

地黄 microRNAs 和靶基因的生物信息学预测及验证

赵春丽^{1,2}, 李先恩², 都晓伟^{1*}, 孙鹏^{2*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: **目的** microRNAs (miRNA) 是一类非编码的单链小分子 RNA, 在植物的生长发育、逆境适应和代谢调控等过程中发挥着至关重要的作用。本研究拟利用地黄 EST 数据通过生物信息学手段预测新的地黄 miRNA, 为今后地黄 miRNA 的生物学研究奠定基础。**方法** 本研究根据 miRNA 家族在不同物种中的保守性, 将 miRBase 数据库中的已知植物 miRNA 与通过高通量测序获得的 93172 条地黄 EST 序列进行同源比对, 按照 miRNA 前体应具备的标准进行筛选。**结果** 预测到分属于 8 个家族的 8 条潜在地黄 miRNA 序列, 并通过实时荧光定量 PCR 对 8 条预测的 miRNA 进行了检测, 证实 8 条 miRNA 在地黄中真实存在。随后利用软件对 8 条地黄 miRNA 的靶基因进行预测, 发现其靶基因主要编码与地黄生长发育、代谢以及胁迫响应等过程相关的蛋白。**结论** 新预测的地黄 miRNA 及其靶基因因为今后研究它们在地黄中的生物学功能奠定了基础。

关键词: 地黄; microRNA; 靶基因; 生物信息学; PCR 检测

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)08-0-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.

Bioinformatic prediction and validation of conserved microRNAs and their target genes in *Rehmannia glutinosa*

ZHAO Chun-li^{1,2}, LI Xian-en², DU Xiao-wei¹, SUN Peng²

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Institute of Medicinal Plant, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** MicroRNAs (miRNA) are a class of small non-coding RNA molecules, playing vital roles in plant growth and development, stress adaptation, and metabolic pathway regulation. In order to establish the material basis for future studies on the biological function of miRNAs, we aimed to predict novel miRNAs from EST sequences of *Rehmannia glutinosa* by using bioinformatic strategies. **Methods** Since most of the plant miRNAs were conserved in plant species, all plant miRNAs deposited in miRBase were aligned to the 93 172 EST sequences generated by next generation high-throughput RNA sequencing technology and the putative miRNA precursors were screened according to serious criteria. **Results** Eight novel rehmannia miRNAs were identified that belonged to eight different families, which were further validated by real-time PCR analysis. Then the eight rehmannia miRNAs were subjected to target prediction analysis, and the results showed that the target genes encoded the proteins related to root growth, metabolism, stress responses, and other processes. **Conclusion** The miRNAs and their target genes identified in this study will provide clues to their biological functions in *R. glutinosa*.

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch; microRNA; target gene; bioinformatics; PCR detection

地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 为玄参科 (Scrophulariaceae) 地黄属多年生草本植物, 是著名的“四大怀药”之一, 具有滋阴清热、补血止血等

功效。地黄应用广泛, 为多种方剂配伍要药及中成药的主要原料。

miRNA 是一类在真核生物中发现的长度为 21

收稿日期: 2013-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901969)

作者简介: 赵春丽 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物分子生物学。Tel: 13121897466 E-mail: chunli_x2@sina.com

*通信作者 都晓伟 Tel: (0451)87267031 E-mail: duxiaowei@hljucm.net

孙鹏 Tel: (010)62810019 E-mail: psun@implad.ac.cn

nt 左右的单链小分子 RNA。miRNA 通过与靶基因的特异性碱基互补配对, 从而降解靶基因或抑制其翻译, 在转录后水平对动植物的基因表达进行调控^[1]。miRNA 参与一系列真核细胞的基因表达调控, 在植物中, 对植物器官的形态建成、生长发育、逆境胁迫的应答、次生代谢等都具有重要的调控作用^[2]。miRNA 在植物体内的表达具有组织和时期特异性, 并且在进化上有很高的保守性^[3-5]。

近年来, 随着 miRNA 研究范围的扩大和深入, miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 中的 miRNA 数量不断增多, 一些药用植物如红豆杉、白木香、人参、地黄等也开展了 miRNA 研究, Yang 等^[6]利用高通量测序技术分析、鉴定与地黄连作障碍相关的 miRNA, 发现一些与转录、信号转导、块根发育相关的 miRNA 可能与地黄连作障碍的形成相关。与模式植物拟南芥、水稻等已鉴定的 miRNA 数量相比, 目前已鉴定的地黄 miRNA 数量有限, 在 miRBase 数据库中仅登录了 13 条地黄 miRNA 序列。虽然高通量测序仍是目前鉴定 miRNA 的最直接手段, 但利用本物种 EST 序列预测新的 miRNA 序列则更加经济、快捷, 可以有效地扩充本物种的 miRNA 数量, 被广泛用于植物 miRNA 的鉴定^[7-9]。课题组前期转录组测序工作的完成, 为地黄 miRNA 及其靶基因的生物信息学预测奠定了良好的基础。本研究根据植物 miRNA 进化上的高度保守性, 以已知的植物 miRNA 为探针, 与高通量测序获得的地黄 EST 进行序列比对, 预测新的地黄 miRNA, 为扩展地黄 miRNA 的研究范围奠定研究基础。

1 材料

地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 种植于中国医学科学院药用植物研究所试验田, 经中国医学科学院药用植物研究所李先恩研究员鉴定为地黄栽培种 85-5。

2 方法

2.1 参考 miRNA 序列的选择

本研究首先从 miRNA 数据库 miRBase 中下载了拟南芥、大豆、水稻、玉米等 71 种植物 (不含地黄) 的 7 385 条 miRNA。随后, 为避免 miRNA 数据的冗余性, 本研究剔除了不同物种 miRNA 之间的重复序列, 剩余的 miRNA 序列进入下一步分析, 作为预测地黄保守 miRNA 的参照序列。

2.2 地黄 miRNA 的生物信息学预测流程

将无重复的植物 miRNA 序列与 93 172 条地黄 EST 进行序列同源比对, 筛选出少于等于 3 个碱基错配的同源 EST 序列, 比对上的 EST 再经自身比对去除冗余序列后, 用 Mfold 3.2 软件 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>) 预测候选 miRNA 前体序列的二级结构, 并分析其结构稳定性^[10]。

2.3 二级结构筛选标准

地黄 miRNA 的生物信息学预测参照 Zhang 等^[11]的方法, 具体筛选标准如下: (1) 新预测的地黄 miRNA 序列与已知的 miRNA 序列碱基错配数小于 4; (2) 新预测的地黄 miRNA 前体能够折叠成发夹状的二级结构, 并且其成熟的 miRNA 与相同家族已知的 miRNA 位于前体发夹结构的相同臂上; (3) 成熟的 miRNA 与另一条臂上的互补序列有不超过 5 个的错配碱基; (4) 成熟的 miRNA 与另一条臂上的互补序列不允许有缺口或者较大的环; (5) miRNA 前体要有绝对值较高的最小折叠自由能 (Minimal folding free energy, MFE) 和较高的最小折叠自由能系数 (Minimal folding free energy index, MFEI); (6) miRNA 中 (A+U) 量在 30%~70%。

2.4 miRNA 的荧光定量 PCR 检测

用 Trizol 试剂 (Invitrogen, USA) 提取各组织的总 RNA, 具体方法参照说明书。分别提取地黄的根、茎、叶、花四个不同组织的总 RNA, NanoDropTM2000 分光光度计 (Thermo Fisher, USA) 检测总 RNA 的浓度和纯度, 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 总 RNA 于 -80℃ 贮存备用。

miRNA 在地黄组织的表达检测采用实时荧光定量 PCR 方法: 首先在 miRNA 的 3' 末端做多聚腺苷酸化处理, 然后用含接头的引物进行第一链反转录, 最后用荧光定量 PCR 检测 miRNA 的表达情况。其中 miRNA 3' 末端 polyA 处理和第一链 cDNA 合成均采用 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (TIANGEN)。荧光定量 PCR 反应在 CFX-1000 型荧光定量 PCR 仪上 (Bio-Rad) 运行, 按照 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒 (TIANGEN) 说明步骤冰上配置反应体系: miRcute miRNA Premix (2×) 10 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, DNA 模板 2.5 μL, ddH₂O (灭菌蒸馏水) 补足至 20 μL, 设置温度梯度摸索 PCR 最佳退火温度, 最终确定反应条件为 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C

退火延伸 1 min, 40 个循环, 延伸阶段收集信号, 从 60 °C 到 95 °C, 每个循环增加 0.5 °C, 持续 0.05 s 获得解链温度, 采集融解曲线荧光信号。反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和溶解曲线, 记录 CT 值。

2.5 地黄 miRNA 靶基因的生物信息学预测

由于植物 miRNA 与其靶基因具有高度的序列互补性, 科研人员根据这一特点开发了多款植物 miRNA 靶基因预测软件, 本实验以地黄 EST 序列为参照序列, 采用当前运用较多的 psRNATarget 软件 (<http://www.plantgrn.org/psRNATarget/>) 进行在线靶基因预测, 运行参数设置为默认。psRNATarget 通过罚分机制筛选潜在靶基因, 每个 G:U 摆动配对、碱基插入或缺失分别罚 0.5、1 和 2 分, 在 miRNA

5'端第 2~7 bp 发生除 G:U 外的碱基错配罚分为 1, 总得分小于等于 3 的基因为 miRNA 的潜在靶基因^[12]。根据靶基因的功能注释, 分析 miRNA 在地黄中的功能作用。

3 结果与分析

3.1 预测到的地黄 miRNA 序列及其二级结构

从 miRBase (V 20.0) 数据库下载的 71 种植物共计 7 385 条 miRNA 经去冗余后得到 3 956 条唯一的 miRNA 序列, 以此为探针与地黄 EST 序列进行 BLASTN 比对分析, 筛选出 237 条候选 miRNA 前体序列, 其中能够用 Mfold 折叠形成茎环结构, 并符合相应筛选标准的共有 8 条。最终成功预测到的 8 条地黄 miRNA, 分别属于 8 个不同的 miRNA 家族 (表 1)。

表 1 地黄中新发现的 miRNA 及其序列特征

Table 1 Novel miRNAs predicted from *R. glutinosa* and their sequence signatures

miRNA	miRNA 序列 (5'-3')	Gene ID	Location	LM	LP	(A+U)/%	MFE	MFEI
miR168	UAGCUUGGUGCAGCUCGGGA	4 495	3'	20	109	45.87	46.90	0.79
miR172	UGAGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU	40 783	5'	23	69	63.77	18.10	0.72
miR396	UUCAAGAAAGCUGUAGGAAAA	92 675	5'	21	110	66.36	41.20	1.11
miR397	UUGAGUGCAGCGUUGAUGAU	35 712	3'	20	65	52.31	13.60	0.44
miR472	UGGUCGAAGUAGGCUA AAUC	8 171	3'	20	51	47.06	15.70	0.58
miR2218	UUGCCUGCUUGCCGAUCCU	92 228	5'	20	83	51.81	35.80	0.90
miR5290	AUUUGGAGAGAGAAAGACACAU	73 579	5'	22	62	62.90	35.60	1.55
miR6111	CUUUAUGUCACG AUGGAUGAC	46 017	3'	21	60	45.00	23.60	0.72

Location-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, 单位为 kCal/mol MFEI-最小折叠自由能系数

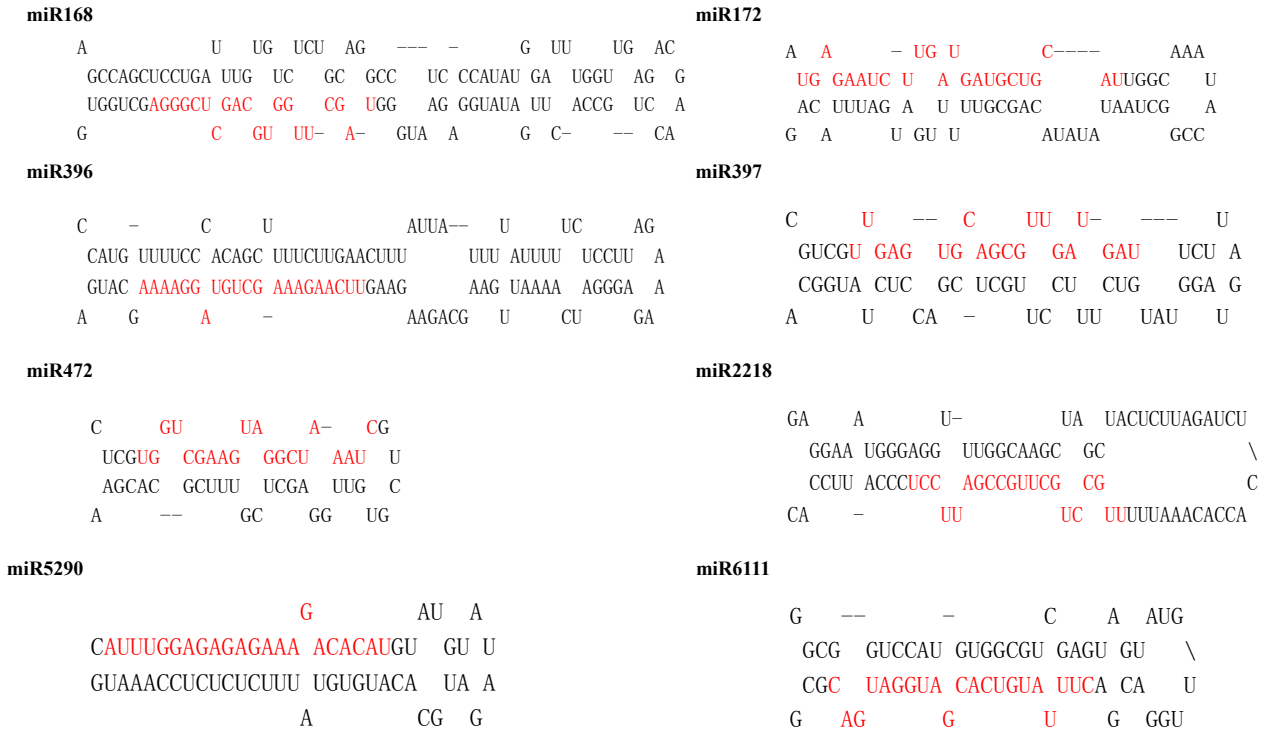
LM-length of mature miRNA LP-length of precursor MFE-minimal folding free energies, the unit is kCal/mol MFEI-minimal folding free energy index

在地黄中预测到的 8 条成熟 miRNA 的长度为 20~23 bp, 其中有一半为 20 bp。通常情况下, 大多数动物 miRNA 前体长度为 70~100 bp, 其二级结构也相对保守^[13]; 而植物 miRNA 前体在长度和二级结构上则存在多样性^[14]。由表 1 可以看出, 新预测的地黄 miRNA 前体的长度变化相对较大, 在 51~110 bp; 虽然地黄 miRNA 前体的长度和二级结构变化很大, 但都能折叠成茎环结构 (图 1)。8 条成熟 miRNA 有 4 条位于前体的 3'端, 4 条位于前体的 5'端。该比例与在其他植物中的报道类似^[15-16]。

在新预测的 8 条地黄 miRNA 中, 地黄 miRNA 前体的(A+U)量在 45.0%~67.0%, MFE 在 15.70~46.90 kcal/mol, 平均值为 28.81 kcal/mol; 其 MFEI 为 0.44~1.55, 平均值为 0.85 (表 1), 均符合 miRNA 二级结构稳定性要求。

3.2 新预测地黄 miRNA 的荧光定量 PCR 验证

为了验证新预测的 miRNA 在地黄中的真实性, 根据 8 条 miRNA 序列设计引物, 用实时定量 PCR 对地黄 miRNA 进行检测, 荧光定量融解曲线显示各 miRNA 扩增产物为单峰, PCR 产物琼脂糖凝胶电泳显示片段大小约 100 bp, 表明 8 条 miRNA 在地黄中真实存在。Ct 值与表达值的关系为 Ct 值越小, 表达值越高。8 个 miRNA 在地黄中均有表达, 其中 miR472 和 miR6111 在 4 个组织中的表达差异不大; 其余 6 条 miRNA 的表达呈现组织特异性, 其中 miR168 和 miR5290 的 Ct 值在根、茎、叶、花中依次降低, 说明其表达值呈逐渐升高的趋势; miR396 和 miR172 在叶、花中高表达; miR397 在花中表达值高; miR2218 在茎、花中表达值高。结果见图 2。



红色标注为成熟 miRNA 序列

The red mark for mature miRNA sequences

图 1 新预测地黄 miRNA 前体的二级结构图

Fig. 1 Predicted second structures of pre-miRNA from *R. glutinosa*

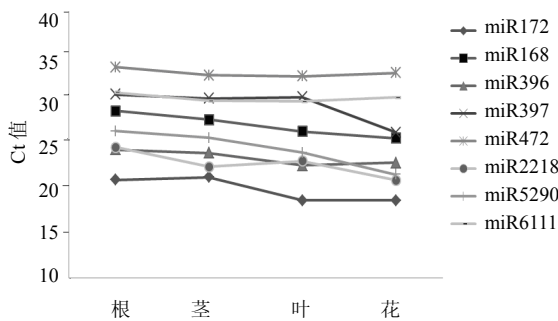


图 2 新预测的地黄 miRNA 在根、茎、叶、花中的表达情况

Fig. 2 Expression of predicted miRNAs from *R. glutinosa* in root, stem, leaf, and flower

3.3 地黄 miRNA 靶基因的预测及主要功能分析

根据新鉴定的 8 条地黄 miRNA 序列，通过在线软件 psRNATarget 对其靶基因进行了预测，8 条地黄 miRNA 共预测到 51 个靶基因，其中有 34 个靶基因有功能注释，这些靶基因分别编码转录调控因子、信号转导、细胞骨架、代谢等相关蛋白见表 2。

4 讨论

miRNA 作为一种新发现的非编码基因表达调控因子，在真核生物的基因表达调控中起到十分重

要的作用，参与了调控植物器官的形态建成、生长发育、信号转导、激素合成和对逆境因子的应答^[17-18]。除此之外，研究人员还发现 miRNA 影响植物次生代谢产物的生物合成。如拟南芥中的 miR828，参与调控黄酮类化合物等次生代谢产物的合成^[19]；miR156 可靶向与次生代谢相关的 SPL 转录因子，当上调 miR156 的表达时可促进拟南芥中花青素的积累，下调 miR156 的表达时却会使植物体内黄酮醇的积累量升高^[20]。随着 miRNA 研究的扩大和深入，植物 miRNA 的功能研究不再仅集中在模式植物中，药用植物的 miRNA 研究也越来越得到关注。如 Hao 等^[21]发现红豆杉中的 miR164 和 miR171 可直接靶向紫杉醇合成途径中的紫杉烷 13 α -羟基化酶和紫杉二烯 2 α -O-苯甲酰转移酶基因，参与调控紫杉醇的生物合成。Wang 等^[22]通过实验推测出掌叶半夏中 miR166 作用的靶基因与叶的发育有关；miR397 的靶基因与氧化、干旱、营养等胁迫响应有关；miR156 作用的靶基因参与花的发育调控。陈新建等^[23]利用 Solexa 测序技术并结合生物信息学和荧光定量分析，在正茬和重茬地黄之间构建了 miRNAs 差异表达谱，发现表达差异的 miRNA

表 2 地黄中新预测 miRNA 的靶基因及编码蛋白

Table 2 Target genes of new predicted miRNA and their encoding proteins in *R. glutinosa*

miRNA	靶基因	靶蛋白	抑制作用
miR168	Unigene4495_RNA	AGO1-2	分裂
	Unigene10361_RNA	光敏素 B	分裂
	Unigene192_RNA	生长素响应因子 1	分裂
miR172	Unigene67738_RNA	AP2 结构域的转录因子	分裂
	Unigene14104_RNA	poly(A)-mRNA 结合蛋白	翻译
	Unigene867_RNA	生长素响应家族蛋白	分裂
	Unigene58139_RNA	蛋白质结合蛋白	分裂
	Unigene22164_RNA	核基质成分蛋白 1	分裂
	Unigene18719_RNA	F-box 蛋白	分裂
	Unigene78641_RNA	假设蛋白	分裂
miR396	Unigene24520_RNA	微管蛋白的 γ 复合物相关蛋白	分裂
	Unigene12013_RNA	钼喋呤硫酸化酶	分裂
	Unigene32769_RNA	Tic62 蛋白质	分裂
miR397	Unigene35712_RNA	LAC11	分裂
	Unigene74397_RNA	漆酶	分裂
	Unigene30375_RNA	邻二酚氧化酶	分裂
	Unigene9352_RNA	假设蛋白	分裂
miR472	Unigene8171_RNA	Jp18	分裂
miR2218	Unigene24988_RNA	假设蛋白	分裂
miR5290	Unigene56861_RNA	GTP 结合蛋白同系物 LepA	分裂
	Unigene6899_RNA	RNA 识别含基序蛋白质	分裂
	Unigene25368_RNA	3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶 2	分裂
	Unigene6940_RNA	磷酸胆碱磷酸酶 1	分裂
	Unigene23380_RNA	ATP/ADP 转运质体	分裂
	Unigene79963_RNA	MMP37 样蛋白	翻译
miR6111	Unigene46017_RNA	细胞分裂素调节激酶 1	分裂
	Unigene80378_RNA	S 位点的凝集素蛋白激酶家族蛋白	分裂
	Unigene39634_RNA	激酶家族蛋白	分裂
	Unigene23626_RNA	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	分裂
	Unigene19132_RNA	受体激酶受体 TRKb	分裂
	Unigene17761_RNA	ATP 结合酶	分裂
	Unigene66344_RNA	类受体蛋白激酶 2	分裂
	Unigene39357_RNA	激酶家族蛋白	分裂
	Unigene5363_RNA	激酶相互作用因子 1	分裂

参与了转录调控、信号传导、逆境生理等生物学过程, 这些 miRNAs 及其靶基因直接或间接的调控地黄根系的生长发育, 在 miRNAs 介导的转录后基因表达调控在连作障碍的形成过程中可能起到关键作用, 为通过 miRNAs 调控基因表达而引起地黄连作

障碍的分子机制提供了线索。因此, 挖掘、鉴定药用植物 miRNA 不仅能够解析植物次生代谢产物的生物合成途径, 对今后解决药用植物的生产栽培中的困难, 培育有效成分高、抗性好的中药材也具有重要意义。

虽然高通量测序技术挖掘、鉴定 miRNA 是目前最直接有效的手段，但利用生物信息学预测 miRNA 更加快速和经济。本研究利用地黄 EST 序列鉴定了分属于 8 个家族的 8 个地黄 miRNA 序列，并通过实时定量 PCR 对其在地黄组织中的表达情况进行了检测，为进一步研究它们在地黄中的功能奠定了基础。本研究还对 8 条地黄 miRNA 的靶基因进行了预测，预测到了 51 个靶基因，这些靶基因参与到地黄生长发育、新陈代谢、应激反应等一系列重要的进程。如 miR168 的靶基因分别靶向 AGO1-2 蛋白、光敏色素 B、生长素响应因子 1。其中 AGO1-2 蛋白在植物中参与维持基因组的稳定、调控组织发育、对逆境的适应性应答以及在 RNA 层面对入侵核酸产生免疫等一系列过程^[24]。光敏色素 B 是一种植物自身合成的色素蛋白质，可以通过对基因表达的调控调节光周期反应进而调节植物的生长和开花^[25]；并且对叶绿素的合成和发育具有调控作用^[26]。生长素响应因子 1 (ARF1) 是一种调控生长素响应基因表达的转录因子，它可与生长素响应元件特异结合，促进或抑制基因的表达^[27]。miR397 的靶基因编码 LAC11、漆酶、邻二酚氧化酶，均属于多酚氧化酶，多酚氧化酶作为一种氧化还原酶在光合作用中发挥作用。如调节叶绿体中有害的光氧化反应速度，参与其中电子传递；还可促进伤口的愈合，也可增加植物对病原体的抗性^[28]。在预测的 51 个靶基因中，miRNA 对其中的绝大多数是通过切割降解方式进行表达调控（表 2）。地黄在生产栽培过程易受病毒病及连长障碍的影响，造成块根产量的下降和品质的下滑，以上 miRNA 的鉴定为研究它们在地黄块根发育中的作用和在逆境胁迫条件下的作用机制提供有利条件。

今后随着药用植物 miRNA 研究的不断深入，必将发现更多的地黄 miRNA 及其靶基因，对其基因表达调控的认识也将越来越全面和准确，有望运用 miRNA 基因工程技术用于改良地黄的遗传品质，培育抗逆性好、有效成分含量高的地黄新品种。

参考文献

- [1] Jung J H, Seo P J, Park C M. MicroRNA biogenesis and function in higher plants [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2009, 3(2): 111-126.
- [2] 张松莲, 喻宁华, 饶力群, 等. 植物 miRNA 的功能及其作用机制 [J]. *热带作物学报*, 2006, (5): 444-450.
- [3] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function [J]. *Cell*, 2007, 131: 11-29.
- [4] Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19-53.
- [6] Yang Y, Chen X, Chen J, et al. Differential miRNA expression in *Rehmannia glutinosa* subjected to continuous cropping [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11(1): 53.
- [7] Fahlgren N, Howell M D, Kasschau K D, et al. High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for frequent birth and death of MIRNA genes [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(2): e219.
- [8] Yao Y, Guo G, Ni Z, et al. Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Genome Biol*, 2007, 8 (6): R96.
- [9] Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, et al. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing [J]. *BMC plant biology*, 2008, 8(1): 25.
- [10] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3406-3415.
- [11] Zhang B H, Xiao Ping P A N, Qing Lian W, et al. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis [J]. *Cell Research*, 2005, 15(5): 336-360.
- [12] Zhang Y J. MiRU: an automated plant miRNA target prediction server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(S2): 701-704.
- [13] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431: 350-355.
- [14] Zhang B H, Pan XP, Anderson TA. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(15): 3753-3762.
- [15] Frazier T P, Xie F L, Freistaedter A, Burklew CE, Zhang BH. Identification and characterization of microRNAs and their target genes in bobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. *Planta*, 2010, 232(6): 1289-1308.
- [16] Zhang B H, Pan X P, Stellwag E J. Identification of soybean microRNAs and their targets [J]. *Planta*, 2008, 229(1): 161-182.
- [17] 郭 韬, 李广林, 魏 强, 等. 植物 MicroRNA 功能的研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2011, 31(11): 2349-2351.
- [18] Voinnet O. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: A touch of robustness and versatility [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(4): 464-470.

- [19] Luo Q J, Mittal A, Jia F, *et al.* An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in Arabidopsis [J]. *Plant Mol Biol*, 2012, 80(1): 117-129.
- [20] Gou J Y, Felippes F F, Liu C J, *et al.* Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4): 1512-1522.
- [21] Hao D C, Yang L, Xiao P G, *et al.* Identification of Taxus microRNAs and their targets with high-throughput sequencing and degradome analysis [J]. *Physiol Plant*, 2012, 146(23(4)): 388-403.
- [22] Wang B, Dong M, Chen W, *et al.* Microarray identification of conserved microRNAs in *Pinellia pedatisecta* [J]. *Gene*, 2012, 498(1): 36-40.
- [23] 陈新建, 杨艳会, 许海霞, 等. 正荏与重荏地黄 miRNAs 的差异表达谱分析 [J]. 全国第 9 届天然药物资源学术研讨会论文集, 2010.
- [24] 李超, 杜志游, 陈集双. 解读 AGO 蛋白结构及其功能 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(11): 969-976.
- [25] 刘圈炜, 何云, 齐胜利, 等. 光敏色素研究进展 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 237-241.
- [26] 赵杰, 周晋军, 顾建伟, 等. 光敏色素 B 正调控水稻叶绿素合成和叶绿体的发育 [J]. 中国水稻科学 (ChinJ RiceSci), 2012, 26(6): 637-642.
- [27] 方佳, 何勇清, 余敏芬, 等. 植物生长素响应因子基因的研究进展 [J]. 浙江农林大学学报 ISTIC, 2012, 29(4): 611-616.
- [28] 胡春和. 多酚氧化酶的研究现状 [J]. 中国高新技术企业, 2009, 3(14): 73-75.