

· 热点评 ·

## miR396-GRF模块：水稻分子育种的新资源

刘玲童, 王台\*

中国科学院植物研究所, 植物分子生理学重点实验室, 北京 100093

**摘要** 籽粒大小与颖花数量是影响水稻(*Oryza sativa*)产量的重要因素。miR396-GRF模块在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻等植物的营养器官和花器官生长发育过程中扮演着多面角色。最近, 中国科学家在miR396-GRF模块调控水稻籽粒大小和穗粒数的分子机理研究方面取得了突破性进展。

**关键词** 水稻, 籽粒大小, miR396, GRF, miR396-GRF模块

刘玲童, 王台 (2016). miR396-GRF模块: 水稻分子育种的新资源. 植物学报 51, 1–1.

植物的生长发育过程普遍受到表观遗传的调控。21–24个核苷酸长度的microRNA (mi-RNA)是一类重要的表观遗传调控因子, 它可以通过碱基配对结合靶基因的mRNA, 引发mRNA降解或者翻译抑制(Pasquinelli and Ruvkun, 2002; Kim, 2005)。1993年最先报道了秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)中的miRNA (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993)。近20年的研究表明, miRNA在动物、植物和病毒中普遍存在。目前miR-Base数据库已收录760个拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) miRNA (ath-miR)序列, 1 392个水稻(*Oryza sativa*) miRNA (osa-miR)序列(Griffiths-Jones et al., 2006)。miRNA在核内由RNA polymerase II转录, 也可被5'加帽、剪接和3'聚腺苷酸化(polyadenylated)。初级转录本(pri-mir)在核内被剪切成具颈环结构的miRNA前体(pre-mir), 之后进一步被Dicer (植物中是dicer-like protein, DCL1)剪切, 产生成熟的miRNA (Chen, 2005; Kim, 2005)。因为每个miRNA来源于颈环结构的双链部分, 所以刚被切下的双链RNA包含1条有功能的miRNA链及其反向互补序列。其中miRNA链优先装载到miRISC (miRNA-containing RNA-induced silencing complex)上, 并引发靶基因的转录后沉默(Kim, 2005)。

与动物miRNA相比, 植物miRNA与靶mRNA序列的配对结合程度更高, 更容易引发mRNA的切割(Bartel, 2004)。总体来说, 植物miRNA倾向于结合编码转录因子和F-box蛋白等发育相关的靶mRNA

(Wang et al., 2004; Chen, 2005; Liang et al., 2014)。干旱、高盐、低温和线虫侵染等环境胁迫都会诱发某些miRNA的高表达(Liu et al., 2008; Zhao et al., 2015)。Jones-Rhoades和Bartel (2004)及Wang等(2004)采用生物信息学手段最先报道了植物miR396基因家族的存在, 拟南芥基因组有2个基因座(ath-MIR396a和ath-MIR396b)编码miR396。目前在miRBase数据库中可检索到8个水稻miR396 (osa-MIR396a–h)。许多证据显示, miR396抑制植物特异性转录因子GRFs (growth-regulating factors, GRFs)的表达, 进而影响GRFs/GIFs (GRF-interacting factors)介导的水稻生长发育过程(Omidbakhshfard et al., 2015)。在拟南芥中过表达miR396会降低靶GRFs的mRNA水平, 导致短根、小叶、单心皮雌蕊以及根尖生长点异常等表型(Bao et al., 2014; Liang et al., 2014; Rodriguez et al., 2015)。在水稻中, miR396-GRF模块(module)被发现是花器官发育所必需的(Liu et al., 2014)。这些结果表明, miR396-GRF模块在营养器官和花器官发育过程中起着重要的调控作用, 然而我们对miR396在种子发育中的作用还知之甚少。

最近, 中国水稻研究所钱前研究组, 中国科学院遗传与发育生物学研究所李云海研究组与储成才研究组, 武汉大学李绍清研究组纷纷揭示了miR396对水稻籽粒大小和穗粒数的分子调控机制(Che et al., 2015; Duan et al., 2015; Gao et al., 2015; Hu et al., 2015)。钱前研究组与李云海研究组通过对籼稻大粒

收稿日期: 2016-01-25; 接受日期: 2016-02-01

\* 通讯作者。 E-mail: twang@ibcas.ac.cn

品种的研究,在第2号染色体上定位到1个主效QTL基因GS2,它对水稻粒长、粒宽和粒厚都有正向影响。基因精细定位和籼稻遗传资源材料的基因组序列分析结果表明,来源于籼稻的半显性基因(LOC\_Os02-g47280)第3个外显子的TC→AA突变导致2个品种间的粒型差异。将gGS2<sup>AA</sup>转入粳稻品种中花11能显著增加转基因植株籽粒的粒长和粒重。GS2编码水稻GRF家族成员OsGRF4。钱前研究组发现,GS2的全长或单独的C末端具有转录激活活性,且该活性不受TC→AA突变影响。粳稻等位基因GS2<sup>TC</sup>的第3个外显子有miR396c/g的靶位点,miR396能够切割GS2<sup>TC</sup>的mRNA。而长粒品种的GS2<sup>AA</sup>突变干扰了miR396c/g对GS2/OsGRF4转录本的切割。细胞学分析显示,GS2/OsGRF4通过影响细胞分裂和细胞伸长,调控水稻籽粒的大小。另外,GS2还可显著上调与灌浆速率有关的GIF1的表达。钱前研究组和李云海研究组分别对66个和41个常见籼粳稻栽培品种的GS2基因序列进行了比对分析,发现这些品种均没有GS2<sup>AA</sup>等位基因,表明GS2<sup>AA</sup>在栽培稻驯化(育种)过程中没有被广泛的正向选择。

储成才研究组发现的GL2是OsGRF4的一个等位基因,该基因在幼嫩的花序和颖壳中优势表达。与GS2类似,GL2 mRNA上的miR396d靶位点有2 bp的(TC→AA)突变,使miR396d对OsGRF4的mRNA切割能力减弱,导致OsGRF4的mRNA含量在近等基因系(near-isogenic line, NIL) NIL-GL2的幼嫩花序中比小粒品种BobaiB的增加3倍左右。储成才研究组还发现NIL-GL2的幼苗株高比BobaiB显著增加,推测这一表型与BR途径有关。但结果显示,BR合成相关基因和BR含量在NIL-GL2幼苗中并没有明显变化;而GA合成基因GA20ox-1、GA20ox-2和GA3ox-2的表达水平及GA1含量比BobaiB明显升高,GA失活基因GA2ox-3的表达水平下降。说明GL2是通过激活BR响应而不是激活BR合成或GA信号转导起作用。NIL-GL2幼苗和幼穗的表达谱分析结果显示,GL2能促进细胞膨大(cell expansion)相关基因的表达,这为GL2如何促进水稻籽粒变大提供了进一步的解释。此外,储成才研究组发现,GL2可与水稻BR信号通路的重要负调控因子GSK2互作,而GSK2能显著抑制GL2的转录激活活性。Che等(2015)的杂交实验也表明,GSK2可在很大程度上抑制NIL-GL2的籽粒增大效果。

李绍清研究组利用miRNA芯片筛选杂交水稻Yuetai-A/9311及其亲本幼嫩花序中差异表达的miRNA,发现将筛选到的miR396b在籼稻Yuetai-B中过量表达会导致其花序短小、次级枝梗和颖花数量严重减少;过表达miR396b的无效类似物(MIM396)或OsGRF6(miR396b的靶基因),水稻的次级枝梗数和颖花数量则显著增加。RNA-seq显示OsGRF6是生长素IAA信号途径的正调控因子;ChIP-seq分析发现OsGRF6在生长素相关基因OsYUCCA-like(FMO)、OsARF2和OsARF7的启动子区显著富集。Gao等(2015)的研究也发现,OsGRF6可以体外结合花序发育的重要调控基因OsTAWAWA1和OsMADS34的CGSMR序列。

这些研究从不同角度揭示了miR396-GRF模块调控水稻籽粒大小和穗粒数的分子机制,显示多个miR396变体参与了水稻粒形的调控,它们或作用于同一个靶基因,或调控不同的靶基因,为进一步探讨这些分子的调控网络奠定了基础。同时,研究也揭示了miR396-GRF模块与BR和IAA等信号转导通路的可能联系,暗示更大的颖壳与更快的灌浆速率是导致大粒表型的直接原因。遗憾的是,GS2<sup>AA</sup>会显著提高稻米的垩白度和垩白率(Hu et al., 2015),这可能是GS2<sup>AA</sup>在中国的栽培稻驯化过程中未被广泛利用的原因之一。一直以来,产量与品质的协同改良是水稻分子育种面临的重要挑战,因此,miR396-GRF模块在水稻分子育种中的利用价值尚需进一步探索。

## 参考文献

- Bao M, Bian H, Zha Y, Li F, Sun Y, Bai B, Chen Z, Wang J, Zhu M, Han N (2014). miR396a-mediated basic helix-loop-helix transcription factor bHLH74 repression acts as a regulator for root growth in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiol* **55**, 1343–1353.
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297.
- Che R, Tong H, Shi B, Liu Y, Fang S, Liu D, Xiao Y, Hu B, Liu L, Wang H, Zhao M, Chu C (2015). Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nat Plants* **2**, 15195.
- Chen X (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett* **579**, 5923–5931.
- Duan P, Ni S, Wang J, Zhang B, Xu R, Wang Y, Chen H,

- Zhu X, Li Y** (2015). Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. *Nat Plants* **2**, 15203.
- Gao F, Wang K, Liu Y, Chen Y, Chen P, Shi Z, Luo J, Jiang D, Fan F, Zhu Y, Li S** (2015). Blocking miR396 increases rice yield by shaping inflorescence architecture. *Nat Plants* **2**, 15196.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ** (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* **34**, D140–144.
- Hu J, Wang Y, Fang Y, Zeng L, Xu J, Yu H, Shi Z, Pan J, Zhang D, Kang S, Zhu L, Dong G, Guo L, Zeng D, Zhang G, Xie L, Xiong G, Li J, Qian Q** (2015). A rare allele of GS2 enhances grain size and grain yield in rice. *Mol Plant* **8**, 1455–1465.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP** (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* **14**, 787–799.
- Kim VN** (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 376–385.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854.
- Liang G, He H, Li Y, Wang F, Yu D** (2014). Molecular mechanism of microRNA396 mediating pistil development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **164**, 249–258.
- Liu H, Guo S, Xu Y, Li C, Zhang Z, Zhang D, Xu S, Zhang C, Chong K** (2014). OsmiR396d-regulated OsGRFs function in floral organogenesis in rice through binding to their targets OsJMJ706 and OsCR4. *Plant Physiol* **165**, 160–174.
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC** (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* **14**, 836–843.
- Omidbakhshfard MA, Proost S, Fujikura U, Mueller-Roeber B** (2015). Growth-Regulating Factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. *Mol Plant* **8**, 998–1010.
- Pasquinelli AE, Ruvkun G** (2002). Control of developmental timing by microRNAs and their targets. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 495–513.
- Rodriguez RE, Ercoli MF, Debernardi JM, Breakfield NW, Mecchia MA, Sabatini M, Cools T, De Veylder L, Benfey PN, Palatnik JF** (2015). MicroRNA miR396 regulates the switch between stem cells and transit-amplifying cells in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **27**, 3354–3366.
- Wang XJ, Reyes JL, Chua NH, Gaasterland T** (2004). Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol* **5**, R65.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G** (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855–862.
- Zhao W, Li Z, Fan J, Hu C, Yang R, Qi X, Chen H, Zhao F, Wang S** (2015). Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato. *J Exp Bot* **66**, 4653–4667.

## miR396-GRF Modules: A New Prospective on Rice Molecular Breeding

Lingtong Liu, Tai Wang\*

*Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*

**Abstract** Grain size and number of spikelets are major factors controlling rice yield. The miR396-GRF module plays multifaceted roles in the growth and development of *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) and rice (*Oryza sativa*). Recently, Chinese scientists have revealed novel insights into the role of miR396-GRF modules in controlling grain size and number of spikelets in rice.

**Key words** rice, grain size, miR396, GRF, miR396-GRF modules

**Liu LT, Wang T** (2016). miR396-GRF modules: a new prospective on rice molecular breeding. *Chin Bull Bot* **51**, 1–1.

---

\* Author for correspondence. E-mail: twang@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 孙冬花)