

DOI: 10.13376/j.cbils/2022003

文章编号: 1004-0374(2022)01-0023-11

RNA在植物细胞间运输的研究进展

王 菲, 莫蓓莘*, 梁 超*

(深圳大学生命与海洋科学学院, 广东省植物表观遗传学重点实验室, 深圳 518037)

摘 要: 在高等植物中, 不同种类的 RNA 既可以通过胞间连丝在细胞与细胞之间移动, 也可以通过韧皮部进行系统性长距离运输, 从而调控植物的生长发育。RNA 的非细胞自主性使得其可以在合成它们的细胞之外起作用。具有非细胞自主性的 RNA 分子可以作为移动信号来调节植物发育、营养分配、基因沉默等等一系列的生理过程。该文主要总结了近年来植物 RNA 运输研究中的重要进展, 介绍了各种类型的 RNA 分子通过韧皮部及胞间连丝运输来行使其相应生物学作用的机制, 并对现今存在的关于 RNA 运输的科学问题进行展望。

关键词: 非细胞自主性; 胞间连丝; 小 RNA; RNA 干扰; 韧皮部; mRNA

中图分类号: Q945.7 **文献标志码:** A

RNA trafficking in plants

WANG Fei, MO Bei-Xin*, LIANG Chao*

(Guangdong Provincial Key Laboratory for Plant Epigenetics, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518037, China)

Abstract: In higher plants, different kinds of RNAs can be transported from cell to cell through plasmodesmata or systematically through phloem to regulate plant growth and development. Non-cellular autonomy of RNAs allows them to function outside the cells that synthesize them. RNA molecules with non-cellular autonomy can be used as mobile signals to regulate a series of physiological processes such as plant development, nutrient distribution, and gene silencing. In this article, we summarize the important progress of plant non-cellular autonomy in recent years, mainly introducing the mechanisms of the biological functions of RNA transport through phloem or plasmodesmata. Questions that remain to be answered in this field are discussed for future research.

Key words: non-cellular autonomy; plasmodesmata; small RNA; RNA interference; phloem; mRNA

经过长期的演化, 植物产生了复杂的细胞间通讯网络来协调和调整其生长发育以适应自然界各种环境变化。植物细胞与动物细胞最大的区别是, 植物细胞有一层坚硬的厚壁——细胞壁, 这个细胞壁成为细胞间交流的物理屏障。作为有效的细胞间通讯策略, 植物进化出一条通过穿过细胞壁连接相邻细胞的细胞质和内质网的膜性结构, 称为胞间连丝(plasmodesmata, PD), 允许相邻细胞之间的小分子(代谢物和植物激素等)和大分子(蛋白质和RNA等)的共质运动^[1-2]。在高等植物中, 各种类型的植物RNA, 包括信使RNA(mRNA)、小分子干扰RNA(siRNA)、微小RNA(microRNA)、转运RNA(tRNA)、

核糖体RNA(rRNA)均可以通过胞间连丝在细胞之间短距离运动, 或者通过韧皮部进行长距离运输^[3]。囊泡介导的运输也可能是RNA分子在植物细胞间运输的途径^[4]。此外, 作为信号分子, RNA分子的非细胞自主性表明, RNA分子可以在合成它们的细胞之外起作用^[3]。这些非细胞自主性的RNA分

收稿日期: 2021-08-05; 修回日期: 2021-10-09

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31701112); 深圳市基础研究自然科学基金项目(JCYJ20190808-115005598)

*通信作者: E-mail: bmo@szu.edu.cn (莫蓓莘); chaoliang@szu.edu.cn (梁超)

子可以参与信号转导来调节植物的生长发育^[4],对植物细胞的分化、形态建成、环境响应具有重要意义。本文简要阐述了 mRNA 和小 RNA 分子(包括 miRNA 和 siRNA)通过韧皮部的长距离运输和通过胞间连丝的短距离运输,并讨论了小 RNA 非自主性沉默调控植物生长发育的分子机制及其生物学功能。

1 RNA分子在细胞间的运输通道

1.1 胞间连丝——RNA在相邻细胞间的运输通道

胞间连丝是贯穿两个相邻植物细胞细胞壁并将细胞的原生质连接起来的细胞间通道。作为细胞间的桥梁,它是植物细胞间所特有的亚细胞结构。在19世纪末,植物细胞被认为是单个互不相通的细胞集合。然而,1879年,植物生理学家 Tangle 在马钱子胚乳中发现了植物细胞之间存在着某种连接,在常规显微镜下观察到了相邻的植物细胞间的通道。1901年,Strasburger 将这些通道命名为胞间连丝^[5]。虽然胞间连丝的概念被许多植物学家所接受,但由于早期技术的限制,胞间连丝的精微结构和生理功能均未得到细致的研究。直到电子显微镜技术出现,科学家们才可以观察到胞间连丝的超微细结构。1992年,Ding 等^[6]采用快速冷冻固定和冷冻替代技术并结合计算机辅助得到了胞间连丝清晰图像。简单来说,胞间连丝通道是两个相邻植物细胞质膜(PM)的连接和延续。在显微镜下,这些通道是由压扁内质网(ER)形成的圆筒体,称为压缩内质网或连丝微管(desmotubule, DT)。连丝微管是内质网的一种衍生结构^[7-8]。在连丝微管的中央与垂直细胞壁方向有一系列电子密度高的颗粒,称为中心柱(central rod),推测这些颗粒的性质都是蛋白质。质膜与连丝微管中间充斥着细胞质,其横断面呈环状且是孔径为2.5 nm的开放空间,因此称为孔环(annulus)。在胞间连丝的两端,由于连丝微管与质膜间的间距缩小,孔环随之收缩形成颈区(neck region)。鉴于胞间连丝的来源是内质网,1993年,Lucas 等^[9]提出用压缩内质网取代连丝微管的概念。另外,连丝微管上附着了一些蛋白质,这些蛋白质对物质在细胞间的运输起调节作用。除此之外,在胞间连丝的两端外侧区域的细胞壁内有胼胝质(callose)的积累。胼胝质的沉积和降解是一个动态的过程,对胞间连丝的开-闭状态起到了决定性作用,进而直接影响胞间连丝的通透性,胞间连丝的结构可见下图(图1)。

在植物的生长发育过程中,胞间连丝是一个高

度动态的结构。高等植物的胞间连丝可以在细胞分裂末期、胞质分裂过程中形成(称为初生 PD),也可以在胞质分裂完成之后形成(称为次生 PD, sPD)。而在其功能上,胞间连丝能控制在胞间扩散的小分子和代谢物分子大小限度(size exclusion, SEL)^[9],还能促进和调控大分子,如 RNAs、转录因子的胞间运输^[10]。有研究发现,一些可移动的 RNA 分子,如 miR390、miR165/166 和 *SUC1* mRNA 可以通过胞间连丝运动^[11-13],揭示了胞间连丝是植物中 RNA 穿梭的重要通道(图2)。

1.2 韧皮部——RNA长距离运输通道

植物的维管系统主要由韧皮部和木质部组成,为远端组织和器官的生长发育输送必需的物质^[11]。在植物体内,水分和无机盐则主要通过木质部从根部运输到地上部分的组织,而光合产物和大分子通过植物韧皮部从源器官运输到库组织。韧皮部也是植物体内传递移动信号的高速公路^[12]。被子植物的韧皮部由筛管、伴胞、筛分子韧皮纤维和韧皮薄壁细胞组成。利用高通量测序技术对韧皮部汁液中的 RNA 分子进行检测,检测到很多主要的内源性 RNA 分子,包括 mRNAs 和非编码小 RNA,如 siRNAs、miRNAs 和 rRNAs 等^[13]。植物中可长距离移动的小 RNA 分子在基因沉默、资源分配以及叶片发育中都发挥着重要的调控作用。植物的小 RNA 作为传递信号的功能分子,可以通过胞间连丝运输到相邻细胞或通过韧皮部运输到远处的组织中发挥功

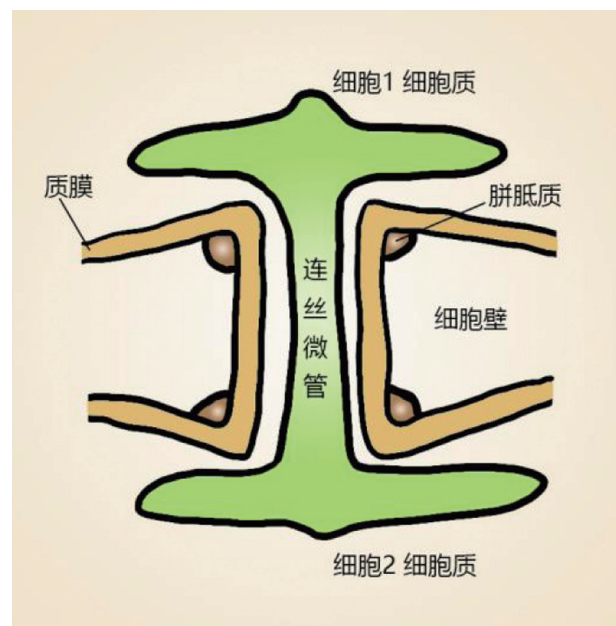


图1 胞间连丝结构图

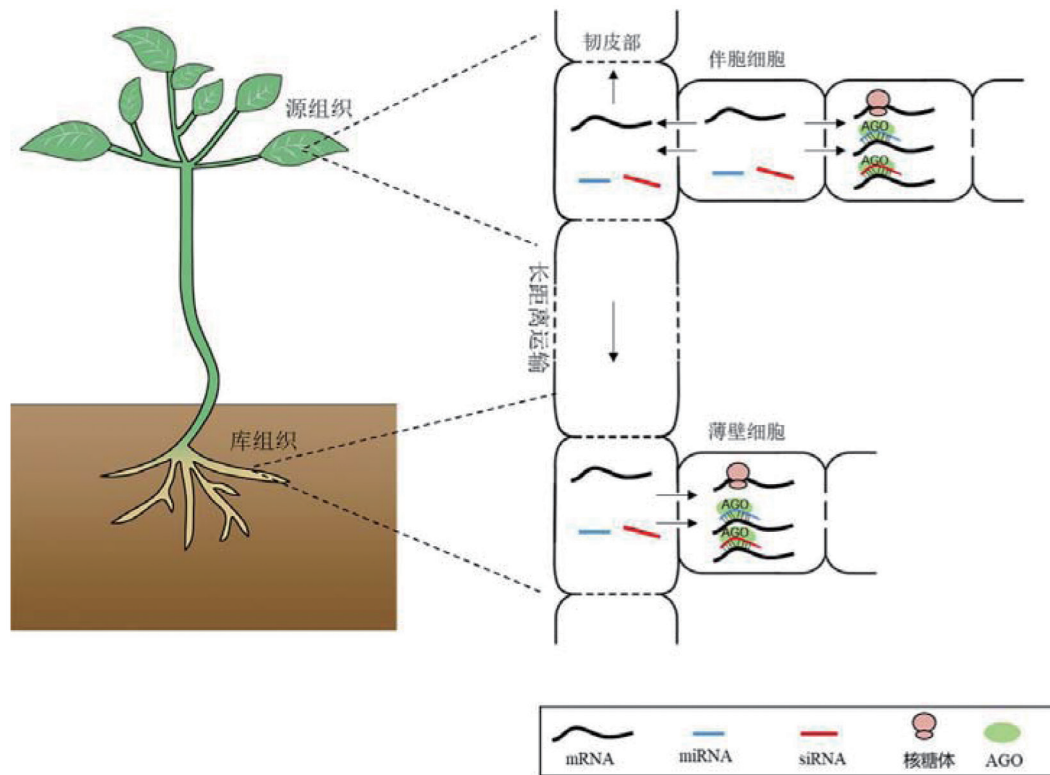


图2 RNA和sRNA在植物体内长距离运输和细胞间运输的网络图

能,体现了小RNA分子的非细胞自主性沉默功能。对于拟南芥等这种难于获取韧皮部汁液的植物,可以通过嫁接技术检测RNA分子在韧皮部中的移动,从而研究RNA分子的长距离运输对调控植物生长发育的作用(图2)。嫁接是将来自不同植物的两个或多个活组织连接成一株植物。植物嫁接作为一种常规的无性繁殖手段,已经广泛运用于果树栽培、植物育种等众多领域。在植物科学领域,嫁接也是一种重要的研究手段。利用嫁接,科学家们能够研究植物体内物质的运输、信号的转导等,嫁接已经被证明是研究韧皮部中小RNA长距离运动的有效工具^[4]。

2 植物体内可移动的RNA

在植物中,mRNA、miRNA、siRNA、rRNA和tRNA均在它们合成的细胞之外被发现,说明RNA在植物体内是可以移动的。研究表明,mRNA和小RNA可以分别通过植物维管束的韧皮部和胞间连丝进行长距离和短距离运输(图2)。在此,本文将分别对可移动的mRNA和小RNA进行描述。

2.1 可移动的mRNA

利用高通量测序技术对韧皮部汁液的测序表

明,mRNAs可能通过韧皮部流向远处的组织中,如南瓜韧皮部汁液含有大量mRNAs^[14]。研究人员将转基因植物和突变体植物进行嫁接以研究mRNAs在韧皮部中运输的机制,发现mRNA的长距离运输似乎不是随机的。通过对拟南芥嫁接植株中发现的PolyA-RNAs进行生物信息学分析,发现TLSs(tRNA-like structures)基序可以触发mRNAs的移动。因此,TLSs基序对于mRNAs的长距离运输是必要的^[15-17]。

胞间连丝是植物中在相邻细胞之间建立胞质连续性的胞间细胞器。玉米显微注射实验研究表明,胞间连丝能促进植物转录因子*KN1*(KNOT-TED1)的细胞间转运,Lucas等^[18]首次揭示了植物mRNA可以通过胞间连丝在细胞之间移动。他们将荧光标记的*KN1*mRNA和*KN1*蛋白一起注入烟草叶肉细胞,观察到荧光探针从注射细胞扩散到相邻细胞,表明*KN1*蛋白能协助自身的*KN1*mRNA在细胞之间进行运输。*KN1*是第一个在植物中被发现的细胞间移动的转录因子,也是第一个被报道的具有非细胞自主性质的分子。mRNA分子的非细胞自主性质表明它们可以通过在细胞之间移动,从而在其起源的细胞之外发挥作用。在随后的研究中发现,*KN1*

在细胞之间的转运对植物苗端形态发生起到了非常重要的调控作用。蔗糖是高等植物光合作用的主要产物,蔗糖在植物体内从源(成熟叶片)到库(异养组织)的运输对植物是否能满足其生长发育的能量需要起到了关键的作用。蔗糖转运蛋白 SUT1 是韧皮部的“装载”和同化产物长距离运输所必需的。Kuhn 等^[19]应用免疫定位的方法对 *SUT1* mRNA 进行定位研究,发现 *SUT1* mRNA 在伴胞细胞中合成,但 *SUT1* mRNA 主要存在于筛管中。这项研究为 mRNA 通过胞间连丝从伴胞细胞移动到相邻的筛管细胞这一猜想提供了证据。

拟南芥是一种兼性长日照植物,植物开花时间受到多种环境因子及其自身节律的调控。其中, *Flowering locus T (FT)* 基因是光周期诱导开花途径中一个重要的因子。2019年,德国 Franziska Turck 课题组利用靶向 DNA 甲基化技术鉴定到了一个新的增强子 *Block E*。实验表明 *Block C* 和 *E* 可以作为附加的转录增强子,与 *FT* 基因的启动子区域一起控制叶韧皮部 *FT* 基因响应光周期时的表达^[20]。此外,2020年,Liu 等^[21]发现,植物可以感知周围环境温度变化并通过调控 FT 蛋白从伴胞向筛管的运输,从而影响 FT 长距离运输到茎顶端分生组织。这项研究表明,通过调控 FT 基因的表达和蛋白运输的双重调控来调控开花时间,能防止植物在低温环境下过早开花,从而确保植物在最有利的环境条件下实现物种的繁衍。与拟南芥开花调控类似,马铃薯中也存在一系列与 *FT* 一样在韧皮部中进行长距离运输的基因,从而影响块茎的形成。实验表明,编码 *POT1* 的 mRNA 可以作为移动信号参与马铃薯块茎的形成^[22-23]。Banerjee 等^[23]也证实了 *StBEL5* 通过韧皮部运输到达匍匐茎顶端诱导块茎形成。马铃薯块茎形成是一个复杂的调控过程,阐明与这一运动相关的生理作用是具有挑战性的,但仍是未来研究的重要任务。研究学者通过大量嫁接实验发现 mRNA 可以在拟南芥^[24]、水稻、大麦、南瓜、番茄、西瓜和马铃薯^[22]等不同植物之间移动。对嫁接植株的不同组织进行 RNA 高通量测序,发现了大量的可运输的 mRNA。通过拟南芥和烟草的异源嫁接实验发现,138 个 mRNAs 从拟南芥移动至烟草^[25]。而在矿物质缺乏的情况下,植物响应而产生的可移动 mRNA 也具有重要的研究意义^[26-27],如烟草和番茄的异源嫁接实验发现多个远距离移动的 mRNA 与低矿质水平有关^[28-30]。此外,研究者报道将拟南芥不同生态型的地上部分 (shoot) 和根 (root) 嫁接

后,发现了 2 006 个移动的 mRNA^[31]。将两个大豆品种 (*Peking* 和 *Williams*) 异种嫁接后,在大豆中鉴定了 4 552 个产生可移动 RNA 的基因^[32]。移动的 mRNA 不仅在拟南芥中被发现,在作物,如葡萄和黄瓜中也分别被发现有 3 333 和 3 546 个^[33-34]。这些发现表明, mRNAs 的长距离运动是一个复杂的过程,阐明与这一运动相关的生理作用是具有挑战性的,但仍是未来研究的重点^[35]。

2.2 可移动的小分子 RNA

小 RNA 是长度在 21~24 nt 的非编码小分子 RNA,在动植物中参与基因表达的转录后调控。植物中的小 RNA 根据其生物发生的不同以及分子特征分为两大类: miRNA 和 siRNA。小 RNA 在植物中的长距离扩散和局部扩散的区别在于,前者需要 RNA 依赖的 RNA 聚合酶,而后者不需要。在短距离运输中,由于没有 RDR6 (RNA 依赖的 RNA 聚合酶 6) 的扩增,所以只限于通过胞间连丝扩散至周围的 10~15 层细胞。和长距离运输一样,短距离局部 RNA 沉默对植物防御外来病毒的入侵起着很重要的作用^[36]。Dunoye 等^[37]研究证明,由 DCL4 切割产生的 21-nt siRNA 复合体可以在细胞间运动。NRPD1a、RDR2 和 CLASSY1 (CLSY1) 是 siRNA 运动中必要的蛋白质^[38]。植物 miRNA (如 miR399) 信号通过维管束形成一个沉默复合体,在植物细胞的长距离范围内起到沉默作用^[39-40]。在短距离范围内, RNA 可以通过细胞间运输从而在根 (miR165/6)^[12] 或者叶片 (miR390)^[41] 中移动。

2.2.1 可移动的 siRNA

siRNAs 由单链 RNA 经 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RDRs) 变成 dsRNA,并进一步被 Dicer Like (DCL) 酶切割形成。在拟南芥中,这些 dsRNA 主要被 DCL2、DCL3 和 DCL4 切割分别产生 21、22 和 24 nt 的 siRNA, siRNA 产生之后选择不同的 AGO 蛋白 (AGO1、AGO2、AGO3、AGO4、AGO6 和 AGO9) 形成 RISC 复合体,进而负调控基因的表达。

基因沉默远距离传播的第一个证据是通过嫁接实验获得的,通过将硝酸还原酶 (NIA) 表达被沉默的转基因烟草植物嫁接到表达相应转基因的非沉默植物中,结果在非沉默植物中检测到了硝酸还原酶沉默诱导的表型,从植物底部的一片叶子传播到了所有的上部叶子。这种传播与内源性 *NIA* mRNA 序列匹配的 siRNA 分子的存在有关^[42]。siRNAs 有助于系统沉默信号的另一证据是将 siRNA 生物发生缺陷的 *dcl2 dcl3 dcl4* 三突变体的根部与野生型拟南

芥的芽进行嫁接, 结果在 *dcl2 dcl3 dcl4* 三突变体的根组织中检测到了转基因衍生的 siRNA^[43]。该实验表明 siRNAs 可通过嫁接从茎向根转移。上述这些例子均表明 siRNA 可以通过维管组织进行长距离运输。

ta-siRNA 又名反式作用小干扰 RNA, 是相位 siRNA (phased siRNA) 的一种, 可以反式调节靶基因。ta-siRNA 广泛存在于各类植物的组织中, 在物种进化、植物生长发育以及响应生物和非生物胁迫中都发挥着重要的作用。ta-siRNAs 是由 Pol II RNA 聚合酶对 *TAS* 基因进行转录, 然后特定 miRNA 对 *TAS* 初级转录本上的靶位点进行剪切 (miR173-*TAS1/2*、miR390-*TAS3*、miR828-*TAS4*), 切割后的目标 mRNA 继而被 RDR6 复制形成双链 RNA (dsRNA)。双链 RNA 被 DCL4 剪切成一系列首尾相连, 具有一定相位的 21 nt 的 RNA 片段, 即 ta-siRNA^[44]。植物的 siRNA 已经被证明在抗病毒防御、细胞信号传递和基因表达调控等方面起作用, 也可能介导跨代的表观遗传。与 mRNA 类似, ta-siRNA 也可以在细胞间局部移动和通过韧皮部进行长距离移动。一个最能证明这一观点的例子就是 tasiRNA-*ARFs* 在细胞间的转运。tasiRNA-*ARF* 是由 miR390-AGO7 复合体对 *TAS3* 转录本进行切割, 切割后的转录本被复制成双链, 并加工成 21 nt 的 siRNA, 再靶向作用于生长素因子 ARF 基因。tasiRNA-*ARF* 是第一个被证明在植物生长发育中作为移动指示信号的小 RNA。TAS3A 和 AGO7 在拟南芥以及 miR390 在玉米中的定位表达发现, tasiR-*ARF* 的生物发生部位是叶原基背面最外侧的两层细胞^[41, 45]。然而, 成熟的 tasiR-*ARF* 从这个确定的生物发生来源通过胞间连丝向叶片腹面移动, 形成浓度梯度, 并在叶片腹面抑制 *ARF3* 和 *ARF4* 的表达^[46-47]。缺乏 tasiR-*ARFs* 的植物发育出背部特征减少或没有背部特征的叶片, 这与 ta-siRNA 作为叶片腹面细胞命运的阻遏因子是一致的^[48]。

2018 年, DCL2 依赖的移动沉默遗传网络及其潜在的生物学相关性, 以及 22-nt siRNA 作为非细胞自主沉默的移动信号在拟南芥和本氏烟草中的应用这一新证据, 为关于 siRNA 迁移率的讨论开创了解开遗传成分和小 RNA 信号分子的一个新趋势^[49]。

移动的 24-nt siRNA 在生殖细胞中也发挥重要的表观遗传效应, 如由于转座子的重新激活, 在花粉的营养核细胞中产生了由高水平的 DCL3 切割产生的 siRNAs。相反, 在花粉精细胞中具有沉默的

转座元件^[50], 并可能受益于 DCL3 剪切的 siRNAs 的运动, 以启动或加强后代转座子沉默。植物 siRNA 可以在细胞之间传递, 也可以通过维管系统进行长距离运输。然而, 目前有关 siRNA 进入生殖细胞的研究一直饱受争议^[51]。植物的雄配子体即花粉, 由生殖细胞和营养核细胞形成; 雌配子体的胚珠由助细胞、中央细胞和卵细胞组成。在模式植物拟南芥的花粉中, 转座元件 (TES) 在伴随的营养核中被重新激活, 导致其转录后降解为 siRNAs。这些 siRNAs 在细胞间运动, 从而加强精子中的 TES 沉默^[52]。Martínez 等^[51]表明, TE 产生的 siRNAs 的作用是非自主的, 可抑制生殖细胞中的转座子 (TE) 活性, 并可能抑制下一代的 TE 活性。除此之外, 在被子植物生殖发育过程中, 雄性生殖细胞会经历 DNA 甲基化重编程。2021 年, 冯小琦课题组系统地揭示了在拟南芥雄性生殖发育过程中, siRNA 可以从绒毡层细胞移动至减数分裂细胞来介导 DNA 甲基化。这种现象不仅发生在转座子外, 也会出现在基因上, 从而调控靶标基因表达, 影响减数分裂过程^[53]。拟南芥中央细胞是卵子的伴生细胞。Ibarra 等^[54]证实, 伴生细胞中的去甲基化加强了植物配子中转座子的甲基化, 并可能有助于转座子元件在世代间的稳定沉默。类似于植物细胞, 在动物中也观察到了相似的转座元件沉默的情况^[55]。从上述这些证据来看, 24-nt siRNAs 在发育过程中可以作为移动的指示信号。

2.2.2 可移动的 miRNA

miRNAs (microRNAs) 是一类广泛存在于动植物体内的约 20~24 个核苷酸长的内源性非编码 RNA^[49, 56]。miRNAs 由 *MicroRNA (MIR)* 基因编码, miRNAs 的生物合成由 RNA 聚合酶 (Pol II) 转录成含有发夹结构的 miRNAs 初级转录产物 (pri-miRNAs)。Pri-miRNAs 被 Dicer 核酸酶家族 Dicer-like 1 (DCL1) 在其茎环结构的根部剪切得到 miRNAs 前体 (pre-miRNA), 再经过 DCL1 剪切加工成成熟的 miRNAs, 其序列具有高度的保守性, 然后成熟的 miRNAs 装载到 Argonaute (AGO) 蛋白家族中形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC)^[57-58]。miRNAs 通过与靶基因的 mRNA 序列互补, 抑制靶基因 mRNA 翻译或是促进 mRNA 降解来调控基因表达^[59]。第一个被发现的 miRNA 是 1993 年在秀丽隐杆线虫中鉴定出的 *lin-4*。在随后几十年的研究中, 多个研究小组已经在植物、动物甚至人类中鉴定出数以万计的 miRNAs, 并且揭示了 miRNA 在众多物种的生

长发育过程中起到的调节作用。

目前,对植物 miRNA 的研究多数集中在生物学功能和作用机制、逆境胁迫等方面。miRNA 作为信息分子可以通过韧皮部进行长距离运输,也可以通过胞间连丝在细胞间进行移动。对韧皮部汁液丰富的植物进行汁液小 RNA 高通量测序发现,汁液中存在 miRNA,表明 miRNA 可能在长距离调控基因表达中发挥信号作用。例如,在油菜、葫芦、羽扇豆以及南瓜等植物的韧皮部汁液中发现了大量与胁迫响应相关的 miRNAs^[60-61]。通过对南瓜韧皮部汁液进行生化分析以及嫁接实验,鉴定出了南瓜韧皮部一种小 RNA 结合蛋白(CmPSRP1)。显微注射实验表明,CmPSRP1 可以介导小 RNA 分子在细胞间的转运,该小 RNA 结合蛋白可能参与远距离传递^[60]。在拟南芥中使用一个基于人工 miRNA 系统(amiR-SUL)的株系筛选到 HASTY 蛋白可以调控 miRNA 在细胞间短距离运输和通过维管的长距离运输^[61]。此外,在不同的胁迫条件下,与硫胁迫相关的 miR395、与铜胁迫相关的 miR398 以及与磷胁迫相关的 miR399 的水平均增加,证明这 3 种 miRNA 在不同的饥饿条件下,对营养剥夺有反应^[39-40,60]。无机磷(PI)是植物生长所必需的矿物质营养之一。矿物质养分由根系从土壤中吸收,然后分配到地上组织。平衡和协调地上组织的需求和地下部分的供应对维持植物的正常生长发育是必不可少的。因此,地上和地下需要一种长距离信号来进行通讯。当矿物质营养浓度过高或者过低时,会触发长距离信号通路进行调节^[62-63]。以磷胁迫相关的 miR399 研究为例^[40],miR399 是首个被发现的通过韧皮部运输的,作为系统性信号调节磷元素的吸收和转运的远程信号。miR399 通过调节编码泛素结合酶的基因 *PHO2* 的表达来调控无机磷的动态平衡^[64]。通过在拟南芥和烟草中的嫁接研究发现,miR399 可以从地上部分长距离移动来调节地下部分根中 *PHO2* 的表达^[64]。随后,该研究小组验证了 miR399 前体和成熟的 miR399 在 *pho1* 突变体(*PHO1* 编码一个新的转运蛋白^[65],可能参与磷向木质部的转运)的地上部分和根系中表达的差异,而磷饥饿诱导条件下的观察结果进一步支持了这一观点。此外,该研究小组还发现 miRNA 在长距离移动中是有选择性的,并且以 miRNA 单链的形式移动。例如在缺磷条件下,对磷响应的 miR827 和 miR2111a 可以在地上部分和根之间移动,而它们各自的 miRNA* (pre-miRNA 产生的两个 miRNAs 中低表

达丰度的 miRNA 称之为 miRNA*) 不能移动且在根部局部积累,这些 miRNA* 为在磷饥饿期间可能以新的途径移动并发挥功能提供了可能性^[66]。此外,在其他作物,如马铃薯中也存在潜在的韧皮部可移动的调节块茎形成的 miR156 和 miR172^[67-68]。这些均证明了 miRNA 可以通过韧皮部进行远距离运输并在植物的生长过程中发挥重要的功能。

与 siRNA 相比,miRNA 被认为是相对不活跃的小 RNA^[69]。可移动的 miRNA 在植物的生长发育过程中充当局部位置信号,并协调整株植物的胁迫响应^[70]。尽管它至关重要,但是 miRNA 在细胞间移动的调控机制仍知之甚少。在过去的 20 年里,许多重要的信号分子已经被鉴定出来,它们通过在细胞之间移动来调控植物的发育。关于 miRNA 在细胞间移动的证据很少。随着实验技术的发展,应用原位杂交技术或者荧光标记技术可以直接检测到 miRNA 的短距离运输。miR165/166 是第一个被报道的具有非细胞自主性的 miRNA。2010 年的一项研究发现,miR165/166 在根部也是可移动的^[71]。植物的根部系统层次清晰,沿着放射轴,中柱周围形成表皮、皮层和内胚层,非常适合于研究组织模式中的细胞间通讯。在研究拟南芥根发育过程中,科学家们发现,miR165/166 的靶标基因 *PHB* 在不同细胞层次之间呈现浓度梯度。由中柱细胞产生的转录因子 SHR (SHOOT-ROOT) 通过胞间连丝移动到内皮层细胞^[72]。SHR 与 SCR (SCARCROW) 共同激活 *MIR165a* 和 *MIR166b*,内皮层产生 miR165/166^[71]。*MIR165a* 和 *MIR166b* 的产物是成熟形式的 miR165 和 miR166,miR165/166 通过胞间连丝扩散到周围组织以控制非径向对称的维管束模式和转运扩增细胞的增殖。此外,内皮层来源的 miR165/166 具有非细胞自主性,能抑制中柱中一类被称为 HD-ZIPIII 转录因子的靶标基因(主要是 *PHB*)^[73],由此导致靶标基因的 mRNA 在中柱内外侧浓度不同,从而决定木质部细胞的类型。在中柱内侧细胞中 *PHB* mRNA 丰度最高,促进次生木质部的形成,从里往外丰度逐渐降低,到内皮层细胞完全降解,因此,外侧的细胞发育成初生木质部。miR165/166 是几十年来研究最为广泛的 miRNAs,已经被证明参与植物根部顶端分生组织和茎端分生组织的维持。2015 年,研究人员证实 AGO10 通过 miR165/166 介导非细胞自主性信号^[74]。AGO1 的活性是包括 miR165/166 在内的大多数 miRNAs 发挥功能的必要条件,AGO1 失活会严重损害植物发育。AGO10

又称 PINHEAD 和 ZWILLE, 是与 AGO1 关系最密切的旁系同源物, 在茎顶端分生组织 (SAM) 发育中起着至关重要的作用。AGO10-miR165/166 活性的时空调控影响 SAM 的发育。通过嵌合互补分析, 该研究小组发现 AGO10 通过时空调控 miR165/166 从发育胚胎到成熟胚胎顶端和中心区域, 最终到子叶和新叶原基整个近轴面和脉管系统的活性, 确保了正确的 SAM 编程^[74]。2018 年, 美国冷泉港实验室通过在特定组织或细胞中表达人工 miRGFP 来靶向各特异表达的 GFP, 然后观察荧光信号的有无来判断 miRNA 是否移动, 结果确认了 miRNA 在细胞间的移动是受发育调节的, 且不是通过胞间连丝的特性来控制的^[70]。该研究结果证明, miRNA 的运动是通过细胞-细胞界面极化的门控机制精确调节的, 这导致 miRNA 迁移是定向运动, 并限制长距离的运输^[70]。研究发现, miRNA 广泛参与植物叶片发育和极性建立过程。植物的生长通常是从位于地上部分和地下部分的两个顶端分生组织开始, 其中地下部分来自于根尖分生组织。先前已经证实 miR165/166 在茎尖分生组织中的迁移性。在玉米和拟南芥中, miR166 在叶原基腹面表皮细胞产生并通过胞间连丝向背部扩散, 成熟的 miR166 以与 HD-ZIPIII 靶基因互补的方式积累在叶原基背面^[75-76]。miR166 和 tasiR-ARF 分别在叶片腹面以浓度梯度效应通过胞间连丝扩散, 并与 HD-ZIPIII 靶基因以及 ARF3 和 ARF4 相互作用调控叶片的极性发育。类似地, miR394 被证明是一种由表面细胞层即原胚层产生的短距离移动信号^[77]。这种 miRNA 是确保分生组织的顶层细胞在经过频繁的分裂后仍保持干细胞特性所必需的。miR394 可以从生物发生部位通过胞间连丝扩散到茎尖分生组织端部, 通过抑制 F-box 蛋白的表达赋予远端分生组织干细胞能力^[77]。有趣的是, miR394 和它的靶标基因在叶片极性建立过程中也发挥了作用。有科学家就提出了一种可能性, 即 miR394 可能是参与叶片中的腹面和背部模式调控的第三个移动的小 RNA。以上这些研究结果均表明, 植物利用具有非细胞自主性的 miRNA 通过胞间连丝在细胞间进行短距离运输, 以此来调控植物生长发育。

小 RNA 在细胞间的移动对小 RNA 在叶片中浓度梯度的形成至关重要。小 RNA 可移动的能力对植物细胞间的通讯是必不可少的。目前小 RNA 大多都是利用胞间连丝这一通道移动到相邻细胞, 但是, 这种移动是被动扩散的还是主动扩散的至今

还不清楚。

RNA 的长距离移动对于植物生长和环境响应是非常重要的。但是, 具体哪些 RNA 会在相距甚远的组织之间迁移, 以及其相对量级和功能重要性仍然缺少基因组层面的诠释。有研究团队利用大豆与菜豆异源及自嫁接植株作为实验材料, 发现移动到目标组织中的 mRNAs 仅占该目标组织总 mRNAs 的极少一部分^[78]。通过 small RNA-seq 分析、降解组测序和 5'-RACE 实验等技术发现了豆类作物小 RNA 单向运输的现象, 移动的小 RNA 表现为由茎端到根部的单向运输; 多数小 RNA 表现出不能由根部产生, 但在根部高丰度积累。该研究揭示了相比于 mRNA 的移动, 小 RNA 的移动受到更加严格的调控, 表明可移动的小 RNA 和 mRNA 在功能和运输机制上有很大的不同, 并且在功能上可能小 RNA 要比 mRNA 的移动更加重要^[78]。

2.2.3 AGO1 蛋白决定 siRNA 的运动模式

siRNA 可以和不同的 AGO 蛋白结合形成 RISC 复合体来调控基因表达。不同的细胞和组织中所含的 AGO 蛋白的种类和数量不同。2020 年, Voynet 实验室发现细胞中 AGO 蛋白的量决定了 siRNA 的运输^[79]。如果一个细胞中的 AGO 蛋白过剩, 和 AGO 蛋白匹配形成 RISC 的 siRNA 就会基本上停止运动, 从而停留在细胞内对靶基因行使功能。如果一个细胞内基本不含 AGO 蛋白, 甚至没有任何 AGO 蛋白, 那么绝大多数的 siRNA 将离开该细胞并运输到距离更远的细胞。如果一个细胞只包含一个特定的 AGO 蛋白, 那么只有和该特定的 AGO 蛋白相匹配的 siRNA 才会被消耗, 不结合的 siRNA 将会以双链的形式在植物细胞间进行穿梭。此外, 更有趣的是, 一些 AGO 蛋白是受条件和环境诱导的, 在特定诱导条件下, AGO 蛋白被激活, 大量积累并结合更多的 siRNA。只要 siRNA 分子作为自由的双链存在于细胞中, 那么它就是移动的, 因为它不能与相匹配的 AGO 蛋白结合。siRNA 只有结合正确的 AGO 蛋白, 才能形成相应的 RISC 复合体, 并行行使功能。他们还发现, siRNA 可以在细胞间进行穿梭, 且是以双链的形式移动^[79]。

3 RNA 运输的生物学功能

南瓜中的韧皮蛋白 CmPp16 可以促进内源 mRNA 的运输^[80]。马铃薯纺锤块茎类病毒 PSTVd 的烟草侵染实验表明, 不同的机制调控 RNA 进出韧皮部^[81]。番茄 PFP-LeT6 的远距离运输被发现可以影

响叶片形态, 并且嫁接实验证明了叶形信号的传递^[82]。随着生物技术的发展以及成熟运用, 人、植物、小鼠等生物中广泛存在的小 RNA 不断被研究、验证, 同时科学家们也在探寻相应小 RNA 的生物学意义。目前, 许多小 RNA (包括 miRNA 和 siRNA) 以及 mRNA 被证实具有非细胞自主性 (表 1)。在这其中, 只有极少数的可移动的 miRNA 被证明具有非细胞自主性, 而这些可移动的 miRNA 对植物的生长发育发挥着重要的作用。例如, 在拟南芥中, miR165 和 miR166 参与茎端分生组织的维持, 并与 tasiR-ARFs 以浓度梯度效应参与叶片极性建立, 在地下部分中还通过胞间连丝进行运动, 从而决定木质部的类型。当外源基因插入引起 RNA 沉默时, 在韧皮部产生的 RNA 信号 (包括 siRNA 和 dsRNA) 能直接诱导基因沉默, 也可以通过维管系统进行长距离运输诱导整株植物产生系统性沉默^[83]。这些不同的证据表明, 移动 RNA 的非细胞自主性可以系统性调控植物的生理活动, 并且在生长发育、逆境胁迫等方面具有重要的生物学意义。

4 影响RNA运输因素的研究

在过去的几十年里已经发现了大量的 RNA 是

可移动的, 但是, 影响 RNA 运输的因素尚不清晰。Calderwood 等^[84]利用 computational diffusionbased 模型研究发现, mRNA 丰度是迁移率的关键决定因素。统计分析还预测, 半衰期更长、长度更短 mRNA 似乎更具迁移性。特定的基序也被发现影响 RNA 的迁移率: 在马铃薯中, 调控块茎形成的转录因子 *StBEL5* 的 UTR 是其长距离运输到根中所必需的, 这表明 *StBEL5* 转录本的运动具有序列特异性的选择机制^[85-86]。此外, 通过对拟南芥^[31]和葡萄嫁接^[33]可移动转录组数据的分析发现, 大量的可移动转录本在编码序列或 UTR 中含有 *TLS* 基序^[17]。上述这些例子可以表明 RNA 丰度、序列、特定的基序是影响迁移率的可能因素。

5 展望

RNA 分子 (包括 RNA 病毒、植物内源 mRNA 和非编码小 RNA) 存在于植物韧皮部筛分子中, 并进行长距离运输, 这是植物界一个突破性的发现。韧皮部液汁内 RNA 分子的长距离运输可作为系统信号分子介导植物生长发育的调控。植物中的 siRNA 和 miRNA 都可以通过维管束或者胞间连丝在细胞间运动。这些短的 21~24 nt 的 RNA 通过在

表1 植物体内代表性的可以运输的RNA

RNA	功能	物种	参考文献
mRNA			
<i>KN1</i>	调控节间和叶片形态	玉米、烟草	[18]
<i>SUT1</i>	蔗糖运输	马铃薯	[19]
<i>Aux/IAA</i>	根部发育	拟南芥	[24]
<i>POTH1</i>	叶片发育	马铃薯	[22-23]
<i>FT</i>	调控开花时间	拟南芥	[20-21]
<i>StBEL5</i>	调节块茎形成	马铃薯	[23]
<i>CmPp16</i>	RNA运输	南瓜	[80]
<i>PFP-T6</i>	叶片发育	番茄	[82]
miRNA			
miR395	硫酸盐平衡	拟南芥	[60]
miR399	磷酸盐平衡	拟南芥	[40, 62-64]
miR156	调节块茎形成	马铃薯	[68]
miR172	调节块茎形成	马铃薯	[67]
miR165/166	根部木质部发育	拟南芥	[72-73]
miR165/166	茎端分生组织的维持	拟南芥	[74]
miR166	叶片的极性发育	玉米、拟南芥	[75-76]
miR394	茎尖分生组织的维持	拟南芥	[77]
siRNA			
tasiRNA-ARF	叶片发育	玉米、拟南芥	[41, 45-47]
<i>NIA</i> mRNA匹配的siRNA	基因沉默的远距离传播	烟草	[42]

细胞间运动, 参与植物生长发育、基因对逆境胁迫的调控。基因组学技术的进步推动了大量移动 RNA 的发现, 进一步强调了移动 RNA 的功能和意义。此外, 其他的 RNA 也被发现可以运输, 如高通量测序在韧皮部的汁液中发现了 rRNA 和 tRNA。测序结果显示, 在油菜和南瓜韧皮部检测到 rRNA (包括 5S、5.8S、18S 和 25S)^[87-88]; 在南瓜韧皮部 RNA 库中, 大量的 tRNA 被检测到^[87]。

在高等植物中, RNA 可以作为移动信号在细胞与细胞之间短距离移动, 也可以通过韧皮部进行长距离运输。但是, 到目前为止, 还是有许多的细节没有研究清楚, 如目前统计分析发现 RNA 的序列和丰度是影响其迁移率的可能因素, 那么移动的 RNA 都有什么特征, 是经过 Dicer 酶切割的次级 RNA 还是小 RNA 前体; ARID1 介导 siRNA 运动以加强雄性生殖系中的异染色质沉默, 还有什么因子可以介导 RNA 运输; 目前发现的 RNA 移动的例子并不是在转录不活跃的组织/细胞之间才发生, 那么 RNA 为什么要采取这种长距离运输; 植物如何控制 RNA 在不同组织和细胞中的积累; 运输到库器官的这些 RNA 又将如何行使功能; 这些移动的 RNA 最终的宿命是什么, 是否也会和那些组织和细胞中不移动的 RNA 一样正常翻译和降解; 成熟的 miRNA 与 AGO1 蛋白形成 RISC, 那么这些移动的小 RNA 分子是游离的小 RNA 分子还是与 AGO 蛋白结合形成的复合物; 是单链的 RNA 还是双链 RNA (dsRNA) 在运动; 运动的小 RNA 在植物中是否保守。这些都是未来需要解决的问题。此外, 2019 年, 的研究表明, 小 RNA 存在于动物的外泌体中^[89], 这表明小 RNA 可能也可以作为移动信号调控动物的生长发育。由于植物和动物的物种差异性, 这还是一个有趣的猜想。总而言之, 研究小 RNA 在植物中作为移动信号的具体分子机制是一个巨大的挑战但也是一个机遇。

[参 考 文 献]

- [1] Otero S, Helariutta Y, Benitez-Alfonso Y. Symplastic communication in organ formation and tissue patterning. *Curr Opin Plant Biol*, 2016, 29: 21-8
- [2] Kitagawa M, Fujita T. A model system for analyzing intercellular communication through plasmodesmata using moss protonemata and leaves. *J Plant Res*, 2015, 128: 63-72
- [3] Reagan BC, Ganusova EE, Fernandez JC, et al. RNA on the move: the plasmodesmata perspective. *Plant Sci*, 2018, 275: 1-10
- [4] Liu L, Chen X. Intercellular and systemic trafficking of RNAs in plants. *Nat Plants*, 2018, 4: 869-78
- [5] Fengshan MA, Peterson CA. Plasmodesmata: dynamic channels for symplastic transport. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43: 441-60
- [6] Ding B, Turgeon R, Parthasarathy MV. Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. *Protoplasma*, 1992, 169: 28-41
- [7] Knox K, Wang PW, Kriechbaumer V, et al. Putting the squeeze on plasmodesmata: a role for reticulons in primary plasmodesmata formation. *Plant Physiol*, 2015, 168: 1563-72
- [8] Knox JP, Benitez-Alfonso Y. Roles and regulation of plant cell walls surrounding plasmodesmata. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 22: 93-100
- [9] Lucas WJ, Ding B, van der Schoot C. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol*, 1993, 125: 435-76
- [10] Lee JY, Cui WE. Non-cell autonomous RNA trafficking and long-distance signaling. *J Plant Biol*, 2009, 52: 10-8
- [11] Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R, et al. The plant vascular system: evolution, development and functions. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55: 294-388
- [12] Saploura E, Kragler F. Mobile transcripts and intercellular communication in plants. *Enzymes*, 2016, 40: 1-29
- [13] Kehr J, Kragler F. Long distance RNA movement. *New Phytol*, 2018, 218: 29-40
- [14] Haywood V, Yu TS, Huang NC, et al. Phloem long-distance trafficking of *GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE* RNA regulates leaf development. *Plant J*, 2005, 42: 49-68
- [15] Guan D, Yan B, Thieme C, et al. PlaMoM: a comprehensive database compiles plant mobile macromolecules. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: D1021-8
- [16] Kragler F. RNA in the phloem: a crisis or a return on investment? *Plant Sci*, 2010, 178: 99-104
- [17] Zhang WN, Thieme CJ, Kollwig G, et al. tRNA-related sequences trigger systemic mRNA transport in plants. *Plant Cell*, 2016, 28: 1237-49
- [18] Lucas WJ, Bouché-Pillon S, Jackson DP, et al. Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science*, 1995, 270: 1980-3
- [19] Kuhn C, Franceschi VR, Schulz A, et al. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science*, 1997, 275: 1298-300
- [20] Zicola J, Liu L, Tanzler P, et al. Targeted DNA methylation represses two enhancers of *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Plants*, 2019, 5: 300-7
- [21] Liu L, Zhang Y, Yu H. Florigen trafficking integrates photoperiod and temperature signals in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62: 1385-98
- [22] Mahajan A, Bhogale S, Kang IH, et al. The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile. *Plant Mol Biol*, 2012, 79: 595-608
- [23] Banerjee AK, Chatterjee M, Yu YY, et al. Dynamics of a

- mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *Plant Cell*, 2006, 18: 3443-57
- [24] Xia C, Zhang C. Long-distance movement of mRNAs in plants. *Plants (Basel)*, 2020, 9: 731
- [25] Notaguchi M, Higashiyama T, Suzuki T. Identification of mRNAs that move over long distances using an RNA-Seq analysis of *Arabidopsis/Nicotiana benthamiana* heterografts. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 311-21
- [26] Medici A, Szponarski W, Dangeville P, et al. Identification of molecular integrators shows that nitrogen actively controls the phosphate starvation response in plants. *Plant Cell*, 2019, 31: 1171-84
- [27] Maeda Y, Konishi M, Kiba T, et al. A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in *Arabidopsis*. *Nature Commun*, 2018, 9: 1376
- [28] Xia C, Huang J, Lan H, et al. Long-distance movement of mineral deficiency-responsive mRNAs in *Nicotiana Benthamiana*/tomato heterografts. *Plants (Basel)*, 2020, 9: 876
- [29] Ota R, Ohkubo Y, Yamashita Y, et al. Shoot-to-root mobile CEPD-like 2 integrates shoot nitrogen status to systemically regulate nitrate uptake in *Arabidopsis*. *Nature Commun*, 2020, 11: 641
- [30] Grillet L, Lan P, Li WF, et al. IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants. *Nat Plants*, 2018, 4: 953-63
- [31] Thieme CJ, Rojas-Triana M, Stecyk E, et al. Endogenous *Arabidopsis* messenger RNAs transported to distant tissues. *Nat Plants*, 2015, 1: 15025
- [32] Zhang C, Qi MF, Zhang XX, et al. Rhizobial infection triggers systemic transport of endogenous RNAs between shoots and roots in soybean. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 1213-26
- [33] Yang YZ, Mao LY, Jittayasothorn Y, et al. Messenger RNA exchange between scions and rootstocks in grafted grapevines. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 251
- [34] Zhang ZL, Zheng Y, Ham BK, et al. Vascular-mediated signalling involved in early phosphate stress response in plants. *Nat Plants*, 2016, 2: 16033
- [35] Xia C, Zheng Y, Huang J, et al. Elucidation of the mechanisms of long-distance mRNA movement in a *Nicotiana benthamiana*/tomato heterograft system. *Plant Physiol*, 2018, 177: 745-58
- [36] Rosas-Diaz T, Zhang D, Fan PF, et al. A virus-targeted plant receptor-like kinase promotes cell-to-cell spread of RNAi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 1388-93
- [37] Dunoyer P, Schott G, Himer C, et al. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, 2010, 328: 912-6
- [38] Kalantidis K, Schumacher HT, Alexiadis T, et al. RNA silencing movement in plants. *Biol Cell*, 2008, 100: 13-26
- [39] Buhtz A, Springer F, Chappell L, et al. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J*, 2008, 53: 739-49
- [40] Pant BD, Buhtz A, Kehr J, et al. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant Jo*, 2008, 53: 731-8
- [41] Chitwood DH, Nogueira FTS, Howell MD, et al. Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev*, 2009, 23: 549-54
- [42] Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, et al. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J*, 1997, 16: 4738-45
- [43] Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, et al. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 2010, 328: 872-5
- [44] Fei QL, Xia R, Meyers BC. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell*, 2013, 25: 2400-15
- [45] Nogueira FTS, Chitwood DH, Madi S, et al. Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000320
- [46] 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
- [47] Yifhar T, Pekker I, Peled D, et al. Failure of the tomato *trans*-acting short interfering RNA program to regulate *AUXIN RESPONSE FACTOR3* and *ARF4* underlies the wiry leaf syndrome. *Plant Cell*, 2012, 24: 3575-89
- [48] Zhang X, Lai TF, Zhang PC, et al. Mini review: revisiting mobile RNA silencing in plants. *Plant Sci*, 2019, 278: 113-7
- [49] Yu Y, Jia TR, Chen XM. The “how” and “where” of plant microRNAs. *New Phytol*, 2017, 216: 1002-17
- [50] Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, et al. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*, 2009, 136: 461-72
- [51] Martinez G, Panda K, Kohler C, et al. Silencing in sperm cells is directed by RNA movement from the surrounding nurse cell. *Nat Plants*, 2016, 2: 16030
- [52] Wu WY, Li L, Zhao Y, et al. Heterochromatic silencing is reinforced by ARID1-mediated small RNA movement in *Arabidopsis* pollen. *New Phytol*, 2021, 229: 3269-80
- [53] Long J, Walker J, She W, et al. Nurse cell-derived small RNAs define paternal epigenetic inheritance in *Arabidopsis*. *Science*, 2021, 373: eabh0556
- [54] Ibarra CA, Feng XQ, Schoft VK, et al. Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in Gametes. *Science*, 2012, 337: 1360-4
- [55] Malone CD, Hannon GJ. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*, 2009, 136: 656-68
- [56] Song XW, Li Y, Cao XF, et al. MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions. *Ann Rev Plant Biol*, 2019, 70: 489-525
- [57] Derrien B, Clavel M, Baumberger N, et al. A suppressor screen for AGO1 degradation by the viral F-Box P0 protein uncovers a role for AGO DUF1785 in sRNA duplex unwinding. *Plant Cell*, 2018, 30(6): 1353-74
- [58] Brosnan CA, Sarazin A, Lim P, et al. Genome-scale, single-cell-type resolution of microRNA activities within a whole plant organ. *EMBO J*, 2019, 38: e100754
- [59] Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, et al. Deci-

- phering miRNAs' action through miRNA editing. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 6249
- [60] Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, et al. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, 2004, 16: 1979-2000
- [61] Brioudes F, Jay F, Sarazin A, et al. HASTY, the *Arabidopsis* EXPORTIN5 ortholog, regulates cell-to-cell and vascular microRNA movement. *EMBO J*, 2021, 40: e107455
- [62] Schachtman DP, Shin R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 47-69
- [63] Atkins CA, Smith PMC. Translocation in legumes: assimilates, nutrients, and signaling molecules. *Plant Physiol*, 2007, 144: 550-61
- [64] Lin SI, Chiang SF, Lin WY, et al. Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol*, 2008, 147: 732-46
- [65] Hamburger D, Rezzonico E, Petetot JMC, et al. Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell*, 2002, 14: 889-902
- [66] Huen AK, Rodriguez-Medina C, Ho AYY, et al. Long-distance movement of phosphate starvation-responsive microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Biol*, 2017, 19: 643-9
- [67] Martin A, Adam H, Diaz-Mendoza M, et al. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development*, 2009, 136: 2873-81
- [68] Bhogale S, Mahajan AS, Natarajan B, et al. MicroRNA156: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. andigena. *Plant Physiol*, 2014, 164: 1011-27
- [69] Alvarez JP, Pekker I, Goldshmidt A, et al. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell*, 2006, 18: 1134-51
- [70] Skopelitis DS, Hill K, Klesen S, et al. Gating of miRNA movement at defined cell-cell interfaces governs their impact as positional signals. *Nature Commun*, 2018, 9: 3107
- [71] Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, et al. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 2010, 465: 316-21
- [72] Nakajima K, Sena G, Nawy T, et al. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*, 2001, 413: 307-11
- [73] Miyashima S, Koi S, Hashimoto T, et al. Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Development*, 2011, 138: 2303-2313
- [74] Zhou YY, Honda M, Zhu HL, et al. Spatiotemporal sequestration of miR165/166 by *Arabidopsis* Argonaute10 promotes shoot apical meristem maintenance. *Cell Reps*, 2015, 10: 1819-27
- [75] Kidner CA, Martienssen RA. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, 2004, 428: 81-4
- [76] Husbands AY, Chitwood DH, Plavskin Y, et al. Signals and prepatterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes Dev*, 2009, 23: 1986-97
- [77] Knauer S, Holt AL, Rubio-Somoza I, et al. A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Dev Cell*, 2013, 24: 125-32
- [78] Li S, Wang XT, Xu WY, et al. Unidirectional movement of small RNAs from shoots to roots in interspecific heterografts. *Nat Plants*, 2021, 7: 50-9
- [79] Devers EA, Brosnan CA, Sarazin A, et al. Movement and differential consumption of short interfering RNA duplexes underlie mobile RNA interference. *Nat Plants*, 2020, 6: 789-99
- [80] Crawford KM, Zambryski PC. Phloem transport: are you chaperoned? *Curr Biol*, 1999, 9: R281-5
- [81] Zhu Y, Qi Y, Xun Y, et al. Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiol*, 2002, 130: 138-46
- [82] Jackson D. The long and the short of it: signaling development through plasmodesmata. *Plant Cell*, 2001, 13: 2569-72
- [83] Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, et al. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J*, 2003, 22: 4523-33
- [84] Calderwood A, Kopriva S, Morris RJ. Transcript abundance explains mRNA mobility data in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2016, 28: 610-5
- [85] Lin T, Sharma P, Gonzalez DH, et al. The impact of the long-distance transport of a BEL1-like messenger RNA on development. *Plant Physiol*, 2013, 161: 760-72
- [86] Banerjee AK, Lin T, Hannapel DJ. Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism. *Plant Physiol*, 2009, 151: 1831-43
- [87] Zhang SD, Sun L, Kragler F. The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiol*, 2009, 150: 378-87
- [88] Ostendorp A, Pahlow S, Krussel L, et al. Functional analysis of *Brassica napus* phloem protein and ribonucleoprotein complexes. *New Phytol*, 2017, 214: 1188-97
- [89] Maugeri M, Nawaz M, Papadimitriou A, et al. Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nat Commun*, 2019, 10: 4333