

# 植物 miRNA 在调节低磷胁迫响应中的作用

潘晓阳<sup>1</sup>, 张文睿<sup>1</sup>, 王丹<sup>1</sup>, 申忠宝<sup>2</sup>, 郭长虹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院 / 黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150000;

<sup>2</sup> 黑龙江省农业科学院草业研究所, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 植物 MicroRNA (miRNA) 是一类内源性非编码小分子 RNA, 它们参与调节植物的生长、发育和代谢过程中多种基因的表达。近期的研究发现 miRNA 参与调节磷的吸收和利用, 对植物适应低磷胁迫具有重要作用。本文概述了植物磷吸收和转运的机制, 介绍了低磷胁迫下 miRNA 的表达水平变化, 重点对 miRNA 在植物响应低磷胁迫中的作用, 如改变根系结构、提高磷的转运和再利用效率、参与花青素和抗氧化物生物合成等进行了综述, 以期揭示植物低磷胁迫响应分子机制, 提高植物对磷的吸收效率提供借鉴。

**关键词:** 植物; miRNA; 低磷胁迫; 响应

## The Roles of Plant MicroRNA in Regulating the Response to Low Phosphorus Stress

PAN Xiao-yang<sup>1</sup>, ZHANG Wen-rui<sup>1</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>, SHEN Zhong-bao<sup>2</sup>, GUO Chang-hong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science and Technology, Harbin Normal University/Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and

Genetic Breeding of Heilongjiang Province, Harbin 150000; <sup>2</sup> Institute of Forage and Grassland Science,

Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086)

**Abstract:** Plant microRNA (miRNA) is a group of endogenous non-coding RNAs that participate in regulating gene expression during the processes of plant growth, development and metabolism. Recent studies indicated that miRNAs play important roles in plant adaptation to low phosphorus stress by regulating phosphorus absorption and utilization. This review summarizes the molecular mechanisms of phosphorus absorption and transport by plants, and introduces the transcriptional patterns of miRNAs under low phosphorus stress. Especially, this focuses on plant miRNAs responding to low phosphorus stress, including structure modification of root system, improvement of the efficiency of phosphorus transport and reuse, as well as anthocyanin and antioxidant biosynthesis. It is expected to provide insights for unlocking the molecular mechanisms of plant responses to low phosphorus stress and improving the efficiency of plant phosphorus absorption.

**Key words:** plant; microRNA; low phosphorus stress; response

磷 (P) 是植物生长发育必需的营养物质, 是核酸、磷脂和高能磷酸盐化合物 ATP、ADP 和 AMP 的关键组成成分<sup>[1]</sup>。磷在细胞新陈代谢过程中起

关键作用, 然而与其他矿物元素相比, 土壤中植物对磷吸收的有效率非常有限<sup>[2]</sup>。植物以  $H_2PO_4^-$  和  $HPO_4^{2-}$  的形式摄取磷酸盐 (Pi)。然而, 土壤中大部

收稿日期: 2019-10-22 修回日期: 2019-11-09 网络出版日期: 2019-12-06

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191022001>

第一作者研究方向为遗传育种学, E-mail: 924207703@qq.com; 张文睿为共同第一作者

通信作者: 郭长虹, 研究方向为植物遗传学, E-mail: kaku3008@126.com

**基金项目:** 国家重点研发计划项目 (2017YFD0101303); 黑龙江省科技攻关项目 (GA18B104); 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08004-002); 哈尔滨师范大学研究生创新基金项目 (HSDSSCX2019-21)

**Foundation project:** National Key R&D Program Projects (2017YFD0101303), Science and Technology Project of Heilongjiang Province (GA18B104), The National Major Project for Cultivation of Transgenic Crops (2016ZX08004-002), The Postgraduate Innovation Fund of Harbin Normal University (HSDSSCX2019-21)

分的磷,由于吸附或与其他阳离子反应生成沉淀或被微生物转化成有机形式而不能溶于水。因此,植物进化出许多适应性的反应以维持磷稳态,这些反应包括侧根增多、根毛增长、分泌有机酸和磷酸酶使土壤中的磷酸盐溶解,这些过程由一系列基因控制的磷相关信号通路所协调<sup>[1]</sup>。

MicroRNA (miRNA) 是一类内源性非编码小分子 RNA, 长度为 21~24 nt, 由发夹结构的前体剪切加工产生<sup>[3]</sup>。miRNA 参与了植物对非生物和生物胁迫的反应<sup>[4]</sup>。在植物中,成熟的 miRNA 通过 HST1 转运蛋白从细胞核中输出至细胞质中,然后成熟的 miRNA 与 AGO 蛋白结合形成 RISC 复合体。RISC 根据碱基互补配对原则切割靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 的翻译。近年来的研究表明,许多 miRNA 直接或间接影响植物在低磷胁迫下的适应和耐受性<sup>[5]</sup>。本文对植物 miRNA 在低磷胁迫响应中的作用作综述,为利用 miRNA 进行耐低磷胁迫分子育种奠定基础。

## 1 植物磷吸收和转运的机制

植物中磷浓度通常比土壤中的磷浓度高 1000~10000 倍,因此植物通过主动运输的方式从土壤中吸收磷<sup>[6]</sup>。当外部磷浓度很低时,植物会有多个磷转运体用于获取磷<sup>[4,7]</sup>。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中已经鉴定出 5 个磷转运蛋白家族: PHT1<sup>[8]</sup>、PHT2<sup>[7]</sup>、PHT3<sup>[9]</sup>、PHT4<sup>[10]</sup> 和 PHT5<sup>[11]</sup>。磷从土壤到根细胞的摄取由高亲和力的 PHT1 介导,该蛋白家族在质膜上利用 H<sup>+</sup> 梯度来调节 H<sup>+</sup>/Pi 共转运通道蛋白的活性<sup>[8]</sup>。PHT2 蛋白定位于叶绿体内膜,而小麦的 *pht2;1* 突变体植株叶绿体中的磷浓度显著降低,这表明 *TaPHT2;1* 在调节磷从胞质向叶绿体的转移中起着关键作用<sup>[12]</sup>。PHT3 定位于线粒体内膜上,通过 Pi/H<sup>+</sup> 同向转运, Pi/OH<sup>-</sup> 反向转运来调控磷稳态<sup>[9]</sup>。PHT4 定位于叶绿体、非光合质体和高尔基体中,参与磷、有机阴离子和氯化物的运输<sup>[10]</sup>。PHT5 则定位于液泡膜,参与调节磷在液泡和细胞溶胶之间的分配以维持磷稳态<sup>[13]</sup>。

在拟南芥中,有一个调控磷转运信号和磷稳态的途径 PHR1-IPS1-miR399-PHO2,在这个途径中,PHR1 和 SPX1 之间的磷依赖性互作可能受细胞中有效磷水平的影响<sup>[14-15]</sup>。在低磷胁迫下,PHR1 通过结合 P1BS 调控元件激活低磷胁迫诱导基因 (*IPS1* 和 *SPX1*)<sup>[14]</sup>。PHR1 可以诱导 miR399 的表达,其靶基因 *PHO2* 的表达产物是一种 E2 泛素结合酶,*PHO2* 的表达会引起 PHT 家族的几种磷酸

转运蛋白的降解。miR399 的上调表达能够降低 *PHO2* 的表达,从而减少磷酸转运蛋白的降解,并最终增强了磷从地下转移到地上部分的能力<sup>[14]</sup>。*IPS1* 基因可以通过介导级联信号调节转运蛋白 PHT1s 和 PHO1 的表达来调节植物根系的活动和磷的吸收进行磷从地下到地上的运输,在这个过程中 *IPS1* 基因起着关键作用<sup>[15]</sup>。

在水稻中 *PHO2* 和 miR399 的互作受到 *IPS1* 基因的调控<sup>[16]</sup>。*IPS1* 在低磷胁迫 21 d 的水稻根系中升高 1000 倍以上,强于 miR399,这会导致低磷胁迫 1 周后 *PHO2* 的表达水平相对增加。这有可能是由于植物体内某些机制导致 *IPS1* 转录的 mRNA 不会被磷酸盐敏感的 RNA 结合蛋白降解<sup>[17]</sup>。通过对两个小麦品种 Crac 和 Tukan 的研究发现,低磷胁迫条件下,Crac 中 *TaPHT1;2*、*TaPHT1;10*、*TaIPS1* 和 *Tae-miR399b* 的表达水平均显著高于 Tukan,而 Crac 独脚金内酯的基础含量要高于 Tukan,因此独脚金内酯可能参与了对小麦中磷转运信号通路的调控<sup>[18]</sup>。

在水稻中,PHR1 的同源蛋白 PHR2 通过改变其作用位置来响应磷含量的变化。磷含量较高时,PHR2 被定位在胞质溶胶中,反之,则被定位于核中<sup>[19]</sup>。定位于核的 SPX 蛋白可以通过磷酸依赖的方式形成 SPX-PHR 复合物,阻止 PHR 与 *PSI* 基因的启动子结合来调节磷酸盐信号<sup>[19]</sup>。在草莓中,乙烯能够通过促进 *EIN3* 的表达间接促进 *PHR1* 的表达以维持植物体内的磷稳态<sup>[20]</sup>。

## 2 低磷胁迫下 miRNA 的表达水平变化

miRNA 能参与植物的发育过程,调节植物对不同非生物和生物胁迫的响应<sup>[21]</sup>。近年来,通过高通量测序,发现多个 miRNA 在低磷胁迫下差异表达<sup>[22-29]</sup>。植物在低磷胁迫下会通过改变磷吸收相关基因的表达量来增强对磷元素的吸收,以此来适应逆境<sup>[1]</sup>。

近年来,随着高通量测序技术的发展,在低磷胁迫下拟南芥<sup>[22]</sup>、玉米<sup>[24,30]</sup>、大豆<sup>[23]</sup>、水稻<sup>[25]</sup>、大麦<sup>[26]</sup>、白羽扇豆<sup>[28]</sup>、番茄<sup>[29]</sup>和紫花苜蓿<sup>[27]</sup>等植物中观察到了 miRNA 的差异表达。在模式植物拟南芥中,miRNA 在低磷胁迫中的作用已进行了较为通透的研究,如 miR399、miR827 和 miR2111 在低磷胁迫条件下被特异诱导<sup>[22]</sup>。此外拟南芥 miR156、miR169、miR163、miR395、miR398 和 miR778 可能参与了磷稳态的调控<sup>[31-32]</sup>。其中,miR395 在韧皮部下调表达,能够将幼苗根系中的营养从根转移至茎,从而提高对低磷胁迫的抗性<sup>[31]</sup>。由于低磷胁迫

对于农作物的产量具有较大影响,人们对于培育出能够抵抗低磷胁迫的高产作物有着迫切的需求。

在粮食作物玉米中,在低磷胁迫下共鉴定出 28 个差异表达的 miRNA,其中 miR166、miR156、miR159、miR396、miR397 和 miR168 等家族上调表达,而 miR395、miR171、miR2118、miR169 和 miR398 则下调表达<sup>[30]</sup>。功能注释分析发现,这些磷应答 miRNA 的靶基因涉及转录、细胞过程、代谢过程、生物调节和对刺激物的应答等多种生物学过程,而且大多数为转录因子,如 SBP、MYB、ARF、NF-YA、AP2 和 GRF<sup>[30]</sup>。

高通量测序及荧光定量 PCR 结果表明,大豆 miR399a、miR399b、miR399c、miR399d 在地上和地下部分均显著上调。miR399a、miR399b、miR399c、miR399d 和 *GmLPS1* 的核心区域几乎完全匹配,这意味着大豆 miR399 参与了磷转运信号的激活<sup>[23]</sup>。但是,和低磷胁迫下的其他物种相比,由于豆类植物中可能会有独特的方式调控其磷稳态,所以 miR399 在豆类植物中的诱导表达水平是比较低的,以此可推测豆类植物中可能会有独特的方式调控其磷稳态,这项研究结果对于豆科植物磷稳态调节机制的研究会有新的思路<sup>[33]</sup>。

水稻 miR399 负调控叶尖坏死基因 1 (*LTN1*, *LEAVE TIP NECROSIS1*),该基因编码了一类含有泛素结合域的蛋白质。水稻中 *LTN1* 是低磷胁迫信号的重要组成部分,参与调控多个低磷胁迫的响应,它参与水稻高亲和力磷酸盐转运蛋白 PHTs 的降解<sup>[34]</sup>。miR399 过表达水稻根中,磷吸收相关基因的表达显著增加,水稻 *ltn1* 突变体表现出根系生长速率的增加和磷转运速率的增强<sup>[35]</sup>,因此 miR399 的上调会促进水稻根的生长和磷的转运。

随着农牧业的发展,为了培育高产、高抗的牧草新品种,人们开始关注 miRNA 在牧草低磷胁迫中的重要作用。紫花苜蓿低磷胁迫下有 47 个已知的 miRNA 在根中差异表达,同时特异性地检测到了 miR159b、miR160、miR166 和 miR5037a; 44 个已知的 miRNA 在芽中差异表达<sup>[27]</sup>,特异性地检测到了 miR172a、miR172c 和 miR408。这些特异表达的 miRNA 可能在根或芽中发挥与磷吸收或转运相关的功能<sup>[27]</sup>。通过以上结果,我们得到了大量低磷胁迫差异表达的 miRNA,值得我们对其在低磷胁迫中的功能进行进一步的研究。

### 3 植物 miRNA 在低磷胁迫下的作用

在低磷环境下,miRNA 的表达变化会影响靶基

因的表达,导致植物在低磷条件下发生生理和形态变化。这些变化包括根系构型的改变、代谢产物的产生以及花青素和氧化自由基清除剂的合成。表 1 显示了不同的 miRNA 在低磷胁迫条件下生物学功能。

大量研究表明一些 miRNA 家族,如 miR156、miR159、miR166、miR319、miR395、miR398、miR399 和 miR827 在不同物种间对低磷胁迫有共同的响应,miR399 在磷转运通路中是高度保守的<sup>[41-42]</sup>。其中,miRNA399 在拟南芥、白羽扇豆、西红柿、水稻中均能表达,且在拟南芥和水稻中功能已被验证<sup>[22, 25, 28-29, 35, 43]</sup>。miR827 在拟南芥和水稻中表达,且对低磷胁迫响应的功能已被验证<sup>[22, 37, 39, 44]</sup>。除此之外,分别在拟南芥和水稻中特异表达的 miR778 和 miR444 分别参与磷稳态的调控和营养信号的传递,已通过遗传转化的方式对其功能进行了验证<sup>[32, 38]</sup>。紫花苜蓿 miR2634a、miR5287b 在低磷胁迫中差异表达,但其功能还未进行验证,因此需要进一步的研究来揭示这些低磷胁迫响应 miRNA 是如何参与了植物对低磷胁迫的响应<sup>[27]</sup>。

#### 3.1 改变根系结构

根系结构变化是低磷胁迫的重要形态学反应,而 miRNA 在根系生长方面具有调节作用<sup>[45]</sup>。有报道表明,miRNA 可以减少主根的发育而增加侧根发育,并刺激侧根伸长,从而增加植物对环境的适应性<sup>[45]</sup>。与野生型拟南芥相比,miR778 过表达拟南芥侧根数目增加,而 miR778 靶基因模拟拟南芥初生根则会变短<sup>[32]</sup>,说明 miR778 可能通过参与植物根的发育,进而促进植物对磷的吸收。在紫花苜蓿中,miR156、miR159、miR160、miR166、miR167、miR169、miR171 和 miR2634 靶向调节 ARF、SPL 的转录因子的表达从而参与根的发育调节<sup>[45]</sup>。miR393、miR160、miR164 和 miR167 可以通过调节 NAC 和生长素转录因子表达丰度参与调节根的生长,因此可以推测它们与磷缺乏中侧根发育的调节有关<sup>[40, 46-47]</sup>。例如,水稻 *OsmiR167* 的靶基因 *OsARF12*,会促进生长素转运体 *OsPINs*、*OsLAXs*、*OsPGPs* 的表达并通过改变根系结构的方式来调节磷稳态<sup>[47]</sup>。

生长素在植物发育过程中起重要作用。在玉米低磷胁迫的早期阶段,miR393 的差异表达可在生长素相关的侧根发育中发挥作用<sup>[24]</sup>。低磷胁迫下,过表达 miR393 的转基因剪股颖侧根与分蘖数增多,表明 miR393 可能参与低磷胁迫下根的生长<sup>[48]</sup>。虽然植物 miRNA 的差异表达对于植物根系

表 1 低磷胁迫条件下差异表达 microRNA 及其靶基因功能和组织特异性表达情况

Table 1 Different microRNAs and their target genes are involved in phosphorus starvation, function and tissue-specific effects

miRNA	靶基因 Target gene	生物学功能 Biological function	物种 Species	表达情况 Expression	参考文献 References
<b>miR156</b>	SPL 转录因子	叶片的形成、开花时间、育性	拟南芥	R(+)	[22]
			白羽扇豆	R(+), L(-)	[28]
<b>miR159</b>	MYB, TCP 转录因子	植物发育	白羽扇豆	R(+), SM(-), L(-)	[28]
			大豆	R(+)	[23]
miR160	生长素响应因子	减少生长素反应活性和营养生长 侧根和不定根的发育, 信号转导	白羽扇豆	R(+), L(-)	[28]
miR164	NAC 转录因子	加速衰老	白羽扇豆	R(+), SM(-), L(-)	[28]
<b>miR166</b>	HD-ZIP 转录因子	地上部分发育	白羽扇豆	R(+), SM(-), L(-)	[28]
miR167	生长素响应因子	增强生长素反应活性, 侧根生长	白羽扇豆	R(+), L(-)	[28]
miR168	AGO 蛋白	miRNA 的稳态和反馈调控	白羽扇豆	R(+), L(+)	[28]
miR169	HAP2/NFYA 转录因子 CAAT 结合因子	抗氧化	拟南芥	R(-), S(-)	[22]
miR171	SCARECROW 转录因子	根的发	白羽扇豆	SM(+), L(+)	[28]
miR172	类 AP2 转录因子	乙烯应答途径, 花的发育	番茄	L(-)	[29]
<b>miR319</b>	TCP 转录因子	减少营养生长	白羽扇豆	R(+), SM(-)	[28]
<b>miR395</b>	三磷酸腺苷硫酸酯酶 硫酸盐转运蛋白	硫酸盐稳态	拟南芥	R(-), S(-)	[22]
			白羽扇豆	R(-), SM(-), L(+)	[28]
miR396	生长调节因子 (GRF)	叶片发育	白羽扇豆	R(+), L(-)	[28]
<b>miR398</b>	COX5b-1; CCS1 COX	铜稳态, 氧化应激, 增强在应激下产生 ATP	拟南芥	SD(-), R(-), S(-)	[22]
			番茄	L(+)	[29]
			大豆	R(-)	[23]
<b>miR399</b>	泛素化连接酶 E2/UBC24	磷酸盐稳态、摄取和转运	拟南芥	SD(+), R(+), L(+)	[22, 36-37]
			白羽扇豆	R(+), L(+)	[28]
			西红柿	R(+), S(+)	[29]
			水稻		[25, 35]
miR444	MADS-box	根系发育	水稻	R(+)	[38]
miR778	Su (var) 3-9 同系物 6 (SUVH6)	促进初生根和侧生根的生长, 地上部分 磷的积累, 低磷胁迫下花青素的积累	拟南芥	R(+), S(+)	[32]
<b>miR827</b>	E3 连接酶 SPX 蛋白	氮磷代谢 促进叶片衰老, P 平衡, P 吸收	拟南芥	SD(+), R(+), S(+)	[22, 37]
			水稻	R(+), S(+)	[39]
miR828	TAS4	花青素合成	拟南芥	S(+)	[22]
miR2111	F-box 结构域蛋白		拟南芥	SD(+), R(+), S(+)	[22, 37]
miR2643	F-box 相互结构域蛋白 脱落酸受体 Py19 类蛋白 乙烯型锌指蛋白	嫩枝发育, 叶片衰老, 抵抗干旱胁迫 调节根系发育和营养胁迫反应	紫花苜蓿	R(-), S(-)	[27, 40]
miR5287	GDSL 脂肪酶 果糖二磷酸醛缩酶 细胞色素 P450 家族蛋白	脂肪酸的降解 糖酵解或糖异生; 激素和除草剂的合成与降解	紫花苜蓿	S(+)	[27]

R: 地下部分; L: 叶; S: 地上部分; SM: 茎; SD: 幼苗; (+): 上调; (-): 下调; 粗体标记的为保守的 miRNA 家族

R: root, L: leaf, S: shoot, SM: stem, SD: seedling, (+): up, (-): down, conservative miRNAs are indicated in Bold

发育起着重要的作用, 但是要了解其详细的分子机制还需要做更深入的研究。

### 3.2 提高磷的转运和再利用效率

许多 miRNA 通过调节它们靶基因的表达参与磷的吸收、再定位和再活化。例如, miR399 可以通过抑制泛素结合 E2 酶, *PHOSPHATE2* (*PHO2*) 来调节水稻中的磷稳态<sup>[35]</sup>。低磷胁迫下在拟南芥突

变体 (*phr1*) 中 miR399 的表达被显著抑制, 这说明在低磷胁迫响应通路中, *PHR1* 基因调控 miR399 基因的表达<sup>[49]</sup>。*PHR1*、miR399 和 *PHO2* 组成了一个保守的信号传导通路, 该通路对低磷胁迫作出响应<sup>[35]</sup>。*PHO2* 对磷的吸收、转化以及再利用水平起负调控作用。当磷供应充足时 *PHO2* 上调表达, 植物对磷吸收效率降低<sup>[35]</sup>。拟南芥的 *pho2* 突变体

在地上部分会积累过多的磷,从而表现出磷中毒现象<sup>[50]</sup>。同样,miR399 过表达会导致植物增强磷的摄取和在芽中的转移,在磷充足条件下引起磷中毒<sup>[49]</sup>。低磷胁迫会抑制磷从老叶到幼叶的再利用<sup>[51]</sup>,因此可以通过诱导 miR399 的过表达使其靶基因 *PHO2* 下调,从而增强磷从根部至地上部的吸收、转运和再利用,这有助于维持磷的稳态<sup>[35]</sup>。在水稻<sup>[25]</sup>中也发现 miR399 和 *PHO2* 的同源基因在调节磷稳态方面具有类似作用,这表明 miR399 在被子植物中的调节作用是相对保守的。

研究表明 miR827 在维持植物体内磷稳态方面也起着关键作用<sup>[52]</sup>。miR827 靶向调节 *NLA* 和 *PHT5* 基因家族,而 *NLA* 转录物编码 RING 泛素 E3 连接酶,能够使磷转运相关的蛋白降解<sup>[52]</sup>。低磷胁迫可以诱导 miR827 的表达,在该条件下 *NLA* 的转录水平会受到抑制,从而增强对磷的转运<sup>[52]</sup>。*nla* 和 *pho2* 突变体的早期衰老表型都是由过量磷积累引起的<sup>[52]</sup>。在低  $\text{NO}_3^-$  条件下,*nla* 和 *pho2* 突变体植株中磷的过度积累更为明显,说明 *NLA* 和 *PHO2* 维持磷稳态与  $\text{NO}_3^-$  含量有关<sup>[50,53]</sup>。有研究报道,miR827 的靶基因 *SPX-MFS* 可以编码 SPX 亚家族蛋白,miR827 可以通过下调该基因的表达而正调控植物的磷稳态,该研究结果丰富了 miR827 对磷稳态的调节方式,对于 miR827 在低磷中的功能研究开拓了新的方向<sup>[39]</sup>。

miR169 通过介导 NF-YA 转录因子的上调从而导致硝酸盐转运体蛋白 AtNRT2.1 和 AtNRT1.1 的上调表达<sup>[54]</sup>,从而促进  $\text{NO}_3^-$  的吸收,而充足的  $\text{NO}_3^-$  可以促进根系的形成,从而促进豆科植物对磷的吸收<sup>[55]</sup>,因此,低磷胁迫条件下 miR169 的下调可能会促进植物对氮的吸收和再活化,同时间接促进磷吸收。miR399、miR827 和 miR169 这类物种保守的 miRNA 可能在不同物种的磷转运信号通路中具有通用的作用机制来抵抗低磷胁迫。

### 3.3 参与花青素和抗氧化物生物合成

磷缺乏会诱导植物花青素的积累,一些 miRNA 靶向调节了参与花青素生物合成途径的相关基因<sup>[56]</sup>。花青素生物合成的激活因子和抑制因子之间存在动态平衡关系,它不仅和转录的协调有关,而且与 miRNA 的调节相关<sup>[57]</sup>。miR828 在低磷胁迫条件下上调表达,可以通过对其靶基因 *TAS4* 切割产生 ta-siRNA<sup>[22]</sup>。ta-siRNA 的靶基因的表达产物 MYB 转录因子是调控花青素生物合成途径中的关键基因<sup>[22]</sup>。此外,miR156 主要靶定 SPLs 家

族,该家族基因是影响花青素生物合成的负调控因子,miR156 靶向调节 *SPL9* 基因最终对花青素的合成产生正调控的作用<sup>[58]</sup>。有报道表明,miR778 可能通过调控花青素的合成来调节植物体内的磷稳态<sup>[32]</sup>。花青素具备抵抗氧化应激的作用<sup>[59]</sup>,因此对于提高植物在低磷胁迫下的生存能力可能具有重要的功能。

氧化应激是植物普遍存在的一种现象,在低磷胁迫条件下,植物通过产生激活氧化清除剂来保护机体,以应对有害的氧化应激,从而维持氧化还原稳态<sup>[60]</sup>。在低磷胁迫条件下,拟南芥 miR169 和 miR398 会显著下调<sup>[22]</sup>。过表达 miR169 靶基因 *NF-YA5* 会增加拟南芥中几种抗氧化酶的表达,如谷胱甘肽 S-转移酶和过氧化物酶,帮助植物抵抗低磷胁迫条件下产生的氧化应激<sup>[61]</sup>。在拟南芥中,miR398 的靶基因编码了 CSD1 和 CSD2 转录因子,其表达产物 Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (SOD) 可用于清除氧化物<sup>[62]</sup>。在氧化应激条件下,miR398 的靶基因 *SODX* 对总 SOD 活性具有拮抗作用,miR398 的上调可促进 SOD 的积累以增强氧化应激耐受性并最终增强植物对低磷胁迫的耐受性<sup>[63]</sup>。

## 4 展望

低磷胁迫对植物生长和产量都有着严重影响。近年来随着生物信息学的发展,大量的 miRNA 被发现<sup>[64]</sup>。miRNA 作为一类重要的调控因子,在植物抵抗低磷胁迫过程中发挥着重要作用。但是目前鉴定与验证的低磷胁迫相关 miRNA 还比较少,需要对低磷胁迫相关的 miRNA 及其靶基因进行更深入的研究,以提高植物对磷元素的有效利用。

在响应低磷胁迫应答方面,植物 miRNA 除了调控相关基因的表达以外,也通过其他表观遗传调控方式响应低磷胁迫,如染色质结构和甲基化模式的改变<sup>[65]</sup>、小干扰 RNA (siRNA)<sup>[66]</sup> 和长链非编码 RNA (lncRNA)<sup>[67]</sup> 的调控。例如,拟南芥 miR778 的靶基因 *SUVH6* 可编码 H3K9 甲基转移酶,该酶促进了组蛋白 H3 的赖氨酸甲基化,可能参与调控植物体内的磷稳态<sup>[32]</sup>。小干扰 RNA (siRNA) 可以在低磷胁迫的牵牛花中抑制花青素合成相关基因 *CHS-A*,从而抑制花青素合成<sup>[66]</sup>。除此之外,siRNA 还能够参与调控 DNA 的甲基化,siRNA 可以通过 RNA 介导的 DNA 甲基化 (RdDM) 途径诱导 DNA 甲基化<sup>[68]</sup>。有报道表明,在水稻中低磷胁迫会调节多种磷元素转运相关基因的甲基化水平,包括磷稳

态的关键调节基因如 *SPX2*<sup>[69]</sup>。除此之外,甲基化水平的改变会影响拟南芥的根系发育情况,进而影响植物对磷的吸收<sup>[70]</sup>。因此 siRNA 也有可能通过调节 DNA 甲基化参与植物对低磷胁迫的响应。玉米的 lncRNA, PILNCR1 可以通过互补结合的方式降低 miR399 的水平来调节植株对磷的吸收<sup>[67]</sup>。对低磷胁迫条件下非编码 RNA 表观遗传调控的研究可以更加清晰地了解植物对低磷胁迫的适应性,为植物营养获取和利用提供更深入的理解。

与编码蛋白基因的功能研究相比,miRNA 的功能研究手段具有一定的局限性,目前常用方法包括对靶基因的点突变和靶基因模拟技术。由于 miRNA 是非编码 RNA,所以通过基因移码或替换的点突变一般不会对 miRNA 的功能产生显著影响,而是需要在 miRNA 断裂功能最关键的第 10 或 11 位碱基处进行结合位点突变,该位点处的错配会导致 miRNAs 无法切割其靶 mRNAs,从而使 miRNA 丧失原本的功能<sup>[71]</sup>。靶基因模拟技术是一种能够在植株中有效沉默 miRNAs 的方法,该方法主要通过转入一段与成熟体 miRNA 互补结合但不能被 miRNAs 正常切割的片段,从而抑制 miRNA 与其靶 mRNA 的结合,导致 miRNAs 失去其对靶基因的调控作用,但通常无法使 miRNA 的功能完全丧失<sup>[3]</sup>。CRISPR-Cas9 作为一种基因编辑技术可以定向编辑数十个碱基序列,因此可以设计针对 miRNA 成熟体的引导 RNA 彻底敲除 miRNA 基因<sup>[72]</sup>。目前拟南芥磷吸收相关的 miR827a 已通过 CRISPR-Cas9 技术成功敲除<sup>[72]</sup>,将来应加强利用 CRISPR-Cas9 技术,开展植物低磷胁迫应答 miRNA 的功能研究,为提高植物适应低磷胁迫能力,提高作物产量和品质奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Ferrol N, Azcón-Aguilar C, Pérez-Tienda J. Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. *Plant Science*, 2019, 280: 441-447
- [2] 秦利均,杨永柱,杨星勇. 土壤溶磷微生物溶磷、解磷机制研究进展. *生命科学研究*, 2019, 23(1): 59-64  
Qin L J, Yang Y Z, Yang X Y. Advances in mechanisms of soil phosphorus solubilization and dissolution by phosphate solubilizing microorganisms. *Life Science Research*, 2019, 23(1): 59-64
- [3] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57(1): 19-53
- [4] Basso M F, Ferreira P C G, Kobayashi A K, Harmon F G. MicroRNAs and new biotechnological tools for its modulation and improving stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(8): 1482-1500
- [5] Chien P S, Chiang C B, Wang Z, Chiou T J. MicroRNA-mediated signaling and regulation of nutrient transport and utilization. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 39: 73-79
- [6] Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z H, Chen X P, Zhang W F, Zhang F S. Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 997-1005
- [7] Daram P, Brunner S, Rausch C, Steiner C, Amrhein N, Bucher M. Pht2; 1 encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1999, 11(11): 2153-2166
- [8] 董旭,王雪,石磊,蔡红梅,徐芳森,丁广大. 植物磷转运子 PHT1 家族研究进展. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(3): 799-810  
Dong X, Wang X, Shi L, Cai H M, Xu F S, Ding G D. Advances in plant PHT1 phosphate transporter family research. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2017, 23(3): 799-810
- [9] Takabatake R, Hata S, Taniguchi M, Kouchi H, Sugiyama T, Izui K. Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial phosphate transporters in soybean, maize, rice, and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40(3): 479-486
- [10] Młodzińska E, Zboińska M. Phosphate uptake and allocation-A closer look at *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L.. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1198
- [11] Liu T Y, Huang T K, Yang S Y, Hong Y T, Huang S M, Wang F N, Chiang S F, Tsai S Y, Lu W C, Chiou T J. Identification of plant vacuolar transporters mediating phosphate storage. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 11095
- [12] Guo C G, Zhao X L, Liu X M, Zhang L J, Gu J T, Li X J, Lu W J, Xiao K. Function of wheat phosphate transporter gene *TaPHT2; 1* in Pi translocation and plant growth regulation under replete and limited Pi supply conditions. *Planta*, 2013, 237(4): 1163-1178
- [13] Luan M, Zhao F, Han X, Sun G F. Vacuolar phosphate transporters contribute to systemic phosphate homeostasis vital for reproductive development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2019, 179(2): 640-655
- [14] Qi W, Manfield I W, Muench S P, Baker A. AtSPX1 affects the AtPHR1-DNA-binding equilibrium by binding monomeric AtPHR1 in solution. *Biochemical Journal*, 2017, 474(21): 3675-3687
- [15] Ham B K, Chen J, Yan Y, Lucas W J. Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 49: 1-9
- [16] Hou X L, Wu P, Jiao F C, Jia J Q. Regulation of the expression of *OsIPSI* and *OsIPSI2* in rice via systemic and local Pi signalling and hormones. *Plant Cell and Environment*, 2005, 28(3): 353-364
- [17] Ajmera I, Shi J, Giri J, Wu P. Regulatory feedback response mechanisms to phosphate starvation in rice. *npj Systems Biology and Applications*, 2018, 4(1): 4
- [18] de Souza Campos P M, Cornejo P, Rial C, Borie F, Varela R M, Seguel A, López-Ráez J A. Phosphate acquisition efficiency in wheat is related to root: shoot ratio, strigolactone levels, and Pho2 regulation. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(20): 5631-5642
- [19] Hu B, Jiang Z, Wang W, Qiu Y H, Zhang Z H, Liu Y Q, Li A,

- Gao X K, Liu L H, Qian Y G, Huang X H, Yu F F, Kang S, Wang Y Q, Xie J P, Cao S Y, Zhang L H, Wang Y H, Xie Q, Kopriva S, Chu C G. Nitrate-NRT1.1B-SPX4 cascade integrates nitrogen and phosphorus signalling networks in plants. *Nature Plants*, 2019, 5(6): 637
- [20] Wang Y, Zhang F, Cui W, Chen K Q, Zhao R, Zhang Z H. The FvPHR1 transcription factor control phosphate homeostasis by transcriptionally regulating miR399a in woodland strawberry. *Plant Science*, 2019, 280: 258-268
- [21] Li S, Castillo-González C, Yu B, Zhang X R. The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. *The Plant Journal*, 2017, 90(4): 654-670
- [22] Hsieh L C, Lin S I, Shih A C, Chen J W, Lin W Y, Tseng C Y, Li W H, Chiou T J. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiology*, 2009, 151(4): 2120-2132
- [23] Xu F, Liu Q, Chen L, Kuang J B, Walk T, Wang J X, Liao H. Genome-wide identification of soybean microRNAs and their targets reveals their organ-specificity and responses to phosphate starvation. *BMC Genomics*, 2013, 14: 66
- [24] Du Q, Wang K, Xu C, Zou C, Xie C X, Xu Y B, Li W X. Strand-specific RNA-Seq transcriptome analysis of genotypes with and without low-phosphorus tolerance provides novel insights into phosphorus-use efficiency in maize. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 222
- [25] Grewal R K, Saraf S, Deb A Kundu S. Differentially expressed MicroRNAs link cellular physiology to phenotypic changes in rice under stress conditions. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(10): 2143-2154
- [26] Hackenberg M, Shi B J, Gustafson P, Langridge P. Characterization of phosphorus-regulated miR399 and miR827 and their isomirs in barley under phosphorus-sufficient and phosphorus-deficient conditions. *BMC Plant Biology*, 2013, 13: 214
- [27] Li Z, Xu H, Li Y, Wan X F, Ma Z, Cao J, Li Z S, Feng H, Wang Y F, Wan L Q, Tong Z Y, Li X G. Analysis of physiological and miRNA responses to Pi deficiency in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 2018, 96(4-5): 473-492
- [28] Yi Y Z, Hou Q Z, Cai X D, Xiao M Y, Shen Q R, Zhi M, Yang Z L. microRNA expression profiles associated with phosphorus deficiency in white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Science*, 2010, 178(1): 23-29
- [29] Gu M, Xu K, Chen A, Zhu Y Y, Tang G L, Xu G H. Expression analysis suggests potential roles of microRNAs for phosphate and arbuscular mycorrhizal signaling in *Solanum lycopersicum*. *Physiologia Plantarum*, 2010, 138(2): 226-237
- [30] Nie Z, Ren Z, Wang L, Su S Z, Wei X, Zhang X, Wu L, Liu D, Tang H T, Liu H L, Zhang S Z, Gao S B. Genome-wide identification of microRNAs responding to early stages of phosphate deficiency in maize. *Physiologia Plantarum*, 2016, 157(2): 161-174
- [31] Kumar S, Verma S, Trivedi P. Involvement of small RNAs in phosphorus and sulfur sensing, signaling and stress: current update. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 285
- [32] Wang L, Zeng H Q, Song J, Feng S J, Yang Z M. miRNA778 and SUVH6 are involved in phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 2015, 238: 273-285
- [33] Zeng H Q, Zhu Y Y, Huang S Q, Yang Z M. Analysis of phosphorus-deficient responsive miRNAs and cis-elements from soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(15): 1289-1297
- [34] Hu B, Zhu C, Li F, Tang J Y, Wang Y Q, Lin A H, Liu L C, Che R H, Chu C G. LEAF TIP NECROSIS1 plays a pivotal role in the regulation of multiple phosphate starvation responses in rice. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 1101-1115
- [35] Hu B, Wang W, Deng K, Li H, Zhang Z H, Zhang L H, Chu C G. MicroRNA399 is involved in multiple nutrient starvation responses in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 188
- [36] Park B S, Seo J S, Chua N H. NITROGEN LIMITATION ADAPTATION recruits PHOSPHATE2 to target the phosphate transporter PT2 for degradation during the regulation of *Arabidopsis* phosphate homeostasis. *The Plant Cell*, 2014, 26(1): 454-464
- [37] Shukla P S, Borza T, Critchley A T, Hiltz D, Norrie J, Prithiviraj B. Ascophyllum nodosum extract mitigates salinity stress in *Arabidopsis thaliana* by modulating the expression of miRNA involved in stress tolerance and nutrient acquisition. *PLoS One*, 2018, 13(10): e206221
- [38] Yan Y, Wang H, Hamera S, Chen X, Fang R. miR444a has multiple functions in the rice nitrate-signaling pathway. *The Plant Journal*, 2014, 78(1): 44-55
- [39] Lin S I, Santi C, Jobet E, Lacut E, El Kholi N, Karlowski W M, Verdeil J L, Bretiler J C, Périn C, Ko S S, Guiderdoni E, Chiou T J, Echeverria M. Complex regulation of two target genes encoding SPX-MFS proteins by rice miR827 in response to phosphate starvation. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(12): 2119-2131
- [40] Samad A F A, Sajad M, Nazaruddin N, Fauzi I A, Murad A M A, Zainal Z, Ismail I. MicroRNA and transcription factor: Key players in plant regulatory network. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 565
- [41] Sunkar R, Li Y, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(4): 196-203
- [42] Sun S, Gu M, Cao Y, Huang X P, Zhang X, Ai P H, Zhao J N, Fang X R, Xu G H. A constitutive expressed phosphate transporter, OsPht1; 1, modulates phosphate uptake and translocation in phosphate-replete rice. *Plant Physiology*, 2012, 159(4): 1571-1581
- [43] Baek D, Kim M C, Chun H J, Kang S, Park H C, Shin G, Park J, Shen M, Hong H, Kim W Y, Kim D H, Lee S Y, Bressan R A, Bohnert H J, Yun D J. Regulation of miR399f transcription by AtMYB2 affects phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2013, 161(1): 362-373
- [44] Nguyen G N, Rothstein S J, Spangenberg G, Kant S. Role of microRNAs involved in plant response to nitrogen and phosphorous limiting conditions. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 629
- [45] Benjamin P, Thierry D, Ricarda J, Kanno S, Berkowitz O, Nussaume L. Root architecture responses: in search of phosphate. *Plant Physiology*, 2014, 166(4): 1713-1723
- [46] Guo H S, Xie Q, Fei J F, Chua N H. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate

- auxin signals for arabidopsis lateral root development. *The Plant Cell*, 2005, 17(5): 1376-1386
- [ 47 ] Wang S, Zhang S, Sun C, Xu Y X, Chen Y, Yu C L, Qian Q, Jiang D A, Qi Y H. Auxin response factor (OsARF12), a novel regulator for phosphate homeostasis in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 2014, 201(1): 91-103
- [ 48 ] Zhao J, Yuan S, Zhou M, Yuan N, Li Z, Hu Q, Bethea F G, Liu H, Li S, Luo H. Transgenic creeping bentgrass overexpressing Osa-miR393a exhibits altered plant development and improved multiple stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(1): 233-251
- [ 49 ] Bari R, Datt Pant B, Stitt M, Scheible W R. *PHO2*, microRNA399, and *PHR1* define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology*, 2006, 141(3): 988-999
- [ 50 ] Medici A, Szponarski W, Dangeville P, Safi A, Dissanayake I M, Saenchai C, Emanuel A, Rubio V, Lacombe B, Ruffel S, Tanurdzic M, Rouached H, Krouk G. Identification of molecular integrators shows that nitrogen actively controls the phosphate starvation response in plants. *The Plant Cell*, 2019, 31(5): 1171-1184
- [ 51 ] Chiou T J, Aung K, Lin S I, Wu C C, Chiang S F, Su C L. Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2006, 18(2): 412-421
- [ 52 ] Lin W Y, Lin Y Y, Chiang S F, Syu C, Hsieh L C, Chiou T J. Evolution of microRNA827 targeting in the plant kingdom. *New Phytologist*, 2018, 217(4): 1712-1725
- [ 53 ] Liu W, Sun Q, Wang K, Du Q, Li W X. Nitrogen Limitation Adaptation (NLA) is involved in source-to-sink remobilization of nitrate by mediating the degradation of *NRT1.7* in Arabidopsis. *New Phytologist*, 2017, 214(2): 734-744
- [ 54 ] Sorin C, Declerck M, Christ A, Blein T, Ma L, Lelandais-Brière C, Njo M F, Beeckman T, Crespi M, Hartmann C. A miR169 isoform regulates specific NF-YA targets and root architecture in Arabidopsis. *New Phytologist*, 2014, 202(4): 1197-1211
- [ 55 ] Boschiero B N, Mariano E, Azevedo R A, Ocheuze Trivelin P C. Influence of nitrate-ammonium ratio on the growth, nutrition, and metabolism of sugarcane. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 139: 246-255
- [ 56 ] Jiang C, Gao X, Liao L, Harberd N P, Fu X. Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in Arabidopsis. *New Phytologist*, 2007, 145(4): 1460-1470
- [ 57 ] He L, Tang R, Shi X, Wang W, Cao Q, Liu X, Wang T, Sun Y, Zhang H, Li R, Jia X. Uncovering anthocyanin biosynthesis related microRNAs and their target genes by small RNA and degradome sequencing in tuberous roots of sweetpotato. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 232
- [ 58 ] Zhang G, Chen D, Zhang T, Duan A, Zhang J, He C. Transcriptomic and functional analyses unveil the role of long non-coding RNAs in anthocyanin biosynthesis during sea buckthorn fruit ripening. *DNA Research*, 2018, 25(5): 465-476
- [ 59 ] Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Michael A J, Tohge T, Yamazaki M, Saito K. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal*, 2014, 77(3): 367-379
- [ 60 ] Kandlbinder A, Finkemeier I, Wormuth D, Hanitzsch M, Dietz K J. The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 2004, 120(1): 63-73
- [ 61 ] Du Q, Zhao M, Gao W, Sun S, Li W X. microRNA/microRNA\* complementarity is important for the regulation pattern of *NFYA5* by miR169 under dehydration shock in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 2017, 91(1): 22-33
- [ 62 ] Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 2006, 18(8): 2051-2065
- [ 63 ] Li Y, Cao X L, Zhu Y, Yang X M, Zhang K N, Xiao Z Y, Wang H, Zhao J H, Zhang L L, Li G B, Zheng Y P, Fan J, Wang J, Chen X Q, Wu X J, Zhao J Q, Dong O X, Chen X W, Chern M, Wang W M. Osa-miR398b boosts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and rice blast disease-resistance via multiple superoxide dismutases. *New Phytologist*, 2019, 222(3): 1507-1522
- [ 64 ] 张廷婷, 胡述浩, 闫彩霞, 赵小波, 单世华, 姜林平. 生物信息学预测植物 miRNAs 的方法. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(1): 147-150  
Zhang T T, Hu S H, Yan C X, Zhao X B, Shan S H, Jiang L P. Bioinformatics prediction of microRNAs in plant. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(1): 147-150
- [ 65 ] Sirohi G, Pandey B K, Deveshwar P, Giri J. Emerging trends in epigenetic regulation of nutrient deficiency response in plants. *Molecular Biotechnology*, 2016, 58(3): 159-171
- [ 66 ] Hosokawa M, Yamauchi T, Takahama M, Goto M, Mikano S, Yamaguchi Y, Tanaka Y, Ohno S, Koeda S, Doi M, Yazawa S. Phosphorus starvation induces post-transcriptional CHS gene silencing in *Petunia corolla*. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(5): 601-609
- [ 67 ] Du Q, Wang K, Zou C, Xu C, Li W X. The PILNCR1-miR399 regulatory module is important for low phosphate tolerance in maize. *Plant Physiology*, 2018, 177(4): 1743-1753
- [ 68 ] Matzke M A, Mosher R A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(6): 394-408
- [ 69 ] Secco D, Wang C, Shou H, Schultz M D, Chiarenza S, Nussaume L, Ecker J R, Whelan J, Lister R. Stress induced gene expression drives transient DNA methylation changes at adjacent repetitive elements. *eLife*, 2015, 4: e09343.
- [ 70 ] Yen M, Suen D, Hsu F, Tsai Y H, Fu H, Schmidt W, Chen P Y. Deubiquitinating enzyme OTU5 contributes to DNA methylation patterns and is critical for phosphate nutrition signals. *Plant Physiology*, 2017, 175(4): 1826-1838
- [ 71 ] Yu Y, Jia T, Chen X. The 'how' and 'where' of plant microRNAs. *New Phytologist*, 2017, 216(4): 1002-1017
- [ 72 ] Zhao Y, Zhang C, Liu W, Gao W, Liu C, Song G, Li W X, Mao L, Chen B, Xu Y, Li X, Xie C. An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 23890