

植物miRNA参与调控作物农艺性状的研究进展*

江曾明^{1)**} 何娟^{1,3)**} 莫蓓蓓^{1,2)} 刘琳^{1,2)***} 徐晓峰^{1)***}

(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;

(³⁾ 深圳大学光电工程学院, 光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 深圳 518060)

摘要 植物 microRNA (miRNA) 是一类长度约为 20~24 nt 的内源非编码小 RNA, 它们通过在转录后水平调控靶基因的表达, 在植物的生长发育、逆境响应和环境适应等过程中起着关键作用. miRNA 对水稻、玉米、大豆等重要经济作物的农艺性状也起着重要的调控作用, 在改良农作物性状上具有重大的应用潜能. 本文重点介绍了参与作物农艺性状(如株型、花期、种子发育及抗逆等)调控的关键 miRNA 及其调控途径, 同时总结了 miRNA 参与作物性状改良的主要研究方法和手段, 并讨论了 miRNA 在作物性状改良应用中的前景.

关键词 microRNA, 农作物, 调控机制, 性状改良

中图分类号 Q94, Q944, Q945

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0294

microRNA (miRNA) 是一类在动植物中广泛分布的长度在 20~24 nt 左右的非编码小 RNA. 最早发现的 miRNA 编码基因是线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 *lin-4*, 它的产物是 24 nt 的小 RNA, 能够与其靶基因 *lin-14* mRNA 的 3' 非编码区序列以非完全互补的形式结合并抑制蛋白质的翻译过程, 从而调控线虫早期发育时期的转化^[1]. 随后又有报道发现, 线虫中另一个 miRNA 基因 *let-7* 在后期发育转化中起重要作用^[2-3]. 除了线虫以外, 在果蝇、人类等多个物种中也陆续发现了 *let-7* 的同源基因^[4-6], 说明 miRNA 具有高度的保守性, 作为小的非编码 RNA 广泛存在于生物发育的多个调控过程. 多个研究组在植物中也发现 miRNA 能够抑制基因的表达, 并鉴定出参与 miRNA 合成途径的重要基因^[7-9].

在植物中 miRNA 能够通过转录剪切或翻译抑制来负调控靶基因, 从而精确控制其表达水平, 这些靶基因主要包括转录因子、胁迫响应蛋白以及其他一些能够影响植物生长发育及生理机能的蛋白质编码基因^[10]. 很多植物拥有上百个 miRNA 基因 (MIR)^[11], 它们主要位于基因组的间隔区域^[9]. MIR 基因由 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, Pol II) 转录, 转录出的产物称为 pri-miRNA, 稳

定状态的 pri-miRNA 拥有 5' 端 7-甲基鸟苷帽子 (7-methylguanosine) 和 3' 端的多聚腺苷酸 (polyadenylate) 尾巴, 同时序列中包含茎环结构^[12]. Pri-miRNA 的加工过程需要多种蛋白质的参与, 包括 DCL1 (DICER - LIKE1)、HYL1 (HYPONASTIC LEAVES1)、SE (SERRATE) 和 TGH (TOUGH) 等, 它们结合在 pri-miRNA 的不同部分发挥作用(图 1). 其中 DCL1 是一种 RNase III 内切酶, 负责对 pri-miRNA 进行剪切加工, 而 HYL1 和 SE 负责确保 DCL1 加工的精确性, TGH 则负责增强 DCL1 的活性^[13-15]. Pri-miRNA 先是在接近茎基部的地方被 DCL1 切割成 pre-miRNA, 随后再被切割成短的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA), 即 miRNA / miRNA* 二聚体. miRNA/miRNA* 二聚体两端各有 2 个碱基的突出,

* 国家自然科学基金(31600982), 广东省创新团队(2014ZT05S078)项目, 深圳大学科研基金(2016095)和深圳市高端人才科研基金(827/000256)资助项目.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

刘琳. Tel: 13510529306, Email: linliu@szu.edu.cn

徐晓峰. Tel: 13828875371, Email: xxf@szu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-11, 接受日期: 2019-01-07

随后由HEN1甲基转移酶进行甲基化以增强它的稳定性（植物特有）^[10]. miRNA/miRNA*二聚体中，一般是成熟 miRNA 被选择性地装载进 AGO1 (ARGONAUTE1) 蛋白，形成RNA诱导的沉默复合体 (RNA inducing silencing complex, RISC)，另一条链则通常进入降解途径^[16]. miRNA具体的生物合成途径如图1所示.

miRNA 主要通过与其靶基因 mRNA 进行碱基互补配对，引导效应蛋白 AGO1 发挥切割靶基因 mRNA 或者抑制靶基因翻译的作用（图1）^[17]. 在动物中，miRNA 的结合位点通常位于靶基因 mRNA 的3'非编码区 (UTR)，并且从 miRNA 5'端开始第2~7个碱基配对比较严格，这段序列被称为 miRNA 的种子序列 (seed sequence). 这种非严格配对的方式导致动物的 miRNA 有很多靶基因，并且调控方式主要为翻译抑制^[18]. 但在植物中，大部分 miRNA 与靶基因 mRNA 编码区序列之间存在较为严格的碱基互补配对，加之植物大部分 miRNA 的成熟序列在物种间非常保守^[19]，因此植

物的 miRNA 靶基因较少，同时更倾向于对靶基因 mRNA 进行剪切调控^[20].

miRNA 几乎参与植物的生长发育和新陈代谢各方面的调控，如叶片的发育和形成 (miR156^[21]、miRNA165/166^[22]、miR319^[23])、气孔的发育 (miR824)^[24]、侧根的形成 (miR164)^[25]、营养生长向生殖生长的转变调控 (miR172)^[26]、花的发育 (miR172、miR159)^[27]. 此外，植物处于逆境胁迫，如病害、干旱、高温、高盐、营养缺乏等条件都能够诱导体内 miRNA 的异常表达，表明 miRNA 在农作物性状改良和抗逆形成方面可作为潜在靶标应用于遗传育种^[28]. 随着全球人口的快速增长以及经济、社会的发展需要，粮食的需求量不断增多. 在耕地面积有限的情况下，增加作物单产是提高粮食总产量的重要手段. 作物种植过程中很多因素会影响其产量和品质，如气候变化、病虫害等. 改良农作物的性状使其能更好地适应环境，增加逆境胁迫的耐受能力，提高作物的生存能力及产量^[29]. 作物性状改

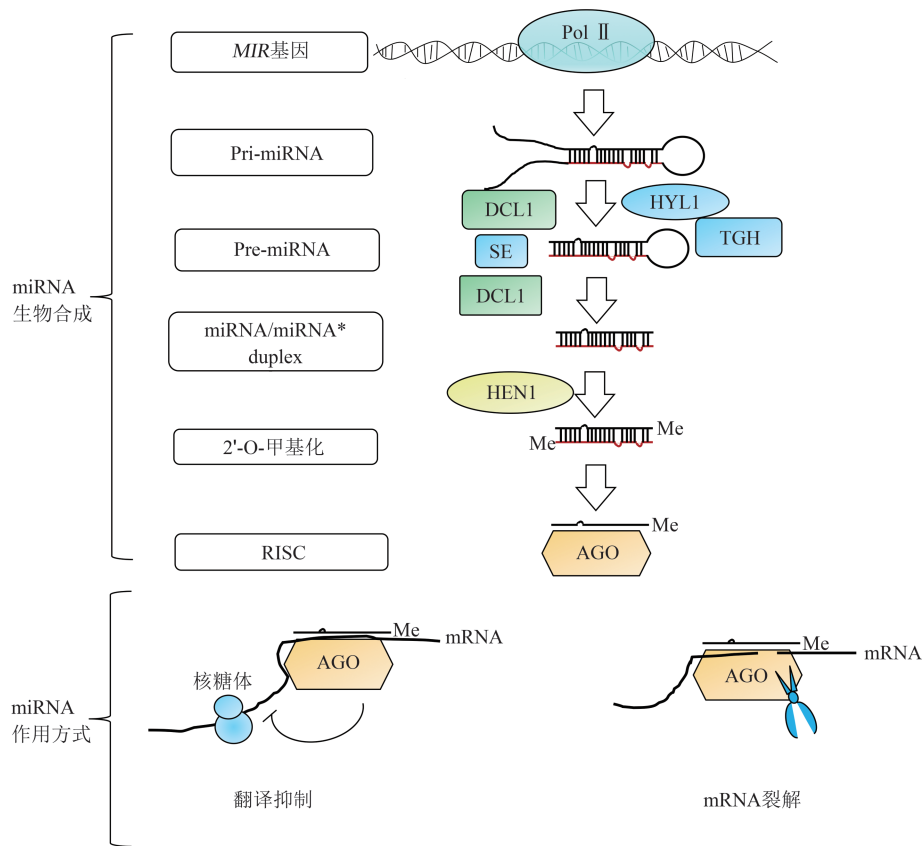


Fig. 1 Biogenesis and mode of action of miRNA

图1 miRNA的生物合成和作用方式

良的手段整合了植物生理学、遗传学、生物组学等多个方向的研究进展,对作物进行遗传改良和分子育种,是一种可持续并能显著提高作物产量的重要方式^[30].本文综述了miRNA在调控作物株型、花期、种子发育、籽粒大小及抗逆等农业性状方面的最新研究进展,同时介绍了目前几种研究miRNA参与植物性状调控的重要手段,分析了miRNA在改良作物性状中的应用前景,旨在整合miRNA相关知识和基因工程技术,为改良农作物性状提供理论依据和新途径.

1 研究miRNA参与植物性状调控的主要途径

1.1 影响作物性状关键miRNA的发现和鉴定

自植物中首次发现miRNA以来,不断有新的miRNA被鉴定和验证.植物miRNA的发现和鉴定最早是在模式植物拟南芥中,通过克隆DCL蛋白剪切产物以及与动物中发现的已知miRNA进行结构比对完成^[9].根据序列分析,后续在重要农作物中也预测和鉴定出一些植物中保守的miRNA^[12, 31].然而,无论是传统的克隆还是利用保守序列的预测都具有很大的局限性,不仅耗时耗力而且许多物种特异性或非序列保守的miRNA不能被有效鉴定.随着高通量测序技术的发展和进步,许多研究者开始利用小RNA文库和高通量测序的方法,很大程度提高了miRNA鉴定的速度和通量^[32-33].例如为了鉴定玉米雌蕊发育相关的miRNA,研究者通过构建玉米不同发育时期雌蕊的小RNA文库,进行高通量测序分析鉴定到98个关键的miRNA^[34].为了研究与干旱胁迫相关的miRNA,对植物进行干旱胁迫处理,通过建立小RNA文库及高通量测序分析,得到可能参与植物干旱胁迫耐受响应的miRNA^[35].目前,在九大作物中大约有2560个成熟miRNA和2063个miRNA前体已经被鉴定^[36].miRNA主要是通过抑制其靶基因的表达来发挥功能,因此miRNA靶基因的鉴定也非常重要.miRNA靶基因的鉴定主要是利用降解组联合高通量测序或者5' RACE (5' rapid amplification of cDNA ends)的方法验证靶基因被剪切后的转录本5'端的序列来进行^[34, 37],但这种方法只能鉴定到被miRNA通过转录剪切模式靶向的靶基因,不能获得被miRNA通过翻译抑制模式靶向的靶基因.

另外,有关作物中调控农艺性状的miRNA的鉴定也可以通过借鉴模式植物中已有的研究结果.

由于植物中存在着许多在进化中高度保守的miRNA,它们在不同植物中的功能可能是相似的.如miRNA396在拟南芥中的靶基因是生长调控因子GRF,GRF能与GIF互作共同组成miR396-GRF-GIF调控网络,调控拟南芥的生长发育过程^[38].参考拟南芥中的研究结果,在水稻中发现转录因子GRF4的编码基因GS2 (GRAIN SIZE ON CHROMOSOME 2)也能够被miRNA396剪切.在一种籼稻变种中,GS2转录本在miRNA396靶向的位点发生了2个碱基的自然突变,从而不能被识别剪切,最终导致该品种的籽粒的长度和重量都显著增加^[39].但同一个保守的miRNA在不同的植物中也可能具有不同的功能,或者多种功能.例如miR166在水稻中与营养离子的吸收与积累相关^[40],而在玉米中却调控了叶极性的发育^[41].miR156除了参与植物分蘖调控外,还参与了花期、籽粒等方面性状的调控^[42-43].通过以上方法鉴定到的参与调控作物性状的miRNA及其靶基因还需要通过基因沉默或者敲除等遗传学手段进行进一步的功能验证和研究.

1.2 miRNA功能研究的主要手段

1.2.1 amiRNA (artificial miRNA) 技术

利用amiRNA技术,可以实现对特定miRNA在植物体内进行组成型过量表达或组织特异性表达,从而为研究其功能提供材料.amiRNA技术通过修饰天然的pre-miRNA产生,将miRNA/miRNA*序列替换成对应的感兴趣的靶基因序列,但是保留pre-miRNA的茎环结构.amiRNA中的miRNA链序列与靶基因的mRNA序列互补,而miRNA*链的作用是使其miRNA/miRNA*二聚体的结构和天然的相同,所以amiRNA和miRNA相同,通过内源的miRNA途径对靶基因进行沉默^[44].通过改造amiRNA载体骨架,将其中原有的miRNA/miRNA*序列替换为所研究的miRNA/miRNA*序列,采用组成型表达启动子或组织特异性表达启动子驱动pre-miRNA的表达,可以获得miRNA过量表达或组织特异性表达的材料,为研究该miRNA的生物学功能奠定基础.对miRNA进行过量表达也可以通过采用高表达的启动子直接驱动miRNA的前体(pri-miRNA)进行,但由于很多miRNA尤其是一些新发现的miRNA的前体序列未知,并且miRNA前体的表达量往往很难以被克隆和测序,所以amiRNA是一种更为快速和精确的过量表达miRNA的方式.但是amiRNA的应用具有一定的

局限性, 如果所研究 miRNA 的本底表达水平很高, 在植物中已经达到饱和水平, 过表达后可能对植物没有明显影响. 另外, amiRNA 技术在育种中的应用也有一定的限制, 过表达某种 miRNA 可能会给植物带来剧烈的性状改变, 从而不适合育种; 同时, 由于一种 miRNA 可能有多种功能, 组成型过表达特定 miRNA 可能会对植物产生多重影响, 改变除目的性状之外的其他性状. 采用组织特异性启动子或者诱导表达型启动子在目的组织或特异条件下对 miRNA 进行特异性表达可能会减小异位表达对植物整体的影响, 从而减少副效应的产生^[45].

1.2.2 串联

短片段靶标模拟 (short tandem target mimic, STTM) 技术

STTM 技术的作用原理是通过模拟靶基因序列结合 miRNA 而造成 miRNA 丰度的降低和功能的抑制, 从而降低 miRNA 对其内源靶基因的沉默作用. STTM 骨架由长约 100 nt 的片段组成, 包括两个 miRNA 结合位点以及连接它们的一个不完全互补的 linker 结构, 其中 linker 结构起到维持 STTM 结构稳定性的作用^[46]. STTM 设计中, miRNA 结合区域的序列是与成熟 miRNA 互补的, 但在该序列相对于 miRNA 的 5' 至 3' 第 10~11 个核苷酸处 (即 miRNA 切割靶基因的位点), 设计一个不能与 miRNA 形成互补的凸起 (bulge), 使得该序列既可以结合 miRNA 但又不被 miRNA 切割, 使 miRNA 不能正常行使功能^[46]. 该设计使 STTM 既能结合 miRNA, 形成 miRNA 无功能复合体, 减少了细胞中游离 miRNA 的数量, 同时又能引起结合到 STTM 结构上的 miRNA 降解, 该降解过程可能是 SDN1^[46] 蛋白介导的, 从而使 miRNA 靶基因的表达量升高. 利用 STTM 技术可以同时靶向一个 miRNA 家族的多个成员, 克服由于基因冗余带来的沉默单个 miRNA 成员性状改变不明显的问题^[46]. 对于一些表达丰度很高的 miRNA 也能达到显著效果, 如 miR165/166^[47] 可以用 STTM 技术有效进行沉默. 此外, STTM 转基因的植株中, 靶向的 miRNA 被抑制, 造成 miRNA 靶基因表达水平升高, 引起植物产生相应表型, 能有效反映出 miRNA 的具体功能. STTM 的表达载体一般使用组成型表达启动子, 在植物整体及植物全生长周期都能起到沉默 miRNA 的作用; STTM 的表达载体也可以使用组织特异表达启动子或诱导型启动子, 实现对 miRNA 表达的精确调控, 获得理想的农艺性

状^[46, 48]. 但该方法也存在一些潜在的问题, 如由于同一个 miRNA 家族的成员之间成熟序列非常保守, 使用该方法将沉默整个家族, 无法精确研究每一个 miRNA 家族成员的功能, 并可能导致植物生长受到严重影响, 不利于获得理想农艺性状. 因此, 在研究 miRNA 的时候需要结合利用多种遗传学手段确定其具体的功能. 目前, STTM 技术已成熟利用在 miRNA 的沉默中, 并改变了模式植物和多种农作物的性状. 例如: 利用 STTM 技术沉默番茄中的 miR396, 使番茄的果实重量增加^[49]; 利用 STTM 技术沉默拟南芥中 miR159 的表达, 改变其响应胁迫的能力^[50]; 利用 STTM 技术沉默水稻中的 miR156、miR159、miR166、miR398 等, 改变了水稻的株型及产量等^[51-52].

1.2.3 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

CRISPR 全称为成簇的、规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), 与其关联蛋白 (CRISPR-associated proteins, Cas) 共同组成了 CRISPR/Cas 系统. 早在 1987 年, 日本微生物学家石野良纯在大肠杆菌中就发现了这种串联间隔重复序列, 但一直不清楚其功能^[53]. 后来的研究发现, 这种重复序列广泛存在于细菌和古细菌中, 直到 2002 年才正式命名为 CRISPR. 而 CRISPR 序列附近存在的多个编码序列, 则被命名为 CRISPR 相关基因, 即 Cas 基因^[54]. 后来的研究发现 CRISPR 系统实际是细菌的一种获得性免疫系统. 细菌被噬菌体侵染之后, 可以获得噬菌体的 DNA 片段并将之整合进基因组中形成记忆, 当细菌再次遭到噬菌体入侵时, 就能形成免疫^[55]. CRISPR / Cas 系统有三种类型, CRISPR/Cas9 属于 II 型, I 型和 III 型由于需要多种 Cas 蛋白参与, 比较复杂故应用不广, 而 CRISPR/Cas9 系统只需要一种 Cas 蛋白即 Cas9 的参与, 操控简单, 因此应用广泛. CRISPR/Cas9 系统由单链的向导 RNA (single guide RNA, 即 sgRNA) 和有核酸内切酶活性的 Cas9 蛋白构成, sgRNA 需有能与靶基因匹配的序列, Cas9 蛋白则需带有核定位信号. 通过设计序列特异性的向导 RNA, 将 Cas9 蛋白招募到基因组特定位置, Cas9 蛋白行使核酸内切酶功能使 DNA 双链断裂, 而细胞在启动修复的过程中会造成碱基的突变或缺失, 从而使靶基因的功能丧失, 达到基因定向编辑的目的^[56]. 该系统目前已经广泛运用到拟南芥、水稻、玉米、番茄等多种植物的基因编辑中, 并取得较好的效果, 是

一种有效的定向基因编辑手段^[57-58]. 用于基因编辑的外源DNA序列很容易在随后几代从被编辑的植物中去除, 将它们转化为不含转基因成分的株系, 有利于消除公众对转基因隐患的担忧. 类似于编码基因, 利用CRISPR/Cas9基因编辑技术可以对特定的非编码基因miRNA进行敲除或碱基替换, 敲除和替换的序列可以是miRNA的种子序列、茎环结构序列或启动子序列, 替换种子序列可以影响其对于靶标的识别, 替换茎环结构可以影响其生物合成, 替换启动子可以影响其表达模式. 同一个miRNA不同的家族成员可能具有不同的表达模式, 在植物的生长发育过程中具有不同的调控功能, 利用CRISPR/Cas9系统可以特异性地针对miRNA基因家族的每个成员单独进行研究, 这是STTM技术无法实现的. 但由于miRNA的序列短, 某些miRNA在其序列上可能难以设计出满足条件的sgRNA, 所以一般在成熟miRNA序列附近的上下游区域选取合适位置设计两个sgRNA位点, 当两个位点同时被编辑时, 它们之间的成熟miRNA序列将被删去, 但这对CRISPR/Cas9系统的编辑效率提出了更高的要求. 目前CRISPR-Cas9技术已经被证明是一种有效的用来编辑植物miRNA的重要手段^[59], 该技术将会极大地拓展miRNA在作物分子育种领域内的应用.

2 参与调控农作物性状的主要miRNA

miRNA是植物生长发育过程的重要调控因子, 越来越多的证据表明, miRNA在调控农作物性状的过程中起着关键的作用. miRNA及其靶基因对农作物的性状有多方面的影响, 在调控农作物的株型、花期、育性、产量、抗逆性状形成、品质等方面都起着关键的作用(图2). 表1中列举了近年来经过实验验证的参与调控农作物性状的主要miRNA及其靶基因.

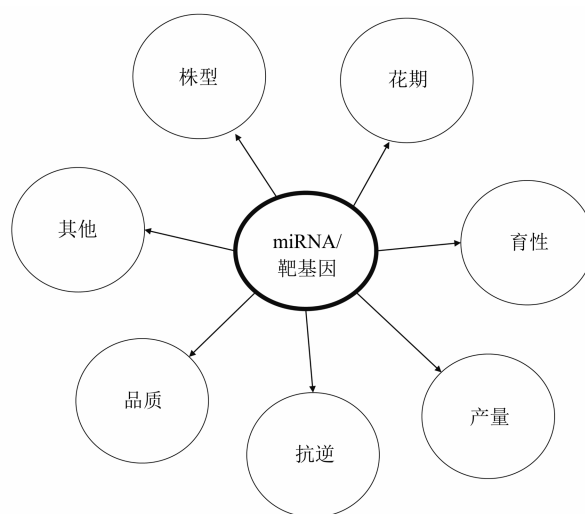


Fig. 2 Effects of miRNAs and their target genes on multiple traits of crops

图2 miRNA及其靶基因对农作物性状有多方面的影响

Table 1 Major miRNAs and their target genes involved in regulation of crop traits verified by experiments

表1 经实验验证的参与调控农作物性状的主要miRNA及其靶基因

miRNA	miRNA靶基因	物种	参考文献
调控株型性状			
miR156	<i>SPLs</i>	水稻、小麦	[42, 60-61]
miR164	<i>NAC2</i>	水稻	[62]
miR166	<i>HB4</i>	水稻	[63]
miR171	<i>GRAS24</i>	番茄	[64]
miR172	<i>AP2</i>	水稻	[65]
miR393	<i>TBI, AUX1</i>	水稻	[66-67]
miR394	<i>LC4</i>	水稻	[68]
miR396	<i>GRF6</i>	水稻	[69]
miR444	<i>MADS57</i>	水稻	[70]
miR529	<i>SPLs</i>	水稻	[65]
调控花期			
miR156	<i>SPLs</i>	水稻、玉米、大麦、大白菜、柳枝稷	[43, 71-73]
miR168	<i>AGO1</i>	番茄	[74]

续表1

miRNA	miRNA靶基因	物种	参考文献
miR172	<i>AP2</i>	水稻、玉米、大麦、大豆、土豆	[75-79]
miR393	<i>TBI, AUX1</i>	水稻	[66]
miR408	<i>TOC1</i>	小麦	[80]
调控雄性育性			
miR159	<i>GAMYB</i>	水稻	[81-82]
miR167	<i>ARF6/8</i>	番茄	[83]
miR1227	<i>SMARCA3L3</i>	小麦	[84]
miR2118	<i>PMS1T</i>	水稻	[85]
miR2275	<i>CAF1</i>	小麦	[84]
调控种子/果实发育			
miR156	<i>SPLs</i>	水稻、番茄	[42, 86-88]
miR157	<i>SPLs</i>	番茄	[88]
miR168	<i>AGO1</i>	番茄	[74]
miR396	<i>GRF4</i>	水稻	[39, 89]
miR397	<i>LAC</i>	水稻	[90]
miR1432	<i>ACOT</i>	水稻	[91]
miR4376	<i>ACA10</i>	番茄	[92]
调控温度胁迫			
miR159	<i>GAMYB</i>	小麦	[93]
miR167	<i>ARF</i>	小麦	[94]
miR319	<i>PCFs</i>	水稻	[95]
miR396	<i>GRFs</i>	烟草	[96]
调控干旱胁迫			
miR159	<i>MYB55</i>	玉米	[97]
miR162	<i>TRE1</i>	水稻	[98]
miR164	<i>OMTNs</i>	水稻	[99]
miR168	<i>AGO1</i>	玉米	[71]
miR169	<i>NF-YA</i>	玉米、番茄	[100-101]
miR9654	<i>DR733425</i>	小麦	[102]
调控盐胁迫			
miR171	<i>ARFs</i>	小麦	[103]
miR393	<i>TIR1, AFB2</i>	水稻、小麦	[66, 103-104]
miR408	<i>CLP1</i>	小麦	[105]
miR1848	<i>CYP51G3</i>	水稻	[106]
调控养分吸收			
miR166	<i>RDD1</i>	水稻	[107]
miR399	<i>LTN1, PHO2</i>	水稻、玉米	[107-109]
miR827	<i>SPX-MFSs</i>	水稻	[110]
调控免疫应答			
miR159	<i>HiC-15</i>	棉花	[111]
miR164	<i>NAC21/22</i>	小麦	[112]
miR166	<i>CLP-1</i>	棉花	[111]
miR168	<i>AGO1</i>	水稻	[113]
miR319	<i>PCFs, TCP21</i>	水稻	[114]
miR398	<i>SODs</i>	水稻、大麦	[115-116]
miR408	<i>CLP1</i>	小麦	[80]
miR444	<i>MADSs</i>	水稻	[117]

续表1

miRNA	miRNA靶基因	物种	参考文献
miR482	<i>NB - LRRs</i>	番茄	[118]
miR528	<i>AO</i>	水稻	[119]
miR5300	<i>NB - LRRs</i>	番茄	[118]
miR6024	<i>NB - LRRs</i>	番茄	[120]
miR7695	<i>NRAMP6</i>	水稻	[121]
miR9863	<i>MLAI</i>	大麦	[122]
调控其他方面			
miR159 (拔节)	<i>GAMYB</i>	水稻	[81]
miR160 (侧根生长)	<i>ARFs</i>	大豆	[123]
miR164 (侧根生长)	<i>NAC1</i>	玉米	[124]
miR166 (叶极性)	<i>RLD1</i>	玉米	[41]
miR319 (结球特性)	<i>TCPs</i>	大白菜	[125]
miR395 (硫酸盐稳态)	<i>SULTR2</i>	烟草	[126]
miR528 (抗倒伏)	<i>LAC3, LAC5</i>	玉米	[127]
miR828 (纤维生长)	<i>MYB2D</i>	棉花	[128]
miR858 (花青素积累)	<i>MYB</i>	番茄	[129]
miR1848 (蜡质合成)	<i>CYP51G3</i>	水稻	[130]
miR2111 (根部结瘤)	<i>TML</i>	百脉根	[131]

2.1 调控作物株型的miRNA

植物的株型与产量密切相关, 植物的株型包括植物的分支模式、株高、叶片形状和排列方式(叶夹角)以及穗型等方面. 为了筛选出高产的水稻品种, 人们定义了理想株型的概念: 在理想的株型中, 分蘖数少但几乎都是有效分蘖; 穗大且籽粒多; 茎粗壮^[132]. 目前已经鉴定出了一些与植物株型相关的基因, 这些基因当中, 有相当一部分已被证明受到miRNA的调控.

禾本科植物的株型大部分由其分支模式决定, 其中分蘖发生在营养生长期, 穗分支则在生殖生长期, 它们的模式与产量密切相关. 在水稻中, miR156、miR529及miR172协同调控了其分支模式^[65]. 其中miR156和miR529通过靶向*SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE)*家族的基因, 调控水稻的分蘖及穗分支, 而miR172则通过靶向*AP2 (APETALA2)*家族的基因调控水稻的分蘖及穗分支. miR156和miR529能使水稻的分蘖数增多, 但是也会使它的穗变小, 小穗的数目减少, 它们负调控花序分生组织的活性及穗分支起始. miR172与分蘖数无关, 但它也会使小穗的数目变少, 它负调控花向小穗的转变. 小麦的miR156与水稻miR156有着相似的作用, 也起到促进分蘖及抑制小穗形成的作用^[33], 其miR529和miR172也可能起着与水稻中相似的作用. 分蘖是受

多基因控制的性状, 多个miRNA参与调控这些基因, 如miR393和miR444. 其中miR393通过靶向两个生长素受体基因, *TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1)*和*AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2)*, 正调控水稻的分蘖数^[66]. miR444则抑制分蘖^[70], 其机制是: miR444抑制*MADS57*的表达, 而*MADS57*是*D14 (Dwarf14)*的表达抑制子, 在miR444过量的情况下, *D14*的表达量增多, 从而抑制水稻的分蘖. 另外, *TBI (TEOSINTE BRANCHED1)*与*MADS57*相互作用会降低*MADS57*对*D14*表达的抑制, 使*D14*的表达量增多. 因此, *TBI*基因也是水稻分蘖的负调控因子.

miR393除了调控分蘖外, 还与miR394、miR396等一起调控叶夹角. 其中miR393通过靶向*TIR1*、*AFB2*基因的转录本, 正向调控旗叶的叶夹角^[67]. 而miR394通过靶向一个F-box基因*LC4 (LEAF INCLINATION 4)*负调控叶夹角^[68]. miR396与miR393相似, 也正调控叶夹角, 此外miR396还负调控株高, 它在水稻中的靶基因是*GRF6 (GROWTH REGULATING FACTOR 6)*, 通过赤霉素和类固醇信号途径起到调控株型的作用^[69]. 与分蘖和叶夹角相似, 穗型和株高也受到多个miRNA的调控. 如miR164通过靶向*NAC2 (NAC-REGULATED SEED MORPHOLOGY 2)*负调控穗的大小, 过表达miR164会减少穗的长度及籽

粒产量, 而过表达抗 miR164 的靶基因模拟序列 (target mimic), 会增加穗长及籽粒产量^[62]; miR398 与 miR172 则是正调控穗的大小, 沉默它们后, 穗都会变短. 其中 miR398 沉默株系穗变得短小, 籽粒变少变轻, 还会产生晚花的现象, 而过表达则结果相反, 而 miR172 沉默株系则只会使穗变短, 但籽粒却变得更密集^[133]. miR156 与 miR396 都有调控多个性状的作用, 且它们都负调控株高^[42]. 除了它们两个外, miR171 也是株高的负调控因子, 在过表达 miR171 的番茄株系中, 植株矮化且果实产量变少^[64]. 另外, miR166 也参与植物株型的调控. miR166 通过靶向 *HB4* (*HOMEODOMAIN CONTAINING PROTEIN4*) 来调控水稻叶片的形状和木质部的大小, 在 miR166 表达沉默的植株中, 叶子卷曲且茎秆的木质部直径变小^[63]. 植物的株型是一个复合性状, 包含株高、分支模式、叶夹角等多个方面, 由多个基因共同调控决定, 这些基因的表达同时也在转录后水平受多个 miRNA 共同调控. 不同的 miRNA 可能通过协同作用或拮抗作用调控同一个性状, 同一个 miRNA 也可能具有多种功能, 参与调控多个不同的性状. 如 miR156 和 miR529 通过 *SPL* 基因协同促进作物的分蘖^[65], 而 miR444 则通过 *MADS57* 基因抑制分蘖^[70], 与它们形成拮抗关系. 同一个性状由多个 miRNA 共同调控, 可能使植物通过多个途径去改变这个性状, 更快地适应环境变化. 同一个 miRNA 也可能通过不同靶基因调控多个性状, 如 miR393 参与分蘖、叶夹角等性状的调控, 其中分蘖性状是与 miR156 等共同调控的, 而叶夹角性状则是与 miR394 等共同调控的. 这些 miRNA 与它们的靶基因一起构成复杂的调控网络, 在不同的环境中精确地控制植物的株型, 使其更好地适应外界环境.

2.2 调控作物花期的 miRNA

在高等植物的生命周期中, 开花是一个非常关键的事件. 植物从营养生长期到开花的转变受到严格的控制, 这关系到它们的繁殖是否成功. 为保证在最有利的条件下开花结果, 植物进化出复杂的调控网络, 它整合了内源性的信号和环境信号, miRNA 是其中的一个重要调控因子^[134]. 在调控作物花期的 miRNA 中, miR172 的研究比较透彻, 在拟南芥中其靶基因是 *AP2* 转录因子^[26]. miR172 在营养生长期表达量很低, 随着开花的进程表达量逐渐升高. 过表达 miR172 能够抑制 *AP2* 的翻译, 从而导致植物早花^[135]. 在玉米^[76]、大豆^[78]、土

豆^[79] 和水稻^[75] 等作物中也有类似研究. 以水稻的 miR172 为例, *Hd3a* (*Heading date 3a*) 和 *RFT1* (*Rice Flowering Locus T 1*) 编码水稻的成花素合成基因, 它们能够促进水稻开花. *Ehd1* (*Early heading date 1*) 是 *Hd3a* 和 *RFT1* 上游的正调控子, miR172 是通过抑制 *AP2* 家族的两个成员 *IDS1* (*INDETERMINATE SPIKELET 1*) 和 *SNB* (*SUPERNUMERARY BRACT*) 的表达, 使 *Ehd1* 表达增多, 从而导致成花素合成基因表达升高, 使水稻的花期提前. miR156 是个多功能的 miRNA, 它在植物中高度保守^[136], 除了调控作物的分蘖外, 在调控作物的花期方面也起着重要的作用. 在水稻和玉米过表达 miR156 的株系中, 植株花期延迟^[43, 71]. 此外, 在柳枝稷中过表达玉米的 miR156 也会使其花期延迟^[137]. 在拟南芥和大白菜中 miR156 也有延长花期的作用^[73, 138], 说明它的功能在植物中与 miR172 一样也是保守的, 而且两者可能存在着拮抗作用. 在拟南芥中, miR156 在幼年期的表达量较成年期高, 而 miR172 则刚好相反. 通过 *SPL* 基因的衔接 (有些 *SPL* 基因, 如 *AtSPL9*、*AtSPL10* 能直接激活 miR172 从而促进植物的生长发育和开花), 它们在调控生长发育的时间上有着连续的作用^[139]. 除了 miR156 和 miR172 外, 作物中还有其他的 miRNA 在调控花期上起作用. 过表达 miR393 的水稻株系出现了早花的现象, 说明它能使花期提前^[66]. 在番茄中, 沉默 miR168 能够使它的开花时间延后^[74]; 在小麦中, 过表达 miR408 的植株抽穗时间提前等^[80]. 开花是植物生命周期的关键事件, 由多个途径共同参与调控, miRNA 与其靶基因构成复杂的调控网络参与这些途径, 在同一时期或不同时期发挥调控作用. 如 miR172 和 miR156 通过 *SPL* 基因的衔接, 分别作为正调控因子和负调控因子在时间上连续调控花期. 随着植物的生长, miR156 的表达水平逐渐下调, 使其靶基因 *SPL* 表达水平升高, 进一步激活 miR172 从而抑制 *AP2* 的表达, 最终使植物顺利完成开花. 不同 miRNA 通过靶基因精确地调控着植物的花期, 使其能够正常生长发育繁衍后代. 研究 miRNA 调控花期的机制对确保作物正常繁殖及缩短作物的生长期具有重要意义.

2.3 调控作物育性的 miRNA

植物的育性关系到其能否产生后代, 是植物繁殖过程中的关键性状之一. 但在作物育种研究中, 通常需要通过雄性不育的株系, 培育杂交品种的作

物, 利用杂交优势提高作物的产量^[140]. 雄性不育分两种: 细胞质雄性不育 (CMS) 和遗传性雄性不育 (GMS). CMS 产生的原因: 线粒体和细胞核的相互作用, 产生了无法存活的花粉^[141], 导致 CMS 的基因位于线粒体基因组中, 但它们的表达受到 *Rf* (*restorer of fertility*) 基因的调控^[142]. GMS 的机制目前还不是很清楚, 但近年来的研究发现, 非编码 RNA 在 GMS 复杂的调控过程中起着重要作用, 它可能充当了细胞核与线粒体间信使的角色^[143]. 目前, 有关调控作物雄性育性 miRNA 的报导较少, 其中一个重要的是 miR2118^[85]. 长日照条件下, 水稻的光周期敏感的雄性不育 (PSMS) 株系中, miR2118 通过靶向 *PMSIT*, 一个长链的非编码 RNA, 产生一系列 21 nt 的 phasiRNA, 使这种 phasiRNA 特异地积累在 PSMS 系的水稻中, 这些 phasiRNA 可能作用于 *Rf* 基因, 进而调控 PSMS. 水稻中另一个影响雄性育性的 miRNA 是 miR159^[81]. 据研究 miR159 影响了水稻花药的发育, 在水稻中过表达 miR159 会导致它的花发育畸形, 雄蕊里面没有花粉. 另外, 在水稻中过表达小麦的 miR159, 即 *tae-miR159* 也会导致水稻雄性不育^[82]. 最近研究发现, miR1227 和 miR2275 可能与小麦的雄性不育相关. miR1227 和 miR2275 分别靶向 *CAF1* (*CCR4-associated factor 1*) 和 *SMARCA3L3* (*SWI/SNF - related matrix - associated actin - dependent regulator of chromatin subfamily A, member 3-like 3*), 这 2 个基因都与减数分裂有关. *CAF1* 和 *SMARCA3L3* 参与了 DNA 修复及转录, 以维持染色体和基因组在减数分裂过程中的完整性, 使减数分裂正常进行^[84]. 此外, 番茄中过表达 miR167 会引起花发育的缺陷及雄性不育^[83], 其靶基因是生长素响应因子 *ARF6* (*Auxin Response Factor 6*) 和 *ARF8* (*Auxin Response Factor 8*), 在拟南芥中 *ARF6* 和 *ARF8* 的作用是促进花序茎伸长及后期雄蕊雌蕊发育^[144]. 除此之外, 通过建库、高通量测序等方法也发现了一些在雄性不育系和它们保持系间差异表达的 miRNA, 它们也可能参与了作物雄性育性的调控, 如玉米的 miR397、miR601、miR604^[145], 水稻的 miR528、miR1432^[146], 大豆的 miR169、miR171、miR397、miR408^[147] 等. 上述调控育性的 miRNA 基本都与植物的花发育相关, 而在花发育过程中, 无论是 21 nt 还是 24 nt 的 phasiRNA 均在花序中大量表达^[148-149]. 如在玉米和非洲水稻中, 21 nt 的 phasiRNA 在花药减数分裂前

期会在花粉囊中积累, 而在减数分裂期, 24 nt 的 phasiRNA 则聚集在绒毡层和性母细胞中, 这种 phasiRNA 积累的现象会持续到花粉性细胞成熟和单倍体配体分化成花粉. 其中 21 nt 的 phasiRNA 由 miR2118 触发产生, 而 24 nt 的 phasiRNA 由 miR2275 触发产生^[150-151], 这两种 miRNA 都参与调控了作物的育性^[84-85]. 其中由 miR2118 触发产生 21 nt 的 phasiRNA 已被证明与水稻的光周期敏感的雄性不育相关^[85], 其他的 miRNA 调控育性的机制目前虽然还不是很清楚, 可能也与 phasiRNA 有关. 植物育性是其繁殖后代的关键, 其背后必然存在一个复杂的调控网络, 虽然现在有关 miRNA 调控育性的报道不多, 但 miRNA 在其中所起的重要作用不可忽视, 有关 miRNA 调控作物育性的机制亟待研究.

2.4 调控作物种子/果实发育的miRNA

种子是植物生长的基础, 也是农业生产中重要的生产资料, miRNA 在种子发育过程中也起着重要的作用. miRNA 可以通过多种途径调控种子的发育, 如信号转导 (ABA、生长素、油菜素甾醇等)、淀粉合成、抗氧化作用、糖转化、细胞生长等^[152]. 研究发现在萌发的种子中 miR159 能够负调控 ABA 信号的正向调控因子 *MYB33* 和 *MYB101*, 说明 miR159 可能通过 ABA 信号途径调控种子的发育^[153]. 此外, miR159 在水稻劣质籽粒中的表达量高于优势籽粒^[154], 而且在灌浆期对水稻进行 ABA 处理可以加快细胞分裂、增加细胞数量、提高灌浆率, 从而增加劣势籽粒的重量^[155]. 这表明 miR159 可能通过调控种子对 ABA 信号的转导, 而影响了种子的灌浆. miR164 在发育的小麦种子中的表达量呈上升趋势^[156], miR167 在玉米种子中的表达量很高^[157], 且它们的靶基因均是生长素信号途径相关的基因^[12], 说明它们可能通过生长素途径调控种子的发育. 在水稻中过表达 miR397 会使籽粒增大, 且促进穗分枝, 从而使水稻的产量升高. miR397 的靶基因为 *LAC* (*LACCASE*) 编码类漆酶蛋白, 参与油菜素甾醇信号转导, 说明 miRNA397 很可能通过油菜素甾醇信号转导途径调控种子的发育^[90].

还有一些 miRNA 是通过调控细胞生长的相关途径影响种子发育. 比如 miR156, 它是个多功能的 miRNA, 除了上文提到的调控水稻的分蘖外, 它在调控水稻籽粒的大小、质量、形状方面也有重要的作用. miR156 通过它的靶基因 *SPL* 家族基因来行使它的功能, 如通过 *OsSPL14* 来调控籽粒的产

量^[42], 通过 *OsSPL13*、*OsSPL16* 来控制籽粒的大小、质量及形状等. *OsSPL13* 能在谷壳中正调控细胞的大小, 从而使水稻的籽粒长度增加且提高了籽粒的产量^[87]. 而 *OsSPL16* 则是细胞增殖的正调控子, 它能促进细胞分化和籽粒的灌浆, 从而增加籽粒的宽度和产量^[86]. 与 miR156 相似, miR396 也是籽粒产量的负调控因子, 它通过 miR396-*OsGRF4* (*GROWTH - REGULATING FACTOR 4*) - *OsGIF1* (*GRF-interacting factors 1*) 模式调控籽粒的大小^[39, 89]. 在过表达 miR396 的水稻中, 籽粒的大小和重量都下降了, 说明 miR396 是籽粒长度和宽度的负调控子, 且它是通过抑制细胞扩张来调控籽粒大小的. 另外, *OsGRF4* 能与激活因子 *OsGIF1* 互作, 且增加 *OsGIF1* 的表达量也会增加籽粒的大小. 此外, miR1432 也是籽粒的负调控因子, 在抑制 miR1432 的植株中, 籽粒的总产量增加了^[91].

在番茄中, miR156、miR157、miR168 和 miR4376 被报道参与果实发育的调控. miR156 和 miR157 均靶向 *SPL* 家族的基因, *LeSPL-CNR*, 它们参与调控番茄果实的成熟. 其中 miR157 与果实成熟的起始相关, 而 miR156 则与果实成熟后的软化相关^[88]; 而 miR168 通过靶向 *AGO1* 来调控果实的起始和发育^[74]; miR4376 则通过靶向 *ACA10* (*autoinhibited Ca²⁺-ATPase 10*), 一种 Ca^{2+} -ATPase 来调控果实的发育^[92]. 在草莓中过表达 miR399 能使其中葡萄糖、果糖及可溶性物质增多, 从而改善果实的品质^[158]. 另外, miR408、miR1867 等可能通过抗氧化、糖转化、淀粉合成等途径参与种子发育的调控^[152, 159]. 协同调控种子果实发育的 miRNA 应该存在着功能冗余的情况, 以确保种子果实正常发育.

种子果实的发育好坏关系着植物繁殖的成功与否, 其背后必然有着一个复杂精细的调控网络, 参与调控该过程的 miRNA 与其靶基因是其中重要的一环. 这些 miRNA 与靶基因中, 有的可能是上下游关系, 有的可能是协同或者相互拮抗的关系, 具体的调控网络还有待进一步揭示. miR156、miR159、miR396、miR1432 等均对籽粒大小有负调控的作用, 它们可能协同负调控籽粒的大小, 而 miR164、miR397 等则与它们的作用相反.

2.5 调控作物抗逆性状形成的 miRNA

农作物每年减少的产量中有 70% 与生物和非生物胁迫相关, 其中非生物胁迫占 50% 以上^[160]. 研究作物抗胁迫的机理, 对提高作物产量有很大的

帮助. miRNA 是作物应对逆境胁迫的主要调控因子, 它已经成为一种具有巨大潜力的遗传工具, 可以利用它来理解作物在分子水平胁迫适应机理, 并用于基因工程来提高作物的抗逆能力.

在生长和发育期间, 作物可能会经历洪水、干旱、极端温度、营养不平衡或盐分等逆境, 越来越多的研究发现, miRNA 在作物应对这些逆境的过程中发挥着重大的作用. 在水稻^[95]、小麦^[93]、大麦^[161]、棉花^[162]、烟草^[96] 等作物中均已有报道对温度胁迫响应的 miRNA. 其中响应冷胁迫的有 miR167、miR319、miR396、miR444 等, 它们中 miR319 和 miR396 都是通过活性氧 (ROS) 的水平来响应冷胁迫, 且 miR319 和 miR396 的过表达植株的冷胁迫耐受力增强^[95-96]. 响应热胁迫的 miRNA 则有 miR159、miR160、miR166、miR167 等, 其中在小麦中过表达 miR159 会使它的对热胁迫更敏感^[93].

在水稻、小麦、番茄、玉米等作物中也已有响应干旱胁迫 miRNA 的报道, 但具体作用机制仍不清楚. 在干旱胁迫的小麦中, miR10 和 miR9654 的表达量上调^[102]. 在干旱胁迫条件下, miR159、miR398、miR408、miR528 等在耐旱品种的水稻中上调, 而在敏感的品种中下调. 这些 miRNA 的靶基因有些是编码铜蛋白的, 它们可能通过下调铜蛋白的含量使体内活性氧 (ROS) 增多, 进而使气孔关闭程度增加以提高抗旱能力^[35]. 此外, miR162 能通过它的靶基因 *TRE1* (*TREHALASE 1*) 增强水稻的抗旱能力^[98], 而 miR164 则可能通过它的靶基因, 几个 *OMTN* (*Oryza miR164-targeted NAC*) 基因来增强水稻的抗旱能力^[99]. 玉米中 miR159、miR168、miR169 在响应干旱胁迫过程中起着重要作用^[97, 101]. 在番茄中过表达 miR169 会使它的气孔开放程度变小, 从而增加它的抗旱能力^[100]. 在大麦中过表达 miR827 也可以提高它的抗旱能力^[163].

对于调控盐胁迫的 miRNA, 人们也已在多种作物中有过研究, 但是具体机制仍不清楚. 如水稻的 miR393、miR1848^[66, 106], 小麦的 miR171、miR393 和 miR408 等^[103-105], 玉米的 miR164、miR167 等^[164], 大麦的 miR168、miR171、miR444 等^[165]. miRNA 在作物遭受营养不足时也起着重要的调控作用, 如 miR166、miR399 和 miR827 等^[40, 107-108, 110]. 值得一提的是, miR166 与营养离子的吸收和积累有关, 它的靶基因 *RDD1* (*Dof daily fluctuations 1*) 过表达时会提高水稻籽粒的产量.

最近研究发现, 玉米中 *PILNCR1* 会抑制 miR399 对 *PHO2* (*PHOSPHATE2*) mRNA 的切割. miR399/*PILNCR1* 模块对玉米耐受低磷胁迫有着重要的调控作用^[109].

除了上述几种逆境胁迫外, miRNA 在调节植物免疫应答方面也有重要的作用, 使得植物在病毒、细菌、真菌及虫害等生物胁迫的条件下生存下来. 如水稻的 miR168、miR319、miR398 等^[113-114, 117], 小麦的 miR164、miR408^[80, 112], 大麦的 miR398、miR9863^[116, 122], 番茄的 miR482、miR5300、miR6024^[118, 120], 棉花的 miR159、miR166、miR482 等^[111] 在作物应对病原菌侵害的过程中起着重要的调控作用.

综上所述, miRNA 参与多种生物胁迫和非生物胁迫过程, 在作物的逆境胁迫适应和抗逆性状形成中起着非常重要的作用. 不同的 miRNA 可能共同参与应答调控同一种胁迫, 同一个 miRNA 也可能在多个胁迫应答中都发挥作用. 研究 miRNA 及其靶基因应对这些逆境胁迫的机理, 对改良作物性状、提高作物的抗逆能力以及最终提高作物的产量和品质有着很大的帮助.

2.6 调控作物其他性状的miRNA

除了上述性状外, miRNA 在调控作物的其他性状方面也有着重要的作用. 如水稻中 miR159 参与调控拔节^[81], miR1848 参与调控蜡质的生物合成过程^[130], 玉米 miR164 参与调控侧根的生长^[124], 玉米 miR166 参与叶极性的决定^[41], 玉米 miR528 通过调控木质素合成影响其抗倒伏性等^[127], 棉花 miR828 和 miR858 参与调控纤维的生长^[128], 大豆 miR160 参与调控侧根的生长^[124], 大白菜中 miR319 通过调控叶片中的细胞分化影响其结球特性^[125], 烟草 miR395 参与调控体内硫酸盐的稳态^[126], 番茄中 miR858 参与调控花青素的积累^[129], miR2111 参与调控百脉根的结瘤^[131] 等等. miRNA 的功能多样化, 几乎参与调控了植物各个方面性状的调控, 对植物的生长发育和抗逆性状形成具有重要意义. 研究 miRNA 的作用机制, 揭示其关键靶基因和下游基因调控网络, 结合基因工程的手段, 通过遗传转化和分子设计育种能有效改变作物的性状, 为改良作物重要性状提供基础研究材料及理论支持.

3 miRNA在改良作物性状中的应用前景和展望

目前, miRNA 已成为分子生物学领域的研究

热点, 在植物中已经有大量的 miRNA 被发现和鉴定, 随着研究手段的不断进步, 越来越多植物 miRNA 的生物学功能及分子作用机制也将逐渐得以阐明, 这些 miRNA 参与植物的生长发育、新陈代谢以及胁迫响应等多个过程, 表明 miRNA 及其靶基因在作物性状改良方面具有不可低估的应用潜能. 一些影响作物重要农艺性状 (如产量、株型、育性等) 的 miRNA 陆续被发现, 如 miR156 调控分蘖数、株高、花期和籽粒大小^[65], miR396 调控叶夹角、株高和籽粒大小^[89], miR2118 调控育性等^[85]. 基于 miRNA 的分子设计育种可通过增加农作物的胁迫耐受性、增加作物产量、提高品质等方面来发展优良的作物品种, 从而提高边际土地的利用率, 减少农药的使用量, 促进农业生产力可持续发展. 另外, miRNA 的相关理论也可应用于作物杂交育种. 研究发现, 水稻、小麦等的杂交品种与它们的亲本相比, miRNA 的整体表达量下调^[166-167]. 研究与杂种优势相关的 miRNA 将有助于作物育种者选择最佳的杂交后代组合, 以产生商业上可用的 F1 代杂交品种^[36]. 还有一些与育性相关的 miRNA, 如 *Osa-miR2118*^[85], 预示 miRNA 也可应用在培育雄性不育系作物上. 此外, CRISPR/Cas9 基因编辑技术在作物 miRNA 及其靶基因上的应用^[59, 168], 使获得性状发生改良且不含转基因成分的遗传材料成为可能, miRNA 在作物性状的分子育种改良中具有广阔的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, **75**(5): 843-854
- [2] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, **403**(6772): 901-906
- [3] Slack F J, Basson M, Liu Z, et al. The *lin-41 RBCC* gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Molecular Cell*, 2000, **5**(4): 659-669
- [4] Brennecke J, Hipfner D R, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 2003, **113**(1): 25-36
- [5] Hipfner DR, Weigmann K, Cohen SM. The bantam gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics*, 2002, **161**(4): 1527-1537
- [6] Pasquinelli A E, Reinhart B J, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 2000, **408**(6808): 86-89

- [7] Llave C, Kasschau K D, Rector M A, *et al.* Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell*, 2002, **14**(7): 1605-1619
- [8] Park W, Li J, Song R, *et al.* CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 2002, **12**(17): 1484-1495
- [9] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, *et al.* MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, 2002, **16**(13): 1616-1626
- [10] Rogers K, Chen X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 2013, **25**(7): 2383-2399
- [11] Nozawa M, Miura S, Nei M. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biology and Evolution*, 2012, **4**(3): 230-239
- [12] Jones-Rhoades M W, Bartel D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 2004, **14**(6): 787-799
- [13] Dong Z, Han M H, Fedoroff N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate *in vitro* processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(29): 9970-9975
- [14] Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *Rna*, 2006, **12**(2): 206-212
- [15] Ren G, Xie M, Dou Y, *et al.* Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(31): 12817-12821
- [16] Sanei M, Chen X. Mechanisms of microRNA turnover. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, **27**: 199-206
- [17] Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 2011, **12**(2): 99-110
- [18] Ha M, Kim V N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, **15**(8): 509-524
- [19] Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, *et al.* Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 2015, **6**: 208
- [20] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009, **136**(4): 669-687
- [21] Schwab R, Palatnik J F, Riester M, *et al.* Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 2005, **8**(4): 517-527
- [22] Kidner C A. The many roles of small RNAs in leaf development. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, **37**(1): 13-21
- [23] Palatnik J F, Wollmann H, Schommer C, *et al.* Sequence and expression differences underlie functional specialization of *Arabidopsis* microRNAs miR159 and miR319. *Developmental Cell*, 2007, **13**(1): 115-125
- [24] Kutter C, Schob H, Stadler M, *et al.* MicroRNA-mediated regulation of stomatal development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2007, **19**(8): 2417-2429
- [25] Xie Q, Guo H S, Dallman G, *et al.* *SINAT5* promotes ubiquitin-related degradation of *NAC1* to attenuate auxin signals. *Nature*, 2002, **419**(6903): 167-170
- [26] Chen X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 2004, **303**(5666): 2022-2025
- [27] Achard P, Herr A, Baulcombe D C, *et al.* Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 2004, **131**(14): 3357-3365
- [28] Sunkar R, Li Y F, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 2012, **17**(4): 196-203
- [29] Takeda S, Matsuoka M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nature Reviews Genetics*, 2008, **9**(6): 444-457
- [30] Lombardo L, Coppola G, Zelascos S. New technologies for insect-resistant and herbicide-tolerant plants. *Trends in Biotechnology*, 2016, **34**(1): 49-57
- [31] Bonnet E, Wuyts J, Rouze P, *et al.* Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(31): 11511-11516
- [32] Sunkar R, Girke T, Jain P K, *et al.* Cloning and characterization of microRNAs from rice. *The Plant Cell*, 2005, **17**(5): 1397-1411
- [33] Song Q X, Liu Y F, Hu X Y, *et al.* Identification of miRNAs and their target genes in developing soybean seeds by deep sequencing. *BMC Plant Biology*, 2011, **11**: 5
- [34] Liu H, Qin C, Chen Z, *et al.* Identification of miRNAs and their target genes in developing maize ears by combined small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics*, 2014, **15**: 25
- [35] Balyan S, Kumar M, Mutum R D, *et al.* Identification of miRNA-mediated drought responsive multi-tiered regulatory network in drought tolerant rice, *Nagina 22*. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 15446-15450
- [36] Tang J, Chu C. MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits. *Nature Plants*, 2017, **3**: 17077
- [37] Li S, Le B, Ma X, *et al.* Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes in *Arabidopsis*. *eLife*, 2016, **5**: doi: 10.7554/eLife.22750
- [38] Debernardi J M, Mecchia M A, Vercruyssen L, *et al.* Post-transcriptional control of GRF transcription factors by microRNA miR396 and *GIF* co-activator affects leaf size and longevity. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*, 2014, **79**(3): 413-426
- [39] Duan P, Ni S, Wang J, *et al.* Regulation of *OsGRF4* by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. *Nature Plants*, 2015, **2**: 15203
- [40] Iwamoto M, Tagiri A. MicroRNA-targeted transcription factor gene *RDD1* promotes nutrient ion uptake and accumulation in rice. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*, 2016, **85**(4): 466-477
- [41] 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
- [42] Jiao Y, Wang Y, Xue D, *et al.* Regulation of *OsSPL14* by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nature Genetics*, 2010,

- 42(6): 541-544
- [43] Xie K, Wu C, Xiong L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiology*, 2006, **142**(1): 280-293
- [44] Schwab R, Ossowski S, Riester M, *et al.* Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2006, **18**(5): 1121-1133
- [45] Zhou M, Luo H. MicroRNA-mediated gene regulation: potential applications for plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 2013, **83**(1-2): 59-75
- [47] Franco-Zorrilla J M, Valli A, Todesco M, *et al.* Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, 2007, **39**(8): 1033-1037
- [46] Tang G, Yan J, Gu Y, *et al.* Construction of short tandem target mimic (STTM) to block the functions of plant and animal microRNAs. *Methods*, 2012, **58**(2): 118-125
- [48] Tang G, Tang X. Short tandem target mimic: a long journey to the engineered molecular landmine for selective destruction/blockage of microRNAs in plants and animals. *Journal of Genetics and Genomics*, 2013, **40**(6): 291-296
- [49] Cao D, Wang J, Ju Z, *et al.* Regulations on growth and development in tomato cotyledon, flower and fruit *via* destruction of miR396 with short tandem target mimic. *Plant Science*, 2016, **247**: 1-12
- [50] Teotia S, Tang G. Silencing of stress-regulated miRNAs in plants by short tandem target mimic (STTM) approach. *Methods in Molecular Biology*, 2017, **1631**: 337-348
- [51] Teotia S, Zhang D, Tang G. Knockdown of rice microRNA166 by short tandem target mimic (STTM). *Methods in Molecular Biology*, 2017, **1654**: 337-349
- [52] Zhang H, Zhang J, Yan J, *et al.* Short tandem target mimic rice lines uncover functions of miRNAs in regulating important agronomic traits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(20): 5277-5282
- [53] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**(12): 5429-5433
- [54] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, **43**(6): 1565-1575
- [55] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, **315**(5819): 1709-1712
- [56] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816-821
- [57] Li J F, Norville J E, Aach J, *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 688-691
- [58] Feng Z, Zhang B, Ding W, *et al.* Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 2013, **23**(10): 1229-1232
- [59] Zhou J, Deng K, Cheng Y, *et al.* CRISPR-Cas9 based genome editing reveals new insights into microRNA function and regulation in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**: 1598
- [60] Wang H, Wang H. The miR156/SPL module, a regulatory hub and versatile toolbox, gears up crops for enhanced agronomic traits. *Molecular Plant*, 2015, **8**(5): 677-688
- [61] Liu J, Cheng X, Liu P, *et al.* miR156-targeted SBP-Box transcription factors interact with DWARF53 to regulate TEOSINTE BRANCHED1 and BARREN STALK1 expression in bread wheat. *Plant Physiology*, 2017, **174**(3): 1931-1948
- [62] Jiang D, Chen W, Dong J, *et al.* Overexpression of miR164b-resistant *OsNAC2* improves plant architecture and grain yield in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2018, **69**(7): 1533-1543
- [63] Zhang J, Zhang H, Srivastava A K, *et al.* Knockdown of rice microRNA166 confers drought resistance by causing leaf rolling and altering stem xylem development. *Plant Physiology*, 2018, **176**(3): 2082-2094
- [64] Huang W, Peng S, Xian Z, *et al.* Overexpression of a tomato miR171 target gene *SIGRAS24* impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, **15**(4): 472-488
- [65] Wang L, Sun S, Jin J, *et al.* Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(50): 15504-15509
- [66] Xia K, Wang R, Ou X, *et al.* *OsTIR1* and *OsAFB2* downregulation *via* *OsmiR393* overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *Plos One*, 2012, **7**(1): e30039
- [67] Bian H, Xie Y, Guo F, *et al.* Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/*TIR1* homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*). *The New Phytologist*, 2012, **196**(1): 149-161
- [68] Qu L, Lin L B, Xue H W. Rice miR394 suppresses leaf inclination through targeting an F-box gene, *LEAF INCLINATION 4*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018[Epub ahead of print] (DOI: 10.1111/jipb.12713)
- [69] Tang Y, Liu H, Guo S, *et al.* *OsmiR396d* affects Gibberellin and Brassinosteroid signaling to regulate plant architecture in rice. *Plant Physiology*, 2018, **176**(1): 946-959
- [70] Guo S, Xu Y, Liu H, *et al.* The interaction between *OsMADS57* and *OsTBI* modulates rice tillering *via* *DWARF14*. *Nature Communications*, 2013, **4**: 1566
- [71] Chuck G, Cigan A M, Saeteurn K, *et al.* The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, 2007, **39**(4): 544-549
- [72] Tripathi R K, Bregitzer P, Singh J. Genome-wide analysis of the *SPL*/miR156 module and its interaction with the *AP2*/miR172 unit in barley. *Scientific Reports*, 2018, **8**(1): 7085
- [73] Wang Y, Wu F, Bai J, *et al.* *BrpSPL9* (*Brassica rapa ssp. pekinensis* SPL9) controls the earliness of heading time in Chinese cabbage.

- Plant Biotechnology Journal, 2014, **12**(3): 312-321
- [74] Xian Z, Huang W, Yang Y, *et al.* miR168 influences phase transition, leaf epinasty, and fruit development *via* *SLAGO1s* in tomato. Journal of Experimental Botany, 2014, **65**(22): 6655-6666
- [75] Lee Y S, Lee D Y, Cho L H, *et al.* Rice miR172 induces flowering by suppressing *OsIDS1* and *SNB*, two *AP2* genes that negatively regulate expression of *Ehd1* and florigens. Rice, 2014, **7**(1): 31
- [76] Lauter N, Kampani A, Carlson S, *et al.* microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, **102**(26): 9412-9417
- [77] Nair S K, Wang N, Turuspekoy Y, *et al.* Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided *HvAP2* mRNA cleavage. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, **107**(1): 490-495
- [78] Yoshikawa T, Ozawa S, Sentoku N, *et al.* Change of shoot architecture during juvenile-to-adult phase transition in soybean. Planta, 2013, **238**(1): 229-237
- [79] Martin A, Adam H, Diaz-Mendoza M, *et al.* Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. Development, 2009, **136**(17): 2873-2881
- [80] Zhao X Y, Hong P, Wu J Y, *et al.* The *tae-miR408*-mediated control of *TaTOC1* genes transcription is required for the regulation of heading time in wheat. Plant Physiology, 2016, **170**(3): 1578-1594
- [81] Tsuji H, Aya K, Ueguchi-Tanaka M, *et al.* *GAMYB* controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology, 2006, **47**(3): 427-444
- [82] Wang Y, Sun F, Cao H, *et al.* *TamiR159* directed wheat *TaGAMYB* cleavage and its involvement in anther development and heat response. Plos One, 2012, **7**(11): e48445
- [83] Liu N, Wu S, Van Houten J, *et al.* Down-regulation of *AUXIN RESPONSE FACTORS 6* and *8* by microRNA 167 leads to floral development defects and female sterility in tomato. Journal of Experimental Botany, 2014, **65**(9): 2507-2520
- [84] Sun L, Sun G, Shi C, *et al.* Transcriptome analysis reveals new microRNAs-mediated pathway involved in anther development in male sterile wheat. BMC Genomics, 2018, **19**(1): 333
- [85] Fan Y, Yang J, Mathioni S M, *et al.* *PMS1T*, producing phased small-interfering RNAs, regulates photoperiod-sensitive male sterility in rice. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, **113**(52): 15144-15149
- [86] Si L, Chen J, Huang X, *et al.* *OsSPL13* controls grain size in cultivated rice. Nature Genetics, 2016, **48**(4): 447-456
- [87] Wang S, Wu K, Yuan Q, *et al.* Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. Nature Genetics, 2012, **44**(8): 950-954
- [88] Chen W, Kong J, Lai T, *et al.* Tuning *LeSPL-CNR* expression by *SlymiR157* affects tomato fruit ripening. Scientific Reports, 2015, **5**: 7852
- [89] Li S, Gao F, Xie K, *et al.* The *OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1* regulatory module determines grain size and yield in rice. Plant Biotechnology Journal, 2016, **14**(11): 2134-2146
- [90] Zhang Y C, Yu Y, Wang C Y, *et al.* Overexpression of microRNA *OsmiR397* improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. Nature Biotechnology, 2013, **31**(9): 848-852
- [91] Zhao Y F, Peng T, Sun H Z, *et al.* *miR1432-OsACOT (Acyl-CoA thioesterase)* module determines grain yield *via* enhancing grain filling rate in rice. Plant Biotechnology Journal, 2018[Epub ahead of print](DOI: 10.1111/pbi.13009)
- [92] Wang Y, Itaya A, Zhong X, *et al.* Function and evolution of a microRNA that regulates a Ca^{2+} -ATPase and triggers the formation of phased small interfering RNAs in tomato reproductive growth. The Plant Cell, 2011, **23**(9): 3185-3203
- [93] Xin M, Wang Y, Yao Y, *et al.* Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum L.*). BMC Plant Biology, 2010, **10**: 123
- [94] Tang Z, Zhang L, Xu C, *et al.* Uncovering small RNA-mediated responses to cold stress in a wheat thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing. Plant Physiology, 2012, **159**(2): 721-738
- [95] Yang C, Li D, Mao D, *et al.* Overexpression of microRNA319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa L.*). Plant, Cell & Environment, 2013, **36**(12): 2207-2218
- [96] Chen L, Luan Y, Zhai J. Sp-miR396a-5p acts as a stress-responsive genes regulator by conferring tolerance to abiotic stresses and susceptibility to *Phytophthora nicotianae* infection in transgenic tobacco. Plant Cell Reports, 2015, **34**(12): 2013-2025
- [97] Wang Y G, An M, Zhou S F, *et al.* Expression profile of maize microRNAs corresponding to their target genes under drought stress. Biochemical Genetics, 2014, **52**(11-12): 474-493
- [98] Tian C, Zuo Z, Qiu J L. Identification and characterization of ABA-responsive microRNAs in rice. Journal of Genetics and Genomics, 2015, **42**(7): 393-402
- [99] Fang Y, Xie K, Xiong L. Conserved miR164-targeted *NAC* genes negatively regulate drought resistance in rice. Journal of Experimental Botany, 2014, **65**(8): 2119-2135
- [100] Zhang X, Zou Z, Gong P, *et al.* Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. Biotechnology Letters, 2011, **33**(2): 403-409
- [101] 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
- [102] Chen X Y, Yang Y, Ran L P, *et al.* Novel insights into miRNA regulation of storage protein biosynthesis during wheat caryopsis development under drought stress. Frontiers in Plant Science, 2017, **8**: 1707
- [103] Wang B, Sun Y F, Song N, *et al.* MicroRNAs involving in cold, wounding and salt stresses in *Triticum aestivum L.* Plant Physiology and Biochemistry : PPB, 2014, **80**: 90-96
- [104] Gupta O P, Meena N L, Sharma I, *et al.* Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. Molecular Biology Reports, 2014, **41**(7): 4623-4629
- [105] Feng H, Zhang Q, Wang Q, *et al.* Target of *tae-miR408*, a chemocyanin-like protein gene (*TaCLPI*), plays positive roles in

- wheat response to high-salinity, heavy cupric stress and stripe rust. *Plant Molecular Biology*, 2013, **83**(4-5): 433-443
- [106] Xia K, Ou X, Tang H, *et al.* Rice microRNA osa-miR1848 targets the obtusifoliol 14 α -demethylase gene *OsCYP51G3* and mediates the biosynthesis of phytosterols and brassinosteroids during development and in response to stress. *The New Phytologist*, 2015, **208**(3): 790-802
- [107] Hu B, Zhu C, Li F, *et al.* *LEAF TIP NECROSIS1* plays a pivotal role in the regulation of multiple phosphate starvation responses in rice. *Plant Physiology*, 2011, **156**(3): 1101-1115
- [108] Hu B, Wang W, Deng K, *et al.* MicroRNA399 is involved in multiple nutrient starvation responses in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2015, **6**: 188
- [109] Du Q, Wang K, Zou C, *et al.* The *PILNCR1*-miR399 regulatory module is important for low phosphate tolerance in maize. *Plant Physiology*, 2018, **177**(4): 1743-1753
- [110] Lin S I, Santi C, Jobet E, *et al.* Complex regulation of two target genes encoding SPX-MFS proteins by rice miR827 in response to phosphate starvation. *Plant & Cell Physiology*, 2010, **51**(12): 2119-2131
- [111] Zhang T, Zhao Y L, Zhao J H, *et al.* Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants*, 2016, **2**(10): 16153
- [112] Feng H, Duan X, Zhang Q, *et al.* The target gene of taе-miR164, a novel *NAC* transcription factor from the *NAM* subfamily, negatively regulates resistance of wheat to stripe rust. *Molecular Plant Pathology*, 2014, **15**(3): 284-296
- [113] Wu J, Yang Z, Wang Y, *et al.* Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA. *eLife*, 2015, **4**: doi: 10.7554/eLife.05733
- [114] Zhang C, Ding Z, Wu K, *et al.* Suppression of jasmonic acid-mediated defense by viral-inducible microRNA319 facilitates virus infection in rice. *Molecular Plant*, 2016, **9**(9): 1302-1314
- [115] Li Y, Lu Y G, Shi Y, *et al.* Multiple rice microRNAs are involved in immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Physiology*, 2014, **164**(2): 1077-1092
- [116] Xu W, Meng Y, Wise R P. Mla- and Rom1-mediated control of microRNA398 and chloroplast copper/zinc superoxide dismutase regulates cell death in response to the barley powdery mildew fungus. *The New Phytologist*, 2014, **201**(4): 1396-1412
- [117] Wang H, Jiao X, Kong X, *et al.* A signaling cascade from miR444 to *RDRI* in rice antiviral RNA silencing pathway. *Plant Physiology*, 2016, **170**(4): 2365-2377
- [118] Ouyang S, Park G, Atamian H S, *et al.* microRNAs suppress NB domain genes in tomato that confer resistance to *Fusarium oxysporum*. *Plos Pathogens*, 2014, **10**(10): e1004464
- [119] Wu J, Yang R, Yang Z, *et al.* ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice. *Nature Plants*, 2017, **3**: 16203
- [120] Wei C, Kuang H, Li F, *et al.* The I2 resistance gene homologues in *Solanum* have complex evolutionary patterns and are targeted by miRNAs. *BMC Genomics*, 2014, **15**: 743
- [121] Campo S, Peris-Peris C, Sire C, *et al.* Identification of a novel microRNA (miRNA) from rice that targets an alternatively spliced transcript of the *Nramp6* (*Natural resistance-associated macrophage protein 6*) gene involved in pathogen resistance. *The New Phytologist*, 2013, **199**(1): 212-227
- [122] Liu J, Cheng X, Liu D, *et al.* The miR9863 family regulates distinct Mla alleles in barley to attenuate NLR receptor-triggered disease resistance and cell-death signaling. *Plos Genetics*, 2014, **10**(12): e1004755
- [123] Nizampatnam N R, Schreier S J, Damodaran S, *et al.* microRNA160 dictates stage-specific auxin and cytokinin sensitivities and directs soybean nodule development. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2015, **84**(1): 140-153
- [124] Li J, Guo G, Guo W, *et al.* miRNA164-directed cleavage of *ZmNAC1* confers lateral root development in maize (*Zea mays*L.). *BMC Plant Biology*, 2012, **12**: 220
- [125] Mao Y, Wu F, Yu X, *et al.* microRNA319a-targeted Brassica rapa ssp. pekinensis TCP genes modulate head shape in chinese cabbage by differential cell division arrest in leaf regions. *Plant Physiology*, 2014, **164**(2): 710-720
- [126] Yuan N, Yuan S, Li Z, *et al.* Heterologous expression of a rice miR395 gene in *Nicotiana tabacum* impairs sulfate homeostasis. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 28791
- [127] Sun Q, Liu X, Yang J, *et al.* microRNA528 affects lodging resistance of maize by regulating lignin biosynthesis under nitrogen-luxury conditions. *Molecular Plant*, 2018, **11**(6): 806-814
- [128] Guan X, Pang M, Nah G, *et al.* miR828 and miR858 regulate homoeologous *MYB2* gene functions in *Arabidopsis* trichome and cotton fibre development. *Nature Communications*, 2014, **5**: 3050
- [129] Jia X, Shen J, Liu H, *et al.* Small tandem target mimic-mediated blockage of microRNA858 induces anthocyanin accumulation in tomato. *Planta*, 2015, **242**(1): 283-293
- [130] Xia K, Ou X, Gao C, *et al.* OsWS1 involved in cuticular wax biosynthesis is regulated by osa-miR1848. *Plant, Cell & Environment*, 2015, **38**(12): 2662-2673
- [131] Tsikou D, Yan Z, Holt D B, *et al.* Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*, 2018, **362**(6411): 233-236 (DOI: 10.1126 / science. aat6907)
- [132] Wang Y, Li J. Branching in rice. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, **14**(1): 94-99
- [133] Zhang H, Zhang J, Yan J, *et al.* Short tandem target mimic rice lines uncover functions of miRNAs in regulating important agronomic traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, **114**(20): 5277-5282
- [134] Mathieu J, Yant L J, Murdter F, *et al.* Repression of flowering by the miR172 target *SMZ*. *Plos Biology*, 2009, **7**(7): e1000148
- [135] Aukerman M J, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *The Plant Cell*, 2003, **15**(11): 2730-2741
- [136] Axtell M J, Bowman J L. Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends in Plant Science*, 2008, **13**(7): 343-349
- [137] Chuck G S, Tobias C, Sun L, *et al.* Overexpression of the maize

- Corngrass1 microRNA prevents flowering, improves digestibility, and increases starch content of switchgrass. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(42): 17550-17555
- [138] Wu G, Poethig R S. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target *SPL3*. *Development*, 2006, **133**(18): 3539-3547
- [139] Wu G, Park M Y, Conway S R, *et al.* The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009, **138**(4): 750-759
- [140] Tester M, Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 2010, **327**(5967): 818-822
- [141] Storchova H. The role of non-coding RNAs in cytoplasmic male sterility in flowering plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, **18**(11): doi: 10.3390/ijms18112429
- [142] Schnable P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science*, 1998, **3**(5): 175-180
- [143] Vendramin R, Marine J C, Leucci E. Non-coding RNAs: the dark side of nuclear-mitochondrial communication. *The EMBO Journal*, 2017, **36**(9): 1123-1133
- [144] Wu M F, Tian Q, Reed J W. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development*, 2006, **133**(21): 4211-4218
- [145] Shen Y, Zhang Z, Lin H, *et al.* Cytoplasmic male sterility-regulated novel microRNAs from maize. *Functional & Integrative Genomics*, 2011, **11**(1): 179-191
- [146] Yan J, Zhang H, Zheng Y, *et al.* Comparative expression profiling of miRNAs between the cytoplasmic male sterile line *MeixiangA* and its maintainer line *MeixiangB* during rice anther development. *Planta*, 2015, **241**(1): 109-123
- [147] Ding X, Li J, Zhang H, *et al.* Identification of miRNAs and their targets by high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile line *NJCMS1A* and its maintainer *NJCMS1B* of soybean. *BMC Genomics*, 2016, **17**: 24
- [148] Komiya R. Biogenesis of diverse plant phasiRNAs involves an miRNA-trigger and Dicer-processing. *Journal of Plant Research*, 2017, **130**(1): 17-23
- [149] Johnson C, Kasprzewska A, Tennessen K, *et al.* Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Research*, 2009, **19**(8): 1429-1440
- [150] Vogel J P, Garvin D F, Mockler T C, *et al.* Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 2010, **463**(7282): 763-768
- [151] Zhai J, Zhang H, Arikat S, *et al.* Spatiotemporally dynamic, cell-type - dependent premeiotic and meiotic phasiRNAs in maize anthers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(10): 3146-3151
- [152] 龚淑敏, 丁艳菲, 朱诚. miRNA 在植物种子发育过程中的作用. *遗传*, 2015, **37**(6): 554-560
- Gong S M, Ding Y F, Zhu C. *Hereditas*(Beijing), 2015, **37**(6): 554-560
- [153] Reyes J L, Chua N H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal : for cell and molecular biology*, 2007, **49**(4): 592-606
- [154] Peng T, Sun H, Qiao M, *et al.* Differentially expressed microRNA cohorts in seed development may contribute to poor grain filling of inferior spikelets in rice. *BMC Plant Biology*, 2014, **14**: 196
- [155] Zhang Z, Chen J, Lin S, *et al.* Proteomic and phosphoproteomic determination of ABA's effects on grain-filling of *Oryza sativa* L. inferior spikelets. *Plant Science*, 2012, **185**-186: 259-273
- [156] Han R, Jian C, Lv J, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in the flag leaf and developing seed of wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 2014, **15**: 289
- [157] Kang M, Zhao Q, Zhu D, *et al.* Characterization of microRNAs expression during maize seed development. *BMC Genomics*, 2012, **13**: 360
- [158] Wang Y, Zhang J, Cui W, *et al.* Improvement in fruit quality by overexpressing miR399a in woodland strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, **65**(34): 7361-7370
- [159] Sun G. MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant Molecular Biology*, 2012, **80**(1): 17-36
- [160] Boyer J S. Plant productivity and environment. *Science*, 1982, **218**(4571): 443-448
- [161] Kruszkka K, Pacak A, Swida-Barteczka A, *et al.* Transcriptionally and post-transcriptionally regulated microRNAs in heat stress response in barley. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **65**(20): 6123-6135
- [162] Wang Q, Liu N, Yang X, *et al.* Small RNA-mediated responses to low- and high-temperature stresses in cotton. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 35558
- [163] Ferdous J, Whitford R, Nguyen M, *et al.* Drought-inducible expression of Hv-miR827 enhances drought tolerance in transgenic barley. *Functional & Integrative Genomics*, 2017, **17**(2-3): 279-292
- [164] Fu R, Zhang M, Zhao Y, *et al.* Identification of Salt tolerance-related microRNAs and their targets in maize (*Zea mays* L.) using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**: 864
- [165] Deng P, Wang L, Cui L, *et al.* Global Identification of microRNAs and their targets in barley under salinity stress. *Plos One*, 2015, **10**(9): e0137990
- [166] Fang R, Li L, Li J. Spatial and temporal expression modes of microRNAs in an elite rice hybrid and its parental lines. *Planta*, 2013, **238**(2): 259-269
- [167] Li A, Liu D, Wu J, *et al.* mRNA and small RNA transcriptomes reveal insights into dynamic homoeolog regulation of allopolyploid heterosis in nascent hexaploid wheat. *The Plant Cell*, 2014, **26**(5): 1878-1900
- [168] Jacobs T B, Lafayette P R, Schmitz R J, *et al.* Targeted genome modifications in soybean with CRISPR / Cas9. *BMC Biotechnology*, 2015, **15**: 16

Advances in miRNAs Regulating Agricultural Traits for Crops*

JIANG Zeng-Ming^{1)**}, HE Juan^{1,3)**}, Mo Bei-Xin^{1,2)}, LIU Lin^{1,2)***}, XU Xiao-Feng^{1)***}

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;

³⁾Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract Plant microRNAs (miRNA) are 21–24 nt endogenous small non-coding RNAs. They play key roles in plant development, adaptation to stresses and flexible environments through regulating the expression of their target genes post-transcriptionally. Besides, miRNAs are critical for regulating agronomic traits of important economic crops such as rice, maize and soybean, and have great potential in improving crop traits. This review focuses on research progresses of miRNAs involved in regulating important crop agronomic traits (including plant architecture, flowering, seeds development, stresses resistance, *etc.*) and their regulatory mechanisms. We also summarized the major research methods and strategies for taking advantage of miRNAs to improve crop traits and discussed the future prospects and problems for the application of miRNAs in crop traits improvement.

Key words microRNA, crop, regulatory mechanism, agronomic traits improvement

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0294

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31600982), Guangdong Innovation Research Team Fund (2014ZT05S078), Shenzhen University Research Fund (2016095) and Shenzhen High-level Talents Research Fund (827/000256).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

LIU Lin. Tel: 13510529306, E-mail: linliu@szu.edu.cn;

XU Xiao-Feng. Tel: 13828875371, E-mail: xxf@szu.edu.cn

Received: November 11, 2018 Accepted: January 7, 2019