

植物 miRNA 的功能及其作用机制

张松莲^{1,2}, 曾富华^{1,2*}, 喻宁华^{1,2}, 饶力群²

(1. 湛江师范学院应用生命科学研究, 广东 湛江 524048; 2. 湖南农业大学生物科学与技术学院, 长沙 410128)

摘要: miRNAs 是真核生物中的一类 5' 端带磷酸基团、3' 端带羟基、长度在 22 nt 左右的内源性非编码调控 RNAs。miRNAs 在控制植物的发育、开花时序、新陈代谢、应激反应等方面起着重要的作用。已知植物 miRNAs 在转录后水平上抑制基因表达, 主要是通过导致 mRNA 的裂解, 对抑制目标转录物的翻译起作用。另外其也能在转录水平上通过决定目标染色体位点的甲基化而起作用。对植物 miRNAs 的功能及作用机制的研究现状做一综述。

关键词: 综述; miRNA; siRNA; RISC; Dicer; 目标 mRNA 裂解; 翻译抑制

中图分类号: Q946.222

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)05-0444-07

Advances in Studies on the Function and Mechanism of Plant MicroRNA

ZHANG Song-lian^{1,2}, ZENG Fu-hua^{1,2*}, YU Ning-hua^{1,2}, RAO Li-qun²

(1. Applied Institute of Life Science, Zhanjiang Normal College, Zhanjiang 524048, China;

2. Life Science & Technology College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: miRNAs are approximately 22-nucleotide endogenesis noncoding regulated RNAs in eukaryotes that have phosphate group at 5' end and hydroxy group at 3' end, which attract extensive attention in recent years. Scientists are now on the threshold of a better understanding how miRNAs works. miRNAs plays an important role in controlling plant development, florescence time, metabolism, response to stress, etc. Plant miRNAs are known to repress gene expression post-transcriptionally, mainly by guiding mRNA cleavage but also by attenuating the translation of target transcripts. In addition, it has been shown that plant miRNAs can also act at the transcriptional level by directing the methylation of target chromosomal loci. This paper reviews recent researches on the function and mechaism of plant microRNA.

Key words: Review; miRNA; siRNA; RISC; Dicer; Targeting mRNAs for cleavage; Translational repression

在细胞表达的 RNA 中,除了我们所熟悉的 3 类 RNA 外,还有大量的不编码蛋白质的非编码 RNA 分子 (noncoding RNA, ncRNA),调控真核细胞中的许多功能,影响基因表达、细胞周期调控和个体发育等多种行为,这使科学家对细胞及其进化的看法进行重新反思。小 RNA 是 21-28 nt 的调控 RNA 分子,主要包括微 RNA (micro RNA, miRNA) 和小干涉 RNA (short interfering RNA, siRNA) 两类,

其中的 miRNA 成为继 siRNA 之后新的研究热点之一,名列 2002 年和 2003 年美国《科学》杂志评出的年度十大科学成就。

miRNA 是 microRNA (微 RNA) 的简称,它是小的调节植物和动物生长、发育的 RNAs,是由非蛋白编码基因转录物形成的茎环结构加工而来的长度在 22 nt 左右的小 RNA 分子,影响目标 mRNAs 的翻译和稳定性。10 年前, Lee 等^[1]首先发现线虫

收稿日期: 2005-11-22 接受日期: 2006-03-06

基金项目: 广东省高校自然科学基金项目 (Z03062); 广东省自然科学基金 (5011730) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

(*Caenorhabditis elegans*) 的异时性 (heterochronic) 基因 *lin-4* 并非编码蛋白质, 它的转录产物中有一个长度为 22 nt 的 RNA。这种转录产物在幼虫的 L1 后期表达, 与 *lin-14* 的 mRNA 的 3' 端非翻译区 (UTR) 序列互补, 从而短暂下调 *lin-14* 蛋白质的表达水平, 使线虫由 L1 期向 L2 期转化。随后另一促进幼虫向成虫发育的基因 *let-7* 也被发现^[2], 其转录产物为 21 nt 的 RNA 分子, 负调节控制线虫发育时序的基因。关于黄酮醇和花青素的生物合成的研究, 导致植物体内同源基因共抑制的发现^[3]。这是在研究矮牵牛花体内查耳酮合酶和二氢黄酮醇 4- 还原酶基因过量表达的实验中得出的一个意外结果。在其它的假说中, 提出由 RNA 链参与的 DNA 甲基化和转录产物的干扰是观察到的转录后基因沉默的可能机制。这一发现使得在线虫体内能用注射双链 RNAs 这样高度专一、有效的方式, 在转录后水平上干涉任何已知基因的活性^[4]。RNA 干涉 (RNAi) 成为在许多生物体内进行基因敲除的首选技术之一^[5]。本文对 miRNA 的功能和作用机制的研究进展作一综述, 以期对 miRNA 的运用提供参考。

1 植物 miRNA 的功能

miRNAs 在真核生物内作为基因表达的负调节子起作用。已知植物 miRNAs 能在转录后水平上抑制基因表达, 主要靠引导 mRNA 裂解和抑制目标转录物的翻译。此外, 发现植物 miRNAs 也能决定目标染色体位点的甲基化, 在转录水平上起作用^[6]。

1.1 由 miRNAs 控制的转录后水平的调节

植物 miRNAs 负调节内源性目标基因, miRNAs 识别及裂解这些基因的转录物是依赖于其与目标基因的转录物部分或完全互补^[7]。正如所预料的, 影响 miRNAs 生物合成的突变, 例如 *hyl1*, *hen1* 和 *hst*, 能导致 miRNAs 靶定的基因表达上调^[8]。在植物体内, 每一个目标 mRNA 通常包括一个位于编码区的单链 miRNA 的互补位点。相反地, 动物 miRNAs 通常是与目标 mRNAs 的 3'UTR 区域的多个结合位点部分互补^[9]。

1.1.1 引导 mRNA 裂解

在细胞分化期间, 许多植物 miRNAs 在专一的子细胞世系中是靠调节关键基因转录物的降解而起作用。例如, 在分化期间, 决定低分化的基因可能

需要被关闭, 这一点能通过抑制转录而实现。然而, 一个基因只在它的 mRNA 停止合成蛋白质时才能完全关闭。因此, 为了更快地使一个基因停止表达, 正在分化的细胞常常配置一种 miRNA, 它能特异地裂解那类 mRNA。这种现象支持这一模式, 即打断与 *PHB* (PHABULOSA) 的 mRNA 互补的 miRNA 位点的突变会导致 mRNA 更广泛的分布, 似乎它不会从表达有 miRNA 的细胞中消失^[10]。

有研究发现, 当 PHABULOSA (*PHB*) 和 PHAVOLUTA (*PHV*) 与 miR165/166 互补的一个位点发生明显的突变时, 就会影响 miRNA, 从而使这些 mRNAs 裂解。Mallory 等^[11]证实, 打断 miRNA 与 mRNA 的配对而不改变 *PHB* 蛋白序列, 会引起 *phb-d* 突变体发育缺陷。在跗基节内, 打断 miRNA 互补位点的中心区域附近的 miRNA 配对, 可减缓末端错配的发育缺陷。这些差异与体外 miRNA 引导的 mRNA 裂解效率的差异是一致的, 错配查找揭示了 miRNA 的中心部位和 3' 端的错配比 5' 端区域的错配更易被忽略。尽管通过组成型 35S 启动子诱导表达 WT (野生型) *PHB* (一种蛋白) (35S: *PHB*) 的少数几株植物上有一到两片辐射状叶片, 但是大部分植物叶片不向轴, 没有表达有野生型蛋白 *PHB* 的整个个体象 *phb-d* (突变体) 植物 (图 1A)。相反地, 57.1% 35S: *phb-1d* T1 植物呈现出明显的离轴至向轴的变化 (图 1B)^[11]。在同一密码子中的一个无义突变, 35S: *PHB* G202G (GGT 变为 GGA), 植株表现出和 35S: *PHB* G202D (GGT 变为 GAT) 转基因相同的表型 (图 1C 和 D)。因此, *phb-d* 突变表型的基础是 miRNA 结合位点遭到破坏^[12]。

已发现几种 miRNAs 在植物发育中起着一定的作用, 但是没有发现植物的表现型与 miRNA 的减少或缺失有关。Guo 等^[13]预期拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) miR164 靶定 5 个 *nac* 编码的 mRNA, 包括 *nac1*, *nac1* 可转换植物激素信号而出现外侧根。有研究表明, miR164 可引导内源和转基因 *nac1* mRNA 的裂解, 产生特异的 3'- 片断。当 *nac1* 突变后不能与 miR164 的碱基配对时, mRNA 的裂解就不发生。与野生型植物相比, 拟南芥 miR164a 和 miR164b 突变植物表达了更少的 miR164 和更多的 NAC1 mRNA, 因而产生更多的侧根。结果表明 miR164 控制的植物激素的感应提供了一种适应性

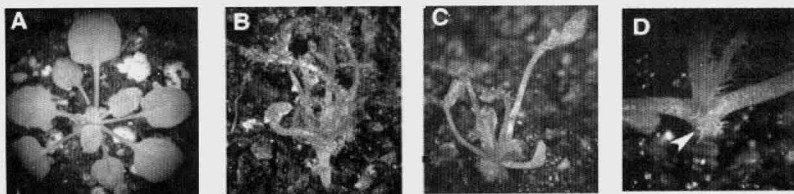


图 1 由 miR165/166 互补位点突变引起的叶片表型 (引自 Maltory 等^[20])

Fig. 1 Leaf phenotypes caused by mutations in the miR165/166 complementary site (After Mallort et al.^[20])

A: 野生型发育的 35S:PHB 植物 35S:PHB plant with WT development; B: 35S:phb-1d 植物上的叶片具辐射状,

叶片数减少,而且是向轴的 35S:phb-1d plants have radialized, reduced leaves with adaxial characteristics; C: 35S:PHB

202G 植物由环境影响引起的叶片变异 35S:PHB G202G plants caused by environment; D: 转基因植物 Transgenic plants.

机能来裂解 *nac1* mRNA, 下调植物激素信号。几个相关的 *nac* 基因(包括 *cuc1*, *cuc2* 和 *nac1*)转录物的裂解是由 miR164 调节的^[19]。 *cuc1*, *cuc2* 和 *nac1* 的转录物在野生植物的 miR164 结合位点被裂解。抗 miR164 的 *cuc1*, *cuc2* 突变体的转录物的翻译引起胚、营养器官和花的发育异常, 这表明 miR164 在控制分裂组织的大小及胚、营养器官和花的形成模式和分化方面起作用^[19]。

由 RNAi (RNA interference) 担任的基因调节需要含有 PAZ 结构域的蛋白 ARGONAUTE (AGO) 的作用^[19]。在植物体内, AGO1 与明显的发育缺陷伴随发生, 表明 miRNA 在器官极性方面起着某种作用。miRNAs 调节的潜在目标是同源区域/亮氨酸拉链基因 *PHABULOSA* (*PHB*) 和 *PHAVOLUTA* (*PHV*)。这些基因在叶原基细胞中以一种极性的方式表达。Catherine 等^[17]认为有一类 miRNA 决定 *PHB/PHV* mRNA 的裂解, 它由 21 个核苷酸组成, 这类 miRNA 首先在胚胎的分裂组织聚集, 然后分布到发育中的叶片的远轴区域。miRNAs 的分布能被 AGO1 的突变打乱, 表明 AGO1 影响 miRNAs 的调节作用。此外, AGO1 的同源区域/亮氨酸拉链的基因和其等位基因系列之间的相互作用表明, miRNAs 在决定叶片的极性方面起作用。

结合大量的突变分析表明, 拟南芥的 5 个 *HD-ZIP III* 基因在很大程度上调节发育的重要方面, 包括维管系统的形成模式, 侧生器官的远轴-近轴极性和分裂组织功能的稳定和维持^[8]。4 种半显性、获得性功能的等位基因, 即 *PHB*、*PHV*、*REVOLUTA* (*REV*) 和 *INCURVATA4* (*ICV4*) (也称

为 *ATHB-15* 和 *CORONA* (*CNA*)), 一旦破坏了它们与 miR165 和 miR166 位于 HD-ZIP III 蛋白的 START 区域的互补位点, 就会影响上述功能的发挥^[19]。

1.1.2 抑制翻译

在植物中, 抑制目标 mRNA 翻译的作用方式很少。但是, 令人困惑的是在对一种植物 miRNA 的研究中, 发现 miR172 在花的发育中可通过翻译抑制调节 *APETALA2*, 而不论 *APETALA2* ORF 区(开放性阅读框架) 在 miRNA 和它的单链互补位点之间是否近乎完全配对^[21]。

发现 miRNA172 与大多数植物 miRNAs 存在不同, 但与动物的相似, 是目前植物体内唯一发现通过抑制它的目标物的翻译来起作用的 miRNA^[21]。

1.2 由 miRNAs 控制的转录水平的调节

用对甲基化敏感的限制性酶和酸性亚硫酸盐测序时, Bao 等^[22]发现拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) miR166 的两个很典型的目标物, 即 *PHABULOSA* (*PHB*) 和 *PHAVOLUTA* (*PHV*) 基因, 它们在大多数野生型细胞内被甲基化。然而, 在破坏 miR166 结合位点的 *PHB* 和 *PHV* 的半显性突变细胞中, *PHB* 和 *PHV* 没有被甲基化。为了研究基因的甲基化与 miRNAs 之间的关系, Bao 等用来自不同生态型的野生型和突变型等位基因结合建立 *PHB* 和 *PHV* 杂合体植物, 这些等位基因在序列的多态性上是有区别的。显然, 野生型等位基因在这些杂合体中是有差别地被甲基化的, 表现出一种新的作用模式, 即在此模式中 miRNAs 很可能与它们的结合位点相

互作用来促进 *cis* 中染色体位点的甲基化。因为 *PHV* 和 *PHB* 的 miRNA 结合位点跨越两个外显子 (图 2), miR166 仅仅能与结合的 *PHV* 和 *PHB* 转录物相互作用, 表明在初生的转录物从模板染色体产生之前, 这些基因产生了外在修饰或被诱导。

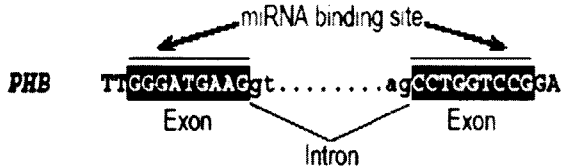


图 2 *PHB* 基因的 miRNA 结合位点(引自 Jover-Gil^[6])

Fig. 2 miRNA binding site of *PHB* (After Jover-Gil^[6])

2 miRNA 的作用机制

miRNAs 靶定 mRNA 能引起基因在转录水平上的沉默, 它在植物体内是通过称为 PTGS (post-transcriptional gene silencing) 的复合物而起作用。与 miRNAs 结合的 mRNA 的命运取决于 miRNAs 与它的目标物 mRNA 之间的互补程度。如果碱基配对完全互补, 目标物 mRNA 在接近于起控制作用的 miRNAs 的 5' 端配对的碱基的位点 10 与 11 之间裂解。如果互补程度较低, 但是有 miRNA 互补位点的合适的构象, 则能导致翻译抑制^[23]。在两者中, 互补性的最高程度 (近于完全配对) 是在接近于 miRNA 的 2-7 碱基位点, 在此区域内的碱基配对似乎对目标识别是重要的。对于翻译抑制来说, miRNAs 与单链 mRNA 的多个结合位点诱导一种协同作用。但是翻译抑制的机制还是不清楚, 因为目标 mRNA 的多核糖体分布图表明核糖体仍然在 mRNA 上运行, 好象他们仍在正常地被翻译^[24]。

2.1 导致 mRNA 裂解的机制

当 miRNA 没有与目标物的 5' - 末端完全配对时, mRNA 的裂解仍可发生, 因此, 切割位点可能取决于 miRNA 的末端部分, 而不是 miRNA 与目标物的碱基是否完全配对。在 mRNA 裂解后, miRNA 仍然是完整的, 仍能识别和破坏另外的 mRNAs^[25]。

在多种真核生物内, 裂解目标 RNA 分子需要 RISC (RNA-induced silencing complex) 复合物的核酸内切酶活性, 而它是由互补的 miRNAs 或 siRNAs 控制的^[26]。典型的 RISC 复合物包括 ARGONAUTE (AGO) 或 PPD 蛋白家族的一个成

员, 这种蛋白 (有时称为 'slicer') 复合物具有核酸内切酶活性^[27]。AGO 蛋白包括高度保守的 PAZ 和 PIWI 区域^[28]。PAZ 区域结合单链 RNAs^[29]。PIWI 区域调节与 Dicer 蛋白的相互作用和提供核酸内切酶活性^[30]。不管 miRNA 有多长, 目标物的裂解, 均发生在 miRNA 的 5' 末端的第 10 或 11 个核苷酸位点, 这需要 miRNA 的 5' 末端与 mRNA 碱基配对^[31]。

对植物 miRNAs 使 mRNA 裂解后产物的降解机制还没有完全弄清楚。Shen 等^[32]指出各种生物体内的 miRNA 决定的 mRNA 裂解后的产物各不相同, 但在它们的 3' 末端都有一段寡聚 U (1-24 个核苷酸), 在转录后水平上添加到裂解位点的下游。3' 端的寡聚 U 的添加, 如在拟南芥内表现的那样, 与裂解产物的去帽子作用和 5' 端缩短有关, 表明了这是 miRNA 使 mRNA 降解机制中关键的一步。

mRNA 的裂解是通过 RNA 内一系列关于专一性序列的作用信号来调节的。AREs (富含 AU 的元件) 分布在一系列短寿的 mRNAs 中。如原癌基因 (prooncogenes) 的 3' -UTR 端, 在各种各样的顺式作用中是最明显的。ARE 使 mRNA 降解的作用被认为是通过与特异的 ARE 结合活性因子来调节的。几种 ARE 结合蛋白已被鉴定, 且它们参与调节 ARE-RNA (包含 ARE 的 mRNA) 的降解, 这已通过实验观察得到证实^[33]。对 HuR (人类 miRNA) 的研究证实^[34], TTP/Tis11 (结合蛋白, tristetraprolin) 和 BRFl/Tis11B 蛋白质有促进 ARE-RNA 降解, 或者增加它们的稳定性的作用。然而, 有关 ARE 参与调节 (ARE-mediated) 的 mRNA 稳定性的机制虽已有许多研究, 也取得了一些成果, 但仍然是模糊的。

为了更好地理解 ARE 参与调节的 mRNA 稳定性的机制, 我们用 RNAi 来筛选 S2 Cells 内一系列基因的 ARE-RNA 降解的必需条件。有研究报道^[35], dicer 和 argonaute 是 miRNA/RNAi 系统的关键成分, 在果蝇 (*Drosophila*) 细胞内, ARE 调节 mRNA 裂解时它们是需要。在海伦 (*Helen*) 细胞内更进一步证实了 ARE-RNA 的降解需要 dicer。随后的分析发现一种 miRNA 即 miR16, 有着 UAAUAAU 序列, 与 ARE 互补。进一步的证据^[36]证明 ARE 调节的 mRNA 裂解依赖于 miR16 的出现。分析来自不同物种的成百上千的 miRNAs 的序列, 发现 miR16 包含能与 TNF- α mRNA 的 ARE 配对的 8 个碱基, 而没

有与 TNF- α mRNA 别的区域随机配对。miR16 的结构是 5'UAGCAGCACGUAUAUUGGCG3'。发现与 miR16 互补的 2'-O- 甲基化的寡聚核苷酸 (anti-miR16) 能抑制 ARE-RNA 的降解, 而别的抗 miR 则对 ARE-RNA 的降解没有影响。因此认为, ARETM-RNA 的降解需要 miR16。在 ARE-RNA 的降解方面 miR16 和 TTP 是相互依赖的, TTP 没有直接与 miR16 结合, 而是与 RISC 成分相互作用, 或协助 miR16 靶定 ARE, 从而使 ARE-RNA 发生降解。

2.2 抑制翻译的机制

mRNA 退出翻译状态, 进而转变成一种 mRNP 状态, mRNP 聚集成加工体 (P bodies)。Jeff 等^[37]鉴定出去帽子激活子 Dhhlp 和 Patlp 可作为翻译抑制子和 P body 形成的元件 (facilitator)。缺乏 Dhhlp 和 Patlp 时, mRNA 的去帽子和 P body 形成不能顺利进行, 从而使 mRNA 的翻译抑制受到阻止。相反地, Dhhlp 和 Patlp 过量表达则引起翻译抑制, P body 的形成会阻碍细胞生长, Dhhlp 和它的人类同源蛋白 PCK/p54 可抑制体外翻译, Dhhlp 在体内可抑制翻译的起始, 这些结果表明了翻译抑制的一种广泛的作用机制, 即对目标 mRNA 去甲基而在翻译控制中起作用。Jeff 等提出的这种机制可与翻译达到竞争性平衡, 改变这种平衡是翻译控制的一个重要方面。

miRNAs 是在 RISC 内起作用, 即使 miRNA 被限制在 RISC 复合体内, 有些 miRNAs 还可能在更多的方面起作用, 而不仅仅是转录后抑制, 但有些则可能靶定 DNA, 从而使转录沉默。Argonaute 蛋白和 siRNAs 与植物 DNA 的甲基化和沉默^[38]、真菌中异染色质的形成及纤毛虫中 DNA 的重排有关。这表明细胞核内存在 RISC 样的复合体。miRNAs 加工可能是在细胞核内完成的, 如果 miRNAs 没有使 DNA 沉默, 研究怎样避免 miRNAs 进入核内 RISC, 尤其在植物中是有意义的。

2.3 目标物的识别

寻找哺乳动物 miRNAs 的目标物时, 最主要的是抓住与 miRNA 的七聚物形成的末端 2-8 位点完全配对的特征^[39], 在植物中也一样。有意思的是, 大多数已知的植物 miRNAs 的目标物是转录因子, 尤其是那些涉及到发育调节或细胞分化的因子。动物

miRNAs 的目标物可能比植物的更加多样化。单链 miRNAs 能结合许多不同的 mRNA 目标物, 相反地, 几种不同的 miRNAs 能共同控制一单链 mRNA 目标物, 因此, miRNAs 和它们的目标物能组成相当复杂的调节网络^[9]。

为什么目标物与 miRNA 的 5' 末端的互补这么重要呢? 不管基因调节的机制如何, 其中一种可能性是 RISC 仅仅瞄准这个核心区域与 mRNA 配对。一种腺苷酸形成的双螺旋几何形状中, 这 7 个核苷酸预排的结果将优先加强与配对的 mRNA 片段的亲和力。Argonaute PAZ 区域结合双链和单链 RNA 的能力将使它成为代表核心和稳定核心配对的一个合适的候选者^[9]。

3 展望

真核细胞中存在数目庞大的 miRNAs 可能是基因调控途径中丰富而重要的组分, 发挥着调节作用。miRNAs 的发现是生命科学的一大突破, 它拓展和丰富了以往人们对小分子 RNA 的认识, 促使生物学家重新反思对细胞进化的理解和认知。

miRNA 与 RNA 沉默有关, 理解 RNA 沉默机制可阐明人类疾病。成熟的生化方法和对 RNA 沉默的作用及机制的其它剖析方法的发展, 将对 RNA 沉默机制提供更多的视点。

模式生物内 miRNA 基因的遗传分析目前在研究嵌合体(胚胎)的片段, 最终将可阐明 miRNA 控制动物发育和生理的机制。通过计算机来预测 miRNA 与目标物的相互作用, 必须与遗传学相结合, 才能鉴定 miRNA 调节的途径。关于 miRNAs 还有许多问题, 如影响 miRNA 在 UTR 位点的易接近和效率是什么? 什么标志使动物 miRNA 进行抑制翻译或者导致 mRNA 裂解? 在 miRNA 基因功能上的协作及冗余的本质和意义是什么? 不同的 miRNAs 结合在相同的目标物上如何起作用? 关于 miRNA 功能的一个关键问题是, 什么控制了 miRNA 的表达? 在 miRNAs 功能上的冗余或叠加关系的分析对于特异的 miRNAs 的抑制来说应当靠遗传学和非遗传学方法的发展来解决。

细胞中是否还存在更多的对基因表达起调控作用而仍未被我们发现的非编码 RNA; 那些已经被发现的 RNA 在细胞中是否还起着一些不为人知的作用呢? 究竟在多大程度上, miRNAs 途径和

siRNAs途径使用平行进化的同源基因; 这两条途径是否在细胞不同部位行使功能? 何种因素介导 miRNA 复合体的核-质转运, 这些都有待于进一步研究和探索。

因此, 随着基因组学研究的深入, 全面研究非编码 RNA 在不同细胞以及细胞的不同时期的功能已经成为后基因组时代的必需和必然, 这些研究成果也必将促进人类和整个生物界研究领域的进一步发展。

参考文献

- [1] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5):843-854.
- [2] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772):901-906.
- [3] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans [J]. *Plant Cell*, 1990, 2:279-289.
- [4] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391:806-811.
- [5] Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 110-119.
- [6] Jover-Gil S, Candela H, Ponce M R. Plant microRNAs and development [J]. *Int J Dev Biol*, 2005, 49(5-6):733-744.
- [7] Bartel B, Bartel D P. MicroRNAs: at the root of plant development? [J] *Plant Physiol*, 2003, 132:709-717.
- [8] Park M Y, Wu G, Gonzalez-Sulser A, et al. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:3691-3696.
- [9] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function [J]. *Cell*, 2004, 116:281-297.
- [10] Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, et al. Prediction of plant microRNA targets [J]. *Cell*, 2002, 110:513-520.
- [11] Mallory A C, Reinhart B J, Jones-Rhoades M W, et al. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region [J]. *EMBO J*, 2004, 23(16): 3356-3364.
- [12] McConnell J R, Emery J, Eshed Y, et al. Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots [J]. *Nature*, 2001, 411:709-713.
- [13] Guo H S, Xie Q, Fei J F, et al. MicroRNA164 directs NAC1 mRNA cleavage to downregulate auxin signals for lateral root development [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(5):1376-1386.
- [14] Baker C C, Sieber P, Wellmer F, et al. The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2005, 15:303-315.
- [15] Laufs P, Peaucelle A, Morin H, et al. MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems [J]. *Development*, 2004, 131:4311-4322.
- [16] Ma J B, Ye K Q, Patel D J. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain [J]. *Nature*, 2004, 429:318-322.
- [17] Kidner C A, Martienssen R A. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1 [J]. *Nature*, 2004, 428:81-84.
- [18] Prigge M J, Otsuga D, Alonso J M, et al. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic and distinct roles in *Arabidopsis* [J]. *Develop Plant Cell*, 2005, 17:61-76.
- [19] Kim J, Jung J H, Reyes J L, et al. MicroRNA directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems [J]. *Plant J*, 2005, 42:84-94.
- [20] Aukerman M J, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11):2730-2741.
- [21] Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development [J]. *Science*, 2004, 303:2022-2025.
- [22] Bao N L, Ye K W, Barton M K. MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome [J]. *Develop Cell*, 2004, 7:653-662.
- [23] Doench J G, Petersen C P, Sharp P A. SiRNAs can function as miRNAs [J]. *Genes Develop*, 2003, 17:438-442.
- [24] Kim N V. Small RNAs: classification, biogenesis, and function [J]. *Mol Cells*, 2005, 19(1):1-15.
- [25] Tang G, Reinhart B J, Bartel D P, et al. A biochemical framework for RNA silencing in plants [J]. *Genes Develop*, 2003, 17:49-63.
- [26] Zamore P D. Ancient pathways programmed by small RNAs [J]. *Science*, 2002, 296:1265-1269.
- [27] Rand T A, Ginalski K, Grishin N V, et al. Biochemical identification of Argonaute2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:14385-14389.
- [28] Carmell M A, Xuan Z, Zhang M Q, et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance and tumorigenesis [J]. *Genes Develop*, 2002, 16: 2733-2742.
- [29] Lingel A, Simon B, Izaurralde E, et al. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute2 PAZ domain [J]. *Nature*, 2003, 426:465-469.
- [30] Parker J S, Roe S M, Barford D, et al. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity [J]. *EMBO J*, 2004, 23: 4727-4737.
- [31] Jones-Rhoades M W, Bartel D P. Computational identification of

- plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA [J]. *Mol Cell*, 2004, 14:787–799.
- [32] Shen B Z, Goodman H M. Uridine addition after microRNA-directed cleavage [J]. *Science*, 2004, 306(5698):997.
- [33] Stoecklin G, Colombi M, Raineri I, et al. Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover [J]. *EMBO J*, 2002, 21:4709–4718.
- [34] Chen C Y, Gherzi R, Ong S E, et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs [J]. *Cell*, 2004, 107:451–464.
- [35] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA [J]. *Nature*, 2004, 431:343–349.
- [36] Jing Q, Huang S, Guth S, et al. Involvement of MicroRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability [J]. *Cell*, 2005, 120:623–634.
- [37] Coller J, Parker R. General translational repression by activators of mRNA decapping [J]. *Cell*, 2005, 122:875–886.
- [38] Zilberman D, Cao X, Jacobsen S E. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation [J]. *Science*, 2003, 299:716–719.
- [39] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets [J]. *Cell*, 2003, 115:787–798.