



microRNA 在玉米生长发育及非生物胁迫响应中的调控功能*

潘锦康¹⁾ 李晶^{1)**} 刘琳^{1,2)**}

¹⁾ 深圳大学生命与海洋科学学院, 广东省植物表观遗传学重点实验室, 深圳 518060;

²⁾ 深圳大学龙华生物产业创新研究院, 深圳 518060)

摘要 microRNA (miRNA) 是一类广泛存在于真核生物中长度为 20~24 nt 的内源非编码小 RNA, 它们通过对靶基因 mRNA 进行切割或翻译抑制, 在转录后水平调控靶基因的表达。近期研究表明, miRNA 参与植物生长发育与逆境胁迫响应的多个重要生物学过程, 对作物的农艺性状也起到重要的调控作用。玉米作为重要的粮食、饲料和工业原料, 提高其产量和品质对于保障世界粮食安全至关重要, 然而与模式植物拟南芥和水稻相比, 玉米中 miRNA 的研究仍然相对较少, 理解 miRNA 在玉米中的功能和调控机理有助于通过分子育种对关键农艺性状进行遗传改良。本文综述了玉米中 miRNA 的发现与鉴定, 系统总结了参与玉米 miRNA 代谢途径的关键蛋白 DCL、AGO 和 HEN1 的研究进展, 重点阐述了在玉米生长发育和非生物胁迫响应过程中已开展功能研究 miRNA 的调控作用, 并对玉米 miRNA 研究当前存在的问题和未来的发展趋势进行了讨论。

关键词 microRNA, 玉米, 农艺性状, 生长发育, 非生物胁迫

中图分类号 Q94, Q944, Q945

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0092

microRNA (miRNA) 是一类长度为 20~24 nt 的内源非编码小 RNA, 它们在真核生物的转录后调控过程中发挥着重要的作用^[1]。植物中, miRNA 由 MIR 基因编码, 经 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, Pol II) 转录产生包含不完全配对茎环结构、长的单链初级转录本 primary-miRNA (pri-miRNA)。pri-miRNA 具有 5'端 7-甲基鸟苷帽子 (m⁷G-cap) 和 3'端多聚腺苷酸尾 (polyA tail), 经 Dicer-like 1 (DCL1) 核酸内切酶切割产生带有茎环结构的前体 precursor-miRNA (pre-miRNA)。DCL1 在 HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1)、SERRATE (SE) 等因子的辅助作用下进行精确切割, 产生 miRNA/miRNA* 双链二聚体, 随后该双链二聚体的 3'端被 HUA ENHANCER1 (HEN1) 甲基化从而保护其不被尿苷化而降解。成熟 miRNA 链进一步被加载到包含 ARGONAUTE (AGO) 蛋白的 RNA 诱导沉默复合体 (RNA induced silencing complex, RISC), 通过与靶基因 mRNA 序列发生互补配对进行剪切或者翻译抑制, 从而在转录后水平调控靶基因的表达 (图 1)^[1]。植物 miRNA 的靶

基因包含大量调节多种生物学过程的转录因子, 通过对靶基因的调控, miRNA 广泛参与植物生长发育和逆境胁迫响应等多个重要生物学过程, 包括顶端分生组织的形成、叶片极性的建立、开花时间调控、侧根的发育, 以及干旱、高盐、高温等逆境胁迫响应^[2-5]。多项研究表明, miRNA 在重要作物的性状改良方面也发挥着重要功能, 可以作为有效的基因资源精确调控作物多方面的农艺性状, 对作物性状改良和分子育种具有重要价值^[6-7]。

玉米不仅是重要的粮食作物, 也是主要的饲料和工业原料, 在国民经济生活中占据重要地位。近年来, 中国玉米总消费量持续上涨, 提高玉米的产

* 广东省自然科学基金 (2019A1515011222, 2019A1515110162, 2021A1515010482), 广东省创新团队项目 (2014ZT05S078) 和深圳市自然科学基金 (JCYJ20190808112207542, JCYJ20190808141815083) 资助。

** 通讯联系人。

刘琳 Tel: 0755-26558081, E-mail: linliu@szu.edu.cn

李晶 Tel: 0755-26558081, E-mail: lijing8311@szu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-15, 接受日期: 2022-06-06

量和品质对于保证国家玉米产业的稳定发展、满足国内日益增长的消费需求具有重要意义。miRNA在玉米的生长发育和逆境胁迫响应中具有重要的调控作用,理解miRNA的分子作用机制及下游调控网络将为玉米关键农艺性状的遗传改良提供理论依

据。本文综述了近年来关于玉米miRNA的鉴定、miRNA生物发生途径的核心组分以及miRNA在玉米生长发育和非生物胁迫响应方面的研究进展,并讨论了玉米miRNA研究领域当前存在的主要问题和未来发展趋势。

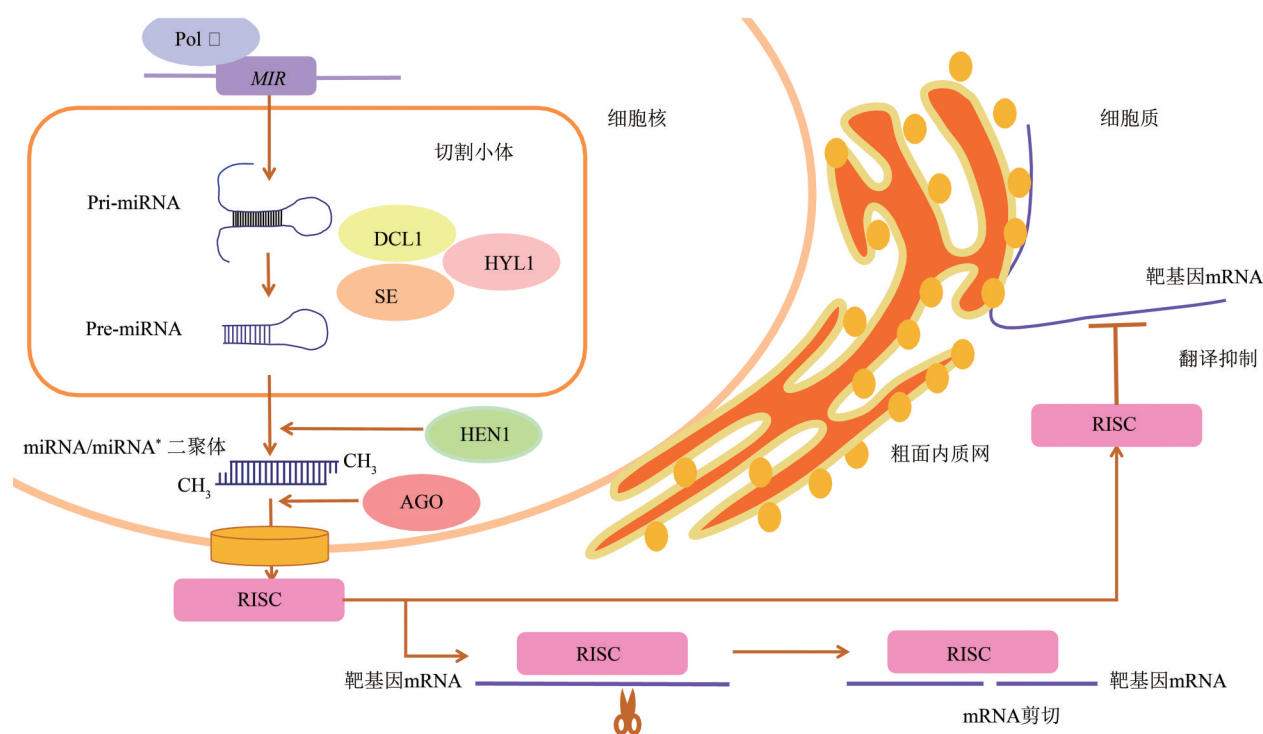


Fig. 1 Biogenesis and mode of action of miRNA

图1 miRNA的生物发生及作用方式

MIR基因由RNA聚合酶II (RNA polymerase II, Pol II) 转录成初级转录本 (primary-miRNA, pri-miRNA), 经切割小体 (Dicing-body, 包含DCL1、HYL1、SE核心组分) 加工成具有茎环结构的precursor-miRNA (pre-miRNA), 并进一步加工产生miRNA/miRNA*双链, 双链经HEN1作用发生甲基化。成熟的miRNA与AGO蛋白结合, 加载到RNA诱导的沉默复合体 (RISC) 上, 通过与靶基因mRNA序列发生互补配对, 在细胞质或内质网上发挥转录切割或翻译抑制的功能, 从而在转录后水平调控靶基因的表达。

1 玉米miRNA的发现与鉴定

自首次 in 模式植物拟南芥中发现 miRNA 以来^[8-9], 新的 miRNA 在其他植物物种中陆续得到鉴定, 如水稻、大豆、小麦等^[10-13]。玉米中首先鉴定的 miRNA 为 miR166 和 miR172, 通过功能研究发现它们分别在调控叶片极性和营养生长的时相转换中发挥关键作用^[14-15]。早期大规模玉米 miRNA 的鉴定主要是通过和已知 miRNA 进行序列和结构比对, 从而对物种间保守的 miRNA 进行预测^[15-16]。随着高通量测序技术的发展, 对 miRNA 的鉴定逐

渐转变为利用建立小 RNA 文库结合高通量测序分析的方法, 从而更为系统和有效地获得真实表达的 miRNA, 同时也能鉴定在玉米中特异表达的非保守 miRNA^[17]。玉米中 MIR 基因的分布模式与一般的蛋白质编码基因类似, 广泛存在于多条染色体上, 其中一部分 MIR 同源基因具有成簇存在的现象^[17]。与其他植物物种一致, 大部分玉米 MIR 基因存在于基因间区域^[17]。利用玉米不同发育时期的特定组织, 通过构建小 RNA 文库进行高通量测序分析, 发现大量组织、时空特异性表达的 miRNA, 如在玉米叶与根^[18]、茎^[19]、雌穗^[20]和

籽粒^[15, 21]中特异表达的miRNA。此外,通过对玉米进行不同的逆境胁迫处理,鉴定出一系列参与特定胁迫过程的miRNA,包括干旱胁迫^[22-23]、盐胁迫^[24]、高温胁迫^[25]、冷胁迫^[26]、营养胁迫^[27]和生物胁迫等^[28-29]。上述研究鉴定获得的大量miRNA,丰富和完善了玉米的miRNA数据库。目前,根据miRBase的注释,在玉米基因组中共鉴定到来自174个前体的325个成熟miRNA,分属于29个miRNA家族^[30-31]。

2 玉米中miRNA生物发生途径的核心组分

2.1 DCL核酸内切酶

Dicer蛋白是一个RNase III类核酸内切酶,负责将长的双链RNA切割成带有3'端2 nt突出和5'单磷酸的双链小RNA。动物的Dicer蛋白和植物的DCL蛋白具有保守的DExD框(DExD-box)、解旋酶C(helicase-C)、DUF283、PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE(PAZ)、RNase III和双链RNA结合(dsRBD)结构域^[32]。玉米具有5个DCL家族成员,分别为ZmDCL1、ZmDCL2、ZmDCL3a、ZmDCL3b和ZmDCL4^[33]。这些DCL基因分别存在于1、3、5、10号染色体(图2,表1),其编码蛋白质分属DCL1、DCL2、DCL3、DCL4家族,

其中ZmDCL3a和ZmDCL3b同属于DCL3家族(图3a)。对多个玉米DCL家族成员突变体的研究表明,DCL蛋白对于植株的生长发育具有重要功能^[34-36]。其中DCL1在miRNA的生物发生过程中发挥调控作用。*fuzzy tassel (fzt)*是玉米*ZmDCL1*基因的突变体,*fzt*表现出多方面的发育缺陷,包括植株矮化、叶片形态和极性改变、幼年期向成年期转变推迟、雌雄花序发育缺陷、性别决定改变等^[34]。*fzt*突变体中大部分miRNA表达水平降低,这与DCL1影响miRNA加工的功能是相关的^[34, 37]。玉米中另一个研究较为清楚的DCL成员是ZmDCL4。玉米*dcl4*突变体的叶片极性发生改变,其极性改变程度随玉米自交系背景的不同而有差异^[36]。玉米不同DCL之间功能可能发生替代,在*dcl4*缺失突变体中,DCL2/3能够代替DCL4切割*TAS3*产生22 nt *tasiR-ARF*,发挥调控生长发育和抗病的作用^[36]。DCL3b是单子叶植物特异的DCL,负责产生24 nt相位小干扰RNA(phased small-interfering RNA, phasiRNA),主要在减数分裂的花药中表达。玉米*dcl3b*突变体中几乎没有24 nt phasiRNA产生,表现出花药短、绒毡层细胞缺陷和温度敏感的雄性不育表型,这些结果说明DCL3b对玉米雄穗的发育至关重要^[35]。

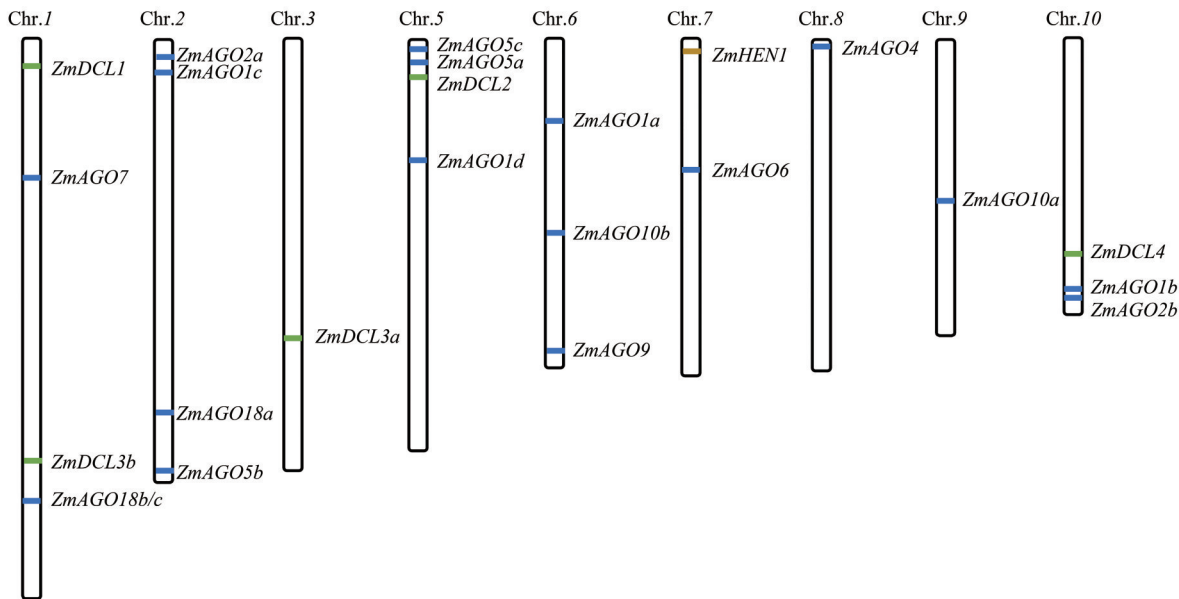


Fig. 2 Distribution of maize DCL, AGO and HEN1 gene family members on chromosomes
图2 玉米DCL、AGO、HEN1基因家族成员在染色体上的分布

Table 1 Location of maize *DCL*, *AGO* and *HEN1* gene family members on chromosomes表1 玉米*AGO*、*DCL*、*HEN1*基因在染色体上的位置

基因名称	基因检索号	基因位置
<i>ZmAGO1a</i>	GRMZM2G441583	Chr 6: 44780803-44789355
<i>ZmAGO1b</i>	AC209206.3_FG011	Chr 10: 138699397-138708217
<i>ZmAGO1c</i>	GRMZM2G039455	Chr 2: 18176301-18185185
<i>ZmAGO1d</i>	GRMZM2G361518	Chr 5: 66763342-66769045
<i>ZmAGO2a</i>	GRMZM2G007791	Chr 2: 10157520-10164911
<i>ZmAGO2b</i>	GRMZM2G354867	Chr 10: 143197942-143203163
<i>ZmAGO4</i>	GRMZM2G589579	Chr 8: 2667303-2674772
<i>ZmAGO5a</i>	GRMZM2G461936	Chr 5: 13953891-13960814
<i>ZmAGO5b</i>	GRMZM2G059033	Chr 2: 239622069-239628992
<i>ZmAGO5c</i>	GRMZM2G123063	Chr 5: 4109487-4117972
<i>ZmAGO6</i>	GRMZM2G347402	Chr 7: 74375269-74402681
<i>ZmAGO7</i>	GRMZM5G892991	Chr 1: 76277152-76282210
<i>ZmAGO9</i>	GRMZM2G141818	Chr 6: 172672133-172683962
<i>ZmAGO10a</i>	AC189879.3_FG003	Chr 9: 89734202-89740800
<i>ZmAGO10b</i>	GRMZM2G079080	Chr 6: 106360618-106367670
<i>ZmAGO18a</i>	GRMZM2G105250	Chr 2: 205398373-205404779
<i>ZmAGO18b/c</i>	GRMZM2G457370	Chr 1: 254172779-254178271
<i>ZmDCL1</i>	GRMZM2G040762_P01	Chr 1: 4724456-4736832
<i>ZmDCL2</i>	GRMZM2G301405_P01	Chr 5: 20375070-20392119
<i>ZmDCL3a</i>	GRMZM5G814985_P01	Chr 3: 167033044-167043664
<i>ZmDCL3b</i>	GRMZM2G413853_P01	Chr 1: 233262795-233282063
<i>ZmDCL4</i>	GRMZM2G160473_P01	Chr 10: 131181940-131237004
<i>ZmHEN1</i>	LOC103631972	Chr 7: 7668569-7673701

2.2 AGO蛋白

miRNA 通过与 AGO 蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合体，在转录后水平发挥基因沉默功能。AGO 蛋白通常包含一个可变的 N 端序列和保守的 PAZ 结构域、MID 结构域和 PIWI 结构域。不同的结构域负责执行不同的功能，MID 结构域负责与 miRNA 的 5' 端磷酸基团结合，PAZ 结构域则与 miRNA 3' 端结合，PIWI 结构域具有切割与 miRNA 结合的靶基因 mRNA 的作用，并通常具有 DDH（天冬氨酸-天冬氨酸-组氨酸）基序^[38]。玉米中共存在 17 个 AGO 基因，负责编码 18 个 AGO 蛋白，其中 ZmAGO18b 和 ZmAGO18c 由同一个基因的不同转录本编码产生。这些 AGO 蛋白分属于 3 个主要进化枝，分别为 AGO1/5/10、AGO2/3/7 和 AGO4/6/8/9，其中 AGO1/5/10 分枝包含草种特有的一个亚类 AGO18^[39-40]。玉米 AGO 蛋白家族在 AGO1/5/10 分支中有 12 个成员，在 AGO2/3/7 分支中有 3 个成员，在 AGO4/6/8/9 分支中有 3 个成员

（图 3b）。AGO 分布在除 3 号、4 号染色体外的多条染色体上，其中 2 号染色体分布最多，包含 4 个 AGO 基因（图 2，表 1）。AGO 蛋白作为 RNA 诱导沉默复合体的关键组分，在植物的生长发育过程中发挥重要作用。玉米 AGO1 主要在未成熟雌穗中大量表达，其中表达量最高的是 ZmAGO1a，研究表明 ZmAGO1a 参与雌穗分生组织的发育过程^[39]。玉米 ZmAGO18 b 在雄穗的花序分生组织和腋生分生组织中高度表达，通过免疫沉淀结合高通量测序，发现 ZmAGO18b 偏好于结合 5' 端为腺嘌呤的 24 nt phasiRNA 以及 5' 端为尿嘧啶的 21 nt phasiRNA/miRNA，并表现出对 miR166 较强的结合偏好性。抑制 ZmAGO18b 的表达导致 miR166 的靶基因 *HD-ZIP III* 转录因子大量积累，引起玉米小穗数目增加，表明 ZmAGO18b 通过调控 miR166-*HD-ZIP III* 途径参与花序和腋生分生组织的发育过程^[39, 41-43]。AGO5c 在玉米花药发育早期大量表达，研究发现水稻中与玉米 AGO5c 同源性最高的

Argonaute MEL1可以通过与21 nt phasiRNA结合,参与调控水稻生殖细胞的减数分裂过程^[44],玉米AGO5c可能也具有类似的功能,在减数分裂前期通过结合 phasiRNA 调控玉米花粉的发育^[43]。玉米 *ZmRGD2* 编码一个 AGO7-like 蛋白, miR390 能够与其结合来影响 *tasiR-ARF* 的产生,进而调控生长素信号通路中靶基因 *ARF3a* 转录本的降解,引起 *rgd2* 突变体叶片的极性发生改变^[45]。玉米中存在的多个 AGO 家族成员可能具有不同的分工,通过结合不同的小 RNA 发挥特异的调控作用,有关其他 AGO 家族成员的具体功能仍需进一步探讨。

2.3 HEN1甲基转移酶

与 DCL 和 AGO 相比, HEN1 在玉米中的功能研究较少。HEN1 蛋白最初是作为一个花发育相关的基因被筛选出来,它在拟南芥雄蕊和心皮的发育过程中发挥着重要的功能^[46]。随后的研究发现,

HEN1 是一类高度保守的甲基转移酶,具有 5 个结构域,分别为 PLD、dsRBD1、dsRBD2、LCD、La 结构域,该酶负责将甲基基团转移到位于 miRNA 和 siRNA 3'端核苷酸的 2'-OH 位点^[47-48]。晶体结构分析表明, HEN1 以单体的形式与底物小 RNA 发生特异性结合^[49]。甲基化可以增强小 RNA 的稳定性, *hen1* 突变体中 miRNA 3'端的尿苷化修饰程度增加从而促进 miRNA 进一步发生降解^[47-48]。水稻 *WAVY LEAF1* (*WAF1*) 是拟南芥 *HEN1* 的同源基因, *WAF1* 参与 miRNA 和 ta-siRNA 的 3'端甲基化过程, *waf1* 突变体中 miRNA 与 ta-siRNA 的表达量下降,突变体呈现出叶片卷曲、植株矮小等表型^[50]。与拟南芥 *hen1* 突变体相比,幼苗致死与根系发育异常的表型是水稻 *waf1* 突变体所特有的。玉米中仅存在一个 *HEN1* 基因,位于 7 号染色体上(图 2, 表 1)。与拟南芥和水稻类似, *HEN1* 的缺失

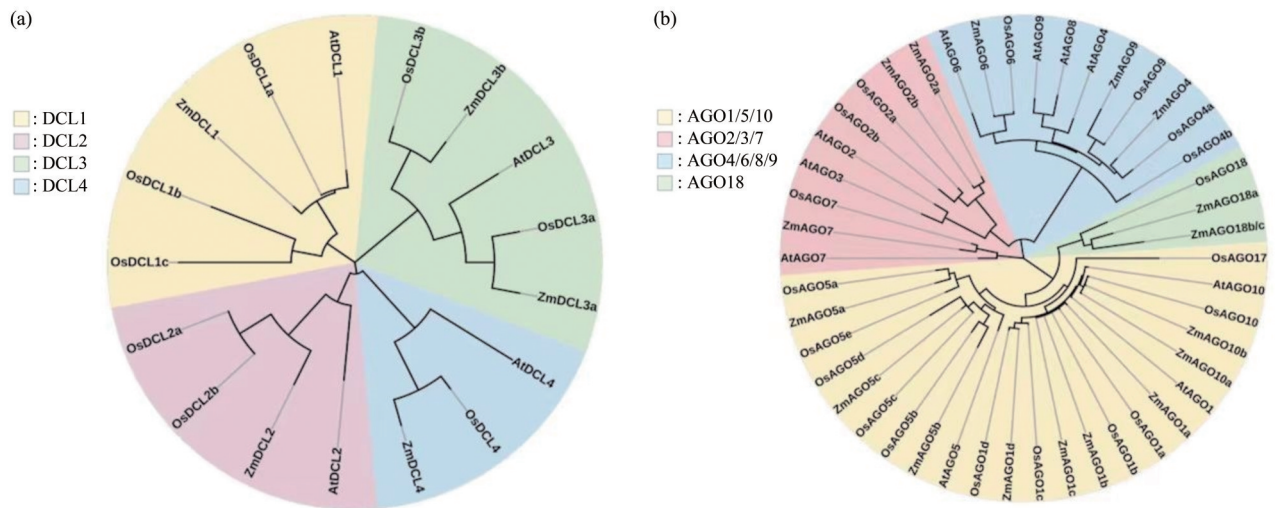


Fig. 3 Phylogenetic analyses of DCL and AGO family members

图3 DCL、AGO家族成员的系统进化分析

使用MEGA7的默认参数构建最大似然(maximum likelihood)进化树, bootstraps值设为1 000。玉米、水稻、拟南芥的DCL、AGO蛋白序列来源于NCBI数据库。(a) DCL蛋白的系统进化关系, 蛋白质检索号如下: AtDCL1 (F4HQG6)、AtDCL2 (Q3EBC8-1)、AtDCL3 (Q9LXW7-1)、AtDCL4 (P84634-1)、OsDCL1a (Q8LMR2.1)、OsDCL1b (XP_015641965.1)、OsDCL1c (Q6ATG6.2)、OsDCL2a (NP_001389112.1)、OsDCL2b (XP_015611517.1)、OsDCL3a (XP_015621462.1)、OsDCL3b (Q7XD96.2)、OsDCL4 (NP_001389326.1)、ZmDCL1 (DAA43005)、ZmDCL2 (AFW68290)、ZmDCL3a (DAA56229)、ZmDCL3b (DAA49563)、ZmDCL4 (AFW58817); (b) AGO蛋白的系统进化关系, 蛋白质检索号如下: AtAGO1 (O04379-2)、AtAGO2 (Q9SHF3)、AtAGO3 (Q9SHF2)、AtAGO4 (Q9ZVD5)、AtAGO5 (Q9SJK3)、AtAGO6 (O48771)、AtAGO7 (Q9C793)、AtAGO8 (A0A1P8BDI0)、AtAGO9 (Q84VQ0)、AtAGO10 (Q9XGW1)、OsAGO1a (XP_015626096.1)、OsAGO1b (NP_001391827.1)、OsAGO1c (XP_015626468.1)、OsAGO1d (NP_001389896.1)、OsAGO2a (XP_015636011.1)、OsAGO2b (Q7XTS3.2)、OsAGO4a (XP_015621073.1)、OsAGO4b (XP_015636673.1)、OsAGO5a (Q10F39.2)、OsAGO5b (XP_015645442.1)、OsAGO5c (XP_015629235.1)、OsAGO5d (Q852N2.1)、OsAGO5e (Q7Y001.2)、OsAGO6 (Q6YSJ5.2)、OsAGO7 (XP_015629412.1)、OsAGO9 (XP_015636673.1)、OsAGO10 (XP_025882034.1)、OsAGO17 (XP_015624008.1)、OsAGO18 (XP_015644916.2)、ZmAGO1a (AFW75071)、ZmAGO1b (AQK45505.1)、ZmAGO1c (DAA36422)、ZmAGO1d (AFW69616)、ZmAGO2a (DAA36016)、ZmAGO2b (AFW59452)、ZmAGO4 (AFW79548)、ZmAGO5a (AFW67977)、ZmAGO5b (DAA42502)、ZmAGO5c (AFW67327)、ZmAGO6 (DAA60814)、ZmAGO7 (DAA45871)、ZmAGO9 (AFW79427)、ZmAGO10a (AQL04260)、ZmAGO10b (AFW76442)、ZmAGO18a (DAA40786)、ZmAGO18b/c (DAA50279)。

也导致玉米体内 miRNA 的尿苷化程度增加进而发生降解, 突变体植株呈现严重的发育缺陷, 不能形成正常的顶端分生组织, 表明 HEN1 具有功能保守性, 在植物的生长发育中发挥重要作用^[51]。

综上所述, 玉米中 miRNA 生物发生途径的核心组分 DCL 核酸内切酶、AGO 蛋白和 HEN1 甲基转移酶的突变均导致玉米体内 miRNA 不能正常合成或发挥功能, 从而使得植株发生严重的表型缺陷, 表明 miRNA 作为关键的调控因子广泛参与玉米生长发育的多个重要生物学过程。

3 miRNA在玉米生长发育中的功能

miRNA 处于植物基因表达调控网络的上游核心位置, 通过对靶基因的表达调控, 在植物生长发育的多个方面起到重要的调控作用, 如调节细胞分化、极性建成、时相转换等^[52]。在模式植物拟南芥和水稻中, 已有大量关于 miRNA 参与生长发育调控的相关报道^[53-54]。然而目前玉米中 miRNA 的功能研究仍然相对较少, 亟待进一步深入探讨。在已发现参与调控玉米生长发育的 miRNA 中, 其中一部分具有高度保守性, 在不同的植物物种间具有类似的表达模式和功能, 同时还存在一些玉米特异的 miRNA 在生长发育中也发挥着重要的作用。对于这些 miRNA 及其下游靶基因调控网络和分子作用机制的认识将有助于加深对玉米生长发育调控过程的理解。

3.1 调控玉米根部发育的miRNA

植物侧根具有吸收及运输水分、养分以及稳固植物的功能, 侧根形态发育对于植物适应环境变化很关键^[55]。研究发现, miR164 通过调控靶基因 *ZmNAC1* 影响玉米的侧根发育^[56]。NAC 是一类植物特异的转录因子, 玉米中 *ZmNAC1* 的累积促进侧根的生长。玉米和拟南芥的 *NAC1* 基因都能够被 miR164 靶向, 表明 miR164 调控侧根发育的功能在物种间具有一定的保守性^[56-57]。

拟南芥中, miR165/166-*HD-ZIP III* 模块负责调控根的生长^[58], 该调控模块同样保守存在于玉米中。玉米 miR165/166 靶向 *HD-ZIP III* 家族成员 *ROLLED (RLD)*。RLD1 的功能获得性突变体 *Rld1-O* 中由于 miR165/166 识别位点的突变, 使 *RLD1* 不能被 miR165/166 识别和切割, 进而表达水平升高, 导致突变体的根部发生多方面的形态变化, 包括主根变短、根部直径减小、次生木质部和外皮层细胞数目减少等, 表明玉米中 miR165/166-*RLD1* 通路在

调控根生长中的重要性^[59]。

3.2 调控玉米叶片发育的miRNA

miRNA 在玉米叶片中的分布具有空间特异性, miR160、miR166、miR168 等主要在叶片的分生区表达, miR167、miR396 等在成熟区表达, 而 miR156、miR399 等在伸长区表达量较高^[60], 表明叶片的生长发育过程涉及多种 miRNA 的参与, 这些 miRNA 和靶基因构成复杂的调控网络, 共同参与叶片形成的过程。

玉米 miR166 与 miR390 共同参与调控叶片的极性建成。miR390 能够靶向 *TAS3* 基因从而产生 *tasiR-ARF*, 这一通路在植物中是高度保守的^[61]。*tasiR-ARF* 主要调控植物顶端分生组织的发育过程, miR390 通过调控 ta-siRNA 的生成影响叶片发育, 在玉米中 miR166 的表达受到 *tasiR-ARF* 的调控, 在叶片中呈梯度分布, 从而维持叶片极性^[45], 利用串联短片段靶标模拟 (short tandem target mimic, STTM) 技术降低玉米 miR166 的表达会导致植株叶片发生卷曲^[62]。miR166 在玉米叶片背腹面的浓度梯度限定了其靶基因 *RLD1* 的空间分布, 功能获得性突变体 *Rld1-O* 不仅表现出根部发育的缺陷, 同时叶片极性也发生改变^[14]。*rgd2 (ago7)* 和 *lbi (sgs3)* 为玉米叶片横向扩展出现问题的突变体, 这两个突变体中 miR166 的分布都发生了改变, 表明 miR166 不仅调控玉米叶片的背腹极性, 同时还参与调控叶片由中心向两侧的极性建成^[45]。

miR156 和 miR172 参与调控玉米幼叶向成熟叶的转变。玉米 *Corngrass1 (Cg1)* 显性突变体中 miR156 过量表达, 植株叶片表现出细胞层数变少、细胞变小、叶片变窄、同时叶片数量增多的表型^[63]。miR172 也是物种间保守的 miRNA, 利用 STTM 技术降低玉米 miR172 的表达使叶片幼年期向成年期的转变时期延长^[62]。miR172 的靶基因为保守的 *AP2* 类转录因子。*glossy15 (gl15)* 是一个玉米 *AP2* 类基因, 提高 *gl15* 的表达水平可以显著增加玉米幼叶的数目, miR172 通过下调 *gl15* 的表达促进幼叶向成熟叶的过渡^[15]。miR156 可以抑制 miR172 的表达, 在 *Cg1* 突变体中, miR156 的过量表达导致 miR172 的丰度降低, 进而引起 *gl15* 表达水平的升高, 说明调控玉米幼叶向成熟叶的转变过程受到 miR156 和 miR172 的精确调控^[63]。

3.3 调控玉米生殖发育的miRNA

玉米具有两种不同的花序: 雄性花序和雌性花序。花序大小和分枝数对产量高低具有决定作用,

雄穗的分枝数控制花粉的量和授粉时长, 而雌穗行数直接影响籽粒的产量, 因此均为重要的农艺性状。玉米的雄性花序和雌性花序几乎同时从顶端分生组织产生, 末梢的分生组织发育成雄穗, 叶腋的一个或多个分生组织发育成雌穗^[64]。已报道多个miRNA参与玉米花序形成和发育的过程^[43, 63, 65]。*fuzz tassels (fzt)* 是玉米*dcl1*突变体, *DCL1*表达量的下降导致miRNA合成受到抑制, 表现出绒毡层退化、花药壁发育缺陷、花粉发育异常等表型, 进一步表明miRNA对玉米花序发育调控的关键作用^[37]。

由于miRNA可以同时靶向多个基因, 同一miRNA可能具有多种生物学功能。*Cgl*突变体中miR156的过量表达不仅影响叶片发育, 也同时影响雄穗和雌穗分化, 由于顶端分生组织缺陷, 雄穗成簇出现, 不能形成正常的小穗对, 雌穗变小且籽粒排列不整齐, 同时雄穗和雌穗外围产生大片苞叶^[63]。玉米中miR156的靶基因之一是*Teosinte Glume Architecture1 (TGA1)*, *Cgl*突变体中*TGA1*表达水平显著降低, *TGA1*是大刍草向栽培玉米进化的主效QTL, 对大刍草和玉米颖片的形态差异有主要贡献^[63]。除*TGA1*外, miR156还通过靶向*TASSEL SHEATH4 (TSH4)*调节穗分枝^[66]。*tsh4*突变体雄穗分枝显著减少, 雌穗种子排列混乱^[66]。miR156的另外两个靶基因SBP-box转录因子*UNBRANCHED2 (UB2)*和*UB3*也参与调控雌穗和雄穗的发育, *ub2 ub3*双突变体的雄穗分枝减少而雌穗行数增多。*tsh4*突变体中, *ub2*和*ub3*的表达水平上调。*tsh4 ub2 ub3*三重突变体的表型类似于miR156过表达的*Cgl*突变体, 表明miR156通过调节这些下游靶基因在调控穗分枝方面发挥重要作用^[67]。

miR172不仅参与调控玉米幼叶向成熟叶的转变, 同时也在玉米的性别决定中发挥作用。*tassel seed4 (ts4)*是玉米miR172e的突变体, *ts4*的突变导致花序远端发生过度分枝, 同时雄穗发生雌性化, 由于雌蕊不能正常凋亡, 使得雄穗部位产生雌性花丝, 引起育性显著下降^[65]。玉米miR172e的靶基因是*indeterminate spikelet1 (ids1)*, 该基因编码一个AP2类转录因子, *ids1*基因在miR172e切割位点发生的点突变导致植株产生类似于*ts4*突变体的表型, 该突变体中由于*ids1*转录本不能被miR172e靶向剪切从而表达水平升高, 进一步证明miR172e通过对*ids1*进行转录后调控影响玉米的雌

雄穗分化^[65]。

phasiRNA是一类内源性的、起调控作用的非编码小RNA, 根据长度主要分为两个类群, 分别为21 nt和24 nt的phasiRNA。21 nt phasiRNA主要由miR2118通过触发*PHAS*前体切割产生, 24 nt phasiRNA由miR2275触发相应的*PHAS*前体切割形成^[68-69]。在玉米花粉细胞中发现大量21 nt和24 nt phasiRNA的存在, 它们的表达具有时空特异性, 对雄性育性起到重要的调控作用。21 nt phasiRNA主要在处于减数分裂前的细胞增殖分化期大量产生并迅速消失, 而24 nt phasiRNA在减数分裂期大量富集并持续表达至花粉成熟; miR2118特异表达于表皮层细胞, 但其诱导产生的21 nt phasiRNA在花粉细胞中均匀分布, 而miR2275及其所诱导产生的24 nt phasiRNA特异存在于花药绒毡层和减数分裂的细胞^[43]。玉米*ocl4 (outer cell layer 4)*、*mac1 (multiple archesporial cells 1)*、*ms23 (male sterile 23)*和*mscal (male sterile converted anther 1)*等多个雄性不育突变体中均发现21 nt或24 nt phasiRNA的缺失, 进一步表明phasiRNA对于雄性生殖发育的重要性^[43, 70]。然而phasiRNA在玉米花粉细胞中的具体分子调控机制目前还不清楚, 仍然需要进一步深入探讨。

3.4 调控玉米籽粒发育的miRNA

玉米籽粒的发育和养分积累大约需要35 d, 授粉后10~15 d是玉米种子发育的关键过渡阶段。授粉15 d之前, 胚的发育主要集中在组织和器官的形成, 而授粉10 d之后, 籽粒才开始营养的累积^[71]。miRNA在玉米籽粒的不同发育阶段具有时空表达特异性, 通过对玉米处于不同发育时期的籽粒进行小RNA测序及降解组分析, 目前已鉴定获得一系列可能参与调控籽粒发育的miRNA及其潜在的靶基因^[21, 71-75]。其中已经有功能研究支持的包括miR164和miR166^[76-77]。在玉米籽粒发育过程中, miR164随着籽粒的成熟呈现下调的趋势, miR164过量表达植株的籽粒长度与宽度显著降低, 同时胚乳体积减小, miR164主要通过靶向转录因子*NAC32*和*NAC40*影响膨脹素基因*EXPB14*和*EXPB15*的表达, 从而调控细胞壁的延展性影响籽粒发育^[76]。利用STTM技术抑制miR166的表达使得玉米籽粒变小、百粒重降低, 但miR166下调同时引起玉米发生多方面表型变化, 籽粒性状的改变可能是由于miR166下降引起植株发育时相转换延缓产生的次级影响^[77]。

4 miRNA在玉米非生物胁迫响应中的功能

植物在自然条件下生长的过程中,不可避免的会受到逆境胁迫的影响,包括盐胁迫、干旱胁迫、温度胁迫、营养胁迫等。miRNA不仅参与调控植物的生长发育,在植物抵抗逆境胁迫的过程中也发挥着重要的功能。目前通过高通量测序的方法,在玉米中已鉴定到大量参与多种非生物胁迫响应的miRNA,其中对于部分miRNA也通过功能研究进一步证实了它们在非生物胁迫耐受中发挥的作用。

4.1 盐胁迫响应相关miRNA

盐胁迫是限制植物生长和发育最广泛和严重的非生物胁迫之一,对植物产量和品质具有显著的负面影响^[78]。盐胁迫下,植物根系最先感受胁迫信号,继而影响地上部分生长和产生响应。miR169及其靶基因核因子Y的A亚基(*NUCLEAR FACTOR-Y subunit A*, *NF-YA*)能够响应盐胁迫而发生表达水平的改变,在玉米的盐胁迫适应过程中发挥调控作用^[79-80]。研究发现,过量表达miR169引起转基因植株耐盐性下降,而抑制miR169的表达量则使植株的耐盐性增强^[80]。盐胁迫条件下,miR169表达水平下降,造成靶基因核因子Y的A8亚基(*NUCLEAR FACTOR-Y subunit A8*, *NF-YA8*)表达上升,从而使得下游抗氧化酶Peroxidase 1发生累积,这有利于玉米在盐胁迫环境下对产生的活性氧物质进行清除^[80]。此外,Fu等^[24]通过对盐胁迫处理下玉米根部和小RNA文库和降解组文库分别进行深度测序,鉴定出1 040个已知的miRNA、37个新的miRNA以及其相应的靶基因,其中314个miRNA是叶片特异的,278个miRNA是根系特异的,这些miRNA可能通过调控靶基因在盐胁迫响应过程中发挥功能。利用盐敏感(Huangzao4)和耐盐玉米自交系(NC28c),也发现一系列差异表达的miRNA,这些差异表达的miRNA可能在介导玉米不同自交系的盐胁迫适应过程中发挥关键作用^[81]。深入分析这些盐胁迫下发生差异表达的miRNA的功能将有助于理解玉米应对盐胁迫的分子调控机制。

4.2 干旱胁迫响应相关miRNA

干旱已成为影响全球作物生产最严重的非生物胁迫之一,miRNA作为转录后调控的重要调控因子,在植物的干旱胁迫适应中起着至关重要的作用。Seeve等^[82]通过对玉米进行不同程度的缺水胁迫处理,以根系为材料建立小RNA和降解组文

库,利用高通量测序鉴定获得在干旱胁迫下发生差异表达的79个miRNA及其所调控的靶基因转录本。此外,利用天然存在的玉米耐旱自交系和干旱敏感自交系,进一步揭示出一系列在玉米不同组织中差异表达的miRNA,这些miRNA对于玉米自交系中不同耐旱性的形成可能具有重要作用^[22-23]。目前,已经得到功能研究的包括miR166和miR169。利用STTM技术抑制miR166的表达使得玉米的非生物胁迫抗性提高,其中耐旱性的提高尤为显著,这可能是由于miR166的降低导致植株中脱落酸(abscisic acid, ABA)的水平上调引起的,ABA是非生物应激反应重要的调节因子,ABA含量的增加有助于提高玉米的抗旱性^[77]。玉米miR169在短期干旱处理后表达明显下调,而其靶基因*NF-YA*表达上升,从而促进根系的生长以获得更多水分^[79]。番茄miR169过表达会引起气孔开放程度变小,从而增加植物的抗旱能力,但玉米miR169是否通过类似的机制起到抗旱作用还需要进一步的研究^[83]。

4.3 温度胁迫响应相关miRNA

利用小RNA测序结合转录组分析,目前已鉴定获得大量参与温度胁迫响应过程的miRNA及其调控的下游靶基因^[25-26, 84]。温度胁迫主要包括高温胁迫和低温胁迫两个方面。高温胁迫对玉米营养生长期光合作用的进行和生殖生长期雌雄穗的发育具有显著影响。研究发现,在玉米不同发育时期的多个组织中,高温胁迫下大量miRNA的表达发生了变化,其中在营养生长时期的组织中变化尤为明显,同时长期高温胁迫处理比短期高温胁迫处理对miRNA表达的影响更大,说明高温胁迫下玉米中miRNA的响应呈高度复杂性和动态性^[25]。低温胁迫处理玉米叶片发现,位于叶片分生区、伸长区和成熟区不同miRNA分别发生了不同程度的表达变化,体现出miRNA在参与调控叶片低温胁迫适应中具有不同分工^[26]。值得注意的是,miR396在高温和低温胁迫下均发生表达量的变化,高温胁迫下miR396在茎和根中表达量下降,低温胁迫下miR396在叶片分生区下降而在伸长区、成熟区表达上升,暗示miR396在玉米温度胁迫响应中的重要性^[25-26, 84]。

4.4 营养胁迫响应相关miRNA

营养胁迫会造成植物的生长受到抑制,甚至导致植物死亡。玉米营养胁迫的相关研究主要集中在低磷胁迫与低氮胁迫两个方面。低磷供应是许多地区玉米产量的限制因素。通过构建玉米叶与根的小

RNA 文库结合高通量测序, 对磷缺乏条件下差异表达的 miRNA 进行鉴定, 发现大量参与低磷胁迫响应的 miRNA^[27, 85]。低磷胁迫下玉米叶与根中 miRNA 的表达存在差异, 具有组织特异性^[27, 85]。另外, 低磷胁迫响应的早期 miRNA 反应迅速, 但通常对磷缺乏没有特异性; 而响应晚期的 miRNA 在长期缺乏磷时参与改变植物的形态、生理或代谢^[85]。miR399 是一类与低磷胁迫有关的 miRNA, 拟南芥 miR399 通过负调控其靶标 E2 泛素结合基因 *PHO2* 参与低磷胁迫响应过程^[86]。玉米中 miR399-*PHO2* 通路在低磷胁迫适应中也具有保守功能, miR399 主要在玉米的维管系统中表达, 在低磷胁迫处理下被诱导, 过量表达 miR399 使得靶基因 *PHO2* 表达下降, 从而导致植株中磷的积累显著上升产生磷中毒症状, 说明 miR399-*PHO2* 模块在维持玉米磷稳态平衡中的重要性^[87]。

低氮胁迫严重影响玉米幼苗的生长, 导致玉米品质和产量显著下降。通过使用基因芯片技术, 在玉米的叶片和根部分别鉴定出 9 个响应低氮胁迫的 miRNA 家族^[88]。随后, 通过小 RNA 和降解组文库深度测序, 在玉米的地上部分与根中进一步鉴定出大量参与低氮胁迫的 miRNA 及其调控的下游靶基因^[89-90]。值得注意的是, 除了 miRNA, 还发现多个 miRNA 的随从链 miRNA* 在低氮胁迫下也发生了明显的表达变化, 通常认为 miRNA* 是 miRNA 加工过程的副产物, 不具有生物学功能, 但近期多项研

究揭示一部分 miRNA* 也具有靶基因, 在植物的多个生理活动中发挥重要的功能^[91], 这些 miRNA* 的鉴定丰富了低氮胁迫差异表达基因的资源^[89]。miR528 是单子叶植物特有的 miRNA, 研究发现氮过量情况下 miR528 水平上升, 而氮缺乏条件下 miR528 水平下降^[92]。miR528 主要在玉米的维管束系统表达, miR528 的过量表达引起靶基因漆酶 *LACCASE3* (*LAC3*) 和 *LACCASE5* (*LAC5*) 表达降低, 从而影响木质素的积累, 导致植株在氮过量条件下容易发生倒伏。缺氮环境下玉米 miR528 表达下降, 使得 *LAC3*、*LAC5* 表达上升, 有助于木质素在玉米茎上累积, 从而有助于提高玉米的抗倒伏性^[92]。

5 总结与展望

miRNA 研究是表观遗传学的热门研究领域之一, 大量研究表明 miRNA 通过复杂的调控网络参与植物体内多种重要的生理活动。随着遗传筛选、生物信息学分析以及高通量测序技术的运用, 在玉米中已鉴定获得大量参与生长发育调控和非生物胁迫响应的 miRNA, 其中部分 miRNA 的功能已经得到验证, 图 4 和表 2 中总结了目前已有功能研究支持的关键 miRNA 及其调控的靶基因。然而, 整体来说, 关于玉米中 miRNA 具体功能和作用机制的研究仍然相对有限, 需要进一步创制突变体等遗传材料, 结合分子生物学、遗传学、基因组学等多种

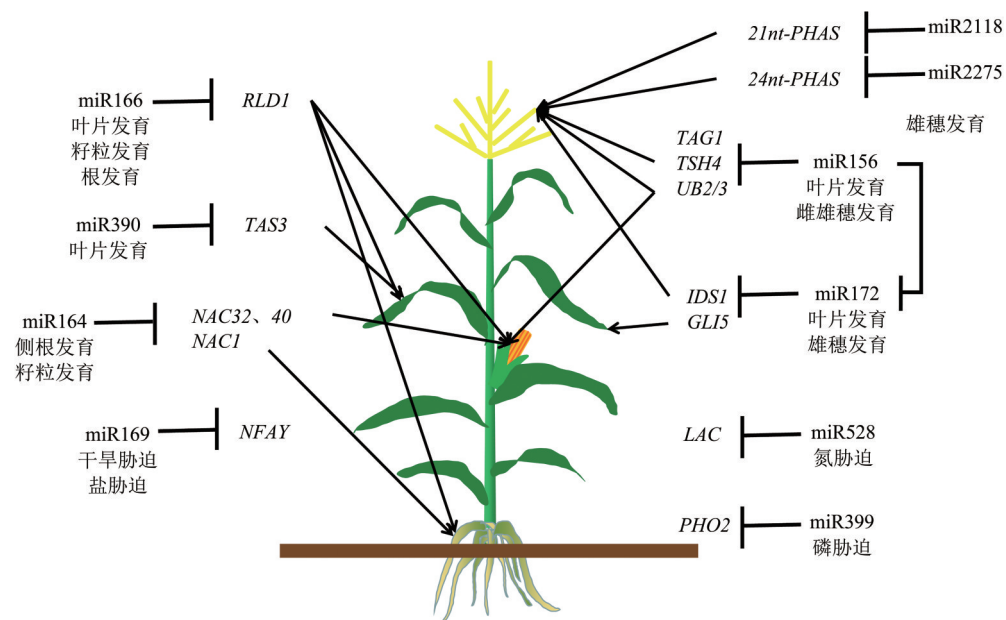


Fig. 4 Key miRNAs and their target genes involved in regulating maize development and abiotic stress responses
图4 参与调控玉米生长发育和非生物胁迫响应的关键miRNA及其靶基因

Table 2 Key miRNAs regulating maize development and abiotic stress responses

表2 调控玉米生长发育和非生物胁迫响应的关键miRNA

miRNA	靶基因	生物学功能	参考文献
miR156	<i>UB2</i> 、 <i>UB3</i>	生殖发育	[67]
	<i>TSH4</i>	叶片发育、雄穗分枝	[63]
	<i>TGA1</i>	颖片发育	[63]
miR164	<i>NAC1</i>	根发育	[56]
	<i>NAC32</i> 、 <i>NAC40</i>	籽粒发育	[76]
miR166	<i>RLD1</i>	叶片极性, 籽粒发育, 根发育	[14, 59, 77]
miR169	<i>NFAY</i>	抗旱, 抗盐	[79-80]
miR172	<i>GL15</i>	叶片发育	[15]
	<i>IDS1</i>	雄穗发育	[65]
miR390	<i>TAS3</i>	叶片极性	[45]
miR399	<i>PHO2</i>	磷胁迫	[87]
miR528	<i>LAC3</i> 、 <i>LAC5</i>	氮胁迫	[41]
miR2118	<i>21nt-PHAs loci</i>	生殖发育	[43]
miR2275	<i>24nt-PHAs loci</i>	生殖发育	[43]

手段开展深入的功能研究。目前, 通过过量表达 miRNA, 利用串联短片段靶标模拟 STTM 技术沉默抑制 miRNA, 或者通过 CRISPR/CAS9 基因编辑技术构建 miRNA 突变体, 都可以实现对 miRNA 表达水平的调节进而研究其对玉米重要农艺性状的影响, 进一步确认 miRNA 的具体功能。总体来说, 与拟南芥、水稻中 miRNA 的研究相比, 目前玉米中的相关研究仍然非常有限, 主要集中在对处于不同生长发育过程和不同非生物胁迫条件下玉米中 miRNA 的鉴定, 仍然缺乏深入和系统的功能机制解析, 同时对于 miRNA 如何相互协调作用、如何参与由多个调控通路组成的复杂调控网络也知之甚少, 因此进一步探讨玉米 miRNA 的生物学功能及其参与的复杂调控网络将是今后的工作重点。尤其值得关注的是, 玉米中存在大量单子叶植物特有 miRNA, 这在双子叶模式植物拟南芥中是无法进行研究的, 发现这些新的 miRNA 并对其进行功能解析对于理解单子叶植物生长发育调控和非生物胁迫适应的过程具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Yu Y, Zhang Y, Chen X, *et al.* Plant noncoding RNAs: hidden players in development and stress responses. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2019, **35**: 407-431
- [2] Du F, Gong W, Bosca S, *et al.* Dose-dependent AGO1-mediated inhibition of the mirna165/166 pathway modulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* shoot apical meristem. *Plant Commun*, 2020, **1**(1): 100002
- [3] Das Gupta M, Nath U. Divergence in patterns of leaf growth polarity is associated with the expression divergence of mir396. *Plant Cell*, 2015, **27**(10): 2785-2799
- [4] Wang H, Li Y, Chern M, *et al.* Suppression of rice miR168 improves yield, flowering time and immunity. *Nat Plants*, 2021, **7**(2): 129-136
- [5] Li S, Castillo-Gonzalez C, Yu B, *et al.* The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. *Plant J*, 2017, **90**(4): 654-670
- [6] Tang J Y, Chu C C. MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits. *Nat Plants*, 2017, **3**(7): 17077
- [7] Chen J, Teotia S, Lan T, *et al.* MicroRNA techniques: valuable tools for agronomic trait analyses and breeding in rice. *Front Plant Sci*, 2021, **12**: 744357
- [8] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, *et al.* MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 2002, **16**(13): 1616-1626
- [9] Llave C, Kasschau K D, Rector M A, *et al.* Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 2002, **14**(7): 1605-1619
- [10] Wang J F, Zhou H, Chen Y Q, *et al.* Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(5): 1688-1695
- [11] Sunkar R, Girke T, Jain P K, *et al.* Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*, 2005, **17**(5): 1397-1411
- [12] Zhang B, Pan X, Stellwag E J. Identification of soybean microRNAs and their targets. *Planta*, 2008, **229**(1): 161-182
- [13] Zhou J, Cheng Y, Yin M, *et al.* Identification of novel miRNAs and miRNA expression profiling in wheat hybrid necrosis. *PLoS One*, 2015, **10**(2): e0117507
- [14] Juarez M T, Kui J S, Thomas J, *et al.* MicroRNA-mediated repression of *rolled leaf1* specifies maize leaf polarity. *Nature*,

- 2004, **428**(6978): 84-88
- [15] Lauter N, Kampani A, Carlson S, *et al.* *MicroRNA172* down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(26): 9412-9417
- [16] Mica E, Gianfranceschi L, Pe M E. Characterization of five microRNA families in maize. *J Exp Bot*, 2006, **57**(11): 2601-2612
- [17] Zhang L, Chia J M, Kumari S, *et al.* A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS Genet*, 2009, **5**(11): e1000716
- [18] 陈洁, 林海建, 潘光堂, 等. 利用深度测序技术检测玉米根系和叶片中已知的 microRNAs. *遗传*, 2010, **32**(11): 1175-1186
- Chen J, Lin H J, Pan G T, *et al.* *Hereditas* (Beijing), 2010, **32**(11): 1175-1186
- [19] Zhao Z, Xue Y, Yang H, *et al.* Genome-wide identification of miRNAs and their targets involved in the developing internodes under maize ears by responding to hormone signaling. *PLoS One*, 2016, **11**(10): e0164026
- [20] Ding D, Li W, Han M, *et al.* Identification and characterisation of maize microRNAs involved in developing ears. *Plant Biol* (Stuttg), 2014, **16**(1): 9-15
- [21] Gu Y, Liu Y, Zhang J, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in the developing maize endosperm. *Genomics*, 2013, **102**(5-6): 472-478
- [22] Aravind J, Rinku S, Pooja B, *et al.* Identification, characterization, and functional validation of drought-responsive micrnas in subtropical maize inbreds. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 941
- [23] Liu X, Zhang X, Sun B, *et al.* Genome-wide identification and comparative analysis of drought-related microRNAs in two maize inbred lines with contrasting drought tolerance by deep sequencing. *PLoS One*, 2019, **14**(7): e0219176
- [24] Fu R, Zhang M, Zhao Y, *et al.* Identification of salt tolerance-related micrnas and their targets in maize (*Zea mays* L.) using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 864
- [25] He J, Jiang Z M, Gao L, *et al.* Genome-wide transcript and small rna profiling reveals transcriptomic responses to heat stress. *Plant Physiol*, 2019, **181**(2): 609-629
- [26] Aydinoglu F. Elucidating the regulatory roles of microRNAs in maize (*Zea mays* L.) leaf growth response to chilling stress. *Planta*, 2020, **251**(2): 38
- [27] Nie Z, Ren Z, Wang L, *et al.* Genome-wide identification of microRNAs responding to early stages of phosphate deficiency in maize. *Physiol Plant*, 2016, **157**(2): 161-174
- [28] Xia Z H, Zhao Z X, Gao X R, *et al.* Characterization of maize miRNAs in response to synergistic infection of maize chlorotic mottle virus and sugarcane mosaic virus. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(13): 3146
- [29] Wu F, Shu J, Jin W. Identification and validation of miRNAs associated with the resistance of maize (*Zea mays* L.) to *Exserohilum turcicum*. *PLoS One*, 2014, **9**(1): e87251
- [30] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(D1): D68-D73
- [31] Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(D1): D155-D162
- [32] Vergani-Junior C A, Tonon-Da-Silva G, Inan M D, *et al.* DICER: structure, function, and regulation. *Biophys Rev*, 2021, **13**(6): 1081-1090
- [33] Qian Y, Cheng Y, Cheng X, *et al.* Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize. *Plant Cell Rep*, 2011, **30**(7): 1347-1363
- [34] Thompson B E, Basham C, Hammond R, *et al.* The *dicer-like* homolog *fuzzy tassel* is required for the regulation of meristem determinacy in the inflorescence and vegetative growth in maize. *Plant Cell*, 2014, **26**(12): 4702-4717
- [35] Teng C, Zhang H, Hammond R, *et al.* *Dicer-like 5* deficiency confers temperature-sensitive male sterility in maize. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 2912
- [36] Petsch K, Manzotti P S, Tam O H, *et al.* Novel dicer-like1 siRNAs bypass the requirement for dicer-like4 in maize development. *Plant Cell*, 2015, **27**(8): 2163-2177
- [37] Field S, Thompson B. Analysis of the maize *dicer-like1* mutant, *fuzzy tassel*, implicates micrnas in anther maturation and dehiscence. *PLoS One*, 2016, **11**(1): e0146534
- [38] Singh R K, Gase K, Baldwin I T, *et al.* Molecular evolution and diversification of the Argonaute family of proteins in plants. *BMC Plant Biol*, 2015, **15**: 23
- [39] Zhai L, Sun W, Zhang K, *et al.* Identification and characterization of *Argonaute* gene family and meiosis-enriched Argonaute during sporogenesis in maize. *J Integr Plant Biol*, 2014, **56**(11): 1042-1052
- [40] Zhang H, Xia R, Meyers B C, *et al.* Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, **27**: 84-90
- [41] Sun W, Xiang X, Zhai L, *et al.* AGO18b negatively regulates determinacy of spikelet meristems on the tassel central spike in maize. *J Integr Plant Biol*, 2018, **60**(1): 65-78
- [42] Sun W, Chen D, Xue Y, *et al.* Genome-wide identification of AGO18b-bound miRNAs and phasiRNAs in maize by cRIP-seq. *BMC Genomics*, 2019, **20**(1): 656
- [43] Zhai J, Zhang H, Arikat S, *et al.* Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phasiRNAs in maize anthers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(10): 3146-3151
- [44] Komiya R, Ohyanagi H, Niihama M, *et al.* Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *Plant J*, 2014, **78**(3): 385-397
- [45] Douglas R N, Wiley D, Sarkar A, *et al.* *ragged seedling2* Encodes an ARGONAUTE7-like protein required for mediolateral expansion, but not dorsiventrality, of maize leaves. *Plant Cell*, 2010, **22**(5): 1441-1451
- [46] Xuemei C, Jun L, Yulan C, *et al.* *HEN1* functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower.

- Development, 2002, **129**(5): 1085-1094
- [47] Yu B, Yang Z, Li J, *et al.* Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 2005, **307**(5711): 932-935
- [48] Li J, Yang Z, Yu B, *et al.* Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, **15**(16): 1501-1507
- [49] Huang Y, Ji L, Huang Q, *et al.* Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature*, 2009, **461**(7265): 823-827
- [50] Abe M, Yoshikawa T, Nosaka M, *et al.* WAVY LEAF1, an ortholog of *Arabidopsis* HEN1, regulates shoot development by maintaining microRNA and trans-acting small interfering RNA accumulation in rice. *Plant Physiol*, 2010, **154**(3): 1335-1346
- [51] Zhai J, Zhao Y, Simon S A, *et al.* Plant microRNAs display differential 3' truncation and tailing modifications that are ARGONAUTE1 dependent and conserved across species. *Plant Cell*, 2013, **25**(7): 2417-2428
- [52] Zhou M, Luo H. MicroRNA-mediated gene regulation: potential applications for plant genetic engineering. *Plant Mol Biol*, 2013, **83**(1-2): 59-75
- [53] Peng T, Teotia S, Tang G, *et al.* MicroRNAs meet with quantitative trait loci: small powerful players in regulating quantitative yield traits in rice. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2019, **10**(6): e1556
- [54] Liu H, Yu H, Tang G, *et al.* Small but powerful: function of microRNAs in plant development. *Plant Cell Rep*, 2018, **37**(3): 515-528
- [55] Motte H, Vanneste S, Beeckman T. Molecular and environmental regulation of root development. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, **70**: 465-488
- [56] Li J, Guo G, Guo W, *et al.* miRNA164-directed cleavage of *ZmNAC1* confers lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biol*, 2012, **12**: 220
- [57] Xie Q, Frugis G, Colgan D, *et al.* *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev*, 2000, **14**(23): 3024-3036
- [58] Di Ruocco G, Bertolotti G, Pacifici E, *et al.* Differential spatial distribution of miR165/6 determines variability in plant root anatomy. *Development*, 2018, **145**(1): dev153858
- [59] Gautam V, Singh A, Yadav S, *et al.* Conserved *LBL1-ta-siRNA* and miR165/166-*RLD1/2* modules regulate root development in maize. *Development*, 2020, **148**(1): dev190033
- [60] Aydinoglu F, Lucas S J. Identification and expression profiles of putative leaf growth related microRNAs in maize (*Zea mays* L.) hybrid ADA313. *Gene*, 2019, **690**: 57-67
- [61] Xia R, Xu J, Meyers B C. The emergence, evolution, and diversification of the miR390-*TAS3*-*ARF* pathway in land plants. *Plant Cell*, 2017, **29**(6): 1232-1247
- [62] Peng T, Qiao M, Liu H, *et al.* A resource for inactivation of microRNAs using short tandem target mimic technology in model and crop plants. *Mol Plant*, 2018, **11**(11): 1400-1417
- [63] Chuck G, Cigan A M, Saeteurn K, *et al.* The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nat Genet*, 2007, **39**(4): 544-549
- [64] Li M, Zhong W, Yang F, *et al.* Genetic and molecular mechanisms of quantitative trait loci controlling maize inflorescence architecture. *Plant Cell Physiol*, 2018, **59**(3): 448-457
- [65] Chuck G, Meeley R, Irish E, *et al.* The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1*. *Nat Genet*, 2007, **39**(12): 1517-1521
- [66] Chuck G, Whipple C, Jackson D, *et al.* The maize SBP-box transcription factor encoded by *tasselsheath4* regulates bract development and the establishment of meristem boundaries. *Development*, 2010, **137**(8): 1243-1250
- [67] Chuck G S, Brown P J, Meeley R, *et al.* Maize *SBP-box* transcription factors *unbranched2* and *unbranched3* affect yield traits by regulating the rate of lateral primordia initiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(52): 18775-18780
- [68] Ta K N, Sabot F, Adam H, *et al.* *miR2118*-triggered phased siRNAs are differentially expressed during the panicle development of wild and domesticated African rice species. *Rice (N Y)*, 2016, **9**(1): 10
- [69] Zheng Y, Wang Y, Wu J, *et al.* A dynamic evolutionary and functional landscape of plant phased small interfering RNAs. *BMC Biol*, 2015, **13**: 32
- [70] Zhang M, Ma X, Wang C, *et al.* CHH DNA methylation increases at 24-*PHAS* loci depend on 24-nt phased small interfering RNAs in maize meiotic anthers. *New Phytol*, 2021, **229**(5): 2984-2997
- [71] Li D D, Liu Z C, Gao L, *et al.* Genome-wide identification and characterization of microRNAs in developing grains of *Zea mays* L. *PLoS One*, 2016, **11**(4): e0153168
- [72] Jin X, Fu Z, Lv P, *et al.* Identification and characterization of microRNAs during maize grain filling. *PLoS One*, 2015, **10**(5): e0125800
- [73] Hu Y, Li Y, Weng J, *et al.* Coordinated regulation of starch synthesis in maize endosperm by microRNAs and DNA methylation. *Plant J*, 2021, **105**(1): 108-123
- [74] Xing L, Zhu M, Zhang M, *et al.* High-throughput sequencing of small RNA transcriptomes in maize kernel identifies miRNAs involved in embryo and endosperm development. *Genes (Basel)*, 2017, **8**(12): 385
- [75] Wu F Y, Tang C Y, Guo Y M, *et al.* Comparison of miRNAs and their targets in seed development between two maize inbred lines by high-throughput sequencing and degradome analysis. *PLoS One*, 2016, **11**(7): e0159810
- [76] Zheng L, Zhang X, Zhang H, *et al.* The miR164-dependent regulatory pathway in developing maize seed. *Mol Genet Genomics*, 2019, **294**(2): 501-517
- [77] Li N, Yang T, Guo Z, *et al.* Maize microRNA166 inactivation confers plant development and abiotic stress resistance. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(24): 9506
- [78] Van Zelm E, Zhang Y, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, **71**: 403-433
- [79] Luan M, Xu M, Lu Y, *et al.* Expression of zma-miR169 miRNAs

- and their target *ZmNF-YA* genes in response to abiotic stress in maize leaves. *Gene*, 2015, **555**(2): 178-185
- [80] Xing L, Zhu M, Luan M, *et al.* miR169q and NUCLEAR FACTOR YA8 enhance salt tolerance by activating PEROXIDASE1 expression in response to ROS. *Plant Physiol*, 2022, **188**(1): 608-623
- [81] Ding D, Zhang L, Wang H, *et al.* Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Ann Bot*, 2009, **103**(1): 29-38
- [82] Seeve C M, Sunkar R, Zheng Y, *et al.* Water-deficit responsive microRNAs in the primary root growth zone of maize. *BMC Plant Biol*, 2019, **19**(1): 447
- [83] Zhang X, Zou Z, Gong P, *et al.* Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnol Lett*, 2011, **33**(2): 403-409
- [84] Zhang M, An P, Li H, *et al.* The miRNA-mediated post-transcriptional regulation of maize in response to high temperature. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(7): 1754
- [85] Li Z, Zhang X, Liu X, *et al.* miRNA alterations are important mechanism in maize adaptations to low-phosphate environments. *Plant Sci*, 2016, **252**: 103-117
- [86] Franco-Zorrilla J M, Valli A, Todesco M, *et al.* Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet*, 2007, **39**(8): 1033-1037
- [87] Du Q G, Wang K, Zou C, *et al.* The *PILNCRL*-miR399 regulatory module is important for low phosphate tolerance in maize. *Plant Physiol*, 2018, **177**(4): 1743-1753
- [88] Xu Z, Zhong S, Li X, *et al.* Genome-wide identification of microRNAs in response to low nitrate availability in maize leaves and roots. *PLoS One*, 2011, **6**(11): e28009
- [89] Zhao Y, Xu Z, Mo Q, *et al.* Combined small RNA and degradome sequencing reveals novel miRNAs and their targets in response to low nitrate availability in maize. *Ann Bot*, 2013, **112**(3): 633-642
- [90] Yang Z, Wang Z, Yang C, *et al.* Physiological responses and small RNAs changes in maize under nitrogen deficiency and resupply. *Genes Genom*, 2019, **41**(10): 1183-1194
- [91] Liu W W, Meng J, Cui J, *et al.* Characterization and function of MicroRNA(*)s in plants. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 2200
- [92] Sun Q, Liu X, Yang J, *et al.* MicroRNA528 affects lodging resistance of maize by regulating lignin biosynthesis under nitrogen-luxury conditions. *Mol Plant*, 2018, **11**(6): 806-814

Regulatory Roles of MicroRNAs in Maize Growth, Development and Abiotic Stress Responses*

PAN Jin-Kang¹⁾, LI Jing^{1)**}, LIU Lin^{1,2)**}

¹⁾Guangdong Provincial Key Laboratory for Plant Epigenetics, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

²⁾Longhua Bioindustry and Innovation Research Institute, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous non-coding small RNAs with a length of 20–24 nucleotides that present widely in eukaryotes. miRNAs regulate the expression of their target genes post-transcriptionally through transcript cleavage or translation inhibition. Recent studies have shown that miRNAs are involved in a wide variety of biological processes of plant growth, development and stress responses, and play essential roles in regulating agronomic traits of crops. Maize is an important staple food, feed and industrial raw material, and thus it is crucial to improve maize yield and quality to ensure world food security. Compared to model plants *Arabidopsis* and rice, the studies on maize miRNAs are still relatively limited. The understanding of functions and regulatory mechanisms of miRNAs in maize is essential for engineering important agronomic traits genetically through molecular breeding. In this article, we review the discovery and identification of maize miRNAs, most of which are tissue-specific and spatiotemporally expressed. Up to now, a total of 325 mature miRNAs from 174 precursors were identified in maize genome, belonging to 29 miRNA families. We also systematically summarize the functions of key components in maize miRNA biogenesis pathways, including DCL, AGO and HEN1. Mutations in these miRNA processing proteins result in pleiotropic developmental phenotypes, suggesting the important regulatory roles for miRNAs in maize development. MiRNAs whose functions have been characterized in maize growth and development are discussed, including those involved in root formation, leaf morphogenesis, grain maturation and reproductive development. Furthermore, function of miRNAs in responses to abiotic stresses, such as salt stress, drought stress, temperature stress and nutrition stress are elaborated, with the highlight on miR169-*NF-YA*, miR399-*PHO2*, and miR528-*LAC3* regulatory modules. We also discuss the current existed issues and future perspectives in maize miRNA study. Despite the identification of a large number of maize miRNAs, research on the functions and regulatory mechanisms of miRNAs in maize is still very limited, and it is still required to generate essential genetic materials and take advantage of multiple experimental strategies to perform in-depth and systematic studies on miRNA and their target genes. It is believed that miRNAs are valuable gene resources and a better understanding of miRNA-mediated regulatory network would be beneficial for engineering maize varieties with improved agronomic traits.

Key words microRNA, maize, agronomic trait, growth and development, abiotic stress

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0092

* This study was supported by grants from Natural Science Foundation of Guangdong Province (2019A1515011222, 2019A1515110162, 2021A1515010482), Guangdong Innovation Research Team Fund (2014ZT05S078), and Shenzhen Basic Research General Project (JCYJ20190808112207542, JCYJ20190808141815083).

** Corresponding author.

LIU Lin. Tel: 86-755-26558081, E-mail: linliu@szu.edu.cn

LI Jing. Tel: 86-755-26558081, E-mail: lijing8311@szu.edu.cn

Received: March 15, 2022 Accepted: June 6, 2022