

microRNA 参与柑橘生长发育和抗逆的研究进展

姚利晓, 何永睿, 陈善春*

(西南大学/中国农业科学研究院柑桔研究所, 国家柑桔工程技术研究中心, 国家柑桔品种改良中心, 重庆 400712)

摘要: microRNA(miRNA)是在转录后水平调控基因表达的一类非编码的小分子 RNA。植物 miRNA 最早于 2002 年在拟南芥中发现, 柑橘 miRNA 的研究始于 2005 年, 现已发现了许多保守的 miRNA 和新的 miRNA。对参与柑橘生长发育及对生物学胁迫和非生物学胁迫应答过程的 miRNA 进行了归纳, 并对 *cis*-miR156、*cis*-miR396 和 *cis*-miR3954 在柑橘中的功能研究进行了总结。与模式植物和大田作物相比, 柑橘 miRNA 的功能研究相对滞后, 新发现 miRNA 的功能有待深入研究。最后对利用柑橘特异的病毒载体和基因定点编辑技术加快柑橘 miRNA 功能研究进行了展望。

关键词: 柑橘; miRNA; 生长发育; 生物和非生物胁迫; 柑橘病毒载体; CRISPR/Cas9

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 05-0995-14

Research Advances of Citrus microRNAs in Plant Development and Stress Resistance

YAO Lixiao, HE Yongrui, and CHEN Shanchun*

(Citrus Research Institute, Southwest University/Chinese Academy of Agricultural Sciences; National Citrus Engineering Research Center; National Center for Citrus Variety Improvement, Chongqing 400712, China)

Abstract: microRNAs (miRNAs) are a class of endogenous small non-coding RNAs, which regulate complementary mRNAs by mediating mRNA degradation and translational repression. The research on citrus miRNAs has been conducted from 2005, three years after the first plant miRNA was identified in *Arabidopsis*. Many plant-conserved miRNAs and novel miRNAs have been identified in citrus, with the advancement of high-throughput sequencing technology and the improvement of bioinformatics analysis methods. These miRNAs were not only involved in the biological processes, such as citrus reproduction, flower and fruit development, but also in the resistance against biotic and abiotic stresses, through regulation of their target genes. Meanwhile, the functions of *cis*-miR156, *cis*-miR396, and *cis*-miR3954 were summarized herein. In the present manuscript, we also prospected the usage of citrus-specific viral vectors and CRISPR/Cas9 gene editing technology to accelerate the study on function of citrus miRNAs, especially the novel miRNAs.

Keywords: citrus; miRNA; growth and development; biotic and abiotic stress; citrus virus vector; CRISPR/Cas9

收稿日期: 2020-01-02; **修回日期:** 2020-03-04

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-26); 重庆市基础与前沿研究项目 (cstc2018jcyjAX0247); 中央高校基本业务费专项 (XDJK2019B018)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenshanchun@cric.cn)

microRNA(miRNA)是一类生物体内源产生的长度在 20~24 nt 的非编码的小分子 RNA。miRNA 首先于 1993 年在线虫中发现(Liu et al., 2017a), 植物中最早于 2002 年从拟南芥中筛选出(Llave et al., 2002; Reinhart et al., 2002), 随后在水稻、玉米等大田作物中大量发现。目前 miRBase 数据库(miRBase 22 release)收录了 271 个物种 38 589 条 miRNA 前体和 48 885 条成熟 miRNA 的注册序列(Kozomara & Griffiths-Jones, 2014)。另建有专门的植物 miRNA 数据库可供查询, 如可检索植物 miRNA 胁迫相关调控条目的 PASmiR 数据库(Zhang et al., 2013), miRNA 与内源 RNA 竞争性互作的 PceRBase 数据库(Yuan et al., 2017), circRNA-miRNA-mRNA 互作的 PlantCircNet 数据库(Zhang et al., 2017c)和植物非编码 RNA 数据库 PNRD(Yi et al., 2015)等。前人的研究表明, miRNA 的利用有望提高植物产量和品质, 增强植物的抗胁迫反应(Liu et al., 2017b; Deng et al., 2018; Nogoy et al., 2018)。

柑橘 miRNA 的研究始于 2005 年(Zhang et al., 2005), 目前已从多个柑橘品种筛选出大量已知 miRNA 和柑橘特异 miRNA, 这些 miRNA 参与柑橘营养生长和生殖生长, 在抵御生物胁迫和非生物胁迫中可能具有重要作用。

1 miRNA 的鉴定方法

1.1 miRNA 的产生和作用机理

在植物基因组中, miRNA 大多位于基因间隔区, 拥有自己的启动子, 在细胞内的转录、运输和作用机制已研究的比较清楚(Iwakawa & Tomari, 2015; Yu et al., 2017)。miRNA 由聚合酶 Polymerase II (Pol II)转录形成具有茎环结构的初始转录本 pri-miRNA(primary miRNA), 在双链结合蛋白 HYL1 (Hyponastie leaves 1)的帮助下, 由具有 RNase III 核酸内切酶特征的 DCL1 (Dicer-like 1)将 pri-miRNA 剪切形成具有二级茎环结构的 miRNA 前体(pre-miRNA), 并再次剪切形成 miRNA: miRNA*双链复合体; 随后双链复合体的 3'端由甲基转移酶 HEN1 (Hua enhancer)进行甲基化修饰, 这一修饰过程有效地保证了双链复合体不被核酸外切酶降解, 从而在细胞内保持稳定状态, 并在 HASTY 的帮助下从细胞核运送到细胞质。miRNA: miRNA*双链复合体在细胞质中解离, miRNA*链迅速降解, 成熟的 miRNA 与 AGO1 (Agronaute 1)蛋白相互作用形成核蛋白沉默复合体 RISC (RNA-induced silencing complex), 对互补的靶基因进行剪切或抑制其翻译。靶标 mRNA 和非编码 RNA (non-coding RNA)被 RISC 剪切生成编码和非编码的单链 RNA。这些失去末端保护的单链 RNA 常被核酸外切酶降解, 但有时也会在 RDR6 (RNA-dependent RNA polymerase 6)的作用下复制为双链 RNA (dsRNA), 后被 DCL4 或 DCL5 加工生成植物特有的 21 nt 或 24 nt phased siRNA (phasiRNA)。phasiRNA 可以介导下游靶基因的剪切, 调控基因的表达, 作为一个重要的调控元件参与植物 miRNA 调控网络中(Fei et al., 2013; Wu et al., 2016; Liu et al., 2017c; Chen et al., 2018)。

miRNA 产生和作用机理的研究结果多来自于拟南芥等模式植物, DCL 和 AGO 是其作用过程的主要酶。拟南芥基因组中存在 4 个 DCL 蛋白的编码基因, AtDCL1 在 miRNA 成熟过程中发挥作用, 将基因组转录产生的 pri-miRNA 进行切割, 经 pre-miRNA 中间体产生成熟的 miRNA: miRNA*双链复合体; AtDCL4 在 phasiRNA 的产生过程中发挥作用, 将 dsRNA 切割生成 21 nt 的 phasiRNA。同样切割生成 phasiRNA 的还有水稻 OsDCL3b 蛋白(也称 DCL5), 可产生 24 nt 的 siRNA (Fei et al., 2013)。

笔者在甜橙基因组中发掘出 5 个 DCL 基因, 其中 orange1.1t00584 编码蛋白与 AtDCL1、Cs4g01340 与 AtDCL4、Cs4g06370 与 AtDCL3 高度同源 (图 1, A)。同样, 从甜橙基因组中还发掘出 10 个 AGO 基因。鉴于 AGO1 蛋白在形成 RISC 以及 AGO1 和 AGO7 在 phasiRNA 生成过程中的重要作用 (Chen et al., 2018), 笔者分析发现 Cs7g03360 编码蛋白与 AtAGO7 高度同源, 但在甜橙和克里曼丁基因组中都未能发现与 AtAGO1 高度同源的基因 (图 1, B)。柑橘 DCL 和 AGO 蛋白在 miRNA 作用过程中的具体作用和调控机制有待深入研究。

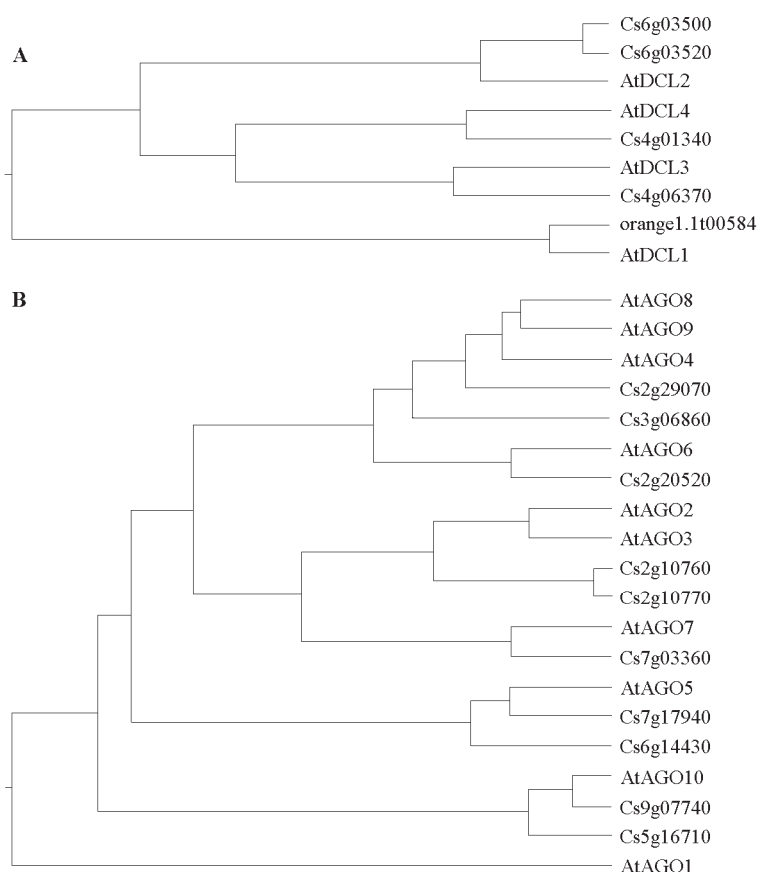


图 1 柑橘 (Cs) 和拟南芥 (At) DCL (A) 和 AGO (B) 蛋白进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of DCL (A) and AGO (B) in *Citrus sinensis* (Cs) and *Arabidopsis thaliana* (At)

1.2 miRNA 鉴定与检测方法

植物细胞中小分子 RNA 的种类非常丰富, 其主要类型是 miRNA 和 phasiRNA (Fei et al., 2013; Chen et al., 2018; Feng et al., 2019), 两者的异同见表 1。

目前植物 miRNA 常通过小分子 RNA 测序的方法获得。对于测序获得的大量数据, 首先将测序结果与 miRBase 中植物 miRNA 相比较, 筛选出已知的 miRNA。在比对过程中, 候选 miRNA 与数据库中存在的 miRNA 错配的核苷酸数小于 3 个, 且无核苷酸的插入或缺失; 其前体序列为非蛋白编码序列 (BLAST 搜索的 E 值小于或等于 $1E-6$), 可形成茎环状二级结构, 最小自由能小于 $-15 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。对于新 miRNA 的鉴定, 利用生物信息学软件进行预测时应遵循如下原则 (Axtell &

Meyers, 2018) —— (1) pre-miRNA 的长度小于 300 nt, 只存在 1 个 miRNA: miRNA*复合物, 且该复合物中没有第 2 个茎环结构; (2) 小分子 RNA 测序文库中至少存在 1 个 miRNA: miRNA*复合物; (3) miRNA: miRNA*复合物错配碱基数不超过 5 个, 最多有 3 处错配碱基形成不对称凸起; (4) 精度计算时, miRNA 和 miRNA*可包含 1 个碱基的变异; (5) 候选 miRNA 至少存在于 2 个小分子 RNA 文库中, 长度在 20 ~ 24 nt; (6) 长度在 23 ~ 24 nt 的候选 miRNA 应存在于 4 个以上的小分子 RNA 文库中。

表 1 植物 miRNA 和 phasiRNA 的比较
 Table 1 Comparison between miRNA and phasiRNA of plant

	miRNA	phasiRNA
产生来源 Source	基因组 Genome	mRNA, non-coding RNA
前体序列	茎环 Precursor miRNA (单链)	dsRNA (双链)
Precursor sequence	Stem-loop precursor miRNA (single chain)	dsRNA (double chain)
成熟过程中的酶	Pol II 合成, DCL1 切割, 需要经过 pri-pre-miRNA 的过程,	RDR6 合成 dsRNA, DCL4/DCL5 切割, phasiRNA
Enzymes in maturing	与靶基因 mRNA 来自不同的基因 Synthesis with Pol II, dicing with DCL1, miRNA coming from different genes with target mRNA	与靶基因来源于同一基因或不同基因 Synthesis with RDR6, dicing with DCL4/DCL5, miRNA coming from different or same gene with target mRNA
与靶基因的配对	完全或不完全匹配 (可调控多个基因)	完全匹配, 专一性很强
Pairing with target	Perfect or nonperfect pairing	Perfect pairing
长度 Length	多为 21 nt 或 22 nt 21 nt or 22 nt	21 nt 或 24 nt 21 nt or 24 nt
保守性 Homology	很强 (尤其在近源物种中) High (Especially in analogous species)	不同来源 phasiRNA 具有较大差异 phasiRNAs from different sources are differential
作用位置	靶基因 mRNA 的任何部位	
Acting position	Any position in target mRNA	
作用阶段	转录后水平或翻译水平	
Acting period	Post transcription or at translation level	
靶基因沉默方式	mRNA 被剪切或翻译抑制	
Reason for target gene	Forming diced or translation-inhibited mRNA	

miRNA 检测方法包括 Northern 杂交、微阵列法和 qPCR 等。Northern 杂交在研究早期应用较广, 但其操作复杂, 检测动力学范围低, 不能区分核苷酸差异小的 miRNA, 也不能区分 miRNA 前体和成熟 miRNA。微阵列检测法是一种高通量的检测方法, 不适合少量 miRNA 的检测, 检测的动力学范围较宽, 但假阳性率高, 难以区分前体 miRNA 和成熟 miRNA。qPCR 法应用较多, 因其检测动力学范围可达 7 个数量级, 既可高通量也适合单个 miRNA 的检测, 不仅能区分前体 miRNA 和成熟 miRNA, 且在优化条件下, 甚至能区分单核苷酸差异的 miRNA。

2 miRNA 功能研究方法

2.1 miRNA 靶基因预测及检测方法

miRNA 的功能与其靶基因的功能息息相关, 因此对靶基因的预测和验证非常必要 (表 2)。靶基因的预测常利用生物信息学的方法。目前已开发出多个植物 miRNA 靶基因预测的算法, 如 psRNAtarget (Dai et al., 2018)、WMD3 (Schwab et al., 2006) 和 ViennaRNA (Lorenz et al., 2011) 等在线软件。利用生物信息学软件对靶基因进行预测时遵循以下规则 (Allen et al., 2005; Schwab et al., 2005) —— (1) miRNA 和候选靶基因间不配对碱基不超过 4 个 (G-U 算 0.5 个不配对); (2)

表 2 柑橘中 miRNA 及其验证的靶基因
Table 2 miRNAs and confirmed target genes in citrus

miRNA	成熟序列 (5' - 3') Mature sequence	靶基因 Target gene	靶基因功能 Target function	miRNA 功能 miRNA function
miR156a	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	<i>Pt-SPL9</i> <i>Pt-SPL13</i> <i>CsSPL3</i> <i>CsSPL14</i>	转录因子 Transcriptional factor	体细胞胚发生 Somatic embryogenesis
miR160	UGCCUGGCUCCUGUAUGCCA	<i>ARF10</i>	转录因子 Transcriptional factor	
miR160a	UGCCUGGCUCCUGUAUGCUU	Ciclev10011194m Ciclev10030860m Ciclev10000695m	转录因子 Transcriptional factor	在硼毒害时差异表达 Boron stress
miR164a	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA	<i>PtNAC1</i> Cs5g10870	转录因子 Transcriptional factor 转录因子 Transcriptional factor	果实成熟相关 Fruit mature
miR165	UCGGACCAGGCUUCAUCCCCC	<i>PtATHB8</i>	转录因子 Transcriptional factor	
miR167	UAGAUCAGGCUGGCAGCUUGU	<i>ARF8</i>	转录因子 Transcriptional factor	
miR172	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAA	<i>PtAP2</i>	转录因子 Transcriptional factor	
miR393	AGACAAUGCGAUCCCUUGGA	<i>AFB2</i>	转录因子 Transcriptional factor	
miR394	GGAGGUUGACAGAAUGCCAA	F-box protein	转录因子 Transcriptional factor	
miR3954	UUGGACAGAGAAAUCACGUGCA	Cs7g22460 Cs1g09600 Cs1g09635	转录因子 Transcriptional factor 未知 Unknown 未知 Unknown	促进柑橘开花 Flowering
miR396b	UUCCACAGCUUUCUUGAACUU	<i>PtrACO</i>	氧化酶 Oxidase	抗寒性相关 Cold stress
miR397a	UCAUUGAGUGCAGCGUUGAU	Ciclev10038090m Ciclev10011400m	漆酶 Laccase	在硼毒害时差异表达 Boron stress
cj_new_MIR165	AGGCAGUGAUGUUCAGAACUACC	Ciclev10016217m	未知 Unknown	干旱胁迫时上调 Drought stress
cj_new_MIR203	GGAUUCGAGUGAAGGACUUGCU	Ciclev10014301m	ATP 酶 ATPase	干旱胁迫时上调 Drought stress
cj_new_MIR219	UCAUAGGAAGUAGGCUGCACC	Ciclev10018889m	蔗糖合成酶 Sucrose aynthase	盐胁迫时上调 Salt stress
miRN23-5p	CTGTAGAAGGCTCCTGTGACC	Cs9g06920	未知 Unknown	胚性相关 Somatic embryogenesis

miRNA	靶基因 Target gene	qPCR	降解组测序 Degradome sequencing	RLM-5'RACE	瞬时表达 Transient expression	过表达 miRNA miRNA overexpression	参考文献 Reference
miR156a	<i>Pt-SPL9</i> <i>Pt-SPL13</i> <i>CsSPL3</i> <i>CsSPL14</i>	否 No 否 No 否 No 否 No	否 No 否 No 否 No 否 No	是 Yes	否 No 否 No 否 No 否 No	否 No 是 Yes 否 No 否 No	Song et al., 2010b Long et al., 2018
miR160	<i>ARF10</i>	否 No	否 No	是 Yes	否 No	否 No	Song et al., 2009
miR160a	Ciclev10011194m Ciclev10030860m Ciclev10000695m	是 Yes 否 No 否 No	否 No 否 No 否 No	是 Yes	否 No 否 No 否 No	否 No 否 No 否 No	Huang et al., 2016
miR164a	<i>PtNAC1</i> Cs5g10870	否 No 是 Yes	否 No 否 No	是 Yes 是 Yes	否 No 是 Yes	否 No 否 No	Song et al., 2010b Liu et al., 2014
miR165	<i>PtATHB8</i>	否 No	否 No	是 Yes	否 No	否 No	Song et al., 2010b
miR167	<i>ARF8</i>	否 No	否 No	是 Yes	否 No	否 No	Song et al., 2009
miR172	<i>PtAP2</i>	否 No	否 No	是 Yes	否 No	否 No	Song et al., 2010b
miR393	<i>AFB2</i>	否 No	否 No	是 Yes	否 No	否 No	Song et al., 2009
miR394	F-box protein	否 No	否 No	是 Yes	否 No	否 No	Song et al., 2009
miR3954	Cs7g22460 Cs1g09600 Cs1g09635	否 No 否 No 否 No	是 Yes 否 No 否 No	是 Yes	否 No 是 Yes 是 Yes	是 Yes 否 No 否 No	Liu et al., 2017c
miR396b	<i>PtrACO</i>	是 Yes	否 No	是 Yes	是 Yes	是 Yes	Zhang et al., 2016b
miR397a	Ciclev10038090m Ciclev10011400m	是 Yes 否 No	否 No 否 No	是 Yes	否 No 否 No	否 No 否 No	Huang et al., 2016
cj_new_MIR165	Ciclev10016217m	是 Yes	否 No	是 Yes	否 No	否 No	Xie et al., 2017
cj_new_MIR203	Ciclev10014301m	否 No	否 No	否 No	否 No	否 No	
cj_new_MIR219	Ciclev10018889m	否 No	否 No	否 No	否 No	否 No	
miRN23-5p	Cs9g06920	是 Yes	否 No	是 Yes	否 No	否 No	Long et al., 2016

miRNA 与靶基因的靶定区不能有多于 2 处相邻位点的错配, 且在 miRNA 5'端第 2 ~ 12 碱基位点不得有相邻错配位点; (3) 第 1 ~ 12 位点不允许超过 2.5 个错配, 第 10 ~ 11 碱基位点不能出现错配; (4) miRNA 和靶基因复合体最小自由能要 \geq miRNA 与其最佳互补序列结合时自由能的 72%。

对靶基因的验证方法包括 RLM-5'RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of 5'-cDNA ends)、降解组测序技术、瞬时表达系统等。RLM-5'RACE 由传统的 5'RACE 技术改良而来, miRNA 对靶标 mRNA 剪切后, 产生的 3'端剪切片段含有 5'单磷酸和 3'polyA 尾巴, 可由 RNA 连接酶连接通用引物, 经反转录生成 cDNA, 用于下游的测序试验; 而含有 5'帽子结构的完整基因, 含有帽子结构的 5'剪切片段或是其他缺少 5'单磷酸基团的 RNA 无法被 RNA 连接酶识别, 因而无法进入下游的测序试验; 对测序数据进行比对分析, 可以直观地发现在 mRNA 序列的某个位点会出现一个波峰, 而该处正是候选的 miRNA 剪切位点。降解组测序的原理与其类似, 都是利用剪切产生的具有 5'单磷酸的 3'端剪切片段经 RNA 连接酶连接通用引物, 连接产物进行高通量测序, 与植物基因组序列进行定位分析, 根据形成的 T-plot 图确定 miRNA 剪切位点 (Addo-Quaye et al., 2008; German et al., 2008)。通常情况下候选靶基因的 T-plot 图产生一个峰值, 该处即为 miRNA 剪切位点; 若峰值不唯一, 还需通过 RLM-5'RACE 进一步确认剪切位点。瞬时表达系统需要构建 miRNA 过表达载体和候选靶标基因一报告基因的过表达载体, 将两者同时注射烟草叶片, 根据报告基因的表达与否, 判定候选靶标基因能否被 miRNA 剪切。利用上述方法已对柑橘中部分 miRNA 和其靶基因进行了验证 (表 2)。

2.2 miRNA 功能研究方法

研究 miRNA 功能有两种方式, 在植物中过表达 miRNA 前体基因序列, 或者降低植物体内特异 miRNA 的浓度。miRNA 过表达法主要利用基于植物双元表达载体的根癌农杆菌转化法将 miRNA 前体序列整合到宿主基因组上 (Liu et al., 2017c), 也可以利用植物病毒表达载体, 将特异 miRNA 投送到植物细胞内, 随着病毒基因组的复制表达 miRNA 序列 (Jian et al., 2017)。根癌农杆菌转化法应用广泛, 在甜橙、金柑、柚、柠檬、枸橼、枳、枳橙等多个柑橘品种中获得成功 (姚利晓 等, 2013)。但柑橘遗传转化效率低于模式生物, 且柑橘生长周期长。植物病毒表达载体成为一种替换方式, 该方法操作步骤相对简单, 转化周期相对较短, 但病毒载体的宿主选择范围较窄。目前已利用柑橘衰退病毒 (Citrus tristeza virus, CTV) 和柑橘叶斑驳病毒 (Citrus leaf blotch virus, CLB) 构建载体, 在柑橘上成功实现外源基因的稳定表达 (Dawson & Folimonova, 2013; Velázquez et al., 2016) 和对内源基因的高效沉默抑制 (Mei et al., 2019)。柑橘病毒载体采用弱毒株系构建, 降低了媒介传播扩散的可能性, 保证生物学安全, 并且可通过嫁接将目的基因产物传递到成年态材料中, 缩短基因功能评价时间, 提高应用效率。由于多数植物病毒 (如 CTV) 局限在韧皮部移动, CLB 虽然能够侵染植物多种组织甚至分生组织, 但在植物体内含量低, 可能会影响 miRNA 功能的评价效率。

降低植物体内特异 miRNA 的浓度主要是在细胞内表达 miRNA 靶标基因的模拟物, 植物中常用 TM (Target mimic) 和 STTM (Short tandem target mimic) 方法, 也有用 SP (Sponges) 沉默 miRNA 的报道 (图 2)。TM 法基于拟南芥非编码基因 *IPS1* (Induced by phosphate starvation 1) RNA 分子可与 miR399 结合但不被其降解, 将 *IPS1* 中 miR399 结合位点替换为其他 miRNA 不完全匹配的结合位点, 可竞争性抑制 miRNA 与其靶标基因的结合 (Marco et al., 2010)。TM 分子的长度与 *IPS1* 基因长度相当, 约 500 bp。STTM 是将两个 miRNA 结合位点序列通过 48 ~ 88 bp 间隔序列串联在一起, 形成长度约 100 bp 的具有茎环结构的分子, 比 TM 具有更广泛的应用 (Zhang et al., 2017b)。SP 是

一种沉默动物 miRNA 的方法, 后被应用于植物 miRNA 功能研究。SP 分子包含 4~15 个 miRNA 结合位点, 中间以 4 bp 短序列分开, 长度大约 100~400 bp (Reichel et al., 2015)。上述 3 种方法的关键在于 miRNA 结合位点 (miRNA binding site) 的设计, 该位点两端与 miRNA 完全匹配, 但切割位点处的 3 个核苷酸发生改变, 从而避免核酸酶 AGO1 的内切作用 (图 2)。但是 TM、STTM 和 SP 的沉默效率依赖于 miRNA 的类别 (Reichel et al., 2015), 各方法的优势并不明显, 高效率沉默 miRNA 的方法有待于进一步研究。

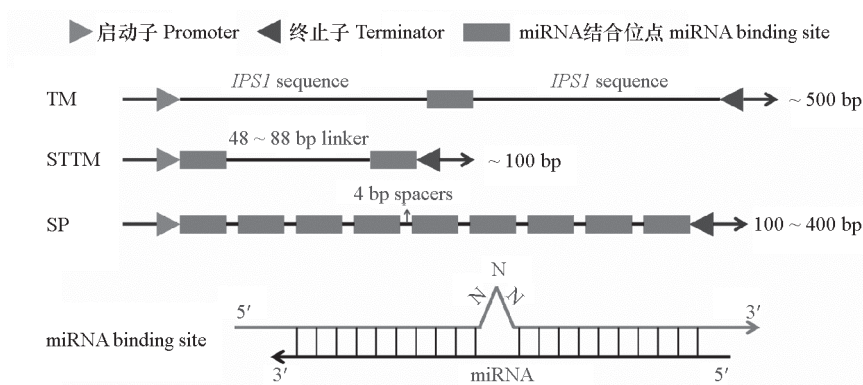


图 2 植物 miRNA 靶标模拟分子 TM、STTM 和 SP 示意图
Fig. 2 Schematic diagram of TM, STTM and SP

新的基因编辑技术 CRISPR/Cas9 开始应用于植物 miRNA 功能的研究 (Zhou et al., 2017; Konermann et al., 2018; Basso et al., 2019)。该技术已被成功应用于柑橘 *CsLOB* 基因和启动子的编辑 (Jia et al., 2017; Peng et al., 2017), 也有望用于柑橘 miRNA 的功能研究。CRISPR-Cas9 系统利用具有核酸内切酶活性的 Cas9 蛋白与相应的 CRIPST RNA 形成复合体来行使功能, 对 DNA 靶序列进行切割后, 既可以通过非同源末端连接造成基因敲除, 也可以利用同源重组精确地插入目的基因。CRISPR-Cas9 系统具有设计简易、重复性好、工作效力高、特异性强等优点, 但也存在基因编辑效率低, 可能脱靶等不利因素。通过设计和筛选更加特异的 gRNA, 选用性能更佳的 Cas9 突变体或新的 Cas 蛋白 (Jia et al., 2019), 用特异性启动子代替传统 CAMV35S 启动子 (Zhang et al., 2017a), 或对植物材料进行适当高温处理等方法 (Leblanc et al., 2017), 都可有效提高基因编辑效率和减弱脱靶潜力。

3 柑橘 miRNA 的研究进展

3.1 柑橘 miRNA 的挖掘

柑橘 miRNA 的研究起步相对较晚, 根据获取 miRNA 的方法可分为两个阶段。第 1 阶段主要以已知的植物 miRNA 为种子序列, 通过生物信息学方法从柑橘 EST 序列数据库中鉴定 miRNA。Zhang 等 (2005) 在分析植物 miRNA 时, 从柑橘 EST 中鉴定出 5 个 miRNA。随后, Sukar 和 Jagadeeswaran (2008) 从植物 EST 数据库中鉴定出 14 个柑橘 miRNA。Song 等 (2009, 2010b) 专门对柑橘 EST 数据库进行分析, 分别鉴定出 27 个和 38 个柑橘 miRNA。随着柑橘 EST 数量的增加, 随后鉴定出

51 个 miRNA (Wu et al., 2011)。然而, 这一方法不仅受限于在植物 EST 序列数据库中已注册的柑橘 EST 数量, 也受限于当时已知的植物保守 miRNA 数量; 仅能从柑橘中筛选出已知的植物 miRNA, 无法鉴定柑橘中特异表达的新的 miRNA。随着甜橙、宽皮柑橘、柚、金柑、枸橼、宜昌橙、酒饼勒等柑橘及其近源属植物基因组的释放 (Xu et al., 2013; Wu et al., 2014; Wang et al., 2017, 2018; Zhu et al., 2019), 可以在柑橘全基因组范围内高效准确地预测大量 miRNA 甚至丰度极低的 miRNA, 对柑橘中 miRNA 的发掘及对 miRNA 在柑橘发育过程中的功能研究起到了显著地推动作用, 柑橘 miRNA 的研究自此进入第 2 阶段。Song 等 (2010a) 对枳进行深度测序, 发掘出 63 个已知的 miRNA 和 10 个新的 miRNA。Xu 等 (2010) 同年对甜橙进行深度测序, 发掘出 85 个已知的 miRNA 和 12 个新的 miRNA。通过小分子 RNA 测序技术, 不断从甜橙 (Zhao et al., 2013; Liu et al., 2014; Huang et al., 2016)、柚 (Fang et al., 2016)、资阳香橙 (Xie et al., 2017) 和枳 (Sun et al., 2012; Zhang et al., 2014; Song et al., 2018) 等品种及其杂交种和突变体中筛选发掘出保守的和柑橘特异的 miRNA。研究发现 miRNA 及其靶基因参与调控柑橘生长发育、果实品质和逆境胁迫等过程 (图 3)。

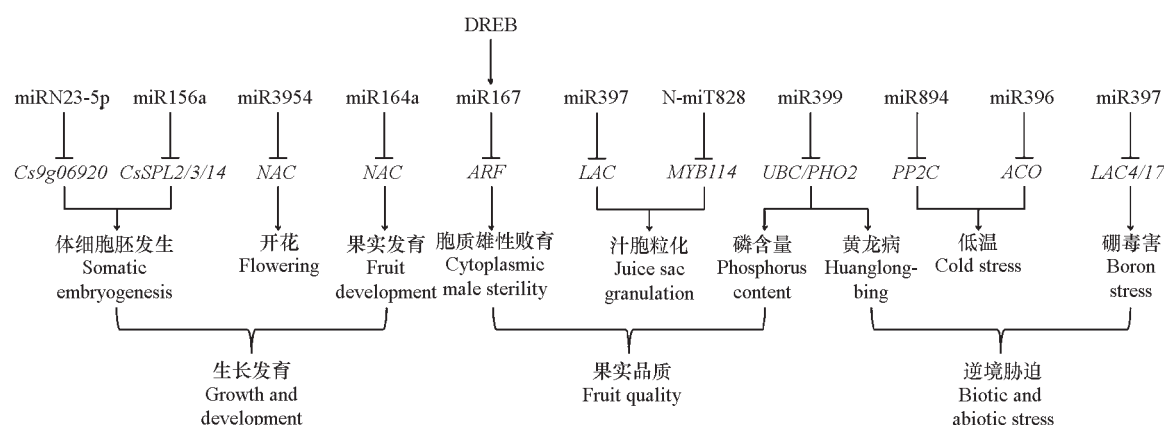


图 3 miRNA 参与柑橘生长发育、果实品质和逆境胁迫的调控

Fig. 3 miRNA were involved in the regulation of citrus growth, fruit quality, and stress response

影响果实品质的柑橘 miRNA 的发掘: miRNA 可能参与调控柑橘果实色泽、有无种籽、汁胞粒化等品质特征。与普通甜橙相比, 红肉甜橙富含番茄红素。小 RNA 测序显示 51 个已知的植物 miRNA 和 9 个新的 miRNA 在红肉甜橙中差异表达, 其中 *csi-miR319* 和 *csi-miR1857* 可能调控甜橙果实中番茄红素的合成过程 (Xu et al., 2010)。利用小 RNA 测序, 从雄性不育的椪柑和不育的胞质杂种柚中发掘出可能参与核雄性不育及细胞质雄性不育的 miR156、miR167、miR399 和 miR827 等分子 (Fang et al., 2014, 2016)。酵母单杂交鉴定 DREB 转录因子是 miR167a 基因的上游调控因子, 烟草双荧光素酶检测体系进一步证实了上述互作关系 (Fang et al., 2016)。*csi-miR397* 和 *N-miR828* 与柑橘汁胞粒化密切相关, 随着粒化程度加重其表达量降低, 而其靶基因漆酶和 *MYB114* 表达上升 (Zhang et al., 2016a)。

响应黄龙病胁迫的柑橘 miRNA 的发掘: 柑橘黄龙病由韧皮部专性寄生的一种难培养的革兰氏阴性菌 ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ 引起, 是威胁柑橘产业最严重的病害 (Bové, 2006)。对患病柑橘和健康植株进行小 RNA 测序发现多个差异表达的 miRNA。其中 miR399 在感染黄龙病的甜橙、宽皮橘和葡萄柚中都上调表达, 且不受与黄龙病症状相似的顽固病菌 (*Spiroplasma citri*) 的诱导, 并且在黄龙病感病植株中 miR399 的靶基因 *CsPHO2* 表达下调, 而受 *CsPHO2* 调控的下游

基因 *CsPHT2:1* 和 *CsPT2* 上调表达。miR399 与植物体内磷平衡和信号转导相关, 果园喷施含磷营养液可减弱黄龙病对柑橘树的影响, 提高产量, 侧面证实 miR399 参与植物与黄龙病菌的互作反应 (Zhao et al., 2013)。

响应非生物逆境的柑橘 miRNA 的发掘: 陈立松课题组 (Lu et al., 2014, 2015; Ma et al., 2016; Liang et al., 2017) 对甜橙在缺镁和缺硼胁迫下根和叶早期差异表达的 miRNA 进行了研究, 发现 *csi-miR158* 在缺硼、缺镁的叶片中均上调表达, 但在根中该 miRNA 在两种缺素条件下差异表达趋势相反。在柑橘缺硼的早期和晚期, miR164、miR3446、miR403、miR479、miR6173 和 miR6025 都存在差异表达 (Lu et al., 2015; Yang et al., 2015)。在过量硼处理柑橘后, miR397a 在硼敏感的柚叶片中显著上调, 在硼耐受的甜橙叶片中下调, 和其靶标基因 *LAC4* 和 *LAC17* 呈现相反的表达模式 (Huang et al., 2016)。Xie 等 (2017) 在资阳香橙根中筛选出受干旱或盐胁迫诱导表达的 75 个 miRNA, 其中 34 个在干旱条件下差异表达, 62 个在盐胁迫时诱导表达, 21 个同时受干旱和盐胁迫的影响, 如 *cj_miR3946*、*cj_miR3951* 和 *cj_new_miR197* 同时被干旱和盐胁迫下调表达, *cj_new_miR203*、*cj_new_miR219* 和 *cj_miR482b* 在干旱胁迫时上调表达而在盐胁迫时下调表达。

3.2 柑橘 miRNA 的功能研究

csi-miR156 促进柑橘体细胞胚发生并可能参与调控柑橘童期: miR156 是植物中鉴定的第 1 个 miRNA (Reinhart et al., 2002), 也是一个高度保守的 miRNA 家族, 抑制转录因子 SPL (Squamosa promoter binding protein-like) 基因表达。柑橘基因组有 4 个 *MIR156* 基因, 编码 4 个成熟的 *csi-miR156*, 其中 *csi-miR156a* 和 *csi-miR156b* 序列相同, 其前体序列存在差异 (Liu et al., 2017a)。靶标基因 *SPL* 在柑橘基因组中有 15 个成员, 其中 10 个 *SPL* 在基因编码区或 3'UTR 区具有 *csi-miR156* 的结合位点 (Shalom et al., 2015; Liu et al., 2017a)。柑橘 miR156 在体细胞胚发生过程中表达量升高 (Wu et al., 2011)。在山金柑愈伤组织中过表达 *csi-miR156a* 或对其靶基因 *CsSPL3* 和 *CsSPL14* 进行干扰后, 可显著提升体细胞胚的发生能力。*CsSPL14* 可与激酶催化亚基 *CsAKIN10* 互作, 表明 miR156a-CsSPL14-CsAKIN10 通路可能在体细胞胚发生过程中具有重要作用 (Long et al., 2018)。另有研究显示, miR156 在柑橘愈伤组织中过表达可显著提高淀粉含量 (Liu et al., 2017a), 但不清楚淀粉含量的增加是否与体细胞胚发生相关。此外, *csi-miR156* 可能同其他植物的 miR156 一样, 在植物从童期到成熟期的发育过程中具有重要的调控作用, 其靶基因 *CiSPL5* 在拟南芥中异源表达可促进转基因植株提早开花 (Shalom et al., 2015)。

ptr-miR396 具有耐低温胁迫功能: miR396 家族也是一个保守的植物 miRNA 家族, 具有多个成员, 在植物的生长、发育及抗非生物胁迫 (如盐、碱、低温等胁迫) 中具有重要作用 (Zhang et al., 2016b; Wang et al., 2018; Miao et al., 2019)。在拟低温胁迫的小 RNA 文库中筛选出低温诱导表达的 *ptr-miR396*; 通过 RLM-5'RACE 验证和烟草瞬时表达验证, 确认 *PtrACO* (ACC oxidase) 为 *ptr-miR396b* 的靶基因; *ptr-miR396* 与靶基因 *ACO* (ACC oxidase) 在低温胁迫条件下呈现相反的表达模式, 表明 *ptr-miR396* 可能在转录后水平调控 *ACO* 基因的表达 (Zhang et al., 2014)。在 *ptr-miR396b* 过表达的柠檬转基因植株中, *ACO* 表达下降, 乙烯释放量降低。低温 (-2 °C) 处理 *ptr-miR396b* 过表达的柠檬植株, 转基因植株中多胺合成的关键基因 (*S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因 *CISAMDC*、亚精胺合酶基因 *CISPDS* 和精胺合酶基因 *CISPMS* 等) 表达增加, 且多胺含量升高, 但过氧化氢和活性氧的水平低于野生型对照。推测 *ptr-miR396* 通过抑制乙烯合成途径关键基因 *ACO* 的表达, 降低乙烯释放量并增加多胺的生成, 从而提高了植株的耐低温能力 (Zhang et al., 2016b)。

csi-miR3954 促进柑橘开花: miR3954 曾命名为 miR7122, 目前仅在柑橘、桃、苹果和番茄中鉴

定到。*csi-miR3954* 在甜橙花器官中高表达, 作用于靶基因 *NAC* 和两个在柑橘中特异表达的非编码 RNA *Cs1g09600* 和 *Cs1g09635*。*NAC* 是植物特有的一类转录因子, 不仅可以控制花瓣的大小, 也影响植物的开花时间 (Borevitz et al., 2007; Pei et al., 2013)。过表达 *csi-miR3954* 可促使转基因金柑提前开花, 产生的种子在播种后 7 个月即可开花结果。其作用机理可能包含两个途径: *csi-miR3954* 直接剪切 *NAC* 基因, 或通过剪切非编码靶标 RNA 产生 *phasiRNA* 降解同源的 *NAC* 基因, 即 *miR3954*-*IncRNA*-*phasiRNA*-*NAC* 途径 (Liu et al., 2017c)。

4 展望

与模式植物和大田作物相比, 柑橘中已发掘和鉴定的 miRNA 数量并不少。随着柑橘更多基因组序列的释放, 高通量测序技术和生物信息学分析方法的不断进步, 有望在柑橘不同品种、不同组织、不同发育阶段、不同逆境胁迫等条件下发现更多的植物保守的 miRNA 和柑橘特有的 miRNA。保守的 miRNA 对于植物的生长发育非常重要, 它们虽具有相似的功能, 但在不同植物中其功能也不尽相同。如与果实大小发育相关的 *miR172*, 在拟南芥中过表达使果荚增大 (Ripoll et al., 2015), 而在苹果中过表达则使果实变小 (Yao et al., 2015)。由此可见, 柑橘中保守 miRNA 和品种特异 miRNA 的研究具有重要的生物学意义。对植物 miRNA 功能的研究多依赖于遗传转化的方法, 柑橘上已建成成熟的根癌农杆菌遗传转化再生技术, 能够利用实生苗上胚轴和成年态材料成功获得转基因植株 (姚利晓 等, 2013), 这为柑橘 miRNA 功能的研究奠定了坚实基础。但由于柑橘是多年生高度杂合的木本植物, 遗传转化率远低于模式生物和大田作物, 且难以获得纯合的转基因株系。柑橘病毒载体的开发和利用大大缩短了基因的转化周期, 且外源标记基因不会整合到植物的基因组上。在未来的研究中可综合前述 3 种方法, 利用农杆菌转化系统获得转有 *Cas9* 基因的植株, 通过柑橘病毒载体投递靶向 gRNA, 对 miRNA 基因及其基因家族进行基因编辑, 加快柑橘 miRNA 功能的研究进展。毫无疑问, 进一步识别、验证和分析更多柑橘 miRNA 及进一步发展基于 miRNA 的育种策略, 将促进 miRNA 在柑橘改良中的应用。另外, 通过高通量测序技术和现代分子生物学技术的联合应用, 构建基于 miRNA 的协同调控网络, 将有望加深对柑橘 miRNA 在特定生物学过程中精确调控的解析。

References

- Addo-Quaye C, Eshoo T W, Bartel D P, Axtell M J. 2008. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the *Arabidopsis* degradome. *Current Biology*, 18: 758 - 762.
- Allen E, Xie Z, Gustafson A M, Carrington J C. 2005. microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121: 207 - 221.
- Axtell M J, Meyers B C. 2018. Revisiting criteria for plant microRNA annotation in the era of big data. *The Plant Cell*, 30: 272 - 284.
- Basso M F, Ferreira P C G, Kobayashi A K, Harmon F G, Nepomuceno A L, Molinari H B C, Grossi-de-Sa M F. 2019. MicroRNAs and new biotechnological tools for its modulation and improving stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 17: 1482 - 1500.
- Borevitz J, Yoo S Y, Kim Y, Kim S Y, Lee J S, Ahn J H. 2007. Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2: e642.
- Bové J M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88: 7 - 37.
- Chen C, Zeng Z, Liu Z, Xia R. 2018. Small RNAs, emerging regulators critical for the development of horticultural traits. *Horticulture Research*, 5: 63.

- Dai X, Zhuang Z, Zhao P X. 2018. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release) . Nucleic Acids Research, 46: W49 – W54.
- Dawson W O, Folimonova S Y. 2013. Virus-based transient expression vectors for woody crops: a new frontier for vector design and use. Annual Review of Phytopathology, 51: 321 – 337.
- Deng Y, Liu M, Li X, Li F. 2018. microRNA-mediated *R* gene regulation: molecular scabbards for double-edged swords. Science China Life Sciences, 61: 138 – 147.
- Fang Y N, Qiu W M, Wang Y, Wu X M, Xu Q, Guo W W. 2014. Identification of differentially expressed microRNAs from a male sterile Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and its fertile wild type by small RNA and degradome sequencing. Tree Genetics & Genomes, 10: 1567 – 1581.
- Fang Y N, Zheng B B, Wang L, Yang W, Wu X M, Xu Q, Guo W W. 2016. High-throughput sequencing and degradome analysis reveal altered expression of miRNAs and their targets in a male-sterile cybrid pummelo (*Citrus grandis*) . BMC Genomics, 17: 591.
- Fei Q, Xia R, Meyers B C. 2013. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. The Plant Cell, 25: 2400 – 2415.
- Feng L, Xia R, Liu Y L. 2019. Comprehensive characterization of miRNA and PHAS loci in the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) genome. Horticultural Plant Journal, 5 (6): 255 – 267.
- German M A, Pillay M, Jeong D H, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, Kannan V, Rymarquis L A, Nobuta K, German R, De Paoli E, Lu C, Schroth G, Meyers B C, Green P J. 2008. Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. Nature Biotechnology, 26: 941 – 946.
- Huang J H, Qi Y P, Wen S X, Guo P, Chen X M, Chen L S. 2016. Illumina microRNA profiles reveal the involvement of miR397a in *Citrus* adaptation to long-term boron toxicity via modulating secondary cell-wall biosynthesis. Scientific Reports, 6: 22900.
- Iwakawa H-o, Tomari Y. 2015. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. Trends in Cell Biology, 25: 651 – 665.
- Jia H, Orbović V, Wang N. 2019. CRISPR-LbCas12a-mediated modification of citrus. Plant Biotechnology Journal, 17 (10): 1928 – 1937.
- Jia H, Zhang Y, Orbović V, Xu J, White F F, Jones J B, Wang N. 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. Plant Biotechnology Journal, 15: 817 – 823.
- Jian C, Han R, Chi Q, Wang S, Ma M, Liu X, Zhao H. 2017. Virus-based microRNA silencing and overexpressing in common wheat (*Triticum aestivum* L.) . Frontiers in Plant Science, 8: 500.
- Konermann S, Lotfy P, Brideau N J, Oki J, Shokhirev M N, Hsu P D. 2018. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. Cell, 173: 665 – 676.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Research, 42: D68 – D73.
- Leblanc C, Zhang F, Mendez J, Lozano Y, Chatpar K, Irish V F, Jacob Y. 2017. Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. Plant Journal, 93: 377 – 386.
- Liang W W, Huang J H, Li C P, Yang L T, Ye X, Lin D, Chen L S. 2017. MicroRNA-mediated responses to long-term magnesium-deficiency in *Citrus sinensis* roots revealed by Illumina sequencing. BMC Genomics, 18: 657.
- Liu M Y, Wu X M, Long J M, Guo W W. 2017a. Genomic characterization of miR156 and SQUAMOSA promoter binding protein-like genes in sweet orange (*Citrus sinensis*) . Plant Cell Tissue & Organ Culture, 130: 103 – 116.
- Liu S-R, Zhou J J, Hu C G, Wei C L, Zhang J Z. 2017b. MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. Frontiers in Microbiology, 8: 1801.
- Liu Y, Ke L, Wu G, Xu Y, Wu X, Xia R, Deng X, Xu Q. 2017c. miR3954 is a trigger of phasiRNAs that affects flowering time in citrus. The Plant Journal, 92: 263 – 275.
- Liu Y, Wang L, Chen D, Wu X, Huang D, Chen L, Li L, Deng X, Xu Q. 2014. Genome-wide comparison of microRNAs and their targeted transcripts among leaf, flower and fruit of sweet orange. BMC Genomics, 15: 695.
- Llave C, Kasschau K D, Rector M A, Carrington J C. 2002. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. The Plant Cell, 14:

- 1605 – 1619.
- Long J M, Liu C Y, Feng M Q, Liu Y, Wu X M, Guo W W. 2018. miR156-SPL modules regulate induction of somatic embryogenesis in citrus callus. *Journal of Experimental Botany*, 69: 2979 – 2993.
- Long J M, Liu Z, Wu X M, Fang Y N, Jia H H, Xie Z Z, Deng X X, Guo W W. 2016. Genome-scale mRNA and small RNA transcriptomic insights into initiation of citrus apomixis. *Journal of Experimental Botany*, 67: 5743 – 5756.
- Lorenz R, Bernhart S H, Siederdisen C H Z, Tafer H, Flamm C, Stadler P F, Hofacker I L. 2011. ViennaRNA package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6: 26.
- Lu Y B, Qi Y P, Yang L T, Guo P, Li Y, Chen L S. 2015. Boron-deficiency-responsive microRNAs and their targets in *Citrus sinensis* leaves. *BMC Plant Biology*, 15: 271.
- Lu Y B, Yang L T, Qi Y P, Li Y, Li Z, Chen Y B, Huang Z R, Chen L S. 2014. Identification of boron-deficiency-responsive microRNAs in *Citrus sinensis* roots by Illumina sequencing. *BMC Plant Biology*, 14: 123.
- Ma C L, Qi Y P, Liang W W, Yang L T, Lu Y B, Guo P, Ye X, Chen L S. 2016. MicroRNA regulatory mechanisms on *Citrus sinensis* leaves to magnesium-deficiency. *Frontiers in Plant Science*, 7: 201.
- Marco T, Ignacio R S, Javier P A, Detlef W. 2010. A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 6: e1001031.
- Mei P, Song Z, Li Z a, Zhou C. 2019. Functional study of *Csrbohs* in defence response against *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *Functional Plant Biology*, 46: 543 – 554.
- Miao C, Wang D, He R, Liu S, Zhu J K. 2019. Mutations in MIR396e and MIR396f increase grain size and modulate shoot architecture in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 18 (2): 1 – 11.
- Nogoy F M, Niño M C, Song J Y, Jung Y J, Kang K K, Nou I, Cho Y G. 2018. Plant microRNAs in molecular breeding. *Plant Biotechnology Reports*, 12: 15 – 25.
- Pei H, Ma N, Tian J, Luo J, Chen J, Li J, Zheng Y, Chen X, Fei Z, Gao J. 2013. An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals. *Plant Physiology*, 163: 775 – 791.
- Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, Wu L, Yao L, Zou X. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 1509 – 1519.
- Reichel M, Li Y, Li J, Millar A A. 2015. Inhibiting plant microRNA activity: molecular *SPONGEs*, target *MIMICs* and *STTM*s all display variable efficacies against target microRNAs. *Plant Biotechnology Journal*, 13: 915 – 926.
- Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, Bartel B, Barte D P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, 16: 1616 – 1626.
- Ripoll J J, Bailey L J, Mai Q A, Wu S L, Hon C T, Chapman E J, Ditta G S, Estelle M, Yanofsky M F. 2015. microRNA regulation of fruit growth. *Nature Plants*, 1: 15036.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18: 1121 – 1133.
- Schwab R, Palatnik J F, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D. 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8: 517 – 527.
- Shalom L, Shlizerman L, Zur N, Doron-Faigenboim A, Blumwald E, Sadka A. 2015. Molecular characterization of SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) gene family from *Citrus* and the effect of fruit load on their expression. *Frontiers in Plant Science*, 6: 389.
- Song C, ChenWang, Zhang C, Korir N K, Yu H, Ma Z, Fang J. 2010a. Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in trifoliolate orange (*Citrus trifoliata*) . *BMC Genomics*, 11: 431.
- Song C, Fang J, Li X, Liu H, Chao C T. 2009. Identification and characterization of 27 conserved microRNAs in citrus. *Planta*, 230: 671 – 685.
- Song C, Jia Q, Fang J, Li F, Wang C, Zhang Z. 2010b. Computational identification of citrus microRNAs and target analysis in citrus expressed sequence tags. *Plant Biology*, 12: 927 – 934.
- Song F, He C, Yan X, Bai F X, Pan Z Y, Deng X X, Xiao S Y. 2018. Small RNA profiling reveals involvement of microRNA-mediated gene regulation in response to mycorrhizal symbiosis in *Poncirus trifoliata* L. Raf. *Tree Genetics & Genomes*, 14: 42.

- Sun L M, Ai X Y, Li W Y, Guo W W, Deng X X, Hu C G, Zhang J Z. 2012. Identification and comparative profiling of miRNAs in an early flowering mutant of trifoliate orange and its wild type by genome-wide deep sequencing. PLoS ONE, 7: e43760.
- Sunkar R, Jagadeeswaran G. 2008. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. BMC Plant Biology, 8: 37.
- Velázquez K, Agüero J, Vives M C, Aleza P, Pina J A, Moreno P, Navarro L, Guerri J. 2016. Precocious flowering of juvenile citrus induced by a viral vector based on *Citrus leaf blotch virus*: a new tool for genetics and breeding. Plant Biotechnology Journal, 14: 1976 – 1985.
- Wang K T, Su X M, Cui X, Du Y C, Zhang S B, Gao J C. 2018. Identification and characterization of microRNA during *Bemisia tabaci* infestations in *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. Horticultural Plant Journal, 4 (2): 62 – 72.
- Wang L, He F, Huang Y, He J, Yang S, Zeng J, Deng C, Jiang X, Fang Y, Wen S, Xu R, Yu H, Yang X, Zhong G, Chen C, Yan X, Zhou C, Zhang H, Xie Z, Larkin R M, Deng X, Xu Q. 2018. Genome of wild mandarin and domestication history of mandarin. Molecular Plant, 11: 1024 – 1037.
- Wang X, Xu Y, Zhang S, Cao L, Huang Y, Cheng J, Wu G, Tian S, Chen C, Liu Y, Yu H, Yang X, Lan H, Wang N, Wang L, Xu J, Jiang X, Xie Z, Tan M, Larkin R M, Chen L L, Ma B G, Ruan Y, Deng X, Xu Q. 2017. Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction. Nature Genetics, 49: 765 – 772.
- Wu G A, Prochnik S, Jenkins J, Salse J, Hellsten U, Murat F, Perrier X, Ruiz M, Scalabrin S, Terol J, Takita M A, Labadie K, Poulain J, Couloux A, Jabbari K, Cattonaro F, Del Fabbro C, Pinosio S, Zuccolo A, Chapman J, Grimwood J, Tadeo F R, Estornell L H, Muñoz-Sanz J V, Ibanez V, Herrero-Ortega A, Aleza P, Pérez-Pérez J, Ramón D, Brunel D, Luro F, Chen C, Farmerie W G, Desany B, Kodira C, Mohiuddin M, Harkins T, Fredrikson K, Burns P, Lomsadze A, Borodovsky M, Reforgiato G, Freitas-Astúa J, Quetier F, Navarro L, Roose M, Wincker P, Schmutz J, Morgante M, Machado M A, Talon M, Jaillon O, Ollitrault P, Gmitter F, Rokhsar D. 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. Nature Biotechnology, 32: 656 – 662.
- Wu J, Zheng S, Feng G, Yi H. 2016. Comparative analysis of miRNAs and their target transcripts between a spontaneous late-ripening sweet orange mutant and its wild-type using small RNA and degradome sequencing. Frontiers in Plant Science, 7: 1416.
- Wu X M, Liu M Y, Xu Q, Guo W W. 2011. Identification and characterization of microRNAs from citrus expressed sequence tags. Tree Genetics & Genomes, 7: 117 – 133.
- Xie R, Zhang J, Ma Y, Pan X, Dong C, Pang S, He S, Deng L, Yi S, Zheng Y, Lv Q. 2017. Combined analysis of mRNA and miRNA identifies dehydration and salinity responsive key molecular players in citrus roots. Scientific Reports, 7: 42094.
- Xu Q, Chen L L, Ruan X, Chen D, Zhu A, Chen C, Bertrand D, Jiao W B, Hao B H, Lyon M P. 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). Nature Genetics, 45: 59 – 66.
- Xu Q, Liu Y L, Zhu A D, Wu X M, Ye J L, Yu K Q, Guo W W, Deng X X. 2010. Discovery and comparative profiling of microRNAs in a sweet orange red-flesh mutant and its wild type. BMC Genomics, 11: 246.
- Yang C, Liu T, Bai F, Wang N, Pan Z, Yan X, Peng S. 2015. miRNAome analysis associated with anatomic and transcriptomic investigations reveal the polar exhibition of corky split vein in boron deficient *Citrus sinensis*. Molecular Genetics and Genomics, 290: 1639 – 1657.
- Yao J L, Xu J, Cornille A, Tomes S, Karunairetnam S, Luo Z, Bassett H, Whitworth C, Rees-George J, Ranatunga C, Snirc A, Crowhurst R, de Silva N, Warren B, Deng C, Kumar S, Chagné D, Bus V G M, Volz R K, Rikkerink E H A, Gardiner S E, Giraud T, MacDiarmid R, Gleave A P. 2015. A *microRNA* allele that emerged prior to apple domestication may underlie fruit size evolution. The Plant Journal, 84: 417 – 427.
- Yao Li-xiao, He Yong-rui, Zou Xiu-ping, Lei Tian-gang, Xu Lan-zhen, Peng Ai-hong, Chen Shan-chun. 2013. Advances and strategies in citrus genetic engineering and breeding. Journal of Fruit Science, 30: 1056 – 1064. (in Chinese)
- 姚利晓, 何永睿, 邹修平, 雷天刚, 许兰珍, 彭爱红, 陈善春. 2013. 柑橘基因工程育种研究策略及其进展. 果树学报, 30: 1056 – 1064.
- Yi X, Zhang Z, Ling Y, Xu W, Su Z. 2015. PNRD: a plant non-coding RNA database. Nucleic Acids Research, 43: D982 – D989.
- Yu Y, Jia T, Chen X. 2017. The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. New Phytologist, 216: 1002 – 1017.
- Yuan C, Meng X, Li X, Illing N, Ingle R A, Wang J, Chen M. 2017. PceRBase: a database of plant competing endogenous RNA. Nucleic Acids

- Research, 45: D1009 – D1014.
- Zhang B H, Pan X P, Wang Q L, Cobb G P, Anderson T A. 2005. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Research*, 15: 336 – 360.
- Zhang F, Leblanc C, Irish V F, Jacob Y. 2017a. Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene editing in *Citrus* using the YAO promoter. *Plant Cell Reports*, 36: 1 – 5.
- Zhang H, Zhang J, Yan J, Gou F, Mao Y, Tang G, Botella J R, Zhu J K. 2017b. Short tandem target mimic rice lines uncover functions of miRNAs in regulating important agronomic traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: 5277 – 5282.
- Zhang J, Wang M, Cheng F, Dai C, Sun Y, Lu J, Huang Y, Li M, He Y, Wang F, Fan B. 2016a. Identification of microRNAs correlated with citrus granulation based on bioinformatics and molecular biology analysis. *Postharvest Biology and Technology*, 118: 59 – 67.
- Zhang P, Meng X, Chen H, Liu Y, Xue J, Zhou Y, Chen M. 2017c. PlantCircNet: a database for plant circRNA-miRNA-mRNA regulatory networks. *Database*, doi: 10.1093/database/bax089.
- Zhang S, Yue Y, Sheng L, Wu Y, Fan G, Li A, Hu X, Shangguan M, Wei C. 2013. *PASmiR*: a literature-curated database for miRNA molecular regulation in plant response to abiotic stress. *BMC Plant Biology*, 13: 33.
- Zhang X, Wang W, Wang M, Zhang H Y, Liu J H. 2016b. The miR396b of *Poncirus trifoliata* functions in cold tolerance by regulating ACC oxidase gene expression and modulating ethylene-polyamine homeostasis. *Plant and Cell Physiology*, 57: 1865 – 1878.
- Zhang X N, Li X, Liu J H. 2014. Identification of conserved and novel cold-responsive microRNAs in trifoliolate orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] using high-throughput sequencing. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32: 328 – 341.
- Zhao H, Sun R, Albrecht U, Padmanabhan C, Wang A, Coffey M D, Girke T, Wang Z, Close T J, Roose M, Yokomi R K, Folimonova S, Vidalakis G, Rouse R, Bowman K D, Jin H. 2013. Small RNA profiling reveals phosphorus deficiency as a contributing factor in symptom expression for citrus Huanglongbing disease. *Molecular Plant*, 6: 301 – 310.
- Zhou J, Deng K, Cheng Y, Zhong Z, Tian L, Tang X, Tang A, Zheng X, Zhang T, Qi Y, Zhang Y. 2017. CRISPR-Cas9 based genome editing reveals new insights into microRNA function and regulation in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1598.
- Zhu C, Zheng X, Huang Y, Ye J, Chen P, Zhang C, Zhao F, Xie Z, Zhang S, Wang N, Li H, Wang L, Tang X, Chai L, Xu Q, Deng X. 2019. Genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing of an early flowering Mini-citrus (*Fortunella hindsii*). *Plant Biotechnology Journal*, 17: 2199 – 2210.