

# 贝莱斯芽孢杆菌 GF-46 诱导玉米 miRNA 差异表达及其调控功能分析

李婕超, 陈龙俊, 王京辉, 闫国欣, 李朝乾, 朱莹, 韩升才\*

(内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 呼和浩特 010020)

**摘要:** 本研究采用 Illumina 高通量测序技术, 揭示了贝莱斯芽孢杆菌 GF-46 处理对玉米 B73 miRNA 表达的影响。共鉴定出 37 个差异表达的 miRNA, 包括保守家族 (如 miR164、miR171、miR166 等) 和新预测的 miRNA (如 8\_36419、3\_16586 等)。KEGG 通路富集分析显示有 135 条显著调节的代谢途径 ( $Q < 0.05$ ), 主要集中在植物激素信号转导 (生长素、茉莉酸信号通路)、苯丙烷生物合成 (PAL、4CL 酶节点)、植物-病原体相互作用 (RLK 介导的信号通路)。值得注意的是, miRNA-8\_36419 表现出更强的调控能力, 靶向这些关键途径中约 50% 的注释基因。这些发现阐明了 GF-46 介导的玉米生长促进和系统抗性的机制, 加深了对单子叶作物中微生物组调控转录网络的理解。

**关键词:** 玉米; 贝莱斯芽孢杆菌 GF-46; miRNA; 植物-微生物互作

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2025)04-0028-15

## Analysis of the Differential Expression of miRNAs Induced by *Bacillus velezensis* GF-46 and Its Regulatory Functions in Maize

LI Jiechao, CHEN Longjun, WANG Jinghui, YAN Guoxin, LI Zhaoqian, ZHU Ying, HAN Shengcai\*

(College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, China)

**Abstract:** This study employed Illumina high-throughput sequencing technology to investigate the effects of *Bacillus velezensis* GF-46 treatment on miRNA expression in maize B73. A total of 37 differentially expressed miRNAs were identified, including conserved families (such as miR164, miR171, miR166, etc.) and novel miRNAs (such as 8\_36419, 3\_16586, etc.). KEGG pathway enrichment analysis revealed 135 significantly modulated metabolic pathways ( $Q < 0.05$ ), with pronounced representation in: (i) phytohormone signaling (auxin and jasmonic acid signaling pathways), (ii) phenylpropanoid biosynthesis (PAL, 4CL enzymatic nodes), (iii) plant-pathogen recognition systems (RLK-mediated signaling pathways). Notably, miRNA-8\_36419 exhibited superior regulatory capacity, targeting approximately 50% of annotated genes within these key pathways. These findings clarify the mechanisms underlying GF-46-mediated growth promotion and systemic resistance in maize, and deepen the understanding of microbiome-regulated transcriptional networks in monocot crops.

**Key words:** Maize; *Bacillus velezensis* GF-46; miRNA; Plant-microbe interaction

贝莱斯芽孢杆菌作为一种根际益生菌, 接种后可以促进玉米的生长发育, 这种促生作用与贝莱斯芽孢杆菌所具备的促进根系发育尤其对侧根的促进作用有密切的关系, 如 B105-8 和 FZB42, 这些菌株在盐碱条件下或正常土壤条件下具有促生效果<sup>[1-3]</sup>。例如 WRN031 和 D103 菌株能够促进根系伸长<sup>[4-5]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌对玉米的促生作

用还与其解磷、解钾能力密切相关<sup>[2]</sup>。除了促进玉米的生长发育, 贝莱斯芽孢杆菌对玉米的抗病性也有显著的影响, 例如 EBs02、TSA32-1 和 NWUMFkBS10.5 等菌株<sup>[6-8]</sup>, 可产生多肽或聚酮等次级代谢产物, 能够直接破坏病原菌细胞膜的完整性, 抑制病原菌的生长。有些菌株如 *Bacillus velezensis* HC6 能够通过弱化病原菌产生毒素的能力发挥作用<sup>[9]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌还可以通过激活玉米的 ABA 和 SA 调节途径诱导玉米抗病, 防止病原体通过气孔进入<sup>[8]</sup>。

贝莱斯芽孢杆菌对玉米的促生和抗病功能, 可能与调控玉米内源 miRNA 的表达有关。

收稿日期: 2025-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960381、32460535)

作者简介: 李婕超 (1999-), 女, 在读硕士, 主要从事玉米-微生物互作研究。

通信作者: 韩升才, E-mail: shengcai@imau.edu.cn

miRNA 是一类长度为 18~24 nt 的短核苷酸序列,在玉米的生长发育调控及抗病过程中发挥重要的作用。通过降解靶向 mRNA 或抑制 mRNA 翻译来调控基因表达<sup>[10]</sup>。已有研究表明 miRNA 可调控玉米生长发育。miR169 在干旱条件下通过靶向基因 *NF-YA* 调控玉米根系的发育并促进根的生长<sup>[11-12]</sup>。miR164 通过靶基因 *zmNAC1* 调控玉米侧根的发育<sup>[13]</sup>。miR166 和 miR390 可能通过影响脱落酸含量调控玉米的抗旱能力<sup>[14-15]</sup>。miR396 调控玉米对温度的适应能力<sup>[16]</sup>。miR172 调控玉米心皮和雄蕊的发育<sup>[17]</sup>。miR156 调控玉米果穗发育和籽粒结构。miR528 在缺氮条件下调控木质素积累的增加,提升玉米的抗倒伏能力<sup>[18-19]</sup>。经鉴定多种 miRNA 在玉米的抗病过程中发挥重要作用。miRNA160、miR319、miR408b、miR390、miR169j、miR395a/p、miRNA (miRn5231)、miR397、miR408 和 miR528 在诱导玉米抗病性方面表现出色<sup>[20-25]</sup>。经贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 处理后玉米靶向抑制 miRNA 表达,并参与系统抗病性的激活<sup>[26]</sup>。但是在贝莱斯芽孢杆菌与玉米互作过程中被成功鉴定并明确功能的 miRNA 数量有限。

目前鉴定出一株对玉米有显著促生作用且能够有效控制玉米茎基腐病的 *Bacillus. velezensis* GF-46 菌株<sup>[27-29]</sup>。为明确 GF-46 菌株对玉米的益生功能与 miRNA 之间的关系,本研究分析了接种 GF-46 菌株后玉米 B73 植株中差异 miRNA 的变化,通过高通量测序鉴定差异表达 miRNA。对差异表达基因做 GO 注释和 KEGG 代谢通路分析,筛选生长发育和抗病相关潜在关键通路,并用 qPCR 验证测序结果的准确性。该研究结果将为深入理解植物-微生物互作的分子机制,以及利用微生物促进植物生长、提高抗病性提供理论基础和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品制备

试验所用玉米品种为自交系 B73,由中国农业大学资源与环境学院李学贤教授提供。供试菌株 GF-46(CGMCC NO.21314),由内蒙古农业大学园艺与植物保护学院韩升才实验室菌种库保存并提供。活化培养 GF-46 菌株至菌液浓度  $10^8$  CFU/mL ( $OD_{600}$ )。将菌液 6 000 r/min 离心 10 min,去除上清并用无菌水重悬菌体。将经离心重悬后的 GF-46 菌株菌悬液采用浸蘸处理法,将菌悬液缓慢滴加至置于滤纸上的 B73 幼胚表面。对照组以等量无

菌水处理,处理完成后,滤纸保持湿润状态。每个处理 10 株幼胚,3 次重复。室温下培养 7 d 后取样测序。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 玉米 miRNA 的高通量测序

将样本送至上海美吉生物医药科技有限公司提取 RNA 构建文库及测序。参考基因组版本为 Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0<sup>[30]</sup>。使用 QIAseq miRNA Library Kit 试剂盒进行文库构建,引物为 3'-AACTGTAGGCACCATCAAT, 5'-GTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC,并利用 NovaSeq X Plus 平台对 16~35 nt 的小 RNA 片段上机测序。

#### 1.2.2 玉米 miRNA 测序数据分析

原始测序结果包括测序接头序列或低质量片段。为确保后续生物信息学分析的准确性,对原始测序数据进行过滤。利用美吉软件 Fastx-Toolkit ([https://github.com/agordon/fastx\\_toolkit](https://github.com/agordon/fastx_toolkit)) 过滤原始数据:去除 3' 接头、未插入片段的连接产物、剪切 3' 端质量值 < 20 的碱基、去除含未知碱基 N 以及长度过短 (< 18 nt) 和过长 (> 32 nt) 的 reads。得到 clean data 以保证后续分析的顺利进行。

#### 1.2.3 已知 miRNA 鉴定

将已经比对到参考基因组的 reads 与 miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 中玉米 B73 品种的 miRNA 前体及成熟体序列进行比对。允许存在 1 个碱基的错配,以此来识别已知 miRNA,并对其前体的二级结构进行预测。

#### 1.2.4 新 miRNA 预测

使用 miRNA 前体的发夹结构特征预测新 miRNA。将无法与 Rfam 数据库和 miRBase 数据库匹配的 reads 重新比对到参考基因组上,截取周围序列。使用 miRDeep 2 软件对截取序列进行二级结构预测,根据预测结果使用 Dicer 酶切位点信息、能量值等特征进行过滤,鉴定出新的 miRNA。

#### 1.2.5 miRNA 表达量分析

对各样本 miRNA 的表达量进行定量分析,用 TPM 进行表达量的均一化处理。根据 miRBase 数据库和玉米自交系 B73 的基因组序列数据库获取 miRNA 的读数后,对多样本 ( $\geq 2$ ) 项目进行样本间 miRNA 差异表达分析,筛选处理组与对照组之间差异表达 miRNA。用差异表达分析软件 DESeq 2 软件<sup>[31]</sup>筛选差异 miRNA (筛选标准:  $P < 0.05$ ,  $|\log_2FC| \geq 1$ )。通过 psRobot 软件<sup>[32]</sup>预测靶基因并进行功能注释。

### 1.2.6 差异 miRNA 靶基因 GO 和 KEGG 注释分析

基于 GO 数据库对靶基因进行生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 注释, 利用 KEGG 数据库分析代谢通路<sup>[33]</sup>。

### 1.2.7 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 检测

选用 U6 为内参基因, 参照 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒说明书, 将 RNA 反转录为 cDNA。通过 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒进行荧光定量 PCR (反应体系见表 1。反应程序:

表 1 qRT-PCR 反应体系  
Table 1 qRT-PCR reaction system

组分 Component	用量/ $\mu$ L Volume
2 $\times$ SYBR qPCR Master Mix	10
Upstream primer (10 $\mu$ mol/L)	0.4
Downstream primer (10 $\mu$ mol/L)	0.4
Template	1
RNase Free Water	8.2

95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环; 熔解曲线分析: 95  $^{\circ}$ C 保持 15 s, 60  $^{\circ}$ C 保持 60 s, 以 0.05  $^{\circ}$ C/s 的速率升至 95  $^{\circ}$ C), 相对表达量按  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算。qRT-PCR 所用引物见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米 miRNA 测序质量分析

高通量测序结果显示, 处理组 (T46) 和对照组 (CK) 的 Raw reads 数约为 10 907 868 左右。通过质控后的 Clean reads 数约为 7 140 202。useful reads 数从 6 062 703 到 7 280 017 不等。质量值 (Q20) 在 99% 以上, 质量值 (Q30) 在 96% 以上, GC 含量接近 52%, 比率均衡, 说明测序的碱基错误率低, 测序质量非常可靠 (表 3)。

### 2.2 样本间关系分析

主成分分析 (PCA) 常用于评估组间差异及组内样本的重复性。在 PCA 分析中 (图 1), 处理组的 3 个重复样本 T46-1、T46-2 和 T46-3 聚类紧密, 表明组内重复性良好。对照组的 3 个重复样本 CK1、CK2

表 2 qRT-PCR 引物序列  
Table 2 qPCR primer names and sequences

序列名称 Sequence name	引物序列 (3'-5') Primer sequence
U6-F	GATAAAATGGAACGATACAG
U6-R	ATTGACCATTTCTCGATTT
2_12941-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGTCCTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACCCGGAA
zma-miR164a-3p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGTCCTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACGATGGA
zma-miR166n-5p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGTCCTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACCACCGA
8_36419-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGTCCTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACCAGCC
3_16586-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGTCCTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACCCTCGA
10_44628-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGTCCTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACCATAAT
miR-R	GTGCAGGTCCTCCGAGGT
2_12941-F	GGATCTTCTTCGGGGTTTC
zma-miR164a-3p-F	GCACCTGTTCTCTCTCTC
zma-miR166n-5p-F	AGGGATTGTTGTCTGGCT
8_36419-F	AGGGTGGCTGTCTCTC
3_16586-F	CAGCGGCTGCTGTATC
10_44628-F	AGCCCTCGGATGTCTC

和 CK3 虽有分离趋势, 但整体相关性较高, 一致性较强。对照组和 T46 组的样本明显分离, 表明这两组样本的整体表达模式存在显著差异。

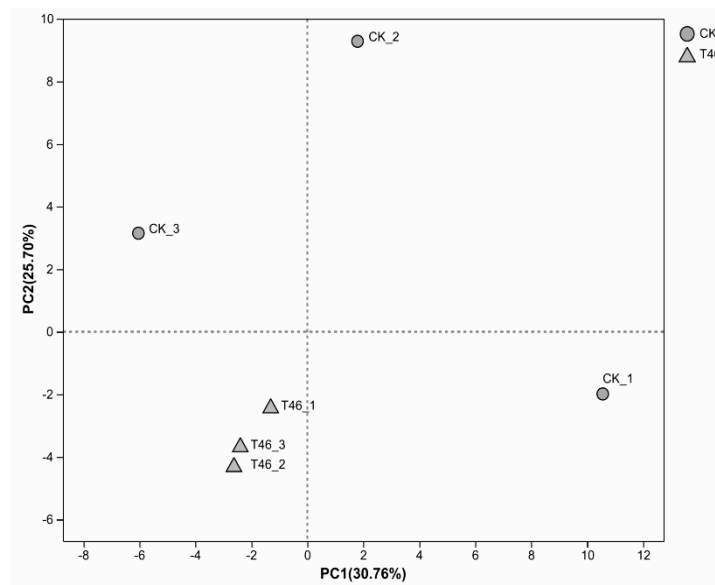
### 2.3 差异表达 miRNA 筛选

将质控后的 useful reads 与参考基因组比对, 共鉴定出 654 个 miRNA 序列, 已知 miRNA 共 250

表 3 不同样本中 miRNA 测序数据分析

Table 3 Statistical analysis of miRNA sequencing data in the different samples

样品 Sample	质控前 read 数 Number of reads before quality control	质控后 read 数 Number of reads after qual- ity control	Q20	Q30	GC 含量/% GC content	长度在 18~32 nt 的序列/个 Number of sequences with length 18~32 nt
T46_1	10 907 868	7 140 202	99.35	97.16	52.25	6 928 758
T46_2	10 493 004	6 858 319	99.30	96.96	52.88	6 505 805
T46_3	10 293 390	6 861 363	99.33	97.13	52.07	6 236 970
CK_1	10 258 448	8 131 645	99.30	96.96	54.26	7 280 017
CK_2	10 274 565	7 048 786	99.34	97.06	52.40	6 410 540
CK_3	12 356 844	6 913 768	99.07	96.30	52.49	6 062 703



注:横轴是 PC1, 变异系数为 30.76%; 纵轴是 PC2, 变异系数为 25.70%。

Note: The horizontal axis represents PC1 with a variance contribution rate of 30.76%; the vertical axis represents PC2 with a variance contribution rate of 25.70%.

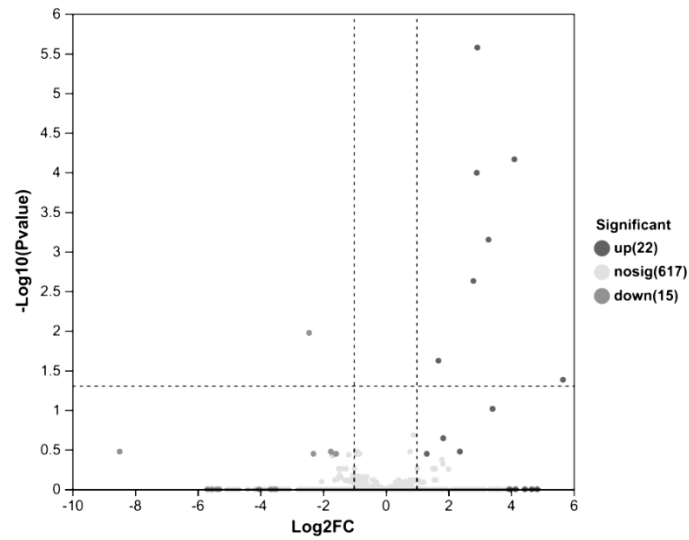
图 1 PCA 主成分分析图

Fig.1 Principal component analysis plot

个,以及 404 个新 miRNA。共筛选出 37 个差异表达的 miRNA,其中 22 个上调、15 个下调(图 2)。极显著差异( $P \leq 0.01$ ) miRNA 共有 14 条。差异 miRNA 序列长度在 18~24 nt,主要集中在 21 nt(表 4)。已知的主要 miRNA 家族包括 miR171、miR164、miR166 和 miR395 等。新预测 miRNA 主要包括 8\_38768、8\_36419、3\_16586、1\_2720、10\_44628、9\_40809 等。8\_38768 和 8\_36419 的成熟体序列、前体序列以及靶向基因均一致,推测可能是由于序列所在基因组位置不同。因此后文仅对 8\_36419 进行分析。这些具有差异性表达的 miRNA 在玉米 B73 经过贝莱斯芽孢杆菌 GF-46 处理后可能发挥特定的功能。

#### 2.4 差异表达 miRNA 的靶基因分析

为了研究菌株 GF-46 处理后玉米中差异表达 miRNA 的功能,本研究采用了 psRobot 靶基因预测软件,对所有已识别的以及新预测的 miRNA 进行了靶基因预测,并对这些靶基因进行了功能注释(图 3)。通过分析,识别出 25 039 个靶基因与已知 miRNA 相关联,而新预测的 miRNA 则对应了 39 597 个靶基因。GO 功能注释揭示差异 miRNA 靶基因在 5 种分子功能(MF)、6 种细胞组分(CC)和 9 种生物学过程(BP)中富集。分子功能方面主要集中在结合(78 个,GO:0005488)和酶活性(51 个,GO:0003824)两方面。细胞组分主要集中在细胞部分(76 个,GO:0044464)、细胞器(52 个,GO:



注:火山图展示了表达差异( $P < 0.05 = -\log_{10} P > 1.301$ ;  $|\log_2 FC| \geq 1$ )。横坐标“Log2FC”表示基因表达水平变化的对数,反映了基因表达上调或下调的程度。纵坐标“-Log10(P value)”反映了统计检验P值,数值越大基因表达差异越显著。图中,右侧点表示显著上调miRNA,共22个。左侧点表示显著下调miRNA,共15个。灰色点表示没有显著差异的miRNA,共617个。

Note: The volcano plot shows the expression differences ( $P < 0.05 = -\log_{10} P > 1.301$ ;  $|\log_2 FC| \geq 1$ ). The abscissa "Log2FC" represents the logarithm of the change in gene expression levels, reflecting the degree of up-regulation or down-regulation of gene expression. The ordinate "-Log10 (P value)" reflects the P-value of the statistical test, and the larger the value, the more significant the difference in gene expression. In the figure, the points on the right represent significantly up-regulated miRNAs, totaling 22. The points on the left represent significantly down-regulated miRNAs, totaling 15. The gray points represent miRNAs with no significant differences, totaling 617.

图2 表达量差异火山图

Fig.2 Volcano plot of differential expression levels

表4 差异miRNA序列表

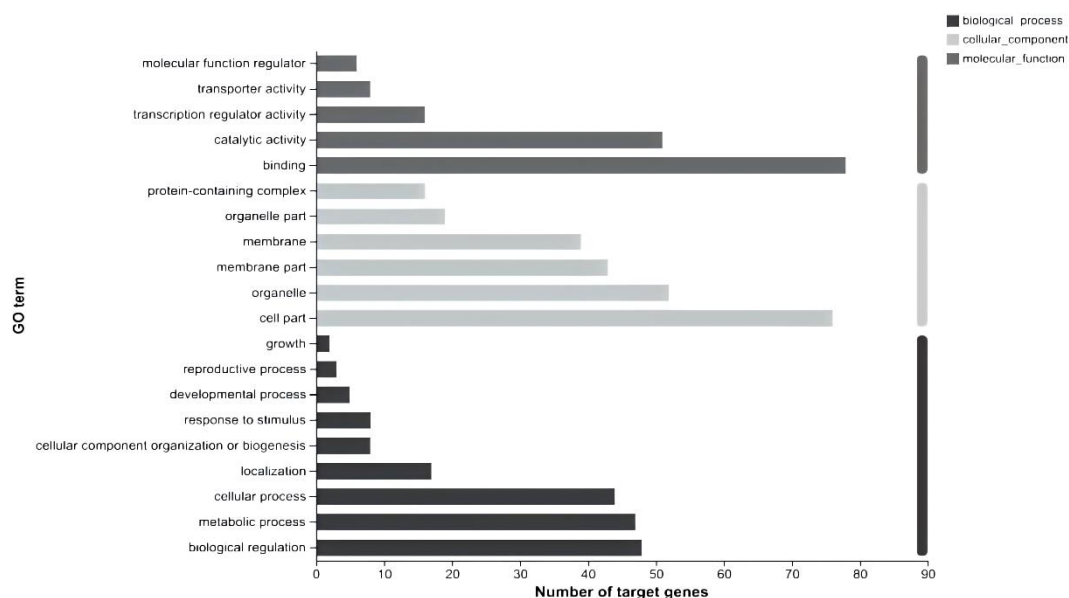
Table 4 Sequence table of differentially expressed miRNAs

miRNA 名称 miRNA name	miRNA 序列 miRNA sequence	miRNA 长度/nt miRNA length	Log2FC(T46/CK)	P 值 P value
zma-miR171g-3p	GAGGUGAGCCGAGCCAAUAUC	21	5.645	0.001 432
2_12941	GAUCUUCUUCGGGGUUUCCGG	21	4.823	0.004 628
10_44783	UCUCUCUGUAUUGCUUUAUUGAUG	24	4.647	0.015 593
zma-miR164e-3p	CAUGUGUCCGCCUCUCCACC	21	4.429	0.031 922
zma-miR164a-3p	CACGUGUUCUCCUUCUCAUC	21	4.135	0.034 196
zma-miR166n-5p	GGAUUGUUGUCUGGCUGGUG	21	4.095	7.868 725E <sup>-7</sup>
4_21397	UGUAGUCUGGGUGGUCAUCUCG	22	3.947	0.020 247
zma-miR395h-5p	GUUCCCUUCAAGCACUUCACAU	22	3.397	0.004 807
zma-miR395j-5p	GUUCCCUUCAAGCACUUCACAU	22	3.397	0.004 807
zma-miR395p-5p	GUUCCCUUCAAGCACUUCACAU	22	3.397	0.004 807
zma-miR395e-5p	GUUCCCUUCAAGCACUUCACAU	22	3.397	0.004 807
zma-miR166j-5p	GGUUUGUUGUCUGGUUCAAGG	22	3.268	1.354 103E <sup>-5</sup>
zma-miR166d-5p	GGAAUGUUGUCUGGUUCAAGG	21	2.913	2.011 697E <sup>-8</sup>
zma-miR166b-5p	GGAAUGUUGUCUGGUUCAAGG	21	2.912	2.035 808E <sup>-8</sup>
zma-miR159a-5p	GAGCUCCUAUCAUCCAAUGA	21	2.895	1.550 887E <sup>-6</sup>
zma-miR164e-5p	UGGAGAAGCAGGACACGUGAG	21	2.786	5.394 613E <sup>-5</sup>
zma-miR171k-3p	GUGAGCCGAACCAUAUCACU	21	2.357	0.032 483

续表 4

Table 4 Continued

miRNA 名称 miRNA name	miRNA 序列 miRNA sequence	miRNA 长度/nt miRNA length	Log <sub>2</sub> FC(T46/CK)	P 值 P value
zma-miR171h-3p	GUGAGCCGAACCAUAUCACU	21	2.357	0.032 483
zma-miR171k-5p	UGGUAUUGUUUCGGCUC AUGU	21	1.825	0.013 905
zma-miR171h-5p	UGGUAUUGUUUCGGCUC AUGU	21	1.825	0.013 905
zma-miR166g-5p	GGAAUGUUGUCUGGUUGGAGA	21	1.671	0.000 730
zma-miR167c-3p	GAUCAUGCUGUGGCAGCCUCACU	23	1.299	0.041 592
8_38768	GGUGGCUGUCCUGGGCUCG	19	-8.492	0.029 852
8_36419	GGUGGCUGUCCUGGGCUCG	19	-8.492	0.029 852
3_16586	AAGUCAGCGGGUGCUGUAUCGAGG	24	-5.689	0.018 748
1_2720	ACGACUAGUCUGGGAAUUGGGCC	24	-5.560	0.002 722
10_44628	AGCCUCGGAUGUCUGCAUUAUG	24	-5.390	0.018 599
9_40809	GUGGGUACGCCGUAUGGAUACUGG	24	-5.318	0.023 826
3_16423	AUGGAUUGUACGAGAUUGAUACGG	24	-4.051	0.037 836
1_3964	AACUCCGUUGCCCAAUGG	18	-3.673	0.027 728
3_14012	UUGGCUGACGACUACCUUGGAG	22	-3.536	0.013 663
1_760	UUGGCUGACGACUACCUUGGAG	22	-3.536	0.013 663
zma-miR167g-3p	GGUCAUGCUGUAGUUUCAUC	20	-2.449	0.000 285
2_10021	AUCAAAAGUUGUAGCGCUAUCGGU	24	-2.311	0.046 572
6_28196	UCGCGGACGAACGGAUAGGAAC	22	-1.757	0.023 428
1_2075	UCGCGGACGAACGGCUAGGAAC	22	-1.757	0.023 428
1_4437	UUGCGUCUGGAUAGAAGGGGA	21	-1.587	0.048 930



注:该图是 T46 组和 CK 组目标基因的 GO 二级注释分析图。横轴表示目标基因的数量,纵轴表示 GO 条目。

Note: This figure is a GO secondary annotation analysis chart of target genes in the T46 group and the CK group. The horizontal axis represents the number of target genes, and the vertical axis represents the GO terms.

图 3 GO 注释分析

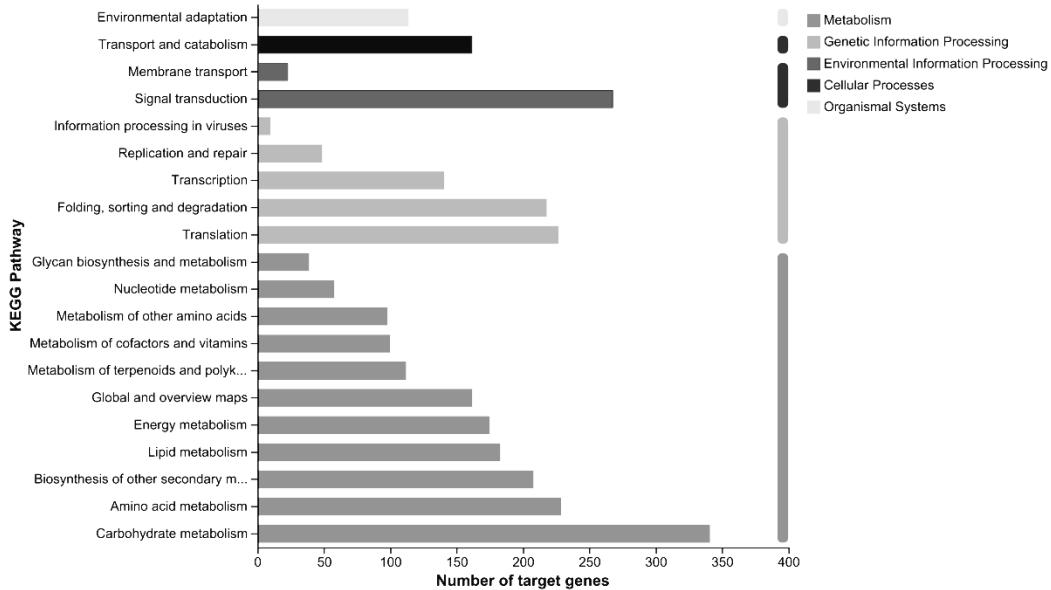
Fig.3 GO annotation analysis

0043226)和膜的组成部分(43个,GO:0044425)3个方面。在生物学过程中靶基因主要集中在生物调节(48个,GO:0065007)、代谢过程(47个,GO:0008152)、细胞过程(44个,GO:0009987)以及细胞组分位置的建立和维护(43个,GO:0051179)。

2.5 KEGG 功能注释差异表达基因

通过对所含靶基因数目较高的KEGG代谢通路进行分析(图4),筛选出与促进生长和抗病相关、调控靶基因数目较多的3条关键通路,并针对

这些通路中的差异靶基因进行了详细分析。这3条通路分别是:植物激素信号转导,苯丙烷生物合成和植物-病原体相互作用。在植物激素信号转导通路中8\_36419调控靶基因占总靶基因的55.9%左右,苯丙烷生物合成通路中8\_36419调控靶基因占48.1%,在植物-病原体相互作用通路中8\_36419调控靶基因数占58.6%左右。在这3条通路中8\_36419起主要作用(表5)。



注:该图是T46组与CK组比较的KEGG注释分析图。横轴表示目标基因的数量,纵轴表示KEGG通路。

Note: This figure is a KEGG annotation analysis chart comparing the T46 group with the CK group. The horizontal axis represents the number of target genes, and the vertical axis represents the KEGG pathways.

图4 KEGG 注释分析

Fig.4 KEGG annotation analysis

表5 各通路中差异miRNA调控靶基因的比例

Table 5 Proportion of target genes regulated by differentially expressed miRNAs in each pathway

miRNA 名称 miRNA name	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	苯丙烷生物合成 Phenylpropane biosynthesis	植物-病原物互作 Plant pathogen interaction
zma-miR171g-3p	4/186	6/104	1/99
2_12941	9/186	2/104	1/99
10_44783	5/186	0/104	1/99
zma-miR164e-3p	12/186	6/104	4/99
zma-miR164a-3p	6/186	4/104	2/99
zma-miR166n-5p	7/186	3/104	2/99
4_21397	11/186	5/104	3/99
zma-miR395h-5p	1/186	1/104	1/99
zma-miR395j-5p	1/186	1/104	1/99
zma-miR395p-5p	1/186	1/104	1/99

续表 5

Table 5 Continued

miRNA 名称 miRNA name	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	苯丙烷生物合成 Phenylpropane biosynthesis	植物-病原物互作 Plant pathogen interaction
zma-miR395e-5p	1/186	1/104	1/99
zma-miR166j-5p	2/186	0/104	0/99
zma-miR166d-5p	0/186	0/104	0/99
zma-miR166b-5p	0/186	0/104	0/99
zma-miR159a-5p	1/186	0/104	0/99
zma-miR164e-5p	3/186	0/104	0/99
zma-miR171k-3p	0/186	0/104	0/99
zma-miR171h-3p	0/186	0/104	0/99
zma-miR171k-5p	4/186	0/104	0/99
zma-miR171h-5p	4/186	0/104	0/99
zma-miR166g-5p	1/186	0/104	0/99
zma-miR167c-3p	5/186	12/104	0/99
8_38768	104/186	50/104	58/99
8_36419	<b>104/186</b>	<b>50/104</b>	<b>58/99</b>
3_16586	5/186	2/104	1/99
1_2720	1/186	0/104	1/99
10_44628	15/186	6/104	10/99
9_40809	9/186	15/104	4/99
3_16423	0/186	0/104	0/99
1_3964	0/186	0/104	0/99
3_14012	13/186	3/104	2/99
1_760	14/186	3/104	1/99
zma-miR167g-3p	0/186	1/104	1/99
2_10021	0/186	0/104	0/99
6_28196	5/186	1/104	3/99
1_2075	2/186	1/104	3/99
1_4437	1/186	3/104	1/99

### 2.5.1 植物激素信号转导 KEGG 通路

在植物激素信号转导的 KEGG 通路中, 存在 8 条关键代谢途径(图 5)。通过对靶基因的分析发现, 脱落酸受体、生长素响应蛋白、*bZIP* 转录因子以及乙烯相关蛋白在其中占比较大, 主要受 8\_36419、zma-miR164a-3p 和 zma-miR164e-3p 等 miRNA 的调控。在这 8 条代谢途径中, 均有 8\_36419 参与调控。其中, 赤霉素、茉莉酸和水杨酸代谢通路仅由 8\_36419 调控。生长素代谢通路主要由 3\_16586、zma-miR164e-3p 和 9\_40809 调控, 其靶基因主要为 *TIR1*、*ARF*、*GH3* 和 *SAUR*, 影响细胞增大和植株生长。细胞分裂素代谢通路由 8\_36419 和 3\_16586 共同调控。在细胞分裂素信号转导通路中, *B-ARR* 作为正向调节因子, *A-ARR* 主要起到反馈调节作用, 最终对细胞分裂与芽分化产生影响。在脱落

酸的合成通路中, 10\_44628、zma-miR164a-3p 和 zma-miR164e-3p 发挥着主要作用。乙烯通路主要由 9\_40809 调控, 该通路影响着植物的衰老与成熟。在芸苔素类固醇相关的信号通路中, zma-miR164e-3p 和 8\_36419 发挥作用, 其靶基因主要包括 *BSK*、*BIN2*、*BZR1/2* 等, 影响气孔闭合、种子休眠和细胞伸长等生理过程。

### 2.5.2 植物-病原物互作 KEGG 通路

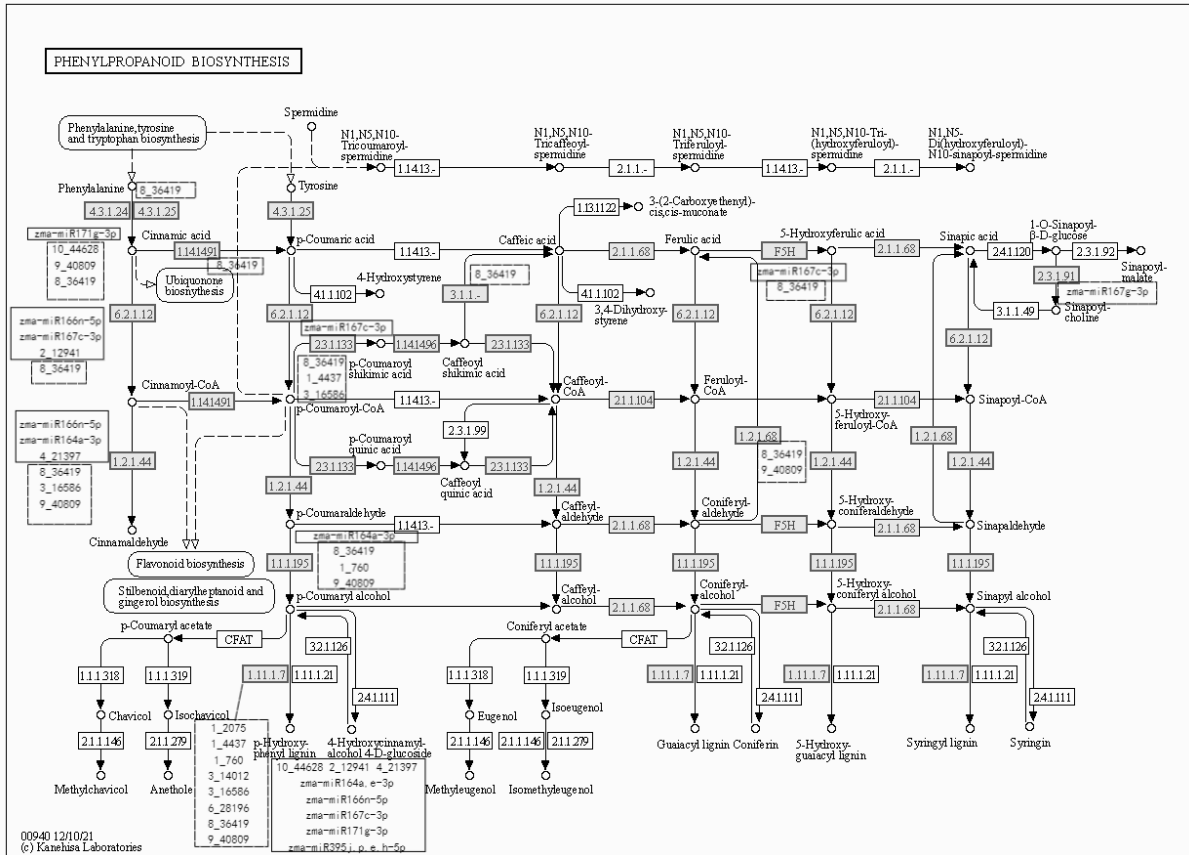
对植物病原物互作的 KEGG 通路(图 6)靶基因分析发现, 3-酮酰基辅酶 A 合成酶、钙依赖性蛋白激酶(CDPK)、钙结合蛋白、*WRKY* 转录因子以及与抗病/致病相关的蛋白编码基因富集程度较高。在植物抵御病原侵袭的免疫应答过程中, 主要存在两种模式: 一是病原相关分子模板触发的免疫(PTI); 二是效应蛋白触发的免疫(ETI)。在





8\_36419 发挥主要作用。该合成通路中存在许多保守基因,例如 4CL、CCR、CAD、FH5 以及 1.11.1.7 等,在木质素合成过程中发挥着重要作用。这些保守基因均受 8\_36419 的调控,8\_36419 不仅调控这些保守基因,还对 PTAL、CSE、HCT 等基因具有调控作用。此外, zma-miR164a-3p 主要调控 CAD, zma-miR166n-5p 调控 CCR, 而 zma-miR171g-3p、9\_40809、zma-miR166n-5p 则主要调控 1.11.1.7。

不同的 miRNA 通过对这些基因的调控,最终影响 p-羟基苯基木质素、愈创木基木质素、5-羟基愈创木基木质素以及紫丁香基木质素的合成代谢通路。这些 miRNA 的靶基因包含苯丙氨酸解氨酶、肉桂酰辅酶 A 还原酶、细胞色素 P450、过氧化物酶等。这些靶基因深度参与木质素的合成、分解与聚合等复杂过程,在植物抵御外界逆境胁迫、增强抗逆性方面发挥作用。



注:该图展示了苯丙烷生物合成途径。此途径描绘了植物从初始底物如苯丙氨酸出发,通过一系列酶促反应,合成多种苯丙烷化合物的过程。图中与差异表达靶基因相对应的受体突出显示,并带有边框(实线框表示上调的 miRNA,虚线框表示下调的 miRNA)。

Note: This diagram shows the phenylpropanoid biosynthesis pathway. This pathway depicts the process by which plants synthesize various phenylpropanoid compounds from initial substrates such as phenylalanine through a series of enzymatic reactions. In the figure, the receptors corresponding to differentially expressed target genes are highlighted with borders(Those marked with solid-line boxes indicate up-regulated miRNAs, and those marked with dashed-line boxes indicate down-regulated miRNAs).

图7 苯丙烷生物合成 KEGG 通路图

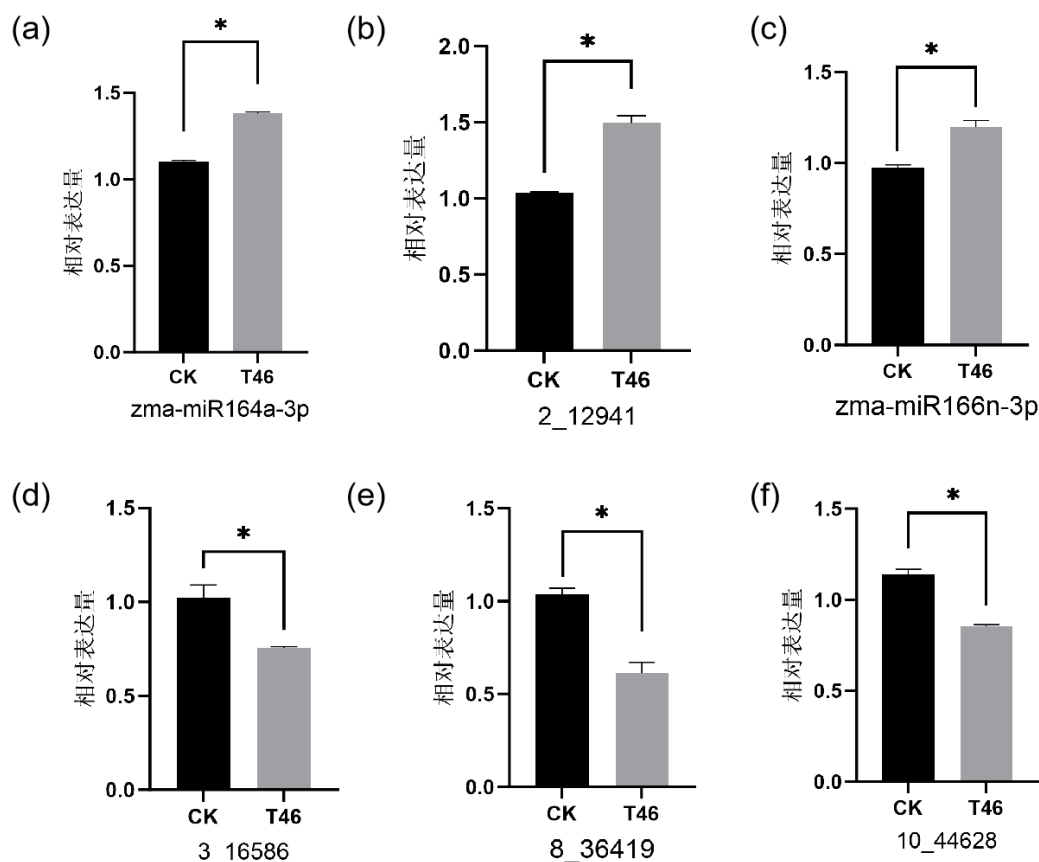
Fig.7 KEGG pathway diagram of phenylpropanoid biosynthesis

2.6 qRT-PCR 验证

随机筛选出部分差异 miRNA 进行验证, zma-miR164a-3p、2\_12941、zma-miR166n-3p 等的表达量增加,而 miRNA 3\_16586、8\_36419、10\_44628 的表达量均下降(图 8)。为了验证 miRNA-Seq 的结果,将 qRT-PCR 获得的每个基因的表达量与 miRNA-Seq 的 TPM 值进行了关联。这些基因在这两个数据集中表现出相似的表达模式(表 6)。

3 讨论

本研究使用贝莱斯芽孢杆菌 GF-46 处理玉米后,确定了 37 条差异表达的 miRNA,其中上调表达的 miRNA 有 22 个,下调表达的 miRNA 有 15 个。这些差异表达的 miRNA 主要包括 miRNA164 家族、miRNA171 家族、miRNA166 家族及部分新预测 miRNA,他们的靶基因主要集中在植物激素信号



注:对差异表达的 miRNA 进行了荧光定量 PCR 验证,其中(a)、(c)和(e)为上调的 miRNA,(b)、(d)和(f)为下调的 miRNA。图中 CK 为对照组,T46 为处理组。

Note: Quantitative real-time PCR verification was performed on differentially expressed miRNAs, among which (a), (c), and (e) are up-regulated miRNAs, and (b), (d), and (f) are down-regulated miRNAs. In the figure, CK represents the control group, and T46 represents the treatment group.

图 8 qRT-PCR 表达量检测图

Fig.8 qRT-PCR expression detection chart

表 6 表达量与 TPM 关联表

Table 6 Correlation table between expression levels and TPM

	zma-miR164a-3p	2_12941	zma-miR166n-3p	8_36419	3_16586	10_44628
zma-miR164a-3p	0.9552 <b>0.0448*</b>					
2_12941		0.9501 <b>0.0499*</b>				
zma-miR166n-3p			0.9692 <b>0.0308*</b>			
8_36419				0.9495 0.0505		
3_16586					0.9621 <b>0.0379*</b>	
10_44628						0.9992 <b>0.0008*</b>

注:上排数字为相关性系数,下排加粗数字为显著性。

Note: The numbers in the upper row are correlation coefficients, and the bold numbers in the lower row indicate significance.

转导、植物根系生长发育、木质素的合成以及植株与病原物互作等关键代谢通路。Xie等<sup>[26]</sup>研究发现,贝莱斯芽孢杆菌FZB42可以诱导玉米系统抗性(ISR),并鉴定出3个miR169家族成员参与ISR激活过程。玉米的代谢通路影响范围更为广泛,特别是8\_36419家族在玉米的3条KEGG通路中都有靶基因存在,主要调控玉米的生长发育和提高其抗病抗逆能力。本研究中8\_36419、10\_44628、3\_14012、4\_21397、miR166、miR171和miRNA164等家族共同参与玉米的信号转导通路、病原菌互作通路及苯丙烷生物合成通路。

在玉米应对非生物胁迫的过程中miRNA也发挥着关键作用。Zma-miR164能够响应盐胁迫,导致其靶基因NAC转录因子家族蛋白NAM、ATAF和CUC的表达显著增加<sup>[34]</sup>。miR164可能通过靶向NAC、MYB和MAPK基因家族在植物抗旱过程中起重要作用<sup>[35]</sup>。研究表明,miRNA164可能参与了玉米维持低Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>比的信号转导和响应机制<sup>[36]</sup>,并且Zma-miR164s可能与玉米节间伸长的杂种优势有关<sup>[37]</sup>。miR164家族的成员能够调控与激素信号转导相关的基因,促进节间的正常伸长,进而影响玉米的株高和叶片分布<sup>[38]</sup>。miR171在植物应答盐胁迫和干旱逆境胁迫的过程中发挥重要作用,通过调节相关的转录因子或信号传导途径,帮助植物调整生长和生理状态,增强抗逆能力<sup>[39]</sup>。敲除miR166基因会导致玉米叶片卷曲,延迟开花时间<sup>[40]</sup>。该基因还参与调控干旱、高温和低温等其他非生物胁迫,并且在玉米叶片极性的建立过程中发挥作用<sup>[41]</sup>。miR156靶向SBP转录因子家族的成员,影响玉米的分蘖模式和叶片形态<sup>[42]</sup>。miR167是玉米生长、发育和胁迫响应过程中的关键调节因子,主要通过负调控生长素响应因子(ARF)家族的靶基因(*ZmARF3*和*ZmARF30*)来发挥作用。这些ARF基因参与生长素信号通路,在根系生长、分支以及花序发育过程中起重要作用<sup>[43]</sup>。在玉米的生长发育过程中,miR167抑制ARF基因的表达,精细地调节根系形态发生<sup>[44]</sup>和花序发育<sup>[45]</sup>。在胁迫响应方面,miR167的表达量在盐胁迫<sup>[46]</sup>、冷胁迫和水分胁迫<sup>[47]</sup>下会发生变化,通过调控ARF基因来帮助玉米适应不利环境。miR395参与玉米的代谢调控,尤其是在碳水化合物代谢相关的过程中<sup>[48]</sup>。

玉米应对病原物侵染时,发生超敏反应、细胞壁动态变化、气孔开闭调控、miRNA介导的基因表达以及植物抗毒素积累等方面均发挥着极为关

键的作用。miRNA在哈茨木霉T28诱导玉米小斑病菌的抗性中发挥作用<sup>[21]</sup>,ZmmiR398b负调控玉米对甘蔗花叶病毒(SCMV)的抗性<sup>[49]</sup>。苯丙烷生物合成途径能够增强玉米的抗病性和抗逆性。该途径产生的木质素是植物细胞壁的关键组成部分,可以增加细胞壁的厚度和硬度,强化植物细胞,从而增强植物抵御病原菌的物理屏障。miRNA528调控木质素合成途径中的关键酶*ZmPAL*的表达,进而而在高氮条件下影响玉米的抗倒伏性和抗逆性<sup>[50]</sup>。miR397、miR408和miR528可以靶向漆酶等蛋白质的编码基因,影响木质素的合成与代谢。在玉米中过表达这3种miRNA可以降低漆酶活性和木质素含量,增加类黄酮的积累,并显著提高玉米对寒冷和干旱胁迫的耐受性<sup>[51]</sup>。本研究发现,miRNA可能通过影响苯丙烷生物合成通路影响玉米对非生物胁迫的耐受性。

植物激素信号转导、苯丙烷生物合成以及植物与病原体互作这3条通路相互关联且彼此影响。在植物激素信号转导与苯丙烷生物合成途径的联系中,后者部分酶基因的表达受植物激素的调控。例如,水杨酸和茉莉酸能够调控苯丙烷生物合成途径中的关键酶基因(*PAL*、*C4H*、*4CL*)表达。反之,苯丙烷生物合成途径产出的木质素、黄酮类和酚类化合物等,可作为信号分子参与到植物激素信号转导的调控进程中。植物在受到病原体侵袭时会激发病原相关分子模式激发的免疫反应(PTI)和效应子触发免疫(ETI)。在PTI免疫过程中,位于植物细胞膜表面的模式识别受体(PRR)能够特异性识别病原体相关分子模式(PAMP),引发下游信号级联反应。其中植物激素信号转导也被激活,进而调控苯丙烷生物合成途径关键酶基因的表达。在ETI中,植物通过抗病蛋白识别病原体效应子,引发强烈的免疫反应,同样影响植物激素水平以及信号转导,间接对苯丙烷生物合成途径产生作用。同时苯丙烷生物合成途径产生的黄酮类化合物能影响植物体内转录因子的活性,从而调控水杨酸和茉莉酸信号通路中关键基因的表达,进一步影响信号转导<sup>[52]</sup>。苯丙烷生物合成途径对玉米与病原菌相互作用通路也有重要影响。玉米受到病原菌侵染时,苯丙烷生物合成途径会生成木质素、黄酮类和酚类化合物等次生代谢产物,这些产物使细胞壁更加坚固,有效阻止病原菌的入侵<sup>[41]</sup>。植物与病原体相互作用的通路和植物激素信号转导之间的关系复杂且紧密。一些miRNA的靶基因参与生长素、水

杨酸、茉莉酸等激素的信号转导, miRNA 表达水平的改变会影响靶基因表达, 改变植物体内激素平衡与信号传递, 促使玉米启动防御反应抵抗病原菌入侵。PTI 和 ETI 会影响 miRNA 的基因表达变化及其靶基因的调控, 间接影响植物激素信号转导。而植物激素信号转导产生的水杨酸和脱落酸, 能够调节气孔免疫<sup>[20,53]</sup>, 减少病原菌进入植物的机会, 并诱导植物防御相关基因的表达, 增强植物抗病能力<sup>[54]</sup>。由此可见, 贝莱斯芽孢杆菌 GF-46 所表现出的促生和抗病效果, 极有可能与改变玉米内源相关 miRNA 的表达有关。这些 miRNA 深度影响了与促生和抗病有关的重要信号通路, 其中主要包括植物激素信号通路, 植物和病原物互作通路以及苯丙烷代谢通路。

## 4 结 论

通过对 GF-46 诱导的玉米 miRNA 进行分析, 鉴定出 37 个差异表达的 miRNA。这些 miRNA 主要集中在 miR164 家族、miR171 家族、miR166 家族以及一些新预测的 miRNA 中。由 miRNA 介导的变化主要影响了 3 条途径: 植物激素信号转导途径、苯丙烷生物合成途径以及植物-病原体相互作用途径。这些途径在玉米的抗逆性、抗病性、生长和发育等方面都发挥着重要作用。在这些途径中, miRNA-8\_36419 调控的靶基因数量最多。因此, miRNA-8\_36419 很可能是调控玉米生长发育、抗病性和抗逆性的关键 miRNA。然而, 仅仅认为 miRNA-8\_36419 重要是一种过于简单化的观点。其他 miRNA, 如 miR164 和 miR171, 也可能对调控植物的生长、发育和抗病性做出重大贡献。

## 参考文献:

- [ 1 ] WANG S, JIN P, ZHENG Y, et al. *Bacillus velezensis* B105-8, a potential and efficient biocontrol agent in control of maize stalk rot caused by *Fusarium graminearum*[J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1462992.
- [ 2 ] MPANGA I K, LUDEWIG U, DAPAHAN H K, et al. Acquisition of rock phosphate by combined application of ammonium fertilizers and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in maize as affected by soil pH[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(4): 947-957.
- [ 3 ] ÇAM S, KÜÇÜK Ç, ALMACA A. *Bacillus* strains exhibit various plant growth promoting traits and their biofilm-forming capability correlates to their salt stress alleviation effect on maize seedlings[J]. *Journal of Biotechnology*, 2023; 369:35-42.
- [ 4 ] WANG A, HUA J, WANG Y, et al. Stereoisomers of nonvolatile acetylbutanediol metabolites produced by *Bacillus velezensis* WRN031 improved root elongation of maize and rice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(23): 6308-6315.
- [ 5 ] ZHANG Y, ZHANG N, BI X, et al. Growth promotion on maize and whole-genome sequence analysis of *Bacillus velezensis* D103 [J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(12): e0114724.
- [ 6 ] ADEDIRE D E, OWOEYE T E, FARINU O M, et al. Management of *Fusarium* wilt disease of maize(*Zea mays* L.) with selected antimycotic plant extracts and inhibitory *Bacillus* strains [J]. *Current Microbiology*, 2023, 80(6): 204.
- [ 7 ] KIM J A, SONG J S, KIM P I, et al. *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a promising agent for biocontrol of plant pathogenic fungi [J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(10): 1053.
- [ 8 ] ADENIJI A A, BABALOLA O O. Evaluation of *Pseudomonas fulva* PS9.1 and *Bacillus velezensis* NWUMfKBS10.5 as candidate plant growth promoters during maize *Fusarium* interaction [J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(3): 324
- [ 9 ] LIU Y, TENG K, WANG T, et al. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(1): 242-254.
- [ 10 ] FAN B, WANG C, SONG X, et al. Corrigendum: *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2491.
- [ 11 ] XING L, ZHANG L, ZHENG H, et al. ZmmiR169q/ZmNF-YA8 is a module that homeostatically regulates primary root growth and salt tolerance in maize[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1163228.
- [ 12 ] 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[J]. *Gene*, 2015, 555(2):178-185.
- [ 13 ] LI J, GUO G, GUO W, et al. miRNA164-directed cleavage of *ZmNAC1* confers lateral root development in maize(*Zea mays* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 220.
- [ 14 ] LI N, YANG T, GUO Z, et al. Maize microRNA166 Inactivation confers plant development and abiotic stress resistance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9506.
- [ 15 ] XIA R, XU J, MEYERS B C. The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(6): 1232-1247.
- [ 16 ] ZHANG M, AN P, LI H, et al. The miRNA-Mediated Post-transcriptional regulation of maize in response to high temperature[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(7): 1754.
- [ 17 ] CHUCK G, MEELEY R, IRISH E, et al. The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(12): 1517-1521.
- [ 18 ] CHUCK G, WHIPPLE C, JACKSON D, et al. The maize *SBP*-box transcription factor encoded by tasselseed4 regulates bract development and the establishment of meristem boundaries[J]. *Development*, 2010, 137(8): 1243-1250.
- [ 19 ] SUN Q, LIU X, YANG J, et al. MicroRNA528 affects lodging re-

- sistance of maize by regulating lignin biosynthesis under Nitrogen-Luxury conditions[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(6): 806-814.
- [20] ZHOU Z, CAO Y, LI T, et al. MicroRNAs are involved in maize immunity against *Fusarium verticillioides* ear rot[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2020, 18(3): 241-255.
- [21] WANG S, WANG X, CHEN J. Identification of miRNAs involved in maize-induced systemic resistance primed by *Trichoderma harzianum* T28 against *Cochliobolus heterostrophus*[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(2): 278.
- [22] HONG Z, XU H, SHEN Y, et al. Bioengineering for robust tolerance against cold and drought stresses via co-overexpressing three Cu-miRNAs in major food crops[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(10): 114828.
- [23] QIN R, HU Y, CHEN H, et al. MicroRNA408 negatively regulates salt tolerance by affecting secondary cell wall development in maize[J]. *Plant Physiology*, 2023, 192(2): 1569-1583.
- [24] LIU H, YU M, ZHOU S, et al. Unveiling novel anti-viral mechanisms of  $\epsilon$ -poly-l-lysine on tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana tabacum* through microRNA and transcriptome sequencing[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 268(Pt 1): 131628.
- [25] QU Q, LIU N, SU Q, et al. MicroRNAs involved in the transkingdom gene regulation in the interaction of maize kernels and *Fusarium verticillioides*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 242(Pt 4):125046.
- [26] XIE S, YU H, LI E, et al. Identification of miRNAs involved in *Bacillus velezensis* FZB42-Activated induced systemic resistance in maize[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(20): 5057.
- [27] 张玉蓉. 向日葵菌核病和黄萎病生防菌株筛选与防治效果研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- ZHANG Y R. Screening of biocontrol strains for sunflower Sclerotinia rot and Verticillium wilt and study on their control effects[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [28] QIAN Y, REN Q, ZHANG J, et al. Transcriptomic analysis of the maize(*Zea mays* L.) inbred line B73 response to heat stress at the seedling stage[J]. *Gene*, 2019, 692: 68-78.
- [29] 白建飞. 玉米抗倒增产功能菌群的构建及田间效果研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- BAI J F. Study on the construction of functional microbial communities for lodging resistance and yield increase in maize and their field effects[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [30] SCHNABLE P S, WARE D, FULTON R S, et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics[J]. *Science*, 2009, 326(5956): 1112-1115.
- [31] FRIEDLÄNDER M R, MACKOWIAK S D, LI N, et al. miRD-ep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(1): 37-52.
- [32] WU H J, MA Y K, CHEN T, et al. PsRobot: a web-based plant small RNA meta-analysis toolbox[J]. *Nucleic Acids Research*. 2012, 40(Web Server issue): 22-28.
- [33] KANEHISA M, FURUMICHI M, SATO Y, et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes[J]. *Nucleic Acids Research* 2023, 51(D1): 587-592.
- [34] SHAN T, FU R, XIE Y, et al. Regulatory mechanism of maize (*Zea mays* L.) miR164 in salt stress response[J]. *Russian Journal of Genetics*, 2020, 56(7): 835-842.
- [35] TANG Q, LYU H, LI Q, et al. Characteristics of microRNAs and target genes in maize root under drought stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 4968.
- [36] LI J, ZHOU X, WANG Y, et al. Inhibition of the maize salt overly sensitive pathway by *ZmSK3* and *ZmSK4*[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 50(12): 960-970.
- [37] YANG S, ZHAO D, LI M, et al. Conserved Zma-miR164 family is responsible for maize heterosis by negatively regulating *NAC* transcription factor during internode elongation[J]. *South African Journal of Botany*, 2022,150:806-812.
- [38] ZHENG L, ZHANG X, ZHANG H, et al. The miR164-dependent regulatory pathway in developing maize seed[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2019, 294(2): 501-517.
- [39] KONG Y M, ELLING A, CHEN B. Differential expression of microRNAs in maize inbred and hybrid lines during salt and drought stress[J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2010, 1(2):69-76.
- [40] LI N, YANG T, GUO Z, et al. Maize microRNA166 inactivation confers plant development and abiotic stress resistance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9506.
- [41] NOGUEIRA F T, MADI S, CHITWOOD D H, et al. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis[J]. *Genes & Development*, 2007, 21(7):750-755.
- [42] DONG Z, HU G, CHEN Q, et al. A regulatory network controlling developmental boundaries and meristem fates contributed to maize domestication[J]. *Nature Genetics*, 2024, 56(11): 2528-2537.
- [43] ZHAO Z, XUE Y, YANG H, et al. Genome-Wide identification of miRNAs and their targets involved in the developing internodes under maize ears by responding to hormone signaling[J]. *Public Library of Science One*,2016, 11(10): e0164026.
- [44] LIU X, HUANG S, XIE H. Advances in the regulation of plant development and stress response by miR167[J]. *Frontiers in Bioscience(Landmark Ed)*,2021, 26(9):655-665.
- [45] XING H, PUDAKE R N, GUO G, et al. Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor(ARF) gene family in maize[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 178.
- [46] DING D, ZHANG L, WANG H, et al. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots[J]. *Annals of Botany*, 2009, 103(1): 29-38.
- [47] AYDINOGLU F. Elucidating the regulatory roles of microRNAs in maize(*Zea mays* L.) leaf growth response to chilling stress[J]. *Planta*, 2020, 251(2): 38.

- LI F, ZHANG J, YANG Z, et al. Determination of 17 pesticide residues in vegetables by QuEChERS/liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Jilin Agricultural Sciences*, 2013, 38(3): 93-96. (in Chinese)
- [23] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, STAJNBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce[J]. *Journal of AOAC International*, 2003, 86(2): 412-431.
- [24] GONZALEZ-CURBELO M A, SOCAS-RODRIGUEZ B, HERRERA-HERRERA A V, et al. Evolution and applications of the QuEChERS method[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 71: 169-185.
- [25] 吴绪金, 马欢, 马婧玮, 等. 啞蟊灵在棉花和土壤中的残留及消解动态研究[J]. *现代农药*, 2014, 13(1): 37-40.
- WU X J, MA H, MA J W, et al. Study on residue and degradation dynamics of pyridaben in cotton and soil[J]. *Modern Agrochemicals*, 2014, 13(1): 37-40. (in Chinese)
- [26] LIU C Y, LU D H, WANG Y C, et al. Residue and risk assessment of pyridaben in cabbage[J]. *Food Chemistry*, 2014, 149: 233-236.
- [27] 徐晓英. 地下滴灌技术在新疆地区棉花种植中的应用[J]. *吉林农业*, 2018(21): 73.
- XU X Y. Application of sub-surface drip irrigation technology in cotton planting in Xinjiang region[J]. *Jilin Agriculture*, 2018(21): 73. (in Chinese)
- [28] 李文明, 王林, 乔成奎, 等. 不同施药剂量条件下啞苯隆和敌草隆在棉叶上的残留动态研究[J]. *农药科学与管理*, 2014, 35(5): 33-37.
- LI W M, WANG L, QIAO C K, et al. Residue dynamics of thidiazuron and diuron on cotton leaves under different application doses[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2014, 35(5): 33-37. (in Chinese)
- [29] 王璞. 啞虫啉在小麦中的残留动态及其环境行为的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012.
- WANG P. Residue dynamics of pymetrozine in wheat and its environmental behavior[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2012. (in Chinese)

(责任编辑:王 昱)

(上接第 42 页)

- [48] MATTS J, JAGADEESWARAN G, ROE B A, et al. Identification of microRNAs and their targets in switchgrass, a model biofuel plant species[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(11): 896-904.
- [49] GAO X, DU Z, HAO K, et al. ZmmiR398b negatively regulates maize resistance to sugarcane mosaic virus infection by targeting ZmCSD2/4/9[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2024, 25(5):e13462.
- [50] SUN Q, LIU X, YANG J, et al. MicroRNA528 affects lodging resistance of maize by regulating lignin biosynthesis under Nitrogen-Luxury conditions[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(6): 806-814.
- [51] HONG Z, XU H, SHEN Y, et al. Bioengineering for robust tolerance against cold and drought stresses via co-overexpressing three Cu-miRNAs in major food crops[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(10): 114828.
- [52] DIVEKAR PA, NARAYANA S, DIVEKAR BA, et al. Plant secondary metabolites as defense tools against herbivores for sustainable crop protection[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(5):2690.
- [53] WANG H, SONG S, GAO S, et al. The NLR immune receptor ADR1 and lipase-like proteins EDS1 and PAD4 mediate stomatal immunity in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2024, 36(2):427-446.
- [54] WAN D, LI R, ZOU B, et al. Calmodulin-binding protein CBP60g is a positive regulator of both disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(7): 1269-1281.

(责任编辑:范杰英)