

miR397 调控植物生长发育和胁迫响应的分子机制

袁 慧¹, 曾超珍¹, 董旭杰^{1,2}, 严明理³, 刘志祥^{1,2}

(¹中南林业科技大学生命科学与技术学院 / 林业生物技术湖南省重点实验室, 长沙 410004;

²湖南农业大学园艺园林学院 / 湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地,

长沙 410128; ³湖南科技大学生命科学学院 / 经济作物遗传改良与综合利用湖南省重点实验室, 湘潭 411201)

摘要: miR397 是植物中保守的 miRNA 之一, 在不同植物中 miR397 家族大多由 1~3 个成员组成。通过调控漆酶基因等 miR397 广泛参与调控植物生长发育和胁迫响应, 从而影响植物种子产量、果实品质等重要经济性状。因此, miR397 作为分子育种的重要靶标在植物遗传改良中具有很大的应用潜力。本文对 miR397 在植物中的分布、miR397 靶基因的鉴定、miR397 调控植物生长发育和胁迫应答的分子机制进行了评述, 并提出了仍有待解决的问题, 以期为 miR397 在植物遗传改良中的应用提供参考。

关键词: miR397; 靶基因; 漆酶; 木质素; 胁迫响应; 生长发育

Molecular Mechanism of miR397 Regulating Plant Growth, Development and Stress Responses

YUAN Hui¹, ZENG Chao-zhen¹, DONG Xu-jie^{1,2}, YAN Ming-li³, LIU Zhi-xiang^{1,2}

(¹College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology/Hunan Provincial Key Laboratory of Forestry Biotechnology, Changsha 410004; ²Hunan Agricultural University, College of Horticulture and Landscape Architecture/Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization - National Key Laboratory Cultivation Base Jointly Built by Province and Ministry, Changsha 410128; ³College of Life Science, Hunan University of Science and Technology/Hunan Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement and Comprehensive Utilization of Economic Crops, Xiangtan 411201)

Abstract: miR397 is one of the conserved miRNAs in plants. In different plants, the miR397 family is mostly composed of one to three members. Through regulating the laccase gene and other genes, miR397 is widely involved in regulating plant growth, development, and stress responses, thus affecting important economic traits such as seed yield and fruit quality. Therefore, as a target gene of molecular breeding, miR397 has great application potential in plant genetic improvement. In this article, the distribution of miR397 in plants, the identification of target genes of miR397, and the regulating roles of miR397 in plant growth, development, and stress responses were reviewed, and the problems that remain to be solved are pointed out, which provides a reference for the application of miR397 in plant genetic improvement.

Key words: miR397; target gene; laccase; lignin; stress response; growth and development

收稿日期: 2020-10-12 修回日期: 2020-11-09 网络出版日期: 2020-12-04

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20201012001>

第一作者研究方向为生物资源学, E-mail: yuanhui0522@foxmail.com

通信作者: 刘志祥, 研究方向为植物分子遗传学, E-mail: liuzx@csuoft.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31671601); 湖南省教育厅科学研究项目 (16A223); 湖南省作物种质创新与资源利用国家重点实验室培育基地科学基金开放项目 (17KFXM04); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20190626)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31671601), Key Scientific Research Project of the Education Department of Hunan Province, China (16A223), Project of Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization (17KFXM04), Graduate Research and Innovation Project of Hunan Province (CX20190626)

微 RNA (miRNA, microRNA) 是真核生物中普遍存在的一类小分子非编码 RNA, 长度为 19~24 个核苷酸, 通过介导 mRNA 降解、翻译抑制、DNA 甲基化和组蛋白修饰的方式调控靶基因的表达^[1]。miRNA 在植物生长发育和环境胁迫响应中具有重要的调控作用^[2-5]。通过基因工程利用 miRNA 改良植物生长发育表型、提高植物的胁迫抗性, 为培育优质高抗的植物新品种提供了新途径^[6]。

miR397 是植物中高度保守的 miRNA^[7]。研究表明, miR397 广泛参与调控植物生长发育和胁迫响应, 从而影响植物种子产量和果实品质等重要经济性状^[8-10]。因此, miR397 作为分子育种的重要靶标在植物遗传改良中具有很大的应用潜力。

本文综述了植物 miR397 的研究进展, 并对后续研究进行了展望, 以期为进一步深入揭示 miR397 的功能并将其应用于植物遗传改良提供参考。

1 miR397 家族成员在植物中的分布

目前 PmiREN 数据库 (<http://www.pmiren.com/>) 中收录的 miR397 家族 143 个成员分布于 68 种不同植物, 在不同植物中的 miR397 家族大多由 1~3 个成员组成 (图 1), 这些成员之间在其成熟 miRNA 序列中只有 1~3 个核苷酸的差异^[11]。例外的是, 在欧洲云杉 (*Picea abies*) 中已鉴定出 22 个 miR397 家族成员。

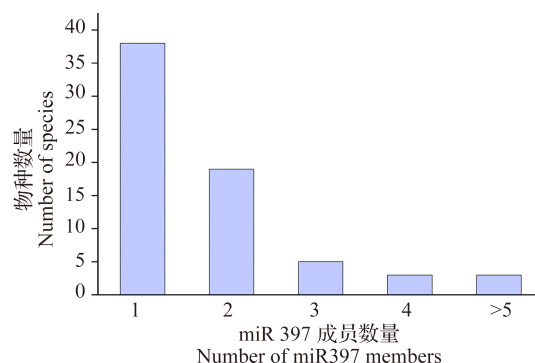


图 1 不同植物中 miR397 家族成员数量分布情况
Fig.1 Distribution of number of miR397 family members in plant species

miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 收录了 78 条植物 miR397 成熟序列, 这些序列来自 33 种植物, 包括拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、无油樟 (*Amborella trichopoda*)、欧洲云杉、毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 等。采用 Clustalx 程序对这 78 条 miR397 成熟序列进行了序列比对, 比对结果采用 WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) 绘制序列保守性 Logo 图, 如图 2 所示。miR397 成熟序列长度基本为 21nt, 其中 5 个碱基完全保守, 12 个碱基保守性较高, 其余碱基保守性较低。



图 2 不同植物中 miR397 成熟序列保守性分析

Fig.2 Conservativity analysis of mature sequences of miR397 in different plants

2 miR397 的靶基因

目前 miRNA 靶基因分析方法包括生物信息学预测和实验验证两类。植物 miRNA 靶基因的生物信息学预测是指采用 miRU (<http://bioinfo3.noble.org/miRNA/miRU.htm>)、WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>)、psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 等程序利用植物 miRNA 成熟序列与靶基因识别位点的序列高度互补的特征预测靶基因。植物 miRNA

靶基因的实验验证包括 RNA 连接酶介导的 5' RACE (RLM-5' RACE, RNA ligase-mediated 5'-rapid amplification of cDNA ends)、降解组测序 (Degradome sequencing) 等。采用上述方法已经在不同植物中鉴定了 miR397 的多个靶基因, 这些靶基因的编码产物包括酶、结构蛋白和转录因子。

miR397 调控的酶包括漆酶、酪蛋白酶、质体蓝素、过氧化物酶、蛋白糖苷酶、植酸酶、抗坏血酸氧化酶等。其中, 漆酶基因 (*LAC*) 是研究得最多的 miR397 靶基因。植物漆酶是第 1 个被证明能在

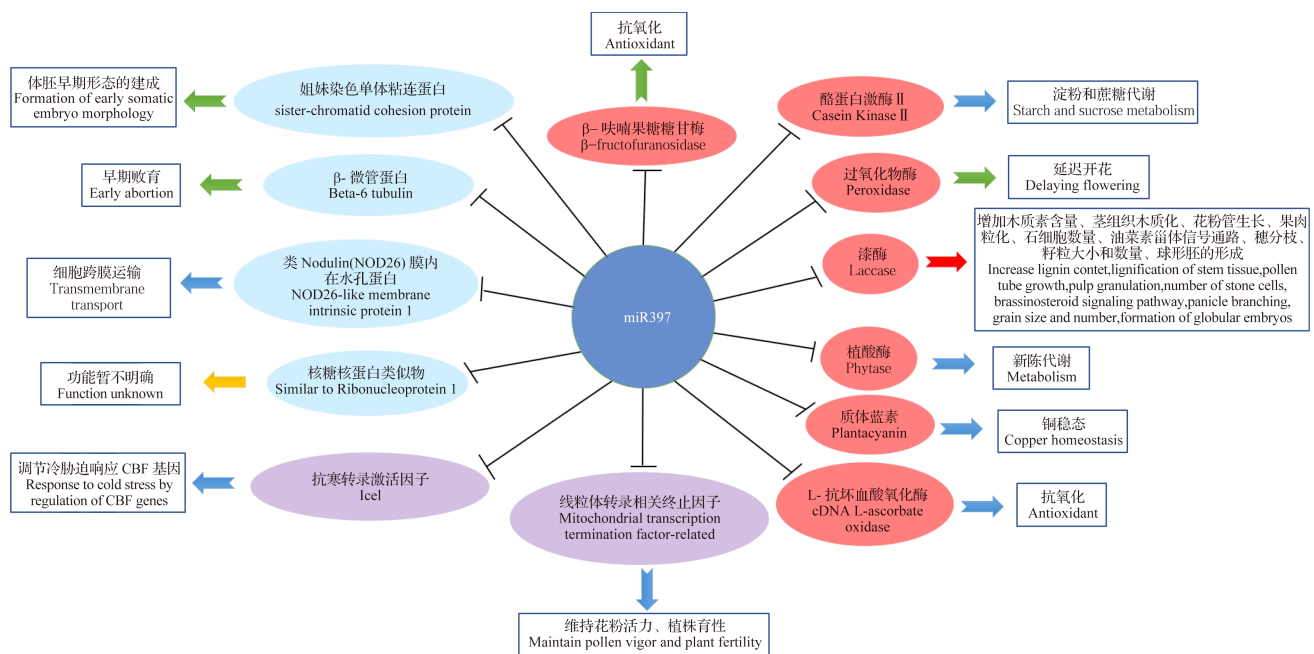
体外聚合木质素的含铜多酚氧化酶,通常以单体糖蛋白的形式存在^[12]。经 RLM-5' RACE 验证,毛果杨中的漆酶基因确定具有 miR397 真实靶点^[13]。湖北海棠 (*Malus hupehensis*) miR397 可以直接介导靶基因 *MhLAC7* 的 mRNA 降解^[14]。丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 中 23 个 *SmLAC* 被预测为 miR397 的靶点,miR397 在控制细胞壁木质素生物合成和胁迫反应中存在重要作用^[15]。经 RLM-5' RACE 验证,在拟南芥中酪蛋白激酶 II (casein kinase II) 基因为 miR397b 的靶基因^[16]。psRNATarget 预测 miR397 在火炬松中靶向质体蓝素 (plantacyanin) 基因^[17-18],该预测在拟南芥中则得到了 RLM-5' RACE 验证^[18]。在雄性不育的玉米 (*Zea mays*) 中,高表达 miR397 会导致过氧化物酶 (POD, Peroxidase) 缺乏,用 miRU 和 WMD3 分析 miR397 靶向 POD 基因^[11]。水稻 miR397 经 miRU 预测靶向 β -呋喃果糖糖苷酶 (β -fructofuranosidase) 基因和 L-抗坏血酸氧化酶 (L-ascorbate oxidase) 基因^[19],通过 RLM-5' RACE 验证 L-抗坏血酸氧化酶基因转录本的切割是由 miR397b 介导的^[20]。另外,miRU 预测表明普通小麦 (*Triticum aestivum*) miR397 靶向调

控植酸酶 (Phytase) 基因^[21]。

miR397 调控的结构蛋白包括微管蛋白、姐妹染色单体粘连蛋白、膜整合蛋白和核糖核蛋白。经 miRU 和 WMD3 预测拟南芥和玉米中的 miR397 可靶向 β -微管蛋白^[11,22]。经 RLM-5' RACE 验证,在龙眼 (*Dimocarpus longan*) 姐妹染色单体粘连蛋白的 mRNA 中存在 miR397a 的裂解位点,该蛋白对于姐妹染色单体的粘连和分离起着重要作用^[23]。经 miRU 预测玉米 miR397 可靶向一种膜整合蛋白,该蛋白参与细胞跨膜运输和对干旱胁迫的应答^[24]。经 psRNATarget 预测表明野生二粒小麦 miR397 的靶蛋白包含一种核糖核蛋白类似物^[25]。

miR397 的靶基因还包括转录因子。例如,利用 miRU、WMD3 分析玉米 miR397c 的预测靶点包括线粒体转录相关终止因子^[11]。miRU 预测和 psRNATarget 预测拟南芥^[26-27]和普通小麦中 miR397 靶向转录因子 ICE1,该转录因子参与调节冷胁迫响应 CBF 基因的表达^[28]。

通过调控上述这些靶基因,miR397 在植物生长发育与胁迫响应过程中发挥了重要的调控作用 (图 3、表 1)。



- : miR397 调控的酶类; ●: miR397 调控的结构蛋白; ●: miR397 靶向的转录因子; ●: 调控植物生长发育;
 ●: 响应非生物胁迫; ●: 功能暂不明确; ●: 既调控生长发育又响应胁迫; —| 箭头: 负调节
 ●: Enzymes regulated by miR397, ●: Structural proteins regulated by miR397, ●: Transcription factors targeted by miR397,
 ●: Regulating plant growth and development, ●: Responding to abiotic stress, ●: Function unknown,
 ●: Regulating growth and responding to stress, —| arrow: Negative regulation

图 3 miR397 调控植物生长发育与胁迫响应的模式图

Fig.3 Model diagram of miR397 regulating plant growth, development, and stress responses

3 miR397 在植物生长发育中的作用

3.1 调控植物细胞分化与胚胎形成

miR397 在未分化的水稻胚性愈伤组织中高度特异性表达,而在分化的愈伤组织和其他成熟器官中表达量极低,miR397 的强烈表达导致漆酶基因的下调,从而使胚胎细胞处于薄壁和分生细胞状态^[29]。miR397 可在落叶松(*Larix leptolepis*)体细

胞胚胎发生(SE, somatic embryogenesis)过程中,通过切割漆酶 mRNA 调节细胞壁的厚度,且与原胚团(PEM, proembryogenic mass)的增殖调控以及向单个胚性细胞转化有关^[9,17]。miR397a 也可能通过靶向调控姐妹染色单体粘连蛋白影响龙眼体胚发生早期形态的建成^[23]。另外,miR397 还与 miR159、miR164、miR390 等在甜橙(*Citrus sinensis*)中影响球形胚的形成^[30]。

表 1 miR397 在不同植物中的靶基因及其编码蛋白质
Table 1 Target genes and encoding proteins of miR397 in different plants

靶基因功能 Function of target genes	靶基因 (GenBank 序列号) Target genes (GenBank accession)	分类群 Taxon	鉴定方法 Confirmation methods	参考文献 References
漆酶 Laccases	<i>AtLAC2</i> (At2g29130) 、 <i>AtLAC4</i> (At2g38080)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	RLM-5' RACE、 降解组测序	[16]
	<i>ZmLAC7</i> (Zm00001d042848) 、 <i>ZmLAC17</i> (Zm00001d042905)	玉米 <i>Zea mays</i>	miRU、降解组测序	[11, 31]
	<i>PtLAC1</i> 、 <i>PtLAC2</i> 、 <i>PtLAC18</i> 、 <i>PtLAC26</i> 、 <i>PtLAC30</i>	毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	RLM-5' RACE	[13]
	<i>MhLAC7</i>	湖北海棠 <i>Malus hupehensis</i>	RLM-5' RACE	[14]
	<i>GmLAC7</i> (Glyma03g15800.1)	大豆 <i>Glycine max</i>	降解组测序	[32]
	<i>SmLAC3</i> 、 <i>SmLAC50</i>	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	RLM-5' RACE、 降解组测序	[15]
	<i>BnLAC4</i> (TC164751)	甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	降解组测序	[33]
	<i>SpLAC23</i> (SCQSAD1056B07.g)	甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i>	psRNATarget 预测	[34]
	<i>DlLAC4</i> (LOC18037896) 、 <i>DlLAC7</i> (KM103386) 、 <i>DlLAC17</i> (LOC18039542)	龙眼 <i>Dimocarpus longan</i>	RLM-5' RACE	[23]
	<i>AtCKB3</i> (At3g60250)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	RLM-5' RACE	[16]
酪蛋白激酶 II Casein kinase II	—	水稻 <i>Oryza sativa</i>	RLM-5' RACE	[19–20]
L- 抗坏血酸氧化酶 L-ascorbate oxidase	(At5g12250)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	RLM-5' RACE	[35]
β- 微管蛋白 Beta-6 tubulin	(Zm00001d027295)	玉米 <i>Zea mays</i>	miRU、WMD3 预测	[11]
姐妹染色单体粘连蛋白 sister-chromatid cohesion protein	(LOC18047875)	龙眼 <i>Dimocarpus longan</i>	RLM-5' RACE	[23]
质体蓝素 Plantacyanin	(JR143920)	火炬松 <i>Pinus taeda</i>	psRNATarget 预测	[17]
	(AT2G02850)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	RLM-5' RACE	[18]
过氧化物酶 Peroxidase (POD)	(TC3855599)	玉米 <i>Zea mays</i>	miRU、WMD3 预测	[11]
β- 呋喃果糖糖苷酶 β-fructofuranosidase	<i>OsFosA</i> (MF422637)	水稻 <i>Oryza sativa</i>	miRU 预测	[19]
植酸酶 Phytase	—	普通小麦 <i>Triticum aestivum</i>	miRU 预测	[21]
类 Nodulin (NOD26) 膜内在水孔蛋白 NOD26-like membrane intrinsic protein 1	<i>ZmNIP1-I</i> (NM_001112251)	玉米 <i>Zea mays</i>	miRU、miRU2 预测	[24]
姐妹染色单体粘连蛋白 Simila to ribonucleoprotein 1	—	野生二粒小麦 <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	psRNATarget 预测	[25]
线粒体转录相关终止因子 Mitochondrial transcription termination factor-related	(Zm00001d034669)	玉米 <i>Zea mays</i>	miRU、WMD3 预测	[11]
抗早转录激活因子 Ice1 (inducer of CBF expression 1)	(AT3G26744)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	miRU 预测	[26–27]
	—	普通小麦 <i>Triticum aestivum</i>	psRNATarget 预测	[28]

3.2 调控育性

研究发现,玉米单核期花粉粒中 miR397 高表达可抑制 β -微管蛋白的合成,导致花药微管组织无法形成,并通过抑制过氧化物酶和漆酶基因的表达来影响花粉萌发、花粉管发育和花粉活力,致使玉米花粉败育^[11]。

3.3 调控植物开花结实

拟南芥中 miR397b 通过靶向 CKB3 (casein kinase II subunits beta3) 调节 CCA1 (circadian clock associated1) 蛋白的磷酸化,形成 miR397b-CKB3-CCA1 负反馈环,参与调节昼夜节律进而调控拟南芥开花时间^[36]。柑橘 (*Citrus reticulata*) miR397 的表达与木质素生物合成和果肉的粒化程度呈负相关^[37]。miR397a 在转基因烟草中的稳定过表达降低了目标 LAC 基因的表达,降低了木质素的含量,与梨 (*Pyrus bretschneideri*) 中木质素含量的降低相一致,miR397 可通过调控其靶基因 *PbrLACs* 的表达来减少梨果实中的石细胞数量^[38]。

3.4 调控株型与种子产量

在水稻 (*Oryza sativa* var. *indica*) 中的过表达 miR397 导致漆酶的选择性降解,减少了茎组织的木质化,从而影响水稻驯化相关优良表型 (如叶片宽度、茎粗、株高、种子数量) 的形成^[39]。水稻 miR397 通过下调 *OsLAC* 的表达增加籽粒大小并促进穗分枝,从而提高了水稻产量^[40]。过表达 miR397 的拟南芥植株可以发育形成更多的花序芽从而增加种子产量^[41]。

4 miR397 在非生物胁迫中的作用

研究表明,miR397 广泛参与了植物对干旱胁迫、低温胁迫、高温胁迫、营养胁迫、重金属胁迫和病害胁迫的响应 (表 2)。

4.1 miR397 与干旱胁迫

干旱是影响作物产量最主要的非生物胁迫因子之一^[25,34]。在许多植物中 miR397 参与了对干旱胁迫的响应。例如,拟南芥^[16]、野生二粒小麦^[25]和甘蔗^[34]等植物在干旱胁迫应答中 miR397 的表达显著上调。干旱胁迫下过表达番茄 (*Solanum lycopersicum*) miR397 的转基因拟南芥植株的长势明显高于野生型,说明 miR397 的表达可缓解干旱胁迫对植物生长发育的不利影响^[42]。与上述植物不同的是,水稻^[19]、毛竹 (*Phyllostachys edulis*)^[43]和马铃薯 (*Solanum tuberosum*)^[44]在干旱胁迫时 miR397 的表达量显著下调。在水稻中 miR397 通过

调控 β -呋喃果糖糖苷酶基因的表达,参与干旱胁迫下水稻淀粉合成和蔗糖代谢的调控^[19]。另外在干旱胁迫下,小麦 (*Triticum aestivum*) 耐旱品种 (C-306、NI-5439) 的 miR397 被下调,而在不耐旱品种 (HUW-468、WL-711) 中被上调,它与靶蛋白植酸酶的表达呈负相关,从而参与小麦的干旱胁迫耐受机制^[21]。

上述研究表明,干旱胁迫下不同植物中 miR397 的表达模式不同,说明 miR397 在不同植物中调控干旱胁迫响应的功能是复杂多样的,其机理仍有待更深入的研究。

4.2 miR397 与冷、热胁迫应答

寒冷和高温影响植物的地理分布和生长季节^[10]。研究表明,miR397 参与调控了植物对高、低温胁迫的响应。

在拟南芥、毛果杨、短柄草 (*Brachypodium distachyon*) 中的 miR397 在冷胁迫条件下表达量显著上调^[16,45-46],但在小麦冷胁迫时 miR397 的表达却被抑制^[28]。在拟南芥中,miR397 通过调节寒冷信号通路发挥作用,即 miR397 通过靶向转录因子 ICE1 来调节 *CBF* 基因和 *COR* 基因的表达做出冷胁迫应答,其对另一个靶基因 *LAC4* 的调控也在适应低温环境中具有重要的作用^[26-28]。

热胁迫对植物生长发育具有不利影响,特别是对花粉活力和果实成熟的影响最为严重^[3]。在热胁迫条件下,拟南芥、木薯 (*Manihot esculenta*)、番茄中 miR397 表达均被下调^[47-49],但在水稻幼苗中热胁迫诱导 miR397 表达上调^[20]。miR397 可能通过负调控漆酶的表达,来加强细胞与细胞间的粘附,维持正常细胞壁结构,从而抵御热胁迫损伤^[49]。

4.3 miR397 与营养胁迫响应

氮 (N)、硫 (S)、磷 (P)、铜 (Cu) 是生物体生长发育所必需的元素,在植物中这些营养物质的代谢同样受 miR397 调控。例如,在拟南芥中 miR397 的表达通常在 N 或 S 缺乏时被抑制,在 Cu 缺乏时却被诱导,这意味着 miR397 在不同营养状态下呈差异表达,从而不同程度地参与营养物质的代谢过程^[50]。低氮胁迫下马铃薯的根^[51]和缺 P 白羽扇豆 (*Lupinus albus*)^[52]的叶片中,miR397 的表达水平也显著降低。一般来说,miR397 可通过调控锌指蛋白 (Zn finger protein)、热休克蛋白 (heat shock protein)、丝氨酸蛋白激酶 (serine-threonine protein kinase)、漆酶 (laccases) 等响应胁迫蛋白的表达,以适应在这些营养胁迫缺乏环境中生存^[51]。

铜是植物生长所必需的微量营养元素,是多

种蛋白质的辅助因子,在光合和呼吸电子传递链、细胞壁形成和氧化应激保护等方面也发挥着重要作用^[53]。在植物中铜的稳态平衡是受到严格调控的过程,其中涉及了几个保守的铜响应 miRNA,如 miR397、miR398、miR408 和 miR857^[54]。在拟南芥^[18]和葡萄 (*Vitis vinifera*)^[53]中,miR397 是维持 Cu 稳态的关键调节因子。高 Cu 胁迫下,miR397 表达下调,促进漆酶或质体蓝素等铜结合蛋白的合成,铜积累减少;在低 Cu 胁迫下,miR397 的表达上调,抑制漆酶或质体蓝素等的合成,铜积累增多,从而有利于维持铜稳态平衡^[18,53]。

4.4 miR397 与重金属胁迫

miR397 在植物对重金属胁迫的响应中也具有重要的调控作用。有研究发现,利用 Al₂O₃ 纳米颗粒处理烟草 (*Nicotiana tabacum*),其 miR397 表达量上调了 55 倍,说明 miR397 可能影响氧化还原反应中的电子传递过程,从而在 Al₂O₃ 纳米颗粒胁迫响应中发挥作用,这与铜胁迫响应作用途径类似^[55]。

在水稻和甘蓝型油菜中,miR397 的表达在镉 (Cd) 胁迫条件下均被上调^[33,56],其调控网络可能涉及光合途径、转录因子激活、抗氧化反应和次生代谢等过程^[32]。在大豆^[32]、萝卜 (*Raphanus sativus*)^[57]、菜薹 (*Brassica parachinensis*)^[58] 中 miR397 对 Cd 胁迫应答均表现出明显上调。Cd 处理条件下,菜薹 miR397 表达量增加,促进了低 Cd 积累品种的根系生长^[58]。

在硼 (B) 胁迫下,大麦 (*Hordeum vulgare*) miR397 的表达水平显著降低^[59-60]。柑橘 miR397

通过负调控 *LAC7* 的转录在维管束的次生细胞壁生物合成中起关键作用,以此来增强对 B 毒性胁迫的耐受性^[61]。

在铬 (Cr) 胁迫条件下,水稻 miR397 表达水平显著上调,可能通过调控 L- 抗坏血酸氧化酶和丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶基因,进一步调节水稻氧化胁迫抗性^[62]。

5 miR397 在生物胁迫中的作用

在植物应答病原微生物侵染过程中,miR397 表达下调可提高漆酶活性,诱导木质素和其他酚类聚合物的合成并迅速沉积在细胞壁上,以限制病原微生物的生长和入侵。例如,在湖北海棠^[14]和苹果 (*Malus × domestica*)^[63] 感染苹果环腐病 (*Botryosphaeria dothidea*) 时,miR397 表达下调使湖北海棠 *MhLAC7*、苹果 *LAC17* 的表达均上调,从而增加木质素合成,以此维持细胞壁的正常形态直接抵御病菌的侵害。在马铃薯感染 PVA 病毒 (PVA, potato virus A)^[64]和玉米感染甘蔗花叶病毒 (SCMV, sugarcane mosaic virus) 时^[31],都通过下调 miR397 的表达,增强漆酶的活性,增加木质素的形成,从而抑制病毒的侵害。

此外,miR397 对维持植物与真菌的共生状态也具有重要作用。在玉米和丛枝菌根 (AM, arbuscular mycorrhiza) 真菌共生过程中,miR397 表达下调可促进植物向 AM 真菌的脂质传递和调控转运蛋白基因的表达来维持共生状态,从而提高玉米的产量和抗性^[65]。

表 2 植物 miR397 对逆境胁迫的响应
Table 2 Response of plant miR397 to stress

胁迫类型 Type of stress	物种及 miR397 表达变化 Species and expression changes of miR397	功能机制 Functional mechanisms	参考文献 References
干旱 Drought	拟南芥 ↑、小麦 ↑、番茄 ↑、大豆 ↑、毛果杨 ↑、水稻 ↓、毛竹 ↓、马铃薯 ↓	调节淀粉合成和蔗糖代谢	[10, 19, 43-44]
低温 Cold	短柄草 ↑、拟南芥 ↑、杨树 ↑、小麦 ↓	调节冷应激 CBF 基因转录水平	[16, 28, 45-46]
高温 Heat	水稻 ↑、拟南芥 ↓、木薯 ↓、番茄 ↓	负调控漆酶,维持正常的细胞壁结构	[20, 47-49, 66-67]
营养胁迫 Nutritional stress	拟南芥 (C/N/S/P) ↓、马铃薯 (N) ↓、白羽扇豆 (P) ↓、拟南芥 (Cu) ↓、葡萄 (Cu) ↓	保持营养元素的平衡、诱导含铜蛋白、清除活性氧	[50-53]
Cd 胁迫 Cd stress	水稻 ↑、大豆 ↑、甘蓝型油菜 ↑、萝卜 ↑、菜薹 ↑	影响光合途径、抗氧化反应	[32-33, 56-58]
B 胁迫 B stress	小麦 ↓、柑橘 ↓、枸橼 ↓	调控维管束细胞壁生物合成	[59-61]
生物胁迫 Biotic stress	湖北海棠 ↑、玉米 ↓、马铃薯 ↓	调节漆酶活性、增加木质素含量	[31, 63-64]

↑ : 上调; ↓ : 下调
↑ : up-regulated, ↓ : down-regulated

6 总结与展望

miR397 能够调节细胞壁的生物合成,调控花粉管发育,参与淀粉和蔗糖代谢,增加植物穗分枝、籽粒大小和数量等,在植物生长发育中发挥了重要的调控作用。同时,miR397 也是植物响应环境胁迫的关键 miRNA 之一。研究 miR397 及其靶基因的功能将为作物高产、抗逆分子育种提供新思路,但目前如下两个方面仍有待深入研究。

6.1 miR397 及其靶基因的功能

目前,关于植物 miR397 的报道大多仅限于研究不同植物在胁迫响应或生长发育过程中 miR397 表达水平的变化情况,而采用 miRNA 过表达、靶标模拟(TM, target mimicry)等方法深入解析 miR397 功能的研究仍较少。对 miR397 靶基因的研究主要集中在 *LAC* 基因,而其他靶基因研究较少。部分 miR397 的靶基因仅由生物信息学方法预测,尚缺乏 RLM-5' RACE 等实验验证。因此,还需更深入地研究 miR397 及其靶基因功能以揭示其参与调控生长发育与胁迫应答的分子机制。

6.2 miR397 的表达调控机制

miRNA 基因由 RNA 聚合酶 II (RNA Pol II, RNA polymerase II) 转录,其转录过程受一系列顺式作用元件和反式作用因子调控^[68]。miR397 的表达调控网络具体机制目前仍然不清楚。目前仅发现在拟南芥中 CCA1 是 miR397b 的转录抑制因子^[36],而 SPL7 (SQUAMOSA promoter binding protein-like 7) 是 miR397a 表达所必需的转录因子^[69]。因此,参与 miR397 的转录调控的相关顺式作用元件与特异性转录因子仍有待进一步研究。

此外,miRNA 的表达还受到转录后水平的调控。在拟南芥中发现了一种核酸外切酶 SDN1 可特异性降解 miRNA 单链成熟序列,而 3' 末端甲基化修饰的 miRNA 则不易被该酶降解^[70]。在毛果杨中 miRNA 序列 3' 末端添加腺苷酸残基可减缓包括 miR397a 在内的多种 miRNA 的降解^[71]。但总体上目前对 miR397 表达的转录后调控机制还有待深入研究。

参考文献

- [1] Chellappan P, Xia J, Zhou X, Gao S, Zhang X, Coutino G, Vazquez F, Zhang W, Jin H. siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38 (20): 6883-6894
- [2] Kawaguchi R, Girke T, Bray E A, Bailey-Serres J. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 2004, 38 (5): 823-839
- [3] Singh A, Gautam V, Singh S, Das S S, Verma S, Mishra V, Mukherjee S, Sarkar A K. Plant small RNAs: advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta*, 2018, 248 (3): 545-558
- [4] 郁佳雯, 韩荣鹏, 仇婷, 李宗芸, 潘沈元, 董婷婷. microRNA 在植物生长发育中的研究进展. *分子植物育种*, 2019, 18 (5): 1496-1504
- [5] Yu, J W, Han R P, Qiu T, Li Z Y, Pan S Y, Dong T T. Research progress on microRNA in plant growth and development. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 18 (5): 1496-1504
- [5] 潘晓阳, 张文睿, 王丹, 申忠宝, 郭长虹. 植物 miRNA 在调节低磷胁迫响应中的作用. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 (3): 517-524
- [5] Pan X Y, Zhang W R, Wang D, Shen Z B, Guo C H. The roles of plant MicroRNA in regulating the response to low phosphorus stress. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (3): 517-524
- [6] Zheng L L, Qu L H. Application of microRNA gene resources in the improvement of agronomic traits in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13 (3): 329-336
- [7] Kozomara A, Jones S G. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: 152-157
- [8] Chinnusamy V, Zhu J, Zhou T, Zhu J K. Small RNAs: big role in abiotic stress tolerance of plants/Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. Netherlands: Springer, 2007: 223-260
- [9] Zhang J, Zhang S, Han S, Wu T, Li X, Li W, Qi L. Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta*, 2012, 236 (2): 647-657
- [10] Sunkar R, Li Y, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 2012, 17 (4): 196-203
- [11] Shen Y, Zhang Z, Lin H, Liu H, Chen J, Peng H, Cao M, Rong T, Pan G. Cytoplasmic male sterility-regulated novel microRNAs from maize. *Functional & Integrative Genomics*, 2011, 11 (1): 179-191
- [12] Vanholme R, de Meester B, Ralph J, Boerjan W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 230-239
- [13] Lu S F, Li Q Z, Wei H R, Chang M J, Tunlaya-Anukit S, Kim H, Liu J, Song J Y, Sun Y H, Yuan L C, Yeh T F, Peszlen I, Ralph J, Sederoff R R, Chiang V L. Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110 (26): 10848-10853
- [14] Yu X Y, Gong H Y, Cao L F, Hou Y J, Qu S C. MicroRNA397b negatively regulates resistance of *Malus hupehensis* to *Botryosphaeria dothidea* by modulating *MhLAC7* involved in lignin biosynthesis. *Plant Science*, 2020, 292: 110390

- [15] Li C L, Li D Q, Zhou H, Li J, Lu S F. Analysis of the laccase gene family and miR397-/miR408-mediated posttranscriptional regulation in *Salvia miltiorrhiza*. Peer Journal, 2019, 7 (23) : e7605
- [16] Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. Plant Cell, 2004, 16 (8) : 2001-2019
- [17] 张俊红, 张守攻, 吴涛, 韩素英, 杨文华, 齐力旺. 落叶松体胚发育中 5 个 miRNA 前体与成熟体的表达. 植物学报, 2012, 47 (5) : 462-473
Zhang J H, Zhang S G, Wu T, Han S Y, Yang W H, Qi L W. Expression analysis of five miRNAs and their precursors during somatic embryogenesis in Larch. Chinese Bulletin of Botany, 2012, 47 (5) : 462-473
- [18] Abdel-Ghany S E, Marinus P. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283 (23) : 15932-15945
- [19] Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, Luo L. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. Journal of Experimental Botany, 2010, 61 (15) : 4157-4168
- [20] Jeong D H, Park S, Zhai J, Gurazada S G R, Paoli E D, Meyers B C, Green P J. Massive analysis of rice small RNAs: Mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage. Plant Cell, 2011, 23 (12) : 4185-4207
- [21] Kaur A, Gupta O P, Meena N L, Grewal A, Sharma P. Comparative temporal expression analysis of microRNAs and their target genes in contrasting wheat genotypes during osmotic stress. Applied Biochemistry Biotechnology, 2017, 181 (2) : 613-626
- [22] 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
- [23] 徐小萍, 廖琪, 陈旭, 陈晓慧, 林玉玲, 赖钟雄. 龙眼 miR397 家族成员分子特性及其在体胚发生早期的表达分析. 果树学报, 2019, 36 (5) : 567-577
Xu X P, Liao Q, Chen X, Chen X H, Lin Y L, Lai Z X. Molecular characteristics and expression analysis of miR397 family members during the early somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. Journal of Fruit Science, 2019, 36 (5) : 567-577
- [24] Xu C, Yang R F, Li W C, Fu F L. Identification of 21 microRNAs in maize and their differential expression under drought stress. African Journal of Biotechnology, 2010, 9 (30) : 4741-4753
- [25] Kantar M, Lucas S J, Budak H. miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. Planta, 2011, 233 (3) : 471-484
- [26] Dong C H, Pei H X. Over-expression of miR397 improves plant tolerance to cold stress in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Biology, 2014, 57 (4) : 209-217
- [27] Ekinci M H, Kayihan D S, Kayihan C, Çiftçi Y Ö. The role of microRNAs in recovery rates of *Arabidopsis thaliana* after short term cryo-storage. Plant Cell Tissue and Organ Culture, Doi: 10.1007/s11240-020-01811-8
- [28] Gupta O, Meena N, Sharma I, Sharma P. Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. Molecular Biology Reports, 2014, 41 : 4623-4629
- [29] Luo Y C, Zhou H, Li Y, Chen J Y, Yang J H, Chen Y Q, Qu L H. Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryogenic development. FEBS Letters, 2006, 580 (21) : 5111-5116
- [30] Wu X M, Liu M Y, Ge X X, Xu Q, Guo W W. Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. Planta, 2011, 233 (3) : 495-505
- [31] Xia Z H, Zhao Z X, Li M J, Chen L, Jiao Z Y, Wu Y H, Zhou T, Yu W C, Fan Z F. Identification of miRNAs and their targets in maize in response to Sugarcane mosaic virus infection. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 125 : 143-152
- [32] Fang X L, Zhao Y Y, Ma Q B, Huang Y A, Wang P, Zhang J, Nian H, Yang C Y. Identification and comparative analysis of cadmium tolerance-associated miRNAs and their targets in two soybean genotypes. PLoS ONE, 2013, 8 (12) : e81471
- [33] Zhou Z S, Song J B, Yang Z M. Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 (12) : 4597-4613
- [34] Ferreira T H, Gentile A, Vilela R D, Costa G G L, Dias L I, Endres L, Menossi M. microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum* spp.). PLoS ONE, 2012, 7 (10) : e46703
- [35] Liu H, Tian X, Li Y, Wu C, Zheng C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. RNA-A Publication of the RNA Society, 2008, 14 (5) : 836-843
- [36] Feng Y Z, Yu Y, Zhou Y F, Yang Y W, Lei M Q, Lian J P, He H, Zhang Y C, Huang W, Chen Y Q. A natural variant of miR397 mediates a feedback loop in circadian rhythm. Plant Physiology, 2020, 182 (1) : 204-214
- [37] Zhang J, Wang M, Cheng F S, Dai C, Sun Y F, Lu J, Huang Y T, Li M M, He Y, Wang F Z, Fan B. Identification of microRNAs correlated with citrus granulation based on bioinformatics and molecular biology analysis. Postharvest Biology and Technology, 2016, 118 : 59-67
- [38] Xue C, Yao J L, Qin M F, Zhang M Y, Allan A C, Wang D F, Wu J. PbrmiR397a regulates lignification during stone cell development in pear fruit. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17 (1) : 103-117
- [39] Swetha C, Basu D, Pachamuthu K, Tirumalai V, Nair A, Prasad M, Shivaprasad P V. Major domestication-related phenotypes in *Indica* rice are due to loss of miRNA-mediated laccase silencing. Plant Cell, 2018, 30 (11) : 2649-2662
- [40] Zhang Y C, Yu Y, Wang C Y, Li Z Y, Liu Q, Xu J, Liao J Y, Wang X J, Qu L H, Chen F, Xin P Y, An C Y Y, Chu J F, Li H Q, Chen Y Q. Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. Nature Biotechnology, 2013, 31 (9) : 848-852
- [41] Wang C Y, Zhang S C, Yu Y, Luo Y C, Liu Q, Ju C L, Zhang

- Y C, Qu L H, Lucas W J, Wang X, Chen Y Q. MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(8): 1132-1142
- [42] 向娟, 林鹏, 李兴盛, 李双桃, 刘梦云, 张磊, 郭仰东. 过表达番茄 Sly-miR397 基因增强拟南芥的耐旱性. *中国农业大学学报*, 2016, 21(10): 51-58
- Xiang J, Lin P, Li X S, Li S T, Liu M Y, Zhang L, Guo Y D. Overexpression of tomato Sly-miR397 gene enhances drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of China Agricultural University*, 2016, 21(10): 51-58
- [43] 王丽丽, 赵韩生, 孙化雨, 董丽莉, 姜永峰, 高志民. 毛竹 miR397 和 miR1432 的克隆及其逆境胁迫响应表达分析. *林业科学*, 2015, 51(6): 63-70
- Wang L L, Zhao H S, Sun H Y, Dong L L, Lou Y F, Gao Z M. Cloning and expression analysis of miR397 and miR1432 in *Phyllostachys edulis* under stresses. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(6): 63-70
- [44] Shin S J, Lee J H, Kwon H B. Genome-wide identification and characterization of drought responsive MicroRNAs in *Solanum tuberosum* L. *Genes & Genomics*, 2017, 39(11): 1193-1203
- [45] Lu S, Sun Y H, Chiang V L. Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *Plant Journal*, 2008, 55(1): 131-151
- [46] Zhang J, Xu Y, Huan Q, Chong K. Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 2009, 10: 449
- [47] Mahale B M, Fakrudin B, Ghosh S, Krishnaraj P U. LNA mediated in situ hybridization of miR171 and miR397a in leaf and ambient root tissues revealed expressional homogeneity in response to shoot heat shock in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 23(1): 93-103
- [48] Liu Q, Yang T F, Yu T, Zhang S H, Mao X X, Zhao J L, Wang X F, Dong J F, Liu B. Integrating small RNA sequencing with QTL mapping for identification of miRNAs and their target genes associated with heat tolerance at the flowering stage in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 43
- [49] Vijay G, Vinay K B, Paramjit K. miRNomes involved in imparting thermotolerance to crop plants. *E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, 2018, 8(12): 497
- [50] Liang G, Ai Q, Yu D Q. Uncovering miRNAs involved in crosstalk between nutrient deficiencies in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11813
- [51] Tiwari J K, Buckseth T, Zinta R, Saraswati A, Singh R K, Rawat S, Chakrabarti S K. Genome-wide identification and characterization of microRNAs by small RNA sequencing for low nitrogen stress in potato. *PLoS ONE*, 2020, 15(5): e0233076
- [52] Yi Y Z, Hou Q Z, Cai X D, Xiao M Y, Qi R S, Zhi M Y. MicroRNA expression profiles associated with phosphorus deficiency in white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Science*, 2010, 178(1): 23-29
- [53] Leng X P, Wang P P, Zhao P C, Wang M Q, Cui L W, Shanguan L F, Wang C. Conservation of microRNA-mediated regulatory networks in response to copper stress in grapevine. *Plant Growth Regulation*, 2017, 82(2): 293-304
- [54] Burkhead J L, Reynolds K A, Abdel-Ghany S E, Cohu C M, Pilon M. Copper homeostasis. *New Phytologist*, 2009, 182(4): 799-816
- [55] Burklew C E, Ashlock J, Winfrey W B, Zhang B H. Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e34783
- [56] Ding Y F, Ye Y Y, Jiang Z H, Wang Y, Zhu C. MicroRNA390 is involved in cadmium tolerance and accumulation in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 235
- [57] Xu L, Wang Y, Zhai L L, Xu Y Y, Wang L J, Zhu X W, Gong Y Q, Yu R G, Limera C, Liu L W. Genome-wide identification and characterization of cadmium-responsive microRNAs and their target genes in radish (*Raphanus sativus* L.) roots. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(14): 4271-4287
- [58] Zhou Q, Yang Y C, Shen C, He C T, Yuan J G, Yang Z Y. Comparative analysis between low- and high-cadmium-accumulating cultivars of *Brassica parachinensis* to identify difference of cadmium-induced microRNA and their targets. *Plant and Soil*, 2017, 420(1-2): 223-237
- [59] Ozhuner E, Eldem V, Ipek A, Okay S, Sakcali S, Zhang B, Boke H, Unver T. Boron stress responsive microRNAs and their targets in barley. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59543
- [60] Huang J H, Qi Y P, Wen S X, Guo P, Chen X M, Chen L S. Illumina microRNA profiles reveal the involvement of miR397a in *Citrus* adaptation to long-term boron toxicity via modulating secondary cell-wall biosynthesis. *Scientific Reports*, 2016, 6: e22900
- [61] Jin L, Liu Y, Yin X, Peng S. Transcript analysis of citrus miRNA397 and its target *LAC7* reveals a possible role in response to boron toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(1): 18
- [62] Dubey S, Saxena S, Chauhan A S, Mathur P, Rani V, Chakrabarty D. Identification and expression analysis of conserved microRNAs during short and prolonged chromium stress in rice (*Oryza sativa*). *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(1): 380-390
- [63] Yu X Y, Du B B, Gao Z H, Zhang S J, Tu X T, Chen X Y, Zhang Z, Qu S C. Apple ring rot-responsive putative microRNAs revealed by high-throughput sequencing in *Malus x domestica* Borkh. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(8): 5273-5286
- [64] Li Y L, Hu X X, Chen J R, Wang W X, Xiong X Y, He C Z. Integrated mRNA and microRNA transcriptome analysis reveals miRNA regulation in response to PVA in potato. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16925
- [65] Xu Y J, Zhu S W, Liu F, Wang W, Wang X W, Han G M, Cheng B J. Identification of arbuscular mycorrhiza fungi responsive microRNAs and their regulatory network in maize. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 2-13
- [66] Ballén-Taborda C, Plata G, Ayling S, Rodríguez-Zapata F, Becerra Lopez-Lavalle L A, Duitama J, Tohme J. Identification of *Cassava* microRNAs under abiotic stress. *International Journal of Genomics*, 2013, 2013: e857986
- [67] Pan C T, Ye L, Zheng Y, Wang Y, Yang D D, Liu X, Chen

- L F, Zhang Y W, Fei Z J, Lu G. Identification and expression profiling of microRNAs involved in the stigma exertion under high-temperature stress in tomato. *BMC Genomics*, 2017, 18 (1); 843
- [68] Song X W, Li Y, Cao X F, Qi Y J. MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 489-525
- [69] Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T. *SQUAMOSA* promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21 (1): 347-361
- [70] Ramachandran V, Chen X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science*, 2008, 321 (5895): 1490-1492
- [71] Lu S, Sun Y H, Chiang V L. Adenylation of plant miRNA. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (6): 1878-1885