

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.53074

综 述

sRNA 的生物合成和作用机制及其对种子发育和休眠与萌发调控的研究进展

宋松泉^{1,2,*} 唐翠芳^{1,3} 梁裕荣¹ 程红焱² 王伟青²

¹ 广州市业坤医药集团有限公司, 广东广州 510650; ² 中国科学院植物研究所, 北京 100093; ³ 广州常春藤种业科技有限公司, 广东广州 510650

摘 要: 种子的发育、休眠和萌发是植物生命周期中的重要过程, 受许多遗传因素和环境因子的调控。小 RNAs (sRNAs) 是一组由 19~24 个核苷酸组成的非编码 RNA 分子, 调控编码转录因子和关键调节蛋白的基因表达, 在植物和动物的形态发生、生长、发育以及对生物和非生物胁迫的反应中发挥着重要的作用。尽管植物 sRNA 的部分调控机制尚不明确, 但已有的证据表明它们显著调控种子的发育、休眠和萌发。本文综述了近年来植物 sRNA 的研究进展, 主要包括 sRNA 的生物发生(生物合成)和作用机制, 以及它们对种子发育、休眠和萌发的调控作用, 并提出了在本领域需要进一步研究的科学问题, 试图为深入研究 sRNAs 在调控种子发育、休眠和萌发中的分子机制, 以及提高种子的质量与产量和萌发活力提供参考。

关键词: 基因沉默; 调控; 种子发育、休眠与萌发; 小 RNA; 翻译抑制

Research progress in biosynthesis and action mechanism of sRNAs and their regulation on seed development, dormancy and germination

Song Song-Quan^{1,2,*}, Tang Cui-Fang^{1,3}, Liang Yu-Rong¹, Cheng Hong-Yan², and Wang Wei-Qing²

¹ Guangzhou Yekun Pharmaceutical Group Co., Ltd., Guangzhou 510650, Guangdong, China; ² Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ³ Guangzhou Ivy Seed Industry Technology Co., Ltd., Guangzhou 510650, Guangdong, China

Abstract: The development, dormancy and germination of seeds are critical processes in the plant life cycle, and are regulated by various genetic factors and environmental cues. Small RNAs (sRNAs) are a group of non-coding RNA molecules consisting of 19–24 nucleotides, and regulate the expression of genes encoding transcription factors and key regulatory proteins. They play important roles in morphogenesis, growth, development, and response on biotic and abiotic stresses in both plants and animals. Although some of the regulation mechanisms of plant sRNAs remain unclear, existed evidences indicate their significant regulatory roles in seed development, dormancy, and germination. In the present paper, the research progresses of plant sRNAs in recent years were reviewed, mainly including sRNA biogenesis (biosynthesis) and action mechanism, as well as their regulatory roles in seed development, dormancy, and germination. Additionally, we have highlighted key scientific issues requiring further investigation in this field. The aim is to deepen our understanding of sRNA-mediated molecular mechanisms in these processes, thereby providing insights into improving seed quality, yield, and germination vigor.

Keywords: gene silencing; regulation; seed development, dormancy and germination; small RNAs; translation repression

种子是植物物种遗传信息保存和传递的重要个体(微小植物), 也是人类和动物的主要食物来源以及部分工业的主要原料。种子休眠(seed dormancy)是植

物在长期进化过程中所形成的一种适应性机制, 为了确保物种的生存与繁衍, 种子选择在其幼苗最适生长与发育季节的初始时期完成休眠释放和萌发^[1-2]。

本研究由国家自然科学基金项目(32470357)和郴州国家可持续发展议程创新示范区建设省级专项(2022sfq06)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (32470357) and the Provincial Special Project of Chenzhou National Sustainable Development Agenda Innovation Demonstration Zone Construction (2022sfq06).

* 通信作者(Corresponding author): 宋松泉, E-mail: sqsong2019@163.com

Received (收稿日期): 2025-10-09; Accepted (接受日期): 2025-12-16; Published online (网络出版日期): 2025-12-22.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20251222.1018.002>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

同时, 种子休眠也是一种重要的农艺性状, 低水平的休眠可能导致种子收获前萌发(pre-harvest sprouting, PHS), 而高水平的休眠则抑制种子迅速和整齐的萌发^[3-4], 导致萌发速率降低和部分个体不能正常生长与发育; 这二者都严重影响了作物的产量和质量。种子的休眠特性是在其发育过程中伴随着储藏物积累、萌发能力形成和耐脱水性增强而产生的, 在生理成熟期达到峰值^[2] (图 1)。然而, 种子休眠的概念被功能性地定义, 目前仍然没有找到评价干燥种子是否具有休眠特性以及休眠特性深浅的方法^[5], 常常用给定条件下的种子萌发率来表示; 而种子休眠和萌发是 2 个相互关联的独立事件, 具有一系列不同的生理和生化过程^[4,6]。因此, 哪些过程或机制与休眠相关还不清楚, 休眠形成与释放的过程或机制是

否为同一反应过程但方向相反的进程也不清楚。

种子萌发(seed germination)是植物生命周期中的起始步骤, 在物种生存与繁衍以及农作物生产中发挥着重要的作用。种子萌发起始于水分吸收, 终止于胚轴, 通常是胚根突破周围结构^[4]。在萌发过程中, 干燥静止的种子迅速恢复代谢活性, 如呼吸作用增强、线粒体修复与增殖、氨基酸代谢活化、利用储存和/或者新合成的 mRNA 合成蛋白, 以及胚中储藏物的动员等。这些事件促进了胚轴的伸长和胚周围组织的弱化, 导致种皮和胚乳破裂、胚根伸出周围结构以及幼苗建成^[7-9] (图 1)。研究表明, 许多内源和外源因子调控种子的休眠与萌发, 主要包括植物激素、基因转录和转录后修饰、表观遗传以及环境因子, 例如水分、温度和光照^[7-10]。

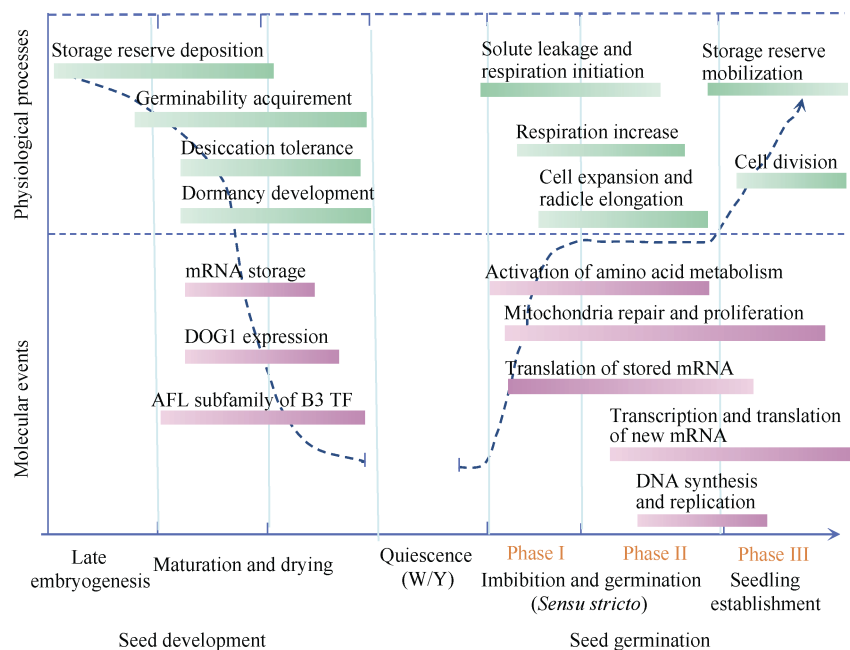


图 1 影响种子发育和萌发的主要生理过程和分子事件的模式图

Fig. 1 Schematic diagram of the main physiological processes and molecular events that influence seed development and germination

图的左边和右边分别代表种子发育和萌发的主要生理过程和分子事件, 中间区域表示种子的静止过程(用时间表示)。值得注意的是, 萌发能力、脱水耐性和休眠特性是在种子发育过程中同时形成的。种子的休眠释放和萌发均受植物激素、基因转录与转录后、表观遗传和环境因子的调控(图中未表明)。蓝色虚线表示不同发育阶段的水分含量变化。每个生理过程或分子事件下面的长条形方框表示该过程或该事件进行的起始时间与变化趋势。AFL: ABI3、FUS3 (FUSCA3) 和 LEC2 (LEAFY COTYLEDON 2) 亚家族; DOG1: 萌发延迟 1; TF: 转录因子; W: 星期; Y: 年。

The left and right sides in the figure represent the main physiological processes and molecular events of seed development and germination, respectively, and the middle area, and quiescent processes of seeds (expressed in time). It is noteworthy that germinability, desiccation tolerance, and dormancy characteristic occur simultaneously during seed development. The dormancy release and germination of seeds are regulated by phytohormones, gene transcription and post-transcription, epigenetic, and environmental factors (not shown in the Figure). The blue dashed line represents the changes in water content at different developmental stages. The long rectangular box below each physiological process (or molecular event) represents the starting time and change tendency of the processes (or events). AFL: subfamily of ABI3、FUS3 (FUSCA3) and LEC2 (LEAFY COTYLEDON 2); DOG1: DELAY OF GERMINATION 1; TF: transcription factor; W: weeks; Y: years.

小 RNAs (small RNAs, sRNAs) 是一组由 19~24 个核苷酸(nucleotide, nt)组成的非编码 RNA 分子, 调控编码转录因子(transcription factor)和关键调节蛋白的基因表达, 在植物和动物的形态发生、生长、发育以及对生物和非生物胁迫的反应中发挥着重要的作用^[11-14]。植物微小 RNA [microRNA, miRNA (miR)]由 RNA 聚合酶 II (polymerase II, Pol II)转录, 并被顺式(*cis*-)和反式作用调节元件(*trans*-acting regulatory element)调控^[15-17]。初级 *MIR* (primary miRNA, pri-miRNA)转录本由 DCL1 (DICER-LIKE 1) 酶与 HYL1 (HYPOPLASTIC LEAVES 1) 和 SE (SERRATE)蛋白共同加工形成发夹前体(hairpin precursor)。miRNA 前体经过第 2 次 DCL 介导的切割并形成双链(double strands)。然后, 该双链的 3'端被 HEN1 (HUA ENHANCER 1)甲基化, 并运输到细胞质中, 进一步掺入 miRNA 诱导的沉默复合物中。miRNA 能够在转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)或翻译抑制(translation repression)中起作用, 或者它们能够触发转录本的切割以产生另一种类型的 miRNA。AGO1 (ARGONAUTE 1) 蛋白是一种 miRNA 诱导的沉默复合物的核心组分, 它引导复合物进入靶 RNA 序列, 这些序列几乎与 miRNA 完全互补^[12]。许多 sRNAs 基因的生物合成和功能也受到不同植物激素和环境胁迫的调控^[18-19]。近年来, sRNA 对植物生长发育和胁迫响应的研究取得了重要的进展^[14,20-21], 但 sRNA 对种子发育、休眠和萌发的作用及其调控的部分机制还不够清楚^[14,22-23]。本文主要综述了近年来植物 sRNA 的生物发生(合成), sRNA 的作用机制, 以及 sRNA 对种子发育、休眠和萌发的作用, 试图为 sRNA 调控种子休眠与萌发的作用机制研究以及提高种子萌发活力和减轻种子 PHS 提供参考。

1 sRNA 的生物合成与调节

典型的植物 sRNA 包括 miRNA 和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。siRNA 又可分为异染色质 siRNA (heterochromatic siRNA, hc-siRNA)和次级 siRNA (secondary siRNA)^[13-14]。sRNA 的生物合成通常由 DCL 核糖核酸内切酶(endoribonuclease)从较长的 RNA 分子中产生 20~24 nt 的 sRNA 双链。或者是由自身互补的 RNA (self-complementary RNA) 折叠加工而成的发夹状 RNA (hairpin-like RNA), 或者是由 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent

RNA polymerase, RDR)合成的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)。在许多情况下, 由 DCL 产生的一条短的 dsRNA 分子基于序列互补性被加载到 AGO 蛋白上以靶向内源或外源 RNA, 并介导基因或转座子(transposon)沉默^[13]。

1.1 miRNA 的生物合成与修饰

植物 miRNA 由内源 *MIR* 基因编码。植物的大多数 *MIR* 基因是基因间的非编码位点, 只有少数位于蛋白质编码基因的内含子(intron)中^[24-25]。通过 DNA 依赖的 Pol II, *MIR* 基因的转录产生 pri-miRNA, 这些 pri-miRNA 是单链的、多聚腺苷酸化的(polyadenylated)和自身互补的 RNA 分子, 可以折叠成为发夹状结构。折叠的 pri-miRNA 被 DCL1 识别和切割, 产生成熟的 miRNA 双链。每条双链由一条 miRNA 链和一条 miRNA*链组成。miRNA*链通常被降解, 而 miRNA 链被保留在 AGO 蛋白上, 形成一个 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC) (图 2)。大多数植物 miRNA 的长度为 21 nt, 少数 miRNA 为 20 nt 或 22 nt, 23 nt 或 24 nt 的 miRNA 是非常少的^[26]。

1.1.1 miRNA 的转录 *MIR* 基因的转录与蛋白质编码基因的转录相似, 需要招募 Pol II 和共转录(cotranscription)初级转录本(即 pri-miRNA)的 5'帽子(5' cap)和 3'多聚腺苷酸(3' polyadenylation)^[27]。miRNA 的分析已经鉴定出许多调控 *MIR* 转录的转录因子。例如, 调节 *miR172* 的 SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE)转录因子家族^[28]。转录因子的研究也鉴定出了一些转录因子-*MIR* 的相互作用。例如, 2 个 *MIR156* 拷贝被鉴定为拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子发育过程中 FUS3 (FUSA 3)和 ABI3 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3)的直接靶标^[29]。在拟南芥中, 与 Pol II 机制或染色质修饰过程有关的一些蛋白或蛋白复合物也参与了 *MIR* 转录的调控。SMA1 (SMALL1; 一种 DEAD-box 结构域剪接体蛋白)、PP4 (PROTEIN PHOSPHATASE 4)复合物和 EMF2 (EMBRYONIC FLOWER 2)复合物[一种 PRC2 (polycomb repressive complex 2)类型的复合物, 它介导 H3K27me3 (histone H3 lysine 27 trimethylation)]的修饰直接与 *MIR* 基因的启动子相互作用来调节其转录^[30-32]。2 个 NOT2 (NEGATIVE ON TATA LESS 2)蛋白 NOT2a 和 NOT2b [假定的 CCR4 (CARBON CATABOLITE REPRESSION 4)-NOT 复合物成分], SAC3A 和 THP1 [TREX-2 (THREE

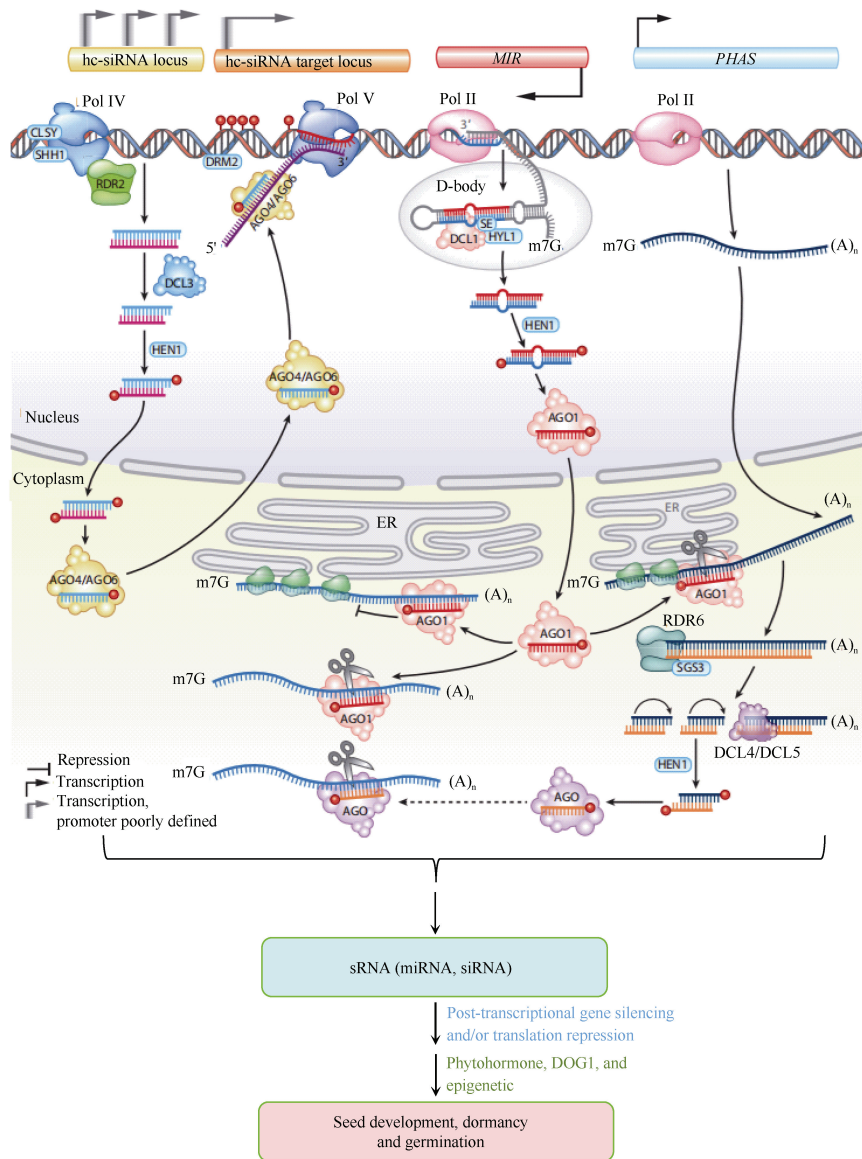


图 2 典型的植物 sRNA 的生物发生和作用模式

Fig. 2 Biogenesis and action mode of canonical plant sRNAs

hc-siRNA 主要是通过 Pol IV、CLSY、RDR2 和 DCL3 的作用产生。hc-siRNA 与 AGO4/AGO6 蛋白形成 RISC, 并通过 DRM2 在 Pol V 转录位点指导 DNA 甲基化。hc-siRNA 及其靶标转录起始点上的模糊箭头表示尚未被充分表征的 Pol IV/Pol V 转录起始位点。miRNA 主要通过 Pol II、DCL1、HYL1 和 SE 的作用产生。miRNA 优先与 AGO1 形成 RISC; miRISC 可以指导转录本的切割、介导翻译抑制或触发 phasiRNA 生物发生。phasiRNA 由 Pol II、RDR6 和 DCL4/DCL5 产生。参与生物发生或作用的其他蛋白在正文中被描述。AGO: Argonaute; CLSY: CLASSY; D-body: 核切割体; DCL: Dicer-like; DRM2: 结构域重排的甲基化酶 2; ER: 内质网; hc-siRNA: 异染色质小干扰 RNA; HEN1: HUA 增强子 1; HYL1: HYPONASTIC LEAVES 1; MIR: 微小 RNA 基因; miRISC: miRNA 诱导的沉默复合物; miRNA: 微小 RNA; PHAS: 相位次级小干扰 RNA 位点; phasiRNA: 相位次级小干扰 RNA; Pol II: RNA 聚合酶 II; Pol IV: RNA 聚合酶 IV; Pol V: RNA 聚合酶 V; RDR: RNA 依赖的 RNA 聚合酶; RISC: RNA 诱导的沉默复合物; SE: SERRATE; SGS3: 基因沉默抑制因子 3; SHH1: SAWADEE 同源结构域同源物 1; sRNA: 小 RNA。

hc-siRNAs are generated mainly through the activities of Pol IV, CLSY, RDR2, and DCL3. hc-siRNAs form RISCs with AGO4/AGO6 proteins and direct DNA methylation at Pol V-transcribed loci via DRM2. The blurry arrow for the transcriptional start of the hc-siRNAs and targets indicates the poorly characterized Pol IV/Pol V transcription start sites. miRNAs are generated through the activities of primarily Pol II, DCL1, HYL1, and SE. miRNAs form RISCs predominantly with AGO1; miRISCs can direct transcript cleavage, mediate translational repression, or trigger phasiRNA biogenesis. phasiRNAs are produced by Pol II, RDR6, and DCL4/DCL5. Other proteins involved in the biogenesis or actions are described in the main text. AGO: Argonaute; CLSY: CLASSY; D-body; nuclear dicing body; DCL: Dicer-like; DRM2: DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2; ER: endoplasmic reticulum; hc-siRNA: heterochromatic small interfering RNA; HEN1: HUA ENHANCER 1; HYL1: HYPONASTIC LEAVES 1; MIR: *MIR4*; miRISC: microRNA-induced silencing complex; miRNA: microRNA; PHAS: phased secondary siRNA loci; phasiRNA: phased secondary siRNA; Pol II: RNA polymerase II; Pol IV: RNA polymerase IV; Pol V: RNA polymerase V; RDR: RNA-dependent RNA polymerase; RISC: RNA-induced silencing complex; SE: SERRATE; SGS3: SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3; SHH1: SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1; sRNA: small RNA.

PRIME REPAIR EXONUCLEASE-2)复合物的成分]与 Pol II 相互作用来促进 *MIR* 的转录^[33]。与 Pol II 或染色质修饰过程有关的大多数蛋白都参与调控多个 *MIR* 位点。尽管这些蛋白的一些特性主要涉及一个或几个特定的 *MIR* 位点,但其中的许多蛋白很可能与大多数(如果不是全部) *MIR* 基因的转录有关,特别是直接与 DCL1 复合物相互作用的调控蛋白。

1.1.2 初级 miRNA 的加工和修饰 pri-miRNA 的加工。植物 pri-miRNA 形成不完全折叠的结构,并在细胞核中被 DCL1 切割,产生 miRNA-miRNA*双链;而在动物系统中, pri-miRNA 由 2 种核糖核酸酶(ribonuclease) Drosha (在细胞核中)和 Dicer (在细胞质中)依次加工^[34]。pri-miRNA 的二级结构是 DCL1 在 pri-miRNA 内进行切割的关键决定因素^[35]。一些 pri-miRNA 在 miRNA-miRNA*双链区域的下方和一个或多个凸起的上方含有一条 15~17 nt 的不完美的下茎(imperfect lower stem)。这种结构引导 DCL1 在茎环的远端进行初始切割(即从茎基部向环状结构方向加工)。其他的 pri-miRNA 可能在环状结构和双链区域之间含有一条上茎(upper stem),并以从环到茎基部的方式被加工。在少数情况下,还观察到 DCL1 进行 3 次或 4 次切割的加工模式。但在所有的情况下,通过 2 次(或最终)切割后都释放 miRNA-miRNA*双链^[35]。

pri-miRNA 的修饰。dsRNA 结合蛋白 HYL1 和 C2H2 锌指蛋白(C2H2 zinc-finger protein) SE 与 DCL1 结合形成核切割体(nuclear dicing body; D-小体),这些 D-小体在 miRNA 生物合成中起着核心作用^[36]。HYL1 和 SE 通过 DCL1 促进 pri-miRNA 的准确加工^[37]。HYL1 和 SE 功能丧失突变体表现出多效性的发育缺陷(pleiotropic developmental defect)和 miRNA 的整体丰度减少,这 2 种突变体之间的一些表型相似性支持了 HYL1 和 SE 在 miRNA 生物合成中的普遍作用^[36]。研究表明, D-小体是相分离凝聚物(phase-separated condensate), SE 的相分离介导了 D-小体的形成,对 pri-miRNA 的高效加工非常重要^[38]。

除 HYL1 和 SE 外,许多其他的因素也调控 pri-miRNA 的加工。例如, SMA1 和 NOT2 蛋白以及 TREX-2 复合物直接与 DCL1/HYL1/SE 相互作用来促进 pri-miRNA 加工^[31,33]。BRM [BRAHMA; 曾被称为 CHR2 (CHROMATIN REMODELING FACTOR 2), 一种 SWI2 (Switch 2) /SNF2 (Sucrose Non-Fermentable 2) 复合物的 ATP 酶亚基]、延长因子(elongator)和 TREX-2 复合物以及 HST (HASTY; 一种动物

exportin-5 的直系同源物)也与 DCL1/SE 相互作用来调控 pri-miRNA 的加工^[39-40]。值得注意的是,尽管 BRM、TREX-2、延长因子复合物和 HST 是否直接与转录机制相互作用还不清楚,但它们也促进 *MIR* 的转录^[33,39-40]。总之,许多与转录机制有关的蛋白也与 D-小体相互作用,这表明 pri-miRNA 被共转录加工。事实上, pri-miRNA 被加工成为 miRNA, 仍然与 Pol II 机制相关, R 环(DNA-RNA 杂交体)在 *MIR* 位点形成,以促进 pri-miRNA 的共转录加工^[41]。

D-小体组分的积累也被严格地调控。核蛋白 XCT (XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER)促进 *DCL1* 的转录,并有助于 pri-miRNA 的加工^[42]。SMA1 蛋白除直接调控 *MIR* 转录和 pri-miRNA 加工外,还通过促进 *DCL1* 前体 mRNA (pre-mRNA)的剪接来增强 pri-miRNA 的加工^[31]。*DCL1* 转录本直接被 miR162 (一种 DCL1 作用的 miRNA 产物)靶向,这表明了一种负反馈调节。碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子光敏色素相互作用因子 4 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4, PIF4)与 DCL1 和 HYL1 相互作用,并破坏 DCL1 的稳定性,以及抑制 pri-miRNA 的加工^[43]。在 RNA 脱支酶 1 [RNA DEBRANCHING ENZYME 1 (RNA DBR1); 一种参与内含子套索 RNA (intronic lariat RNA)降解的蛋白]有缺陷的突变体中, pri-miRNA 加工被抑制,这可能反映了过量的套索 RNA 对 D-小体的隔离,证明了 DCL1 活性被调控的专一性机制^[44]。

一些植物 *MIR* 基因位于内含子中,而另一些 *MIR* 基因本身包含内含子^[24]。因此,剪接机制(splicing mechanism)也在 miRNA 加工中发挥作用。许多蛋白在 pri-miRNA 的剪接和加工中起着双重作用,一些剪接因子与 D-小体共定位或相互作用,调控 pri-miRNA 的加工。例如,剪接因子 GRP7 (GLYCINE-RICH RBP7)、RS40 (ARGININE/SERINE-RICH SPLICING FACTOR 40)、RS41、SMA1 和 STA1 (STABILIZED1)参与 pri-miRNA 的剪接和加工^[31]。此外,前体 mRNA 加工蛋白(pre-mRNA-processing protein) PRP39b、PRP40a、PRP40b 和 LUC7l (LETHAL UNLESS CBC 7 RL)在内含子 miRNA 的生物合成中起着关键作用^[45]。

pri-miRNA 也在 3'端加尾巴,如尿苷酸化(uridylation)和胞苷酸化(cytidylation),这促进了 pri-miRNA 的加工^[17]。核苷酸转移酶(nucleotidyl transferase) HESO1 (HEN1 SUPPRESSOR 1)是一种介导 pri-miRNA 尿苷酸化和胞苷酸化的关键蛋白,

而另外 2 种核苷酸转移酶 NTP6 和 NTP7 也有助于 pri-miRNA 的胞苷酸化^[17]。

RNA 甲基化, 如 *N*⁶-甲基腺苷(*N*⁶-methyladenosine, m⁶A), 是一种基因调控的重要机制^[46]。拟南芥中的 mRNA 腺苷甲基化酶(mRNA adenosine methylase, MTA)将 m⁶A 沉积在 pri-miRNA 上, 促进了 pri-miRNA 的加工, 并影响 D-小体的组装^[47]。

1.1.3 miRNA 的修饰和周转 在 pri-miRNA 加工后, sRNA 2'-*O*-甲基转移酶(2'-*O*-methyltransferase) HEN1 替代 SE 与 DCL1 和 HYL1 相互作用, 并在 miRNA 双链的 3'端催化 2'-*O*-甲基化以稳定 miRNA^[48]。*hen1* 功能丧失突变体表现出几乎所有的 miRNA 的丰度降低, 以及 miRNA 的分子大小也不同, 从而导致了 miRNA 3'端到 5'端的截短和 3'端尿苷酸化。3 个 sRNA 降解核酸酶(*SMALL RNA-DEGRADING NUCLEASE*)基因 *SDN1*、*SDN2* 和 *SDN3* 编码 3'到 5'核酸外切酶(exonuclease), 它们在野生型和 *hen1* 突变体中在降解 miRNA 和 siRNA 中具有冗余功能^[49-50]。*SDN1* 的核酸外切酶活性被 miRNA 的 3'端甲基化部分抑制^[49], 从而支持了 3'端甲基化在保护 miRNA 中的作用。在拟南芥、水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)的 *hen1* 突变体中, miRNA 经历了 3'端尿苷酸化, 其中, miRNA 的甲基化被去除^[51]。在拟南芥 *hen1* 突变体中, HESO1 和 URT1 (UTP:RNA URIDYLTRANSFERASE 1)尿苷酸化未甲基化的 miRNA, 导致 miRNA 降解^[52-53]。HESO1 的功能丧失部分地挽救了 *hen1* 突变体的发育缺陷, 伴随着 miRNA 积累增加和 3'端尿苷酸化减少^[52]。这些结果表明, 3'端尿苷酸化引导 miRNA 的降解以降低其调节功能。在体外, 当 AGO1 结合的 miR165/miR166 被 URT1 尿苷酸化时, miR165/miR166-AGO1 复合物的切割活性被降低^[53], 这表明除 miRNA 的稳定性外, 3'端尿苷酸化也调控 miRNA 活性。总之, HEN1 在调节 miRNA 的周转和功能中起着关键作用; 它能够甲基化 miRNA 以防止尿苷酸化, 尿苷酸化导致 miRNA 降解并降低 miRNA 功能。

1.2 siRNA 的生物合成与修饰

1.2.1 24 nt siRNA 的生物合成 hc-siRNA 来源于异染色质基因组区域的转座子, 长度为 24 nt, 在 RNA 指导的 DNA 甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)中起作用。它们是植物中最丰富的 siRNA, 在拟南芥中占 siRNA 群体的 90%以上^[54]。hc-siRNA 的生物合成起始于植物专一的 DNA 依赖的 RNA 聚合酶(DNA-dependent RNA polymerase)

Pol IV 的转录, 随后由 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 2 (RNA dependent RNA polymerase 2, RDR2)合成第二条 RNA 链。然后, dsRNA 被 DCL3 切割成 hc-siRNA 双链并甲基化, 单链被装载到 AGO4、AGO6 或 AGO9 上形成 RISC^[13-14,55](图 2)。

Pol IV 的转录起始于类 Pol II (Pol II-like)转录起始位点; 即转录区域第一个核苷酸的直接上游核苷酸高度偏向于嘧啶(Y), 而转录区域的第一个核苷酸偏向于嘌呤(R), 表明尽管 Pol II 和 Pol IV 作用于不同的基因组区域, 但它们之间的转录起始位点偏好是保守的^[56-57]。Pol IV 可以在具有 YR 序列的多个位置启动转录, 从单个位点产生多个短的转录本, 通常为 26~45 nt^[56-57]。含有 SNF2 结构域的染色质重塑因子 CLSY1 (CLASSY 1) ~CLSY4^[58]和同源结构域的 DNA 结合蛋白 SHH1 (SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1)/DTF1 (DNA-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR 1)^[59-60]一起招募 Pol IV 使 hc-siRNA 位点能够转录。

生化分析发现, Pol IV 与 RDR2 发生物理相互作用来形成双重 RNA 聚合酶复合物(dual-RNA-polymerase complex)^[59]。结构研究表明, Pol IV 和 RDR2 的活性是紧密耦合的, 因为 Pol IV 转录本被直接输送到 RDR2; Pol IV 的原路返回(backtracking)使 RDR2 能够合成 hc-siRNA 前体的第二条链[称为 Pol IV-RDR2 (P4R2) RNA]^[61-62]。双链 P4R2 RNA 被 DCL3 切割, 每个前体产生一个 hc-siRNA^[56-57]。通过将 Pol IV、RDR2 和 DCL3 与 DNA 模板和核苷三磷酸(ribonucleotide triphosphate)共孵育, hc-siRNA 的生物合成可以在体外重复, 这表明这 3 种酶足以用于 hc-siRNA 的生物合成^[63]。P4R2 RNA 的切割不仅产生 24 nt hc-siRNA, 而且产生 23 nt siRNA^[64]。然而, AGO4 几乎完全与 24 nt siRNA 免疫沉淀^[65], 这表明 23 nt siRNA 是 hc-siRNA 双链的乘客链(passenger strand)^[63]。P4R2 RNA 被 DCL3 加工的生化研究表明, 哪个前体末端被切割, 以及是否产生 24 nt 和/或 23 nt siRNA, 取决于 P4R2 RNA 的 Pol IV 链的第一个核苷酸和 RDR2 在 Pol IV 转录本末端内的起始位置^[66]。Wang 等^[67]对 DCL3-P4R2 RNA 复合物进行了结构分析, 结果表明, DCL3 的 PAZ (Piwi/Argonaute/ Zwiille)和 RNase IIIb 结构域仅测量 P4R2 RNA 一条链的 5'端核苷酸和 RNase IIIb 结构域切割位点之间的 24 nt 的距离。RNase IIIa 结构域切割所测量的链产生 24 nt siRNA, 而 RNase IIIc 结构域切割未测量的链以产生 23 nt siRNA^[67]。

一类胚乳专一的 siRNA (siRNA endosperm-specific, siren)位点也在水稻胚乳中被发现, 这些位点在胚乳中高度表达^[68]。在胚乳中积累的 siren 具有母系偏向性, 被认为是从种皮转移到子代组织(胚乳和胚/受精卵), 以反式介导蛋白基因的 DNA 甲基化^[69-70]。Siren 产生的 sRNA 不仅诱导 DNA 甲基化, 而且调节邻近基因的表达^[69-70]。Siren 与 hc-siRNA 不同, 因为它们来源于数量较少的蛋白编码基因附近的位点, 而不是转座子。然而, siren 的生物合成似乎与 hc-siRNA 的生物合成相似, 因为它们依赖于 Pol IV 和 RDR2^[69-70]。此外, *CLSY1~CLSY4* 基因在拟南芥组织中差异表达, 以协同调节 hc-siRNA 和 siren 的积累, 从而调节 DNA 的甲基化模式。Siren 在胚珠中高度富集, 主要依赖于 CLSY3, 在较小的程度上依赖于 CLSY4^[71]。因此, siren 似乎在胚珠和种子组织中特异地介导 RdDM, 而 hc-siRNA 在其他组织中负责调控 RdDM。到目前为止, siren 仅在拟南芥、油菜(*Brassica napus*)和水稻中被报道^[69,71-72], 因此, 它们在被子植物中的保守程度需要进一步研究。

1.2.2 次级 siRNA 的生物合成 次级 siRNA 是指其生物合成是由其他 miRNA 或 siRNA 产生的 siRNA。相位次级 siRNA (phased secondary siRNA, phasiRNA)由长的 RNA 前体产生, 产生的 siRNA 以精确的头尾排列(head-to-tail arrangement)映射到前体。这种排列的结果是: 前体首先在特定的靶位点被 RISC 切割, 形成双链, 然后被 DCL 蛋白按顺序方式切割(图 2)。根据每个位点的编码潜力, 产生 phasiRNA 的基因组位点(也称为 PHAS 位点)可以分为蛋白编码位点和非编码位点^[73]。PHAS 前体, 无论是 mRNA 还是长链非编码 RNA, 都是 Pol II 的产物。产生 phasiRNA 的蛋白编码基因包括那些来自不同家族的蛋白编码基因; 这些基因的 phasiRNA 生物合成通常遵循一次打击模型(one-hit model), 但具有不同的 miRNA 触发因子^[73]。来源于非编码位点的 phasiRNA 具有反式作用 siRNA (*trans*-acting siRNA, tasiRNA)和生殖 phasiRNA (reproductive phasiRNA)的显著特征。

拟南芥基因组含有 8 个已知的 tasiRNA 产生位点(即 TAS 位点), 属于 TAS1~TAS4 4 个家族。tasiRNA 的生物合成通过 2 条途径产生^[73]; 这 2 条途径都起始于由 miRNA 介导的 TAS 前体的切割。一个前体切割的片段被 RDR6 转化为 dsRNA, 并被 DCL4 和 DRB4 (DOUBLE-STRANDED RNA-BINDING

PROTEIN 4)辅助, 反复切割以产生 21 nt phasiRNA 双链, 然后被分选并装载到 AGO 蛋白上。除了这些相似的步骤之外, 这 2 条途径也有一些差异。普遍的一次打击途径(one-hit pathway)起始于 TAS 前体被含有 5' U 22 nt 的 miRNA 触发因子切割, 这优先引导 miRNA 被装载到 AGO1。尽管已经提出了几种其他的假设, 但 22 nt 长度似乎是 miRNA 触发次级 siRNA 生物合成的关键^[74]。由 AGO1-miRNA 切割产生的 3'片段是 dsRNA 合成和随后产生 tasiRNA 的底物。在不常见的 2 次打击途径(two-hit pathway)中, 前体被 AGO7-miR390 复合物在 2 个位点靶向: 3'-近端靶点被切割, 而 5'-近端靶点未被切割。在切割时, 5'片段作为 RDR6 的底物^[75]。这些 tasiRNA 生物合成的途径/模型大多基于拟南芥 tasiRNA 的特征。然而, 对拟南芥之外的物种进行分析时发现, 在这些物种中其途径也存在显著的差异, 包括 miRNA 触发因子的长度以及触发因子与 TAS 前体之间的配对^[76-77]。因此, 这里描述的途径还需要从更广泛的物种中获得更多的数据来支持。

生殖 phasiRNA 最初在草本植物、随后在其他被子植物中被鉴定。在花药中富集的生殖 phasiRNA 可分为 2 种亚类型, 即 21 nt 和 24 nt phasiRNA。在水稻和玉米中, 这 2 种亚类型的 phasiRNA 分别在花药发育的减数分裂前和减数分裂期间优先积累^[78]。生殖 phasiRNA 的生物合成遵循一次打击模型, miR2118 家族触发 21 nt phasiRNA 的合成, 而 miR2275 触发 24 nt phasiRNA 的合成。在玉米中, HD-ZIP IV (homeodomain-leucine zipper IV)家族转录因子 OCL4 (OUTER CELL LAYER 4)可能是 21 nt phasiRNA 的关键转录调控因子^[79], 而 3 个 bHLH 家族转录因子 MS23 (MALE STERILE 23)、MS32 和 bHLH12 在调控 24 nt phasiRNA 生物合成中起着关键作用^[80]; 然而, OCL4 和 bHLH 是否直接激活生殖 PHAS 位点还不清楚。生殖 phasiRNA 生物合成途径存在一些差异, 包括不需要 RDR6 从发夹状结构产生的 24 nt phasiRNA^[81], 以及其前体缺乏已知 miRNA 靶点的一组 24 nt phasiRNA^[82-83]。

次级 siRNA 也可以在不同的发育阶段产生, 例如, 表观遗传激活的 siRNA (epigenetic-activated siRNA, easiRNA), 这是一类在花粉营养细胞中富集的 21 nt 或 22 nt siRNA^[84]。Creasey 等^[85]证明, easiRNA 来源于激活的转座子, 并由 DCL1 依赖的 miRNA 触发。DCL1、DCL4 或 RDR6 的缺失导致

21 nt easiRNA 的缺陷, 这表明 DCL4 和 RDR6 参与 easiRNA 和 tasiRNA 的生物合成^[85]。其他的研究表明, DCL2、AGO1、AGO2、AGO6 和 Pol IV 也参与 easiRNA 的生物合成或活化^[86-87], 以及 easiRNA 的生物合成起始于减数分裂期间或之后^[88]。然而, easiRNA 的生物合成途径仍然在很大程度上不清楚, 它在拟南芥之外的其他物种中的普遍性也不清楚。研究发现, 父系 Pol IV 的缺失抑制了 easiRNA 的生物合成, 并绕过了父系基因组过量引发的种子败育^[86-87]。这些发现表明, easiRNA 调控基因组的丰度平衡。

除上述的 sRNA 外, 还有一些其他类型的植物 sRNA 也被报道, 如天然反义转录本 siRNA (naturally antisense transcript siRNA, natsiRNA)、22 nt siRNA 和转运 RNA 片段(transfer RNA fragment, tRF)^[13,89-90], 但它们的特征仍然了解较少, 甚至存在争议。

天然反义转录本 siRNA。具有互补的内源转录本退火(anneal), 产生的 dsRNA 被 DCL 蛋白加工, 从而产生介导基因沉默的 natsiRNA^[90]。尽管已经报道了几个关于这类位点的计算预测(computational prediction), 但在植物中还没有鉴定到单个 *trans*-natsiRNA 的功能作用^[91]。因此, 本节主要关注 *cis*-natsiRNA, 它们来源于同一转录位点但转录方向相反。已报道的 *cis*-natsiRNA 的生物合成途径似乎具有多样性, 其中的一条途径依赖于 Pol IV、RDR2 和 DCL3, 类似于 hc-siRNA; 其余的几条途径依赖于 DCL1、DCL2 和/或 DCL3, 以及其他的 sRNA 生物合成蛋白^[92]。拟南芥中的一些基因被 *cis*-natsiRNA 沉默。盐胁迫诱导了 *SRO5* [一个对 *P5CDH* 的反义转录本, *P5CDH* 编码 Δ -吡咯啉-5-羧酸脱氢酶(Δ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase)]。正义和反义 2 种转录本形成 dsRNA, dsRNA 被 DCL2 加工以产生 24 nt siRNA, 进而触发从 *P5CDH* 转录本产生 DCL1 依赖的 21 nt phasiRNA, 并下调 *P5CDH* 的表达。在拟南芥花粉中, 重叠的 *KPL* (*KOKOPELLI*) 和 *ARI14* (*ARIADNE 14*) 基因的转录本产生一种精子专一的 natsiRNA, 该 natsiRNA 通过沉默 *ARI14* 来实现成功的受精^[93]。在这些研究中, natsiRNA 似乎通过切割来沉默靶 mRNA; 而在其他的一些研究中, natsiRNA 参与介导 DNA 和/或组蛋白甲基化^[94]。

22 nt siRNA。拟南芥 DCL2 是一种 RNase III 家族的核糖核酸内切酶(dicer)蛋白, 它加工病毒产生 siRNA, 但当其他的 DCL 缺失时, 它也产生内源 22 nt siRNA。在拟南芥突变体中已观察到 22 nt siRNA

的大量积累, 这些突变体缺乏细胞质 RNA 衰减和 DCL4 活性, 导致发育缺陷, 如叶片扩展和色素沉积减少^[95]。这些缺陷可以通过 *dcl2* 或 *rdr6* 突变来修复, 这表明它们是由 DCL2-和 RDR6-依赖的 22 nt siRNA 的异位积累引起的。转录组(transcriptome)和翻译组(translatome)分析进一步表明, *NIA1/NIA2* 基因[编码硝酸还原酶(nitrate reductase)]产生的 22 nt siRNA 占 22 nt siRNA 的近一半, 并由 AGO1 装载, 抑制其同源 mRNA 以及其他 mRNA 的翻译, 从而抑制植物生长并增强对氮缺乏的响应^[95]。有研究表明, 野生型大豆(*Glycine max*)积累丰富的 DCL2 依赖的 22 nt siRNA^[96]。大豆 DCL2 蛋白以具有长反向重复的 Pol II 转录本作为底物, 类似于芦笋(*Asparagus officinalis*)和百合(*Lilium lancifolium*)中存在的生殖 24-PHAS 前体^[81], 这表明大豆中 22 nt siRNA 的生物合成可能不需要 RDR6。DCL2 依赖的 22 nt siRNA 通过触发查尔酮合酶(chalcone synthase)转录本的次级 siRNA 来调控大豆种子的颜色^[96]。总之, 这些研究表明, 根据生物合成(是否依赖 RDR6)、分子活性和发育功能, 植物内源 22 nt siRNA 不可能是保守的。22 nt siRNA 在玉米、木薯(*Manihot esculenta*)和几种菊科植物中也很丰富^[97]。显然, 需要对不同的植物物种开展更多的研究来了解 22 nt siRNA 的差异。

转运 RNA 片段。在典型的 tRNA 生物合成途径中, tRNA 前体(tRNA precursor, pre-tRNA)由 RNA 聚合酶 III (RNA polymerase III, Pol III)转录, 并经历一系列的成熟事件, 包括除去 5'前导序列(5' leader)和 3'尾随序列(3' trailer)、内含子剪接、3'端 CCA 残基的添加和共价修饰。成熟的 tRNA 从细胞核输出到细胞质, 在翻译中发挥作用^[98]。对动物、酵母和植物的研究表明, 成熟的 tRNA 可以被核酸内切酶(endonuclease)切割产生 tRF^[89]。tRF 主要以 tRF-5、tRF-3、5' tRNA 半分子(5' tRNA half)和 3' tRNA 半分子的形式存在, 这取决于它们的前体 tRNA 分子。tRF-5 和 tRF-3 RNA 分别来源于 tRNA 5'端和 3'端, 长度约为 13~30 nt; 它们是由 RNase T2 家族的核酸内切酶切割 tRNA 的 D 和 T Ψ C 环产生的^[89]。拟南芥 RNase T2 家族成员 RNS1 和 RNS3 是 tRF-5 生物合成所必需的^[99]。DCL1 也参与拟南芥花粉中 tRF-5 的生物合成^[100]。然而, 尽管对不同的组织进行了分析, 但有研究表明, DCL1 在 tRF 生物合成中不起主要作用^[101]。因此, 目前的证据表明, 在植物 tRF 的生物合成中, RNase T2 酶起着关键作用, 而 DCL 的

作用是有争议的。

2 sRNA 的作用机制

2.1 Argonaute 蛋白对 sRNA 的分选和装载

sRNA 被装载到它们的效应器(effector) AGO 蛋白上。AGO 蛋白是一类庞大的蛋白家族,是组成 RISC 复合物的主要成员。AGO 蛋白由 N 端、PAZ、MID 和 PIWI (p-element induced wimpy testis) 4 个结构域组成^[13-14]。PAZ 结构域结合到 siRNA 的 3'端, PIWI 结构域赋予切割体(slicer)以内切酶活性; PAZ 和 PIWI 2 个结构域与 siRNA 和目标 mRNA 相互作用,从而导致目标 mRNA 的切割或者翻译抑制。在种子植物中,AGO 蛋白家族高度多样化,形成了 3 个主要的系统发育分支: AGO1/AGO5/AGO10、AGO2/AGO3/AGO7 和 AGO4/AGO6/AGO8/AGO9 (基于拟南芥蛋白而命名)^[102]。对拟南芥的研究表明, sRNA 的 5'端核苷酸是其分选(sorting)和装载(loading)的关键决定因素之一; AGO1 优先与具有 5' U 的 sRNA 结合, AGO2、AGO4、AGO6、AGO7 和 AGO9 优先与具有 5'A 的 sRNA 结合,而 AGO5 优先与具有 5'C 的 sRNA 结合^[55]。

对拟南芥 AGO1、AGO2 和 AGO5 的结构分析表明, AGO 蛋白的 MID 结构域感知 sRNA 的 5'端核苷酸以进行分选^[103]; AGO10 中央裂缝(central cleft)中的一个环对于 miR165/miR166 的选择性装载是关键的^[104]。sRNA 的长度对于 AGO 装载的分选是另一个关键的决定因素,具有 21 nt 和 22 nt sRNA 优先与 AGO1/AGO5/AGO10 和 AGO2/AGO3/AGO7 进化枝的成员结合,而 24 nt sRNA 优先与 AGO4/AGO6/AGO9 结合^[55,105]。sRNA 双链的二级结构也影响它们在 AGO 上的装载。miR165/miR166 具有 5' U, 可以被装载到 AGO1 上,但 AGO10 对 miR165/miR166 的亲合力高于 AGO1,因为 AGO10 的位置 12 与成熟双链中 2 个相邻的匹配(位置 10 和位置 11)有一个错配(mismatch)^[105]。同样, miRNA 双链位置 11 的错配有助于 miR390 和 AGO7 之间的专一相互作用^[106], miRNA 双链位置 15 的碱基配对对于 AGO1 和 AGO2 之间的 miRNA 分选也是重要的^[107]。除 miRNA 外,对水稻和玉米中 21 nt 生殖 phasiRNA 的分析表明,分别在位置 14 和位置 19 富集大量的 U 和 G,这表明这些核苷酸位置以及 5'端核苷酸影响 phasiRNA 装载到 AGO 蛋白上^[108]。

在 miRISC 形成过程中, 5'端热力学稳定性较低

的链被优先选择为引导链,一些蛋白包括上述的 HYL1、RS40 和 RS41 都参与了这一过程^[109]。miRNA 在细胞核中被装载到 AGO1 上, AGO1 和 miRISC 可以在细胞核和细胞质之间穿梭(shuttling)^[110]。穿梭是由 AGO1 蛋白序列中的核定位信号(nuclear localization signal)和核输出信号(nuclear export signal)以及输出蛋白 1 (exportin-1)实现的。相反, phasiRNA 和 hc-siRNA 在细胞质中被装载到 AGO 蛋白上^[110]。

2.2 miRNA 的作用机制

在植物中, miRNA 主要通过靶转录本的切割来沉默基因表达,其次是抑制翻译活性,在很少的情况下指导 DNA 的甲基化(图 2); 这些不同的作用方式在很大程度上取决于 miRNA 和装载它们的 AGO 蛋白^[13]。转录本的切割取决于 miRNA 指导的 AGO 的切割活性; 已经在拟南芥中证明了 AGO1、AGO2、AGO4、AGO7 和 AGO10 具有切割活性^[111]。AGO 蛋白的 PIWI 结构域中的氨基酸催化三联体切割具有完全或几乎完全互补的 miRNA 的靶转录本^[111]。切割后,未加帽的 3'片段被 5'-3'核糖核酸内切酶 XRN4 降解; 5'片段被 HESO1 尿苷酸化,并被 RICE1 (RISC-INTERACTING CLEARING 3'-5' EXORIBONUCLEASE 1)和 RICE2 降解^[112]。值得注意的是,尽管被 miRISC 切割的大多数转录本将被降解,但有一亚组的切割片段可以被 RDR6 转化为 dsRNA,并通过 phasiRNA 生物合成途径被 DCL 蛋白加工。

在 miRNA 的翻译抑制中, miRISC 靶向不同的转录本区域产生不同的结果。靶向转录本的 5'非翻译区(5' untranslated region, 5'UTR)阻断核糖体(ribosome)的招募和翻译起始,而靶向开放阅读框(open reading frame)阻断翻译延长^[113]。在这 2 种情况下,核糖体活性很可能通过空间阻碍被 miRISC 阻断。miRISC 靶向 3'UTR 也抑制翻译启动,但这似乎是 miRNA 的一种罕见活性,因为它需要在 3'UTR 中的多个靶位点来进行有效的抑制^[113]。miRISC 抑制翻译发生在内质网上,以及同时需要与微管动力学(microtubule dynamics)或 miRNA 去帽相关的蛋白参与^[114]。此外, DRB2 对于 miRNA 抑制翻译是必需的,这表明 miRNA 是指导切割转录本还是抑制翻译取决于 DCL1 相互作用蛋白 DRB1 (又称 HYL1)和 DRB2 的活性^[115]。

在很少的情况下, miRNA 指导 DNA 的甲基化,而不是切割转录本或抑制翻译。拟南芥 miR165/

miR166 介导 HD-ZIP III 家族转录因子基因 *PHB* (*PHABULOSA*) 的 DNA 甲基化, 可能是通过与新生的 *PHB* 转录本的碱基配对。在水稻中, 24 nt miRNA 类似于 hc-siRNA, 因为它们是由 DCL3 而不是由 DCL1 产生的, 并被装载到 AGO4 上以指导 DNA 甲基化^[116]。miRNA 指导 DNA 甲基化的罕见性表明, DNA 甲基化可能是它们在特定的发育环境中所需的一种特异性的作用, 并表明由 Pol IV 产生的 sRNA 不能靶向 RdDM^[13]。

除少量编码 NB-LRR (nucleotide-binding and leucine-rich repeat) 或其他触发 phasiRNA 蛋白家族和长链非编码 RNA 的 mRNA 外, miRNA 主要靶向编码转录因子的 mRNA^[117]。通过调控转录因子基因, miRNA 作为植物发育和对非生物或生物胁迫反应的关键调控因子起作用^[118-119]。

2.3 异染色质小干扰 RNA 的作用机制

Pol IV 依赖的 hc-siRNA 通过 RdDM 途径来调控植物基因组的稳定性和基因表达。在典型的 RdDM 途径中, hc-siRNA 靶位点由另一种植物专一的 RNA 聚合酶 V (polymerase V, Pol V) 转录, 产生非编码的转录本。虽然 Pol V 转录本仍然附着在其基因组位点上, 但 hc-siRNA-AGO4/AGO6 复合物通过序列互补靶向转录本, 并招募 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase) DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2), 在所有的序列 (CG、CHG 和 CHH, 其中 H = A/C/T) 背景下介导 Pol V 转录位点的从头 DNA 甲基化^[120-121] (图 2)。除涉及由 Pol IV、RDR2 和 DCL3 产生的 hc-siRNA 典型途径外, 还有一些非典型的 RdDM 途径, 它们是由其他机制产生的 siRNA 通过不同的位点进入^[121]。RdDM 最典型的生物学功能是沉默转座子。

转座子是基因组 DNA 的片段, 可以通过复制-粘贴 (copy-and-paste) 或剪切-粘贴 (cut-and-paste) 机制在染色体位点之间移动。这些转座子可以破坏基因或基因调控区, 因此, 植物已进化出了沉默转座子的机制^[122]。转座子是 hc-siRNA 最普遍的靶点, 这表明通过转座子沉默来维持基因组的完整性是 hc-siRNA 的主要作用^[120]。反转录转座子 (retrotransposon) EVD (EVADÉ) 是最早发现的被 24 nt hc-siRNA 沉默的转座子之一^[123]。随后对 EVD 的分析揭示了从 PTGS 向 RdDM 介导的转录基因沉默过渡的关键机制, 涉及从产生 21 nt 或 22 nt siRNA 转换为产生 24 nt siRNA^[124]。然而, RdDM 并不是转

座子沉默的唯一机制, 在拟南芥 RdDM 缺陷突变体中只有少数转座子被激活^[125]。对玉米 RdDM 突变体的研究表明, 基因附近的 RdDM 活性对于维持活跃转录的染色质区域和相邻转座子之间的边界是重要的^[126]。

对拟南芥的早期研究表明, 抑制 RdDM 介导的 *FWA* (*FLOWERING WAGENINGEN*) 基因启动子区 SINE 相关的直接重复序列对正确的开花时间至关重要, *FWA* 基因编码同源结构域 (homeodomain) 转录因子^[127]。对其他植物物种包括番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[128]、油菜^[129]、芥菜 (*Capsella rubella*)^[88] 和水稻^[130-132] RdDM 突变体的研究揭示了 RdDM 在营养 (如叶片) 和/或生殖 (如小孢子、花粉和种子) 发育中的关键作用。Siren 也是 Pol IV 依赖的 24 nt siRNA (类似于 hc-siRNA)。由于 siren 可以指导生殖组织中的 DNA 甲基化^[70-71], Pol IV/Pol V 突变体的生殖缺陷是否由于 hc-siRNA 或 siren 的功能丧失引起的还不清楚。此外, RdDM 也参与了基因组印迹 (genomic imprinting) 和倍性间杂交障碍 (interploidy hybridization barrier) 的调节^[133-134]。

2.4 相位次级小干扰 RNA 的作用机制

tasiRNA 介导切割一组不同基因的转录本, 以调节植物发育或对胁迫做出反应。在拟南芥中, *TASI* siRNA 靶向热反应基因 *HTT1* (*HEAT-INDUCED TASI TARGET 1*) 和 *HTT2*, 以抑制耐热性。*TAS3* siRNA 靶向生长素反应因子 (auxin response factor, ARF) 家族转录因子, 以调控许多与植物发育和反应有关的生长素信号, 如叶片发育和幼年期到成年期的过渡^[135]。*TAS4* siRNA 靶向 MYB 家族转录因子的 mRNA, 以调节花青素 (anthocyanin) 的生物合成^[136] 和毛状体 (trichome) 的发育^[137]。虽然 *TAS1* 和 *TAS2* 仅仅在拟南芥中被报道, 但 *TAS3* 广泛存在于陆生植物中, 而 *TAS4* 在真双子叶植物中是保守的^[73]。除拟南芥之外, 还存在一些额外的 *TAS* 位点或家族 (*TAS5~TAS10*)^[138]; 然而, 这些较少表征的位点在植物中表现出有限的保守性。

21 nt 生殖 phasiRNA 可以介导反式靶点 mRNA (水稻) 或其自身前体 (水稻和玉米) 的切割^[139-140]。对玉米和/或水稻中 OCL4 (假定的 21 nt phasiRNA 途径转录因子的调控因子)、miR2118 (21 nt phasiRNA 的触发因子) 和 AGO5 同源物 (21 nt phasiRNA 的效应因子) 的研究揭示了 21 nt phasiRNA 在发育中的功能。玉米 *ocl4* 突变体缺乏 21 nt phasiRNA, 表现出

温度敏感的雄性不育(temperature-sensitive male sterility, TGMS)^[79]。水稻中—亚组 *MIR2118* 拷贝的敲除导致雄性不育(male sterility), 并降低 21 nt phasiRNA 的丰度^[141]。值得注意的是, 部分 *mir2118* 突变体也表现出雌性不育(female sterility), 这表明 *mir2118* 和潜在的 21 nt phasiRNA 在调节雌性种系(germline)发育中起作用^[141]。在水稻中, AGO5c/MEL1 (MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE 1)蛋白装载—亚组 21 nt 生殖 phasiRNA, 干扰 AGO5c 基因引起雄性不育^[142]。在玉米中, AGO5b/MAGO1 (MALE-ASSOCIATED ARGONAUTE-1)和 AGO5c/MAGO2 在调节雄性育性中起冗余作用, 因为只有敲除或双敲除突变体才显示出雄性不育^[143]; 而另一项研究则表明, AGO5c 是典型的玉米突变体 *ms28* (male sterile 28)的原因基因(causal gene), 是雄性育性唯一所必需的^[144]。Lee 等^[143]也证明了 AGO5b 和 AGO5c 装载热诱导的 21 nt phasiRNA 以调节雄性生殖细胞中反转录转座子的活性, 以及 *ago5b;ago5c* 敲除突变体表现出温度敏感的雄性不育^[143]。

24 nt 生殖 phasiRNA 的分子功能仍然不够明确。它们可能介导自身位点的 CHH 甲基化, 但这似乎不是它们的唯一功能^[145]。玉米 *DCL5* 的一些功能丧失突变等位基因在 24 nt 生殖 phasiRNA 生物合成中专一地起作用, 它们缺乏 24 nt phasiRNA, 并表现出温度敏感的雄性不育表型^[146]。*DCL5* 是 *DCL3* 的复制品, 在 24 nt phasiRNA 生物合成中的特殊作用归因于 *DCL3* 和 *DCL5* 的 PAZ 结构域的差异, 这 2 个结构域对底物 siRNA 前体的 5'磷酸和 3'突出物表现出不同的偏好^[147]。*MS23*、*MS32* 和 *bHLH122* 是假定的 24 nt phasiRNA 生物合成的转录因子的调控因子, 其单突变体表现出完全雄性不育; 在这些突变体中 24 nt phasiRNA 的丰度也显著降低^[80]。21 nt phasiRNA 途径存在于所有已鉴定的单子叶植物中, 而 24 nt phasiRNA 在被子植物中较广泛, 但并不是普遍的^[73]。因此, 已有的数据表明, 21 nt 和 24 nt phasiRNA 在调节雄性育性中起重要和保守的作用。

2.5 转运 RNA 片段的作用模式

在拟南芥花粉中, 19 nt tRF 被 AGO1 装载, 可以介导反转录转座子 Gypsy 家族的切割^[100], 也有证据表明 tRF 在翻译水平上沉默基因表达。对南瓜 (*Cucurbita maxima*)的研究表明, 韧皮部汁液中的 RNA 分子能够以非专一的方式抑制翻译, tRF 可能起主要作用^[148]。拟南芥中的一组 tRNA 半分子和其

他的 tRF 可以抑制体外翻译^[149]。然而, 通过 tRF 的抑制翻译机制在很大程度上还不清楚。例如, tRF 是靶向 mRNA 还是 tRNA? 该过程是否需要 AGO?

tRF-AGO1 RISC 对 Gypsy 转座子的切割表明, tRF 参与调控基因组的稳定性^[100]。此外, tRF 常常被非生物和生物胁迫诱导, 如氧化胁迫、紫外线辐射、冷、热、低磷酸盐和病原体感染^[150]。研究表明, 在未被感染时, 5' tRF 与 AGO1 形成 RISC 来抑制病原体的防御^[151]。然而, 抑制防御反应可能不是 tRF 的普遍作用, 因为它们更频繁地被病原体感染诱导而不是抑制^[152-153], 这表明 tRF 很可能作为病原体防御的激活剂发挥作用。因此, 关于 tRF 的功能仍然有许多问题需要研究。例如, 在胁迫反应中, tRF 直接调控哪些靶 RNA, 以及它们是如何被调节的(例如是切割 RNA 还是抑制翻译)?

3 sRNA 对种子发育、休眠和萌发的作用

3.1 对种子发育的作用

3.1.1 sRNA 对种子发育的调控 sRNA 参与种子成熟过程中基因表达的调控^[154-156]。在拟南芥胚发育的不同阶段, 利用低通量 sRNA 测序(low-input small RNA sequencing)已经鉴定了 349 个 miRNA 介导的靶转录因子的降解和抑制, 其中, 22 个 miRNA 家族在种子成熟后期阶段积累, 并在成熟的绿色胚中持续存在^[156]。这些家族包括 miR156、miR167、miR170/171、miR390、miR394 和 miR403^[156]。成熟胚中 miR156 的水平增加, miR172 和转录因子 SPL3、SPL4 和 SPL5 的水平降低, 从而延缓发育转变并使种子处于休眠状态^[157](图 3)。

在水稻中, 多个 sRNA 包括 miR156、miR159、miR160、miR396 和 miR397 调控籽粒的大小与性状^[158-159]。其中, *OsmiR156* 的不同亚家族产生不同的种子性状。*OsmiR156* 由 12 个基因编码, 它们产生 3 种 *OsmiR156*-5p 异构体和 4 种 *OsmiR156*-3p 异构体^[160]。*OsmiR156* 调控 *SPL* 和 *IPA1* (*Ideal Plant Architecture 1*)基因的表达。*SPL13*、*SPL16* 和 *IPA1* 是籽粒大小的正调控因子^[161-162](图 3), *SPL12* 和 *IPA1* 通过直接调控赤霉素(gibberellin, GA)途径中的多个基因来增强种子休眠^[163-164]。*OsmiR396* 基因家族在水稻中高度保守并高丰度积累; 它由 8 个基因组成, 编码 5 个成熟的异构体; 这些异构体靶向 11 个 GRF (GROWTH REGULATING FACTOR)转录因子的编码基因; 该家族也参与籽粒大小的调控^[165](图 3)。

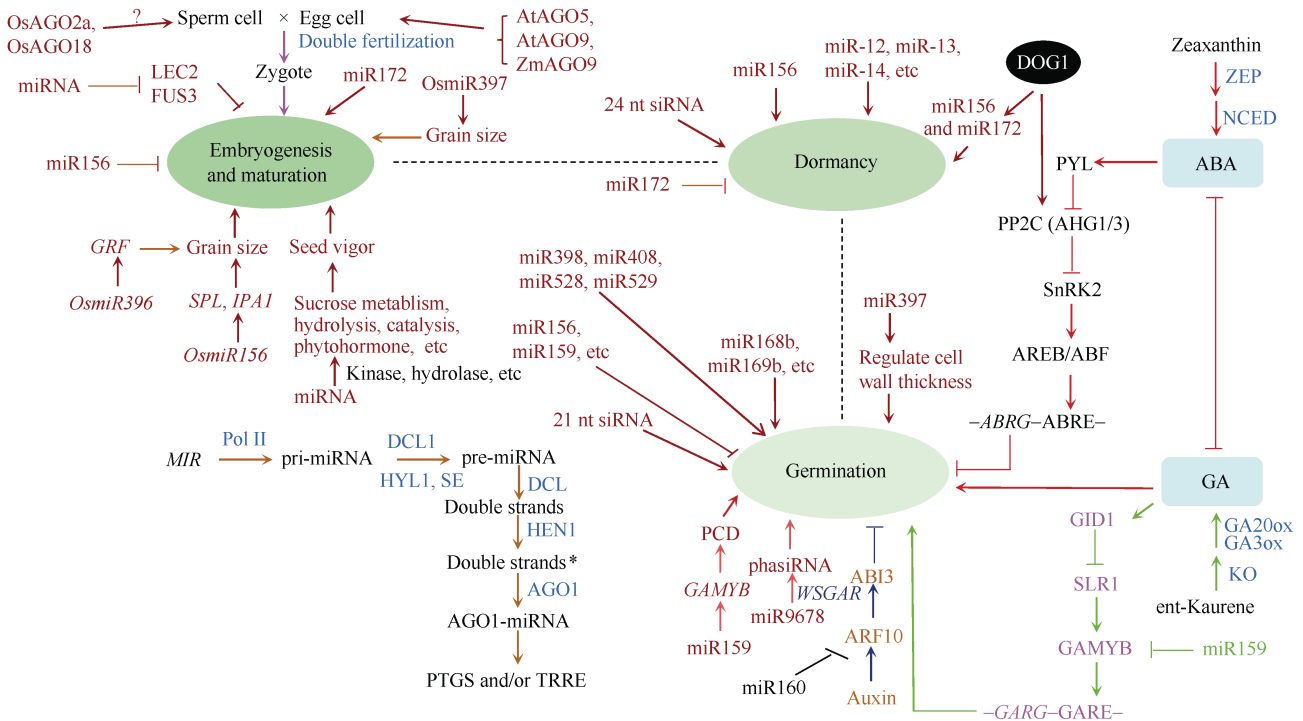


图 3 sRNA 调控种子形成、发育、休眠和萌发的示意图

Fig. 3 Schematic diagram of seed formation, development, dormancy, and germination regulated by sRNAs

小 RNAs (sRNAs) 包括微小 RNAs (miRNAs, miRs) 和小干扰 RNAs (siRNAs), 通过转录后基因沉默或翻译抑制调控编码转录因子和关键调节蛋白的基因表达, 并通过与植物激素、DOG1 和表观遗传因子相互作用在种子形成、发育 (包括种子大小)、休眠和萌发的调控中发挥重要作用。黑色虚线表示种子形成和发育与种子休眠和萌发的相互关系。种子形成与发育是种子休眠和萌发的前提, 休眠种子必须在干藏、冷湿和植物激素处理解除休眠后才能萌发。→ 和 ⊣ 分别表示促进和抑制。ABA: 脱落酸; ABF: ABA 反应元件结合因子; ABI3: ABA 不敏感 3; ABRE: ABA 反应元件; *ABRG*: ABA 反应基因; AGO: Argonaute; AHG1/3: ABA 过敏感萌发 1/3; AREB: ABRE 结合蛋白; ARF10: 生长素反应因子 10; At: 拟南芥; DCL1: DICER-LIKE 1; DML3: DEMETER-LIKE PROTEIN 3; DOG1: 萌发延迟 1; FUS3: FUSCA3; GA: 赤霉素; GA20ox: GA 20 氧化酶; GA3ox: GA 3 氧化酶; GAMYB: 赤霉素诱导的 MYB 转录因子; GARE: GA 反应元件; *GARG*: GA 反应基因; GID1: 赤霉素不敏感矮化 1; GRF: 生长调节因子; HEN1: HUA ENHANCER 1; HYL1: HYPONASTIC LEAVES 1; IPA1: Ideal Plant Architecture 1; KO: 内根-贝壳杉烯氧化酶; LEC2: leafy cotyledon 2; *MIR*: microRNA 基因; NCED: 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶; nt: 核苷酸; Os: 水稻; PCD: 细胞程序性死亡; phasiRNA: 相位次级小干扰 RNA; pol II: RNA 聚合酶 II; PP2C: 蛋白磷酸酶 2C; pre-miRNA: 前体 miRNA; pri-miRNA: 初级 miRNA; PTGS: 转录后基因沉默; PYL: pyrabactin resistance 1/pyrabactin resistance 1-like/regulatory components of ABA receptor; SLR1: SLENDER RICE 1; SnRK2: SNF1 (蔗糖非发酵-1) 相关的蛋白激酶 2; SPL: SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE; TRRE: 翻译抑制; *WSGAR*: 小麦种子萌发相关的 RNA 基因; ZEP: 玉米黄质环氧化酶。

Small RNAs (sRNAs), including microRNAs (miRNAs, miRs) and small interfering RNAs (siRNAs), regulate the expression of genes encoding transcription factors and key regulatory proteins through post-transcriptional gene silencing or translational inhibition. They also play an important role in the regulation of seed formation, development (including seed size), dormancy, and germination by interacting with phytohormone, DOG1, and epigenetic factors. The dashed black line indicates the relationship between seed formation and development with seed dormancy and germination. Seed formation and development are prerequisites for seed dormancy and germination, and dormant seeds can only germinate after dormancy is broken through dry storage, cold-moist treatment, and phytohormone treatment. → and ⊣ represent promotion and inhibition, respectively. ABA: abscisic acid; ABF: ABA-responsive element factor; ABI3: ABA insensitive 3; ABRE: ABA-responsive element; *ABRG*: ABA-responsive gene; AGO: Argonaute; AHG1/3: ABA HYPERSENSITIVE GERMINATION 1/3; AREB: ABRE-binding protein; ARF10: AUXIN RESPONSE FACTOR 10; At: *Arabidopsis thaliana*; DCL1: DICER-LIKE 1; DML3: DEMETER-LIKE PROTEIN 3; DOG1: DELAY OF GERMINATION 1; FUS3: FUSCA3; GA: gibberellin; GA20ox: GA 20-oxidase; GA3ox: GA 3-oxidase; GAMYB: Gibberellin-induced MYB; GARE: GA-responsive element; *GARG*: GA-responsive gene; GID1: GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1; GRF: GROWTH REGULATING FACTOR; HEN1: HUA ENHANCER 1; HYL1: HYPONASTIC LEAVES 1; IPA1: Ideal Plant Architecture 1; KO: ent-kaurene oxidase; LEC2: leafy cotyledon 2; *MIR*: microRNA gene; NCED: 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; nt: nucleotide; Os: *Oryza sativa*; PCD: programmed cell death; phasiRNA: phased secondary siRNA; pol II: RNA polymerase II; PP2C: protein phosphatase 2C; pre-miRNA: precursor miRNA; pri-miRNA: primary miRNA; PTGS: post-transcriptional gene silencing; PYL: pyrabactin resistance 1/pyrabactin resistance 1-like/regulatory components of ABA receptor; SLR1: SLENDER RICE 1; SnRK2: SNF1 (sucrose non-fermenting-1) -related protein kinase 2; SPL: SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE; TRRE: translation repression; *WSGAR*: *WHEAT SEED GERMINATION ASSOCIATED RNA*; ZEP: zeaxanthin epoxidase.

抗 OsmiR160 的 *OsARF18* (一种籽粒大小的负调控因子编码基因) 表达产生较小的籽粒且淀粉粒的积累减少, 这表明 miRNA 可以精确地调控种子发育^[154]。OsmiR397 在幼穗和籽粒中高度表达, 其过表达促进穗分枝并增加籽粒的体积^[155]。这些结果表明通过 miRNA 的转录后修饰将有助于开发出更好的遗传材料, 提高产量。

Xie 等^[166]利用 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) /Cas (CRISPR-associated nuclease) 12SF01 对大豆优良品种‘中黄 302’的 *mir396* 基因进行基因组编辑, 获得了 8 个大豆突变体, 其中在 6 个大豆 *mir396* 基因中具有不同的纯合突变组合。他们对 4 个三重突变体(*mir396aci*、*mir396acd*、*mir396adf* 和 *mir396cdf*) 和 2 个五重突变体(*mir396abcdf* 和 *mir396bcdfi*) 的研究发现, 与野生型‘中黄 302’相比, 所有 *mir396* 突变体的植株都产生较大的种子。田间试验表明, *mir396adf* 和 *mir396cdf* 的产量在适合‘中黄 302’生长的相对高纬度地区显著增加, 而在低纬度地区适度增加。相反, *mir396abcdf* 和 *mir396bcdfi* 在相对高纬度地区因株高增加容易倒伏, 导致产量降低; 但在低纬度地区倒伏较少, 产量增加; 这些研究结果表明, *miR396* 基因功能的丧失导致大豆种子的体积显著增大, 产量增加; *miR396* 基因为培育高产大豆品种提供了有价值的种质资源^[166]。

Yue 等^[20]的研究发现, 与父本(‘11GF5135’)和母本(‘BS1453’)相比, 杂交小麦(‘BS1453×11GF5135’)在种子活力和抗衰老能力方面表现出优势。他们鉴定了 4 种与种子活力相关的 miRNA, 这些 miRNA 的大多数靶标与泛素连接酶(ubiquitin ligase)、激酶(kinase)、蔗糖合酶(sucrose synthase)和水解酶(hydrolase)有关, 涉及淀粉和蔗糖代谢、水解、催化、植物激素信号转导等途径(图 3), 在种子发育中发挥重要作用。此外, 他们还发现 *miR531* 在父本和杂交种中也差异表达, 其靶基因是 α -酮酸脱氢酶复合物(α -ketoate dehydrogenase complex)的 E1 亚基, 该亚基与二氢硫辛酰胺乙酰转移酶(dihydrolipoamide acetyltransferase, E2)和二氢硫辛酸脱氢酶(dihydrolipoyl dehydrogenase, E3)相互作用。此外, *miR156b*、*miR414*、*miR2673b* 和 *miR7826* 通过调节牡丹(*Paeonia suffruticosa*)脂肪酸生物合成和脂质代谢所需基因的表达来控制种子发育^[167] (图 3)。在麻疯树(*Jatropha curcas*)种子发育过程中, 多种 miRNA

(包括 *miR156*、*miR157*、*miR159*、*miR166*、*miR167*、*miR168* 和 *miR396*)靶向与细胞结构、核功能、翻译、运输、激素合成和脂质代谢相关的基因^[168]。木本油料植物水黄皮(*Pongamia pinnata*)在胚胎发生、种子灌浆和脱水阶段的深度测序表明, *miR482a-3p* 在种子发育过程中调控脂肪酸的生物合成^[169]。在椰子(*Cocos nucifera*)中, *miR166a*、*miR397a* 和 *miR398a* 在未成熟的胚乳中高度表达^[170]。

在龙眼(*Dimocarpus longan*)体细胞胚发生过程中, 许多 miRNA 在不同的发育阶段被优先表达: *miR156* 和 *miR166c** 在早期胚培养物中表达, *miR159*、*miR160*、*miR390* 和 *miR398* 在心形和鱼雷形胚阶段表达, *miR167*、*miR168a**、*miR397*、*miR398*、*miR808* 和 *miR5077* 在子叶期胚阶段表达, 而 *miR167*、*miR808* 和 *miR5077* 在成熟胚阶段表达^[171]。*miR166* 的过表达抑制了体细胞胚发生过程中子叶的形成, 导致胚顶端异常发育^[172]。*miR159* 通过负调控其靶点 *LaMYB33* 来维持体细胞胚的成熟^[173]。在火炬松(*Pinus taeda*)中, *miR166* 主要在合子胚和雌配子体中表达; 但 *miR167* 仅在合子胚中被检测到^[174]。

miRNA 生物合成所需的 *DCL1* 突变影响早期胚胎发生的程序。无效突变体(null mutant)的胚发育不会超过球形胚阶段, 其形态缺陷是由胚 miRNA 的积累较少及其靶标上调造成的^[175]。表达模式的改变导致发育不规则, 如细胞过早分化、细胞命运改变、早期组织和分生组织改变^[176]。在 miRNA 生物合成途径中的其他基因突变也发生类似的变化^[177]。Willmann 等^[177]研究表明, miRNA 可以通过抑制成熟调控因子 *LEC2* (leafy cotyledon 2)和 *FUS3* (*FUSCA3*)的表达来发挥作用(图 3)。在 *dcl1* 突变体胚中, *LEC2* 和 *FUS3* 的转录本上调, 而组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylase)等阻遏物则下调。2 个三螺旋转录因子(trihelix transcription factor) *ASIL1* (*ARABIDOPSIS6B-INTERACTING PROTEIN1-LIKE 1*)和 *ASIL2* 与组蛋白脱乙酰酶 *HDA6* 一起在 miRNA 的下游起作用, 抑制早期胚发育过程中的成熟程序^[177]。此外, 在种子发育和成熟过程中, 许多来源于母体组织的 *POL IV* 介导转录的 siRNA 可以调控胚乳基因的表达^[178-179]; 这些 siRNA 占整个家族的 90%^[69]。尿囊素酶(allantoinase)是一种胚乳母系表达的基因和休眠的负调控因子, 其印迹通过 24 nt siRNA 和非典型的 RdDM 途径被甲基化控制, 以促进低温下的种子

休眠^[180]。

3.1.2 sRNA 在种子杂交优势、杂交败育和倍性杂交种中的作用 雄性不育是植物中的一种常见的生物学现象。雄性不育系是作物杂种优势利用和商业化杂交种生产的宝贵育种材料^[181]。研究表明,一些 AGO 成员在植物雄配子和/或雌配子发育中起重要作用。拟南芥中的 AtAGO9 和 AtAGO5^[182]以及玉米中的 ZmAGO9 介导雌配子的形成^[183](图 3)。在水稻中, OsAGO2a 和 OsAGO18 参与小配子体发育^[184](图 3), OsAGO5c/MEL1 在减数分裂前期介导雄性和雌性器官中的生殖细胞分裂^[185](图 3)。玉米基因组包含 17 种预测的 AGO 家族蛋白^[102], 其中, ZmAGO18b、ZmAGO1b 和 ZmAGO5c 在减数分裂期花药中高表达^[186]。Li 等^[144]研究了玉米中一个典型的雄性不育突变体 *ms28* (*male sterile 28*)。该突变体具有正常的雄配子减数分裂过程, 但其绒毡层细胞在减数分裂前期的早期表现出过早的液泡化, 乌氏体(Ubisch body)发育缺陷以及产生无生活力的花粉粒。*Ms28* 编码 AGO 家族蛋白 ZmAGO5c, 其转录本主要在减数分裂前的花药中积累, 且在花粉母细胞(pollen mother cell, PMC)中的丰度更高。转录组分析表明, 与花药发育、细胞分裂和生殖结构发育过程相关的基因在 *ms28* 突变体及其可育同胞植株(sibling plant)之间差异表达。sRNA 测序表明, 在 *ms28* 减数分裂的花药中, siRNA 和 miRNA 的丰度显著改变, 这表明 *ms28* 可能通过 sRNA 介导的表观遗传调控途径调节绒毡层细胞的发育^[144]。

Shi 等^[187]研究表明, AGO1d 分别优先结合 miR2118 和 miR2275 以触发 21 nt 和 24 nt 相位 siRNA90 (phase siRNA90)的生物合成, 以及敲除 *AGO1d* 导致 21 nt 和 24 nt 相位 siRNA 的总体丰度降低以及 TGMS。在较低的温度下, *ago1d* 花药表现出糖和脂质代谢失调, 绒毡层细胞增多^[187]。通过对 sRNA、降解组(degradome)和转录组的多组学分析, 发现 21 nt 相位 siRNA 占水稻花药中 21 nt sRNA 的比例最大, 对低温敏感; 而在 *ago1d* 突变体中 21 nt 相位 siRNA 显著下调^[188]。此外, 21 nt 相位 siRNA 对于与可育性和耐寒性相关基因的 mRNA 切割是必需的, 这些基因直接或间接地由 AGO1d 介导的基因沉默决定, 包括 *EDT1* (*Earlier Degraded Tapetum 1*)、*TDR* (*Tapetum Degeneration Retardation*)、*OsPCF5* 和 *OsTCP21*; 21 nt 相位 siRNA 的功能丧失可能导致其靶基因上调, 并引起不同程度的雄性可

育和籽粒形成缺陷^[188]。这些研究结果表明, 21 nt 相位 siRNA 在水稻 TGMS 中的重要功能, 为未来两系杂交水稻育种提供了重要参考。

自交不亲和性(self-incompatibility)在被子植物中起着重要的作用, 它能防止近亲繁殖衰退和维持种群内的遗传多样性。在多倍体化(polyploidization)之后, 许多被子植物物种从自交不亲和转变为自交亲和(self-compatibility)。Dou 等^[189]研究了十字花科(Brassicaceae)植物中的 S-位点, 并鉴定了 S-位点内 sRNA 位点 *SMI1* (*SCR Methylation Inducer 1*)和 *SMI2* 的不同起源。研究发现 *SMI1* 位点在十字花科中广泛存在, 而 *SMI2* 位点则仅存在于芸薹属(*Brassica*)物种中。在自交不亲和的欧洲油菜(*Brassica napus*) ‘S-70^{S1300S6}’中过表达 *BnSMI-1*, 导致 *BnSCR-6* 和 *BnSCR-1300* 启动子区域中的 DNA 甲基化显著增加, 从而产生自交亲和性。相反, 通过在 ‘S-70^{S1300S6}’ 品系中过表达 *BnSMI-1* 的一个点突变, *BnSCR-6* 和 *BnSCR-1300* 启动子中的 DNA 甲基化水平降低。在 ‘-SI-326^{S7S6}’ 品系中, *BnSMI2-1300* 的过表达通过转录抑制来自 *BnS-1300* 单倍型的 *Smi2* sRNA, 降低了 *BnSCR-7* 的表达^[189]。这些研究结果表明, 油菜的自交亲和性是由多倍体化后 S-位点 sRNA 介导的 *SCR* 基因沉默决定的, 这有助于进一步培育自交不亲和或自交亲和的油菜品系, 进而促进杂种优势的利用。

多倍体(polyploidy)或全基因组加倍(whole-genome duplication)是植物中一种常见的物种形成机制。多倍体形成的一个重要障碍是缺乏相容的配偶, 而自交亲和性可以克服这一难题。Bachmann 等^[190]研究了十字花科自交不亲和性系统的分子组成, 特别是由 sRNA 介导的 S-单倍型(S-haplotype)之间的显性关系能否促进异源多倍体(allopolyploid)十字花科植物中自交不亲和的丧失。试验材料为异源四倍体芥(*Capsella bursa-pastoris*), 该物种大约在 30 万年前通过杂交和全基因组加倍形成, 其祖先来自东方芥(*Capsella orientalis*)和大花芥(*Capsella grandiflora*)的谱系。他们利用靶向长读长测序(targeted long-read sequencing)来组装和分析 8 个全长 S-位点单倍型, 以及利用花芽中的 sRNA 测序数据, 以鉴定候选的显性修饰因子。研究结果发现, 芥中东方芥衍生的 S-单倍型含有雄性自交不亲和和特异性基因 *SCR* 的截短版本, 并表达一个保守的基于 sRNA 的候选显性修饰因子, 其靶标存在于大花芥的 S-单倍型中; 花粉水平的显性可能促进芥中自交不亲和性的丧失;

而在东方芥和大花芥杂交后自发产生的体细胞四倍体化阶段可以产生自交亲和的四倍体后代^[190]。

3.2 对种子休眠和萌发的影响

3.2.1 sRNA 对种子休眠和萌发的作用 在日本落叶松 (*Larix kaempferi*) 中, miR-12、miR-13、miR-14、miR159c、miR162a、miR319a、miR397d、miR894g 和 miR1313b 在休眠胚中上调, 而 miR168b、miR169b、miR414b 和 miR529a 在萌发胚中上调^[191] (图 3)。同样, miR397 通过调节细胞壁的厚度在休眠胚转化为萌发胚的过程中起作用^[191] (图 3)。此外, 日本落叶松种子休眠维持和释放的调控伴随着 siRNA 家族的变化。休眠胚表现出较高水平的 24 nt siRNA 的积累, 而萌发胚则偏向于 21 nt siRNA 的积累。这可能是由于 RDR2 和/或 RDR6 的表达水平差异, 表明不同的 sRNA 途径对休眠释放的贡献也不同^[191]。

不同的 miRNA, 如 miR156、miR158、miR159、miR160、miR164、miR165/166、miR167、miR172、miR395、miR402 和 miR417 能够调控种子萌发和休眠的激活剂和抑制剂^[12,22,192]。Li 等^[193]研究表明, 种子吸胀过程本身可以差异下调 12 个 miRNA 家族成员(miR156、miR159、miR164、miR166、miR167、miR168、miR169、miR172、miR319、miR393、miR394 和 miR397), 而在种子萌发过程中有 4 个家族成员(miR398、miR408、miR528 和 miR529)上调(图 3)。

Sun 等^[194]比较了抗 PHS 和 PHS 敏感的白小麦品种的萌发种子中 miRNA 组的差异。在种子萌发的 3 个不同阶段共鉴定出 1879 种 miRNA。为了进一步获得候选的 miRNA, 通过差异表达和时间序列分析(time-series analysis)挖掘了差异表达 miRNA 的不同数据集, 结合降解组数据, 在靶基因全基因组筛选后进行 miRNA mRNA 网络分析, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)富集表明, 与 PHS 相关的淀粉和蔗糖代谢途径在来源于 R12R18-HE miRNA 的专一靶基因数据集中被特异地富集。

miRNA 生物合成的不同组分也有助于调控萌发后事件。miR402 通过调节 miRNA 指导的 DML3 (DEMETER-LIKE PROTEIN 3)正调控胁迫条件下的种子萌发和幼苗生长^[195] (图 3); 在黑暗中, HYL1、DCL1、HEN 和 HASTY 增加了幼苗下胚轴的生长^[43,196]。HYL1 被 COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1)稳定, 并与 PIF4 相互作用^[43]。与 HYL1 相反, 在幼苗光形态发生过程中,

DCL1 和 SE 促进钩的伸展。这些结果表明, miRNA 生物合成机制精确地调节幼苗的发育^[196]。

3.2.2 sRNA 与植物激素的互作 赤霉素。GA 结合并激活其核受体 GID1 (GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF 1), 从而触发下游抑制蛋白 DELLA (Asp-Glu-Leu-Leu-Ala) 的多泛素化 (polyubiquitylation), 并通过 26S 蛋白酶体 (proteasome) 对 DELLA 蛋白进行降解^[197-198]。在植物中, DELLA 基因编码保守的主要生长调控因子。核定位的 DELLA 蛋白是转录调控因子, 能与数百个转录因子及其转录调控因子相互作用。它们在维管植物中不仅作为 GA 信号转导的抑制因子发挥作用, 而且在协调多种信号途径响应内部激素信号和外部信息(如光照和营养条件、生物和非生物胁迫)中起核心作用^[199]。GAMYB 蛋白作为 GA 信号级联的正调节因子^[3,200], miR159 通过靶向 MYB33 在控制种子萌发中起重要作用^[201-202] (图 3)。在 GA 缺乏的情况下, miR159 的表达可能通过 DELLA 蛋白的作用被抑制^[201]。miR159 和 GA 对 GAMYB 的下调促进了萌发所需的糊粉层程序性细胞死亡(programmed cell death)过程^[203] (图 3)。在小麦中, 22 nt miR9678 专一地在发育和萌发种子的盾片中表达, 这表明它在调节种子萌发方面具有潜在的作用^[204]。miR9678 靶向一种长链非编码 WSGAR (WHEAT SEED GERMINATION ASSOCIATED RNA), 具有触发 phasiRNA 生物合成的典型的 22 nt miRNA 的特征(图 3)。miR9678 及其触发的 phasiRNA 对萌发和 PHS 都表现出负调控(图 3)。在 miR9678 过表达系中, 生物活性 GA 的含量以及与萌发有关的基因的表达水平降低, 这表明小麦专一的 miR9678-WSGAR-phasiRNA 途径通过 GA 信号转导在调节种子萌发中发挥作用^[204]。

脱落酸。ABA (abscisic acid)是种子休眠的诱导因子和种子萌发的抑制因子; GA 拮抗 ABA 的作用, 是种子萌发的促进因子^[7]。在休眠胚转化为萌发胚的过程中, ABA 通过调节 miRNA 生物合成基因的表达水平来改变 miRNA 的组成^[191]。miR159 的表达被 GA 和 ABA 共同控制^[205], MYB33 在 ABI5 (ABA INSENSITIVE 5)的上游对 ABA 起反应^[202]。ABI5 是一种碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)转录因子, 在种子萌发过程中介导对 ABA 信号的感知。miR159 负调控 MYB33 (图 3), 而 MYB33 通过直接与 ABI5 启动子的 GTAC 基序结合来促进其转录。因此, miR159 的功能丧失增强了种子萌发的抗旱性和

对 ABA 的超敏性^[202]。miR159 介导的对 *AtMYB33* 和 *AtMYB101* 调控的缺陷增加了种子萌发对 ABA 的敏感性,表明它可能在此过程中作为 ABA 反应的负调控因子起作用。Guo 等^[204]发现, *miR9678* 的转录依赖于 ABA 信号转导途径,提出 miRNA 介导小麦种子萌发中 ABA 和 GA 之间的互作。

生长素。ARF 是许多植物生长发育过程中参与生长素信号转导的转录因子。ARF 的丰度受到包括 miRNA 在内的许多机制的精确调节。特别是,在胚发育后期和萌发过程中, *ARF10* 的转录水平受 miR160 的调节^[206]。在拟南芥中, miR160 通过切割 *ARF* 的 mRNA 来负调控 *ARF10*、*ARF16* 和 *ARF17* 的表达水平,从而控制光照条件下下胚轴的伸长^[207](图 3)。*ARF10* 的去阻遏增加种子对 ABA 的敏感性,而 *miR160a* 的过表达降低拟南芥种子对 ABA 的敏感性^[206]。当 *ARF10* 的抗 miR160 的切割因子在拟南芥中表达和积累时,一些 ABA 反应基因的表达增加,表明生长素可能影响拟南芥中的 ABA 反应途径。研究表明,通过 miR160 下调 *ARF10*,对萌发过程中降低 ABA 敏感性和允许胚根伸长是必需的^[208]。这些证据表明,在种子萌发过程中, miR160 似乎是作为生长素和 ABA 介导的互作的汇合点;因为 *ARF10* 的突变导致发育缺陷和 ABA 反应基因的过表达, miR160 的过表达导致萌发过程中对 ABA 的敏感性降低^[206]。在种子萌发过程中,其他的 *ARF* 被 miR390 调节。miR390 通过促进 *TAS3* 转录本加工成为功能性 tasiR-ARF 来连接 2 种主要类型的 sRNA (miRNA 和 tasiRNA), tasiR-ARF 靶向家族成员 *ARF2*、*ARF3* 和 *ARF4*^[209]。此外, *ARF2*、*ARF3* 和 *ARF4* 的转录水平在萌发早期较低,只有在吸胀 48 h、miR390 的积累下降后才变高^[22]。“miR390-tasiR-ARF”模块通过调控一些 ARF 转录因子及其下游靶点的表达水平在种子萌发中起作用。

细胞分裂素。在大麦种子灌浆期间, siRNA 通过靶向 *HvCKX2.1* [*CYTOKININ-OXIDASE 2.1*; 一种参与细胞分裂素降解和萌发时间控制的 CKX (cytokinin oxidase/dehydrogenase, EC.1.5.99.12)]来影响干旱胁迫反应^[210]。当对未成熟的种子进行干旱处理时,胁迫专一性 24 nt siRNA 的产生使得 *HvCKX2.1* 启动子区域的 DNA 甲基化增加,降低了 CKX 的 mRNA 水平,并进一步影响随后的萌发速率和芽的出现,这可能是通过细胞分裂素核苷(cytokinin riboside)的积累实现的。

乙烯。乙烯与 ABA 信号转导途径相互作用促进种子萌发。突变体 *etr1* (*ethylene resistant 1*)和 *ein2* (*ethylene insensitive 2*)或 *era3* (*enhanced response to aba 3*)表现出 ABA 响应基因上调、种子萌发延迟^[3]。用乙烯前体 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)处理的野生型种子中的 ABA 响应因子下调,而 *etr1-2* 突变体中的 GA 过量积累,这可能是对 ABA 过量积累的补偿^[3]。由于 miR159 和 miR160 对 ABA 和 GA 都具有调节作用,乙烯与 ABA 和 GA 都有互作;因此,推测这些 miRNA 可能在种子休眠和萌发过程中直接或间接地控制乙烯介导的调控。

3.2.3 sRNA 与 DOG1 DOG1 (delay of germination 1)蛋白是种子休眠的一种主要调控因子,可与 ABA 协同作用来延迟种子萌发^[5,211-212]。核心 ABA 信号转导途径和 DOG1 途径在蛋白磷酸酶 2C (protein phosphatase 2C, PP2C)处汇聚。DOG1 调控种子休眠需要 PP2C,并通过与 ABA 过敏感萌发 1/3 (ABA HYPERSENSITIVE GERMINATION 1/3, AHG1/AHG3)结合来增强 ABA 的信号转导。DOG1 抑制 AHG1 的作用可增加 ABA 的敏感性和诱导种子休眠^[211-212]。对拟南芥和莴苣(*Lactuca sativa*)种子的研究表明,DOG1 可以通过影响 miR156 和 miR172 的产生、作用以及加工来调控种子的休眠^[213-214]。*AtMIR156* 的过表达促进种子休眠,而 *AtMIR172* 的过表达减少种子休眠^[213]。miR156 水平的降低导致 *SPL* 水平的增加,促进了 miR172 的表达和种子萌发。拟南芥和莴苣 *dog1* 突变体的干种子中与 miR156 和 miR172 加工有关的基因表达丰度降低^[213]。在一些物种中,miRNA 与种子休眠和萌发的激活剂和阻遏物有关^[63,175]。在 32℃下,DOG1 也影响吸胀的拟南芥种子中 miRNA 的产生和萌发热抑制(thermoinhibition)^[213]。有趣的是,DOG1 影响编码 miRNA 加工蛋白的基因表达:在干种子中, *DCL1* 和 *HYL1* 的转录本被 *DOG1* 诱导(图 3),而 *SE* 被 *DOG1* 抑制,这表明 DOG1 可以通过调控 miRNA 加工来控制种子萌发^[213]。此外,在高温下,高水平的 miR156 抑制种子萌发,而高水平的 miR172 促进种子萌发。

3.2.4 sRNA 与表观遗传 虽然 miRNA 主要发挥 PTGS 的作用,不直接促进表观遗传修饰(epigenetic modification),但它们可以通过控制编码特定染色质重塑因子或表观遗传修饰因子的转录本水平来间接地影响表观遗传格局。例如, miR402 是一种正调控种子萌发的 miRNA,特别是在胁迫条件下^[215]。

miR402 靶向脱甲基酶(demethylase) *DML3* 转录本, *dml3* 突变体的种子在相同的胁迫条件下表现出萌发速率增加。研究发现, 胁迫诱导的 miR402 引导 *DML3* 的切割, *DML3* 的降低有助于维持种子萌发过程中负调控基因上的 DNA 甲基化^[215]。然而, 由 miR402 过表达所引起的专一甲基化变化需要进一步的研究来证实。

RdDM 途径产生的 24 nt sRNA 调控种子发育和基因组印迹(genomic imprinting)^[216]。在水稻中, RdDM 途径基因如 *Pol IV (OsNRPD1)*、*OsRDR2/FEM1* 和 *Pol V (OsNRPE1)* 调控穗发育、花粉发育和结实等^[131,217-218]。在水稻胚乳中, 大部分 24 nt sRNA 主要来自基因区域, 而不是来自转座子^[68]。Pal 等^[219]发现 *CLSY* 家族的染色质重塑因子 *OsCLSY3* 在 sRNA 途径中作为上游因子起作用, 是水稻胚乳发育和印迹所必需的。比较转录组和遗传分析表明, *OsCLSY3* 主要在胚乳中表达, 调控转座子产生的 sRNA、siren 位点和印迹 sRNA 位点。*OsCLSY3* 突变负调控胚乳发育, 突变基因的过表达导致具有细胞化缺陷的较大的籽粒。*OsCLSY3* 主要与基因组中的长末端重复(long terminal repeat)转座子结合发挥作用。

4 结论与展望

sRNA 是植物生命周期中基因表达的中心效应因子。从胚胎发育到萌发后生长, sRNA 调节它们的靶标并支持植物发育阶段的转变。特别是, miRNA 在胚胎发生、萌发、器官模式形成、开花、激素信号转导和胁迫感知中起着重要的作用^[220]。大多数 miRNA 靶向转录因子网络, 并建立基因表达梯度, 以决定超过阈值的特定细胞命运。然而, 在种子发育、休眠和萌发期间发生表达变化的 miRNA 中, 只有少数 miRNA 与生理和分子水平的特定功能有关^[220], 值得进一步深入研究。

miRNA 在转录后水平上作为基因表达的主控因子, 也是一个新的潜在的作物改良研究领域; miRNA 正在成为作物基因工程的下一代关键靶标。因此, 阐明它们在种子发育中的作用有助于改善种子的产量和质量。例如, *MIR* 基因以器官或时间依赖的方式过表达能够改善作物的农艺性状, 包括籽粒的产量、质量以及耐旱性和耐寒性^[117,221]。但是, 在设计人工 miRNA 时应谨慎, 因为 miRNA 具有广泛的作用网络, 转基因事件也可能产生多效性表型。

sRNA 主要包括 miRNA 和 siRNA 2 种类型, 而后者又可分为 hc-siRNA 和次级 siRNA。这些不同类型的 sRNA 在种子发育、休眠、萌发以及对生物和非生物胁迫反应调控中的作用与相互关系还不清楚。上述问题的深入研究将有助于理解 sRNA 调控种子特性的分子机制及其实际应用。

References

- [1] Baskin J M, Baskin C C. Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination, 2nd edn. Amsterdam: Academic Press, 2014.
- [2] 刘军, 宋松泉, 等. 水稻种子生物学. 北京: 科学出版社, 2024. Liu J, Song S Q, et al. Rice Seed Biology. Beijing: Science Press, 2024 (in Chinese).
- [3] Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, et al. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 387–415.
- [4] Bewley J D, Bradford K J, Hilhorst H W M, et al. Seed: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd edn. New York: Springer, 2013.
- [5] Iwasaki M, Penfield S, Lopez-Molina L. Parental and environmental control of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol*, 2022, 73: 355–378.
- [6] Sohn S I, Pandian S, Kumar T S, et al. Seed dormancy and pre-harvest sprouting in rice—an updated overview. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 11804.
- [7] Sajeev N, Koornneef M, Bentsink L. A commitment for life: decades of unraveling the molecular mechanisms behind seed dormancy and germination. *Plant Cell*, 2024, 36: 1358–1376.
- [8] Zhao J, He Y, Zhang H, et al. Advances in the molecular regulation of seed germination in plants. *Seed Biol*, 2024, 3: e006.
- [9] 宋松泉, 唐翠芳, 程红焱, 等. 种子萌发调控的研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2024, 54: 1226–1253. Song S Q, Tang C F, Cheng H Y, et al. Research progress in regulation of seed germination. *Sci Sin Vitae*, 2024, 54: 1226–1253 (in Chinese with English abstract).
- [10] 宋松泉, 唐翠芳, 雷华平, 等. 种子休眠与萌发调控的研究进展. *作物学报*, 2024, 50: 1–15. Song S Q, Tang C F, Lei H P, et al. Research progress of seed dormancy and germination regulation. *Acta Agron Sin*, 2024, 50: 1–15 (in Chinese with English abstract).
- [11] Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, et al. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 208.
- [12] Tognacca R S, Botto J F. Post-transcriptional regulation of seed dormancy and germination: current understanding and future directions. *Plant Commun*, 2021, 2: 100169.
- [13] Zhan J P, Meyers B C. Plant small RNAs: their biogenesis, regulatory roles, and functions. *Annu Rev Plant Biol*, 2023, 74: 21–51.
- [14] Xie G, Du X, Hu H, et al. Molecular mechanisms underlying the establishment, maintenance, and removal of DNA methylation in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2025, 76: 143–170.
- [15] Achkar N P, Cambiagno D A, Manavella P A. miRNA biogenesis: a dynamic pathway. *Trends Plant Sci*, 2016, 21: 1034–1044.

- [16] Chorostecki U, Moro B, Rojas A M L, et al. Evolutionary footprints reveal insights into plant microRNA biogenesis. *Plant Cell*, 2017, 29: 1248–1261.
- [17] Song J, Wang X, Song B, et al. Prevalent cytidylation and uridylation of precursor miRNAs in *Arabidopsis*. *Nat Plants*, 2019, 5: 1260–1272.
- [18] Sanan-Mishra N, Varanasi S P R M, Mukherjee S K. Micro-regulators of auxin action. *Plant Cell Rep*, 2013, 32: 733–740.
- [19] Cao W, Yang L, Zhuang M, et al. Plant non-coding RNAs: the new frontier for the regulation of plant development and adaptation to stress. *Plant Physiol Biochem*, 2024, 208: 108435.
- [20] Yue J R, Liu Y J, Yuan S H, et al. Uncovering seed vigor responsive miRNA in hybrid wheat and its parents by deep sequencing. *BMC Genomics*, 2024, 25: 991.
- [21] Zainali N, Alizadeh H, Delavault P. Gene silencing in broomrapes and other parasitic plants of the Orobanchaceae family: mechanisms, considerations, and future directions. *J Exp Bot*, 2025, 76: 243–261.
- [22] Das S S, Karmakar P, Nandi A K, et al. Small RNA mediated regulation of seed germination. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 828.
- [23] Sarkar Das S, Yadav S, Singh A, et al. Expression dynamics of miRNAs and their targets in seed germination conditions reveals miRNA-ta-siRNA crosstalk as regulator of seed germination. *Sci Rep*, 2018, 8: 1233.
- [24] Yan K, Liu P, Wu C A, et al. Stress-induced alternative splicing provides a mechanism for the regulation of microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell*, 2012, 48: 521–531.
- [25] Yang G D, Yan K, Wu B J, et al. Genomewide analysis of intronic microRNAs in rice and *Arabidopsis*. *J Genet*, 2012, 91: 313–324.
- [26] Axtell M J, Meyers B C. Revisiting criteria for plant microRNA annotation in the era of big data. *Plant Cell*, 2018, 30: 272–284.
- [27] Xie Z, Allen E, Fahlgren N, et al. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol*, 2005, 138: 2145–2154.
- [28] Wu G, Park M Y, Conway S R, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009, 138: 750–759.
- [29] Tian R, Wang F, Zheng Q, et al. Direct and indirect targets of the *Arabidopsis* seed transcription factor ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant J*, 2020, 103: 1679–1694.
- [30] Xu M, Hu T, Smith M R, et al. Epigenetic regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2016, 28: 28–41.
- [31] Li S, Xu R, Li A, et al. SMA1, a homolog of the splicing factor Prp28, has a multifaceted role in miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 9148–9159.
- [32] Wang S, Quan L, Li S, et al. The PROTEIN PHOSPHATASE4 complex promotes transcription and processing of primary microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2019, 31: 486–501.
- [33] Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 5–20.
- [34] Bologna N G, Schapire A L, Zhai J, et al. Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Res*, 2013, 23: 1675–1689.
- [35] Yang L, Liu Z, Lu F, et al. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2006, 47: 841–850.
- [36] Dong Z, Han M H, Fedoroff N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate *in vitro* processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 9970–9975.
- [37] Xie D, Chen M, Niu J, et al. Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol*, 2021, 23: 32–39.
- [38] Zhang B, You C, Zhang Y, et al. Linking key steps of microRNA biogenesis by TREX-2 and the nuclear pore complex in *Arabidopsis*. *Nat Plants*, 2020, 6: 957–969.
- [39] Wang Z, Ma Z, Castillo-González C, et al. SWI₂/SNF2 ATPase CHR2 remodels pri-miRNAs via serrate to impede miRNA production. *Nature*, 2018, 557: 516–521.
- [40] Cambiagno D A, Giudicatti A J, Arce A L, et al. HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Mol Plant*, 2021, 14: 426–439.
- [41] Gonzalo L, Tossolini I, Gulanicz T, et al. R-loops at microRNA encoding loci promote co-transcriptional processing of pri-miRNAs in plants. *Nat Plants*, 2022, 8: 402–418.
- [42] Fang X, Shi Y, Lu X, et al. CMA33/XCT regulates small RNA production through modulating the transcription of Dicer-like genes in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2015, 8: 1227–1236.
- [43] Sun Z, Li M, Zhou Y, et al. Coordinated regulation of *Arabidopsis* microRNA biogenesis and red light signaling through Dicer-like 1 and phytochrome-interacting factor 4. *PLoS Genet*, 2018, 14: e1007247.
- [44] Li Z, Wang S, Cheng J, et al. Intron lariat RNA inhibits microRNA biogenesis by sequestering the dicing complex in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2016, 12: e1006422.
- [45] Knop K, Stepień A, Barciszewska-Pacak M, et al. Active 5' splice sites regulate the biogenesis efficiency of *Arabidopsis* microRNAs derived from intron-containing genes. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 2757–2775.
- [46] Frye M, Harada B T, Behm M, et al. RNA modifications modulate gene expression during development. *Science*, 2018, 361: 1346–1349.
- [47] Bhat S S, Bielewicz D, Gulanicz T, et al. mRNA adenosine methylase (MTA) deposits m⁶A on pri-miRNAs to modulate miRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 21785–21795.
- [48] Baranauskė S, Mickutė M, Plotnikova A, et al. Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 2802–2812.
- [49] Ramachandran V, Chen X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science*, 2008, 321: 1490–1492.
- [50] Yu Y, Ji L, Le B H, et al. ARGONAUTE10 promotes the degradation of miR165/6 through the SDN1 and SDN2 exonucleases in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 2017, 15: e2001272.
- [51] Zhai J, Zhao Y, Simon S A, et al. Plant microRNAs display differential 3' truncation and tailing modifications that are ARGONAUTE1 dependent and conserved across species. *Plant Cell*, 2013, 25: 2417–2428.
- [52] Ren G, Chen X, Yu B. Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2012, 22: 695–700.

- [53] Tu B, Liu L, Xu C, et al. Distinct and cooperative activities of HESO1 and URT1 nucleotidyl transferases in microRNA turnover in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005119.
- [54] Mosher R A, Schwach F, Studholme D, et al. Pol IVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 3145–3150.
- [55] Havecker E R, Wallbridge L M, Hardcastle T J, et al. The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation Argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell*, 2010, 22: 321–334.
- [56] Blevins T, Podicheti R, Mishra V, et al. Identification of Pol IV and RDR2-dependent precursors of 24 nt siRNAs guiding *de novo* DNA methylation in *Arabidopsis*. *eLife*, 2015, 4: e09591.
- [57] Zhai J, Bischof S, Wang H, et al. A one precursor one siRNA model for pol IV-dependent siRNA biogenesis. *Cell*, 2015, 163: 445–455.
- [58] Zhou M, Palanca A M S, Law J A. Locus-specific control of the *de novo* DNA methylation pathway in *Arabidopsis* by the CLASSY family. *Nat Genet*, 2018, 50: 865–873.
- [59] Law J A, Vashisht A A, Wohlschlegel J A, et al. SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1002195.
- [60] Law J A, Du J, Hale C J, et al. Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature*, 2013, 498: 385–389.
- [61] Fukudome A, Singh J, Mishra V, et al. Structure and RNA template requirements of *Arabidopsis* RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2115899118.
- [62] Huang K, Wu X X, Fang C L, et al. Pol IV and RDR2: a two-RNA-polymerase machine that produces double-stranded RNA. *Science*, 2021, 374: 1579–1586.
- [63] Singh J, Mishra V, Wang F, et al. Reaction mechanisms of pol IV, RDR2, and DCL3 drive RNA channeling in the siRNA-directed DNA methylation pathway. *Mol Cell*, 2019, 75: 576–589.e5.
- [64] Zhang X, Henderson I R, Lu C, et al. Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 4536–4541.
- [65] Qi Y, He X, Wang X J, et al. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 2006, 443: 1008–1012.
- [66] Loffer A, Singh J, Fukudome A, et al. A DCL3 dicing code within Pol IV-RDR2 transcripts diversifies the siRNA pool guiding RNA-directed DNA methylation. *eLife*, 2022, 11: e73260.
- [67] Wang Q, Xue Y, Zhang L, et al. Mechanism of siRNA production by a plant Dicer-RNA complex in dicing-competent conformation. *Science*, 2021, 374: 1152–1157.
- [68] Rodrigues J A, Ruan R, Nishimura T, et al. Imprinted expression of genes and small RNA is associated with localized hypomethylation of the maternal genome in rice endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 7934–7939.
- [69] Grover J W, Burgess D, Kendall T, et al. Abundant expression of maternal siRNAs is a conserved feature of seed development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 15305–15315.
- [70] Burgess D, Chow H T, Grover J W, et al. Ovule siRNAs methylate protein-coding genes in trans. *Plant Cell*, 2022, 34: 3647–3664.
- [71] Zhou M, Coruh C, Xu G, et al. The CLASSY family controls tissue-specific DNA methylation patterns in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 2022, 13: 244.
- [72] Li C, Gent J I, Xu H, et al. Resetting of the 24-nt siRNA landscape in rice zygotes. *Genome Res*, 2022, 32: 309–323.
- [73] Liu Y, Teng C, Xia R, et al. PhasiRNAs in plants: their biogenesis, genic sources, and roles in stress responses, development, and reproduction. *Plant Cell*, 2020, 32: 3059–3080.
- [74] Fei Q, Yu Y, Liu L, et al. Biogenesis of a 22-nt microRNA in phaseoleae species by precursor-programmed uridylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 8037–8042.
- [75] Axtell M J, Jan C, Rajagopalan R, et al. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2006, 127: 565–577.
- [76] 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. *Genes Dev*, 2011, 25: 2540–2553.
- [77] Xia R, Xu J, Meyers B C. The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants. *Plant Cell*, 2017, 29: 1232–1247.
- [78] Johnson C, Kasprzewska A, Tennessen K, et al. Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Res*, 2009, 19: 1429–1440.
- [79] Yadava P, Tamim S, Zhang H, et al. Transgenerational conditioned male fertility of HD-ZIP IV transcription factor mutant ocl4: impact on 21-nt phasiRNA accumulation in pre-meiotic maize anthers. *Plant Reprod*, 2021, 34: 117–129.
- [80] Nan G L, Teng C, Fernandes J, et al. A cascade of bHLH-regulated pathways programs maize anther development. *Plant Cell*, 2022, 34: 1207–1225.
- [81] Kakrana A, Mathioni S M, Huang K, et al. Plant 24-nt reproductive phasiRNAs from intramolecular duplex mRNAs in diverse monocots. *Genome Res*, 2018, 28: 1333–1344.
- [82] Xia R, Chen C, Pokhrel S, et al. 24-nt reproductive phasiRNAs are broadly present in angiosperms. *Nat Commun*, 2019, 10: 627.
- [83] Pokhrel S, Meyers B C. Heat-responsive microRNAs and phased small interfering RNAs in reproductive development of flax. *Plant Direct*, 2022, 6: e385.
- [84] Nuthikattu S, McCue A D, Panda K, et al. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21–22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiol*, 2013, 162: 116–131.
- [85] Creasey K M, Zhai J, Borges F, et al. miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*. *Nature*, 2014, 508: 411–415.
- [86] Borges F, Parent J S, van Ex F, et al. Transposon-derived small RNAs triggered by miR845 mediate genome dosage response in *Arabidopsis*. *Nat Genet*, 2018, 50: 186–192.
- [87] Martinez G, Wolff P, Wang Z, et al. Paternal easiRNAs regulate parental genome dosage in *Arabidopsis*. *Nat Genet*, 2018, 50: 193–198.
- [88] Wang Z, Butel N, Santos-González J, et al. Polymerase IV plays a crucial role in pollen development in *Capsella*. *Plant Cell*, 2020, 32: 950–966.

- [89] Su Z, Wilson B, Kumar P, et al. Noncanonical roles of tRNAs: tRNA fragments and beyond. *Annu Rev Genet*, 2020, 54: 47–69.
- [90] Reis R S, Poirier Y. Making sense of the natural antisense transcript puzzle. *Trends Plant Sci*, 2021, 26: 1104–1115.
- [91] Vivek A T, Kumar S. Computational methods for annotation of plant regulatory non-coding RNAs using RNA-seq. *Brief Bioinform*, 2021, 22: bbaa322.
- [92] Zhang X, Xia J, Lii Y E, et al. Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biol*, 2012, 13: R20.
- [93] Ron M, Alandete Saez M, Eshed Williams L, et al. Proper regulation of a sperm-specific *cis*-nat-siRNA is essential for double fertilization in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2010, 24: 1010–1021.
- [94] Wan Q, Guan X, Yang N, et al. Small interfering RNAs from bidirectional transcripts of GhMML3_A12 regulate cotton fiber development. *New Phytol*, 2016, 210: 1298–1310.
- [95] Wu H, Li B, Iwakawa H O, et al. Plant 22-nt siRNAs mediate translational repression and stress adaptation. *Nature*, 2020, 581: 89–93.
- [96] Jia J, Ji R, Li Z, et al. Soybean DICER-LIKE2 regulates seed coat color via production of primary 22-nucleotide small interfering RNAs from long inverted repeats. *Plant Cell*, 2020, 32: 3662–3673.
- [97] Lunardon A, Johnson N R, Hagerott E, et al. Integrated annotations and analyses of small RNA-producing loci from 47 diverse plants. *Genome Res*, 2020, 30: 497–513.
- [98] Phizicky E M, Hopper A K. tRNA processing, modification, and subcellular dynamics: past, present, and future. *RNA*, 2015, 21: 483–485.
- [99] Megel C, Hummel G, Lalande S, et al. Plant RNases T2, but not Dicer-like proteins, are major players of tRNA-derived fragments biogenesis. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 941–952.
- [100] Martinez G, Choudury S G, Slotkin R K. tRNA-derived small RNAs target transposable element transcripts. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 5142–5152.
- [101] Alves C S, Vicentini R, Duarte G T, et al. Genome-wide identification and characterization of tRNA-derived RNA fragments in land plants. *Plant Mol Biol*, 2017, 93: 35–48.
- [102] Zhang H, Xia R, Meyers B C, et al. Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, 27: 84–90.
- [103] Frank F, Hauver J, Sonenberg N, et al. *Arabidopsis* Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO J*, 2012, 31: 3588–3595.
- [104] Xiao Y, MacRae I J. The molecular mechanism of microRNA duplex selectivity of *Arabidopsis* ARGONAUTE10. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: 10041–10052.
- [105] Zhu H, Hu F, Wang R, et al. *Arabidopsis* Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, 2011, 145: 242–256.
- [106] Endo Y, Iwakawa H O, Tomari Y. *Arabidopsis* ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly. *EMBO Rep*, 2013, 14: 652–658.
- [107] Zhang X, Niu D, Carbonell A, et al. ARGONAUTE PIWI domain and microRNA duplex structure regulate small RNA sorting in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 2014, 5: 5468.
- [108] Patel P, Mathioni S, Kakrana A, et al. Reproductive phasiRNAs in grasses are compositionally distinct from other classes of small RNAs. *New Phytol*, 2018, 220: 851–864.
- [109] Cui Y, Fang X, Qi Y. TRANSPORTIN1 promotes the association of microRNA with ARGONAUTE1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2016, 28: 2576–2585.
- [110] Bologna N G, Iselin R, Abriata L A, et al. Nucleo-cytosolic shuttling of ARGONAUTE1 prompts a revised model of the plant microRNA pathway. *Mol Cell*, 2018, 69: 709–719.e5.
- [111] Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, et al. Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell*, 2012, 24: 3613–3629.
- [112] Zhang Z, Hu F, Sung M W, et al. RISC-interacting clearing 3′–5′ exoribonucleases (RICEs) degrade uridylated cleavage fragments to maintain functional RISC in *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 2017, 6: e24466.
- [113] Iwakawa H O, Tomari Y. Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol Cell*, 2013, 52: 591–601.
- [114] Yang L, Wu G, Poethig R S. Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 315–320.
- [115] Reis R S, Hart-Smith G, Eamens A L, et al. Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins. *Nat Plants*, 2015, 1: 14027.
- [116] Wu L, Zhou H, Zhang Q, et al. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell*, 2010, 38: 465–475.
- [117] Tang J, Chu C. MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits. *Nat Plants*, 2017, 3: 17077.
- [118] Fei Q, Zhang Y, Xia R, et al. Small RNAs add zing to the zig-zag-zig model of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact*, 2016, 29: 165–169.
- [119] Song X, Li Y, Cao X, et al. MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 489–525.
- [120] Matzke M A, Mosher R A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 394–408.
- [121] Cuerda-Gil D, Slotkin R K. Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nat Plants*, 2016, 2: 16163.
- [122] Dubin M J, Mittelsten Scheid O, Becker C. Transposons: a blessing curse. *Curr Opin Plant Biol*, 2018, 42: 23–29.
- [123] Mirouze M, Reinders J, Bucher E, et al. Selective epigenetic control of retrotransposition in *Arabidopsis*. *Nature*, 2009, 461: 427–430.
- [124] Mari-Ordóñez A, Marchais A, Etcheverry M, et al. Reconstructing *de novo* silencing of an active plant retrotransposon. *Nat Genet*, 2013, 45: 1029–1039.
- [125] Ito H, Gaubert H, Bucher E, et al. An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature*, 2011, 472: 115–119.
- [126] Li Q, Gent J I, Zynda G, et al. RNA-directed DNA methylation enforces boundaries between heterochromatin and euchromatin in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 14728–14733.
- [127] Kinoshita Y, Saze H, Kinoshita T, et al. Control of FWA gene

- silencing in *Arabidopsis thaliana* by SINE-related direct repeats. *Plant J*, 2007, 49: 38–45.
- [128] Gouil Q, Baulcombe D C. DNA methylation signatures of the plant chromomethyltransferases. *PLoS Genet*, 2016, 12: e1006526.
- [129] Grover J W, Kendall T, Baten A, et al. Maternal components of RNA-directed DNA methylation are required for seed development in *Brassica rapa*. *Plant J*, 2018, 94: 575–582.
- [130] Xu L, Yuan K, Yuan M, et al. Regulation of rice tillering by RNA-directed DNA methylation at miniature inverted-repeat transposable elements. *Mol Plant*, 2020, 13: 851–863.
- [131] Zheng K, Wang L, Zeng L, et al. The effect of RNA polymerase V on 24-nt siRNA accumulation depends on DNA methylation contexts and histone modifications in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2100709118.
- [132] Chakraborty T, Trujillo J T, Kendall T, et al. A null allele of the pol IV second subunit impacts stature and reproductive development in *Oryza sativa*. *Plant J*, 2022, 111: 748–755.
- [133] Erdmann R M, Satyaki P R V, Klosinska M, et al. A small RNA pathway mediates allelic dosage in endosperm. *Cell Rep*, 2017, 21: 3364–3372.
- [134] Satyaki P R V, Gehring M. Paternally acting canonical RNA-directed DNA methylation pathway genes sensitize *Arabidopsis* endosperm to paternal genome dosage. *Plant Cell*, 2019, 31: 1563–1578.
- [135] Adenot X, Elmayan T, Lauressergues D, et al. DRB4-dependent TAS3 *trans*-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr Biol*, 2006, 16: 927–932.
- [136] Luo Q J, Mittal A, Jia F, et al. An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2012, 80: 117–129.
- [137] Guan X, Pang M, Nah G, et al. miR828 and miR858 regulate homoeologous *MYB2* gene functions in *Arabidopsis* trichome and cotton fibre development. *Nat Commun*, 2014, 5: 3050.
- [138] Deng P, Muhammad S, Cao M, et al. Biogenesis and regulatory hierarchy of phased small interfering RNAs in plants. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 965–975.
- [139] Jiang P, Lian B, Liu C, et al. 21-nt phasiRNAs direct target mRNA cleavage in rice male germ cells. *Nat Commun*, 2020, 11: 5191.
- [140] Zhang Y C, Lei M Q, Zhou Y F, et al. Reproductive phasiRNAs regulate reprogramming of gene expression and meiotic progression in rice. *Nat Commun*, 2020, 11: 6031.
- [141] Araki S, Le N T, Koizumi K, et al. miR2118-dependent U-rich phasiRNA production in rice anther wall development. *Nat Commun*, 2020, 11: 3115.
- [142] Komiya R, Ohyanagi H, Niihama M, et al. Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *Plant J*, 2014, 78: 385–397.
- [143] Lee Y S, Maple R, Dürr J, et al. A transposon surveillance mechanism that safeguards plant male fertility during stress. *Nat Plants*, 2021, 7: 34–41.
- [144] Li Y, Huang Y, Pan L, et al. Male sterile 28 encodes an ARGONAUTE family protein essential for male fertility in maize. *Chromosome Res*, 2021, 29: 189–201.
- [145] Zhang M, Ma X, Wang C, et al. CHH DNA methylation increases at 24-PHAS loci depend on 24-nt phased small interfering RNAs in maize meiotic anthers. *New Phytol*, 2021, 229: 2984–2997.
- [146] Teng C, Zhang H, Hammond R, et al. Dicer-like 5 deficiency confers temperature-sensitive male sterility in maize. *Nat Commun*, 2020, 11: 2912.
- [147] Chen S, Liu W, Naganuma M, et al. Functional specialization of monocot DCL3 and DCL5 proteins through the evolution of the PAZ domain. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: 4669–4684.
- [148] Zhang S, Sun L, Kragler F. The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiol*, 2009, 150: 378–387.
- [149] Lalonde S, Merret R, Salinas-Giegé T, et al. *Arabidopsis* tRNA-derived fragments as potential modulators of translation. *RNA Biol*, 2020, 17: 1137–1148.
- [150] Ma X, Liu C, Cao X. Plant transfer RNA-derived fragments: biogenesis and functions. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63: 1399–1409.
- [151] Gu H, Lian B, Yuan Y, et al. A 5' tRNA-Ala-derived small RNA regulates anti-fungal defense in plants. *Sci China Life Sci*, 2022, 65: 1–15.
- [152] Asha S, Soniya E V. Transfer RNA derived small RNAs targeting defense responsive genes are induced during *Phytophthora capsici* infection in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Front Plant Sci*, 2016, 7: 767.
- [153] Sun Z, Hu Y, Zhou Y, et al. tRNA-derived fragments from wheat are potentially involved in susceptibility to Fusarium head blight. *BMC Plant Biol*, 2022, 22: 3.
- [154] Huang J, Li Z, Zhao D. Deregulation of the OsmiR160 target gene *OsARF18* causes growth and developmental defects with an alteration of auxin signaling in rice. *Sci Rep*, 2016, 6: 29938.
- [155] Zhang H, Zhang J, Yan J, et al. Short tandem target mimic rice lines uncover functions of miRNAs in regulating important agronomic traits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 5277–5282.
- [156] Plotnikova A, Kellner M J, Schon M A, et al. microRNA dynamics and functions during *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Cell*, 2019, 31: 2929–2946.
- [157] Huang D, Koh C, Feurtado J A, et al. microRNAs and their putative targets in *Brassica napus* seed maturation. *BMC Genomics*, 2013, 14: 140.
- [158] Li S, Castillo-González C, Yu B, et al. The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. *Plant J*, 2017, 90: 654–670.
- [159] Alhassan A R, Dzinyela R, Dargiri S A, et al. Regulatory roles of small RNAs in plant growth, breeding, and stress adaptation. *Plant Growth Regul*, 2025, 105: 295–313.
- [160] Xie K, Wu C, Xiong L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol*, 2006, 142: 280–293.
- [161] Wang H, Wang H. The miR156/SPL module, a regulatory hub and versatile toolbox, gears up crops for enhanced agronomic traits. *Mol Plant*, 2015, 8: 677–688.
- [162] Si L, Chen J, Huang X, et al. OsSPL13 controls grain size in cultivated rice. *Nat Genet*, 2016, 48: 447–456.
- [163] Miao C, Wang Z, Zhang L, et al. The grain yield modulator miR156 regulates seed dormancy through the gibberellin pathway in rice. *Nat Commun*, 2019, 10: 3822.

- [164] Qin M, Zhang Y, Yang Y, et al. Seed-specific overexpression of SPL12 and IPA1 improves seed dormancy and grain size in rice. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 532771.
- [165] Li S, Gao F, Xie K, et al. The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 2134–2146.
- [166] Xie H, Su F, Niu Q, et al. Knockout of miR396 genes increases seed size and yield in soybean. *J Integr Plant Biol*, 2024, 66: 1148–1157.
- [167] Yin D D, Li S S, Shu Q Y, et al. Identification of microRNAs and long non-coding RNAs involved in fatty acid biosynthesis in tree peony seeds. *Gene*, 2018, 666: 72–82.
- [168] Galli V, Guzman F, de Oliveira L F V, et al. Identifying microRNAs and transcript targets in *Jatropha* seeds. *PLoS One*, 2014, 9: e83727.
- [169] Jin Y, Liu L, Hao X, et al. Unravelling the microRNA-mediated gene regulation in developing *Pongamia* seeds by high-throughput small RNA profiling. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3509.
- [170] Li D, Zheng Y, Wan L, et al. Differentially expressed microRNAs during solid endosperm development in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Sci Hortic*, 2009, 122: 666–669.
- [171] Lin Y, Lai Z. Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in Longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *PLoS One*, 2013, 8: e60337.
- [172] Li Z X, Li S G, Zhang L F, et al. Over-expression of miR166a inhibits cotyledon formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2016, 127: 461–473.
- [173] Li W F, Zhang S G, Han S Y, et al. Regulation of LaMYB33 by miR159 during maintenance of embryogenic potential and somatic embryo maturation in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2013, 113: 131–136.
- [174] Oh T J, Wartell R M, Cairney J, et al. Evidence for stage-specific modulation of specific microRNAs (miRNAs) and miRNA processing components in zygotic embryo and female gametophyte of loblolly pine (*Pinus taeda*). *New Phytol*, 2008, 179: 67–80.
- [175] Islam W, Adnan M, Huang Z, et al. Small RNAs from seed to mature plant. *Crit Rev Plant Sci*, 2019, 38: 117–139.
- [176] Seefried W F, Willmann M R, Clausen R L, et al. Global regulation of embryonic patterning in *Arabidopsis* by microRNAs. *Plant Physiol*, 2014, 165: 670–687.
- [177] Willmann M R, Mehalick A J, Packer R L, et al. microRNAs regulate the timing of embryo maturation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 155: 1871–1884.
- [178] Lu J, Zhang C, Baulcombe D C, et al. Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of *Arabidopsis* seeds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 5529–5534.
- [179] Yuan J, Chen S, Jiao W, et al. Both maternally and paternally imprinted genes regulate seed development in rice. *New Phytol*, 2017, 216: 373–387.
- [180] Iwasaki M, Hyvärinen L, Piskurewicz U, et al. Non-canonical RNA-directed DNA methylation participates in maternal and environmental control of seed dormancy. *eLife*, 2019, 8: e37434.
- [181] Wan X, Wu S, Li Z, et al. Maize genic male-sterility genes and their applications in hybrid breeding: progress and perspectives. *Mol Plant*, 2019, 12: 321–342.
- [182] Tucker M R, Okada T, Hu Y, et al. Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*. *Development*, 2012, 139: 1399–1404.
- [183] Singh M, Goel S, Meeley R B, et al. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. *Plant Cell*, 2011, 23: 443–458.
- [184] Das S, Swetha C, Pachamuthu K, et al. Loss of function of *Oryza sativa* Argonaute 18 induces male sterility and reduction in phased small RNAs. *Plant Reprod*, 2020, 33: 59–73.
- [185] Nonomura K I, Morohoshi A, Nakano M, et al. A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell*, 2007, 19: 2583–2594.
- [186] Zhai J, Zhang H, Arikiti S, et al. Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phasiRNAs in maize anthers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3146–3151.
- [187] Shi C, Zhang J, Wu B, et al. Temperature-sensitive male sterility in rice determined by the roles of AGO1d in reproductive phasiRNA biogenesis and function. *New Phytol*, 2022, 236: 1529–1544.
- [188] Shi C, Zou W, Zhu Y, et al. mRNA cleavage by 21-nucleotide phasiRNAs determines temperature-sensitive male sterility in rice. *Plant Physiol*, 2024, 194: 2354–2371.
- [189] Dou S, Zhang T, Wang L, et al. The self-compatibility is acquired after polyploidization: a case study of *Brassica napus* self-incompatible trilinear hybrid breeding system. *New Phytol*, 2024, 241: 1690–1707.
- [190] Bachmann J A, Tedder A, Fracassetti M, et al. On the origin of the widespread self-compatible allotetraploid *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae). *Heredity*, 2021, 127: 124–134.
- [191] Zhang J, Zhang S, Han S, et al. Deciphering small noncoding RNAs during the transition from dormant embryo to germinated embryo in larches (*Larix leptolepis*). *PLoS One*, 2013, 8: e81452.
- [192] Carrera-Castaño G, Calleja-Cabrera J, Pernas M, et al. An updated overview on the regulation of seed germination. *Plants*, 2020, 9: 703.
- [193] Li D, Wang L, Liu X, et al. Deep sequencing of maize small RNAs reveals a diverse set of microRNA in dry and imbibed seeds. *PLoS One*, 2013, 8: e55107.
- [194] Sun L, Zhao T, Qin D, et al. Comparative miRNAome combined with transcriptome and degradome analysis reveals a novel miRNA-mRNA regulatory network associated with starch metabolism affecting pre-harvest sprouting resistance in wheat. *BMC Plant Biol*, 2025, 25: 104.
- [195] Ortega-Galisteo A P, Morales-Ruiz T, Ariza R R, et al. *Arabidopsis* DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol*, 2008, 67: 671–681.
- [196] Sacnun J M, Crespo R, Palatnik J, et al. Dual function of HYPONASTIC LEAVES 1 during early skotomorphogenic growth in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2020, 102: 977–991.
- [197] Davière J M, Achard P. A pivotal role of DELLAs in regulating

- multiple hormone signals. *Mol Plant*, 2016, 9: 10–20.
- [198] Shani E, Hedden P, Sun T P. Highlights in gibberellin research: a tale of the dwarf and the slender. *Plant Physiol*, 2024, 195: 111–134.
- [199] Alabadi D, Sun T P. Green revolution DELLA proteins: functional analysis and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 2025, 76: 373–400.
- [200] Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G. First off the mark: early seed germination. *J Exp Bot*, 2011, 62: 3289–3309.
- [201] Achard P, Herr A, Baulcombe D C, et al. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 2004, 131: 3357–3365.
- [202] Jiang Y, Wu X, Shi M, et al. The miR159-MYB33-ABI5 module regulates seed germination in *Arabidopsis*. *Physiol Plant*, 2022, 174: e13659.
- [203] Alonso-Peral M M, Li J, Li Y, et al. The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2010, 154: 757–771.
- [204] Guo G, Liu X, Sun F, et al. Wheat miR9678 affects seed germination by generating phased siRNAs and modulating abscisic acid/gibberellin signaling. *Plant Cell*, 2018, 30: 796–814.
- [205] Martin R C, Liu P P, Goloviznina N A, et al. microRNA, seeds, and Darwin?: diverse function of miRNA in seed biology and plant responses to stress. *J Exp Bot*, 2010, 61: 2229–2234.
- [206] Liu P P, Montgomery T A, Fahlgren N, et al. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J*, 2007, 52: 133–146.
- [207] Dai X, Lu Q, Wang J, et al. MiR160 and its target genes *ARF10*, *ARF16* and *ARF17* modulate hypocotyl elongation in a light, BRZ, or PAC-dependent manner in *Arabidopsis*: miR160 promotes hypocotyl elongation. *Plant Sci*, 2021, 303: 110686.
- [208] Nonogaki H. Repression of transcription factors by microRNA during seed germination and postgermination: another level of molecular repression in seeds. *Plant Signal Behav*, 2008, 3: 65–67.
- [209] Marin E, Jouanet V, Herz A, et al. miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell*, 2010, 22: 1104–1117.
- [210] Surdonja K, Eggert K, Hajirezaei M R, et al. Increase of DNA methylation at the HvCKX2.1 promoter by terminal drought stress in barley. *Epigenomes*, 2017, 1: 9.
- [211] Carrillo-Barral N, del Carmen Rodríguez-Gacio M, Matilla A J. Delay of germination-1 (DOG1): a key to understanding seed dormancy. *Plants*, 2020, 9: 480.
- [212] 宋松泉, 唐翠芳, 姜孝成, 等. 种子休眠与萌发的关键调控因子 DOG1 的研究进展. *植物科学学报*, 2024, 42: 254–265.
- Song S Q, Tang C F, Jiang X C, et al. Research progress on DOG1, a key regulator of seed dormancy and germination. *Plant Sci J*, 2024, 42: 254–265 (in Chinese with English abstract).
- [213] Huo H, Wei S, Bradford K J. DELAY OF GERMINATION1 (DOG1) regulates both seed dormancy and flowering time through microRNA pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E2199–E2206.
- [214] Nonogaki H. Seed germination and dormancy: the classic story, new puzzles, and evolution. *J Integr Plant Biol*, 2019, 61: 541–563.
- [215] Kim J Y, Kwak K J, Jung H J, et al. MicroRNA402 affects seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions via targeting DEMETER-LIKE Protein3 mRNA. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 1079–1083.
- [216] Kirkbride R C, Lu J, Zhang C, et al. Maternal small RNAs mediate spatial-temporal regulation of gene expression, imprinting, and seed development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 2761–2766.
- [217] Wang L, Zheng K, Zeng L, et al. Reinforcement of CHH methylation through RNA-directed DNA methylation ensures sexual reproduction in rice. *Plant Physiol*, 2022, 188: 1189–1209.
- [218] Hari Sundar G V, Swetha C, Basu D, et al. Plant polymerase IV sensitizes chromatin through histone modifications to preclude spread of silencing into protein-coding domains. *Genome Res*, 2023, 33: 715–728.
- [219] Pal A K, Gandhivel V H-S, Nambiar A B, et al. Upstream regulator of genomic imprinting in rice endosperm is a small RNA-associated chromatin remodeler. *Nat Commun*, 2024, 15: 7807.
- [220] Luján-Soto E, Dinkova T D. Time to wake up: epigenetic and small-RNA-mediated regulation during seed germination. *Plants*, 2021, 10: 236.
- [221] Djami-Tchatchou A T, Sanan-Mishra N, Ntushelo K, et al. Functional roles of microRNAs in agronomically important plants-potential as targets for crop improvement and protection. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 378.