

DOI: 10.13376/j.cbls/2018098

文章编号: 1004-0374(2018)08-0831-09

植物中phasiRNA研究进展

朱成新, 熊伟, 莫蓓莘*

(深圳大学生命与海洋科学学院植物表观遗传实验室, 深圳 518060)

摘要: 植物 phasiRNA (phased, secondary, small interfering RNA) 是一类内源性的、起调控作用的非编码小 RNA (sRNA), 它在植物的生长、发育、生殖以及抗病中发挥着重要作用。PhasiRNA 初级转录本由 Pol II (RNA polymerase II) 转录, 随后 miRNA (microRNA) 引导 AGO 蛋白对 phasiRNA 初级转录本上的靶位点进行剪切, 剪切后的 phasiRNA 前体片段 (剪切位点的上游或下游片段) 继而被 RDR6 (RNA-dependent RNA polymerases 6) 复制成双链 RNA, 双链 RNA 被 DCL4 切割成一系列首尾相接, 具有一定相位的 21-nt 或 24-nt 的小 RNA, 即 phasiRNA。成熟的 phasiRNA 与 AGO 蛋白组装成沉默复合体, 作用于靶基因, 发挥转录后调控的功能。该文对植物 phasiRNA 的生物合成通路、生物学功能及其进化进行综述。

关键词: 非编码小 RNA; phasiRNA; ta-siRNA; 转录后调控

中图分类号: Q752; Q946; S-1 **文献标志码:** A

Recent studies on phasiRNAs in plants

ZHU Cheng-Xin, XIONG Wei, MO Bei-Xin*

(Plant Epigenetic Laboratory, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Plant phasiRNAs (phased, secondary, small interfering RNAs) play important roles in plant growth, development, reproduction as well as resistance to virus. The primary phasiRNAs (pri-phasiRNAs) are transcribed by Pol II (DNA dependant RNA polymerase II). Then, pri-phasiRNAs are cleaved by AGO protein, which is guided by miRNA, to form the precursor phasiRNAs (pre-phasiRNAs). One portion of single-strand RNA (upstream or downstream of the miRNA cleavage site) will be converted by RDR6 (RNA-dependent RNA polymerases 6) into double-strand RNA, which is then cut by DCL4 into 21-nt or 24-nt phased mature phasiRNAs. Mature phasiRNA assembles with AGO protein into silencing complex to influence target gene expression at the posttranscriptional level. This paper will review the biosynthesis pathway, biological function and evolution of phasiRNA in plants.

Key words: noncoding small RNA; phasiRNA; ta-siRNA; posttranscriptional gene regulation

非编码 RNA 是指转录组中不翻译蛋白质的 RNA, 由持家非编码 RNA 和调控非编码 RNA 组成^[1]。调控非编码 RNA 中的短链非编码 RNA (small non-coding RNA) 是最近研究的热点, 它包括微小 RNA (microRNA, miRNA) 和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。

相位 siRNA (phased siRNA or phasiRNA) 是一类由 miRNA 介导生成的首尾相连, 具有相位排列结构特征的植物内源 siRNA^[2]。根据其作用方式的不同, phasiRNA 可分为顺式作用小干扰 RNA (cis acting siRNA, ca-siRNA) 和反式作用小干扰 RNA (trans

acting siRNA, ta-siRNA)^[3-5]。Ca-siRNA 作用于它的来源基因以及来源基因的同家族基因; 而 ta-siRNA 则是像 miRNA 一样通过碱基互补配对靶向并剪切其他基因的 mRNA, 如外源性 RNA 序列——病毒^[6-7]。据目前研究表明, ta-siRNA 也具有顺式剪切的功能^[4,8]。植物中主要的 4 个 ta-siRNA 基因家族为 *TASI*、*TAS2*、*TAS3* 和 *TAS4*, 而部分植物中还

收稿日期: 2018-03-21; 修回日期: 2018-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571332)

*通信作者: E-mail: bmo@szu.edu.cn

存在一些其他的 ta-siRNA 基因家族, 如番茄中的 *TAS5*、藓类中的 *TAS6* 以及只存在于葡萄中的 *vvi-TAS7*、*vvi-TAS8*、*vvi-TAS9* 和 *vvi-TAS10*^[8]。物种及 *TAS* 基因来源决定参与 ta-siRNA 合成通路的 miRNA/AGO 复合体, 如双子叶植物的 miR173/AGO1-*TAS1a/b/c/TAS2* 通路、陆生植物的 miR390/AGO7-*TAS3a/b/c* 通路、拟南芥等双子叶植物的 miR828/AGO1-*TAS4* 通路、番茄 miR482/AGO1-*TAS5* 通路以及藓类的 miR156/miR529/AGO1-*TAS6* 通路等^[2,9-13]。

PhasiRNA 同其他内源性 siRNA 一样, 对于植物的生长发育具有调控作用, 但其发挥功能的模式和其他内源性 siRNA 如 24-nt siRNA 不同。24-nt siRNA 主要通过 RdDM (RNA-directed DNA methylation) 途径, 以 TGS (transcriptional gene silencing) 的方式调控转座子和中心体周围重复序列的表达, 对植物的生长发育进行表观遗传模式的调控。而长度为 21 nt 的 phasiRNA 则是与 AGO 蛋白结合形成 RISC (RNA-induced silencing complex) 复合体, 以复合体的形式对靶标 mRNA 进行剪切, 通过 PTGS (post-transcriptional gene silencing) 的方式调控基因的表达, 影响植物的生长发育^[14]。此外, phasiRNA 在顺式 DNA 的甲基化中也具有一定的作用^[15]。

动物中有一类 phasiRNA 由内切核酸酶 Zucchini (Zuc) 切割产生, 能够抑制生殖细胞中转座子的表达^[16-17], 而植物中的 phasiRNA 也大多聚集在生殖组织中, 并在生殖期间靶定并沉默转座元件^[3,15]。除了调控植物的生殖发育, phasiRNA 还会响应生物或非生物胁迫。同时, 随着物种的进化, phasiRNA 通过调整其合成通路以及它的靶基因来调节植物的生长发育以适应不同生长环境。

1 植物 phasiRNA 的生物合成途径

PhasiRNA 是一类特殊的 siRNA, 它既可以顺式调控其来源基因, 又能够反式作用于其他基因, 由 miRNA 介导 AGO 蛋白剪切产生, 且生成的 siRNA 具有一定的相位, 而它的合成途径有别于其他的 siRNA^[7,18]。

1.1 植物中 phasiRNA 的转录

PhasiRNA 由 Pol II 从 *PHAS* 位点转录出初级转录本 (primary *PHAS* transcript, pri-*PHAS*), 初级转录本拥有 5' 帽子 (5'cap) 和 3' 尾巴 (3'poly(A))(图 1^[19])。 *PHAS* 位点所在的区域可能是基因区, 也可能是基因间隔区。研究发现, 番茄 91 个潜在的 *PHAS* 位点中有 51 个位于基因区, 剩余的位于基因

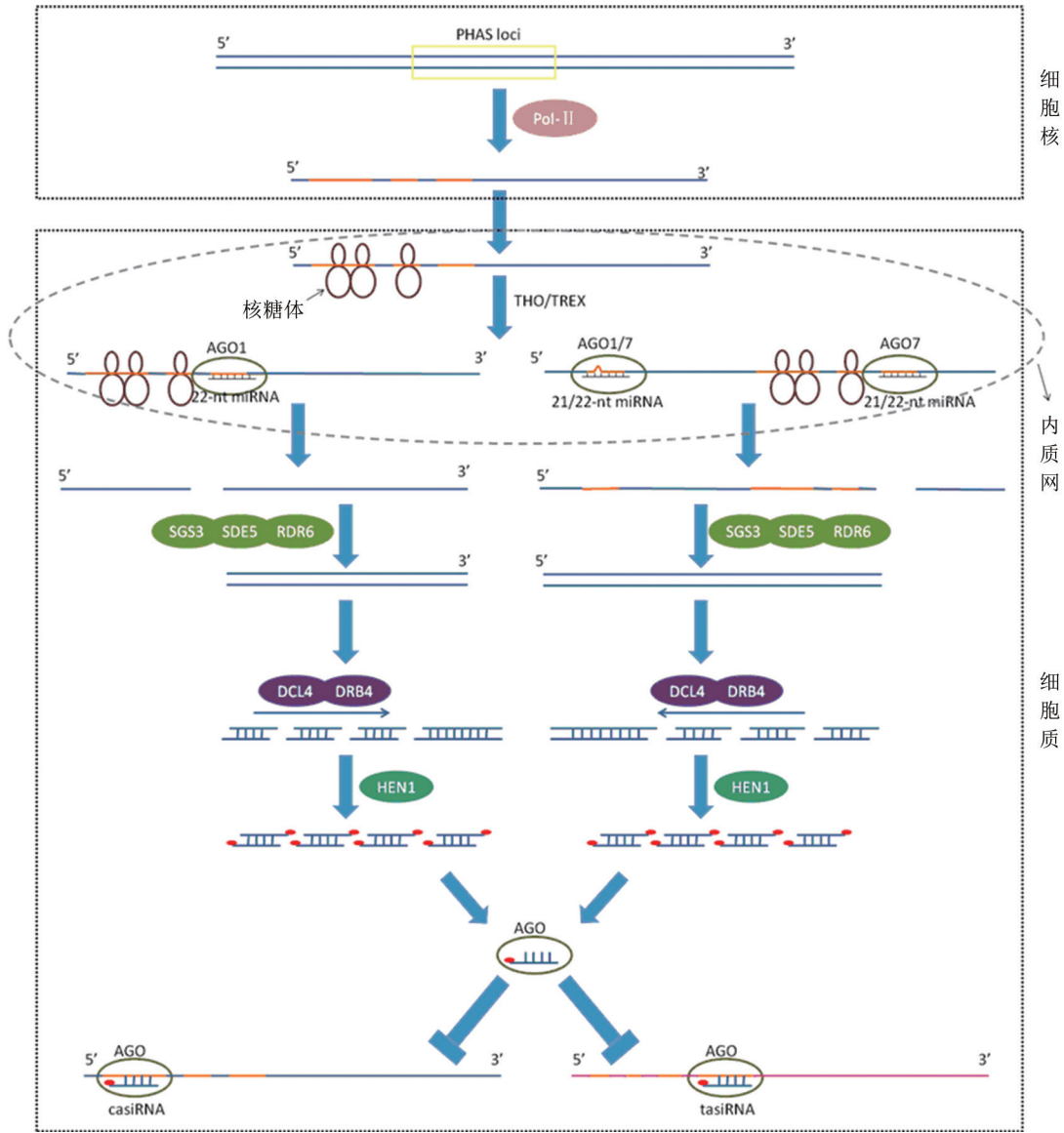
间隔区^[20], 而大豆中有 208 个 *PHAS* 位点与 *NBS-LRR* (nucleotide-binding site, leucine-rich repeat) 基因重合^[3]。部分初级转录本拥有多个短的阅读框, 虽然它们对于 phasiRNA 的生成不是绝对必需的, 且还未证实初级转录本的阅读框可以编码有功能的蛋白, 但是它们的存在对于维持初级转录本的稳定及成熟 phasiRNA 的水平具有一定意义^[21]。初级转录本的阅读框还可以通过微调实现对 phasiRNA 靶基因表达量的精确调控^[19]。

1.2 植物中 phasiRNA 前体的加工

粗面内质网膜上的多聚核糖体 (membrane-bound polysomes, MBPs) 在细胞中主要功能是合成向外分泌的蛋白质或酶, 也是加工 phasiRNA 前体的部位。PhasiRNA 初级转录本可能被 THO/TREX (transcription/export) 复合体从细胞核运转到细胞质^[19,22-24], 再与粗面内质网膜上的核糖体结合并暴露出产生 phasiRNA 前体的部分^[25], miRNA 则通过碱基互补配对与 phasiRNA 初级转录本上的特定位点结合, 并介导 AGO 蛋白对其进行剪切生成 phasiRNA 前体 (pre-phasiRNA)^[26]。PhasiRNA 初级转录本与核糖体的结合在一定程度上可以阻止其被降解^[21]。

PhasiRNA 的合成需要 miRNA 的参与, 且只有部分特定长度的 miRNA (表 1、表 2、表 3) 能够触发 phasiRNA 的产生, 如 22-nt 的 miR173 能够触发 *TAS1* 产生 ta-siRNA^[5,11,27-28]。此外, miRNA 两端的核酸序列也会影响 phasiRNA 的合成, miRNA 3' 端第 20 位核苷酸影响它与 phasiRNA 初级转录本的结合^[29], miRNA 5' 端则影响它与相应 AGO 蛋白的结合^[30]。

21-nt phasiRNA 前体的产生有两种模式, 分别为 “one-hit” 和 “two-hit”。“one-hit” 模式是指 phasiRNA 初级转录本上只有一个 miRNAs 结合位点, 22-nt 的 5'U miRNA 介导 AGO1 剪切 phasiRNA 初级转录本并释放 3' 端片段进行下一步加工^[5,12]; “two-hit” 模式则是 phasiRNA 初级转录本上有两个 miRNA 结合位点, 并被相同或不同的 21-nt 或 22-nt 的 miRNA/AGO 复合体识别与结合, 因为 2 个 miRNA 与 phasiRNA 初级转录本的匹配度不同^[2], 所以, 只有完全匹配的 3' 端结合位点被剪切, 而与 5' 端位点结合的 miRNA 上有一个碱基凸起, 因此, 该位点不会被剪切^[12-31]。拟南芥中的 *TAS1*、*TAS2* 和 *TAS4* 基因以 “one-hit” 模式产生 phasiRNA; 而 *TAS3* 初级转录本则由 2 个 21-nt 的 miR390 识别并结合, 以典型的 “two-hit” 模式产生 ta-siRNA, 且 5'



PhasiRNA由Pol II酶从PHAS位点转录出初级转录本；初级转录本与核糖体结合并被miRNA介导的AGO蛋白切割生成phasiRNA前体(THO/TREX在此期间将phasiRNA初级转录本从细胞核运转到细胞质中)；在SGS3和SDE5的协助下，RDR6将单链RNA复制成双链RNA；双链RNA被DCL4和DRB4复合体切割成首尾相连的、相位小片段RNA；小片段RNA再被HEN1甲基化；小片段RNA中的一条链与AGO蛋白结合沉默casiRNAs或ta-siRNAs。

图1 phasiRNAs的合成通路

端 miR390/AGO7 的存在直接影响 ta-siRNA 的合成^[31-32]。此外，“two-hit”模式也可以由 2 个 22-nt 的 5'U miRNA 介导，如苜蓿属中，由 2 个 miR1509 同时结合 Medtr7g012810 基因的初级转录本介导 AGO1 对其剪切^[4,33]，产生 phasiRNA 前体。此外，de Felippes 等^[34] 研究表明，只有一个 miR390 的情况下，TAS3 同样可以产生 tasiRNA，而“two-hit”模式则可能是为提高 ta-siRNA 产生过程的保真度和下游基因调节的准确性。

PhasiRNA 前体继而在 SGS3 (suppressor of gene

silencing 3) 和 SDE5 (silencing defective 5) 协助下^[19,22]，被 RDR6 (RNA-dependent RNA polymerases 6) 复制成双链 RNA。然后，与 DRB4 (dsRNA-binding protein 4) 结合的双链 RNA 被 DCL4 (Dicer like 4) 切割成首尾相连的短片段 RNA，即 phasiRNA^[12,35-36]，在 DCL4 缺失的情况下，DCL2 和 DCL3 将替补 DCL4 完成切割工作^[9,37]。短片段 RNA 的 3' 端再被甲基转移酶 HEN1 (HUA ENCHANCER1) 甲基化以降低其降解速率^[22]。最后，AGO 蛋白与 phasiRNA 中的一条链结合，形成沉默复合体，作用于它的来源基因以及

表1 PhasiRNA在植物中高度保守

长度(nt)	miRNA	PHAS位点	物种
21	miR164	<i>NAC</i>	拟南芥、苹果、毛果杨
21	miR167	<i>ARF</i>	拟南芥、苹果、豆科
21	miR168	<i>AGO1</i>	拟南芥、苹果、水稻
21	miR319	<i>TCP</i>	拟南芥、苹果、豆科
21	miR390	<i>TAS3</i>	拟南芥、苹果、豆科、云杉
21	miR393	<i>AFB/TIR1</i>	拟南芥、豆科、云杉、水稻
21	miR828	<i>MYB/TAS4</i>	拟南芥、苹果、豆科、云杉、水稻、棉花
22	miR482/miR2118	<i>NB-LRR</i>	豆科、云杉、裸子植物、茄属、西红柿

表2 同种miRNA能够靶向不同PHAS位点的初级转录本

物种	长度(nt)	miRNA	PHAS 位点
拟南芥	22	miR173	<i>TAS1</i> 、 <i>TAS2</i>
拟南芥	21	miR390	<i>TAS3</i> 、 <i>TAS4</i>
拟南芥	22	miR393	<i>AFB</i> 、 <i>siAAR</i> 、 <i>TIR1/F-box</i> 、 <i>bHLH</i>
拟南芥	21	miR395	<i>ATPS</i> 、 <i>AST</i>
拟南芥	21	miR398	<i>CSD</i> 、 <i>CytC oxidase</i>
豆科	21	miR172	<i>RAP2</i> 、DNA binding / transcription factor <i>AP2 (APETALA2)</i> 、 Transducin family protein/WD-40 repeat family protein
豆科	21	miR393	<i>ATCSLE1</i> 、cellulose synthase/transferase、 transferring glycosyl groups、 <i>AFB2</i> 、 <i>TIR1</i>
豆科	21	miR403	<i>AGO2</i> (Argonaute 2)、nucleic acid binding
豆科	22	miR2118	<i>NB-LRRs</i> 、 <i>SGS3</i>
云杉	22	miR951	<i>NB-LRR</i> 、noncoding
云杉	22	miR482/miR2118	<i>NB-LRR</i> 、noncoding
苹果	21	miR159	Transcription factor <i>GAMYB</i> 、 <i>MYB</i>
苹果	21	miR319	Transcription factor <i>TCP4</i> 、 <i>GDP-mannose 3,5-epimerase</i>
苹果	22	miR858	<i>MYB</i> 、Mate efflux family protein、 <i>Lipase family protein</i> 、 Targets for apple-specific miRNAs

表3 同种PHAS位点的初级转录本可能由不同的miRNA触发

长度(nt)	miRNA	PHAS 位点	物种
21	miR529	<i>TAS6</i>	小立碗藓
20	miR156		
21	miR160	<i>ARF</i>	拟南芥
21	miR167		
22	miR11425	Leucine-rich repeat protein kinase family	云杉
22	miR11540		
22	miR11551		
21	miR159	<i>MYB</i>	拟南芥、苹果
22	miR828		棉花、苹果、云杉
22	miR858		棉花、苹果
21	miR161/miR400	<i>PPR</i>	拟南芥
21	<i>TAS2</i>		
21	miR390	<i>TAS4</i>	拟南芥
22	miR828		拟南芥、苹果、水稻

来源基因的同家族基因或切割其他基因的 mRNA。

1.3 植物中phasiRNA的动态平衡

成熟的 phasiRNA 与 AGO 蛋白结合组成沉默

复合体 (RISC), 调控植物的生长发育。为了维持细胞的稳态, phasiRNA 的降解必须维持在一定的水平, 而不同 phasiRNA 的降解速度是不同的, 如葡

葡萄 *vviTAS7* 位点产生的 *tasi-RP1a*、*tasi-RP1b*、*tasi-RP1c* 和 *tasi-RP1d* 中, 21-nt 的 ta-siRNA 降解速度最慢^[8], 而毛果杨中相同转录本上同时生成的各种 phasiRNA 的降解速率相差几千倍^[38]。此外, phasiRNA 初级转录本上 miRNA 结合位点附近的基因也会影响 phasiRNA 初级转录本的降解^[39-40]。

2 植物中phasiRNA的功能

PhasiRNA 在物种进化、植物生长发育、响应生物和非生物胁迫中都扮演着重要的角色^[8,20]。同时, 植物中的 phasiRNA 在功能上具有物种特异性, 如双子叶植物中的 phasiRNA 多参与疾病抵抗, 而单子叶植物中的 phasiRNA 则多与生殖生长相关^[40-41]。

2.1 调控植物生长发育

PhasiRNA 对于植物的生长发育具有一定的影响。它不仅能够调控植物细胞的分裂和分化, 且在不同时期、不同组织中的表达具有一定的差异性^[42-43], 多参与植物的生殖调控。在花发育过程中, 无论是 21-nt 还是 24-nt 的 phasiRNA 均在花序中大量表达^[44-45]。单子叶植物和裸子植物雌雄花序中的 phasiRNA 多由 miR2118 介导产生^[42,46-47]。玉米和非洲水稻中, 花药减数分裂前期, 由 miR2118 触发产生的 21-nt phasiRNA 在花粉囊中累积; 而减数分裂期, miR2275 触发产生的 24-nt phasiRNA 则聚集于绒毡层和性母细胞中, 且该现象会维持到花粉性细胞成熟和单倍体配体分化成花粉^[16,48]。而拟南芥胚珠中, *TEX1* 通过 *TAS3-ARF3* 通路调控大孢子母细胞的形成, 间接影响配子的形成^[49]。长日照条件下, PSMS 系水稻中控制光敏雄性核不育基因 *PMS1* (photoperiod-sensitive genic male sterility 1) 的初级转录本能被 miR2118 介导切割成 21-nt 的 phasiRNA, phasiRNA 的累积最终会导致水稻的雄性不育^[40], 这对于研究两系不育系的培养很重要。另外, 水稻花粉母细胞 (pollen mother cells, PMCs) 从减数分裂前期过渡到减数分裂期期间, 超过 700 个长链基因间非编码 RNA (large intergenic, non-coding RNA, lincRNA) 被由 miR2118 介导的 MEL1 (MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE1) 蛋白剪切, 由此生成的 21-nt phasiRNA 在大范围减数分裂染色体重组 (large-scale meiotic chromosome reprogramming, LMR) 过程中, 促进同源重组和染色体联会, 以表观修饰的方式使减数分裂正常进行^[15-16,43,50-51]。

除了调控植物的生殖发育, phasiRNA 对于植物其他组织的正常发育也有一定的作用。如在蒺藜

苜蓿 (*Medicago truncatula*) 叶缘形成过程中, miR390-*TAS3-ARF3/ARF4a/ARF4b* 通路和植物激素的分布共同影响叶缘的锯齿形态, 并间接影响叶片的极性^[52]。此外, phasiRNA 可以以移动信号的方式在植物细胞间传递信号, 调节植物的生长^[48,53-54], 如在拟南芥叶原基的近轴位置, 由 *TAS3a* 位点生成的 21-nt tasiR-ARF 通过细胞间运输从近轴面运动到远轴面, 并形成梯度分布, 从而影响背腹面叶片的极性^[53,55-57]。除了影响叶片的形态和极性, miR390-*TAS3-ARF* 通路还能调控植物侧根的生长和发育时间或模式, 在大豆中甚至会影响其结节的形成和根瘤菌的感染^[47,58-60]。

此外, phasiRNA 在植物中还参与其他的代谢调控, 如小麦中的 miR9678-*WGSAR*-phasiRNA 通路调控种子的萌发^[61]; 陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 棉纤维的发育受 *GhMYB2D* 基因位点产生的 ta-siRNA 的调控^[39]; 大亚基核糖体 RNA 位点 (large subunit rRNA, LSU-rRNA) 产生的 phasiRNA 通路与一些核糖体 RNA (rRNA) 的生成相关^[37]。PhasiRNA 与 miRNA、内源诱捕靶标 (endogenous target mimic, eTM) 共同调节大豆中的脂类合成过程^[62]。草莓中的 miRFBX7-*FBX*-phasiRNA 通路在花托中发挥作用并影响其果实的独特性^[63]。

2.2 参与胁迫抵制

2.2.1 非生物胁迫

PhasiRNA 参与植物对非生物胁迫的响应, 如在水分缺乏的情况下, 大豆中的 miR1514a 介导剪切 *NAC* 转录因子的转录本产生 phasiRNA, 以响应干旱胁迫^[52,64-65], 而毛果杨中也发现 47 个 phasiRNA 参与植物抵抗干旱胁迫的调控, 如 miR6445-*PHAI8* 通路产生的 phasiRNA 调控毛果杨的干旱耐受性。除了响应干旱胁迫, 毛果杨中的 miR393-*PHAI2* 通路产生的 phasiRNA 能够负调控 *PHAI* 和 *PHA2* 基因以应对盐胁迫^[38]。*TASI-HTT1* (*HEAT-INDUCED TASI TARGET1/HTT2*) 调控植物的耐热性^[66], 而在缺磷、糖、脱落酸 (ABA) 等诱导下, miR828-*TAS4-siR81(-)* 正调控 *MYB* 转录因子, 如 *PAP1*、*PAP2* 和 *MYB113* 以促进植物中花青素的合成^[38,67-69], 累积的花青素可以清除植物细胞在胁迫下产生的自由基^[70]。

2.2.2 生物胁迫

除了应对非生物胁迫, phasiRNA 也参与植物对生物胁迫的响应。植物中抵御病毒入侵的基因主要是 R 基因 (resistance gene), 它包括 *NB-LRR* (nucleotide binding leucine-rich repeat) 基因、*RLK* (receptor like

kinases) 基因、*RLP* (receptor like protein) 基因等^[71]。*R* 基因中存在多个 *PHAS* 位点, 且产生的 *phasiRNA* 也多数靶向 *R* 基因, 以应对病菌的入侵^[20], 如在苜蓿属中发现的能够产生 *phasiRNA* 的 114 个位点中绝大多数都与 *NB-LRR* 编码基因相关^[4]。据相关文献报道, 抵御病菌入侵的 *miR482/miR2118-NB-LRR* 通路普遍存在于单子叶、双子叶和裸子植物中^[20,47,72-73], 如大豆和苜蓿中, *miR2118* 触发 *TIR-NBS-LRR* (Toll/interleukin 1 receptor nucleotide binding site-leucine-rich repeat) 基因位点产生 *phasiRNA* 以抵御病原体入侵, 而在拟南芥和水稻的 *TIR-NBS-LRR* 基因上也发现类似的靶位点^[56,74]。另外, 植物的 *TIR-NB-LRR* 基因在不同组织中产生不同的 *phasiRNA*, 以抵御不同的病原体入侵^[74]。豆类中的 *miR390-TAS3* 通路产生 *ta-siRNAs* 抑制植物激素转录因子 *ARF2/3/4* 的表达, 以增强激素信号转导的方式抵御根瘤菌的感染^[59]。而 *phasiRNA* 的反式作用能够帮助西红柿抵御马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 的感染^[75]。

3 植物中 *phasiRNA* 的进化

植物中的 *phasiRNA* 以及它的合成通路有些随着物种进化而进化, 有些则比较保守。真双子叶植物中普遍存在的 3 个编码蛋白的 *PHAS* 基因家族, 分别为 *NB-LRRs*、*PPRs* 和 *MYBs*^[20,37-38,47], 而单子叶植物中的 *phasiRNA* 前体主要是非编码 RNA^[16]。*TAS3* 基因在单子叶植物和双子叶植物中发生了进化^[77], 如 *TAS3-2* 基因家族在苹果等其他双子叶物种中普遍存在, 而在拟南芥中却没有发现该基因, 但是它产生的 *phasiRNA* 所靶向的 *ARF* 基因与拟南芥的 *ARF* 基因同源^[68]。*TAS4* 也随着单子叶植物和双子叶植物的分歧发生了进化, 只出现在双子叶植物中^[69]。

植物中 *PHAS* 网络是动态的, *phasiRNA* 合成通路中的 *miRNA* 作为该通路的关键因子, 既有延续其最初功能的, 也有随着物种的进化做出相应改变的。根据分析, 不同植物间的同种 *miRNA* 的靶基因相同, 具有一定的保守性, 如拟南芥、苹果等植物中的 *miR390-TAS3-ARF3/ARF4* 通路, 拟南芥、豆科中的 *miR393-TIR1/AFB* 通路, 云杉、西红柿中的 *miR482/miR2118-NB-LRR* 通路和云杉、马铃薯番茄中的 *miR4376-ACA10* 通路 (表 1)^[52,76-77] 均呈现这种物种间的保守性。有些 *miRNA* 在植物中有多个靶基因, 并在植物的不同生长阶段触发产生不同的 *phasiRNA* 以满足植物的不同生长需求 (表 2)。

而在物种进化过程中, 各类植物的需求不同, 同种 *miRNA* 的靶基因也出现分歧, 如真双子叶植物中的 *miR482/miR2118* 靶向 *NB-LRR* 基因, 禾本科植物生殖细胞中的 *miR482/miR2118* 则靶向非编码 *PHAS* 位点, 而 *miR482/miR2118* 介导的这两种 *phasiRNA* 产生通路在裸子植物中同时存在^[47]。另外, 触发产生 *phasiRNA* 的 *miRNA* 在各类植物间也具有一定的差异性, 如棉花中的 *miR828* 和 *miR858* 都可以靶向 *MYB* 基因的初级转录本, 而苹果中 *MYB* 基因的初级转录本除了可以由这两个 *miRNA* 触发产生 *phasiRNA* 外, 还可以由 *miR159* 触发产生 (表 3)。

植物在切换发育模式或应对环境刺激时, *phasiRNA* 将通过时空表达的变化来帮助植物应对发育或环境的变化^[16], 如大豆叶片和根部在应对不同病原体入侵时会产生不同的 *phasiRNA*。*PhasiRNA* 的种类随着物种的进化也有不同, 如野生大豆与驯化大豆在 *phasiRNA* 的种类和数目上存在差异^[74]; 各类植物中的 *phasiRNA* 片段长度也不尽相同, 21-nt 的 *phasiRNA* 在很多植物中都存在, 而 24-nt 的 *phasiRNA* 只在单子叶植物中有发现, 但有研究表明, 双子叶植物中也发现了产生 24-nt *phasiRNA* 的 *PHAS* 位点^[37]。

此外, *phasiRNA* 的靶基因也随着物种的进化而出现变更, 如 *TAS3* 产生的 *ta-siRNA* 在不同种类的植物中靶标基因并不完全相同, 苔类植物中 *ta-siRNAs* 靶定 *AP2* 基因, 而在藓类植物中 *ta-siRNA* 靶定 *AP2* 和 *ARF* (auxin responsive factor) 基因, 而近代植物中 *ta-siRNA* 只靶向 *ARF* 基因^[47]。

4 结语

植物细胞中多种因子的协同调节是保证植物正常生长发育的必备条件。*PhasiRNA* 作为小 RNA 的一员, 广泛存在于各类植物以及它们的各种组织中, 并参与调控植物的生命活动。目前 *pre-phasiRNA* 在细胞中加工成成熟的 *phasiRNA* 的机制尚未清楚, 但有研究表明, 在顺式高尔基体上发现 *SGS3* 和 *AGO7* 的存在, 而高尔基体的功能是加工、分类和包装内质网上合成的蛋白, 所以 *phasiRNA* 的后续生成可能是在高尔基体上进行的。此外, *phasiRNA* 需要 *miRNA* 的介导才能产生, 且其在组织中的移动能力比 *miRNA* 强, 猜测 *phasiRNA* 是一种在特殊情况下, 如生殖期间或病毒入侵, 迅速全方位调控植物生命活动的 *siRNA*。植物体内 *phasiRNA* 的表

过量也会影响植物的生长发育, 有的甚至导致植物的死亡, 所以植物体内的 phasiRNA 必须处于合适的水平。研究植物中众多 phasiRNA 的合成通路以及它们调控靶基因表达的机制, 有助于我们深入了解植物生长发育的调控网络, 对于通过表观遗传途径改变农作物的性状从而获得理想的农作物也具有指导意义。

[参 考 文 献]

- [1] 黄小庆, 李丹丹, 吴娟. 植物长链非编码RNA研究进展. 遗传, 2015, 37: 344-59
- [2] Borges F, Martienssen RA. The expanding world of small RNAs in plants. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015, 16: 727-41
- [3] Arikait S, Xia R, Kakrana A, et al. An atlas of soybean small RNAs identifies phased siRNAs from hundreds of coding genes. Plant Cell, 2014, 26: 4584-601
- [4] Zhai J, Jeong DH, De Paoli E, et al. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. Genes Dev, 2011, 25: 2540-53
- [5] Chen HM, Chen LT, Patel K, et al. 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 15269-74
- [6] 史向毅, 苗琛, 王江, 等. 植物中的一种内源小RNA——ta-siRNA. 植物生理学通讯, 2008, 44: 378-84
- [7] Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, et al. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. Mol Cell, 2004, 16: 69-79
- [8] Zhang C, Li G, Wang J, et al. Identification of trans-acting siRNAs and their regulatory cascades in grapevine. Bioinformatics, 2012, 28: 2561-8
- [9] Arif MA, Fattash I, Ma Z, et al. DICER-LIKE3 activity in *Physcomitrella patens* DICER-LIKE4 mutants causes severe developmental dysfunction and sterility. Mol Plant, 2012, 5: 1281-94
- [10] 张长青, 李海玲, 李广平. 植物ta-siRNA合成作用级联研究进展. 西北植物学报, 2014, 34: 2576-82
- [11] Cuperus JT, Carbonell A, Fahlgren N, et al. Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. Nat Struct Mol Biol, 2010, 17: 997-1003
- [12] Fei Q, Xia R, Meyers BC. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. Plant Cell, 2013, 25: 2400-15
- [13] Zhao JP, Diao S, Zhang BY, et al. Phylogenetic analysis and molecular evolution patterns in the MIR482-MIR1448 polycistron of *Populus L.* PLoS One, 2012, 7: e47811
- [14] Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. EMBO J, 2002, 21: 4671-9
- [15] Dukowic-Schulze S, Sundararajan A, Ramaraj T, et al. Novel meiotic miRNAs and indications for a role of phasiRNAs in meiosis. Front Plant Sci, 2016, 7: 762
- [16] Komiya R. Biogenesis of diverse plant phasiRNAs involves an miRNA-trigger and Dicer-processing. J Plant Res, 2017, 130: 17-23
- [17] Weick EM, Miska EA. piRNAs: from biogenesis to function. Development, 2014, 141: 3458-71
- [18] 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
- [19] Yoshikawa M, Iki T, Numa H, et al. A short open reading frame encompassing the microRNA173 target site plays a role in trans-acting small interfering RNA biogenesis. Plant Physiol, 2016, 171: 359-68
- [20] Wu F, Chen Y, Tian X, et al. Genome-wide identification and characterization of phased small interfering RNA genes in response to *Botrytis cinerea* infection in *Solanum lycopersicum*. Sci Rep, 2017, 7: 3019
- [21] Bazin J, Baerenfaller K, Gosai SJ, et al. Global analysis of ribosome-associated noncoding RNAs unveils new modes of translational regulation. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114: E10018-27
- [22] Jauvion V, Elmayer T, Vaucheret H. The conserved RNA trafficking proteins HPR1 and TEX1 are involved in the production of endogenous and exogenous small interfering RNA in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2010, 22: 2697-709
- [23] Doll S, Kuhlmann M, Rutten T, et al. Accumulation of the coumarin scopolin under abiotic stress conditions is mediated by the *Arabidopsis thaliana* THO/TREX complex. Plant J, 2018, 93: 431-44
- [24] Reed R, Cheng H. TREX, SR proteins and export of mRNA. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17: 269-73
- [25] Li S, Le B, Ma X, et al. Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes in *Arabidopsis*. Elife, 2016, 5: e22750
- [26] Jouannet V, Moreno AB, Elmayer T, et al. Cytoplasmic *Arabidopsis* AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. EMBO J, 2012, 31: 1704-13
- [27] 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
- [28] Felippes FF, Weigel D. Triggering the formation of tasiRNAs in *Arabidopsis thaliana*: the role of microRNA miR173. EMBO Rep, 2009, 10: 264-70
- [29] Fei Q, Li P, Teng C, et al. Secondary siRNAs from *Medicago* NB-LRRs modulated via miRNA-target interactions and their abundances. Plant J, 2015, 83: 451-65
- [30] Komiya R, Ohyanagi H, Niihama M, et al. Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. Plant J, 2014, 78: 385-97
- [31] Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, et al. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. Cell, 2006, 127: 565-77
- [32] 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
- [33] Xia R, Meyers BC, Liu Z, et al. MicroRNA superfamilies

- descended from miR390 and their roles in secondary small interfering RNA biogenesis in eudicots. *Plant Cell*, 2013, 25: 1555-72
- [34] de Felippes FF, Marchais A, Sarazin A, et al. A single miR390 targeting event is sufficient for triggering TAS3-tasiRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 5539-54
- [35] Fukudome A, Kanaya A, Egami M, et al. Specific requirement of DRB4, a dsRNA-binding protein, for the *in vitro* dsRNA-cleaving activity of *Arabidopsis* Dicer-like 4. *RNA*, 2011, 17: 750-60
- [36] Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, et al. Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol*, 2005, 15: 1494-500
- [37] Zheng Y, Wang S, Sunkar R. Genome-wide discovery and analysis of phased small interfering RNAs in Chinese sacred lotus. *PLoS One*, 2014, 9: e113790
- [38] Shuai P, Su Y, Liang D, et al. Identification of phasiRNAs and their drought-responsiveness in *Populus trichocarpa*. *FEBS Lett*, 2016, 590: 3616-27
- [39] Guan X, Pang M, Nah G, et al. miR828 and miR858 regulate homoeologous MYB2 gene functions in *Arabidopsis* trichome and cotton fibre development. *Nat Commun*, 2014, 5: 3050
- [40] Fan Y, Yang J, Mathioni SM, et al. PMS1T, producing phased small-interfering RNAs, regulates photoperiod-sensitive male sterility in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 15144-9
- [41] Zheng Y, Wang Y, Wu J, et al. A dynamic evolutionary and functional landscape of plant phased small interfering RNAs. *BMC Biol*, 2015, 13: 32
- [42] Yu Y, Zhou Y, Zhang Y, et al. Grass phasiRNAs and male fertility. *Sci China Life Sci*, 2018, 61: 148-54
- [43] Komiya R, Ohyanagi H, Niihama M, et al. Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *Plant J*, 2014, 78: 385-97
- [44] Johnson C, Kasprzewska A, Tennessen K, et al. Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Res*, 2009, 19: 1429-40
- [45] Vogel JP, Garvin DF, Mockler TC, et al. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 2010, 463: 763-8
- [46] Ta KN, Sabot F, Adam H, et al. miR2118-triggered phased siRNAs are differentially expressed during the panicle development of wild and domesticated African rice species. *Rice*: NY, 2016, 9: 10
- [47] Xia R, Xu J, Arikait S, et al. Extensive families of miRNAs and PHAS loci in Norway spruce demonstrate the origins of complex phasiRNA networks in seed plants. *Mol Biol Evol*, 2015, 32: 2905-18
- [48] Zhai J, Zhang H, Arikait S, et al. Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phasiRNAs in maize anthers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3146-51
- [49] Su Z, Zhao L, Zhao Y, et al. The THO complex non-cell-autonomously represses female germline specification through the TAS3-ARF3 module. *Curr Biol*, 2017, 27: 1597-609.e2
- [50] Liu H, Nonomura KI. A wide reprogramming of histone H3 modifications during male meiosis I in rice is dependent on the argonaute protein mel1. *J Cell Sci*, 2016, 129: 3553-61
- [51] Nonomura K, Morohoshi A, Nakano M, et al. A germ cell specific gene of the argonaute family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell*, 2007, 19: 2583-94
- [52] Zhou C, Han L, Fu C, et al. The trans-acting short interfering RNA3 pathway and no apical meriste antagonistically regulate leaf margin development and lateral organ separation, as revealed by analysis of an argonaute7/lobed leaflet1 mutant in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 2013, 25: 4845-62
- [53] Benkovic AH, Timmermans MC. Developmental patterning by gradients of mobile small RNAs. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 27: 83-91
- [54] de Felippes FF, Ott F, Weigel D. Comparative analysis of non-autonomous effects of tasiRNAs and miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 2880-9
- [55] Fukushima K, Hasebe M. Adaxial-abaxial polarity: the developmental basis of leaf shape diversity. *Genesis*, 2014, 52: 1-18
- [56] Jagadeeswaran G, Zheng Y, Li YF, et al. Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families. *New Phytol*, 2009, 184: 85-98
- [57] Husbands AY, Chitwood DH, Plavskin Y, et al. Signals and prepatterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes Dev*, 2009, 23: 1986-97
- [58] Adenot X, Elmayan T, Lauressergues D, et al. DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr Biol*, 2006, 16: 927-32
- [59] Hobecker KV, Reynoso MA, Bustos-Sanmamed P, et al. The microRNA390/TAS3 pathway mediates symbiotic nodulation and lateral root growth. *Plant Physiol*, 2017, 174: 2469-86
- [60] 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
- [61] Guo G, Liu X, Sun F, et al. Wheat miR9678 affects seed germination by generating phased siRNAs and modulating abscisic acid/gibberellin signaling. *Plant Cell*, 2018, 30: 796-814
- [62] Ye CY, Xu H, Shen E, et al. Genome-wide identification of non-coding RNAs interacted with microRNAs in soybean. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 743
- [63] Xia R, Ye S, Liu Z, et al. Novel and recently evolved microRNA clusters regulate expansive F-BOX gene networks through phased small interfering RNAs in wild diploid strawberry. *Plant Physiol*, 2015, 169: 594-610
- [64] Sosa-Valencia G, Romero-Perez PS, Palomar VM, et al. Insights into the function of the phasiRNA-triggering miR1514 in response to stress in legumes. *Plant Signal*

- Behav, 2017, 12: e1284724
- [65] Sosa-Valencia G, Palomar M, Covarrubias AA, et al. The legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought. *J Exp Bot*, 2017, 68: 2013-26
- [66] Li S, Liu J, Liu Z, et al. *HEAT-INDUCED TAS1 TARGET1* mediates thermotolerance via HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR a1a-directed pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26: 1764-80
- [67] Hsieh LC, Lin SI, Shih AC, et al. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol*, 2009, 151: 2120-32
- [68] Xia R, Zhu H, An YQ, et al. Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks. *Genome Biol*, 2012, 13: R47
- [69] Luo QJ, Mittal A, Jia F, et al. An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2012, 80: 117-29
- [70] Shi MZ, Xie DY. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*. *Recent Pat Biotechnol*, 2014, 8: 47-60
- [71] Sekhwal MK, Li P, Lam I, et al. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 19248-90
- [72] Shivaprasad PV, Chen HM, Patel K, et al. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell*, 2012, 24: 859-74
- [73] Li F, Pignatta D, Bendix C, et al. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 1790-5
- [74] Sun Y, Mui Z, Liu X, et al. Comparison of small RNA profiles of glycine max and glycine soja at early developmental stages. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 2043
- [75] Zheng Y, Wang Y, Ding B, et al. Comprehensive transcriptome analyses reveal that potato spindle tuber viroid triggers genome-wide changes in alternative splicing, inducible *trans*-acting activity of phased secondary small interfering RNAs, and immune responses. *J Virol*, 2017, 91: e00247-17
- [76] Shen D, Wang S, Chen H, et al. Molecular phylogeny of miR390-guided *trans*-acting siRNA genes (TAS3) in the grass family. *Plant Syst Evol*, 2009, 283: 125-32
- [77] Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, et al. microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005, 121: 207-21