



植物 ta-siRNA 合成作用级联研究进展

张长青¹, 李海玲¹, 李广平²

(1 金陵科技学院 园艺学院, 南京 210038; 2 南京林业大学 林学院, 南京 210037)

摘要: ta-siRNA 是一类长 21 nt 的内源非编码小 RNA, 其合成作用级联参与了植物童期向生殖期的转换、逆境适应、TAS 甲基化修饰、花叶等侧生器官背腹性发育等重要生物过程。该文对近年来有关植物 ta-siRNA 合成作用级联的发现、功能、类型和识别等研究进展进行综述, 同时分析了目前存在的问题和不足, 并展望了未来的研究方向, 以期对 ta-siRNA 合成作用级联的研究和利用提供参考。

关键词: ta-siRNA; miRNA; 调控级联

中图分类号: Q753; Q789

文献标志码: A

Advances in Biosynthesis and Regulatory Cascades of Plant ta-siRNA

ZHANG Changqing¹, LI Hailing¹, LI Guangping²

(1 College of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China; 2 College of Forest, Nanjing Forest University, Nanjing 210037, China)

Abstract: ta-siRNA is a class of 21 nt endogenous non-coding small RNA. Its regulatory cascades have been identified as important elements in gene networks involved in the plant phase transition of juvenile-to-adult, development of adaxial-abaxial leaf/flower, and response to biotic and abiotic stresses, and DNA methylation at the TAS locus. In this paper, we reviewed the advances of ta-siRNA regulatory cascades, including its discovery, function, types and identification, and also discussed its present problems and future research prospects. We hope the review could provide a useful reference for ta-siRNA research and utilization.

Key words: ta-siRNA; miRNA; regulatory cascades

微小 RNA(miRNA)和小干扰 RNA(siRNA)是植物体内两类重要的非编码小 RNA。ta-siRNA(trans-acting small interfering RNA)属于小干扰 RNA, 长 21 nt, 由 miRNA 切割靶基因产生的 RNA 片段衍生而来, 其作用机制与 miRNA 类似, 即反式剪切靶基因转录体干扰基因表达或引发新一轮 ta-siRNA 产生。ta-siRNA 合成作用级联调控了植物童期向生殖期的转换、逆境适应、TAS(ta-siRNA-producing locus)甲基化修饰、花叶等侧生器官背腹性发育等重要生物过程。鉴于近年来 ta-siRNA 合

成作用级联取得的诸多进展和国内相关综述^[1]相对缺乏的现状, 笔者结合课题组研究, 系统阐述了 ta-siRNA 合成作用级联的发现、类型、识别、功能、应用等相关进展, 以期对 ta-siRNA 合成作用级联的研究和利用提供有益借鉴。

1 ta-siRNA 合成作用级联的发现

ta-siRNA 合成作用级联的发现源于 ta-siRNA 反式剪切功能的发现。2004 年, Peragine 等^[2]发现, 3 条 21 nt 长的 sRNA(小 RNA)能与 At5g18040 互补, 且

收稿日期: 2014-07-07; 修改稿收到日期: 2014-11-28

基金项目: 国家自然科学基金(31171273); 江苏省 333 人才工程项目; 江苏省自然科学基金(BK2010019)

作者简介: 张长青(1974—), 男, 博士, 副教授, 主要从事园艺分子生物学和生物信息学研究。E-mail: zcq@jit.edu.cn

与其表达行为相反,进而利用 5'-RACE 和 Northern 印记法阐明了它们对 At5g18040 转录体的反式剪切功能。Vazquez 等^[3]也几乎同时报道了这一现象,他发现 12 条 sRNA 能完美地定位在 At2g27400 基因的内含子及其互补链上,而 9 条 5'端的间距完美地构成了 21 nt 整数倍,3 条反式剪切活性能被 5'-RACE 实验所验证。为揭示 ta-siRNA 的合成机制,他们基于突变体分析发现,ta-siRNA 的产生还需要 SGS3(Suppressor of Gene Silencing 3)和 RDR6(RNA-dependent Polymerase 6)的参与,而 Vazquez 等^[3]提出,AGO1(Argonaute1)、DCL1(Dicer-like1)、HEN1(Hua enhancer 1)、HYL1(Hyponastic leaves 1)也是 ta-siRNA 合成的关键成份。2005 年,Allen 等^[4]进一步报道,ta-siRNA 源于 miRNA 靶基因,它们的 5'端在 miRNA 靶向链上距切点呈 21 nt 整数倍分布,在非靶向链上距切点呈 21 nt 整数倍减 2 分布;在 *dcl1*、*hen1*、*rdr6*、*sgs3* 等突变体内均无法产生,因而整合 Peragine、Vazquez 等结果,首次提出了“miRNA→TAS transcript→ta-siRNA→target gene”的 ta-siRNA 合成作用级联。他认为,ta-siRNA 的产生首先需要 miRNA 剪切 TAS 转录体,随后剪切产物在 RDR6 和 SGS3 辅助下合成双链 RNA 并被 DCL 酶按照 21nt 步长切割,产生 3'端突出 2nt 的双链 sRNA;然后 AGO1 蛋白参与对 sRNA 分拣,被结合的即成为 ta-siRNA,继续调控下游靶基因的表达或引发下一轮 ta-siRNA 的产生。

尽管 miRNA 能剪切 TAS 转录体引发 ta-siRNA 产生,但并非所有 miRNA 都可以,因此人们对 ta-siRNA 产生机制进行了更深入研究。2005 年,Gascioli 等^[5-7]确认了该级联中的 DCL 酶为 DCL4(Dicer-like 4)。2006 年,Axtell 等^[8]提出了 TAS 的双 miRNA 靶点模型,他发现,TAS3 上保守地存在着 2 个

miR390 靶点,而且仅 3'端靶点能被 miRNA 剪切,但 ta-siRNA 产生也离不开 5'端靶点的存在;后来,该现象也在 AP2 等基因上得到了证实^[9],但多数 TAS 却不具有该特征。Adenot 等^[10]同时也报道了 DRB4 蛋白参与了 TAS3 产生 ta-siRNA 的作用。2007 年,Chen 等^[11]报道,ta-siRNA 也能剪切 TAS,激发 ta-siRNA 的产生,从而将 TAS 相位起始子(phase-initiator)由 miRNA 进一步拓展到了 ta-siRNA。2008 年,Montgomery 等^[12]确认 AGO7 是 miR390 的特异结合蛋白,打破了 miRNA 是在 AGO1 结合下激发 ta-siRNA 产生的认识。2010 年,Jauvion 等^[13]提出,SDE5(Silencing defective 5)也是 ta-siRNA 级联中的重要蛋白酶,它在 TAS 产物的核质运输中可能发挥了保护作用。同年,Chen 等^[14]又报道,剪切 TAS 的 miRNA 主要为 22 nt,而 Manavella 等^[15]认为,22 nt 长的 miRNA* 链(miRNA 星号链)更为关键,他发现,即便 miRNA 长度为 21 nt,但如果 miRNA* 为 22 nt,它同样能激发 ta-siRNA 合成。至此,一个较为完整的“phase-initiator→TAS transcript→ta-siRNA→target gene”的 ta-siRNA 合成作用级联基本形成。如图 1 所示,ta-siRNA 的合成首先需要 Phase-initiator (miRNA/siRNA)在 AGO1/7 结合下对 TAS 转录体剪切;而后,剪切产物在 RDR6、SGS3 和 SDE5 辅助下,合成双链 RNA,并在 DRB4 参与下被 DCL4 按照 21 nt 步长酶切,产生 3'端突出 2 nt 的双链 sRNA;然后 AGO1 参与分拣,被结合的 sRNA 最后成为 ta-siRNA,调控下游靶基因的表达或引发下一轮 ta-siRNA 的产生。

2 ta-siRNA 合成作用级联的功能

ta-siRNA 合成作用级联的功能和其成员功能密切相连。人们发现,*ago7*和*sgs3*突变后,百脉根

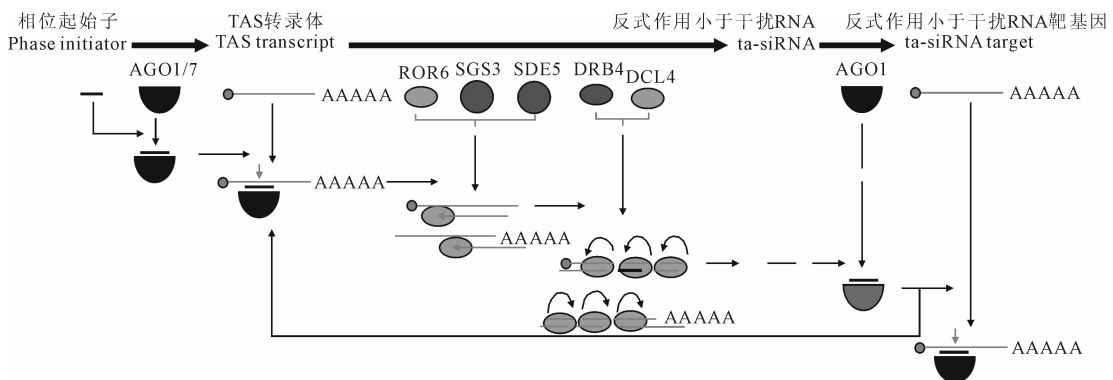


图 1 ta-siRNA 合成作用级联模型

Fig. 1 The model for ta-siRNA biosynthesis and regulatory cascade

(*Lotus corniculatus*)的叶片数量下降、远轴叶缺失、花发育不对称、根瘤减少^[16-17]; *dcl4* 和 *rdr6* 突变后,水稻(*Oryza sativa*)21 nt sRNA 及其 sRNA 类明显下降,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)童期向成熟期的转化加速,小立碗藓(*Physcomitrella patens*)出现了严重的发育失调和植株不育现象^[6,18-20];高表达 ta-siARF(Auxin response factor)后,拟南芥、水稻、玉米(*Zea mays*)的叶片极性减弱、营养阶段向生殖阶段转换推迟^[21-22];检测 ta-siARF 发现,橄榄(*Olea europaea*)生长芽较休眠芽中含量高,暗示了它对橄榄生长发育的调控^[23];昆虫取食、摘心等机械损伤处理后,烟草(*Nicotiana tabacum*) TAS3 和 TAS4 级联出现了 miRNA 和 ta-siRNA 表达量增加、靶基因表达量下降现象^[24];冷处理小麦(*Triticum aestivum*)光温敏雄性不育株后, TAS3a-5'D6(+)出现了花药发育前期表达下调而后正常的现象,2 条靶基因也与其表达呈负相关,因此暗示了 TAS3 级联与花药的冷胁迫应答有关^[25]。分析 ta-siRNA 靶基因又见,它们包括细胞器 RNA 编辑相关的 PPR 基因、植物生长相关的 ARF 基因、花青素合成相关的 MYB 和 bHLH 基因、抗病相关的 BS4 基因、基础生化过程相关的核糖体蛋白 S1 基因、DNA 损伤点检查蛋白 RAD24 基因等。可见,ta-siRNA 级联的功能极其广泛,其外在表现主要为植物童期向成熟期转化、花叶根等侧生器官发育、逆境应答等的调控,而内在机制则主要为植物生长发育、抗病、基础生化等相关基因的调控。

另外,ta-siRNA 级联还具有顺式调控 DNA 甲基化和 ta-siRNA 基因表达的功能。Wu 等^[26]发现,拟南芥 TAS 是被高度胞嘧啶甲基化的,而后来证明这种甲基化状态是由 ta-siRNA 在 AGO4/6 协助下通过顺式作用完成的。笔者^[27]也发现,TAS 产生的 sRNA 能剪切自己引发第二轮 ta-siRNA 的产生,但重要的是,第二轮 ta-siRNA 还可以继续剪切 TAS 引发第三轮 ta-siRNA 的产生,从而调控了自身基因的表达。

3 ta-siRNA 合成作用级联的类型

目前,人们已在 18 种植物中报道了约 600 条 ta-siRNA 合成作用级联^[28]。它们大致可归纳为 7 类:

(1) TAS1/2 类 该类级联由 miR173 及其同源体剪切 TAS1、TAS2 或其同源体开始,产生的 ta-siRNA 最后调控了 PPR(pentatricopeptide repeat)

基因表达^[4,29]。PPR 蛋白是植物中最大蛋白家族之一,拟南芥中已至少发现了 450 个成员。目前,其功能还不十分清楚,推测可能与细胞器 RNA 的编辑加工等过程有关。

TAS1/2 类在双子叶植物广泛存在,但却高度可变。拟南芥中 miRNA 为 miR173, TAS 为 TAS1a、TAS1b、TAS1c 和 TAS2^[4]。桃(*Prunus persica*)中 miRNA 为 miR7122a, TAS 为 TASL1 或 TASL2^[29]。苹果(*Malus domestica*)、大豆(*Glycine max*)和苜蓿(*Medicago truncatula*)中, TAS 剪切模式为双靶点模式,苹果中 miRNA 为 miR7122, TAS 为 TASL1;大豆和苜蓿中 miRNA 为 miR1509, TAS 为 TASL-L1 和 TASL-L2,且表现为双层级联模式,即首先 TASL-L1 在 miR1509 剪切下衍生出称为 TASLL1-3'D2(-)的 ta-siRNA;其次,该 ta-siRNA 又靶向并剪切 TASL-L2 转录体,产生称为 TASLL2-5'D4(-)的 ta-siRNA,该 ta-siRNA 进一步靶向并剪切 PPR 基因,完成双层 ta-siRNA 的合成作用过程^[29]。分析 miR173、miR7122、miR1509 序列发现,尽管它们差异较大,但 miRNA 两边区域却显示出了进化保守特征,因此 Xia 等^[29]推测,它们可能起源于同一基因,而该基因或许就是源自 miR390 的 miR4376 家族成员。

(2) TAS3 类 它由 miR390 剪切 TAS3 引发,产生的 ta-siRNA 主要调控 ARF 基因的表达^[4]。ARF 蛋白是一种转录因子,它能结合生长素信号通路相关基因的启动子,调控生长素信号通路。

TAS3 类级联广泛存在于种子植物中,但 TAS3 的数量和种类在不同植物中却具有一定差异。目前,小立碗藓中已报道了 TAS3a、TAS3b、TAS3c、TAS3d、TAS3e、TAS3f 等 6 个成员^[8,18,30];水稻中报道了 TAS3a、TAS3b、TAS3c、TAS3d、TAS3e 等 5 个成员,其中 TAS3a、TAS3b 还分别具有 2 个子成员^[31];玉米中报道了 TAS3a、TAS3b、TAS3c、TAS3d 等 4 个成员^[21];拟南芥中报道了 TAS3a、TAS3b、TAS3c 等 3 个成员^[4];苹果中报道了 TAS3-1、TAS3-2 等 2 个成员,但 TAS3-1 还有 a、b、c 等 3 个子成员, TAS3-2 有 a、b 等 2 个子成员^[32];橄榄、油菜(*Brassica napus*)、大豆、番茄(*Solanum lycopersicum*)、小麦、烟草中均报道了 TAS3a、TAS3b 等 2 个成员^[23-25,33-35],但烟草中 TAS3a 还包含 2 个子成员;百脉根、苜蓿、甜瓜(*Cucumis melo*)、桃树、杉树(*Cunninghamia lanceolata*)、葡萄(*Vitis vinifera*)均报道了一个 TAS3 成员^[16,36-40],但杉树中还存在着 TAS3a1 和 TAS3a2 等 2 个子成员,葡萄中存在着 TAS3-1 和 TAS3-2 等 2

个子成员。上述报道的所有 TAS3 均为 miR390 双靶点剪切模式。我们报道了葡萄的 TAS3 类级联,但 ta-siRNA 靶基因除 ARF 外,还包括了衰老相关蛋白 DIN1、核糖体蛋白 S1 和 SL10、DNA 损伤检测点蛋白 rad24、铁还原酶等基因^[36]。

(3) TAS4 类 由 miR828 剪切 TAS4 引发,产生的 ta-siRNA 调控了花青素生物合成相关的 MYB 和 bHLH 基因表达^[32,41]。miR828 普遍存在于种子植物中,但 TAS4 却仅发现于拟南芥、苹果、桃、葡萄、棉花(*Gossypium*)等双子叶植物中,因此该级联目前仅被认为是双子叶植物保守的。

(4) TAS5 类 由 miR482 剪切 TAS5 引发,产生的 ta-siRNA 调控了抗病基因 BS4 表达。目前仅在番茄中被报道^[34]。

(5) TAS6 类 发现于小立碗藓中,属于 miRNA 双靶点作用模式,由 miR156 剪切 TAS6 引发,其 ta-siRNA 调控了一个功能尚不清楚的锌指结构蛋白基因表达^[18]。

(6) ptaTC62559 类 由 miR951 剪切 ptaTC62559 引发,其 ta-siRNA 靶向了几个可能与抗病相关的基因。目前,它仅发现于松树中^[42]。

(7) gsvivt00023692001、vviTAS8、vviTAS9、vviTAS10 等其它 TAS 类 发现于葡萄中,其相位起始子均为 siRNA, gsvivt00023692001 的 ta-siRNA 调控了细胞分裂素合成酶基因; vviTAS8 的 ta-siRNA 调控了甘油-3-磷酸酰基转移酶基因和 snRNP 核心蛋白 SMX5b 基因; vviTAS9 的 ta-siRNA 调控了核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶基因、细胞色素 B6-f 复合体亚基 7 基因等; vviTAS10 的 ta-siRNA 调控了磷酸核糖-AMP 环化酶基因、1-磷脂酰肌醇-3-磷酸 5-激酶基因、丙二酰辅酶 A 还原酶基因等^[36,43]。

为方便上述 ta-siRNA 级联的查询和利用,我们基于 Apache+MySQL+Perl-CGI 平台开发了世界第一个 ta-siRNA 级联数据库——tasiRNAd(<http://bioinfo.jit.edu.cn/tasirnadatabase/>)。该数据库目前收录了来自 18 个物种的 583 条 ta-siRNA 级联,为用户提供了每条级联成员间的作用关系和各成员的核酸序列。同时,它也为用户提供了评估已/未公开的 TAS 在其 sRNA 测序库中的表达情况分析工具——TasExpAnalysis^[28]。

4 TAS 辨识与 ta-siRNA 合成作用级联识别

TAS 辨识是 ta-siRNA 合成作用级联识别的核

心。2007 年,Chen 等^[11]提出,如果假设一条测试用 TAS 的长度为 231bp(图 2,A),那么在排除 1 个 miRNA 剪切点后,正链上与 miRNA 切点相距 21 nt 整数倍的位点和负链上相距 21nt 整数倍减 2 的位点均为 DCL4 剪切点(又称相位点,phased position),共有 21 个;而其它位点则为非 DCL4 剪切点(又称非相位点),共有 440 个;它们总和为 461 个。现将 n 种 sRNA 定位到该 TAS 上,若 k 个 5'端位于相位点, $n-k$ 个位于非相位点,那么利用超几何分布方程(图 2,B)就可算出该定位事件出现的随机概率(用 P 值表示)。如果该概率值越小,则测试用 TAS 就更倾向于是真 TAS。基于该假设,Chen 等^[11]开展了拟南芥 TAS 预测和实验验证研究。他发现当 $P < 0.0005$ 时,有 2 个 TAS 家族能被报道,同时也有 3 条新 TAS 被预测,进一步基于实验方法,3 条新 TAS 也得到了验证,从而证明该方法的可行性。随后,Moxon 等^[44]基于 Chen 模型开发了 UEA sRNA tools 的 TAS 预测程序。Dai 等^[45]则认为,Chen 的模型刚性太强,缺乏对 DCL4 剪切点偏移情形的容忍,因此,他们在超几何分布模型中引入了允许 DCL4 剪切点偏移的参数 s (图 2,C),发展了 Chen 模型。同时它们也开发了世界上第一个 ta-siRNA 在线预测工具 pssRNAMiner。2012 年,笔者^[36]进一步发现,TAS 长度并非前人一直假设的 231 bp,如 Allen^[4]报道的 TAS1a、TAS1b、TAS1c、TAS2、TAS3 长度为 126~168 bp,Luo 等^[41]报道的 TAS4 为 189 bp,所以,笔者进一步通过修改 TAS 长度为变量 L 发展了 Chen 的方法。2013 年,进一步借鉴 Dai 的思想,在该模型中引入了 DCL4 切点偏移量 s ,发展出了如图 2,D 所示新模型^[27]。与 Chen、Dai 等模型相比,它的最大优点是突破了预先假设的 TAS 长度为 231nt 的限制,因此具有更准确地计算 TAS 预测得分值的特征,这在 TAS 长度明显偏离 231 nt 时将表现得更为有效。

与 Chen 等^[11]方法相对,Howell 在 2007 年也提出了一个预测模型^[46],其原理如图 2,E 所示。设 TAS 共发生了 8 轮 DCL4 酶切,现将若干条 sRNA 定位在 TAS 上,统计可得:被 sRNA 5'端占据的相位点数为 n 、第 i 个相位点上 sRNA 丰度为 k_i ($i \in [1,8]$)。进一步利用图 2,E 方程即可计算该定位事件的得分值,通过域值筛选可进行 TAS 预测。后来,De Paoli、Song 等进一步在该方程中引入了非相位 sRNA 丰度,并调整 TAS 长度为 10 轮 DCL4 酶切(图 2,F、G),发展了 Howell 模型^[20,47]。

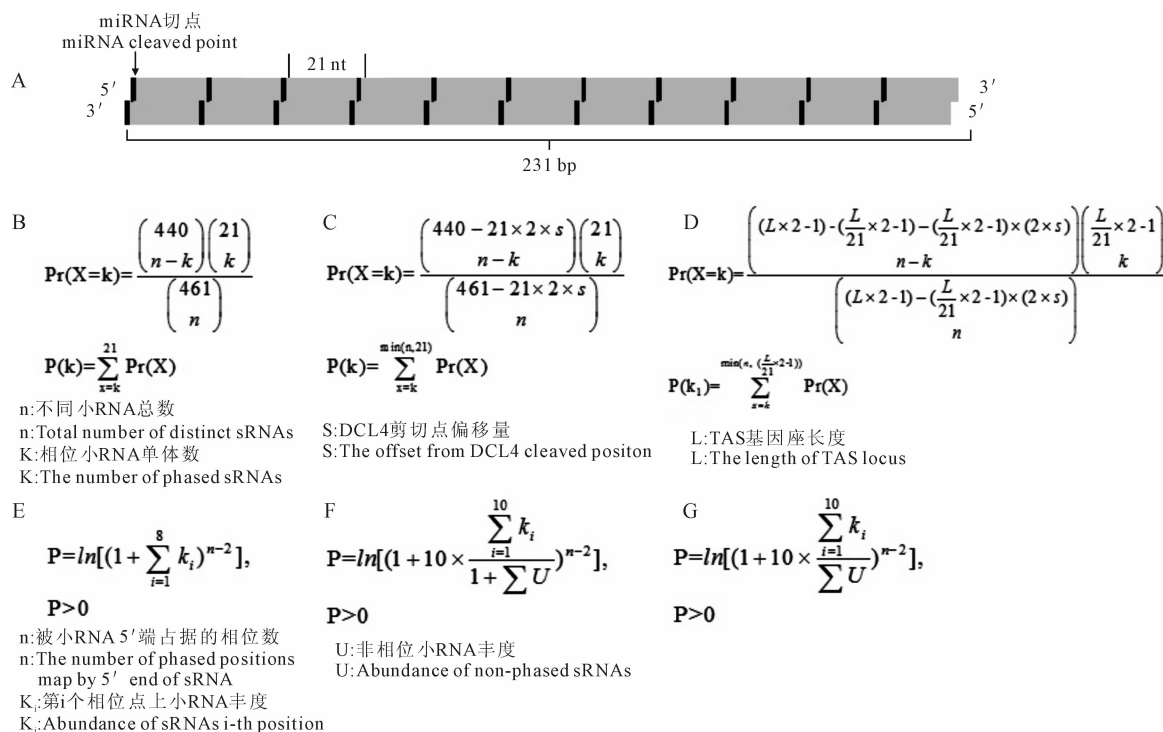


图2 TAS的计算识别算法

A. TAS预测的理论基础; B~G. 预测TAS的方程

Fig. 2 Computational algorithms of TAS

A. Theoretical basis of TAS prediction; B~G. Equation for predicting TAS

比较两类模型可见, Chen等^[11]模型主要源于TAS被sRNA 5'端覆盖信息, 而Howell等^[46]模型则主要源于sRNA测序读体数(或称积累丰度)。实际运用中, 前者会因测序深度增加而出现覆盖率增大, 噪音提升的问题, 而后者也会出现因极端高丰度sRNA的出现而将rRNA/tRNA类似基因误判的情形^[9], 因此滤掉低丰度sRNA和极端高丰度sRNA也是它们分别采用的基本措施之一。

一旦人们完成TAS辨识, 下一步就是确认该TAS是否含有相位起始子靶点和切点、是否能产生功能性ta-siRNA的问题, 这也是ta-siRNA合成作用级联识别的问题。如果该TAS既含有相位起始子的靶点和切点, 同时又能产生功能性ta-siRNA, 那么它就是一条真TAS, 它参与的ta-siRNA合成作用级联也将随之而生。目前, 检测相位起始子靶点和切点的方法基本沿袭了miRNA的靶点和切点识别方法, 而功能性ta-siRNA的检测原理主要是: 假设TAS上的每条相位sRNA均为ta-siRNA, 然后采用类似miRNA靶点预测和切点识别方法对ta-siRNA的靶点和切点进行确认, 如果该ta-siRNA的靶点和切点均得以确认, 那么它将是一条功能性ta-siRNA。鉴于miRNA靶点和切点识别方

法不是ta-siRNA领域专有, 同时大量文献也已阐述^[48-49], 故此处不予累述。

5 问题与展望

ta-siRNA合成作用级联是调控植物基因表达的基础通路, 也是作物生长和诸多农艺经济性性状形成的重要基础之一。目前, 人们已从18个植物中报道了近600条级联, 但笔者发现, 其中52%属于TAS1/2类, 40%属于TAS3类, 而其他类型仅为8%, 可见, 新的ta-siRNA级联发掘工作还有待继续。此外, ta-siRNA级联的功能研究也还主要集中在TAS1/2、TAS3、TAS4类上, 更多级联的功能解析迄今尚未很好刻画。另外, ta-siRNA级联对植物生长发育和重要农艺经济性性状的调控也并非独立完成, 深入研究它如何被调控, 又如何与其它通路互作也将是未来的重要拓展方向。

近年来, 新一代测序技术发展迅速, 海量RNA数据^[50]陡然涌涨。这为人们多视角开展ta-siRNA级联研究提供了可能。同时, 鉴于TAS基因具有一次产生多种ta-siRNA的特征, 因此认为, 它在多基因控制的农艺、经济性性状研究中也具有更为广阔的应用前景。我们相信, 随着更多突变体模型的获

得和研究,更多生物信息学平台的开发和应用,ta-siRNA 级联的识别、功能解析和应用均将取得新的进展。它们将为人们全面理解植物生长发育过程,解析重要农艺、经济性性状形成提供新手段和新认知。

参考文献:

- [1] SHI X Y(史向毅),MIAO CH(苗琛),WANG J(王江),*et al.* A new endogenous small RNA in plants—*trans*-acting siRNA[J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯),2008,**44**(2):378—384(in Chinese).
- [2] 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*[J]. *Genes & Development*,2004,**18**(19):2 368—2 379.
- [3] VAZQUEZ F,VAUCHERET H,RAJAGOPALAN R,*et al.* Endogenous *trans*-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs[J]. *Molecular Cell*,2004,**16**(1):69—79.
- [4] 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.
- [5] GASCIOLLI V,MALLORY A C,BARTEL D P,*et al.* Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing *trans*-acting siRNAs[J]. *Current Biology*,2005,**15**(16):1 494—1 500.
- [6] XIE Z,ALLEN E,WILKEN A,*et al.* DICER-LIKE 4 functions in *trans*-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2005,**102**(36):12 984—12 989.
- [7] 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**(18):2 164—2 175.
- [8] AXTELL M J,JAN C,RAJAGOPALAN R,*et al.* A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants[J]. *Cell*,2006,**127**(3):565—577.
- [9] ZHAI J,JEONG D H,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[J]. *Genes & Development*,2011,**25**(23):2 540—2 553.
- [10] ADENOT X,ELMAYAN T,LAURESSERGUES D,*et al.* DRB4-dependent TAS3 *trans*-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7[J]. *Current Biology*,2006,**16**(9):927—932.
- [11] CHEN H M,LI Y H,WU S H. Bioinformatic prediction and experimental validation of a microRNA-directed tandem *trans*-acting siRNA cascade in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2007,**104**(9):3 318—3 323.
- [12] MONTGOMERY T A,HOWELL M D,CUPERUS J T,*et al.* Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 *trans*-acting siRNA formation[J]. *Cell*,2008,**133**(1):128—141.
- [13] JAUVION V,ELMAYAN 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*[J]. *Plant Cell*,2010,**22**(8):2 697—2 709.
- [14] CHEN H M,CHEN L T,PATEL K,*et al.* 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2010,**107**(34):15 269—15 274.
- [15] MANAVELLA P A,KOENIG D,WEIGEL D. Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2012,**109**(7):2 461—2 466.
- [16] YAN J,CAI X,LUO J,*et al.* The REDUCED LEAFLET genes encode key components of the *trans*-acting small interfering RNA pathway and regulate compound leaf and flower development in *Lotus japonicus*[J]. *Plant Physiology*,2010,**152**(2):797—807.
- [17] LI X,LEI M,YAN Z,*et al.* The REL3-mediated TAS3 ta-siRNA pathway integrates auxin and ethylene signaling to regulate nodulation in *Lotus japonicus*[J]. *New Phytologist*,2014,**201**(2):1 469—8 137.
- [18] ARIF M A,FATTASH I,MA Z,*et al.* DICER-LIKE3 activity in *Physcomitrella patens* DICER-LIKE4 mutants causes severe developmental dysfunction and sterility[J]. *Molecular Plant*,2012,**5**(6):1 281—1 294.
- [19] SONG X,LI P,ZHAI J,*et al.* Roles of DCL4 and DCL3b in rice phased small RNA biogenesis[J]. *The Plant Journal*,2012,**69**(3):462—474.
- [20] SONG X,WANG D,MA L,*et al.* Rice RNA-dependent RNA polymerase 6 acts in small RNA biogenesis and spikelet development[J]. *The Plant Journal*,2012,**71**(3):378—389.
- [21] NOGUEIRA F T,MADI S,CHITWOOD D H,*et al.* Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis[J]. *Genes & Development*,2007,**21**(7):750—755.
- [22] WANG J,GAO X,LI L,*et al.* Overexpression of Osta-siR2141 caused abnormal polarity establishment and retarded growth in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*,2010,**61**(6):1 885—1 895.
- [23] DONAIRE L,PEDROLA L,ROSA RDE L,*et al.* High-throughput sequencing of RNA silencing-associated small RNAs in olive (*Olea europaea* L.)[J]. *PLoS One*,2011,**6**(11):e27916.
- [24] BOZOROV T A,BALDWIN I T,KIM S G. Identification and profiling of miRNAs during herbivory reveals jasmonate-dependent and-independent patterns of accumulation in *Nicotiana attenuata*[J]. *BMC Plant Biology*,2012,**12**:209.

- [25] TANG Z, ZHANG L, XU C, *et al.* Uncovering small RNA-mediated responses to cold stress in a wheat thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing[J]. *Plant Physiology*, 2012, **159**(2): 721–738.
- [26] WU L, MAO L, QI Y. Roles of dicer-like and argonaute proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation[J]. *Plant Physiology*, 2012, **160**(2): 990–999.
- [27] ZHANG C, LI G, WANG J, *et al.* Cascading *cis*-cleavage on transcript from *trans*-acting siRNA-producing locus 3[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**(7): 14 689–14 699.
- [28] ZHANG C, LI G, ZHU S, *et al.* tasiRNAdb: a database of ta-siRNA regulatory pathways[J]. *Bioinformatics*, 2014, **30**(7): 1 045–1 046.
- [29] XIA R, MEYERS B C, LIU Z, *et al.* MicroRNA superfamilies descended from miR390 and their roles in secondary small interfering RNA Biogenesis in Eudicots[J]. *Plant Cell*, 2013, **25**(5): 1 555–1 572.
- [30] AXTELL M J, SNYDER J A, BARTEL D P. Common functions for diverse small RNAs of land plants[J]. *Plant Cell*, 2007, **19**(6): 1 750–1 769.
- [31] WANG J, GAO X, LI L, *et al.* Overexpression of Osta-siR2141 caused abnormal polarity establishment and retarded growth in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, **61**(6): 1 885–1 895.
- [32] XIA R, ZHU H, AN Y Q, *et al.* Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks[J]. *Genome Biology*, 2012, **13**(6): R47.
- [33] ZHAO Y T, WANG M, FU S X, *et al.* Small RNA profiling in two *Brassica napus* cultivars identifies microRNAs with oil production- and development-correlated expression and new small RNA classes[J]. *Plant Physiology*, 2011, **158**(2): 813–823.
- [34] LI F, ORBAN R, BAKER B. SoMART: a web server for plant miRNA, tasiRNA and target gene analysis[J]. *The Plant Journal*, 2012, **70**(5): 891–901.
- [35] ZABALA G, CAMPOS E, VARALA K K, *et al.* Divergent patterns of endogenous small RNA populations from seed and vegetative tissues of *Glycine max*[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, **12**: 177.
- [36] ZHANG C, LI G, WANG J, *et al.* Identification of *trans*-acting siRNAs and their regulatory cascades in grapevine[J]. *Bioinformatics*, 2012, **28**(20): 2 561–2 568.
- [37] JAGADEESWARAN G, ZHENG Y, LI Y F, *et al.* Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families[J]. *New Phytologist*, 2009, **184**(1): 85–98.
- [38] GONZALEZ-IBEAS D, BLANCA J, DONAIRE L, *et al.* Analysis of the melon (*Cucumis melo*) small RNAome by high-throughput pyrosequencing[J]. *BMC Genomics*, 2011, **12**: 393.
- [39] WAN L C, WANG F, GUO X, *et al.* Identification and characterization of small non-coding RNAs from Chinese fir by high throughput sequencing[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, **12**: 146.
- [40] ZHU H, XIA R, ZHAO B, *et al.* Unique expression, processing regulation, and regulatory network of peach (*Prunus persica*) miRNAs[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, **12**: 149.
- [41] LUO Q J, MITTAL A, JIA F, *et al.* An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, **80**(1): 117–129.
- [42] LU S, SUN Y H, AMERSON H, *et al.* MicroRNAs in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and their association with fusiform rust gall development[J]. *The Plant Journal*, 2007, **51**(6): 1 077–1 098.
- [43] CARRA A, MICA E, GAMBINO G, *et al.* Cloning and characterization of small non-coding RNAs from grape[J]. *The Plant Journal*, 2009, **59**(5): 750–763.
- [44] MOXON S, SCHWACH F, DALMAY T, *et al.* A toolkit for analysing large-scale plant small RNA datasets[J]. *Bioinformatics*, 2008, **24**(19): 2 252–2 253.
- [45] DAI X, ZHAO P X. pssRNAMiner: a plant short small RNA regulatory cascade analysis server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, **36**: W114–118.
- [46] 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]. *Plant Cell*, 2007, **19**(3): 926–942.
- [47] DE PAOLI E, DORANTES-ACOSTA A, ZHAI J, *et al.* Distinct extremely abundant siRNAs associated with cosuppression in petunia[J]. *RNA*, 2009, **15**(11): 1 965–1 970.
- [48] XIA W(夏伟), CAO G J(曹国军), SHAO N SH(邵宁生). Research progress in finding and identification of MicroRNA targets[J]. *Science in China (Series C: Life Sciences)* (中国科学·C辑: 生命科学), 2009, **39**(1): 121–128(in Chinese).
- [49] CHEN L F(陈灵锋), ZHANG J P(张均平), WANG M X(王明席). High-throughput assays for MicroRNA target genes[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报), 2013, **29**(3): 207–212(in Chinese).
- [50] LIU Y ZH(刘永振), LI G S(李构思), WANG X Y(王晓宇), *et al.* Exploration on the molecular basis of different resistance in rice using next-generation sequencing[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2014, **34**(9): 1 742–1 748(in Chinese).