

植物花粉发育miRNAs研究进展

杨 静 宋江华*

(安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

摘要 作为一类内源性的负调控因子, 植物miRNAs通过沉默靶基因或者翻译抑制来调控基因的表达。到目前为止, 用高通量测序技术、miRNA微阵列技术以及实时荧光定量PCR等方法已经鉴定出许多与植物花粉发育有关的miRNAs。越来越多的证据表明, 这些miRNAs选择性地存在于花粉发育的各个时期并发挥着特异的调控功能。该文对近年来花粉发育中与miRNAs相关的研究作一综述, 介绍了与之相关的研究方法以及参与调控花粉发育过程的miRNAs, 为深入探索miRNAs调控植物花粉发育的分子机制、通过人工miRNAs技术构建作物雄性不育系以及推动杂种优势的利用提供研究策略。

关键词 花粉发育; miRNAs; 鉴定方法; 靶基因

Research Progress of miRNAs in Plant Pollen Development

Yang Jing, Song Jianghua*

(College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract As a class of endogenous negative regulators, plant miRNAs regulate the gene expression by silencing target genes or translation inhibiting. At present, many miRNAs involved in pollen development had been identified by high-throughput sequencing, miRNA array and quantitative reverse transcription PCR. Meanwhile, more and more evidences showed that these miRNAs selectively existed in various periods of pollen development and played specific roles in regulatory function. This review is about the relevant researches of miRNAs associated with pollen development in recent years. It described the corresponding methods and the miRNAs participating in the regulation of pollen development, in order to provide research strategies for molecular mechanisms of miRNAs regulation on pollen development and male sterility line development in crops by artificial miRNAs, as well as promotion of heterosis application.

Key words pollen development; miRNAs; identification methods; target genes

miRNAs是广泛存在于生物体内的一类长度为20~24 nt的内源非编码小RNA分子, 它们能对生物体内的基因表达起到负调控作用, 在基因调控网络中占据重要的位置。第一个miRNA *lin-4*, 是由Ambros等^[1]于1993年在线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现的, 它参与线虫发育进程的调控。直到2002年, Reinhart等^[2]从拟南芥小分子文库中获得miRNAs,

证明miRNAs同样存在于植物中。相对于动物而言, 植物miRNAs的研究起步较晚, 但其进展迅速。截至目前, 已有许多研究表明, miRNAs广泛存在于植物中, 如在拟南芥^[3-5](*Arabidopsis thaliana*)、水稻^[6](*Oryza sativa*)、玉米^[7](*Zea mays*)、棉花^[8](*Anemone vitifolia* Buch)、黄瓜^[9](*Cucumis sativus*)以及番茄^[10](*Lycopersicon esculentum*)等植物中均发现了大量

收稿日期: 2014-03-30 接受日期: 2014-04-18

国家自然科学基金(批准号: 31272170)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0551-65786212, E-mail: jianghua_80@126.com

Received: March 30, 2014 Accepted: April 18, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31272170)

*Corresponding author. Tel: +86-551-65786212, E-mail: jianghua_80@126.com

网络出版时间: 2014-08-20 15:36

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0104.html>

miRNAs, 并且大多数植物miRNAs在物种间是高度保守的, 表明其具有重要的功能。

有研究表明, 30%以上的高等真核生物基因可能受到miRNAs的调控^[11-12], miRNAs可以在转录水平、转录后水平和翻译水平广泛地参与调控植物的生长发育、逆境生理(如耐寒性、抗旱性)以及响应激素信号(ABA、auxin)等重要过程, 并且绝大多数miRNAs的功能都是重叠于整个基因调控网络中的^[13]。然而, 有关miRNAs在植物花粉发育方面的研究很少。花粉在高等植物有性繁殖过程中扮演着重要的角色, 植物花粉发育的过程直接影响种子的产量及品质, 因而花粉发育相关miRNAs的发掘和调控机理的研究越来越成为人们关注的焦点。这对于阐明植物花粉发育的分子机制, 并通过人工miRNAs技术构建作物雄性不育系以及推动杂种优势的利用具有潜在的应用价值。

1 植物花粉发育miRNAs的研究方法

1.1 miRNAs的研究方法

因为miRNAs分子量小, 表达丰度很低且具有时空特异性, 所以在对其进行研究的过程中, 很容易发生miRNAs的降解丢失或者其他RNA降解产生大量的假阳性片段以及miRNAs不表达或表达量低于检测水平的下限而产生假阴性的情况^[14], 因此鉴定并验证miRNAs具有一定的难度。

目前, 鉴定miRNAs的方法主要有遗传筛选法、直接克隆法、深度测序法和基于基因组同源表达序列标签(sexpression sequence tag, EST)的生物信息学分析方法^[15]。miRNAs的鉴定最早多采用直接克隆和测序的方法实现, 而遗传筛选只能获得少量的miRNAs, 这些传统方法在寻找新miRNAs上具有一定的难度。随着深度测序技术的快速发展, 利用454测序、Illumina/Solexa等新一代测序技术实现了边合成边测序, 可以有效检出一些组织表达丰度低的miRNAs^[16], 具有高通量、高效、准确等特点, 但也存在所需样本量大、费用高、后续实验工作量大等缺点。近年来, 由于越来越多的物种基因组测序工作的开展和序列信息的丰富, 采用生物信息学方法预测新miRNAs与实验生物学方法加以验证有机结合的方式, 成为当前miRNAs鉴定的简单、高效的方法之一。

验证miRNAs的方法主要有Northern杂交、点

杂交、原位杂交、RT-PCR(reverse transcription PCR)、RNase保护试验、引物延伸分析和Invader Assay等^[17], 并在此基础上陆续出现了很多改进方案, 包括用LNA(locked-nucleic acid)修饰探针进行的Northern杂交、茎环RT-PCR等。另外, 随着高通量测序技术的不断革新, 近些年出现了一种新的验证miRNAs及其靶基因的检测方法, 即降解组测序(degradome sequencing)法, 该方法可以直接检测出被剪切的miRNAs靶基因, 同时拥有高通量测序技术、生物信息学分析和RACE验证三者的优势, 并且已经成功应用于拟南芥、水稻和小立碗藓等模式植物miRNAs靶基因的检测^[18]。

1.2 植物花粉发育miRNAs的发掘

在花粉发育相关miRNAs的研究中, 利用新一代的深度测序及qRT-PCR(quantitative reverse transcription PCR)等技术已经发现了存在于拟南芥孢子体内的数以百计的miRNAs序列, 并成功鉴定出miRNAs调控的植物花粉发育过程中的许多功能基因。

Slotkin等^[19]用miRNA微阵列技术、Illumina测序法在拟南芥精细胞和花粉中鉴定出几个已知的miRNAs家族, 并指出它们可以在配子中沉默靶基因。Grant-Downton等^[20]用5' RACE、miRNA微阵列以及RT-PCR法研究了被子植物雄配子中小RNA途径的存在与功能, 结果表明miRNAs确实调控花粉中转录本的表达丰度, 同时证明一些成熟miRNAs在花粉中累积并普遍参与转录后调控中内源基因的表达。随后, 该研究组用454深度测序法在拟南芥成熟花粉中成功地检测到已知的33个miRNAs家族, 并通过qRT-PCR法证明了选定的17个miRNAs中有14个在花粉中高丰度表达且表达量明显高于叶片^[21]。Chambers等^[22]用miRURY LNA array(miRNA锁核苷酸微阵列)法检测出26个在拟南芥成熟花粉和花序中表达差异显著的miRNAs, 通过qRT-PCR证实其中22个miRNAs在成熟花粉中表达。Borges等^[23]用深度测序技术鉴定出25个存在于拟南芥花粉和生殖细胞的新miRNAs。Wu等^[24]用Northern杂交和原位杂交证明了miR167能够调控*ARF6*和*ARF8*的表达模式, 且*ARF6*和*ARF8*是花粉管生长所必需的。在一项水稻花药发育晚期小RNA的研究中, Tomoaki等^[25]用Northern杂交表明, 从单核花粉期到三核花粉期都有miR166和miR167的明显累积。

近几年,国内关于植物花粉发育miRNAs的研究也取得了一些进展。在水稻花粉发育miRNAs的构成和表达模式的研究中,Wei等^[26]用深度测序法在水稻的单核小孢子、二细胞花粉、三细胞花粉以及孢子体组织中共检测到292个已知miRNAs和75个新的miRNAs。292个已知miRNAs中的103个在花粉发育过程中有着较高丰度的表达,且超过一半的新miRNAs显示出表达上的花粉特异性或者阶段特异性。李晓明^[27]通过miRNA微阵列技术比较玉米授粉过程中miRNAs的表达差异,得到了25个差异显著的、极可能在授粉过程中起重要作用的miRNAs,其中大部分为预测的新miRNAs,其靶基因包括*ARF*、*HD-ZIP III*转录因子、*AGO1*及*CYP450*单氧化酶的编码基因等。之后,蒋晶晶^[28]利用miRNAs微流体芯片对白菜3个雄性不育系及其共同的保持系花序进行miRNAs差异表达的比较分析,发现参与花粉发育或授粉受精的非冗余miRNAs共30个,通过对比已有的数据发现,其中近70%曾被报道在花粉中表达。最近,Jiang等^[29]通过高通量测序建立了与白菜花粉发育有关的两个独立的小RNA文库,其中包括54个保守的miRNAs以及8个新miRNAs,同时发现了18个在雄性不育系和可育系中差异表达的miRNAs。并

且qRT-PCR的结果表明,大多数差异表达的miRNAs优先在雄性可育系植株的花蕾中表达。

随着miRNAs鉴定方法及表达水平检测技术的逐步发展、完善,在拟南芥、水稻等模式植物中新发现了数目较多的花粉发育相关miRNAs,但由于研究技术水平的限制,仍有大量的花粉特异miRNAs及其靶基因有待发掘,且绝大多数miRNAs在植物花粉发育基因调控网络中发挥的具体功能尚不清楚。

2 植物花粉发育miRNAs的功能

近年来,拟南芥成为研究花粉发育的模式植物,以花粉发育突变体对应基因的分子鉴定研究迅速发展。通过对拟南芥中已知miRNAs靶基因的分类预测,发现约有70%的靶基因参与发育相关的转录因子及其他调控因子基因的编码,这说明miRNAs处于基因调控网络的中心位置^[30]。早在2005年就有研究表明,miRNAs可能对雄配子体的发育具有调控作用^[31],并且雄配子发育与*SPL*基因、*MYB*基因、赤霉素(GA)等有关^[32]。在挖掘植物miRNAs的过程中,人们陆续发现了一些在花粉发育过程中特异表达的miRNAs,并进一步预测鉴定得到其靶基因(表1)。

miR156被证明是植物中最为保守的miRNAs

表1 部分植物花粉发育miRNAs及其调控的主要靶标(根据参考文献[28]修改)

Table 1 Part of the miRNAs that involved in plant pollen development and its main target genes (modified from reference [28])

miRNAs	靶基因 Target genes	参考文献 References
miR156	<i>SPL</i>	[21,33-34]
miR157	<i>SPL</i>	[21]
miR159	<i>DUO1, MYB, TCP</i>	[26,35]
miR164	<i>NAC, CUC2</i>	[26]
miR166	<i>HD-Zip transcription factors</i>	[25-26]
miR167	<i>ARF6, ARF8</i>	[24,36-37]
miR168	<i>AGO1</i>	[21]
miR169	<i>Nitrate transporter, nitrogen starvation NFYA</i>	[38]
miR170	<i>SCARECROW-like transcription factor</i>	[22]
miR171	<i>SCARECROW-like transcription factor</i>	[39]
miR172	<i>AP2-like transcription factors</i>	[20-21]
miR395	<i>SULTR2, APS</i>	[37]
miR396	<i>GRF, odanase-like proteins, kinesin-like protein B</i>	[26,40]
miR398	<i>CSD(copper superoxide dismutase)</i>	[26]
miR399	<i>Phosphate overaccumulator 2</i>	[20]
miR403	<i>AGO2</i>	[22]
miR408	<i>Plantacyanin, LAC</i>	[26]

之一^[41], 靶定*SPL*家族中的大多数成员(如*SPL9*、*SPL10*、*SPL15*等), 而*SPL*家族在植物大、小孢子发生以及雌雄配子体发育过程中均有重要作用, 在拟南芥*SPL8*突变体中过量表达miR156几乎会导致完全不育^[42]。植物花粉囊绒毡层发育过程中的任何异常都可能直接或间接导致花粉粒败育, 形成雄性不育^[43-44]。最近的几项研究发现, miR159和miR319的过量表达会引起其共同靶定的花发育相关的转录因子*MYB*的表达异常, 从而影响花粉绒毡层的正常代谢, 包括绒毡层形态和结构异常等^[45-47]。由此推测, miRNAs与花粉绒毡层的发育密切相关。有研究发现, miR159的表达受GA3的正调控^[48], 而赤霉素能够通过降解DELLA蛋白促进茉莉酸(JA)的生物合成, 从而调控花粉发育相关*MYB*类转录因子(如*AtMYB21*、*AtMYB24*、*AtMYB57*)的表达, 最终影响花粉正常发育^[49-50]。另外, 拟南芥中miR159靶定*DUO1*, 而*DUO1*在雄配子细胞分裂过程中是必不可少的^[51]。

*AP2-like*基因对于花器官的生成有着非常重要的作用, 而花器官不能正常发育(如花丝异常、花粉囊异常)就极可能会导致花粉粒不能正常发育。拟南芥中通过miR172来调控*AP2-like*转录因子的表达, 进而控制开花的时间和花器官的形成。Chen^[52]研究了拟南芥中miR172调控*AP2*基因表达的情况, 结果表明, miR172过表达会使植株提早开花和花发育畸形, 其表型与*ap2*突变体表型类似, 最终导致配子异常发育。miR167的靶基因是*ARF6*和*ARF8*, 它们在雌蕊群和雄蕊群发育及成熟的过程中有着重要的调控作用^[53]。Mallory等^[54]发现, miR160在转录后水平通过调节生长素应答转录因子*ARF17*的mRNA表达, 影响生长素结合蛋白编码基因*CH3*类基因(如*YDK1/GH3.2*、*GH3.3*、*DFL1/GH3.6*等)mRNA的积累, 这些基因表达量的变化与植物发育性缺陷密切相关, 如花瓣数目减少、雄蕊异常以及花粉败育等。

现在miRNAs已经被证明存在于花粉中^[20-21]并且与miRNA调控过程中一些重要基因的表达有关, 例如*DCL1*可以和miR162之间形成调控网络^[55]、AGO蛋白家族的存在对miRNAs调控靶基因的表达是必需的^[56]等。近来, 闫龙凤^[57]关于水稻和拟南芥花粉不同发育时期转录组基因的研究结果表明, 基因表达在花粉发育过程中呈现出显著而特异的变化, 但长度为21~24 nt的非编码RNA——miRNAs作

为基因表达的调控因子, 在花粉发育过程中的具体功能尚缺乏系统性研究。因此, 分析花粉发育过程中miRNAs的表达与功能特征对于认识植物花粉发育的调控机制以及在农业生产上通过调控花粉育性进行杂交育种具有重要意义。

3 结语与展望

虽然植物花粉发育相关miRNAs的研究已经取得了不少进展, 但是该领域仍有诸多问题亟待解决, 例如: (1)用作实验材料的花粉发育各个时期的花粉纯度难以保证在相同水平。由于花粉存在自降解现象^[58]以及不同发育时期花粉细胞的均一性不够^[59]等因素, 可能会造成单核期花粉纯度能达到90%而三核期却仅有80%, 所以很难确保实验所用各时期花粉材料的纯度处在同一水平。(2)虽然已经发现了大量的miRNAs, 其中一部分已经被证明与花粉发育有关, 但花粉发育相关miRNAs的数量、保守性及其作用机制还不得而知。(3)有研究表明, miRNAs的互补链miRNAs*也能像miRNAs一样调控生物体的生长发育、激素分泌与信号转导以及对外界胁迫的应答等能力^[60], 那么miRNAs*在花粉的发育过程中是否也参与调控, 对此尚不清楚。这些问题都有待于人们进一步探究。

随着对非编码基因的深入研究, 发现miRNAs不仅在生物体内被广泛转录^[61], 而且大部分还具有特定的功能, 尤其是在细胞的增殖、分化与凋亡过程中有着极为重要的调控功能, 而这三种基本行为贯穿于植物花粉发育的整个过程。现在人们已经发现了众多在植物花粉中表达或特异性表达的基因, 并初步研究了这些基因的功能, 但是与众多花粉特异表达的基因相比, 现在被鉴定和克隆的miRNA数目还是非常有限的。深入研究花粉发育相关miRNAs及其调控机制, 有助于运用人工miRNAs技术获得雄性不育系, 提高杂种优势在农业生产活动中的利用程度与范围。

参考文献 (References)

- 1 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
- 2 Reinhart BJ, Weinstein EJ, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 2002; 16(13): 1616-26.
- 3 Addo-Quaye C, Eshoo TW, Bartel DP, Axtell MJ. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the

- Arabidopsis* degradome. *Curr Biol* 2008; 18(10): 758-62.
- 4 Zhan SH, Lukens L. Identification of novel miRNAs and miRNA dependent developmental shifts of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 2010; 5(4): e10157.
- 5 吴炳江. 两个拟南芥microRNAs在转录水平上对基因表达的调控分析(硕士学位论文). 山东农业大学(Wu Bingjiang. Functional dissection of two microRNAs in the regulation of gene expression in transcriptional level in *Arabidopsis*. Shandong Agricultural University), 2013.
- 6 Li YF, Zheng Y, Addo-Quaye C, Zhang L, Saini A, Jagadeeswaran G, *et al.* Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. *Plant J* 2010; 62(5): 742-59.
- 7 Zhao M, Tai HH, Sun SZ, Zhang FS, Xu YB, Li WX. Cloning and characterization of maize miRNAs involved in responses to nitrogen deficiency. *PLoS One* 2012; 7(1): e29669.
- 8 Wang Gaskin, 余道乾, 杜雄明. 陆地棉种子发育过程中microRNA的挖掘与功能研究. 棉花学报(Wang Gaskin, Yu Daoqian, Du Xiongming. Identification of microRNAs in upland cotton. *Cotton Science*) 2014; 26(1): 81-6.
- 9 Mao WH, Li ZY, Xia XJ, Li YD, Yu JQ. A combined approach of high-throughput sequencing and degradome analysis reveals tissue specific expression of microRNAs and their targets in cucumber. *PLoS One* 2012; 7(3): e33040.
- 10 孙广鑫, 栾雨时, 崔娟娟. 番茄中与致病密切相关miRNA的挖掘及特性分析. 遗传(Sun Guangxin, Luan Yushi, Cui Juanjuan. Mining and characterization of miRNAs closely associated with the pathogenicity in tomato. *HEREDITAS*) 2014; 36(1): 69-76.
- 11 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120(1): 15-20.
- 12 Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays* 2007; 29(3): 288-99.
- 13 Mallory AC, Vaucheret H. Function of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet* 2006; 38(6): S31-6.
- 14 曲 涛, 吴建民, 赵志光, 安黎哲. 植物microRNA及其抗胁迫作用机制研究进展. 西北植物学报(Qu Tao, Wu Jianmin, Zhao Zhiguang, An Lizhe. Advances about plant microRNAs in stress tolerance. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*) 2007; 27(6): 1275-84.
- 15 张志明, 宋锐, 彭华, 罗茂, 沈亚欧, 刘丽, 等. 用生物信息学挖掘玉米中的MicroRNAs及其靶基因. 作物学报(Zhang Zhimin, Song Rui, Peng Hua, Luo Mao, Shen Ya'ou, Liu Li, *et al.* Bioinformatic prediction of microRNAs and their target genes in maize. *Acta Agronomica Sinica*) 2010; 36(8): 1324-35.
- 16 Ledergerber C, Dessimoz C. Base-calling for next-generation sequencing platforms. *Brief Bioinform* 2011; 12(5): 489-97.
- 17 Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22(3): 165-73.
- 18 董淼, 黄越, 陈文铎, 徐涛, 郎秋蕾. 降解组测序技术在植物miRNA研究中的应用. 植物学报(Dong Miao, Huang Yue, Chen Wenduo, Xu Tao, Lang Qiulei. Use of degradome sequencing in study of plant microRNAs. *Chinese Bulletin of Botany*) 2013; 48(3): 344-53.
- 19 Slotkin RK, Vaughn M, Tanurdžic M, Borges F, Becker JD, A. Feijó JA, *et al.* Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 2009; 136(3): 461-72.
- 20 Grant-Downton R, Hafidh S, Twell D, Dickinson HG. Small RNA pathways are present and functional in the angiosperm male gametophyte. *Mol Plant* 2009; 2(3): 500-12.
- 21 Grant-Downton R, Trionnaire GL, Schmid R, Rodriguez-Enriquez J, Hafidh S, Mehdi S, *et al.* MicroRNA and tasiRNA diversity in mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 2009; 10: 643.
- 22 Chambers C, Shuai B. Profiling microRNA expression in *Arabidopsis* pollen using microRNA array and real-time PCR. *BMC Plant Biol* 2009; 9: 87.
- 23 Borges F, Pereira PA, Slotkin RK, Martienssen RA, Becker JD. MicroRNA activity in the *Arabidopsis* male germline. *J Exp Bot* 2011; 62(5): 1611-20.
- 24 Wu MF, Tian Q, Reed JW. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* 2006; 133(21): 4211-8.
- 25 Fujioka T, Kaneko F, Kazama T, Suwabe K, Suzuki G, Makino A, *et al.* Identification of small RNAs in late developmental stage of rice anthers. *Genes Genet Syst* 2008; 83(3): 281-4.
- 26 Wei LQ, Yan LF, Wang T. Deep sequencing on genome-wide scale reveals the unique composition and expression patterns of microRNAs in developing pollen of *Oryza sativa*. *Genome Biol* 2011; 12(6): R53.
- 27 李晓明. 玉米授粉过程中microRNA的表达分析(博士学位论文). 山东农业大学(Li Xiaoming. Expression profile of microRNAs during pollination in maize. Shandong Agricultural University), 2011.
- 28 蒋晶晶. 白菜花粉发育和授粉受精相关基因的表达分析与功能验证(博士学位论文). 浙江大学(Jiang Jingjing. Expression and functional characterization of genes during pollen development and fertilization in *Brassica campestris ssp. chinensis*. Zhejiang University), 2012.
- 29 Jiang JX, Lv M, Liang Y, Ma ZM, Cao JS. Identification of novel and conserved miRNAs involved in pollen development in *Brassica campestris ssp. chinensis* by high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Genomics* 2014; 15(1): 146.
- 30 Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 2004; 14(6): 787-99.
- 31 Kidner CA, Martienssen RA. The role of ARGONAUTE1 (*AGO1*) in meristem formation and identity. *Dev Biol* 2005; 280(2): 504-17.
- 32 魏娟, 吴建勇, 邢朝柱, 郭立平, 戚廷香, 王海林. 陆地棉花粉母细胞时期microRNAs分析. 棉花学报(Wei Juan, Wu Jianyong, Xing Zhaozhu, Guo Liping, Qi Tingxiang, Wang Hailin. Analysis of microRNAs at cotton microsporocyte stage. *Cotton Science*) 2011; 23(5): 433-9.
- 33 Xing S, Salinas M, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P. miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2010; 22(12): 3935-50.
- 34 Sunkar R. Signaling and Communication in Plants: MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses. ebook-online: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, 2012,

- 69-81.
- 35 Allen RS, Li JY, Stahle MI, Dubroue A, Gubler F, Millar AA. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the *Arabidopsis* miR159 family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(41): 16371-6.
- 36 Ru P, Xu L, Ma H, Huang H. Plant fertility defects induced by the enhanced expression of microRNA 167. *Cell Res* 2006; 16(5): 457-65.
- 37 Tian Y, Yang H, Zhang HW, Dai Q, Fang J, Qing XG, *et al.* The molecular mechanisms of male reproductive organogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regul* 2010; 61(1): 11-20.
- 38 Li YJ, Fu YR, Ji LS, Wu CG, Zheng C. Characterization and expression analysis of the *Arabidopsis* miR169 family. *Plant Sci* 2010; 178(3): 271-80.
- 39 Valoczi A, Varallyay E, Kauppinen S, Burgyan J, Havelda Z. Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *Plant J* 2006; 47(1): 140-51.
- 40 Yang FX, Liang G, Liu DM, Yu DQ. *Arabidopsis* miR396 mediates the development of leaves and flowers in transgenic tobacco. *J Plant Biol* 2009; 52(5): 475-81.
- 41 Zhang BH, Pan XP, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J* 2006; 46(2): 243-59.
- 42 李明, 李长生, 赵传志, 李爱芹, 王兴军. 植物SPL转录因子研究进展. *植物学报*(Li Ming, Li Changsheng, Zhao Chuanzhi, Li Ai qin, Wang Xingjun. Research advances in plant SPL transcription factors. *Chinese Bulletin of Botany*) 2013; 48(1): 107-16.
- 43 Song JH, Cao JS, Wang CG. *BcMF11*, a novel non-coding RNA gene from *Brassica campestris*, is required for pollen development and male fertility. *Plant Cell Rep* 2013; 32(1): 21-30.
- 44 Huang MD, Hsing YI, Huang AH. Transcriptomes of the anther sporophyte: Availability and uses. *Plant Cell Physiol* 2011; 52(9): 1459-66.
- 45 Palatnik JF, Wollmann H, Schommer C, Schwab R, Boisbouvier J, Rodriguez R, *et al.* Sequence and expression differences underlie functional specialization of *Arabidopsis* microRNAs miR159 and miR319. *Dev Cell* 2007; 13(1): 115-25.
- 46 邓志刚, 金樑, 李晶, 王文斌, 杨龙, 王晓娟. MYB类转录因子对花药和花粉发育的调控途径. *西北植物学报*(Deng Zhigang, Jin Liang, Li Jing, Wang Wenbin, Yang Long, Wang Xiaojuan. Pathways of MYB transcription factors regulating anther development and pollen formation. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*) 2013; 33(4): 850-6.
- 47 Millar AA, Gubler F. The *Arabidopsis* *GAMYB-like* genes, *MYB33* and *MYB65*, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* 2005; 17(3): 705-21.
- 48 Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 2004; 131(14): 3357-65.
- 49 Chen H, Song SS, Xiao LT, Soo HM, Cheng ZW, Xie DX, *et al.* Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of *MYB21*, *MYB24*, and *MYB57* to promote stamen filament growth in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 2009; 5(3): 1-3.
- 50 Tyler L, Thomas SG, Hu JH, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, *et al.* DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2004; 135(2): 1008-19.
- 51 Zheng BL, Chen XM, McCormick S. The anaphase-promoting complex is a dual integrator that regulates both microRNA-mediated transcriptional regulation of cyclin B1 and degradation of cyclin B1 during *Arabidopsis* male gametophyte development. *Plant Cell* 2011; 23(3): 1033-46.
- 52 Chen XM. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* 2004; 303(5666): 2022-5.
- 53 Caryl AP, Jones GH, Franklin FC. Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants. *J Exp Bot* 2003; 54(380): 25-38.
- 54 Mallory AC, Bartel DP, Bartel B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* *AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 2005; 17(5): 1360-75.
- 55 Xje Z, Kasschau KD, Carrington JC. Negative feedback regulation of *Dicer-Like1* in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol* 2003; 13(9): 784-9.
- 56 林玉玲, 赖钟雄. 植物胚胎发育microRNA研究进展. *生物技术通报*(Lin Yuling, Lai Zhongxiong. Advances in study of microRNAs in plant embryonic development. *Biotechnology Bulletin*) 2010; 10: 20-5.
- 57 闫龙凤. 水稻花粉发育过程中miRNA的表达与功能特征研究及*OsUBP1*基因的功能分析(博士论文). 中国科学院研究生院(Yan Longfeng. MiRNA expression and functional characteristics in rice pollen development and functional analysis of *OsUBP1* gene. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences), 2010.
- 58 Yamamoto Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I, Noguchi T. Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2003; 44(11): 1192-201.
- 59 Honys D, Twell D. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 2004; 5(11): R85.
- 60 马圣运, 白玉, 韩凝, 王君晖, 翁晓燕, 边红武, 等. miRNA*生物合成及其功能研究的新发现. *遗传*(Ma Shengyun, Bai Yu, Han Ning, Wang Junhui, Weng Xiaoyan, Bian Hongwu, *et al.* Recent research progress of biogenesis and functions of miRNA*. *HEREDITAS*) 2012; 34(4): 383-8.
- 61 Seignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian miRNAs: A small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 2006; 17(3): 189-202.