

杨树 MIR171 基因家族进化与功能分化研究

刘志祥^{1,2,3}, 曾超珍¹, 曾渭贤¹, 徐刚标¹, 谭晓风^{2,3}

(¹中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙 410004; ²经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 长沙 410004; ³中南林业科技大学林学院, 长沙 410004)

摘要: microRNA (miRNA) 是一类重要的非编码小分子 RNA, 广泛参与植物生长发育和胁迫响应的调控。毛果杨 MIR171 基因家族是一个古老的 miRNA 基因家族, 具有 14 个成员。本研究对毛果杨 MIR171 基因家族的基因倍增模式、表达方式、启动子结构及靶基因进行了分析。结果表明: 毛果杨 MIR171 基因家族主要通过 48~54 百万年前的染色体大片段重复进行扩张, 其表达方式和功能已经出现分化。MIR171 基因家族可能主要通过调控 GRAS 转录因子和信号转导蛋白参与杨树生长发育、光信号转导和光形态建成的调控。

关键词: 毛果杨; microRNA; MIR171 基因家族; 进化; 功能分化

Evolutionary and Functional Diversity of the Poplar MIR171 Genes

LIU Zhi-xiang^{1,2,3}, ZENG Chao-zhen¹, ZENG Wei-xian¹, XU Gang-biao¹, TAN Xiao-feng^{2,3}

(¹College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004; ²Key Lab of Non-wood Forest Products of State Forestry Administration, Changsha 410004; ³College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004)

Abstract: microRNAs (miRNA) are a class of non-coding small RNAs and important regulators of development and stress responses in plants. *Populus trichocarpa* MIR171 gene family is an old gene family which consists of 14 members. In this paper, the duplication, expression patterns, promoters, and target genes of ptc-MIR171 gene family were analyzed. The results showed that ptc-MIR171 gene family expanded mainly through large-scale duplication 48-54 million years ago (MYA) and the expression patterns and functions had diversified. The ptc-MIR171 gene family involved in complex regulation of development, light responsiveness, and photomorphogenesis by regulating GRAS transcription factors and signal transduction proteins.

Key words: *Populus trichocarpa*; microRNA; MIR171 gene family; evolution; function diversification

microRNA (miRNA) 是普遍存在于植物中的一类长约 21 nt 的小分子非编码 RNA, 主要通过介导 mRNA 的剪切或翻译抑制而调控靶基因的表达, 由于 miRNA 的靶基因往往是转录因子等具有调控功能的基因, 所以 miRNA 在植物发育、逆境胁迫响应中具有重要的调控作用^[1]。因此, 对 miRNA 的研究受到广泛重视, 近年来发表 miRNA 的数量呈指数增长^[2]。

杨树 (*Populus* spp.) 是在世界范围内广泛栽培

的速生用材树种, 同时也是极具应用前景的生物能源树种, 具有重要的生态和经济价值^[3]。由于其周期性生长、丰富的变异和广泛的适应性, 杨树是研究木材形成、次生生长和季节性生长的参考模式植物^[4], 特别是在毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 全基因组测序完成后^[5], 杨树被作为木本模式植物得到了广泛的研究。

植物 MIR171 基因是一个古老而保守的 miRNA 基因家族, 根据 miRBase 数据库 (Release19)^[6] 收录

的数据 (<ftp://mirbase.org/pub/mirbase/19/>), 在小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 中已发现了 2 个 MIR171 基因; 毛果杨 MIR171 基因家族共有 14 个成员, 其规模仅次于苹果 (*Malus domestica*) 的 15 个成员和 大豆 (*Glycine max*) 的 21 个成员, 是比较大的 miRNA 基因家族。保守 miRNA 基因家族在不同植物中由于成员数量和基因组分布的差异, 可能通过基因剂量效应和表达的时空差异而发挥着不同的调控作用^[7], 说明 MIR171 基因家族在毛果杨中可能形成了较复杂的调控网络。

杨树 MIR171 基因家族经历的进化过程, 其家族成员之间的功能分化情况, 目前未见系统研究。本研究分析了毛果杨 MIR171 基因家族的扩张模式并估算其时间, 同时结合组织表达方式、启动子结构和靶基因分析对其家族成员的功能分化进行了研究, 以期为毛果杨 MIR171 基因家族的进化、功能及其在分子育种中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 染色体定位与基因倍增模式分析

从 miRBase 数据库 (<ftp://mirbase.org/pub/mirbase/19/>) 中获取 ptc-MIR171 基因家族序列, 以 FASTA 格式提交 Phytozome 数据库 (www.phytozome.net) 毛果杨基因组数据 (*Populus trichocarpa* v3 dataset), 经 Blast 比对获取其染色体定位信息。同一家族的不同 miRNA 位于同一或相邻的基因间区域 (intergenic region), 则这些 miRNA 基因是串联重复 (tandem duplication) 的产物^[8]。取 miRNA 基因上下游各 10 个蛋白质编码基因, 与毛果杨基因组数据库中所有蛋白质编码基因 (共 41335 个) 进行 BLASTP 比对, 获取其最佳非自我匹配基因, 设 $E < 0.001$ 。若 2 个 miR171 基因家族成员的上下游蛋白质基因中有 1 对以上为最佳非自我匹配, 则这些 miRNA 基因为染色体大片段重复 (segmental duplication) 的产物^[8]。

1.2 基因倍增时间估算

对倍增块中保守的蛋白质编码基因采用 Clustal X 进行氨基酸序列比对, 然后以氨基酸序列比对结果为参照, 进行编码序列 (CDS, coding sequence) 比对, 使用 KaKs_Calculator 软件^[9] 采用 YN 算法计算序列间同义替换率 (K_s)。因 $K_s > 2.0$ 时存在饱和现象, 故大于 2.0 的 K_s 值均舍弃。倍增块中的平均 K_s 值用于计算倍增时间 (D), 计算方法为: $D = K_s / 2E$, 其中 E 表示分子替换速率。化石证据与分子进化分析结果的比较表明杨树分子替换速率大概仅为

拟南芥的 $1/6$ ^[5], 而拟南芥的 E 值为 1.5×10^{-8} 替换/同义替换位点/年^[10], 故杨树 E 值采用 2.5×10^{-9} 替换/同义替换位点/年。

1.3 系统发育树构建

将毛果杨 MIR171 基因家族序列进行 MUSCLE 比对, 比对结果输入到 MEGA5 软件中, 采用邻接法和最大似然法构建系统发育树, 采用自展法检验进化树, 重复值设为 1000。

1.4 启动子分析

参考 X. Cui 等^[11] 的方法从 Phytozome 数据库提取 ptc-MIR171 基因家族上游启动子序列。将获得的启动子序列提交 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), 分析其中的顺式作用元件。

1.5 表达分析

1.5.1 基于小 RNA 高通量测序的表达分析 从 J. R. Puzey 等^[12] 对毛果杨 4 种不同样品 (叶片、木质部、机械胁迫木质部、混合组织) 的小 RNA 高通量测序结果的原始数据 (<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0033034>) 中获取 MIR171 基因家族成员原始测序读数, 并进行均一化处理计算表达量, 方法为: 表达量 = 原始读数 / 与基因组匹配的总读数 $\times 10^6$ 。

1.5.2 基于 EST 的表达分析 将毛果杨 MIR171 基因前体序列提交 NCBI 与毛果杨 EST 数据进行 blast 比对, 搜索到的 EST 与 miRNA 匹配覆盖率为 100%、相似度 $> 95\%$ 、匹配方式为 Plus/Plus, E 值 $< 10^{-10}$, 则作为该 miRNA 的表达序列。

1.6 靶基因预测

毛果杨 MIR171 基因家族靶基因预测采用 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/#>), 将 miRNA 成熟序列提交 psRNATarget, 靶基因搜索范围设置为 *Populus trichocarpa* transcript (phytozome v8.0, genome V3.0, internal number 210), 参数为默认值。

2 结果与分析

2.1 染色体定位与基因倍增模式分析

通过提交 Phytozome 数据库确定 ptc-MIR171 基因家族的染色体定位, 其结果如图 1 所示。ptc-MIR171 基因家族 14 个成员中, 仅 ptc-MIR171m 和 ptc-MIR171n 成簇分布, 其余 12 个成员分散分布于 9 条染色体中。ptc-MIR171m 和 ptc-MIR171n 相隔仅 4039 bp, 位于同一基因间区域, 二者构成串联重

复关系。

侧翼保守蛋白质分析结果表明,毛果杨 MIR171 基因家族中有 7 对成员为染色体大片段重复的产物(表 1)。由此可知,毛果杨 MIR171 基因家族扩张的主要途径是染色体大片段重复,而仅有 1 对成员为串联重复产物。

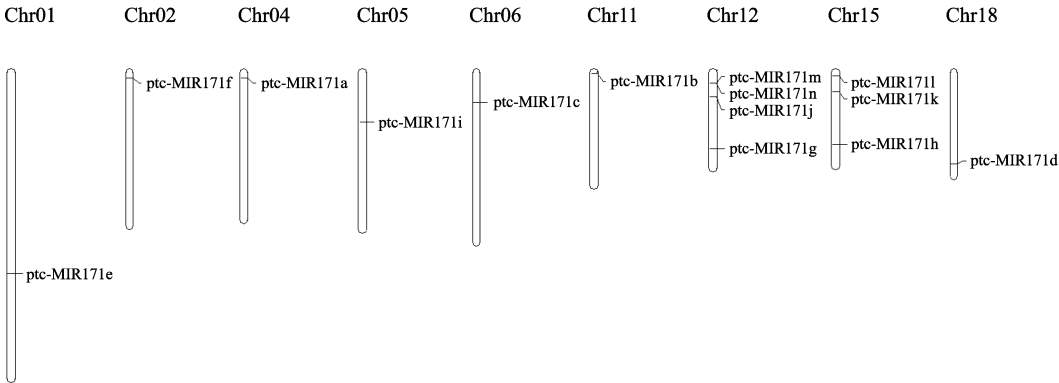


图 1 毛果杨 MIR171 基因家族的染色体定位

Fig. 1 Chromosomal location of the ptc-MIR171 gene family

表 1 大片段重复事件时间估算结果

倍增基因对	侧翼保守蛋白质基因数量	平均 K_s	K_s 标准差	倍增时间 (MYA)
Duplicated pairs	Conserved flanking protein-coding genes	Mean K_s	SD K_s	Date
ptc-MIR171g 与 ptc-MIR 171h	14	0. 269460917	0. 036707391	53. 89
ptc-MIR 171c 与 ptc-MIR 171d	11	0. 240711889	0. 030718037	48. 14
ptc-MIR 171l 与 ptc-MIR 171m/n	11	0. 254037125	0. 045884392	50. 81
ptc-MIR 171j 与 ptc-MIR 171k	9	0. 261116857	0. 050553738	52. 22
ptc-MIR 171a 与 ptc-MIR 171b	9	0. 257264286	0. 059245095	51. 45
ptc-MIR171h 与 ptc-MIR171e	1	—	—	—
ptc-MIR171i 与 ptc-MIR171f	1	—	—	—

—:侧翼保守蛋白质基因数量仅为 1,故未进行倍增时间估算

—:There was only one conserved flanking protein-coding gene within the duplicated region,so the date was not estimated. MYA:million years ago

2.2 基因倍增时间估算

对侧翼保守蛋白质基因数大于 4 的 5 对倍增块进行了倍增时间估算,其结果如表 1 所示。5 对倍增块发生的时间十分接近,都大约发生于 48 ~ 54 百万年前 (MYA,million years ago),而这一时间与杨树在进化过程中最近的一次全基因组重复事件——杨柳科重复事件 (salicoid duplication event) 比较接近^[5],所以这些染色体大片段重复可能属于杨柳科重复事件的一部分。

2.3 系统进化树构建

采用邻接法和最大似然法构建 ptc-MIR171 基因家族系统进化树,建树模型均选择 Kimura 2-parameter,两种方法构建的进化树拓扑结构基本一致,且大部分节点的 bootstrap 值大于 70,说明所建系统进化树较为可靠,最大似然树如图 2 所示。

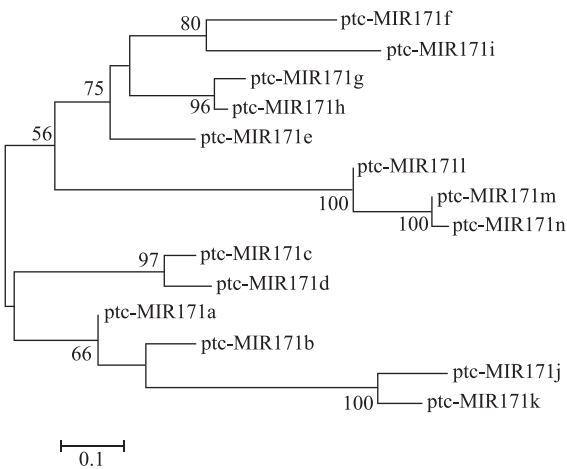


图 2 毛果杨 MIR171 基因家族最大似然树

Fig. 2 A phylogenetic tree of the MIR171 gene family in *P. trichocarpa* constructed with max-likelihood methods

将系统进化树与基因倍增模式分析结果对照分析可知:

(1) ptc-MIR171g 与 ptc-MIR171h、ptc-MIR171c 与 ptc-MIR171d、ptc-MIR171l 与 ptc-MIR171m/n、ptc-MIR171j 与 ptc-MIR171k 在进化树中处于同一分枝 (branches), 且距离较短, 而基因倍增模式分析表明这些基因位于相应的大片段重复倍增块中, 且倍增的时间十分接近 (48 ~ 54 MYA), 所以两种分析的结果较吻合, 也说明了现有 ptc-MIR171 基因家族规模在杨柳科重复事件之后, 就已经形成并维持稳定。

(2) ptc-MIR171m 和 ptc-MIR171n 在进化树中分枝距离较短, 而 ptc-MIR 171l 与 ptc-MIR 171m/n 分枝距离则相对较长, 说明 ptc-MIR171m 与 ptc-MIR171n 串联重复事件发生时间晚于 ptc-MIR 171l 与 ptc-MIR 171m/n 之间的染色体大片段重复。

表 2 毛果杨 MIR171 基因家族成员启动子中的顺式作用元件

Table 2 The *cis*-acting elements in promoters of the ptc-MIR171 gene family

顺式作用元件 <i>cis</i> -acting elements	MIR 171a	MIR 171b	MIR 171c	MIR 171d	MIR 171e	MIR 171f	MIR 171g	MIR 171h	MIR 171i	MIR 171j	MIR 171k	MIR 171l	MIR 171m	MIR 171n
CAAT-box	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
TATA-box	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
TCA-element	√		√	√	√	√	√		√	√	√		√	√
MBS		√			√	√	√		√		√			
ABRE			√					√			√	√	√	
AE-box	√	√	√	√	√		√			√	√	√	√	√
CATT-motif			√	√		√	√		√					
Sp1			√	√			√	√	√			√		
TCCC-motif			√	√					√		√			
TCT-motif			√	√					√		√			
G-Box			√				√	√	√	√	√	√		

CAAT-box: 启动子通用元件; TATA-box: 转录起始点上游-30bp 核心元件; TCA-element: 水杨酸响应元件; MBS: MYB 转录因子结合位点, 受干旱诱导; ABRE: 脱落酸响应元件; AE-box、CATT-motif、Sp1、TCCC-motif、TCT-motif、G-Box 均为光响应元件

CAAT-box: Common *cis*-acting element in promoter, TATA-box: Core promoter element around-30 of transcription start, TCA-element: *cis*-acting element involved in salicylic acid responsiveness, MBS: MYB binding site involved in drought-inducibility, ABRE: *cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness. AE-box, CATT-motif, Sp1, TCCC-motif, TCT-motif, and G-Box: *cis*-acting regulatory element involved in light responsiveness

2.5 表达分析

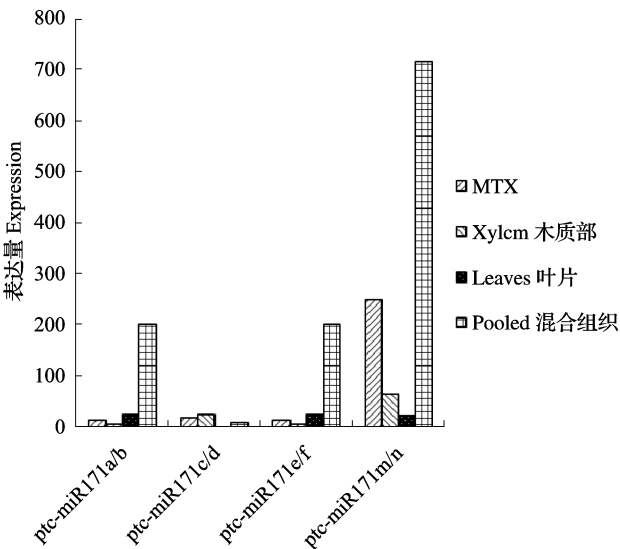
利用小 RNA 高通量测序数据分析毛果杨 MIR171 家族成员组织表达特异性, 结果如图 3 所示。由图 3 可知: ptc-miR171l/m/n 表达活性较高, 尤其在混合样品和 MTX 样品中表达量均为最高, 在木质部中也有明显的表达; 而 ptc-miR171a/b、ptc-miR171e/f 在混合样品中也具有较高表达量, 在叶片、木质部、MTX 中也有较低水平表达; ptc-miR171c/d 整体上表达水平较低, 在叶片中则没有检测到表达。这些结果说明毛果杨 MIR171 家族成

2.4 启动子结构分析

miRNA 基因与蛋白质基因一样也是通过 RNA 聚合酶 II 转录, 因此其转录调控的机制与蛋白质编码基因一致^[1]。将 ptc-MIR171 基因家族成员的上游 2000 bp 序列提交 PlantCARE 进行启动子元件分析, 结果如表 2 所示。ptc-MIR171 基因家族成员上游均具有 CAAT-box、TATA-box 等启动子基本元件, 说明这些成员可能都具有表达活性。但不同成员启动子区的顺式作用元件存在差异, 例如: 水杨酸响应元件 TCA-element、干旱响应元件 MBS、脱落酸响应元件 ABRE、光响应元件 G-box 等则仅存在于部分成员的启动子区, 说明毛果杨 MIR171 基因家族在表达方式上已经出现分化, 家族成员以不同方式参与逆境胁迫、光信号转导与光形态建成等不同生理过程的调控。

员的表达方式已经出现了较大程度的分化。另外 5 个成员 (ptc-miR171g/h/i/j/k) 在这些样品中没有检测到表达, 可能是由于其表达水平极低, 或者在其他组织和生理条件下表达。

经搜索仅发现 1 条 EST 序列与 ptc-MIR171l 匹配, 其序列号为 BU877883.1, 来自毛果杨花组织 cDNA 文库。其余基因家族成员未找到匹配的 EST 序列。这与小 RNA 高通量测序数据中 ptc-MIR171l/m/n 在花和芽等的混合样品中高水平表达相吻合。



MTX 样品为机械胁迫(包括张力和压力)处理的木质部;混合组织样品包括营养生长茎尖、雄花、雌花、雌株顶芽、雄株顶芽和侧芽

MTX means mechanically treated xylem,including tension and compression stress. The pooled tissues include growing vegetative apices,male flowers,female flowers,female apical buds,male apical and lateral buds

图3 毛果杨 MIR171 基因家族成员表达情况

Fig.3 The expression patterns of the ptc-MIR171 gene family

2.6 靶基因分析

毛果杨 MIR171 基因家族成熟序列比对结果显示,14 个家族成员形成的 17 个成熟序列中(ptc-MIR171a、ptc-MIR171g、ptc-MIR171h 各有 2 条成熟序列),仅 6 个核苷酸位点在所有序列中完全一致(图 4)。 ptc-MIR171a-3p/b、ptc-MIR171c/d、ptc-MIR171l/m/n、ptc-MIR171e/f/g-3p/h-3p/i 的成熟序列完全一致,而 ptc-MIR171g-5p/h-5p 仅末端相差 1 个碱基, ptc-MIR171j/k 仅末端 2 个核苷酸位置颠倒。

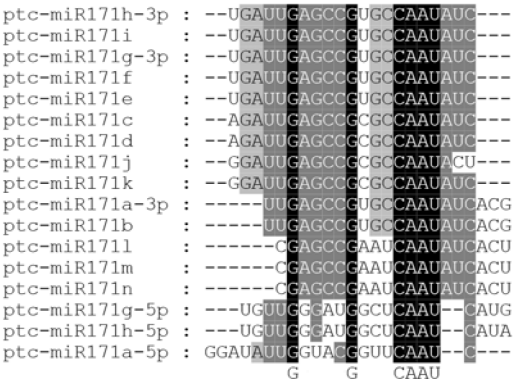


图4 毛果杨 MIR171 基因家族成熟序列比对

Fig.4 The alignment of ptc-miR171 mature sequences

由于毛果杨 MIR171 基因家族成熟序列存在差异,将导致其调控的靶基因可能也存在差异。采用 psRNATarget 对毛果杨 MIR171 基因家族的靶基因分析则验证了这一点(表 3)。毛果杨 MIR171 基因家族靶基因主要是转录因子和细胞信号转导蛋白。其中 GRAS 转录因子是毛果杨 MIR171 基因家族主要调控的靶基因。 ptc-miR171a-3p/b、ptc-miR171e/f/g-3p/h-3p/i、ptc-miR171j/k 的靶基因全部为 GRAS 转录因子,ptc-miR171c/d 的靶基因除了 1 个 MYB 转录因子,其余 6 个全部为 GRAS 转录因子。

GRAS 基因家族是一类植物特有的转录调控因子^[13]。已有报道表明该家族基因在植物生长发育和光信号转导过程中具有重要调控作用^[14-15]。也有证据表明 GRAS 基因家族参与了植物逆境胁迫的应答^[16-17]。目前 MIR171 对部分 GRAS 基因的剪切调控已经通过 RLM-5'RACE、降解组测序等方法在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[18]、胡杨 (*Populus euphratica*)^[19]、水稻 (*Oryza sativa* L. ssp. Indica)^[20] 中得到实验验证。

另外,ptc-miR171a-5p 的靶基因 Potri. 010G136100 与 GBOF-1(GenBank 登录号为 AAD56411. 1)相似度很高,而 GBOF-1 是郁金香 (*Tulipa gesneriana*) 中具有碱性螺旋-环-螺旋 DNA 结合结构域(bHLH,basic helix-loop-helix DNA-binding domain)能识别 G-box 元件的转录因子。另一个靶基因 Potri. 014G164000 则是参与植物光信号转导的蛋白质。不同家族成员调控的靶基因存在差异,说明毛果杨 MIR171 基因家族不同成员对生命活动的调控作用是多样的,即毛果杨 MIR171 基因家族在功能上已经分化。

3 讨论

研究表明植物 miRNA 基因可能起源于靶基因的反向重复^[21]或基因组中的随机序列^[22]; miRNA 基因主要通过全基因组重复、串联重复和染色体大片段重复实现基因家族的扩张^[7-8,23]。基因倍增模式分析表明,毛果杨 MIR171 基因家族在与杨柳科重复事件相近的时间内通过染色体大片段重复增加了 7 个成员,随后又通过 1 次串联重复增加了 1 个成员,之后维持稳定。这说明现存的杨柳科植物 MIR171 基因家族成员和规模可能是基本一致的。

表 3 毛果杨 MIR171 家族成员预测的靶基因

Table 3 The predicted targets of ptc-MIR171 gene family

miRNA	靶基因功能 Target functions	靶基因(得分) Target genes (score)
ptc-miR171a-5p	bHLH 家族转录因子	Potri. 010G136100(2.5)
	AP2 家族转录因子	Potri. 013G056700(3)
	NPH3 家族光信号转导蛋白	Potri. 014G164000(3)
ptc-miR171a-3p/b	GRAS 转录因子	Potri. 005G125800(1);Potri. 005G175300(1.5);Potri. 014G060200(1.5); Potri. 014G060500(1.5);Potri. 001G122800(1.5);Potri. 002G144200(1.5); Potri. 002G144700(1.5)
ptc-miR171c/d	GRAS 转录因子	Potri. 014G060200(1);Potri. 014G060500(1);Potri. 001G122800(1); Potri. 002G144200(1);Potri. 002G144700(1);Potri. 005G125800(3)
	MYB 转录因子	Potri. 001G118800(2.5)
ptc-miR171e/f/g-3p/h-3p/i	GRAS 转录因子	Potri. 014G060200(0.5);Potri. 014G060500(0.5);Potri. 001G122800(0.5); Potri. 002G144200(0.5);Potri. 002G144700(0.5);Potri. 005G125800(1); Potri. 007G029200(2)
ptc-miR171g-5p/h-5p	Na ⁺ 跨膜转运蛋白	Potri. 014G178000(3)
ptc-miR171g-5p	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	Potri. 005G134400(3)
ptc-miR171j/k	GRAS 转录因子	Potri. 014G060200(2);Potri. 014G060500(2);Potri. 001G122800(2); Potri. 002G144200(2);Potri. 002G144700(2)
ptc-miR171k	GRAS 转录因子	Potri. 005G125800(3)
	MYB 转录因子	Potri. 001G118800(3)
	信号转导,抗病蛋白	Potri. T077500(3);Potri. 019G069600(3)
ptc-miR171l/m/n	GRAS 转录因子	Potri. 005G175300(2)
	磷脂酰肌醇-4-磷酸-5-激酶	Potri. 008G128800(3)
	1-乙酰甘油-3-磷酸乙酰基转移酶	Potri. 006G055000(3)

植物 miRNA 基因经历着快速的产生与消亡^[24],保守的 miRNA 基因家族在进化过程中也是动态变化的^[25],而保留下的 miRNA 基因往往形成了重要的调控网络。表达分化是重复基因分化重要的一步,随着时间推移,重复基因间共同的调控元件逐步减少,表达谱特异性增加,最终出现去功能化(nonfunctionalization)、新功能化(neofunctionalization)、亚功能化(subfunctionalization)等不同的命运^[26]。本研究通过基于表达分析、启动子分析和靶基因分析表明,毛果杨 MIR171 基因家族在表达方式上和功能上已经出现了较大分化。基因芯片和高通量测序试验也表明 MIR171 基因家族各成员在干旱处理的胡杨(*P. euphratica*)叶片中的表达变化也是多样的^[27],这与本研究的分析结果一致。

ptc-miR171l/m/n 在多种组织(主要是花和分生组织)中具有较高的表达水平,可能发挥着重要的调控作用。在多个成员的启动子区发现多个光响应元件,说明 MIR171 基因对毛果杨光信号转导和光形态建成等具有调节作用。毛果杨 MIR171 基因

的靶基因主要是转录因子和信号转导蛋白,其中包括 7 个 GRAS 转录因子。GRAS 转录因子在植物生长发育和光信号转导过程中具有重要作用,还参与植物逆境胁迫应答。将靶基因分析结果与启动子分析结果结合分析,可以发现毛果杨 MIR171 基因的表达可能受光信号的调控,同时又进一步去调控其他光响应转录因子或光信号转导蛋白的表达,暗示毛果杨 MIR171 基因在植物光信号转导和光形态建成等过程中发挥着反馈调节等重要的调控作用。

综上所述,MIR171 基因家族在毛果杨中可能发挥着重要的调控作用,对其功能做进一步深入研究具有重要意义,其中 ptc-MIR171l/m/n 及其调控的 GRAS 转录因子尤其具有重要的研究价值。

参考文献

[1] Chen X M. Small RNAs and their roles in plant development[J]. Annu Rev Cell Dev Biol,2009,25:21-44

[2] 蔡蕊,未晓巍,武慧,等. 植物 microRNA 的生物信息学预测与分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(3):565-570

[3] Yang X H, Kalluri U C, DiFazio S P, et al. Poplar genomics: state of the science[J]. Crit Rev Plant Sci,2009,28(5):285-308

[4] Jansson S, Douglas C J. Populus: A model system for plant biolo-

gy[J]. Annu Rev Plant Biol,2007,58:435-458

[5] Tuskan G A,DiFazio S,Jansson S,et al. The genome of black cottonwood,*Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)[J]. Science,2006,313(5793):1596-1604

[6] Kozomara A,Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data[J]. Nucleic Acids Res,2011,39(S1):D152-D157

[7] Li A L,Mao L. Evolution of plant microRNA gene families[J]. Cell Res,2007,17(3):212-218

[8] Maher C,Stein L,Ware D. Evolution of Arabidopsis microRNA families through duplication events[J]. Genome Res,2006,16(4):510-519

[9] Zhang Z,Li J,Zhao X Q,et al. KaKs_Calculator: calculating Ka and Ks through model selection and model averaging[J]. Geno Prot Bioinfo,2006,4(4):259-263

[10] Koch M A,Haubold B,Mitchell-Olds T. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*,*Arabis*, and related genera (Brassicaceae)[J]. Mol Biol Evol,2000,17(10):1483-1498

[11] Cui X,Xu S M,Mu D S,et al. Genomic analysis of rice microRNA promoters and clusters[J]. Gene,2009,431(1-2):61-66

[12] Puzey J R,Karger A,Axtell M,et al. Deep annotation of *Populus trichocarpa* microRNAs from diverse tissue sets[J/OL]. PloS one,2012,7(3):e33034

[13] Pysh L D,Wysocka-Diller J W,Camilleri C,et al. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes[J]. Plant J,1999,18(1):111-119

[14] Torres-Galea P,Huang L F,Chua N H,et al. The GRAS protein SCL13 is a positive regulator of phytochrome-dependent red light signaling, but can also modulate phytochrome A responses[J]. Mol Genet Genomics,2006,276(1):13-30

[15] 赵永斌. 植物 GRAS 蛋白的结构与功能[J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版,2007(4):29-31

[16] 郭华军,焦远年,邸超,等. 拟南芥转录因子 GRAS 家族基因群响应渗透和干旱胁迫的初步探索[J]. 植物学报,2009,44(3):290-299

[17] Fode B,Siensen T,Thurrow C,et al. The *Arabidopsis* GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters[J]. Plant Cell,2008,20(11):3122-3135

[18] Llave C,Xie Z X,Kasschau K D,et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA[J]. Science,2002,297(5589):2053-2056

[19] Qin Y,Duan Z,Xia X,et al. Expression profiles of precursor and mature microRNAs under dehydration and high salinity shock in *Populus euphratica* [J]. Plant Cell Rep, 2011, 30 (10): 1893-1907

[20] Zhou M,Gu L,Li P,et al. Degradome sequencing reveals endogenous small RNA targets in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica)[J]. Front Biol,2010,5(1):67-90

[21] Allen E,Xie Z,Gustafson A M,et al. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*[J]. Nat Genet,2004,36(12):1282-1290

[22] Felippes F F,Schneeberger K,Dezulian T,et al. Evolution of *Arabidopsis thaliana* microRNAs from random sequences[J]. RNA,2008,14(12):2455-2459

[23] 魏强,梁永宏,李广林. 植物 miRNA 的进化[J]. 遗传,2013,25(3):315-323

[24] 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/OL]. PloS one,2007,2(2):e219

[25] Nozawa M,Miura S,Nei M. Origins and evolution of microRNA genes in plant species[J]. Genome Biol Evol,2012,4(3):230-239

[26] 孙红正,葛颂. 重复基因的进化——回顾与进展[J]. 植物学报,2010,45(1):13-22

[27] Li B,Qin Y,Duan H,et al. Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica* [J]. J Exp Bot,2011,62(11):3765-3779