

# 植物非编码小 RNA 研究进展

沈恩惠<sup>1</sup>, 刘杨<sup>1</sup>, 樊龙江<sup>1,2</sup>

(1. 浙江大学, 生物信息学研究所和沃森基因组研究院, 杭州 310058;

2. 浙江大学, 农业与生物技术学院, 杭州 310058)

**摘要:** 在植物和动物中存在着大量非编码小 RNA (small RNA), 它们通过对靶标 mRNA 直接切割或在转录后抑制其翻译对基因表达起调控作用。本文主要综述了该领域的 2 方面进展:

(1) miRNA 介导的 phasiRNA: 由 miRNA 介导的 phasiRNA 可由编码和非编码位点产生, 介绍了 phasiRNA 产生的模式特征, 以及 phasiRNA 和 miRNA 的进化机制; (2) 介绍了最近出现的内源 miRNA 诱捕靶标 (Endogenous Target Mimics, eTM) 研究进展, 包括利用人工诱捕靶标检验 miRNA 的功能, 通过生物信息学方法在全基因组水平计算识别 eTM 等。

**关键词:** miRNA; siRNA; phasiRNA; eTM; 生物信息学

**中图分类号:** S-1

## Recent studies on non-coding small RNA in plants

SHEN Enhui<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, FAN Longjiang<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Bioinformatics & James D Watson Institute of Genome Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Department of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China)

**Abstract:** There are a plenty of non-coding small RNAs in plants and animals, which regulate gene expression via direct cleavage of target mRNAs or inhibition of translation in post-transcriptional level. In this paper, recent studies on miRNA-mediated phased siRNAs (phasiRNA) and endogenous target mimics (eTM) were reviewed: (1) phasiRNAs can be generated in both coding and non-coding loci and some require miRNA-mediated cleavage for their biogenesis. Pattern and evolutionary mechanism of miRNA-mediated phasiRNAs were discussed; (2) genome-wide identification and application of eTMs as miRNA decoy targets, including the use of artificial target mimics to validate the functions of miRNAs and employing bioinformatics methods to identify eTMs in the whole-genome level.

**Key words:** miRNA; siRNA; phasiRNA; eTM; bioinformatics

## 0 引言

在植物中存在着大量非编码小 RNA (small RNA), 它们通过对靶标 mRNA 直接切割或在转录后抑制其翻译对基因表达起调控作用。在植物中小 RNA 主要分为两大类: 一类是 miRNA (microRNA), 另一类是 siRNA (small interfering RNA)。本文主要介绍了由 miRNA 介导产生的 phasiRNA 的研究进展, miRNA 通过顺式和反式调节方式介导产生 siRNA, 而由反式调控形成的 phasiRNA 会进一步靶向更多的基因, 所以受到很多关注。在近年研究中发现, phasiRNA 可在非编码位点和编码蛋白位点介导产生, 因其有特定的产生模式特征, 所以可以发展生物信息学的方法进行大规模鉴定, 此外, 研究 miRNA 与 phasiRNA 的进化机制, 更有助于对 phasiRNA 的功能研究。同时, 本文还阐述了植物内源 miRNA 诱捕靶标 (Endogenous Target Mimics, eTM) 的研究进展。miRNA 能靶向某些特定基因, 对特定 mRNA 起到抑制作用, 而在植物中进化出了一类长非编码 RNA——eTM, 它们能够绑定 miRNA, 并使 miRNA 无法剪切, 从而使 miRNA 隔离, 维持植物体内的稳态。如今, 我们已经可以在植物全基因组水平上大规模鉴定此类长非编码 RNA。

**基金项目:** 基金项目: 水稻种子发育非编码小 RNA 及 miRNA 位点表达与驯化选择分析; 基金项目类别 (20100101110096) 教育部博士点基金

**作者简介:** 沈恩惠 (1990-), 男, 博士, 主要研究方向为作物小 RNA 及其 DNA 甲基化分析

**通信联系人:** 樊龙江 (1965-), 男, 教授, 作物基因组分析及其生物信息学方法. E-mail: fanlj@zju.edu.cn

## 1 miRNA 介导的 phasiRNA 研究进展

### 1.1 phasiRNA 简介

在植物miRNA中，部分miRNA（如miR173, miR390, miR393等）靶向位点或靶基因会产生具有相位排列的siRNA（phasiRNA）。这部分miRNA的靶基因可能为非编码基因（miR390和TAS3）或蛋白质编码基因（miR393和AFB）。由于这种phasiRNA具有明显的结构特征，因此对于大规模的小RNA数据，在已知物种基因组序列或部分参照序列的前提下，可以利用生物信息学的方法查找。Howell 等<sup>[1]</sup>根据一个window (8个相位为一个window)内小RNA是否按照21nt的位移排列这一显著特征，找出候选的TAS基因位点。引入P值作为评价相位排列的参数，P值受小RNA丰度和所处位置的双面影响。P值的计算按单碱基的步长在基因组上滑动，可以将小RNA在基因组上的实际分布转化为P值分布的PHASE图，具有显著高P值的位点被选为候选的phase位点。与Howell的方法类似，Chen等<sup>[2]</sup>的方法也是主要考虑phasiRNA的相位分布特征，并构建了一个P值来查找候选的phasiRNA位点，另外还有基于随机超几何分布的检测方法<sup>[3]</sup>。P值越大，表示相位（phase）结构越明显。Rajagopalan等<sup>[4]</sup>的考虑也基本一致，不过标准比较宽松，在判断是否存在相位排列结构的时候，允许有两个碱基以内的差异。基于上述方法，Liu等<sup>[5]</sup>在野生稻上鉴定了几百个phasiRNA位点，进一步的研究发现这些位点有可能是水稻驯化中的选择压承受位点。在多个物种中发现大量的phasiRNA位点的存在<sup>[1-2,5-6]</sup>，预示着这可能是植物中比较保守的一种调控方式

miRNA介导产生的siRNA的调节方式存在顺式和反式调节2种方式（图1）。由于反式调节方式产生的siRNA会靶向调节下游1个到若干基因，特别是来自编码基因位点的phasiRNA会进一步靶向很多基因（见下面），特别受到关注。

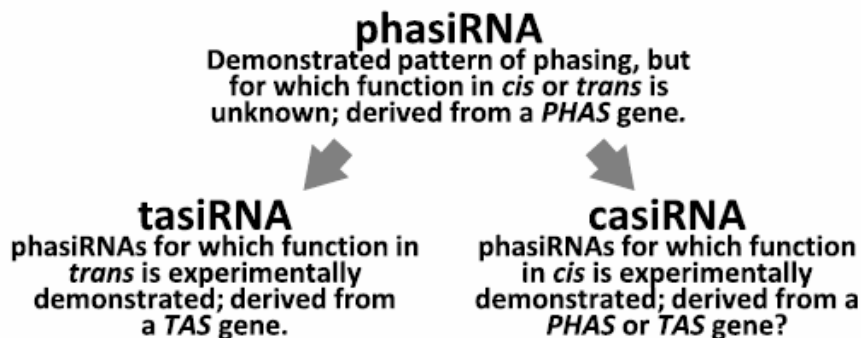


图1 miRNA介导的siRNA（phasiRNA）调节方式包括顺式（casiRNA）和反式（tasiRNA）2种方式<sup>[6]</sup>

Fig. 1 phasiRNA by miRNA-mediated including casiRNA and tasiRNA

#### 1.2.1 miRNA在非编码位点介导产生的phasiRNA

在已发现的众多种类的siRNAs中，有几类是植物特有的具有相位（in phase）排列结构特征的siRNA。相位排列是指产生初级转录本可以在相关因子的作用下产生特定长度的连续的小RNA产物。以tasiRNA为代表，Vazquez 等<sup>[7]</sup>在模式植物拟南芥中发现了这一类与叶片发育期改变相关的siRNA（Peragine et al. 2004; Vazquez et al. 2004; Yoshikawa et al. 2005）<sup>[7-9]</sup>（表1）。tasiRNA的合成是从单链RNA开始，首先被特定的miRNA剪切，剪切产物在RDR6（RNA dependent RNA polymerase 6）作用下形成两端具有miRNA剪切位点的双链RNA，然后在DCL4的作用下一步步的切成特定长度的小RNA。miRNA结合位点的作用仍不是太清楚

[10], 但不同的tasiRNA具有不同的miRNA结合位点, 比如miR173 (TAS1 和 TAS2), miR390 (TAS3)和 miR828 (TAS4)<sup>[4,7-8,10,19-20]</sup>, 其中TAS3较保守, 在许多陆生植物体内(比如水稻)都已发现<sup>[10-12]</sup>。另外, 不同相位产生的小RNA表达量差异很大, 部分小RNA与ARGONAUTE蛋白结合成复合物对特定的目标mRNA进行剪切<sup>[11]</sup>。拟南芥中tasiRNA主要跟营养发育期变化有关, 由于水稻dcl4功能缺失突变体在发育期的表型变化更加明显, 因此水稻中tasiRNA或是其他依赖于DCL4的小RNA可能起着更广泛的作用<sup>[14]</sup>。除了tasiRNA之外, 目前还发现了其他几种类型的具有相位排列特征的siRNA。Zhao等<sup>[15]</sup>在一种单细胞藻类--莱茵衣藻中发现了若干按相位排列的siRNA位点, 但由于其基因组中并未发现RDR同源基因, 因此, 其产生机制是否与植物tasiRNA一致还不清楚。Heisel等<sup>[16]</sup>和Zhu等<sup>[17]</sup>在研究水稻种子发育时期小RNA过程中分别发现了一类与种子发育特异相关的siRNA, 6号和12号染色体各一个, 称之为long miRNA-like hairpin, 其单链RNA前体形成miRNA那样的长发卡结构, 但是有很大的loop环 (>1kb), 长茎部分的双链又跟tasi-RNA类似, 有连续21nt的相位排列结构, 这也支持了前面提到的水稻DCL4还具有调控该类siRNA产生的功能。和在拟南芥中发现的位点<sup>[4,18]</sup>类似, 它们也被认为是由祖先位点复制融合形成的<sup>[16]</sup>。

表1目前已发现的miRNA在非编码位点介导产生phasiRNA位点

Tab.1 phasiRNA has been identified in no-coding loci

绑定 miRNA	miRNA 大小(nt)	phasiRNA 位点	鉴定物种	文献
miR173	22	TAS1a-c, TAS2	拟南芥	Vazquez et al. 2004 <sup>[7]</sup> ; Peragine et al. 2004 <sup>[8]</sup> ; Axell et al. 2006 <sup>[10]</sup>
miR390	21	TAS3	植物	Fahlgren et al. 2006 <sup>[19]</sup> ; Willams et al. 2005 <sup>[20]</sup>
miR828	22	TAS4	拟南芥	Rajagopalan et al. 2006 <sup>[4]</sup>
miR529,miR156	21,20	TAS6	P.patens	Arif et at.2012 <sup>[21]</sup>

90 **1.2.2 miRNA在蛋白质编码位点介导产生的phasiRNA**

MiRNA介导产生phasiRNA的位点有些来自编码基因。Howell等<sup>[1]</sup>和Chen等<sup>[2]</sup>最先报道了这一现象(表2)。他们在包括NBS-LRR类抗性基因在内的至少4个编码基因上发现了miR472等miRNA介导产生phasiRNA现象。由于小RNA在基因组中的分布具有不均一性和热点区(hotspot或cluster), Johnson等<sup>[20]</sup>调查了水稻不同组织和发育时期的小RNA库, 对21nt和24nt的siRNA簇的研究鉴定出了一批相位排列的siRNA位点, 其中大部分具有特异的模式: 在21nt相位排列的转录本5'端存在22nt的相位排列模式, 两者之间有12nt的偏移, 而且22nt的模式序列存在miR2118的结合位点, 同样的, 24nt相位排列的转录本两端也有特定的模式存在。miR2118在双子叶植物中也同样发现, 并陆续表明其是靶向NBS-LRR类抗性基因并导致该基因位点产生phasiRNA。同时这些phasiRNA存在顺式和反式调节功能<sup>[6,23-25]</sup>。Xia等<sup>[25]</sup>在苹果上发现miR828靶向MYB基因, 同时其介导的MYB基因位点可以产生大量phasiRNA, 其靶向几十个基因, 基因功能分布广泛。Thomas Källman等<sup>[26]</sup>在云杉上发现大量的21nt的sRNA都来自于TiR-NBS-LRR中的LRR域, 而这些抗性基因的呈相位式的降解大部分都是由一个表达量很高的长度为22nt的miRNA介导启动的。有趣的是, 在已发现的miRNA介导的产生phasiRNA的编码位点中, 大多来自NBS-LRR类抗性基因(表2)。这表明, miRNA介导的phasiRNA调节机制可能在植物抗性调节中发挥重要作用。

表2目前已发现的miRNA在编码位点介导产生phasiRNA位点  
Tab.2 phasiRNA has been identified in protein-coding loci

绑定 miRNA	miRNA 大小 nt	phasiRNA 位点	鉴定物种	文献
miR828,miR159,miR858	22,21,22	MYB	苹果	Xia et al. 2012 <sup>[25]</sup>
miR161/miR400	21	PPP clade	拟南芥	Howell et al. 2007 <sup>[1]</sup> ; Chen et al. 2007 <sup>[2]</sup>
miR393	22	siRAAR	拟南芥	Howell et al. 2007 <sup>[1]</sup> ; Windels and Vazquez, 2011 <sup>[27]</sup>
miR780/miR856	21	ATCHX18	拟南芥	Howell et al. 2007 <sup>[1]</sup> ;
miR472	22	NBS-LRR	拟南芥	Howell et al. 2007 <sup>[1]</sup> ;
miR2109	22	NBS-LRR	苜蓿	Zhai et al. 2011 <sup>[6]</sup>
miR1507	22	NBS-LRR;	苜蓿	Zhai et al. 2011 <sup>[6]</sup>
miR1509	22	DCL2 Predicted transcription factor	苜蓿	Zhai et al. 2011 <sup>[6]</sup>
miR5754	22	Predicted protein kinase	苜蓿	Zhai et al. 2011 <sup>[6]</sup>
miR156/miR172	21	AP2-like	苜蓿	Zhai et al. 2011 <sup>[6]</sup>
miR4376	22	ACA10	番茄	Wang et al. 2011 <sup>[28]</sup>
miR482	22	NBS-LRR	番茄	Shivaprasad et al. 2012 <sup>[23]</sup>
miR2118	22	NBS-LRR; SGS3	植物	Shivaprasad et al. 2012 <sup>[23]</sup> ; Zhai et al. 2011 <sup>[6]</sup> ; Johnson et al. 2009 <sup>[22]</sup>
miR6019	22	NBS-LRR	烟草	Li et al. 2012 <sup>[29]</sup>
miR6020	21	NBS-LRR	烟草	Li et al. 2012 <sup>[29]</sup>
miR7122	22	PPR	植物	Xia et al. 2013 <sup>[30]</sup>

110 1.3 miRNA介导phasiRNA产生的模式特征

在phasiRNA产生的位点的上下游总有一个miRNA的结合位点，这种只有一端有miRNA结合的模式称之为单端模式（如TAS1/2/4）<sup>[4,7-8,10]</sup>。与之对应的是两端有miRNA结合的双端模式（如TAS3/6）<sup>[19-21]</sup>。典型的单端模式中的miRNA是22nt的，而双端模式中的miRNA是21nt的，单端模式中phasiRNA的形成方向是从5'开始的，而双端模式中是从3'方向开始的。当然单端模式中有些变种，如能形成24ntphasiRNA的（miRNA2275）<sup>[31]</sup>，在两端有miRNA结合的但是3'端不发生切割（miR1509, miR7122）<sup>[6,29]</sup>。双端中也有在5'方向和3'方向都能发成切割导致phasiRNA形成的变种（TAS6）。另外值得一提的是，miRNA介导phasiRNA形成的切割位点多发生在miRNA的5'端的第10~11个碱基<sup>[9]</sup>，这为我们大规模鉴定phasiRNA位点奠定了基础。

120 1.4 miRNA和phasiRNA的进化机制

了解phasiRNA及其介导的miRNA进化机制有助于phasiRNA的鉴定与分析。根据拟南芥miR161、miR163基因与其靶基因在结合位点外表现出的序列相似性，Allen等<sup>[18]</sup>提出了miRNA基因起源的反向复制机制。作为miRNA的祖先序列，编码基因通过全部或部分序列的反向复制事件形成头对头或尾对尾的转录本，并且在回文结构和DCL酶的功能限制（constraints）下，进化成miRNA基因，调控祖先基因或其基因家族其他成员等特定目标序列的表达。Rajagopalan等<sup>[4]</sup>在拟南芥中也发现了除miR161和miR163之外的六个miRNA基因



茎结构区域与相应靶基因的序列相似性。Heisel等<sup>[16]</sup>表明miRNA-like hairpin基因也存在类似的进化机制，认为POT基因可能是Os06g21900的祖先基因。然而，由于tasiRNA位点并未发现类似miRNA的具有回文结构的转录本，而且tasiRNA双链的形成依赖于RDR蛋白而不是DCL蛋白，表明tasiRNA的起源可能有着不同的机制(Allen et al. 2004)<sup>[18]</sup>。实际上，Vazquez等<sup>[8]</sup>首次在拟南芥中发现tasiRNA时就指出由于tasiRNA位点与相应的靶基因间缺少总体的相似性，因此tasiRNA可能起源于另一种机制。Axtell等<sup>[10]</sup>在对高等植物中普遍保守的一类tasiRNA基因TAS3的研究中提出了“two-hit trigger”——即miR390结合在TAS3基因两端进行剪切产生具有两个miR390结合位点的转录本，可能与tasiRNA产生相位排列siRNA有关。Howell等<sup>[1]</sup>认为TAS基因可能起源于miRNA调控的编码基因。作为一个正在快速扩增的基因家族，PPR-P基因与已知的TAS位点很相似，它产生很多21nt相位排列的小RNA，而这些小RNA也负责在转录后期调控PPR-P基因。通过基因漂变或重组事件导致编码功能丧失而保留小RNA作用位点和相位排列的siRNA序列产生区域，可能是新的TAS位点产生的一种进化机制<sup>[1]</sup>。Shen等<sup>[32]</sup>对禾本科的TAS3位点进行了系统进化研究，发现基因或染色体复制导致了TAS3基因成员的扩增，部分成员在一些物种中发生了丢失。Johnson等<sup>[22]</sup>发现的与水稻花序发育相关的相位排列的小RNA与tasiRNA有很多不同：tasiRNAs成员很少并且在大部分组织中均表达，而该类小RNA有数百个位点聚集分布在几个小RNA簇中，几乎只在花序发育组织中表达。而且，不论是21nt还是24nt，这类小RNA只在5'端存在22nt相位排列的模式序列，表现出与拟南芥中特有的TAS1和TAS2基因类似的<sup>[11]</sup>、不同于TAS3的“one hit”机制。而最新的研究结果表明，这些介导产生phasRNA的miRNA可能来自共同一个祖先序列，且进化上可能存在保守性<sup>[30]</sup>。

## 2 内源 miRNA 诱捕靶标(eTM)研究进展

### 2.1 eTM简介

MiRNA在动物和植物的生长发育中起着重要的调控作用。为了实现这些调控功能，miRNA先与AGO蛋白形成复合物，再通过碱基互补配对来绑定特定的信使RNA序列，导致信使RNA的翻译受阻或在特定位点剪切<sup>[33,34]</sup>。Franco-Zorrilla等<sup>[35]</sup>在拟南芥中发现了一个由磷酸盐饥饿诱导不编码蛋白的基因 *IPSI*。该基因能够与拟南芥中的miR399的序列绑定在一起，但是在miR399的剪切位点形成了一个环状凸起结构。因此 *IPSI* 基因无法被切割，却能将miR399隔绝起来。而miR399真正的靶向基因是 *PHO2*，该基因编码泛素结合酶，对维持细胞内蛋白质的产生和降解的平衡及维持细胞的稳态和正常功能方面起着重要作用<sup>[35]</sup>。*IPSI*基因的存在，使得miR399靶向 *PHO2* 基因的活性受到抑制，像类似这种具有抑制miRNA功能的长非编码RNA，定义为 eTM (Endogenous Target Mimics)。

### 2.2 利用人工诱捕靶标(artificial target mimics)来分析miRNA功能

在植物中，存在着大量miRNA，其中很大部分的功能还是未知的，那么如何来检验miRNA的功能？因为eTM对其特定的miRNA呈现一个负相关调控作用，而且miRNA与eTM绑定在一起却无法进行切割，Todesco M等<sup>[37]</sup>根据这一机理开发了一些诱捕靶标模拟序列，转入拟南芥中，使它们顺利表达，来对拟南芥中的miRNA功能进行预测。结果发现在所有71个拟南芥miRNA家族中，有14个miRNA家族功能因其表达受到抑制，导致拟南芥形态上的异常。通过比较，他们发现高度保守的miRNA往往对植物的生长有很大的影响，而那些

165 最近形成的miRNA对植物生长的影响不太明显。此外，他们发现了miRNA序列与其靶向基  
 170 因模拟序列配对时还需遵循一定的规则，在miRNA上第10和11一个碱基需要被诱捕靶标上  
 的三个核苷酸分隔，否则将无法起到抑制作用。如图2所示，他们将对应miR172构建的人工  
 靶向基因模拟序列命名为“MIM172”，其中MIM172cs构建过程中的三个核苷酸凸起未将  
 miR172第10和第11个位点隔开，结果拟南芥表型无明显改变；MIM172构建后利用凸起将  
 miR172第10和第11个位点隔开，结果拟南芥表型出现反常现象；MIM172sn构建后只有在  
 miRNA172第11个位点产生错配，结果拟南芥表型亦无明显变化。

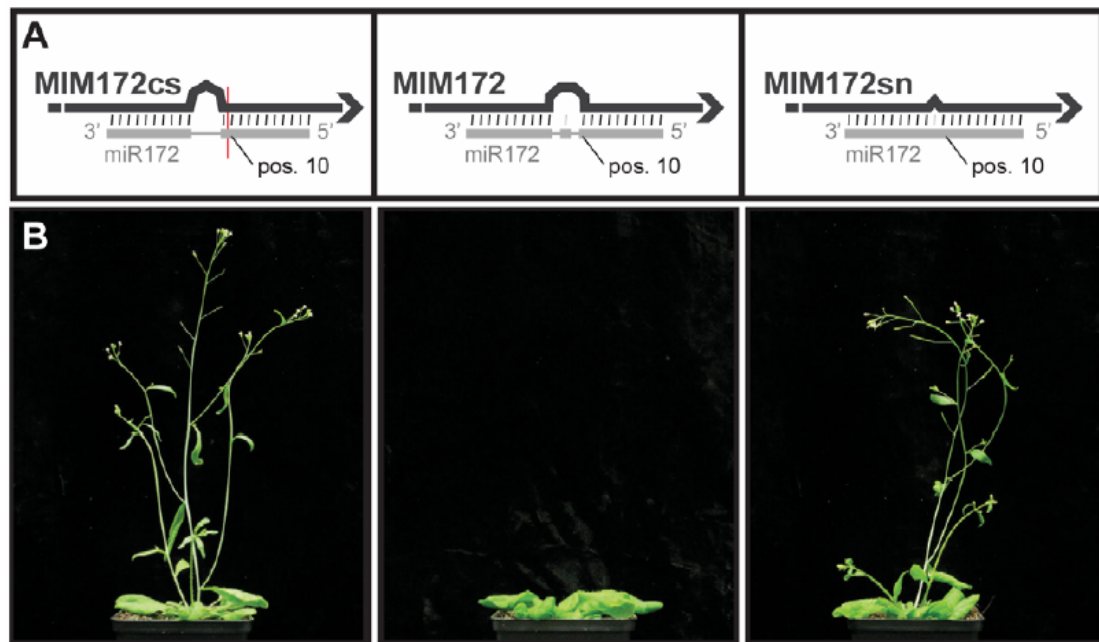


图2 在诱捕靶标切割位点需要一个凸起<sup>[37]</sup>

Fig. 2 Requirement of a bulge at the cleavage site for target mimics.

175

他们的研究，为深入研究miRNA的功能提供了重要的研究方法，同时，也为利用生物  
 信息学方法大规模鉴定植物 eTM奠定了理论基础。

### 2.3 用生物信息学方法大规模鉴定eTM

180 利用人工靶向基因模拟序列可以研究特定的miRNA的功能，然而对植物体内的eTM的  
 鉴定却还很少,但已经对miRNA与其eTM的绑定规则有了研究，这为用生物信息学方法在植  
 物体内大规模鉴定eTM，做下了铺垫。最先对植物体内eTM大规模鉴定的是Meng等<sup>[38]</sup>，他  
 们主要对拟南芥TAIR 10 (The Arabidopsis Information Resource, release 10) 和水稻TIGR 6.1  
 (The Institute for Genome Research, release 6.1) 的转录本进行了鉴定，结果在拟南芥和水稻上  
 185 分别找到了300个和260个潜在eTM。他们主要用了如下方法：首先，用FASTA3程序包中的  
 Ssearch搜索能够与miRNA反向互补的cDNA序列，程序包可以在EBI(European Bioinformatics  
 Institute)的ftp网站下载[ ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/unix/fasta/]<sup>[39,40]</sup>，在搜索过程中允许互  
 补位点有一个较大的凸起；其次，编写perl脚本对Ssearch获得的序列进一步筛选，遵循如下  
 190 规则：(1)在与响应miRNA互补配对的中间区域，必须存在一个3至5个核苷酸的凸起；(2)除  
 了中间的凸起区域，所有的错配数要小于4，且不允许产生连续两个错配；(3)除中间区域外，  
 其他地方不允许产生凸起。能够满足这些筛选标准的cDNA，才能作为候选的eTM。此外，  
 他们还研究了eTM位点在拟南芥和水稻中的分布情况，结果发现这些位点大部分在UTR区

域, 只有少部分在CDS区域。再利用GO对预测的eTM功能富集分析, 用降解组测序鉴定miRNA的真正靶向基因, 成功构建了由eTM, miRNA和靶向基因组成的调控网络。

195 Banks I R等<sup>[41]</sup>利用生物信息学的方法也鉴定了一大批eTM, 同时证实了不仅在几种模式植物中存在这种机理, 而且在其他作物中也有这种现象, 进一步论证了eTM在植物基因表达调控网络中起着重要作用。

先前的几位主要对带有注释的基因组序列进行了大规模鉴定, 且未对预测到的eTM进行功能验证。而Wu等<sup>[42]</sup>的工作弥补了以上不足, 他们开发了一个新的计算方法来预测分布在基因间的eTM, 并且用RNA-Seq测序数据和RT-PCR技术来检验eTM是否表达, 同时证实了  
200 几个检测到的eTM的确能够抑制相应的miRNA功能。他们主要对拟南芥和水稻中20个保守的miRNA进行了分析, 利用一些非编码的RNA序列, 短的开放阅读框(编码少于100个氨基酸)和基因间序列, 作为预测的库。编写的perl脚本遵循以下规则: (1)只允许在miRNA 5'端序列上的第9到第12个位点出现凸起; (2)eTM中的凸起部分由三个核苷酸组成; (3)在miRNA 5'端第2到第8个位点要与eTM完全配对, 但允许G/U错配; (4)除了中间凸起部分, 其  
205 余错配数要  $\leq 3$ , eTM的长度要大于200个核苷酸。他们在拟南芥中鉴定了36个eTM, 其中有25个具有表达证据; 在水稻中鉴定到了186个eTM, 其中94个具有表达证据。且他们还发现, 一个miRNA可以对应多个eTM, 且多个eTM只有在靶向位点具有保守性, 两边序列没有相似性。他们的研究为以后在全基因组上大规模鉴定eTM和验证其功能提供了完善的方法, 大大方便了后来人的研究。

### 210 3 结论

本文介绍了近年来植物中跟miRNA密切相关的phasiRNA与eTM的研究进展。phasiRNA与eTM的进化产生对植物体保持一个稳态具有重要的调控作用。目前只鉴定了一小部分phasiRNA与eTM的具体功能, 更多的phasiRNA与eTM功能需要进一步挖掘。可喜的是, 生物信息学在鉴定和识别phasiRNA和eTM有着不可小觑的作用, 其在计算和数据分析方面的  
215 优势决定了其重要性。如今测序技术的发展, 高通量数据的不断产生, 已然为今后的分析奠定了良好的基础。此外, 植物小RNA的研究是整个植物界中一块发展迅速且极其重要的领域, 其形成机制和作用机理还有待进一步地发现。

#### [参考文献] (References)

- 220 [1] 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(3): 926-942.
- [2]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, 2007,  
225 104(9): 3318-3323.
- [3]Zhang C, Wang J, Hua X, et al. A mutation degree model for the identification of transcriptional regulatory elements[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 262.
- [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): 3407-3425.
- 230 [5] Liu Y, Wang Y, Zhu Q H, et al. Identification of phasiRNAs in wild rice (*Oryza rufipogon*)[J]. Plant signaling & Behavior, 2013, 8(8): e25079.
- [6]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): 2540-2553.

- 235 [7]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.
- [8]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): 2368-2379.
- [9] 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): 2164-2175.
- 240 [10]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.
- [11]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.
- 245 [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(6): 1750-1769.
- [13]Talmor-Neiman M, Stav R, Klipcan L, et al. Identification of trans-acting siRNAs in moss and an RNA-dependent RNA polymerase required for their biogenesis[J]. *The Plant Journal*, 2006, 48(4): 511-521.
- [14]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(9): 2705-2718.
- 250 [15]Zhao T, Li G, Mi S, et al. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Genes & development*, 2007, 21(10): 1190-1203.
- [16]Heisel S E, Zhang Y, Allen E, et al. Characterization of unique small RNA populations from rice grain[J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2871.
- 255 [17]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(9): 1456-1465.
- [18]Allen E, Xie Z, Gustafson A M, et al. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in Arabidopsis thaliana[J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(12): 1282-1290.
- [19]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.
- 260 [20]Williams L, Carles C C, Osmont 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(27): 9703-9708.
- [21]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): 1281-1294.
- 265 [22]Johnson C, Kasprzewska A, Tennessen K, et al. Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice[J]. *Genome Research*, 2009, 19(8): 1429-1440.
- [23]Shivaprasad P V, Chen H M, Patel K, et al. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(3): 859-874.
- 270 [24]Arenas-Huertero C, Pérez B, Rabanal F, et al. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70(4): 385-401.
- [25]Xia R, Zhu H, An Y, et al. Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks[J]. *Genome Biology*, 2012, 13(6): R47.
- [26]TKällman T, Chen J, Gyllenstrand N, et al. A significant fraction of 21-nucleotide small RNA originates from phased degradation of resistance genes in several perennial species[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 741-754.
- 275 [27]Windels D, Vazquez F. miR393: integrator of environmental cues in auxin signaling?[J]. *Plant signaling & Behavior*, 2011, 6(11): 1672-1675.
- [28]Wang Y, Shen D, Bo S, et al. Sequence variation and selection of small RNAs in domesticated rice[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(1): 119.
- 280 [29]Li F, Pignatta D, Bendix C, et al. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(5): 1790-1795.
- [30]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]. *The Plant Cell*, 2013, 25:1555-1572.
- [31]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.
- 285 [32]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(1-2): 125-132.



- [33] Garcia D. A miRacle in plant development: role of microRNAs in cell differentiation and patterning[C]//Seminars in cell & Developmental biology, 2008, 19(6): 586-595.
- 290 [34] Shukla L I, Chinnusamy V, Sunkar R. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2008, 1779(11): 743-748.
- [35] Franco-Zorrilla J M, Valli A, Todesco M, et al. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity[J]. Nature Genetics, 2007, 39(8): 1033-1037.
- 295 [36] Chitwood D H, Timmermans M C P. Target mimics modulate miRNAs[J]. Nature Genetics, 2007, 39(8): 935-936.
- [37] Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, et al. A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in Arabidopsis thaliana[J]. PLoS Genetics, 2010, 6(7): e1001031.
- [38] Meng Y, Shao C, Wang H, et al. Target mimics: an embedded layer of microRNA-involved gene regulatory networks in plants[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 197.
- 300 [39] Pearson W R. Searching protein sequence libraries: comparison of the sensitivity and selectivity of the Smith-Waterman and FASTA algorithms[J]. Genomics, 1991, 11(3): 635-650.
- [40] Pearson W R. Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package[M]//Bioinformatics methods and Protocols. Humana Press, 1999: 185-219.
- 305 [41] Banks I R, Zhang Y, Wiggins B E, et al. RNA decoys: An emerging component of plant regulatory networks?[J]. Plant signaling & Behavior, 2012, 7(9): 1188-1193.
- [42] Wu H J, Wang Z M, Wang M, et al. Widespread Long Noncoding RNAs as Endogenous Target Mimics for MicroRNAs in Plants[J]. Plant Physiology, 2013, 161(4): 1875-1884.