

植物microRNA的长距离移动与养分平衡的系统性调控

曾后清*, 张亚仙, 王慧中, 杜立群

杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州310036

摘要: microRNA (miRNA)是一种广泛存在于动植物体内的长度为20~24个核苷酸的非编码的小RNA。miRNA在植物的生长发育、逆境反应和养分平衡等方面都发挥了非常重要的调节作用。近年来研究表明miRNA作为信号分子可以在细胞间移动,也可以通过韧皮部进行长距离运输。本文简述了植物韧皮液中的miRNA及其对养分胁迫的响应、miRNA的长距离运输及其对养分平衡的系统性调控以及miRNA在植物体内移动的可能的机理,并展望了进一步的研究方向。

关键词: microRNA; 移动; 长距离移动; 韧皮部; 系统性信号; 养分平衡

Systemic Regulation of Nutrient Homeostasis by Long-Distance Movement of Plant microRNAs

ZENG Hou-Qing*, ZHANG Ya-Xian, WANG Hui-Zhong, DU Li-Qun

College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China

Abstract: As a class of small RNAs, microRNAs (miRNAs) are endogenous noncoding RNAs with a length of 20 to 24 nt and exist extensively in animals and plants. miRNAs play critical roles in various developmental and physiological processes in plants, including stress responses and nutrient homeostasis. Over the past years, some miRNAs have been demonstrated to function as signal molecules in a non-cell autonomous manner by moving between cells or over long distance via phloem. In this article, we reviewed the responses of miRNAs in phloem sap to nutrient stress, the systemic regulation of nutrient homeostasis by the long-distance movement of miRNAs, and the possible mechanisms of the movement of miRNAs within plants. We also suggested the perspective on future research based on the current understandings.

Key words: microRNA; movement; long-distance movement; phloem; systemic signal; nutrient homeostasis

高等植物必需的矿质营养元素有14种,其中6种为大量元素(N、P、K、S、Ca、Mg),8种为微量元素(Fe、Mn、Cu、Zn、Ni、B、Mo、Cl)。矿质元素在吸收后被分配至不同的组织,然后直接用于生长代谢或储存在液泡中。缺乏任何一种必需矿质营养元素都会抑制植物生长并使植物表现出营养缺乏的症状,如叶片黄化和坏死等。但矿质营养元素浓度过高也会对植物造成毒害。因此植物体内的各种矿质营养元素必须维持在合适的浓度范围之内。然而土壤中养分的有效性通常受到环境条件如温度、降雨、土壤类型和pH等的影响,使植物所能获取的养分具有很大的波动性。为了应对土壤养分有效性的变化,植物产生了一系列复杂而又精巧的适应机制,比如增强根系对养分的吸收、提高养分的利用率、改变根系形态和调整生物量分配等(Hermans等2006; Miller等2009; Giehl等2014)。植物还通过系统性信号调节

不同组织和器官的养分状况。最先感知养分缺乏的根系可以将相应的信号传递至地上部(shoot),使地上部尽早对养分缺乏做出调整,而地上部也可以将养分需求的信号及时反馈给根系,以确保养分的供应,从而使植物从整体上应对外界养分变化。目前已经发现很多信号物质,比如养分元素本身(硝酸盐、磷酸盐等)、激素(生长素、细胞分裂素等)、蔗糖和microRNA (miRNA)等,可以通过长距离运输系统性调节植物对养分胁迫的反应或调节植物养分的平衡(Giehl等2009; Liu等2009; Kehr 2013; Lin等2014)。

小RNA (small RNA)根据其生物合成的特点、所结合的效应蛋白(即AGO蛋白)和生物学功

收稿 2015-05-19 修定 2015-05-28

资助 国家自然科学基金(31201679和U1130304)和浙江省自然科学基金(LY15C020006)。

* 通讯作者(E-mail: zenghq@hznu.edu.cn, Tel: 0571-28865199)。

能,可以分为两大类: miRNA和小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) (Axtell 2013)。miRNA来源于可形成茎环结构(stem-loop structure)的单链RNA,而siRNA来源于完全配对的双链RNA。此外, miRNA和siRNA产生过程中所需的RNA剪切酶DCL (拟南芥具有4个DCL, DCL1~4), 以及沉默作用所需的AGO蛋白(拟南芥具有10个AGO, AGO1~10)都不相同(Bologna和Voinnet 2014)。植物miRNA的生物合成过程包括了转录、加工、修饰和RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的装载等过程(Rogers和Chen 2013; Bologna和Voinnet 2014)。miRNA基因首先经过RNA聚合酶II转录形成miRNA原初转录物(primary miRNA, pri-miRNA), pri-miRNA含有5'帽子和3' polyA尾巴,并能折叠成茎环结构;然后pri-miRNA的末端被DCL1蛋白剪切后形成miRNA前体(pre-cursor miRNA, pre-miRNA); pre-miRNA进一步被DCL1剪切后形成由成熟miRNA (mature miRNA)和miRNA互补链(miRNA*)组成的miRNA双链(miRNA/miRNA* duplex); miRNA双链的3'端经过HEN1引导的甲基化修饰后通过HST1运输蛋白从细胞核转运至细胞质中;随后miRNA成熟片段被装载至含有AGO蛋白的RISC (RNA-induced silencing complex)中,通过序列互补引导RISC与靶基因结合,进而沉默靶基因,而通常miRNA*很快被降解(Rogers和Chen 2013)。植物miRNA作用的方式主要是通过与靶基因结合并降解靶基因,或抑制靶基因的翻译,从而在转录后水平上调控靶基因。此外, miRNA还可以通过介导DNA甲基化,从而在转录水平上调控靶基因的表达(Wu等2010; Rogers和Chen 2013)。目前,越来越多的研究表明miRNA在维持基因组稳定性以及调控生长发育、逆境反应和营养元素的平衡等方面发挥了非常重要的作用(吕帝瑾等2013; 虞莎和王佳伟2014; Jones-Rhoades等2006; Kuo和Chiou 2011; Khraiwesh等2012; Zeng等2014)。

早些年人们发现转基因介导RNA沉默具有系统获得性沉默(RNA systemic acquired silencing)的现象(Palauqui等1997; Voinnet和Baulcombe 1997),后来证明是因为siRNA在细胞间的移动和长距离的运输导致了非细胞自主性的RNA沉默(也即

siRNA合成场所和作用场所不同) (Hamilton和Baulcombe 1999; Yoo等2004; Molnar等2010)。人们在miR165/166的研究中也提出了植物miRNA在细胞间移动的假设(Juarez等2004; Kidner和Martienssen 2004)。近年来,研究表明植物内源的一些小RNA,如TAS3/ta-siR-ARFs、miR156、miR165/166、miR172、miR390、miR395和miR399等,都具有非细胞自主性的作用方式。这些miRNA通过在细胞间移动或韧皮部介导的长距离运输,在植物的生理活动中发挥了非常重要的作用,比如叶片的发育、根系维管组织的形成、块茎的形成和养分的平衡等(Martin等2009; Chitwood和Timmermans 2010; Brosnan和Voinnet 2011; Marín-González和Suárez-López 2012; Kehr 2013; Bhogale等2014)。本文就miRNA在韧皮部中的长距离运输及其对养分平衡的系统性调控进行总结。

1 植物韧皮液中的miRNA及其对养分胁迫的响应

植物生命的维系需要依赖由韧皮部和木质部所组成的维管组织来介导水分、养分、代谢物以及各类信号物质的运输。很多信号物质,如激素、代谢物、蛋白质和RNA等,既可以通过胞间连丝(plasmodesmata)进行短距离的运输,也可以通过韧皮部进行长距离的运输,从而为植物不同组织之间传递信息并调节植物的各种生物学过程,如叶片发育、开花、碳水化合物分配和病原菌防卫等(Lough和Lucas 2006; Kehr和Buhtz 2008; Turnbull 2011)。韧皮部由筛分子(sieve element)、伴胞细胞(companion cell)和薄壁组织细胞(parenchyma cell)构成。其中直接负责光合产物和信号物质运输的筛分子是一类特殊的细胞,在发育过程中大部分的细胞器丢失了,只剩下细胞膜、质体、内质网膜等,因而其所需的营养物质一般由相邻的伴胞细胞通过胞间连丝传递而来(De Schepper等2013)。由于筛分子不能进行转录和翻译,韧皮液(phloem sap)中内源RNA的发现一直被误认为是由于韧皮液采集时周围组织(如伴胞细胞)的污染所致。后来分子生物技术和嫁接试验强有力地证实了植物内源RNA存在于流动的韧皮液中(Lough和Lucas 2006)。目前,植物内源RNA作为一种信号分子通过韧皮部长距离运输已经有了清楚的认识(李苹芳等2013; Lough和Lucas 2006; Kehr和Buhtz 2008)。

近年来人们发现小RNA也存在于韧皮液中并可以进行长距离的运输(表1)。Yoo等(2004)通过分离南瓜韧皮液中的RNA并对RNA进行放射性标记后,发现小RNA (20~25 nt)存在于韧皮液中。他们还提取了黄瓜、白羽扇豆、蓖麻和丝兰等4种植物的韧皮液,发现这些植物的韧皮液中也都存在小RNA,并且这些小RNA主要以单链的形式存在。通过构建小RNA文库,他们在南瓜韧皮液中还鉴定了3个miRNA(miR156、miR159、miR167),并且通过Northern blot进一步证实了这些miRNA的存在。Buhtz等(2008)通过高通量测序和Northern blot全面分析了油菜韧皮液中的小RNA,发现韧皮液中存在18个家族的miRNA(包含了上述3个miRNA)以及它们的互补链(miRNA*)。这些

miRNA家族大多数也存在于其他植物的韧皮液中,如苹果和白羽扇豆(表1)。Varkonyi-Gasic等(2010)通过蚜虫吻针法收集了苹果韧皮液并用颈环RT-PCR分析了成熟miRNA的表达,发现至少有11个家族的miRNA存在于韧皮液中,其中miR156、miR159、miR160、miR162、miR167、miR169、miR396和miR398的表达量较高,而miR172、miR390和miR393的表达量较低。这些miRNA在韧皮部组织中也有表达,并且miR156、miR167、miR169、miR390和miR398在韧皮液中的表达量显著高于周围的韧皮部组织(Varkonyi-Gasic等2010)。随后,Rodriguez-Medina等(2011)通过构建小RNA文库在白羽扇豆韧皮液中也克隆到9个不同家族的miRNA,其中miR168、miR169、miR395

表1 植物韧皮液中的miRNA

Table 1 miRNAs in phloem sap of different plant species

miRNA家族	植物种类	养分胁迫响应	移动性	靶基因	参考文献
miR156	南瓜、油菜、苹果、白羽扇豆	-	长距离运输	SPL转录因子	1~5
miR157	油菜	-	-	SPL转录因子	2
miR158	油菜	-Fe (+)	-	-	6
miR159	南瓜、油菜、苹果、白羽扇豆	-	-	MYB转录因子	2~5
miR160	油菜、苹果	-	-	ARF转录因子	2, 4
miR162	油菜、苹果	-	-	DCL1蛋白	2, 4
miR164	油菜、白羽扇豆	-	-	NAC转录因子	2, 3
miR166	油菜、白羽扇豆	-	细胞间移动	HD-ZIP转录因子	2, 3, 7, 8
miR167	南瓜、油菜、苹果、白羽扇豆	-	-	ARF转录因子	2~5
miR168	油菜、白羽扇豆	-	-	AGO1蛋白	2, 3
miR169	油菜、苹果、白羽扇豆	-N (-)、-P (-)	-	NF-YA转录因子	2~4, 9, 10
miR171	油菜	-	-	SCL转录因子	2
miR172	油菜、苹果	-	长距离运输	AP2转录因子	2, 4, 11
miR319	油菜	-	-	TCP转录因子	2
miR390	油菜、苹果	-	细胞间移动	TAS3	2, 4, 12
miR393	苹果	-	-	bHLH转录因子、生长素受体	4
miR395	油菜、白羽扇豆	-S (+)、-P (-)	长距离运输	硫酸盐转运蛋白、ATP硫酸化酶	2, 3, 6, 9
miR396	苹果	-	-	GRF转录因子	4
miR397	油菜	-Cu (+)、-S (-)	-	漆酶	6
miR398	油菜、苹果	-Cu (+)、-Fe (-)、-N (-)、 -P (-)、+Cu (-)	-	Cu/Zn超氧化物歧化酶	4, 6
miR399	油菜、白羽扇豆	-P (+)	长距离运输	泛素结合酶PHO2	2, 3, 6, 13, 14
miR400	油菜	-	-	-	2
miR408	油菜	-Cu (+)、-Fe (-)	-	质体蓝素类蛋白、漆酶	6
miR827	油菜	-P (+)	-	泛素连接酶NLA	10
miR2111	油菜	-P (+)、-Fe (-)、-Cu (+)	-	F-box蛋白	6, 9, 10

元素符号前的“+”表示“过量”,“-”表示“缺乏”。元素符号后面括号内的“+”表示“诱导”,“-”表示“抑制”。“-”表示“无响应”或者“尚不清楚”。参考文献中的数字1~14分别表示: 1, Bhogale等2014; 2, Buhtz等2008; 3, Rodriguez-Medina等2011; 4, Varkonyi-Gasic等2010; 5, Yoo等2004; 6, Buhtz等2010; 7, Carlsbecker等2010; 8, Miyashima等2011; 9, Hsieh等2009; 10, Pant等2009; 11, Martin等2009; 12, Marin等2010; 13, Lin等2008; 14, Pant等2008。

和miR399在韧皮液中的表达显著高于其他组织。然而这些存在于韧皮液中的miRNA是否作为信号分子长距离运输以及它们在植物生长发育或逆境反应中是否具有系统性调控的作用还有待进一步的研究。

植物韧皮液中的miRNA还会响应外界环境的变化。研究表明油菜韧皮液中miR395、miR398和miR399的表达分别受缺硫、缺铜和缺磷胁迫诱导(Buhtz等2008, 2010)。这与拟南芥中这些miRNA对养分胁迫的响应是一致的(Jones-Rhoades和Bartel 2004; Chiou等2006; Yamasaki等2007)。miR399在南瓜和白羽扇豆的韧皮液中也受缺磷胁迫诱导(Pant等2008; Rodriguez-Medina等2011)。Buhtz等(2010)通过miRNA基因芯片发现油菜韧皮液中其他miRNA也响应养分胁迫, 比如miR158受缺铁诱导, miR398、miR408和miR2111受缺铁抑制, miR397受缺硫抑制, miR397、miR408和miR2111受缺铜诱导。miR397和miR408对缺铜的响应与拟南芥中的报道一致(Abdel-Ghany和Pilon 2008)。研究人员通过高通量测序和RT-PCR全面分析了拟南芥中缺磷和缺氮响应的miRNA, 发现除miR399外, miR156、miR778、miR827和miR2111等也受缺磷诱导, 而miR395受缺磷抑制, miR169和miR398还同时受到缺磷和缺氮的抑制(Hsieh等2009; Pant等2009)。此外, 高通量测序结果表明油菜韧皮液中miR169、miR399、miR827和miR2111对缺磷或缺氮也具有相同的响应(Pant等2009)。

2 miRNA作为长距离运输的信号分子调节养分的平衡

虽然韧皮液中存在大量的miRNA, 但这些miRNA是否都可以在植物体内移动或进行长距离的运输仍然不是很清楚。目前只有少数miRNA在植物体内的移动得到了证实。比如, miR165/166和miR390在植物细胞间移动并调节叶片背腹极性以及根系的发育(Carlsbecker等2010; Chitwood等2009; Marin等2010; Miyashima等2011); miR156和miR172可能作为一种长距离运输的信号分子调节马铃薯块茎的形成(Bhogale等2014; Martin等2009); miR399和miR395分别受缺磷和缺硫诱导, 通过长距离运输分别调节植物磷营养和硫营养的平衡(Buhtz等2010; Lin等2008; Pant等2008)。

2.1 miR399调节磷营养的平衡

miR399是首个发现的作为系统性信号调节磷营养吸收和转运的miRNA (Lin等2008; Pant等2008)。miR399在拟南芥中的靶基因是泛素结合酶*UBC24* (也叫*PHO2*) (Fujii等2005; Aung等2006; Bari等2006; Chiou等2006)。启动子融合GUS的分析结果表明miR399和*PHO2*在拟南芥的维管组织中都表达(Aung等2006)。缺磷条件下miR399在油菜等植物的韧皮液中积累, 这表明miR399可能是一种长距离运输的调控因子(Pant等2008)。此外pri-miR399在地上部受缺磷的诱导比根系快, 说明植物在缺磷的早期可能将地上部合成的miR399转运至根系(Lin等2008)。过表达miR399的转基因植物与野生型植物嫁接的实验进一步证实了miR399在韧皮部中长距离的运输(Lin等2008; Pant等2008)。miR399可以从过表达植物的接穗(scion)移动到野生型植物的砧木(rootstock)并抑制砧木中*PHO2*的表达, 但不能反过来转运, 即不能从miR399过表达植物的砧木运输到野生型植物的接穗。miR399过表达植物与功能缺失突变体*pho2*都具有地上部过量积累磷酸盐的表型, 是因为这些植物中磷酸盐的吸收和磷酸盐从根系向地上部的转移都增强了(Fujii等2005; Aung等2006; Bari等2006; Chiou等2006; Lin等2008)。水稻和番茄中过量表达miR399也具有类似的表型(Gao等2010; Hu等2011)。最近, 研究人员通过筛选*pho2*突变体的抑制子和定量膜蛋白质组学(quantitative membrane proteomics), 发现定位在细胞内膜系统的PHO2介导了磷酸盐转运蛋白PHT1家族(主要为PHT1;1和PHT1;4)以及与木质部磷酸盐装载相关的蛋白PHO1的泛素化降解(Liu等2012; Huang等2013)。可见, miR399作为一种在韧皮部中长距离运输的信号分子, 通过抑制靶基因*PHO2*的表达, 调节了根系对磷酸盐的吸收和磷酸盐通过木质部向地上部的转运, 从而在植物体内磷酸盐平衡的维持中发挥了重要作用。

2.2 miR395调节硫营养的平衡

miR395在拟南芥中的靶基因有4个, 其中1个是与硫酸盐吸收和转运有关的低亲和性硫酸盐转运蛋白*SULTR2;1*, 另外3个是与硫酸盐同化有关的ATP硫酸化酶*APS1*、*APS3*和*APS4* (Allen等2005;

Jones-Rhoades和Bartel 2004)。组织特异表达分析结果表明miR395主要在韧皮部的伴胞细胞中表达(Kawashima等2009), 而*SULTR2;1*主要在木质部薄壁组织中表达(Takahashi等2000)。缺硫条件下miR395在韧皮部中的诱导表达抑制了*SULTR2;1*的表达, 并使之局限在木质部中表达, 从而增加了硫酸盐通过木质部从根系向地上部的转移, 而降低了地上部硫酸盐通过韧皮部向根系的转移(Kawashima等2009, 2011)。miR395还通过调控*APS*基因的表达调节硫酸盐的同化(Liang等2010)。miR395过表达植物地上部的硫酸盐含量增加, 但却表现出缺硫症状, 这是因为硫酸盐的同化和硫酸盐在叶片间的转移受到了抑制(Liang等2010)。野生型拟南芥和*hen1-1*突变体(HEN1为miRNA生物合成中的甲基化酶, 可使miRNA稳定, *hen1-1*中miRNA含量减少)嫁接的实验进一步表明miR395可以从地上部向根系转移(Buhtz等2010)。因此, miR395也是一种在韧皮部中长距离运输的系统性信号分子, 并参与调控硫营养的平衡。

2.3 其他与养分平衡有关的miRNA

除了miR395和miR399以外, 其他miRNA也参与调控了植物体内养分的平衡(Zeng等2014)。比如, miR169通过调控靶基因*NF-YA*转录因子参与了氮素营养平衡的调节(Zhao等2011); miR827通过调控靶基因泛素连接酶*NLA*, 调控了磷酸盐的吸收(Lin等2013); miR397、miR398、miR408和miR857通过调节一些编码含铜蛋白基因的表达(如*CSD*、*LAC*、*PLC*), 调控了铜素营养的平衡(Sunkar等2006; Yamasaki等2007; Abdel-Ghany和Pilon 2008; Zhang等2014)。值得注意的是, 这些miRNA也存在于韧皮液中(表1), 说明它们也可能作为长距离信号分子调节养分的平衡。

近年来, 随着基因芯片和高通量测序技术的广泛应用, 人们发现很多miRNA对各种养分胁迫都有不同程度的响应(范鹏珍等2012; 雷凯健和安国勇2014; Pant等2009; Zhu等2010; Kuo和Chiou 2011; Zeng等2014)。虽然很多养分响应的miRNA与养分的吸收、转运、代谢或再利用没有直接的关系, 而可能与养分胁迫导致的生长和代谢的变化有关, 但是这些miRNA, 比如miR156、miR159、miR160、miR164、miR167、miR319、

miR393和miR396等, 在韧皮液中是否也对养分胁迫响应以及是否与养分胁迫反应的系统性调控有关还需要进一步明确。

3 miRNA移动的机理

虽然目前只有少数miRNA在植物体内的移动得到了证实, 但可以想象miRNA的移动应该和其他大分子(比如mRNA)的移动类似, 要受到严格的调控。目前, miRNA移动的机理以及影响miRNA移动的因素还不是很清楚, 很多问题还亟待解决。一个重要的问题是miRNA在植物体内以何种形式移动, 是miRNA前体、miRNA双链还是成熟miRNA? 研究表明miR165/166和miR390很可能是以成熟miRNA而非miRNA前体的形式在细胞间移动(Chitwood等2009; Carlsbecker等2010; Marin等2010; Miyashima等2011)。韧皮液中检测到成熟miRNA以及miRNA过表达植物的嫁接实验都表明成熟miRNA可以通过韧皮部长距离运输(Yoo等2004; Buhtz等2008, 2010; Lin等2008; Pant等2008; Varkonyi-Gasic等2010; Rodriguez-Medina等2011)。单链或双链RNase消化的实验表明韧皮液中小RNA主要以单链形式存在(Yoo等2004; Buhtz等2008)。但是Buhtz等(2008)的研究表明miRNA的互补链(miRNA*)也存在于韧皮液中。此外, Hsieh等(2009)的研究表明miR399*与miR399一样也受缺磷诱导并可以通过韧皮部长距离运输。siRNA合成缺失的三突变体*dcl2 dcl3 dcl4* (不产生22、23和24 nt的siRNA)与野生型嫁接的实验表明, 内源siRNA而非siRNA前体可以从野生型的地上部移动到*dcl2 dcl3 dcl4*的根系(Molnar等2010)。另外, 通过使用特异性结合21 bp siRNA双链的病毒沉默抑制子P19以及导入外源带荧光标记的siRNA, 还表明内源siRNA双链而非siRNA前体可以在细胞间移动(Dunoyer等2010)。然而miRNA是否也以双链形式在细胞间移动还有待进一步明确。miRNA和miRNA*在韧皮部中是以单链形式还是双链形式(miRNA/miRNA*)运输仍然期待进一步的鉴定。此外, 在miRNA长距离运输的3个步骤中, 即miRNA进入筛分子、miRNA在筛管中的运输和miRNA从筛分子进入其他细胞, miRNA移动的形式是否一致也需进一步明确。

另一个重要的问题是miRNA的移动是否需要

其他分子组分的伴随? miRNA通过RISC调控靶基因需要结合AGO1蛋白。但Dunoyer等(2010)的研究表明siRNA和miRNA在植物体内的移动并不结合AGO1。而Yoo等(2004)的研究表明南瓜韧皮液中的蛋白PSRP1可以结合单链的小RNA。显微注射实验表明PSRP1介导了25 nt单链小RNA在细胞间的移动。然而目前PSRP1是否可以结合21 nt的miRNA或介导miRNA的运输还不清楚。

此外, miRNA在细胞间的移动是通过共质体途径还是质外体途径也不明确。目前最受认可的移动方式是胞间连丝介导的共质体途径(Chitwood和Timmermans 2010; Gursansky等2011)。拟南芥胼胝质合成酶*CALS3*的功能获得性突变会引起胞间连丝中胼胝质增加, 导致胞间连丝孔径减小, 从而阻碍了miR165在细胞间的移动(Vatén等2011)。可见, miRNA可能通过胞间连丝在细胞间移动。miRNA在韧皮部的装载和卸载也可能通过类似的途径(Marín-González和Suárez-López 2012)。另外, 虽然科学家已经提出siRNA和miRNA以被动扩散的方式在细胞间移动的假说(Voinnet 2005), 但这些小RNA在细胞间的移动或在韧皮液中的运输是否也以主动耗能的方式进行还有待进一步明确。

4 展望

虽然植物miRNA的发现仅有十余年, 但已有越来越多的研究表明miRNA作为一类调节因子在植物的生长发育、逆境反应和养分平衡中都发挥了非常重要的调控作用。与蛋白质和RNA等大分子一样, 一些miRNA也可以作为一类信号分子在植物体内移动, 并系统性调控植物的生理活动, 如磷营养和硫营养的平衡。植物韧皮液中存在大量的miRNA, 但目前只有少数miRNA被证实可以进行长距离的运输, 譬如miR156、miR172、miR395和miR399等。miR165/166和miR390可以在细胞间移动, 但其是否也进行长距离运输仍不清楚。为了扩大我们对miRNA系统性调控的认识, 进一步验证韧皮液miRNA在植物体内的移动性仍然非常必要, 特别是针对一些养分胁迫响应的miRNA, 比如miR169、miR397、miR398、miR408和miR827等。在养分缺乏条件下, 植物为何需要将地上部合成的miRNA, 比如miR399和miR395, 转运至同样具有合成功能的根系, 这是一个值得深入研究

的问题。miRNA的移动或长距离运输除了与养分平衡和植物发育有关, 是否还与植物的生物或非生物胁迫反应有关, 这也是一个值得关注的问题。尽管miRNA在植物体内的移动已经非常明确, 但miRNA移动的机理仍需要进一步阐明。通过对miRNA分子进行标记, 并结合灵敏的检测方法、巧妙的实验设计和强有力的分子遗传学手段, 相信人们对miRNA移动机理的认识一定会越来越清晰。此外, 通过改变系统性调节养分平衡的miRNA或miRNA靶基因的表达以提高农作物的养分利用效率或增强农作物对养分缺乏的抗性, 也可以应用在农业生产上。

参考文献

- 范鹏珍, 李玉花, 周波(2012). MicroRNA在植物营养胁迫中的作用. 植物生理学报, 48: 619~628
- 雷凯健, 安国勇(2014). 植物miRNA介导磷信号转导的研究进展. 植物生理学报, 50: 1071~1078
- 李苹芳, 羊杏平, 徐锦华, 刘广, 姚协丰, 高长洲, 朱凌丽(2013). RNA分子在植物韧皮部长距离运输的研究进展. 园艺学报, 40: 2058~2066
- 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: 847~854
- 虞莎, 王佳伟(2014). miR156介导的高等植物年龄途径研究进展. 科学通报, 59: 1398~1404
- Abdel-Ghany SE, Pilon M (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. J Biol Chem, 283: 15932~15945
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005). microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. Cell, 121: 207~221
- Aung K, Lin SI, Wu CC, Huang YT, Su CL, Chiou TJ (2006). *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. Plant Physiol, 141: 1000~1011
- Axtell MJ (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. Annu Rev Plant Biol, 64: 137~159
- Bari R, Pant BD, Stitt M, Scheible WR (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. Plant Physiol, 141: 988~999
- Bhogale S, Mahajan AS, Natarajan B, Rajabhoj M, Thulasiram HV, Banerjee AK (2014). *MicroRNA156*: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Plant Physiol, 164: 1011~1027
- Bologna NG, Voinnet O (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. Annu Rev Plant Biol, 65: 473~503
- Brosnan CA, Voinnet O (2011). Cell-to-cell and long-distance siRNA movement in plants: mechanisms and biological implications.

- Curr Opin Plant Biol, 14: 580~587
- Buhtz A, Pieritz J, Springer F, Kehr J (2010). Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biol*, 10: 64
- Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J (2008). Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J*, 53: 739~749
- Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S et al (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 465: 316~321
- 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
- Chitwood DH, Nogueira FTS, Howell MD, Montgomery TA, Carrington JC, Timmermans MCP (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev*, 23: 549~554
- Chitwood DH, Timmermans MC (2010). Small RNAs are on the move. *Nature*, 467: 415~419
- De Schepper V, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K (2013). Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *J Exp Bot*, 64: 4839~4850
- Dunoyer P, Schott G, Himber C, Meyer D, Takeda A, Carrington JC, Voinnet O (2010). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, 328: 912~916
- Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 15: 2038~2043
- Gao N, Su Y, Min J, Shen W, Shi W (2010). Transgenic tomato overexpressing ath-miR399d has enhanced phosphorus accumulation through increased acid phosphatase and proton secretion as well as phosphate transporters. *Plant Soil*, 334: 123~136
- Giehl RF, Gruber BD, von Wirén N (2014). It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *J Exp Bot*, 65: 769~778
- Giehl RF, Meda AR, von Wirén N (2009). Moving up, down, and everywhere: signaling of micronutrients in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 320~327
- Gursansky NR, Searle IR, Carroll BJ (2011). Mobile microRNAs hit the target. *Traffic*, 12: 1475~1482
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286: 950~952
- Hermans C, Hammond JP, White PJ, Verbruggen N (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci*, 11: 610~617
- 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: 2120~2132
- Hu B, Zhu C, Li F, Tang J, Wang Y, Lin A, Liu L, Che R, Chu C (2011). *LEAF TIP NECROSIS1* plays a pivotal role in the regulation of multiple phosphate starvation responses in rice. *Plant Physiol*, 156: 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: 4044~4060
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 14: 787~799
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 19~53
- Juarez MT, Kui JS, Thomas J, Heller BA, Timmermans MC (2004). microRNA-mediated repression of *rolled leaf1* specifies maize leaf polarity. *Nature*, 428: 84~88
- Kawashima CG, Matthewman CA, Huang S, Lee BR, Yoshimoto N, Koprivova A, Rubio-Somoza I, Todesco M, Rathjen T, Saito K et al (2011). Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 66: 863~876
- Kawashima CG, Yoshimoto N, Maruyama-Nakashita A, Tsuchiya YN, Saito K, Takahashi H, Dalmay T (2009). Sulphur starvation induces the expression of microRNA395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant J*, 57: 313~321
- Kehr J (2013). Systemic regulation of mineral homeostasis by microRNAs. *Front Plant Sci*, 4: 145
- Kehr J, Buhtz A (2008). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot*, 59: 85~92
- Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta*, 1819: 137~148
- Kidner CA, Martienssen RA (2004). Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, 428: 81~84
- Kuo HF, Chiou TJ (2011). The role of microRNAs in phosphorus deficiency signaling. *Plant Physiol*, 156: 1016~1024
- Liang G, Yang F, Yu D (2010). MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 62: 1046~1057
- 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: 732~746
- 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: 4061~4074
- Lin WY, Huang TK, Leong SJ, Chiou TJ (2014). Long-distance call from phosphate: systemic regulation of phosphate starvation responses. *J Exp Bot*, 65: 1817~1827
- Liu TY, Chang CY, Chiou TJ (2009). The long-distance signaling of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 312~319
- 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: 2168~2183
- Lough TJ, Lucas WJ (2006). Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol*

- 57: 203~232
- Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A (2010). miR390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and their *AUXIN RESPONSE FACTOR* targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell*, 22: 1104~1117
- Marin-González E, Suárez-López P (2012). “And yet it moves”: Cell-to-cell and long-distance signaling by plant microRNAs. *Plant Sci*, 196: 18~30
- Martin A, Adam H, Diaz-Mendoza M, Żurczak M, González-Schain ND, Suárez-López P (2009). Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA *miR172*. *Development*, 136: 2873~2881
- Miller AJ, Shen Q, Xu G (2009). Freeways in the plant: transporters for N, P and S and their regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 284~290
- Miyashima S, Koi S, Hashimoto T, Nakajima K (2011). Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Development*, 138: 2303~2313
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 328: 872~875
- Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J*, 16: 4738~4745
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible WR (2008). MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J*, 53: 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 real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol*, 150: 1541~1555
- Rodriguez-Medina C, Atkins CA, Mann AJ, Jordan ME, Smith PM (2011). Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (*Lupinus albus* L.). *BMC Plant Biol*, 11: 36
- Rogers K, Chen X (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, 25: 2383~2399
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18: 2051~2065
- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, Saito K (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 23: 171~182
- Turnbull C (2011). Long-distance regulation of flowering time. *J Exp Bot*, 62: 4399~4413
- Varkonyi-Gasic E, Gould N, Sandanayaka M, Sutherland P, MacDiarmid RM (2010). Characterisation of microRNAs from apple (*Malus domestica* ‘Royal Gala’) vascular tissue and phloem sap. *BMC Plant Biol*, 10: 159
- Vatén A, Dettmer J, Wu S, Stierhof YD, Miyashima S, Yadav SR, Roberts CJ, Campilho A, Bulone V, Lichtenberger R et al (2011). Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Dev Cell*, 21: 1144~1155
- Voinnet O (2005). Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett*, 579: 5858~5871
- Voinnet O, Baulcombe DC (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 389: 553~553
- Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, Qi Y (2010). DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell*, 38: 465~475
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 282: 16369~16378
- Yoo B-C, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, 16: 1979~2000
- Zeng H, Wang G, Hu X, Wang H, Du L, Zhu Y (2014). Role of microRNAs in plant responses to nutrient stress. *Plant Soil*, 374: 1005~1021
- Zhang H, Zhao X, Li J, Cai H, Deng XW, Li L (2014). MicroRNA408 is critical for the *HY5-SPL7* gene network that mediates the coordinated response to light and copper. *Plant Cell*, 26: 4933~4953
- Zhao M, Ding H, Zhu JK, Zhang F, Li WX (2011). Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 190: 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: 23~29