

## 冬小麦抗寒相关microRNA生物信息学预测分析与表达特征的验证

卢秋巍<sup>1</sup>, 徐庆华<sup>1</sup>, 钟昊<sup>2</sup>, 苍晶<sup>1,\*</sup>, 于晶<sup>1</sup>, 郑成成<sup>1</sup>, 吴冰<sup>1</sup>, 朱会杰<sup>1</sup>, 冯明芳<sup>1</sup>, 梅琳<sup>1</sup>, 孙仙泽<sup>1</sup>

<sup>1</sup>东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨150030; <sup>2</sup>广西大学生命科学学院, 南宁530000

**摘要:** 东北农业大学培育的自主知识产权的冬小麦新品种‘东农冬麦1号’(‘dn1’)是强抗寒(能耐-30 °C低温)栽培品种。本研究应用BLAST、UNAFOLD等生物信息学软件从冬小麦EST库中分析和预测抗寒相关miRNA及其靶基因, 并利用qRT-PCR技术验证表达丰度高、差异显著的miRNA及其靶基因的表达特性。结果显示: 生物信息学软件分析和预测到16条抗寒相关miRNAs, 隶属于15个家族、对应137个靶基因; 其中miR1118、miR1120、miR1128、miR1133和miR1139表达丰度高、差异显著, 上述5个miRNA在-10 °C时表达量显著下降、在-25 °C时表达量显著升高, 但是其相应靶基因在-10 °C时表达量显著升高, 在-25 °C时显著下降。可见, 上述5个miRNA及其靶基因响应低温胁迫, 与‘dn1’的强抗寒性相关。本研究为冬小麦响应低温胁迫下miRNA调控的分子机制奠定基础。

**关键词:** ‘东农冬麦1号’(‘dn1’); 抗寒性; microRNAs (miRNAs); 生物信息学; 表达特性

## Bioinformatics and Expression Characteristic Analysis of Cold Resistance Related microRNAs in Winter Wheat

LU Qiu-Wei<sup>1</sup>, XU Qing-Hua<sup>1</sup>, ZHONG Hao<sup>2</sup>, CANG Jing<sup>1,\*</sup>, YU Jing<sup>1</sup>, ZHENG Cheng-Cheng<sup>1</sup>, WU Bing<sup>1</sup>, ZHU Hui-Jie<sup>1</sup>, FENG Ming-Fang<sup>1</sup>, MEI Lin<sup>1</sup>, SUN Xian-Ze<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences, Guangxi University, Nanning 530000, China

**Abstract:** The winter wheat variety ‘Dongnongdongmai 1’ (‘dn1’), cultivated by Northeast Agricultural University with independent intellectual property rights, was strong cold tolerance (resistance -30 °C low temperature) cultivars. This study analysed and forecasted miRNA and its target genes related to cold resistance from ‘dn1’ EST by BLAST, UNAFOLD bioinformatics software. Quantitative RT-PCR were applied to verify expression characteristic of miRNAs and their target genes which had high expression abundance and apparent differentiation. The result showed that 16 miRNAs, belonging to 15 families and corresponding 137 target genes, could respond to cold stress. Among them miR1118, miR1120, miR1128, miR1133 and miR1139 had higher expression abundance and more apparent differentiation, whose expression levels were significantly decreased at -10 °C and significantly rose at -25 °C. The expression level of their corresponding target genes were significantly increased at -10 °C, while decreased significantly at -25 °C. It was suggested that the selected five miRNA and their target genes could respond to low temperature stress, which associated with the strong cold tolerance of ‘dn1’. This study laid the foundation for molecular mechanism of microRNAs regulation in winter wheat under low temperature stress response.

**Key words:** ‘Dongnongdongmai 1’ (‘dn1’); cold-resistant; microRNAs (miRNAs); bioinformatics; expression characterization

microRNA (miRNA)是一类在转录后调控中发挥重要作用的非编码小RNA, 可沉默目标基因表达, 是植物抗逆性调控网络的重要组成部分(Griffiths-Jones等2008)。低温等多种逆境胁迫均能够调控miRNA的表达, 部分miRNA还直接参与植物逆境胁迫应答反应(Chiou等2005; Navarro等2006; Sunkar等2006; 吕帝瑾等2013)。miRNA的研究以生物实验和生物信息学分析两种方法为主

收稿 2015-02-09 修定 2015-03-26

资助 国家自然科学基金(31471423)、国家自然科学基金人才培养科研训练项目(J1210069)、国家自然科学基金人才培养条件建设项目(J1120002)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金课题(20112325110003)、黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541002)、黑龙江省自然科学基金(C201418)和东北农业大学科学研究基金(2012RCB102)。

\* 通讯作者(E-mail: cangjing2003@163.com; Tel: 0451-55191723)。

(Taylor和Zhang等2011)。生物信息学分析是采用生物信息学软件预测miRNA及其靶基因;生物实验主要是通过RT-PCR、5'-RACE等方法验证候选miRNA及其靶基因。最终确定该miRNA的准确性(Wang等2004; Zhang 2005)。miRNA在植物中具有较高的进化保守性,预测会相对简单且准确(黄儒等2014; 安凤霞等2014)。

东北农业大学培育的自主知识产权的冬小麦新品种‘东农冬麦1号’(‘dn1’)是首例能在黑龙江省高寒地区越冬(返青率85%以上)的强抗寒(能耐-30℃低温)栽培品种(苍晶等2011)。本文利用生物信息学预测实验方法初步研究了‘东农冬麦1号’抗寒相关miRNAs,以期挖掘‘dn1’的优良抗寒miRNA资源,对初步揭示miRNAs调控下‘dn1’强抗寒的分子机制具有重大意义。

## 材料与方法

### 1 实验材料

实验材料为冬小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘东农冬麦1号’,由东北农业大学小麦育种实验室提供。实验材料于2012~2013年种于东北农业大

学实验基地。完全区组设计,3次重复,小区行长2 m,10行区,行距0.2 m,播种量450粒·m<sup>-2</sup>,深播5 cm,常规管理。待温度达到连续10 d最低温度平均为5、-10、-25℃时,于次日上午取样。随机选取长势一致的麦苗,蒸馏水冲洗后剪取整个根茎,液氮速冻,分装后于-80℃冰箱贮存备用。

### 2 miRNAs的预测筛选

#### 2.1 miRNAs序列信息

miRBase (<http://www.mirbase.org/search.shtml>)为microRNA在线数据库,下载包括拟南芥、水稻、玉米、大豆等在内所有已知植物的139 866条miRNA序列。同时为避免miRNA的重复搜索,本研究去除了属于同一个家族并且具有相同序列的miRNA,剩余的miRNA序列被用于预测小麦miRNA的筛选。

#### 2.2 miRNA预测方法

实验室前期构建‘东农冬麦1号’EST数据库,共1 067 291条。miRNA预测方法及预测标准主要参照Wang等(2004),以及Jones-Rhoads和Bartel(2004),图1为流程图。具体流程如下:

(1) EST与植物成熟miRNA数据库进行BLA-

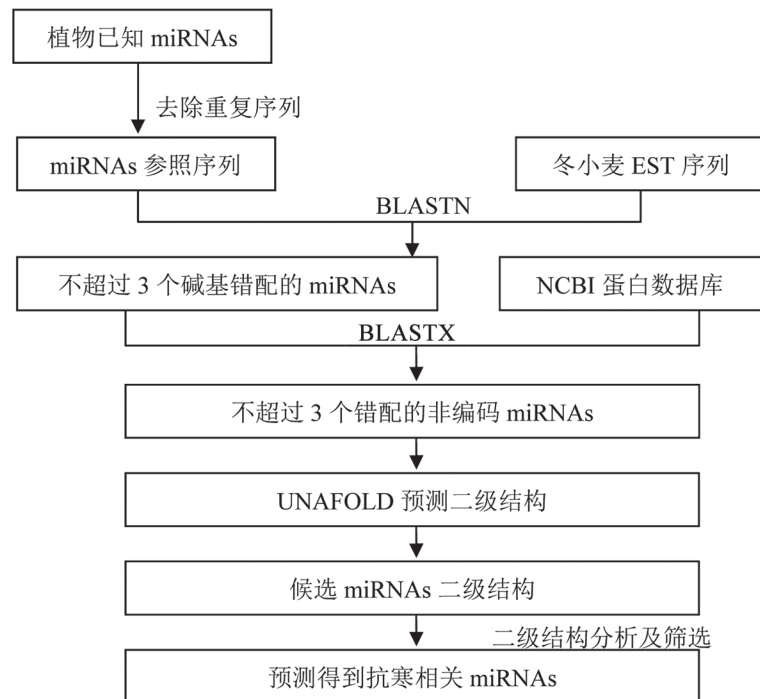


图1 冬小麦miRNAs的生物信息学预测流程

Fig.1 The process of winter wheat miRNAs bioinformatics prediction

STN比对,  $e$ 值设置为 $1e-1$ , 初步筛选可能含有 miRNA 的EST。

(2)将候选EST序列先后与uniprot\_sprot\_plants及uniprot\_trembl\_plants执行BLASTX比对, 去除编码蛋白的EST。

(3)去除编码序列的EST与Rfam执行BLASTN比对, 去除tRNA、rRNA等非编码RNA。

(4)经上述步骤筛选的EST通过UNAFold进行二级结构折叠分析, 计算最小折叠自由能(minimal free energies, MFEs)及最小折叠自由能系数(minimal folding free energy index, MFEI)。

### 3 靶基因预测

本研究利用植物miRNA与其靶基因具有高度的序列互补性为原则的预测软件psRNATarget 软件(<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>), 预测小麦miRNA 的靶基因。设置最大期望值为3, 其他为默认参数; psRNATarget通过罚分机制筛选靶基因(Zhang等2005; 夏伟等2009), 总得分小于3且UPE小于 $25.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的序列为miRNA的潜在靶基因。对于SOMEGI数据库中未作功能注释的mRNA, 本研究将其与NCBI蛋白质数据库BLASTX 比对分析其功能。

### 4 Real-Time PCR

总RNA按照Trizol说明书中方法提取。总RNA (包含小RNA)的反转录利用 miRNA cDNA synthesis kit (宝生物工程有限公, 大连)试剂盒及Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H)试剂盒, 按照操作说明进行; 定量检测利用STBR试剂盒(宝生物工程有限公, 大连)。用U6为miRNA内参基因(Chen等2005; 袁伟等2012), Actin为靶基因内参基因(袁伟等2012)对反转录产物cDNA样品进行归一化。每个样品做2个生物重复, 每个反应各设一个空白对照(cDNA模板空白)所用引物由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成(表1)。

## 实验结果

### 1 预测‘东农冬麦1号’中miRNAs

冬小麦1 067 291条EST序列中去除冗余及过长EST得到的131 583条序列中, 参照标准, 预测得到16条EST序列包含miRNA, 分属于15个miRNA 家族。miRNA家族主要来源于小麦、大麦、黑麦草及二穗短柄草。其中以小麦的miRNA序列居多, 达到13条。miRNA具体信息如表2所示。基因家族为多条小麦EST序列符合miRNA条件。此结果

表1 荧光定量PCR所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in real-time PCR

miRNA	引物序列(5'→3')
miR1118	ACACTCCAGCTGGGCACTACATTGTGAAATT
miR1120	ACACTCCAGCTGGGCACTAIAITTTGAAATG
miR1128	ACACTCCAGCTGGGTACTACTCCCTCCGT
miR1133	ACACTCCAGCTGGGTATATACTCCCTCCGT
miR1139	ACACTCCAGCTGGGGAAGTAACTTAGACTA
反向通用引物	TGGTGTCTGGAGTCG
U6-F	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT
U6-R	GGAACGCTTACGAATTTG
miR1118靶基因-F	TTAGGTGTATCTTGTATCTGTT
miR1118靶基因-R	TGTGAAATGGAGGGAGTA
miR1120靶基因-F	AACCAATGAGACCAACTG
miR1120靶基因-R	CCATAATGTAGTGCTTCCT
miR1128靶基因-F	GGAGCAACAATACGGTAT
miR1128靶基因-R	TTCTGAGTGATGAACCTTCTT
miR1133靶基因-F	TTTAGGAATGGAGGGAGTA
miR1133靶基因-R	GAGGCTTCAACACATATCT
miR1139靶基因-F	TGATGTGGCAAGTAGTTAA
miR1139靶基因-R	CTAAGGCTGGTCATAGTG
ACTIN-F	CCTTAGTACCTTCCAACAGATGT
ACTIN-R	CCAGACAACCTCGCAACTTAGA

表2 ‘东农冬麦1号’中新鉴定的抗寒相关 miRNAs

Table 2 New identification of cold related miRNAs in ‘dn1’

miRNA	miRNA成熟序列(5'→3')	基因ID	位置	LM/nt	LP/nt	MFE/kcal·mol <sup>-1</sup>	MFEI
1117	UUGUCCCGGUUCUUGACACGAACC	gi 143645748	5p	24	118	55.5	1.067
1118	UAAUACAUUUAGGAAUGGAGGGA	gi 93051319	5p	23	140	40.7	1.565
1120	ACGUUCCUAUUAUUAUGGGACGGAA	gi 14169705	3p	24	119	53.4	1.618
1122	UAUAUACAUCCGUAUGUAGU	gi 143579597	3p	20	220	70.5	1.155
1123	UCCGUGAGACCUGGUCUUAUAGA	gi 9623290	3p	23	218	70.9	0.886
1125	AACCAACAAGACCGAAUGUGGCGG	gi 93201760	5p	24	141	52.3	1.136
1126	UUGAAUAUGGACUACAUACGGAU	gi 143535911	3p	23	132	31.6	1.128
1127	UACCUCCAUUCGGAUUAC	gi 93254701	5p	19	150	53.4	1.186
1128	UGGUACUCCUCCGUCCAAA	gi 14332375	5p	21	190	48.7	1.521
1130	ACUCUGUCCAUAAUGUAAGACG	gi 21558555	5p	23	122	46.3	1.543
1131	UAGUACCGGUUCGUGGCGAACC	gi 25275847	5p	22	100	34.5	1.112
1132	UAUUAUGGGACGGAAGGAG	gi 141697051	3p	19	154	56.8	1.494
1133	CUAAUACUCCUCCGUUCCAAA	gi 9422597	5p	22	180	68.9	1.406
1135	CAGCGACAGGUAAUUCGAAUGGA	gi 93254701	3p	24	109	43.7	1.120
1137	UAGUACAAAGUUGAGUCGAG	gi 39563262	3p	20	148	21.0	1.500
1139	GUAGUACAUAAGAGUAGUAACA	gi 32644016	5p	22	216	28.8	1.694

位置: 成熟 miRNA 在前体中的定位; LM: 成熟 miRNA 的长度; LP: 前体序列的长度; MFE: 最小折叠自由能; MFEI: 最小折叠自由能指数。

与有关miRNA预测报道相比(Zhang等2008; Frazier等2010)存在一个miRNA同时对应多个EST序列的现象。

## 2 ‘东农冬麦1号’抗寒相关miRNAs分析

在冬小麦中预测的16条成熟miRNAs的长度为19~24 nt, 符合植物miRNA长度范围16~29 nt (Zhang等2009a)。植物miRNA前体具有较强的多样性。小麦 miRNA前体长度变化范围很大, 在100~220 nt之间, 其中约有79%的miRNA前体长度在100~150 nt之间(表2)。前体长度的不同可能与miRNA基因调控的功能及其合成调控途径相关。从图2可见, 冬小麦miRNA二级结构变化较大, 且都能折叠成二级茎环结构。成熟的miRNA一般定位于前体茎环结构的一条臂上, 预测到的16条miRNA有9条位于5'末端, 7条位于3'末端(表2)。

## 3 ‘东农冬麦1号’ miRNA靶基因的预测及主要功能分析

本研究利用新发现的16条冬小麦 miRNAs, 通过在线软件psRNATarget进行靶基因预测, 共预测到8条小麦miRNAs的137个靶基因。这些靶基因属于不同的基因家族, 主要编码与小麦生长发育、DNA加工、胁迫响应、转录调节、信号转导和跨膜运输等相关的蛋白(表3), 还有一部分靶基

因编码未知功能的蛋白质(未列出), 并且miRNA倾向于靶定转录因子, 其中预测到小麦5个miRNA家族的12条靶基因编码为转录因子, 在冬小麦抗寒机制中起到重要作用。

## 4 不同温度下miRNA及其相应靶基因表达量分析

在16个新发现的冬小麦miRNA中, 选5个(miR1118、1120、1128、1133和1139)表达丰度高、且特异性显著的miRNA做定量分析。图3和图4茎环荧光定量PCR证明, 随温度的降低在-10 °C上述5个miRNA表达量显著下降, 而-25 °C表达量显著升高, 其相应靶基因在-10 °C表达量为显著升高, -25 °C显著下降。表明选取的5个miRNA及其靶基因响应低温胁迫, 表现出温度降低表达量先降后升的趋势, 与实验室其他结果相符合(王健飞等2014), 即在-10 °C为‘东农冬麦1号’抗寒的转折变化温度, 进一步说明miRNA参与到‘东农冬麦1号’的抗寒过程中并发挥作用。

## 讨 论

本研究利用冬小麦EST序列, 采用生物信息学手段同源预测miRNAs, 准确预测得到冬小麦强抗寒相关miRNAs, 预测靶基因中有较多的是转录因子。通常转录因子都是自身反馈调节的诱导型转



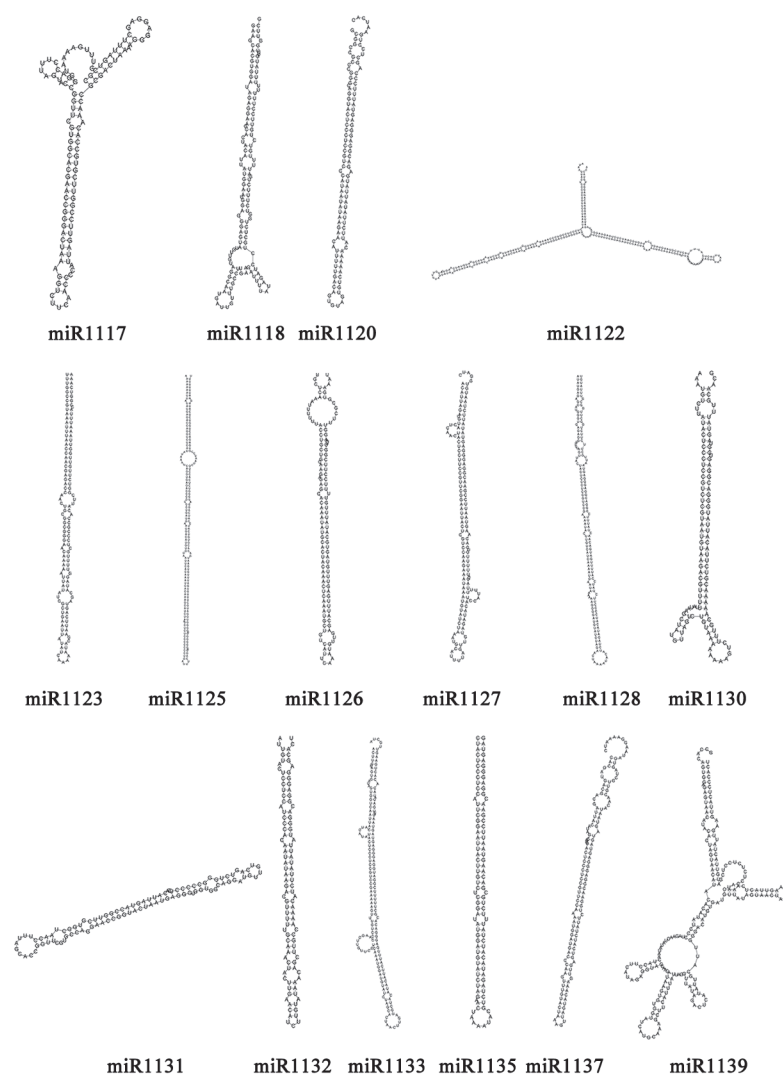


图2 ‘东农冬麦1号’miRNA前体二级结构

Fig.2 Recursor secondary structure of microRNAs in ‘dn1’

录因子, miRNA通过与其互作成为某种活化形式而参与信号转导途径, 通过形成抗寒相关基因表达调控网络而响应逆境的胁迫(郭韬等2011; 武永军等2012)。寒胁迫下, ‘dn1’中表达差异显著的miR1128的靶基因编码CBF (CCAAT结合蛋白, 又称NF-Y或HAP), 是一种特异结合启动子区CCAAT盒的转录因子, 在响应低温胁迫时调节目的基因的转录起始。寒胁迫下, ‘dn1’中表达差异显著的miR1128的靶基因编码的是TecR转录因子, miR1118的靶基因编码HVA22转录因子, Ling等(2013)和陈佳佳等(2014)也发现TecR转录因子和HVA22转录因子参与植物的寒胁迫应答。寒胁迫下, ‘dn1’中表达差异显著的miR1139靶基因为

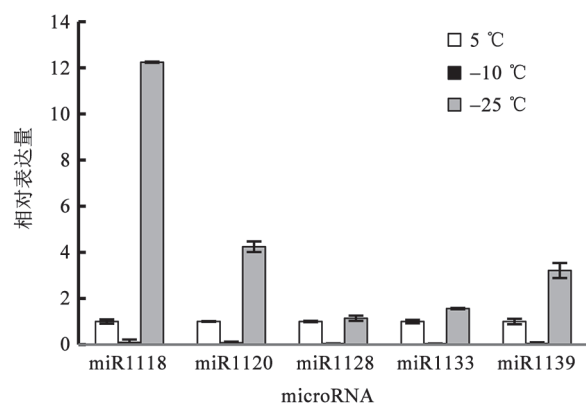
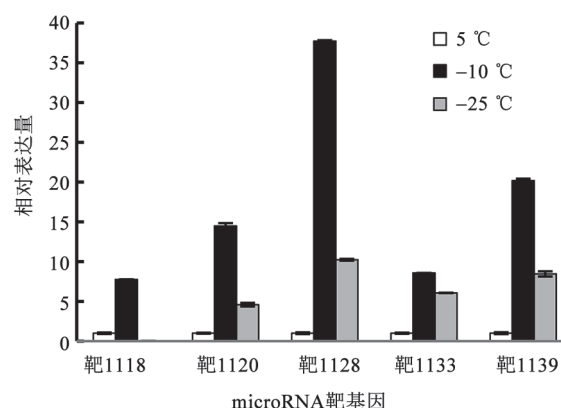
MYB转录因子家族, 它们的功能主要是参与次生代谢的调节、控制细胞的分化、应答激素刺激和外界环境胁迫以及抵抗病原菌的侵害。拟南芥中, miR159的靶基因是MYB33/65, 它可以抑制细胞增殖、可能参与GA诱导的植物细胞程序性死亡(Alonso-Peral等2010)。此外, 王明芳等(2015)研究发现WRKY转录因子对‘dn1’的强抗寒性起到重要调控作用。WRKY转录因子可以通过调控损伤、抗病、衰老等相关基因的表达, 从而参与植物的多种生理生化及生长发育过程, 在植物应对逆境胁迫过程中起到至关重要的作用。

除了转录因子, 预测的‘dn1’的抗寒相关靶基因中还有其他的植物逆境响应蛋白, 如F-box和植

表3 ‘东农冬麦1号’中抗寒相关miRNA 潜在靶标的预测

Table 3 Prediction of target genes of cold resistance miRNAs in ‘dn1’

miRNA	靶蛋白	靶基因功能	靶基因
1118	香叶酰氢化酶	新陈代谢	TC37929
	FOX蛋白	转录因子	TC440827
	谷胱甘肽 S-转移酶	生长调节	TC418995
	HVA22蛋白	转录因子	TC391749
1120	丝氨酸蛋白酶	生长因子	TC392962
	钙调素结合蛋白	胁迫响应、信号转导	TC4857
	S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶	新陈代谢	TC390499
1126	NADPH细胞色素P <sub>450</sub> 还原酶	新陈代谢	TC407053
	DNA聚合酶亚基	生长因子	TC405029
	重结晶抑制蛋白	胁迫响应	TC43811, TC396501
1128	TecR家族转录调节	转录因子	TC412501
	CBF转录因子	转录因子	CK198514
1130	乙醇脱氢酶	新陈代谢	TC38162
1133	DEAD/DEAH解旋酶	新陈代谢	DR731602
1135	果聚糖水解酶	新陈代谢	TC374632
1139	MYB转录因子	胁迫响应、转录因子	TC397585
	丙酮酸脱氢酶复合体	新陈代谢	TC418553

图3 ‘东农冬小麦1号’中抗寒相关miRNA不同温度下的相对表达量( $P<0.05$ )Fig.3 Expression of cold related miRNAs under different temperatures in ‘dn1’ ( $P<0.05$ )图4 ‘东农冬小麦1号’中抗寒相关miRNA靶基因不同温度下的相对表达量( $P<0.05$ )Fig.4 Expression of cold related miRNA target genes under different temperatures in ‘dn1’ ( $P<0.05$ )

物钙调素结合蛋白。寒胁迫下, ‘dn1’中表达差异显著的miR1133及miR1126的靶基因编码的是F-box蛋白。F-box蛋白的功能是通过参与SCF复合体的形成、介导泛素化蛋白底物的特异性识别(秘彩莉等2006; 王秀燕等2008)。可见, ‘dn1’中miR1133及miR1126在相应低温胁迫后、在蛋白质降解过程中发挥关键作用。寒胁迫下, ‘dn1’中表达差异显著的miR1120靶基因是高等植物钙调素结合蛋白, 在自然降温过程中miR1120可通过调控

其靶基因钙调素的表达, 调节细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度, 从而完成低温胁迫下的细胞的信号转导, 增强‘dn1’的抗寒性。Zhang等(2009b)在玉米中也发现了表达丰度较高的miR1120的靶基因是钙调素结合蛋白。综上所述‘东农冬麦1号’中抗寒相关miRNA及其靶基因的作用可通过不同代谢过程及植物自身调节等方面实现其抗寒功能。尤其针对一些miRNA转录因子靶基因的胁迫研究中的作用更为重要(计淑霞等2010)。

本研究筛选出的寒胁迫相关miRNAs, 在冬小麦抗寒研究中报道较少。荧光定量检测分析结果显示, 自然降温过程中, miR1118、1120、1128、1133和1139表达量显著减少; 降温到-10 °C以下后, ‘dn1’通过提高寒胁迫相关miRNAs表达量启动其强抗寒机制、提高‘dn1’抗寒性。本结果与王健飞等(2014)关于‘东农冬麦1号’寒胁迫下miRNA表达模式的研究结果一致。寒胁迫相关miRNA靶基因的荧光定量检测结果显示, miRNA负调控其靶基因表达, 即通过抑制靶基因的表达来提高‘dn1’的抗寒性, 与Yan等(2012)和Sha等(2014)关于逆境下植物miRNA与其靶基因表达模式的研究结果一致。

在本研究的基础上, 拟通过5'-RACE、RNAi、筛选过表达目的基因的转基因植株等实验手段进一步验证寒胁迫相关miRNA及其靶基因提高‘dn1’抗寒性的分子机制。

### 参考文献

- 安凤霞, 卢宝伟, 梁鸣, 唐焕伟, 李富恒(2014). 萱草microRNAs生物信息学及与冷冻相关microRNAs的分析. 植物生理学报, 50 (4): 483-487
- 苍晶, 于晶, 崔红, 王军虹, 张达, 刘丽杰, 李卓夫(2011). 寒地冬小麦对低温逆境的生理适应. 核农学报, 25: 1017-1022
- 陈佳佳, 牟巍, 周树峰, 李晚忱, 付凤玲(2014). 玉米HVA22基因启动子的克隆与功能验证. 核农学报, 28 (4): 560-568
- 郭韬, 李广林, 魏强, 梁永宏(2011). 植物 microRNA功能的研究进展. 西北植物学报, 31 (11): 2349-2351
- 黄儒, 苍晶, 于晶, 卢宝伟, 刘丽杰, 王健飞, 郭人铭, 徐琛(2014). 冬小麦小RNA高通量测序及生物信息学分析. 植物学报, 49 (1): 8-18
- 计淑霞, 戴绍军, 刘炜(2010). 植物应答低温胁迫机制的研究进展. 生命科学, 22 (10): 1013-1019
- 吕帝瑾, 赵佳媛, 陈婧, 钟扬, 南蓬(2013). 植物microRNA的研究进展. 植物生理学报, 49 (9): 847-854
- 秘彩莉, 刘旭, 张学勇(2006). F-box蛋白质在植物生长发育中的功能. 遗传, 28: 1337-1342
- 王健飞, 苍晶, 于晶, 刘丽杰, 黄儒, 郭人铭, 王建超, 徐琛(2014). 外源ABA对东农冬麦1号miRNA表达模式的影响. 麦类作物学报, 34 (3): 311-317
- 王明芳, 李卓夫, 王晓楠, 付连双, 孙莹璐, 王涛(2015). 低温下冬小麦品种间WRKY转录因子的表达特性. 麦类作物学报, 35 (2): 151-158
- 王秀燕, 孙莉萍, 张建, 李辉, 吕文清, 张其清(2008). F-box蛋白家族及其功能. 生命科学, 5 (20): 807-811
- 武永军, 杜江峰, 王晓龙, 方晓峰, 单卫星, 梁宗锁(2012). 糜子miRNAs的生物信息学预测及实验验证. 中国科学C辑: 生命科学, 42 (9): 757-767
- 夏伟, 曹国军, 邵宁生(2009). MicroRNA靶基因的寻找及鉴定方法研究进展. 中国科学C辑: 生命科学, 39 (1): 121-128
- 袁伟, 万红建, 杨悦俭(2012). 植物实时荧光定量PCR内参基因的特点及选择. 植物学报, 47 (4): 427-436
- Alonso-Peral MM, Li JY, Li YJ, Allen RS, Schnippenkoetter W, Ohms S, White RG, Millar AA (2010). The microRNA159 regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 154: 757-771
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR et al (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res, 33 (20): e179
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL (2006). Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. Plant Cell, 18: 412-421
- Frazier TP, Xie FL, Freistaedter A (2010). Identification and characterization of microRNAs and their target genes in bobacco (*Nicotiana tabacum*). Planta, 232 (6): 1289-1308
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008). miR-Base: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res, 36: D154-D158
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Mol Cell, 14 (6): 787-799
- Ling HQ, Zhao SC, Liu DC (2013). Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. Nature, 496: 87-90
- 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: 436-439
- Sha A, Zhao J, Yin K, Tang Y, Wang Y, Wei X, Hong Y, Liu Y (2014). Virus-based microRNA silencing in plants. Plant Physiol, 164: 36-47
- Sunkar R, Girke T, Zhu JK (2005). Identification and characterization of endogenous small interfering RNAs from rice. Nucleic Acids Res, 33: 4443-4454
- Taylor PF, Zhang BH (2011). Identification of plant microRNAs using expressed sequence tag analysis. Methods Mol Biol, 678: 13-25
- Wang JF, Zhou H, Chen YQ, Luo QJ, Qu LH (2004). Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. Nucleic Acids Res, 32 (5): 1688-1695
- Yan J, Gu Y, Jia X, Kang W, Pan S, Tang X, Chen X, Tang G (2012). Effective small RNA destruction by the expression of a short tandem target mimic in *Arabidopsis*. Plant Cell, 24 (3): 1301
- Zhang BH, Pan XP, Stellwag EJ (2008). Identification of soybean microRNAs and their targets. Planta, 229 (1): 161-182
- Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA (2005). Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. Cell Res, 15 (5): 336-360
- Zhang BH, Stellwag EJ, Pan XP (2009a). Large-scale genome analysis reveals unique features of microRNAs. Gene, 443 (1-2): 100-109
- Zhang LF, Chia J, Kumari S (2009b). A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. PLoS Genet, 5 (11): e1000716
- Zhang YJ (2005). MiRU: an automated plant miRNA target prediction server. Nucleic Acids Res, 33 (S2): 701-704