



文章编号: 1000-4025(2013)11-2153-06

草莓 miR390 靶基因 *TAS3* 的克隆及表达分析

李 贺^{1,2}, 毛健鑫², 戚华彩², 张志宏², 纪明山^{1*}

(1 沈阳农业大学 植物保护学院, 沈阳 110866; 2 沈阳农业大学 园艺学院, 沈阳 110866)

摘要:以栽培草莓品种‘全明星’为试材,通过 3'-和 5'-RACE 技术克隆出 miR390 靶基因 *TAS3* 的 cDNA 全长,命名为 *FaTAS3*。序列分析发现:草莓 *TAS3* 基因的 cDNA 全长为 742 bp,含有 16 个碱基的 Poly A 尾巴及 2 个高度保守的 ta-siRNA 产生位点和 1 个 miR390 靶位点;该基因 DNA 全长为 824 bp,5' 端 130 bp 处有一个 98 bp 的内含子序列。生物信息学软件预测显示,草莓 *TAS3* 基因的启动子除具有 TATA/CAAT-box 外,还含有 G-box、C-box 等特异作用元件。实时定量 RT-PCR 结果表明,草莓 miR390 与靶基因 *TAS3* 间的表达模式与拟南芥中的表达模式相同,推测草莓 *TAS3* 基因的生物合成也受 miR390 的指导。

关键词:草莓; *TAS3* 基因; miR390; 实时定量 RT-PCR

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A

Cloning and Expression Analysis of miR390-Targeted *TAS3* Gene from Strawberry

LI He^{1,2}, MAO Jianxin², QI Huacai², ZHANG Zhihong², JI Mingshan^{1*}

(1 Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2 College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The miR390-targeted *TAS3* gene named *FaTAS3* was isolated from strawberry (*Fragaria ananassa* ‘Allstar’) with the methods of PCR and RACE. Sequence analysis showed that the cDNA was consisted of a 742 base pair with a 16 bp poly A and highly conserved domains, two ta-siRNA-generating regions and one miR390 complementary site. The full-length DNA of *FaTAS3* is 824 bp with an intron sequence of 98 bp at the 130 bp from the 5' end of *TAS3* transcript. In addition to the TATA/CAAT-box, its promoter predicted by bioinformatic analyses also contained some specific regulatory elements such as G-box, C-box and etc. The results of real time RT-PCR showed that the expression pattern of miR390 and its targeted *TAS3* gene in strawberry is a similar manner to *Arabidopsis*. So we deduce that the biological formation of strawberry *TAS3* gene was also cleaved by miR390.

Key words: strawberry; *TAS3* gene; miR390; real time RT-PCR

内源性非蛋白质编码小 RNA (small non-protein-coding RNA) 广泛存在于生物体中,通过对靶标 mRNA 进行切割或抑制其翻译进而在转录后水平上调节基因表达^[1]。已知的小 RNA 主要分为两大类,一类是 microRNA (miRNA)^[2],另一类是小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)^[3-4]。植

物内源 siRNA 是一类由长的双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 产生的小分子 RNA,其来源包括转录本、转基因的反向重复序列以及转座子等^[5]。到目前为止,植物 siRNA 主要包括:反式作用小 RNA (trans-acting siRNA, ta-siRNA)、天然反义小 RNA (natural antisense transcript-derived

收稿日期: 2013-09-11; 修改稿收到日期: 2013-11-01

基金项目: 国家自然科学基金 (31101524); 中国博士后科学基金 (20100481212, 2012T50270); 辽宁省创新团队项目 (LT2010094)

作者简介: 李 贺 (1978-), 女, 博士, 副教授, 主要从事果树分子生物学研究。E-mail: lihe1978721@163.com

* 通信作者: 纪明山, 博士, 教授, 主要从事生物农药及农药毒理学研究。E-mail: jimingshan@163.com

siRNA, nat-siRNA)、重复序列相关的小 RNA (repeat-associated siRNA, ra-siRNA) 等^[6-7]。

ta-siRNA 是一类植物内源的并且依赖于 miRNA 而产生的 siRNA^[8], 大小 21nt, 它以与 miRNA 相似的方式行使生物学功能^[9], 即通过与靶位点不完全配对进而对靶 mRNA 进行切割^[1,10]。拟南芥中编码 ta-siRNA 的 TAS 基因属于 4 个家族 (TAS1、TAS2、TAS3 和 TAS4), 其中 TAS3 保守性较高^[4,11]。与大多数 miRNA 不同, miR390 的作用靶标并非 mRNA, 而是另一类小分子 RNA。拟南芥中 TAS3 被鉴定是 miR390 的靶标^[8], 它们之间的具体作用方式是植物 TAS3 基因由 RNA 聚合酶 II 转录产生 ta-siRNA 前体, miR390 在 AGO1 的参与下介导 ta-siRNA 前体的剪切, 之后在 SGS3 (suppressor of gene silencing 3) 的辅助下, RDR6 将断裂的 ssRNA 转换成 dsRNA, 然后在 DRB4 和 HEN1 的帮助下, DCL4 将 dsRNA 切割为成簇的 ta-siRNA, 最后成熟的 ta-siRNA 与 RISC 结合识别靶 mRNA, 通过降解 mRNA 来调节基因表达。目前, 关于 TAS3 的报道主要集中在拟南芥、水稻等植物上^[12-13], 拟南芥中 miR390 指导 TAS3-tasiRNA 的生物合成, 而 TAS3-tasiRNA 通过负调控靶基因生长素响应因子 ARF 来调控叶的极性发育和抑制植物从幼年到成年阶段的转变等^[12,14-15]。至今, 未见草莓 miR390 靶基因 TAS3 的报道, 它们在草莓植株生长发育中的作用也尚不清楚, 但本试验的前期研究发现, 与普通的匍匐茎苗相比, 在草莓微繁殖苗对白粉病抗性下降的同时^[16], miR390 表达

也明显下降^[17]。因此, 本研究克隆了草莓 TAS3 基因的全长, 分析了草莓植株中 miR390 与其靶基因 TAS3 间的差异表达模式, 为揭示草莓 miR390 及其靶基因 TAS3 与白粉病抗性的关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

草莓栽培品种‘全明星’(Allstar)、“丰香”(Toyonoka)、“幸香”(Sachinoka)和“栃乙女”(Tochiotome)露地栽培于沈阳农业大学草莓试验园, 常规栽培管理, 采集幼嫩叶片液氮迅速冷冻, 然后于 -80 °C 超低温冰箱中保存, 用于基因克隆。

草莓‘全明星’试管苗继代培养在 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L IBA 培养基上, 试管苗用 M₀ 表示。试管苗下地移栽 5 个月用 M₅ 表示, 分别取 M₀ 和 M₅ 的幼嫩叶片用液氮迅速冷冻后于 -80 °C 超低温冰箱中保存, 用于基因表达差异分析。

1.2 引物及探针及核酸的提取

利用 Primer 5.0 设计引物及探针, 由 TaKaRa 公司合成, 其序列见表 1。

总 RNA、DNA 及总核酸的提取采用 CTAB 法^[18]。利用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测核酸的完整性, 用 DU800 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter, USA) 检测核酸的纯度。

1.3 RT-PCR 分析

反转录反应体积为 20 μL, 在 0.2 mL 反应管中先加入总 RNA 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 摩尔浓度为 50 pmol/μL 的 Oligo d(T)₁₈ 和 Random 9

表 1 本研究所用引物及探针序列

Table 1 Primers and probes used in this study

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	用途 Use
GSP-F GSP-R	TTCTTGACCTTGAAAGRCCTYTT (Y: T/C; R: A/G) AGCTCAGRAGGGATAG (R: A/G)	TAS3 基因片段的分离 Isolation of TAS3 fragments
GSP-R1 GSP-R2 GSP-R3	TCAGGAGGGATAGACAAGGA AGGAGAAGAAGGGTATGGCG GAACGGGGAGAAGCGGAGGC	5'-RACE Rapid amplification of cDNA 5' ends
GSP-F1 GSP-F2 GSP-F3	GCCTTTTCTTGACCTTGTA CTTTCTTTCGCATTTCTAA ACACACCCTGCACCGGAATT	3'-RACE Rapid amplification of cDNA 3' ends
TAS3-F TAS3-R	AACACCACACTTCTTTCCCTTTTCTC AATAACAACAAGATAGAAT	TAS3 cDNA 全长扩增 Amplification of full-length cDNA of TAS3
TAS3-RT TAS3-PCRF TAS3-PCRR TAS3-Probe	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCCGGCAATTCAGTTGAGGAGATCTT ACACTCCAGCTGGGTCTTGACCT AACTGGTGTCTGGAG FAM-TTCAGTTGAGGAGATCTT-TAMRA	TAS3 定量 RT-PCR qRT-PCR of TAS3
miR390-RT miR390-PCRF miR390-PCRR miR390-Probe	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCCGGCAATTCAGTTGAGGGCGCTAT ACACTCCAGCTGGGAAGTCCAGGA AACTGGTGTCTGGAG FAM-TTCAGTTGAGGGCGCTAT-TAMRA	miR390 定量 RT-PCR qRT-PCR of miR390
18S-F 18S-R 18S-Probe	GTAGTCATATGCTGTCT GAATGATGCGTCGCCAGCACAAAGG FAM-CAGAAGTCGGGATTTGTTGC-TAMRA	18S 定量 RT-PCR qRT-PCR of 18S

mers 各 0.5 μL , 混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后迅速放到冰水混合物中冷却, 之后再加入 AMV (5 U/ μL) 1 μL , AMV Buffer 4 μL , RNase 抑制剂 (40 U/ μL) 1 μL 。通过 37 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 完成反转录反应。取 1 μL cDNA 加入 Long Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.4 μL , Buffer I 2 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 0.4 μL , 正、反向引物 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) 各 1.6 μL , 最后用水补足到 20 μL 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。用含 EB (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.4 RACE 分析

3'-RACE 利用 TaKaRa 的试剂盒 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0, 结合巢式 PCR 进行。5'-RACE 参照 Invitrogen 5'-RACE system version 2.0 试剂盒的方法进行, 相应药品及接头引物均购自 TaKaRa 公司。扩增产物的检测方法同上。

1.5 序列测定和分析

利用 DNA 凝胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收扩增片段, 与 pGM-T 载体连接, 然后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选 PCR 鉴定阳性克隆, 测序工作委托华大基因公司进行。DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEN 公司, pGM-T 载体购自天根公司, 其他药品为国产分析纯。利用 NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对测序结果进行检索, DNAMAN 6.0 进行序列分析。

利用二倍体森林草莓 (*F. vesca*) 基因组 (<https://strawberry.plantandfood.co.nz/>) 和生物信息学软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 来完成草莓 TAS3 基因启动子的预测和分析。

1.6 实时定量 RT-PCR

根据草莓 TAS3 基因序列特点, 设计茎环引物

进行实时定量 RT-PCR 反应。反应程序和体系参照 Li 等^[17] 的方法。反应体积为 20 μL , 包括 1 μL cDNA (RNA 为 2 μg), 8 μL 2.5 \times Mix, 1 μL 增强子, 正、反向引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 探针 0.5 μL , 剩余体积用超纯水补足至 20 μL 。每个反应重复 3 次。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸 1 min, 40 个循环。试剂 2.5 \times realMaster Mix (P/N: FP203) 购自天根公司。使用 ABI 公司的 7500 定量 PCR 仪, 96 孔板和光学膜完成定量 PCR 反应。以 18S rRNA 基因作为管家基因, 清水模板为阴性对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算相对表达量的高低 (Ct 即循环阈值, 表示每一个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。 $\Delta\text{Ct} = \text{目的基因的平均 Ct 值} - \text{管家基因的平均 Ct 值}$ 。 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{(\text{样本}1)} - \Delta\text{Ct}_{(\text{样本}2)}$)。

2 结果与分析

2.1 草莓 TAS3 基因片段的分离

根据 Allen 等^[8] 报道的苹果、葡萄、拟南芥、水稻等物种中 TAS3 基因的序列结构特点, 选择保守区域设计 1 对简并引物 (表 1), 以草莓 '全明星' 幼嫩叶片的总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 得到了一条约 190 bp 的特异条带 (图 1, A)。测序结果表明, 该片段大小为 178 bp, 与拟南芥中 TAS3 (At3g17185) 相关区段的一致性为 59.22%, 且存在 2 个 ta-siRNA 产生位点和 1 个 miR390 靶位点, 表明该片段是草莓 TAS3 基因片段。

2.2 草莓 TAS3 基因 cDNA 全长的获得

基于已获得的草莓 TAS3 序列片段, 设计 3 条巢式引物, 继续以草莓 '全明星' 幼嫩叶片的总 RNA 为模板进行 3'-RACE, 得到 1 条小于 400 bp 的特异谱带 (图 1, B)。克隆测序结果表明该片段大小为 383 bp, 其中包括 16 个碱基的 poly A 尾巴和 3' 接头引物序列, 说明已经到达 3' 末端。利用特异扩增

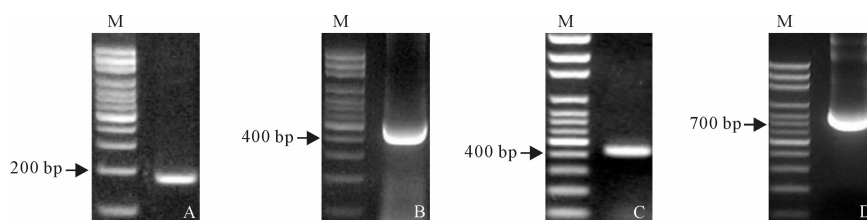


图 1 草莓 TAS3 基因扩增结果

A. TAS3 特异片段; B. 3'-RACE; C. 5'-RACE; D. TAS3 全长; M. 100 bp DNA 标准分子量

Fig. 1 Products of amplification of TAS3 gene from strawberry

A. TAS3 fragment; B. 3'-RACE; C. 5'-RACE; D. Full-length of TAS3; M. 100 bp DNA marker

和 3'-RACE 所得序列为基序设计 3 条巢式引物进行 5'-RACE, 获得大约 450 bp 的特异谱带(图 1, C), 克隆测序结果表明: 该片段包含完整的 5' 端接头引物和多个 GGG 位点, 说明已经到达 5' 末端, 其中基因片段长度为 433 bp。将通过 3'-RACE 和 5'-RACE 得到的序列进行拼接, 得到一条完成的 cDNA 序列, 长度为 742 bp, 包含 16 个碱基的 poly A 尾巴。在此基础上, 去掉 poly A 尾巴在两端设计一对特异引物, 进行 PCR 扩增, 获得 1 条大于 700 bp 的特异片段(图 1, D), 测序结果表明该片段长度为 726 bp, 经过比对分析发现, 该序列与拼接序列的一致性为 99.30%。经过多次重复测序, 排除个别碱基错配及测序误差最终获得了 1 条 742 bp 的草莓 TAS3 基因序列, 将其命名为 *FaTAS3*。将 *FaTAS3* 与苹果、葡萄及拟南芥中的 TAS3 基因进行比对分析发现, 在 2 个 ta-siRNA 产生位点和 1 个 miR390 靶位点高度保守(图 2)。

2.3 草莓 TAS3 基因 DNA 全长的克隆

采用扩增 TAS3 基因全长的引物, 多次以草莓总核酸为模板的 RT-PCR 和以 DNA 为模板的 PCR 扩增发现(图 3): 以总核酸为模板有 2 条特异片段, 分别大于 700 bp 和 800 bp; 而以 DNA 为模板则有 1 条大于 800 bp 的特异片段, 该片段大小与以总核酸为模板的对应片段大小一致。将大于 800 bp 片段分别克隆测序发现, 同一品种中以总核酸为模板和以 DNA 为模板的序列一致, 其中‘全明星’中片段大小为 824 bp, 4 个品种中序列一致性为 98.39%。将获得的 DNA 序列与 cDNA 全长进行比对发现, 一致性高达 88.11%, 主要差异在于从 5' 端 130 bp 处开始多出一段约 98 bp 的序列, 分析该

序列应该是草莓 TAS3 基因的内含子区域(图 4)。进一步克隆测序表明, 以总核酸为模板得到的大于 700 bp 的序列是 TAS3 基因的 cDNA 全长(图 3)。

2.4 草莓 TAS3 基因启动子的预测分析

将获得的草莓 TAS3 基因的 DNA 序列与二倍体森林草莓基因组的对应序列进行比对发现, 一致性高达 97.95%。因此, 下载了基因组中包含对应序列在内 3.8 kb 的序列 (scf0513154: 638800..635000), 根据 RACE 和特异扩增结果, 将 5' 端的转录起始位点 A 定义为 0, 通过 Blast 比对分析将转录起始位点之前 1000 bp 序列用来预测栽培草莓 TAS3 基因的启动子。利用生物学数据库 PlantCARE 对该序列进行预测分析, 发现存在大量顺式作用元件。其中启动子基本作用元件 TATA-box 位于转录起始位点上游 -28、-107、-232、-810、-827、-864、-933 bp 和 -986 bp 处, 增强子 CAAT-box 位于转录起始位点上游 -277、-328、

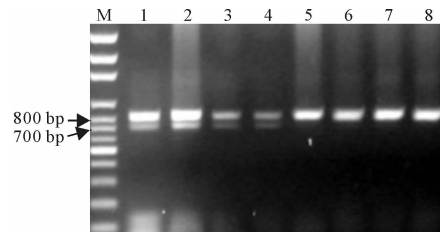


图 3 草莓 TAS3 基因的扩增产物
1~4. 总核酸为模板; 5~8. 基因组 DNA 为模板;
1, 5. 全明星; 2, 6. 丰香; 3, 7. 幸香; 4, 8. 栃乙女
Fig. 3 The products of strawberry *FaTAS3* gene
1~4. Total nucleic acid as templates; 5~8. Total DNA as templates; 1, 5. Allstar; 2, 6. Toyonoka; 3, 7. Sachinoka; 4, 8. Tochiotome

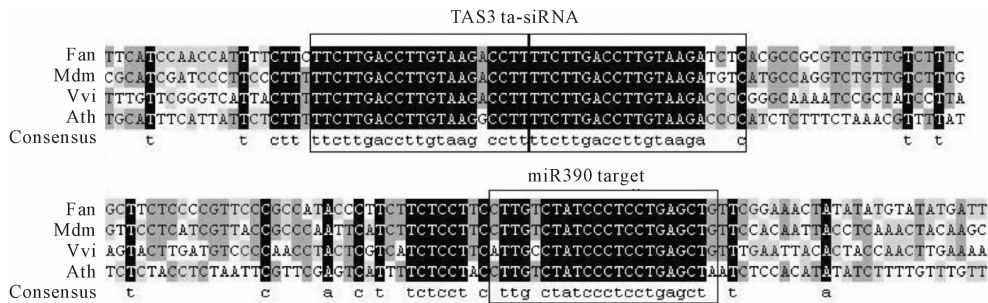


图 2 草莓 TAS3 基因与其他 TAS3 保守区比较
Fan, Mdm, Vvi, Ath 分别为草莓 (*FaTAS3*)、苹果、葡萄及拟南芥中的 TAS3 基因片段, 其中苹果、葡萄及拟南芥中的 TAS3 基因序列参照 Allen 等^[8]报道
Fig. 2 Alignment of strawberry *FaTAS3* and other TAS3 genes
Fan, Mdm, Vvi, Ath stand for the products of TAS3 genes from *Fragaria ananassa*, *Malus domestica*, *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*. The TAS3 genes sequences of *Malus domestica*, *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana* according to the report of Allen *et al.* ^[8]

-428、-507、-909、-947、-970 bp 和 -977 bp (图5)。该启动子还存在着一些光响应元件如C-

box、G-box、spl 及赤霉素响应元件 GARE(图5)。

2.5 草莓植株中 miR390 与其靶基因 TAS3 间表达模式分析

为了研究草莓 miR390 与其靶基因 TAS3 间的表达模式,采用实时定量 RT-PCR 技术,分别以 M₀ 和 M₅ 的总 RNA 为模板系统研究了 miR390 与 TAS3 的表达。结果(图6)表明 miR390 及其靶基因 TAS3 在 M₀ 和 M₅ 中具有相似的差异表达模式,miR390(M₅/M₀=20.08)、TAS3(M₅/M₀=15.813)均在 M₀ 中有较低的表达,在 M₅ 中高表达。

3 讨 论

目前,关于 TAS3 基因的报道多集中在拟南芥^[4,8,11]、水稻^[19-21]等植物上。拟南芥中,Allen 等^[8]率先揭示了 TAS3a 基因具有 2 个几乎完全一致的 21nt 的 ta-siRNA 产生位点,之后 Howell 等^[11]在 TAS3 基因家族的其他成员中发现了单一的 ta-siRNA 产生位点。已有研究表明:TAS3 基因在水稻以及其他的种子植物中都具有高度保守的 ta-siRNA 产生位点和 miR390 互补位点^[13,19-20]。本研究表明,在草莓中分离得到的 FaTAS3 基因在核酸结构上与其他该类同源基因类似,包含典型的 ta-siRNA 产生位点和 miR390 互补位点。这一序列特征表明该基因很可能与其他物种中的 TAS3 同源基因类似,以相同的作用方式在草莓的生长发育过程中发挥着重要的作用。此外利用二倍体森林草莓的基因组信息,本研究预测了草莓 FaTAS3 基因的启动子序列,分析发现包含大量的顺式作用元件,除启动子基本作用元件 TATA-box 和增强子 CAAT-box 外,还存在一些特异调控元件,如光响应元件 C-box、G-box 等。

由于拟南芥中 miR390 与大多数 miRNA 不同,并非负调控靶基因表达,而是正向介导 TAS3-ta-siRNA 的生物合成。即 miR390 与其靶基因 TAS3 的表达正相关,而 TAS3 通过负调控靶基因 ARF 来影响其发育模式、时限及侧根发育等^[14-15],它们之间的具体模式是降低 miR390 的表达,将导致 TAS3 积累水平降低,ARF3/ARF4 表达水平增加^[22]。至今,尽管未见任何关于草莓 miR390 与靶基因 TAS3 间表达模式的报道。但本研究中,qRT-PCR 结果(图6)显示:草莓 FaTAS3 与 miR390 在试管苗(M₀)和试管苗下地移栽 5 个月(M₅)的叶片中表达模式相似,均在试管苗下地移栽 5 个月(M₅)叶片中有较高表达,分析是因为 M₅ 中 miR390 的高表达导

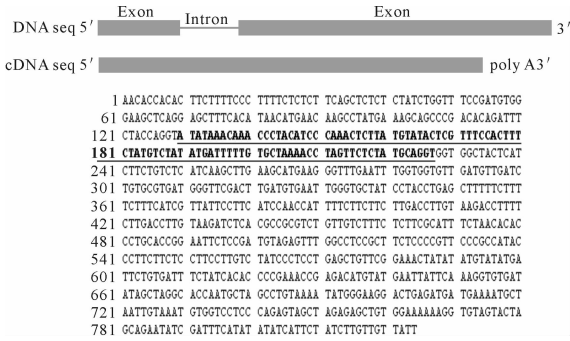


图4 草莓 TAS3 基因的 DNA 序列

下划线为内含子

Fig. 4 The DNA sequence of FaTAS3 gene
The underline area is the domain of intron

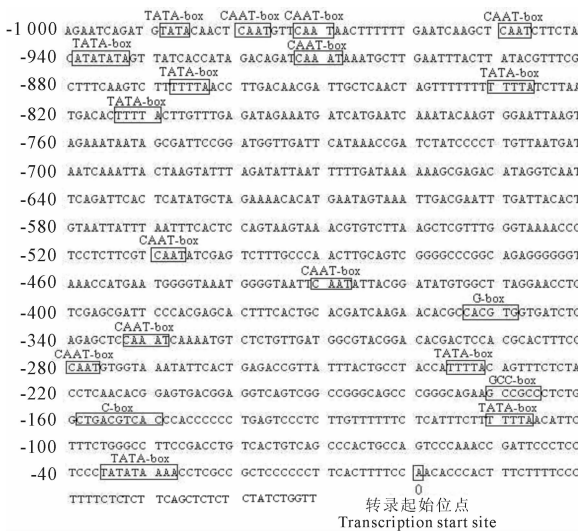


图5 草莓 TAS3 基因启动子
作用元件的预测分析

Fig. 5 The analysis of functional elements of promoter of strawberry TAS3 gene

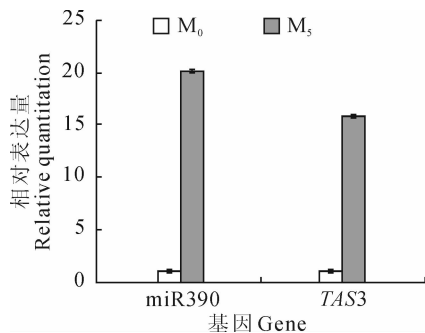


图6 草莓 miR390 与靶基因 TAS3 的差异表达分析

Fig. 6 The analysis of different expression of strawberry miR390 and its target TAS3 gene

致 TAS3 的积累水平增加。因此,基于草莓 miR390 TAS3 基因的生物合成也受 miR390 的指导。与 TAS3 间的表达模式也是正相关,推测草莓

参考文献:

- [1] SHEN D, WANG S, CHEN H, *et al.* Molecular phylogeny of miR390-guided trans-acting siRNA genes (TAS3) in the grass family[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2009, 283: 125–132.
- [2] GUO T(郭 韬), LI G L(李广林), WEI Q(魏 强), *et al.* The function of plant microRNA[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, 31(11): 2 347–2 354(in Chinese).
- [3] BAI M(白 描), CHEN W T(陈文婷), XIE B Y(谢丙炎), *et al.* Diversity of plant RNA silencing pathways and related core proteins[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*(生命科学), 2013, 25(5): 524–531(in Chinese).
- [4] RAJAGOPALAN R, VAUCHERET H, TREJO J, *et al.* A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genes Development*, 2006, 20(24): 3 407–3 425.
- [5] YOSHIKAWA M, PERAGINE A, PARK M Y, *et al.* A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*[J]. *Genes Development*, 2005, 19: 2 164–2 175.
- [6] FARAZI T A, JURANEK S A, TUSCHL T. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members[J]. *Development*, 2008, 135(7): 1 201–1 214.
- [7] RAMACHANDRAN V, CHEN X. Small RNA metabolism in *Arabidopsis*[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(7): 368–374.
- [8] ALLEN E, XIE Z, GUSTAFSON A M, *et al.* MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants[J]. *Cell*, 2005, 121(2): 207–221.
- [9] MARIN E, JOUANNET V, HERZ A, *et al.* miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their auxin response factor targets define an auto-regulatory network quantitatively regulating lateral root growth[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22: 1 104–1 117.
- [10] SUNKAR R, CHINNUSAMY V, ZHU J H, *et al.* Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation [J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12: 301–309.
- [11] HOWELL M D, FAHLGREN N, CHAPMAN E J, *et al.* Genome-wide analysis of the RNA-dependent RNA polymerase6/DICER-like4 pathway in *Arabidopsis* reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 926–942.
- [12] AXTELL M J, SNYDER J A, BARTEL D P. Common functions for diverse small RNAs of land plants[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 1 750–1 769.
- [13] ZHU Q H, SPRIGGS A, MATTHEW L, *et al.* A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains[J]. *Genome Research*, 2008, 18: 1 456–1 465.
- [14] FAHLGREN N, MONTGOMERY T A, HOWELL M D, *et al.* Regulation of auxin response factor3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*[J]. *Current Biology*, 2006, 16(9): 939–944.
- [15] YOON E K, YANG J H, LIM J, *et al.* Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in *Arabidopsis* lateral root development[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009: 1–10.
- [16] HAN B M(韩柏明), LI H(李 贺), GAO X Y(高秀岩), *et al.* Effects of tissue culture and virus elimination on the phenotype of *Fragaria × ananassa* cv. Toyonoka[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*(沈阳农业大学学报), 2009, 40(4): 400–403(in Chinese).
- [17] LI H, ZHANG Z, HUANG F, *et al.* MicroRNA expression profiles in conventional and micropropagated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(6): 891–902.
- [18] CHANG L, ZHANG Z, YANG H, *et al.* Detection of strawberry RNA and DNA viruses by RT-PCR using total nucleic acid as a template [J]. *Journal of Phytopathology*, 2007, 155: 431–436.
- [19] WILLIAMS L, CARLES C C, QSMONT K S, *et al.* A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the *Arabidopsis* ARF2, ARF3, and ARF4 genes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 9 703–9 708.
- [20] AXTELL M J, JAN C, RAJAGOPALAN R, *et al.* A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants[J]. *Cell*, 2006, 127: 565–577.
- [21] LIU B, CHEN Z, SONG X, *et al.* *Oryza sativa* dicer-like4 reveals a key role for small interfering RNA silencing in plant development[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 2 705–2 718.
- [22] POUCH-PÉLISSIER M N, PÉLISSIER T, ELMAYAN T, *et al.* SINE[1] RNA induces severe developmental defects in *Arabidopsis thaliana* and interacts with HYL1 (DRB1), a key member of the DCL1 complex[J]. *PLoS Genetics*, 2008, 4(6): e1000096.