

综述 Reviews

植物miRNA介导磷信号转导的研究进展

雷凯健^{1,2}, 安国勇^{1,*}河南大学¹生命科学学院, 棉花生物学国家重点实验室, ²药学院, 河南开封475004

摘要: MicroRNA (miRNA)是一类新型的调控靶基因表达的小分子RNA, 参与调节植物的生长发育和抗逆反应等多种生理过程。近年来, 随着miR399调节植物磷平衡分子机制的发现, 人们开始广泛关注miRNA在低磷信号转导和磷平衡中的作用。本文基于近几年的研究进展, 综述miR399、miR827等磷响应miRNA在低磷信号转导以及调节磷平衡过程中的作用和分子生理机制。

关键词: miRNA; 低磷胁迫; 磷平衡

Advances in miRNAs Mediated Phosphate Signaling in Plants

LEI Kai-Jian^{1,2}, AN Guo-Yong^{1,*}¹College of Life Sciences, State Key Laboratory of Cotton Biology, ²Pharmacy College, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are short RNA chains which are emerging as important regulators of target gene expression and playing fundamental roles in plant growth and development, as well as in adaptation to biotic and abiotic stresses. In recent years, with the discovery of the involvement of miR399 in phosphate homeostasis, the important role of miRNAs in phosphate signaling and phosphate homeostasis has aroused wide attention. Based on the research progress in recent years, this report reviews the mechanism of miRNAs mediating low phosphate signal transduction and regulating phosphate homeostasis.

Key words: miRNA; low Pi stress; Pi homeostasis

Micro-RNAs (miRNAs)是内源性单链小分子RNA, 长度为21~24 nt, 由发夹结构的前体剪切加工产生(Bartel 2004; Ambros等2003; Zhang等2009), 该加工过程与同样是小分子RNA的siRNA不同。siRNA来源于外源的长链dsRNA, 经过Dicer酶切割形成双链siRNA (Bernstein等2001)。而miRNA在细胞核内由Drosha酶剪切成为70 nt的带有茎环结构的前体miRNA (Lee等2003), 前体miRNA被转运到核外之后, 再由Dicer酶剪切形成成熟miRNA (Hutvagner等2001)。成熟miRNA通过识别并结合靶mRNAs的互补区域, 在转录后水平调节靶基因表达产物的含量。靶mRNAs上的互补区域被称作miRNA响应元件(miRNA response element, MRE), 植物中MRE大多分布在靶基因的编码区、5' UTRs和3' UTRs部位(Rhoades等2002)。miRNA的含量受多种生物及非生物胁迫调节, 成熟的miRNA通过与靶基因的MRE结合参与调节植物的多种生理过程(Sunkar和Zhu 2004; Navarro等2006;

Chiou 2007; Li等2008)。

磷是植物生长发育所必需的大量营养元素。植物生长发育所需的磷主要是从土壤中吸收获得, 虽然土壤中总磷的含量并不低, 但由于土壤中大部分的磷与钙、铁、铝等结合, 形成难溶性、移动性差的结合态磷, 因此土壤中可被植物吸收利用的有效磷含量非常低(Raghothama 1999), 磷营养缺乏是植物生长发育过程中常见的一种逆境胁迫。植物在长期的进化过程中形成了许多适应低磷胁迫策略。例如: 低磷胁迫可诱导植物的侧根及根毛的长度和数量增加, 扩大磷营养的吸收面积; 诱导根部分泌更多有机酸、酶类等物质, 从而将难溶性和不可直接利用磷转换为可溶性磷, 提高土壤有效磷的含量; 诱导磷饥饿响应基因的表

收稿 2014-02-11 修定 2014-07-07

资助 国家自然科学基金(31371426)。

* 通讯作者(E-mail: angy@henu.edu.cn; Tel: 0371-23888901)。

达, 提高磷转运蛋白的含量和活性, 促进植物对磷的吸收和转运(Bates和Lynch 1996; Rausch和Bucher 2002; Ticconi和Abel 2004), 从而实现植物对土壤磷营养的高效利用。近年来研究表明, miRNA作为一类重要信号分子, 响应低磷逆境胁迫, 参与调节磷饥饿相关基因的表达, 进而维持植物体内的磷平衡, 是植物适应低磷胁迫反应的关键调节分子。

1 miR399介导的低磷信号及其在植物磷平衡中的作用

miR399是首个被发现参与介导低磷信号的miRNA分子(Sunkar和Zhu 2004), miR399受低磷胁迫诱导表达, 并作为系统信号分子, 调节磷营养的吸收和转运, 维持植物体内的磷平衡, 是植物适应低磷胁迫反应的关键调节分子。

1.1 miR399及其靶基因

miR399最初是在拟南芥和水稻中被发现的(Sunkar和Zhu 2004; Bari等2006), 进一步的研究表明, 拟南芥基因组中有6个基因位点分别编码*miR399a-f*, 水稻基因组中有11个基因位点编码miR399。拟南芥和水稻中编码miR399的基因可被低磷胁迫特异性地诱导表达, 并参与调解植物体内的磷平衡。在正常的磷营养条件下, 超表达miR399可使拟南芥叶片中的磷含量显著升高, 约为野生型中的3倍, 同时植株也表现出叶片边缘黄化坏死、老叶提前衰老等典型的磷中毒症状(Fujii等2005; Aung等2006; Bari等2006; Chiou等2006)。这些结果表明, 低磷诱导的miR399可促进植物对磷营养的吸收和转运(Fujii等2005)。

作为miR399的靶基因, *PHO2* (*PHOSPHATE 2*)编码的蛋白为泛素连接酶E2。*PHO2*基因的5' UTR区含有5个miR399的识别位点, miR399通过识别和结合这些位点, 调节*UBC24/PHO2*的表达水平和生理功能(Fujii等2005)。已有的实验结果表明, 低磷诱导或超表达miR399都可抑制*PHO2*的表达, *miR399*突变或缺失可阻断低磷胁迫对*PHO2*表达的抑制作用(Bari等2006)。进一步的研究表明, *PHO2*功能缺失突变体和miR399超表达植株具有相似的叶片磷过量积累特性(Aung等2006)。因此, miR399通过调节靶基因*PHO2*表达, 介导低磷胁迫信号, 调节植物体内的磷平衡(Bari等2006)。

*miR399*及其靶基因*PHO2*的同源基因已在水稻、番茄、大豆、菜豆和蒺藜苜蓿等被子植物中

被发现。在这些物种中, miR399的同源基因也可被低磷胁迫诱导表达, *PHO2*同源基因的5' UTR区都含有miR399互补序列(Bari等2006; Lin等2008), 在水稻和菜豆中, *miR399*和*PHO2*的同源基因在响应磷饥饿时, 二者的表达量呈现出负相关性(Valdés-López等2008; Hu等2011)。因此, miR399/*PHO2*调节磷平衡方式是被子植物中一种广泛存在的低磷胁迫适应机制。

1.2 miR399是调节植物磷平衡的系统信号分子

最近研究发现, 低磷胁迫可引起成熟的miR399在油菜和南瓜的韧皮汁液中积累(Lin等2008)。在正常的磷营养条件下, 野生型拟南芥根部的miR399转录产物含量很低, 若将超表达miR399植株的地上部分嫁接到野生型拟南芥的根上, 可引起野生型根部miR399的积累, 该嫁接植株也表现出类似于*pho2*突变体的磷反应表型(Pant等2008)。当野生型植株的地上部分嫁接到miR399超表达植株的根上时, 在植株的茎中检测不到miR399的积累。这表明, miR399作为一个长距离系统信号分子, 通过韧皮部向根部运输, 并传递植株地上部分的低磷信号, 调节根部的靶基因表达和磷的吸收转运(Lin等2008)。

1.3 miR399的活性受靶标模拟机制调节

除*PHO2*之外, 含有miR399互补序列的基因还有*TPSI*家族的*TPSII*和*Mt4*。*TPSII*最初在西红柿中被发现, 之后在蒺藜苜蓿中发现了*Mt4*; 而在拟南芥中却同时发现了*IPS1*和*At4*的存在(Burleigh和Harrison 1997; Liu等1997; Shin等2006)。*IPS1*和*At4*作为非编码RNA, 可被低磷胁迫特异性地诱导表达; 另外, 两者都含有一个长度为23 nt的保守区域, 该区域与miR399的大部分碱基互补, 其中有非互补的碱基存在。为了研究miR399与*IPS1*的mRNA关系, Franco-Zorrilla等(2007)构建了*IPS1*和miR399的超表达转基因植株, 发现超表达miR399虽然能引起*PHO2*的mRNA减少, 却不能引起*IPS1*的mRNA降解, 而超表达*IPS1*能够抑制miR399对*PHO2*的降解, 引起叶片的磷含量降低。利用本氏烟草瞬时表达系统的研究表明, *IPS1*和miR399存在直接的相互作用; 由于*IPS1*与miR399的互补区域多出几个非互补的碱基, 二者在形成互补结构时, 多出的碱基会形成环状结构; 研究表明, 非互补的环状结构使得*IPS1*不能被miR399剪切, 这种

能够与miRNA399结合却不能被降解的*IPSI*被称为模拟靶基因。进一步的研究表明, *IPSI*通过与miR399的结合竞争性地抑制了miR399与*PHO2*转录产物的结合, 阻断了miR399对*PHO2*转录产物剪切, 进而引起*PHO2*转录产物的积累和表达产物生物活性的增强。与*IPSI*相类似, 在低磷条件下, *At4*功能缺失也可引起拟南芥叶片中磷含量上升(Shin等2006)。这种基于靶标模拟(target mimicry)来调节miR399作用的分子机制, 为实现人工合成靶标miRNA来抑制miRNA活性和功能的研究奠定了基础(Todesco等2010), 这也是植物维持体内磷平衡的重要方式。因此, 在低磷胁迫响应过程中, miRNA自身活性受非编码RNA的调节。

1.4 miR399上游调控因子

PHR1 (*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1*)与磷饥饿响应基因*PSR1*同源, 都属于MYB类转录因子。在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中, *PHR1*通过调节多种磷饥饿响应基因的表达来调控个体的低磷反应(Wykoff等1999; Rubio等2001)。在拟南芥中, *phr1*基因的突变可抑制植物的低磷反应和多种低磷响应基因的表达, miR399的5个前体的编码基因在此突变体中的表达量也受到显著抑制。而在磷充足条件下, *phr1*突变体中表达被抑制的一部分基因, 却由于*pho2*的突变其表达又被上调。这表明miR399/*PHO2*位于*PHR1*信号网络的下游(Bari等2006)。

顺式作用元件分析表明, *miR399f*的启动子区含有2个*AtMYB2*的结合位点; 进一步的实验发现, 低磷条件下, *AtMYB2*和*miR399f*的表达模式和组织定位十分相似。体外凝胶迁移实验、体内的瞬时表达分析实验和染色质免疫沉淀实验均表明, *AtMYB2*作为*miR399f*基因转录激活子可直接调控*miR399f*基因的表达和植物的低磷反应(Baek等2013)。因此, 包括*PHR1*和*AtMYB2*在内的多种MYB类转录因子可能作为miR399的上游信号分子, 共同参与调节植物体内的磷平衡。

1.5 miR399/*PHO2*的下游信号途径

*PHO2*作为miR399的靶基因, 其编码的泛素连接酶E2具有蛋白酶的活性; *PHO2*突变可导致拟南芥根部PHT1;8和PHT1;9积累。PHT1;8和PHT1;9是定位在细胞质膜上的磷转运蛋白, 利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术敲除*PHT1;8*基因

可抑制*pho2*突变引起的植株体内磷的积累(Aung等2006; Bari等2006)。因此, PHT1;8和PHT1;9可能位于*PHO2*信号途径的下游, 并作为效应分子维持植物体内的磷平衡。另外, *pho2*的突变也可引起拟南芥叶细胞内编码磷转运蛋白的*PHT2;1*、*PHT3;1*和*PHT3;2*基因以及水稻根中编码磷酸酶和核糖核酸酶的基因表达量升高(Liu等2010; Hu等2011), 这进一步证明了植物磷平衡的众多效应分子可作为miR399/*PHO2*信号途径的下游成分受*PHO2*调节。磷吸收动力学分析表明, *pho2*突变可引起植物对磷吸收的最大速率(V_{max})显著增加, 而磷吸收的动力系数(K_m)却没有明显变化, 也就是说, *pho2*突变只能够引起磷吸收蛋白的数量增加, 却不能够改变磷吸收蛋白本身的特性。因此, *PHO2*是通过调控磷转运蛋白的数量来调节植物对磷的吸收和体内磷平衡(Aung等2006)。Huang等(2013)通过膜蛋白组学技术和免疫印迹方法筛选分析*PHO2*的下游组分的实验结果, 进一步证实了*pho2*的突变和蛋白功能缺失可引起PHT1 (*PHOSPHATE TRANSPORTER 1*)家族(PHT1;1、PHT1;2、PHT1;3和PHT1;4)和PHF1 (*PHOSPHATE TRANSPORTER FACILITATOR 1*)蛋白的积累。这为认识miR399/*PHO2*调节下游的分子机制提供了更为直接的证据。

Liu等(2012)通过EMS诱变*pho2*突变体的方法, 筛选寻找*PHO2*的抑制子和*PHO2*下游的信号分子, 该实验筛选得到的两个突变体都是由*PHO1*错义突变所引起的。已有的研究表明, *PHO1*负责磷转运过程中磷在木质部的装载(Poirier等1991; Delhaize和Randall 1995)。Liu等(2012)发现, *pho2*的突变可促进*PHO1*蛋白的积累。蛋白质合成抑制剂环己酰亚胺处理后, 野生型植株中的*PHO1*迅速降解, 而*pho2*的突变可导致*PHO1*降解速率降低。半胱氨酸蛋白酶抑制子E-64d处理实验表明, *PHO1*降解是依赖于*PHO2*的泛素连接酶活性。另外, 在本氏烟草叶片的瞬时表达系统中发现, 部分*PHO1*与*PHO2*蛋白共定位于细胞内膜上, 并且在此互作。因此, 定位于内膜上的*PHO2*可在翻译后水平上调节*PHO1*蛋白的含量和活性, *PHO1*也作为miR399/*PHO2*信号途径的一个下游成分, 直接参与调节植物的磷平衡。

2 miR827以氮依赖的方式来维持植物的磷平衡

与miR399相似, miR827被缺磷特异地诱导大

量表达(Hsieh等2009)。miR827的靶基因所编码的蛋白含有SPX结构域。在酵母中, SPX结构蛋白参与低磷信号的感知和磷转运的调节;植物中的SPX结构蛋白可响应磷浓度的变化并负责磷在木质部的装载(Hamburger等2002; Duan等2008)。在拟南芥中, miR827的靶基因*NLA* (*NITROGEN LIMITATION ADAPTATION*)编码一个N-端含有SPX结构域、C-端含有一个RING结构域的蛋白, 该RING结构域具有泛素连接酶E3的连接酶活性(Peng等2007; Yaeno和Iba 2008; Hsieh等2009; Pant等2009); 缺磷胁迫可引起*NLA*表达下调(Hsieh等2009; Kant等2011)。NLA作为首个被发现参与缺氮响应的miRNA靶蛋白, *nla*突变体在低氮条件下表现出早衰的表型特征(Peng等2007); *PHF1*或者*PHT1;1*突变体可以抑制缺氮诱导的*nla*突变体的早衰表型; 进一步研究发现, *nla*突变体早衰的表型是由于磷过量积累所引起的。在低氮条件下, miR827超表

达植株出现与*nla*突变体相一致的磷过量表型。Lin等(2013)的研究表明, NLA和PHT1s在细胞质膜上发生互作, *nla*突变可引起PHT1家族的内吞和泛素化作用减弱, 这表明NLA介导了质膜上PHT1s的泛素化过程。因此, miR827/NLA以氮依赖的方式来维持植物的磷平衡(Kant等2011), miR827/NLA可能是氮/磷信号通路链接节点。

Kant等(2011)发现*pho2*突变体也具有氮依赖的磷积累表型, *nla/pho2*双突变体出现与*nla*和*pho2*突变体相似的磷过量特征, 因此, NLA和PHO2在功能上同处于一个信号网络中。虽然两者的细胞定位不同, 功能独立, 但NLA与PHO2可以协同调控PHT1s的蛋白量和磷的吸收(Lin等2013)。Park等(2014)的研究表明, 在磷充足条件下, NLA和PHO2以伴侣关系共同促进PHT1;4的泛素化降解; 在低磷条件下, 它们分别被miR827和miR399降解, 抑制二者对PHT1;4的降解作用, 从而促进植物对磷的吸收和转运(图1)。

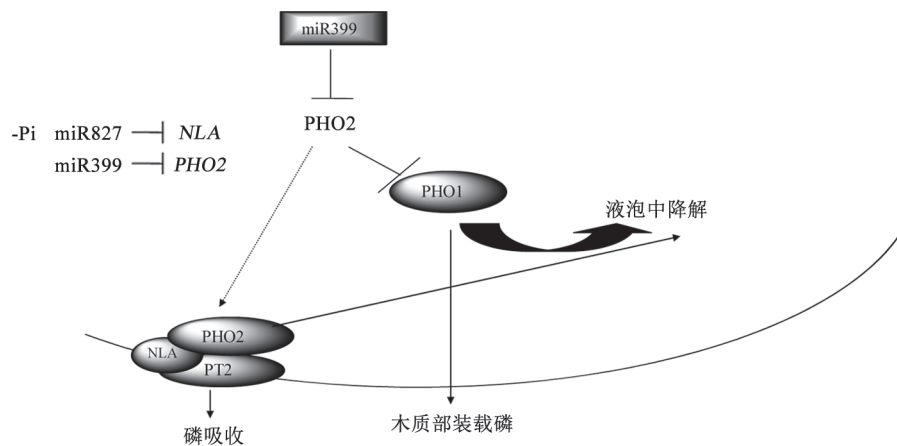


图1 PHO2通过NLA和PHO1调控磷吸收和转运的模式

Fig.1 The model of Pi uptake and root-to-shoot Pi translocation through NLA and PHO1 by PHO2

水稻中的miR827 (*osa-miR827*)同样被低磷胁迫诱导表达, 但其表达具有组织结构的特异性。*osa-miR827*的靶基因*OsSPX-MFS1*和*OsSPX-MFS2*所编码蛋白具有特异的结构特征, 这些蛋白的N-端是SPX结构域, C-端含有MFS结构域, 称之为SPX-MFS蛋白, 这类蛋白可能与无机磷的感知和转运有关(Marger和Saier 1993; Lin等2010)。通过对*osa-miR827*的超表达植株和缺失突变体分析发现, *osa-miR827*负调控*OsSPX-MFS1*和*OsSPX-MFS2*的表达, 但在低磷条件下, *OsSPX-MFS1*

表达下调, 而*OsSPX-MFS2*表达上调。这表明, 低磷条件下*osa-miR827*对两个靶基因的调节具有相对复杂的机制; 根据原位杂交等实验的结果推测, 这一复杂的调控特征可能与相关基因表达的时空特性有关(Lin等2010)。

3 其他miRNA的低磷响应特征

随着miR399和miR827参与调节磷平衡的分子机制的发现, 其他一些参与磷响应的miRNA家族也通过基因芯片、高通量小RNA测序、qRT-PCR及Northern杂交等实验被鉴定出来。其中大部

分miRNA具有类似的低磷响应特性, 但也有一些种类的miRNA对低磷的响应具有物种、组织或器官的特异性。例如, miR395在拟南芥幼苗中的表达被低磷胁迫抑制, 而在白羽扇豆中则被低磷诱导上调

(Hsieh等2009; Zhu等2010)。这些miRNA的靶基因编码的蛋白大多为转录因子, 也有部分miRNA的靶基因编码生物或非生物胁迫的响应因子或酶类, 这些酶类可参与蛋白的修饰与降解过程(表1)。

表1 响应低磷胁迫的miRNA及其已知靶蛋白汇总

Table 1 Summary of PSR miRNA families which target genes are known

miRNA家族	靶蛋白	物种及响应低磷的表达情况	参考文献
miR156	SPL转录因子家族	拟南芥: 根(+); 白羽扇豆: 根(+), 叶(-); 玉米: 根(+); 大麦: 根(+)	Kuo和Chiou 2011; Hackenberg等2013
miR157	SPL转录因子家族	菜豆: 节结(+)	Kuo和Chiou 2011
miR159	TCP转录因子家族	白羽扇豆: 根(+), 茎(-), 叶(-); 大豆: 根(-)	Kuo和Chiou 2011; Xu等2013
miR160	生长素响应因子(ARFs)	白羽扇豆: 根(+), 叶(-)	Kuo和Chiou 2011
miR164	NAC转录因子	白羽扇豆: 根(+), 幼苗叶(-), 叶(-)	Kuo和Chiou 2011
miR166	HD-ZIP转录因子	白羽扇豆: 根(+), 茎(-), 叶(-); 大豆: 根(-)	Kuo和Chiou 2011
miR167	生长素响应因子(ARFs)	白羽扇豆: 根(+), 叶(-)	Kuo和Chiou 2011
miR168	Argonaute (AGO1)	白羽扇豆: 根(+), 叶(+); 大麦: 幼苗叶(+)	Kuo和Chiou 2011; Hackenberg等2013
miR169	NFYA转录因子	拟南芥: 幼苗(-), 根(-), 幼苗叶(-); 水稻: 根(-), 幼苗叶(-); 油菜: 韧皮汁(-)	Kuo和Chiou 2011; Pant等2009; Secco等2013
miR171	SCARCROW类转录因子	白羽扇豆: 茎(+), 叶(+)	Kuo和Chiou 2011
miR172	AP2转录因子	番茄: 叶(-)	Kuo和Chiou 2011
miR319	TCP转录因子	白羽扇豆: 根(+), 茎(-); 番茄: 根(+), 叶(-); 大豆: 根(-)	Kuo和Chiou 2011
miR390	生长素响应因子(ARFs)	白羽扇豆: 根(-)	Kuo和Chiou 2011
miR394	F-框蛋白	番茄: 根(+)	Kuo和Chiou 2011
miR395	ATP硫酸化酶和硫酸转运子	拟南芥: 根(-), 幼苗叶(-); 白羽扇豆: 根(-), 茎(+), 叶(+)	Kuo和Chiou 2011
miR396	生长调节因子(GRF)	白羽扇豆: 根(+), 叶(-)	Kuo和Chiou 2011
miR397	漆酶和 β -6-微管蛋白	白羽扇豆: 叶(-); 菜豆: 叶(-)	Kuo和Chiou 2011
miR398	铜/锌过氧化物歧化酶和细胞色素c氧化酶亚基V	拟南芥: 幼苗(-), 根(-), 幼苗叶(-); 番茄: 叶(+); 大豆: 根(-); 菜豆: 叶(-)	Kuo和Chiou 2011
miR399	泛素连接酶2	拟南芥: 幼苗(+), 根(+), 幼苗叶(+); 蒺藜苜蓿、菜豆、大豆: 根(+), 叶(+); 柳枝稷: 幼苗叶(+); 白羽扇豆: 叶(+); 番茄: 根(+), 茎(+), 叶(+); 水稻: 根(+), 幼苗叶(+); 玉米: 根(+); 大麦: 根(+), 幼苗叶(+); 油菜: 韧皮汁(+); 小麦: 根(+), 叶(+)	Kuo和Chiou 2011; Hackenberg等2013; Pant等2009; Xu等2013; Oono等2013
miR778	SET结构域蛋白	拟南芥: 幼苗(+), 根(+), 幼苗叶(+)	Kuo和Chiou 2011
miR827	泛素连接酶3 (NLA)	拟南芥: 幼苗(+), 根(+), 幼苗叶(+); 水稻: 根(+), 幼苗叶(+); 大麦: 幼苗叶(+); 油菜: 韧皮汁(+)	Hackenberg等2013; Kuo和Chiou 2011; Pant等2009
miR828	TAS4	拟南芥: 幼苗叶(+)	Kuo和Chiou 2011
miR2111-5p	F-框蛋白	拟南芥: 幼苗(+), 根(+), 幼苗叶(+); 大豆: 根(+), 叶(+); 油菜: 韧皮汁(+)	Kuo和Chiou 2011; Pant等2009; Xu等2013
miR6250	未知功能蛋白	水稻: 幼苗叶(+), 根(+)	Secco等2013
Zm-miRNA1	锌指蛋白	玉米: 根(+)	Zhang等2012
Zm-miRNA2	WRKY转录因子	玉米: 根(+)	Zhang等2012
Zm-miRNA3	小GTP酶家族	玉米: 根(+)	Zhang等2012
Zm-miRNA4	WD40结构域蛋白	玉米: 根(+)	Zhang等2012
Zm-miRNA5	硫氧还蛋白	玉米: 根(+)	Zhang等2012
Zm-miRNA6	谷胱甘肽转硫酶	玉米: 根(+)	Zhang等2012
Zm-miRNA7	bHLH蛋白	玉米: 根(+)	Zhang等2012
Zm-miRNA8	类蛋白激酶	玉米: 根(+)	Zhang等2012
Zm-miRNA9	α/β 水解酶	玉米: 根(+)	Zhang等2012

“+”表示表达量上调;“-”表示表达量下调。

miRNA的成熟过程是一个剪切加工过程。在此过程中,前体miRNA互补链中的一条链被降解,另一条链最终形成一条成熟的miRNA (Park等2005; Yu等2005)。比较特殊的是,miR2111在成熟后,仍以大量的互补链形式存在。通过RLM 5'-RACE实验发现, *At3g27150*基因是miR2111的靶基因,其转录产物可被miR2111剪切。虽然miR2111在缺磷时被特异性大量诱导,但其靶基因并没有呈现出与miR2111负相关的表达特性(Hsieh等2009),推测miR2111对*At3g27150*的调控可能存在时空特异性,也可能是在翻译水平上进行调控。除拟南芥之外,在芜菁、蒺藜苜蓿、百脉根、大豆、葡萄中也发现miR2111的同源物。miR2111的保守性表明,它也是植物响应低磷胁迫的重要调节分子(Hsieh等2009; Xu等2013)。

低磷诱导产生的miR828可剪切Trans-Acting siRNA Gene 4 (TAS4)产生小分子干扰RNA (ta-siRNAs)。TAS4-siRNA81(-)的靶基因是一系列MYB家族的基因,包括*PAP1*、*PAP2*和*MYB113*基因,这些基因参与调控花青素合成(Luo等2012)。低磷胁迫诱导这些MYB家族的基因表达可激活花青素的合成;而*PAP1/MYB75*的表达量上升又可以进一步激活miR828和TAS4的表达和TAS4-siRNA81(-)增加,进而又反馈抑制自身MYB家族的基因表达(Hsieh等2009),维持植物体内磷的动态平衡。

在拟南芥和油菜中,miR169及其靶基因NF-YA受低磷胁迫抑制(Hsieh等2009; Pant等2009),暗示miR169可能作为一个负调控信号分子,参与植物的低磷胁迫反应过程。此外,在拟南芥中,miR169及NF-YA还参与低氮胁迫和调控根形态发育(Zhao等2011; Sorin等2014);在大豆中,miR169的靶基因*GmNFYA3*是响应干旱胁迫的正调控子(Ni等2014);在玉米中,miR169及其靶基因*ZmNF-YA*与植物的干旱、ABA及盐胁迫反应有关(Luan等2014)。这表明miR169及其靶基因具有功能多样性。

SPL (SQUAMOSA promoter binding like)家族蛋白是植物特有的一类多功能性的转录因子家族,其中的11个SPL基因受miRNA156调控。虽然已经证明miR156/SPL作为重要信号分子调节植物生长发育(Yang等2011; 李明等2013),但miR156在植物

根部受低磷胁迫诱导表达的实验结果暗示miR156/SPL可能是植物适应低磷胁迫的重要信号分子(Hsieh等2009)。本实验室近期的研究结果表明,miR156/SPL可直接参与调节拟南芥响应低磷胁迫的反应过程(待发表)。

4 展望

磷是植物生长发育所必需的大量元素之一,植物的磷素主要是以无机磷的形式从土壤中吸收获得。但由于土壤中可被植物吸收利用的有效磷含量很低,低磷胁迫已成为制约农业生产的世界性难题。miRNA399在植物应对低磷胁迫反应中的作用及其分子机制研究,为建立土壤磷高效作物新品系奠定理论基础。随着高通量测序技术和计算机分析软件的发展,人们已认识到多种miRNA参与植物的低磷胁迫反应过程。由于miRNA及其靶基因的多样性决定了miRNA信号途径的复杂性,要认清miRNA在植物体内磷平衡过程中的具体机制还需要开展更多的研究工作。

参考文献

- 李明, 李长生, 赵传志, 李爱芹, 王兴军(2013). 植物SPL转录因子研究进展. 植物学报, 48 (1): 107~116
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M et al (2003). A uniform system for microRNA annotation. RNA, 9 (3): 277~279
- Aung K, Lin SI, Wu CC, Huang YT, Su CI, Chiou TJ (2006). *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. Plant Physiol, 141 (3): 1000~1011
- Baek D, Kim MC, Chun HJ, Kang S, Park HC, Shin G, Park J, Shen M, Hong H, Kim WY et al (2013). Regulation of *miR399f* transcription by AtMYB2 affects phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 161 (1): 362~373
- Bari R, Datt Pant B, Stitt M, Scheible WR (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. Plant Physiol, 141 (3): 988~999
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116 (2): 281~297
- Bates TR, Lynch JP (1996). Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. Plant Cell Environ, 19 (5): 529~538
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature, 409 (6818): 363~366
- Burleigh S, Harrison M (1997). A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. Plant Mol Biol, 34 (2): 199~208
- Chiou TJ (2007). The role of microRNAs in sensing nutrient stress.

- Plant Cell Environ, 30 (3): 323~332
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL (2006). Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. Plant Cell, 18 (2): 412~421
- Delhaize E, Randall PJ (1995). Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 107 (1): 207~213
- Duan K, Yi K, Dang L, Huang H, Wu W, Wu P (2008). Characterization of a sub-family of *Arabidopsis* genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. Plant J, 54 (6): 965~975
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, Garcia JA, Paz-Ares J (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. Nat Genet, 39 (8): 1033~1037
- Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. Curr Biol, 15 (22): 2038~2043
- Hackenberg M, Huang PJ, Huang CY, Shi BJ, Gustafson P, Langridge P (2013). A comprehensive expression profile of microRNAs and other classes of non-coding small RNAs in barley under phosphorus-deficient and -sufficient conditions. DNA Res, 20 (2): 109~125
- Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber Petetot J, Somerville C, Poirier Y (2002). Identification and characterization of the *Arabidopsis PHO1* gene involved in phosphate loading to the xylem. Plant Cell, 14 (4): 889~902
- Hsieh LC, Lin SI, Shih AC, Chen JW, Lin WY, Tseng CY, Li WH, Chiou TJ (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. Plant Physiol, 151 (4): 2120~2132
- Hu B, Zhu C, Li F, Tang J, Wang Y, Lin A, Liu L, Che R, Chu C (2011). *LEAF TIP NECROSIS 1* plays a pivotal role in regulation of multiple phosphate starvation responses in rice. Plant Physiol, 156 (3): 1101~1115
- Huang TK, Han CL, Lin SI, Chen YJ, Tsai YC, Chen YR, Chen JW, Lin WY, Chen PM, Liu TY et al (2013). Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* roots. Plant Cell, 25 (10): 4044~4060
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. Science, 293 (5531): 834~838
- Kant S, Peng M, Rothstein SJ (2011). Genetic regulation by NLA and microRNA827 for maintaining nitrate-dependent phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. PLoS Genet, 7: e1002021
- Kuo HF, Chiou TJ (2011). The role of microRNAs in phosphorus deficiency signaling. Plant Physiol, 156 (3): 1016~1024
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S et al (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, 425 (6956): 415~419
- Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK (2008). The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. Plant Cell, 20 (8): 2238~2251
- Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC, Chiou TJ (2008). Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. Plant Physiol, 147 (2): 732~746
- Lin SI, Santi C, Jobet E, Lacut E, El Kholti N, Karlowski WM, Verdeil JL, Breitler JC, Perin C, Ko SS et al (2010). Complex regulation of two target genes encoding SPX-MFS proteins by rice miR827 in response to phosphate starvation. Plant Cell Physiol, 51 (12): 2119~2131
- Lin WY, Huang TK, Chiou TJ (2013). *NITROGEN LIMITATION ADAPTATION*, a target of microRNA827, mediates degradation of plasma membrane-localized phosphate transporters to maintain phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. Plant Cell, 25 (10): 4061~4074
- Liu C, Muchhal US, Raghothama KG (1997). Differential expression of *TPS11*, a phosphate starvation-induced gene in tomato. Plant Mol Biol, 33 (5): 867~874
- Liu F, Wang Z, Ren H, Shen C, Li Y, Ling HQ, Wu C, Lian X, Wu P (2010). OsSPX1 suppresses the function of OsPHR2 in the regulation of expression of *OsPT2* and phosphate homeostasis in shoots of rice. Plant J, 62 (3): 508~517
- Liu TY, Huang TK, Tseng CY, Lai YS, Lin SI, Lin WY, Chen JW, Chiou TJ (2012). PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. Plant Cell, 24 (5): 2168~2183
- Luan M, Xu M, Lu Y, Zhang Q, Zhang L, Zhang C, Fan Y, Lang Z, Wang L (2014). Family-wide survey of *miR169s* and *NF-YAs* and their expression profiles response to abiotic stress in maize roots. PLoS One, 9 (3): e91369
- Luo QJ, Mittal A, Jia F, Rock CD (2012). An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in *Arabidopsis*. Plant Mol Biol, 80 (1): 117~129
- Marger MD, Saier MH (1993). A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. Trends Biochem Sci, 18 (1): 13~20
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. Science, 312 (5772): 436~439
- Ni Z, Hu Z, Jiang Q, Zhang H (2013). *GmNFYA3*, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. Plant Mol Biol, 82 (1~2): 113~129
- Oono Y, Kobayashi F, Kawahara Y, Yazawa T, Handa H, Itoh T, Matsumoto T (2013). Characterisation of the wheat (*Triticum aestivum* L.) transcriptome by *de novo* assembly for the discovery of phosphate starvation-responsive genes: gene expression in Pi-stressed wheat. BMC Genomics, 14: 77
- Pant B, Buhtz A, Kehr J, Scheible W (2008). MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. Plant J, 53 (5): 731~738
- Pant BD, Musialak-Lange M, Nuc P, May P, Buhtz A, Kehr J, Walther D, Scheible WR (2009). Identification of nutrient-responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive re-

- al-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol*, 150 (3): 1541~1555
- Park BS, Seo JS, Chua NH (2014). NITROGEN LIMITATION ADAPTATION recruits PHOSPHATE2 to target the phosphate transporter PT2 for degradation during the regulation of *Arabidopsis* phosphate homeostasis. *Plant Cell*, 26 (1): 454~464
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (10): 3691~3696
- Peng M, Hannam C, Gu H, Bi YM, Rothstein SJ (2007). A mutation in *NLA*, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of *Arabidopsis* to nitrogen limitation. *Plant J*, 50 (2): 320~337
- Poirier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J (1991). Mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol*, 97 (3): 1087~1093
- Raghothama KG (1999). Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50: 665~693
- Rausch C, Bucher M (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 216 (1): 23~37
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110 (4): 513~520
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín A, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev*, 15 (16): 2122~2133
- Secco D, Jabnourne M, Walker H, Shou H, Wu P, Poirier Y, Whelan J (2013). Spatio-temporal transcript profiling of rice roots and shoots in response to phosphate starvation and recovery. *Plant Cell*, 25 (11): 4285~4304
- Shin H, Shin H, Chen R, Harrison M (2006). Loss of *At4* function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *Plant J*, 45 (5): 712~726
- Sorin C, Declerck M, Christ A, Blein T, Ma L, Lelandais-Brière C, Fransiska N, Beeckman T, Crespi M, Hartmann C (2014). A miR169 isoform regulates specific NF-YA targets and root architecture in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 202 (4): 1197~1211
- Sunkar R, Zhu JK (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16 (8): 2001~2019
- Ticconi CA, Abel S (2004). Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends Plant Sci*, 9 (11): 548~555
- Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, Weigel D (2010). A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 6 (7): e1001031
- Valdés-López O, Arenas-Huertero C, Ramírez M, Girard L, Sánchez F, Vance CP, Luis Reyes J, Hernández G (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant Cell Environ*, 31 (12): 1834~1843
- Wykoff DD, Grossman AR, Weeks DP, Usuda H, Shimogawara K (1999). Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (26): 15336~15341
- Xu F, Liu Q, Chen LY, Kuang JB, Walk T, Wang JX, Liao H (2013). Genome-wide identification of soybean microRNAs and their targets reveals their organ-specificity and responses to phosphate starvation. *BMC Genomics*, 14: 66
- Yaeno T, Iba K (2008). BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant Physiol*, 148 (2): 1032~1041
- Yang L, Conway SR, Poethig RS (2011). Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156. *Development*, 138 (2): 245~249
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307 (5711): 932~935
- Zhang B, Stellwag EJ, Pan X (2009). Large-scale genome analysis reveals unique features of microRNAs. *Gene*, 443 (1~2): 100~109
- Zhang ZM, Lin HJ, Shen Y, Gao J, Xiang K, Liu L, Ding HP, Yuan GS, Lan H, Zhou SF et al (2012). Cloning and characterization of miRNAs from maize seedling roots under low phosphorus stress. *Mol Biol Rep*, 39 (8): 8137~8146
- Zhao M, Ding H, Zhu JK, Zhang F, Li WX (2011). Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 190 (4): 906~915
- Zhu YY, Zeng HQ, Dong CX, Yin XM, Shen QR, Yang ZM (2010). MicroRNA expression profiles associated with phosphorus deficiency in white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Sci*, 178 (1): 23~29