

文章编号: 1004-0374(2010)07-0682-06

植物小分子RNA 研究进展

武 亮, 戚益军*

(北京生命科学研究所, 北京 102206)

摘 要: 植物体内存在多种不同类型的小分子RNA (small RNA, sRNA), 在调节植物生长发育、抑制转座子活性和抵御逆境等过程中发挥着重要的作用。近年来, 人们在sRNA的产生机制、效应复合物的形成和对靶基因的调控方式及其生物学功能等方面的研究取得了很大进展。该文对这些进展作简要介绍。

关键词: RNA 干扰; miRNA; siRNA; Dicer; AGO

中图分类号: Q52; Q946.2 **文献标识码:** A

Plant small RNAs

WU Liang, QI Yi-jun*

(National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China)

Abstract: Small RNAs (sRNAs) have emerged as key components in the gene regulatory networks of eukaryotes. Several classes of sRNAs have been discovered in plants. These sRNAs play important roles in developmental regulation, inactivation of transposons, and responses to biotic and abiotic stresses. Here, we briefly review the recent progress in understanding the mechanisms of sRNA biogenesis, sorting of sRNAs into effector complexes, modes of sRNA action on their targets and their biological functions.

Key words: RNA interference; miRNA; siRNA; Dicer; AGO

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是近年来发现的一种高度保守的基因表达调控机制。RNAi通过sRNA的介导,在转录(transcriptional gene silencing, TGS)和转录后水平(post-transcriptional gene silencing, PTGS)调控靶基因的表达。

在植物中,根据其产生来源、结合效应蛋白和生物学功能的不同,sRNA可以分为两类: micro-RNA (miRNA)和short interfering RNA (siRNA)^[1]。miRNA是真核生物中广泛存在的长度为20~24 nt的非编码sRNA,由Dicer-like蛋白(DCL)剪切具有茎环结构的前体形成,主要在转录后水平调控目标靶基因的表达; siRNA由Dicer酶切割双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)产生,可以通过切割RNA方式在转录后水平起作用,也可以通过介导DNA甲基化在转录水平起作用^[2]。siRNA可以进一步分为四种,即heterochromatic siRNA (hc-siRNA)、trans-acting siRNA (ta-siRNA)、natural antisense tran-

script-derived siRNA (nat-siRNA)和long siRNA (lsiRNA)^[3]。

1 miRNA

植物miR基因主要来自于基因组上的基因间区,截至目前,拟南芥中已经发现超过100个家族的miRNA^[1]。包含发卡结构的miRNA前体(primary miRNA, pri-miRNA)由RNA聚合酶Pol II转录而来,在细胞核内经过DCL1的两步连续切割,形成miRNA/miRNA* duplex (miRNA*是指与miRNA互补形成二聚体的链)。这个切割过程DCL1需要与双链RNA结合蛋白HYL1 (hyponastic leaves 1)和C2H2锌指蛋白SE (Serrate)相互作用形成复合物,来提高DCL1的剪切效率和准确性^[4-6]。miRNA duplex由

收稿日期: 2010-06-04

*通讯作者 E-mail: qiyijun@nibs.ac.cn

S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶 HEN1 (*hua enhancer 1*)通过甲基化3'末端核苷酸羟基的方式稳定结构,防止由尿苷化引起的RNA降解;*hen1*突变体与*dc11*突变体表型相似,均表现出严重的生长发育缺陷,表明HEN1对于miRNA的甲基化保护作用非常重要^[7]。HASTY可能参与了miRNA/miRNA* duplex从细胞核内到细胞核外的运输,但其具体的运输过程还不清楚;拟南芥*hasty*突变体的细胞核和细胞质中的miRNA积累量都下降,说明可能还存在着不依赖于HASTY的其他运输方式^[8]。在细胞质中miRNA/miRNA* duplex中的miRNA与Argonaute (AGO)蛋白结合形成沉默复合物(RNA-induced silencing complexes, RISCs)来执行功能,而miRNA*则被降解。最近研究表明,植物sRNA 5'末端碱基是其选择进入AGO蛋白的决定因素,拟南芥共编码10种AGO蛋白,其中AGO1主要结合5'末端是U的miRNA,大部分植物miRNA的5'末端核苷酸是U,所以选择进入AGO1,这对于miRNA行使功能是必需的,更换人工miRNA的5'末端核苷酸碱基会使之失去沉默作用^[9]。核酸外切酶可以特异降解单链miRNA, sRNA降解核酸酶复合物(small RNA degrading nuclease, SDN)参与了此过程^[10]。

植物miRNA与靶基因mRNA互补性很高,且与有切割活性的AGO1形成RIGS复合物,所以植物miRNA主要通过切割mRNA方式在转录后水平调控靶基因的表达^[11],植物miRNA的这种作用方式使生物信息学方法容易预测miRNA的靶基因,而且通过5' cDNA末端快速克隆(5' rapid-amplification of cDNA ends, 5' RACE)的技术可以验证miRNA对靶mRNA的精确切割位点。最近通过构建植物降解组(degradome)文库并进行大规模测序,已经对拟南芥和水稻miRNA的靶基因进行了全基因组水平的验证^[3, 12, 13]。点突变体*ago1-27*中AGO1虽然具有切割活性,但仍表现出发育异常表型,说明miRNA不仅通过切割起作用,而且可能通过其他方式调控靶基因表达。最近研究发现,植物中抑制蛋白质翻译也是miRNA调控基因表达的普遍方式,AGO1与AGO10都参与了这种调控方式。切割mRNA和抑制蛋白质翻译同时进行可能是miRNA调控靶基因更为经济有效的方式,这取决于植物在不同组织或不同发育阶段是否存在抑制蛋白质翻译需要的其他因子^[14]。最近研究表明,水稻中还存在着由DCL3切割产生的长度为24 nt的miRNA(long miRNA, lmiRNA),它们可以依据其产生机制和5'末端核苷

酸特异选择进入AGO4蛋白,从而通过DNA甲基化方式在转录水平调控靶基因的表达,这揭示了miRNA对靶基因的一种新的调控方式^[15]。

通过甲基化DNA、切割mRNA和抑制蛋白质翻译等方式,植物miRNA在转录水平和转录后水平调控目标靶基因,且这些目标靶基因编码包括参与重要发育过程的转录因子和参与其他各种生理过程的关键蛋白质,说明miRNA在植物生长发育和响应各种逆境胁迫过程中发挥着重要作用^[16, 17]。

ARF是生长素信号转导途径中一类重要的正负调控转录因子,植物中共有27个ARF基因,其中1/3以上可以被miRNA所调控。miR160在植物各组织都表达较高,它的靶基因是ARF10、ARF16和ARF17。表达突变miR160切割位点的ARF17转基因植株,可以产生锯齿状卷曲叶片、开花时间提前、育性下降等发育异常表型,说明miR160调控ARF17的表达对于植物体内维持生长素的平衡具有重要作用;此外,miR160可以通过调控ARF10和ARF16的表达影响植物根发育的向地性、根细胞的形成、生长和分化;miR160调控三个基因的平衡对于植物萌发和萌发后对生长素的敏感性也是至关重要的^[18]。CUC基因家族中的三个成员CUC1、CUC2、CUC3,其中的前两个是miR164的靶基因,过量表达miR164的转基因植物顶端分生组织、萼片、雄蕊均发育不正常,与*cuc1 cuc2*双突变体表型相似;miR164还可通过调控NAC1基因的表达影响植物侧根的发育^[19, 20]。miR167的靶基因是ARF6和ARF8,表达突变miR167切割位点的ARF8转基因植株出现花粉量增多、雌雄不育等发育异常症状,过量表达miR167a的转基因植物与*arf6 arf8*双突变体相似,说明miR167可以通过调控ARF6和ARF8基因的表达影响生长素信号DR5的活性^[21]。miR159的靶基因是MYB转录因子,它可以严格控制植物花药中MYB33和MYB65的表达,改变miR159靶位点的MYB33转基因植物生长周期出现紊乱^[22]。miR165/166通过切割亮氨酸拉链转录因子(homeodomain leucine-zipper transcription factors, HD-ZIP)基因家族的PHB、PHV、REV基因的mRNA,使PHB、PHV、REV基因严格在近轴面表达来保持植物叶片的形态^[23]。最近有报道表明,miR156与miR172共同控制了植物从营养生长到生殖生长的转变过程^[24, 25]。

各种生物胁迫或非生物胁迫是制约植物生长的关键因素之一,多种miRNA在植物受到病害、盐

害等胁迫时被诱导表达,表明miRNA参与了植物的抗逆反应。miR393通过对生长素受体TIR1、AFB2和AFB3的负调控增强植物的抗病能力^[17]。植物在受到病原菌侵害后,miR398b和miR773被诱导表达,过量表达这两个miRNA可以提高植物的抗病性^[26]。miR398的靶基因是过氧化物歧化酶基因*CSD1*和*CSD2*,植物在低铜条件下,诱导miR398表达量上升,致使*CSD1*和*CSD2*的蛋白表达下降,以保证植物对铜离子的有效利用;植物在重金属胁迫条件下会造成氧化胁迫,通过抑制miR398使*CSD*表达量增加,消除体内产生的活性氧,植物抗氧化能力增强^[27]。此外,miR399响应低磷胁迫^[28],miR395响应低硫胁迫,miR169响应干旱胁迫^[29],这表明在逆境条件下,植物通过对miRNA的正负调控来调控靶基因的表达,增强植物的抗逆性。

植物miRNA代谢途径还存在着自我调控机制,例如miR162、miR168和miR403的靶基因分别是*DCL1*、*AGO1*和*AGO2*,它们对靶基因的切割作用在植物体内已经得到了实验验证。人工改变miR162的表达模式可以造成许多其他miRNA的异位表达,过量表达miR168的转基因拟南芥与*ago1*突变体表型相似,说明植物体内通过自我调控机制维持*DCL1*和*AGO1*的平衡是非常重要的^[30,31]。

由于植物体内miRNA可以通过切割靶mRNA或抑制靶蛋白的翻译来调控基因表达,这使利用miRNA前体骨架结构表达人工miRNA来沉默靶基因成为可能^[32]。这种人工miRNA技术已经成为反向遗传学研究基因功能的有效工具,将来还可能成为改良作物农艺性状和抗逆性的重要手段。利用miR159作为骨架,针对病毒蛋白设计人工miRNA并转化拟南芥,结果发现转基因植物对病毒具有良好的抗性,即使经过多代繁殖抗病性也不会丧失;针对两种病毒内源蛋白设计的人工miRNA转基因植物,对两种病毒均有良好的抗病作用,表明利用人工miRNA技术改良作物是可行的^[33,34]。

2 hc-siRNA

除miRNA之外,hc-siRNA是植物中另一类大量存在的sRNA。hc-siRNA长度为24 nt,主要来自于基因组上的异染色质区、反向重复序列区、转座子区和着丝粒重复序列区^[35]。DNA甲基化和组蛋白甲基化是生物进行表观修饰的重要标志,植物中的hc-siRNA是介导DNA甲基化(CNG、CHH)和组蛋白甲基化(H3K9)的重要因素,它们不仅可以抑制

转座子或反转座子活性,而且可以影响基因组重复序列区附近某些基因的表达^[36]。

hc-siRNA的产生依赖于RNA聚合酶Pol IV、DCL3、RNA依赖的RNA聚合酶2(RNA-dependent RNA polymerase 2, RDR2)等蛋白。来自于转座子区和DNA重复序列区的单链RNA经过植物特异的一类RNA聚合酶Pol IV转录后经RDR2扩增变为双链RNA, DCL3切割这些双链RNA形成hc-siRNA,染色质重塑因子蛋白CLASSY1可能也参与了此过程, hc-siRNA产生后进入AGO4蛋白^[37,38]。另一类植物特异的RNA聚合酶Pol V具有基因间非编码区(intergenic non-coding, IGN)RNA的转录活性,IGN的转录可以招募AGO4,使结合了hc-siRNA的AGO4与具有GW/WG结构域的Pol V和KTF1蛋白相互作用形成复合物,该复合物使甲基转移酶DRM2(domains rearranged methyltransferase 2)结合到产生hc-siRNA的DNA位置上进行甲基化修饰,此过程称为RNA介导的DNA甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)^[39,41]。Zhang等^[42]发现,基因组上某些位置IGN的转录也依赖于RNA聚合酶Pol II,说明Pol II也参与了hc-siRNA介导的DNA甲基化途径。尽管已经报道了大量RdDM通路的蛋白质,但这些蛋白质如何相互作用和协调来影响DNA甲基化的具体机制还不十分清楚^[43]。

3 ta-siRNA

ta-siRNA是一类植物特有的siRNA,其最显著的特征是它的产生依赖于miRNA的切割作用^[44]。*TAS*前体由Pol II转录而来,包含miRNA的切割位点,*TAS*前体经过miRNA切割后的RNA产物经SGS3蛋白稳定后,由RDR6合成双链RNA,再经过DCL4切割后形成连续的sRNA,其中某些sRNA可以进入RISCs来切割靶mRNA^[45]。由于ta-siRNA前体需要miRNA首先切割,所以它也依赖于DCL1、HYL1、HEN1等miRNA通路蛋白。

拟南芥中具有多个能产生ta-siRNA的基因位点,其中包括*TAS1*、*TAS2*、*TAS3*和*TAS4*。miR173与AGO1相互作用形成复合物,它们结合在*TAS1*和*TAS2*基因转录本的5'末端切割mRNA来引起这两个基因位点产生ta-siRNA^[46]; *TAS3*前体上有两个miR390结合位点,miR390特异进入AGO7来起作用,结合在*TAS3*前体3'末端的miR390-AGO7直接切割靶*TAS3* mRNA,结合在5'末端的miR390-AGO7虽然不能切割mRNA,但这种结合作用对于*TAS3*基

因位点产生 ta-siRNA 却是必需的^[47]。此外,拟南芥中存在大量 miRNA,却只有极少数 miRNA 可以引起 ta-siRNA 的产生,其机理有径于进一步研究。

生物信息学预测和 5' RACE 实验证明, ta-siRNA 的靶基因有生长素响应转录因子 *ARF* 基因、三角状多肽重复 *PPR* 基因和 *MYB* 转录因子。到现在为止, *TAS3* 基因位点产生的部分 ta-siRNA 通过调控 *ARF2/3/4* 基因影响植物激素反应的机制已经被人们所认识, miR390 和 *TAS3* 受生长素响应,拟南芥突变体 *rdr6*、*sgs3*、*dcl4* 和 *ago7* 的叶片出现狭长表型,说明拟南芥 ta-siRNA 通过控制叶片的发育来影响植株从幼年期到成年期的转变^[48]。有趣的是,水稻 *dcl4* 突变体穗花序发育存在缺陷^[49],玉米 *sgs3* 和 *ago7* 突变体出现叶片极性发育异常和植株严重矮化等表型^[50,51],说明与双子叶植物相比, ta-siRNA 在单子叶植物中可能发挥着更大作用。

4 nat-siRNA

基因组 DNA 正反义链上两个基因同时转录时可以形成双链 RNA,这种双链 RNA 由 DCL1 或 DCL2 切割后可形成初级 siRNA,初级 siRNA 根据互补配对切割其中一个基因的 mRNA,产物可以由 RDR6 在 SGS3 的辅助下再次扩增形成双链 RNA 并由 DCL1 剪切产生次级 siRNA,进入 AGO 蛋白后可以持续沉默产生它的基因,形成一种调控循环,在此过程中形成的 siRNA 称为 nat-siRNA。与 ta-siRNA 的产生不同,次级 nat-siRNA 的产生还依赖于 Pol IV^[52]。

nat-siRNA 对于植物响应各种生物胁迫或非生物胁迫非常重要, P5CDH 是植物分解脯氨酸的重要蛋白,拟南芥 *P5CDH* 基因组表达,在高盐胁迫下,拟南芥诱导正反义链上的 *SRO5* 基因转录,与 *P5CDH* 产生双链 RNA,最后形成 nat-siRNA 来切割 *P5CDH* 基因的 mRNA,从而积累脯氨酸,提高植物对胁迫的耐受性^[53]。植物在受到细菌 *Pst* DC3000 的侵染条件下, GTP 结合蛋白基因 *ATGB2* 与 PPR 蛋白基因 *PPRL* 的正反义链同时转录产生双链 RNA,被 DCL1 切割后形成 nat-siRNA^{ATGB2},从而切割靶基因 *PPRL* mRNA。PPRL 是植物菌害超敏感反应的负调控因子,所以受到细菌侵害而诱导产生的 nat-siRNA 可以提高植物的抗病性^[54]。拟南芥 *kokopelli* (*kpl*) 突变体结实率降低,最新研究表明, *KPL* 基因和一个编码泛素连接酶 E3 的基因 *ARI14* (*ARIADNE 14*) 双向转录,可以形成精细胞特异的 nat-siRNA,在 *kpl* 突变体和 nat-siRNA 形成突变体

中 *ARI14* 表达量上升,过量表达 *ARI14* 的转基因植株表型与 *kpl* 突变体相似,也表现为育性下降,说明 nat-siRNA 对于植物控制双受精过程中精细胞的形成非常重要^[55]。植物基因组上存在大量可以正反义链同时进行基因转录的位置,从而可以形成 nat-siRNA,说明 nat-siRNA 可能发挥更为广泛的作用。

5 lsiRNA

lsiRNA 是植物中存在的一类长度为 30~40 nt 的 siRNA,与 nat-siRNA 相似,lsiRNA 前体来自正反义链上的转录本^[56]。迄今为止,植物中发现的 lsiRNA 是受到细菌性侵害或在特殊的生长条件下产生的,且依赖于 DCL1、DCL4、HYL1、RDR6、SGS3、HST、HEN1、Pol IV 和 AGO7。拟南芥 *AtRAP* 基因缺失突变体抗病力增强,过量表达 *AtRAP* 的转基因植株增加病菌繁殖速度,说明 *AtRAP* 是植物病理免疫的负调控因子, *AtlsiRNA1* 在细菌 *pst* (*avrRpt2*) 诱导后产生,通过对靶基因 *AtRAP* 的 5' 去帽作用,使外切核酸酶 XRN4 由 5' 端至 3' 端降解 *AtRAP* 的 mRNA,从而提高植物的抗病性,其他 lsiRNA 的产生和效应机制还有待于进一步研究^[56]。

综上所述,植物体内存在着多种类型的 sRNA,各种 sRNA 产生和效应途径纷繁复杂,它们在植物生长发育、抵御外界胁迫和保持基因组稳定性过程中发挥着重要作用。到现在为止,人们对于植物 miRNA 等 sRNA 的研究,仅仅通过过量表达 sRNA 或基因敲除产生 sRNA 必需的关键蛋白等途径来实现,因而对 sRNA 在植物自然生长条件下的作用还没有完全认识,关于多种 sRNA 共同调节植物生长发育形成的调控网络报道也非常少。除 sRNA 之外,植物中还具有其他类型的非编码 RNA,例如,拟南芥抑制开花基因 *FLC* (*flowering locus c*) 正反义链上长片段非编码 RNA 的转录,可以通过影响 *FLC* 基因的表达来控制植物的开花,说明长片段非编码 RNA 的存在对于植物的生长发育也十分重要^[57]。

[参 考 文 献]

- [1] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009, 136: 669-87
- [2] Chapman EJ, Carrington JC. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet*, 2007, 8: 884-96
- [3] Wu L, Zhang Q, Zhou H, et al. Rice microRNA effector complexes and targets. *Plant Cell*, 2009, 21: 3421-35
- [4] Laubinger S, Sachsenberg T, Zeller G, et al. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA

- splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 8795–800
- [5] Vazquez F, Gasciolli V, Crete P, et al. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. Curr Biol, 2004, 14: 346–51
- [6] 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: 206–12
- [7] Chen X. MicroRNA biogenesis and function in plants. FEBS Lett, 2005, 579: 5923–31
- [8] Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, et al. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 3691–6
- [9] Mi S, Cai T, Hu Y, et al. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. Cell, 2008, 133: 116–27
- [10] Ramachandran V, Chen X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. Science, 2008, 321: 1490–2
- [11] Qi Y, Denli AM, Hannon GJ. Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. Mol Cell, 2005, 19: 421–8
- [12] Addo-Quaye C, Eshoo TW, Bartel DP, et al. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the *Arabidopsis* degradome. Curr Biol, 2008, 18: 758–62
- [13] German MA, Pillay M, Jeong DH, et al. Global identification of microRNA–target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. Nat Biotechnol, 2008, 26: 941–6
- [14] Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, et al. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. Science, 2008, 320: 1185–90
- [15] Wu L, Zhou H, Zhang Q, et al. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. Mol Cell, 2010, 38: 465–75
- [16] Poethig RS, Peragine A, Yoshikawa M, et al. The function of RNAi in plant development. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006, 71: 165–170
- [17] Rubio-Somoza I, Cuperus JT, Weigel D, et al. Regulation and functional specialization of small RNA–target nodes during plant development. Curr Opin Plant Biol, 2009, 12: 622–7
- [18] Wang JW, Schwab R, Czech B, et al. Dual effects of miR156-targeted *SPL* genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 2008, 20: 1231–43
- [19] Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, et al. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. Curr Biol, 2004, 14: 1035–46
- [20] Guo HS, Xie Q, Fei JF, et al. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. Plant Cell, 2005, 17: 1376–86
- [21] Wu MF, Tian Q, Reed JW. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. Development, 2006, 133: 4211–8
- [22] Millar AA, Gubler F. The *Arabidopsis* *GAMYB-like* genes, *MYB33* and *MYB65*, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. Plant Cell, 2005, 17: 705–21
- [23] Zhong R, Ye ZH. Regulation of *HD-ZIP III* genes by microRNA 165. Plant Signal Behav, 2007, 2: 351–3.
- [24] Wang JW, Czech B, Weigel D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. Cell, 2009, 138: 738–49
- [25] Wu G, Park MY, Conway SR, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. Cell, 2009, 138: 750–9
- [26] Li Y, Zhang Q, Zhang J, et al. Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. Plant Physiol, 2010, 152: 2222–31
- [27] Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. Plant Cell, 2006, 18: 2051–65
- [28] Aung K, Lin SI, Wu CC, et al. *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. Plant Physiol, 2006, 141: 1000–11
- [29] Zhao B, Ge L, Liang R, et al. Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. BMC Mol Biol, 2009, 10: 29
- [30] Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Negative feedback regulation of Dicer-like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. Curr Biol, 2003, 13: 784–9
- [31] Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, et al. The action of *ARGONAUTE1* in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. Genes Dev, 2004, 18: 1187–97
- [32] Schwab R, Ossowski S, Riester M, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2006, 18: 1121–33
- [33] Duan CG, Wang CH, Fang RX, et al. Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants. J Virol, 2008, 82: 11084–95
- [34] Niu QW, Lin SS, Reyes JL, et al. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. Nat Biotechnol, 2006, 24: 1420–8
- [35] Qi Y, He XY, Wang XJ, et al. Distinct catalytic and non-catalytic roles of *ARGONAUTE4* in RNA-directed DNA methylation. Nature, 2006, 443: 1008–12
- [36] Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. *ARGONAUTE4* control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. Science, 2003, 299: 716–9
- [37] Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. PLoS Biol, 2004, 2: E104
- [38] Smith LM, Pontes O, Searle I, et al. An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2007, 19: 1507–21
- [39] Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS. Noncoding transcrip-

- tion by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell*, 2008, 135: 635-48
- [40] Wierzbicki AT, Ream TS, Haag JR, et al. RNA polymerase V transcription guides *ARGONAUTE4* to chromatin. *Nat Genet*, 2009, 41: 630-4
- [41] He XJ, Hsu YF, Zhu S, et al. An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an *ARGONAUTE4*- and RNA-binding protein. *Cell*, 2009, 137: 498-508
- [42] Zheng B, Wang Z, Li S, et al. Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional genes silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2009, 23: 2850-60
- [43] Gao Z, Liu HL, Daxinger L, et al. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 2010, 465: 106-9
- [44] Allen E, Xie Z, Gustafson AM, et al. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005, 121: 207-21
- [45] Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, et al. *SGS3* and *SGS2/SDE1/RDR6* are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2004, 18: 2368-79
- [46] Montgomery TA, Yoo SJ, Fahlgren N, et al. AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20055-62
- [47] Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, et al. Specificity of *ARGONAUTE7*-miR390 interaction and dual functionality in *TAS3* trans-acting siRNA formation. *Cell*, 2008, 133: 128-41
- [48] Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, et al. Regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR3* by *TAS3* ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2006, 16: 939-44
- [49] Liu B, Chen Z, Song X, et al. *Oryza sativa Dicer-like4* reveals a key role for small interfering RNA silencing in plant development. *Plant Cell*, 2007, 19: 2705-18
- [50] Nogueira FT, Madi S, Chitwood DH, et al. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes Dev*, 2007, 21: 750-5
- [51] Douglas RN, Wiley D, Sarkar A, et al. *ragged seedling2* encodes an *ARGONAUTE7*-like protein required for mediolateral expansion, but not dorsiventrality, of maize leaves. *Plant Cell*, 2010 [Epub ahead of print]
- [52] Xie Z, Qi X. Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779: 720-4
- [53] Borsani O, Zhu J, Verslues PE, et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 123: 1279-91
- [54] Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, et al. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18002-7
- [55] Ron M, Saez MA, Williams LE, et al. Proper regulation of a sperm-specific cis-nat-siRNA is essential for double fertilization in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2010, 24: 1010-21
- [56] Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, et al. A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2007, 21: 3123-34
- [57] Swiezewski S, Liu F, Magusin A, et al. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature*, 2009, 462: 799-802