

microRNA 对植物生长发育和病毒感染的调控

段成国 王春哈 郭惠珊*

(中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100080. *联系人, E-mail: guohs@im.ac.cn)

摘要 microRNA (miRNA) 是一类在真核生物中广泛存在的大小约 22 nt 的非编码小分子单链 RNA, 它可以通过对靶标 RNA 的剪切或抑制靶标 RNA 的翻译调控靶标基因的表达. miRNA 不仅参与了植物器官的形态建成, 还参与调控植物的信号转导系统等与生长发育相关的基因表达调控过程. 与植物抗病毒 RNA 沉默途径一样, miRNA 途径也受到病毒沉默抑制子的干扰. 本文简述了 miRNA 介导的 RNA 调控途径和 siRNA 介导的 RNA 沉默路径的异同, 并对近几年 miRNA 在植物生长发育调控以及与病毒相互作用的研究进展进行了综述, 以求进一步理解真核生物基因表达调控的多层次性及复杂性.

关键词 miRNA siRNA 发育 RNA 沉默 病毒沉默抑制子

早在 1993 年, 在线虫发育的研究中 miRNA 就被发现, 但 miRNA 在生物界存在的普遍性和重要性直到最近才为人们所逐渐了解. 从 2000 年发现第 2 个 miRNA [1] 以来, 动物和植物大量 miRNA 相继被克隆 [2-5], 表明 miRNA 在真核生物中广泛存在. 截至目前, 在 miRNA 数据库 miRBase (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Rfam/mirna/browse.pl>) 中注册的 miRNA 已达 2900 余种, 但这一数字仍在增大, 包括模式生物拟南芥 117 种, 线虫 193 种, 病毒 35 种, 其中包括用生物信息学方法对已知基因组序列的物种预测的或用生物化学方法直接克隆得到的. 对那些未知基因组序列物种的 miRNA 只有通过克隆的方法得到, 如最近在低级植物苔藓中克隆到新的 miRNA [6]. 另外, 因为 miRNA 的表达具有时间和组织特异性, 用不同的组织或不同发育时期的生物材料(器官)也将可能分离克隆到新的 miRNA.

从不同生物中克隆及鉴定新的 miRNA 的标准最早由 Ambros 等人 [7] 提出, 包括表达与生物合成两个方面, 最近 Kim [8] 又进行了细化: (i) 该小 RNA 的表达应能通过 Northern 杂交, RT-PCR, RNase 保护实验 (RNase protection assay, RPA), 引物延伸法 (primer extension, PEX) 等技术手段检测到 (主要是 Northern 杂交的证据); (ii) 该小 RNA 应存在发夹状前体, 而且这段序列中无大的突起或环状结构; (iii) 该小 RNA 序列在系统学上应该是保守的; (iv) Dicer 酶缺失突变会增加发夹状前体的积累. 仅满足上述任何条件之一都不足以注释为一个新的 miRNA, 如果在该小 RNA 存在的前提下, 又能检测到发夹状前体或者是其

在系统学上的保守性, 都可以被认为是 miRNA; 如果因为该序列表达量太低而检测不到, 在具有保守性的前提下, 需要克隆到其前体 cDNA, 否则, 需要看该前体 RNA 在 Dicer 突变体中是否有增加, 才能被确定为 miRNA.

近年来的研究揭示了 miRNA 生物学功能的多样性与重要性. miRNA 介导的转录后基因调控是生物体内除了 siRNA (small interference RNA) 引起的 RNA 沉默之外另一条小 RNA (small RNA, sRNA) 调控途径. miRNA 最重要的功能之一是控制转录因子, 从而调控生物体的正常发育. 另外, miRNA 还可以将诸如蛋白水解、代谢、离子运输 [9] 以及信号转导途径 [10, 11] 中的多种 mRNA 作为靶点进行降解或阻止翻译, 这显示了此类小分子 RNA 具有重要的生物学意义. 另外, 对那些受胁迫诱导的小分子 RNA 的序列分析表明, 它们也参与了细胞的非生物胁迫反应 [12]. 例如, miR393 [12], miR159 [13] 和 miR164 [10] 的表达就分别受到脱落酸、赤霉素和生长素的调控. 除了在转录后水平和翻译水平上起作用外, miRNA 和 siRNA 一样, 还参与基因的甲基化和异源染色体形成继而沉默目的基因 [14]. 由此可见, siRNA 和 miRNA 的存在, 对生物正常发育的生理过程起着极为重要的调控作用.

1 miRNA 的生物合成

关于 miRNA 的生物合成及其在动、植物中的异同已有较多的文章进行了综述 [8, 9, 15, 16], 本文只做些概述.

miRNA 由非编码核基因转录而来, 其基因多定位于基因之间的间隔区, 也有一些处于已知基因的内含

子区域,而且有些成簇存在。miRNA基因首先转录成较长的初级miRNA,称为pri-miRNA,再在具有RNaseIII活性的核酸酶(动、植物中不同)作用下形成miRNA前体(pre-miRNA),然后由具有RNaseIII活性的核酸酶Dicer切割成21 nt的成熟miRNA。最初人们认为,miRNA基因是由RNA聚合酶III转录而来,因为像tRNA等小分子RNA都是由RNA聚合酶III转录的。但最近研究表明,大部分miRNA基因由RNA聚合酶II转录^[17,18]。因为miRNA的初级转录产物pri-miRNA一般都很长,有的达几个kb,且中间经常会包含超过4个U的片段,这很容易造成RNA聚合酶III的转录终止,而且与其他由RNA聚合酶II转录的基因一样,miRNA基因的转录也受到发育阶段的精确调控。另有研究表明,具有pri-miRNA序列的质粒能够由RNA聚合酶II转录出具有完全功能的成熟miRNA^[18]。最近的研究又提供了3个更直接的证据:首先,pri-miRNA含有5'帽子和3' poly(A)尾巴,而这是由RNA聚合酶II转录的mRNA的典型特征;其次,miRNA的转录活性对RNA聚合酶II的抑制剂敏感,而对其他聚合酶的抑制剂不敏感;最后,免疫沉淀分析表明miR-23a~27a~24-2的启动子区域能与RNA聚合酶II结合^[18]。

在动物体内,Drosha (RNaseIII)结合其他成分(如人类的DGCR8蛋白、果蝇的Pasha蛋白)将pri-miRNA切割成pre-miRNA(约60~70 nt)。Drosha是一种约160 kD的保守蛋白,包含两个RNAaseIII结构域和一个双链RNA结合结构域(dsRBD),它能与DGCR8, Pasha等蛋白组成更大的复合物。研究发现,Drosha通过识别pri-miRNA的三级结构来对其进行正确的加工。pre-miRNA通过Exportin-5^[19,20]运到核外,再由DCR (Dicer)加工成miRNA-miRNA*双体,miRNA-miRNA*存在的时间很短,在解旋酶(Helicase)的作用下加工成成熟的单链miRNA。

植物miRNA的合成与动物大体相似,只是pri-miRNA在核内是由DCL1 (Dicer-like protein)结合其他成分,如HYL1蛋白,切割成pre-miRNA(约80~200 nt),pre-miRNA很不稳定,在核内直接在DCL1的作用下形成miRNA-miRNA*双体,经HEN1甲基转移酶对miRNA-miRNA*双体3'的尿嘧啶进行甲基化^[21],再由HASTY (HST, Exportin-5的同源蛋白)运输至核外^[22],同样在解旋酶的作用下加工成成熟的miRNA。

2 由 miRNA 或 siRNA 介导的 RNA 沉默

真核生物中,21~25 nt的小RNA诱发的RNA沉默是导致基因表达受抑的一个非常保守的系统。除了以上描述的miRNA外,另一类非编码的小RNA是siRNA。siRNA是RNA沉默反应的重要特征。siRNA是由反向重复序列、病毒复制或RDR (RNA-dependent RNA polymerase)合成的dsRNA产物在Dicer作用下产生的。这些siRNA分子可结合并指导RNA诱导沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)降解与之序列同源的RNA分子,该过程被称为RNA沉默。在植物与*C. elegans*中,由siRNA介导的RNA沉默的一个非常重要的特征是产生沉默信号,并由沉默信号介导长距离的系统RNA沉默^[23,24]。

miRNA与siRNA在化学性质和作用效果上极其类似但又有着本质上的不同。近年来的研究发现,miRNA在代谢上与siRNA共享着一些相似的蛋白和路径,如都是Dicer蛋白加工的产物,都需要解旋酶的参与,所结合的复合体siRISC和miRISC(或称miRNP, miRNA-ribonucleoprotein complex)都包含有至少一个Argonaute家族蛋白。近年来,人们对植物中DCL蛋白家族的研究较多,通过对DCL的进一步亚细胞定位及功能研究,揭示了植物中不同小RNA的形成源于DCL蛋白功能的多样性。拟南芥编码4个DCL: DCL1主要分布于核内,可以确保miRNA由不完全配对的前体茎环结构开始的逐步加工过程^[22,25];核内的DCL3主要合成那些可以指导转座子和内源基因位点进行外在修饰(epigenetic modification)的siRNA分子,这种修饰的结果可能会产生转录水平的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)^[26];DCL2在核、质中均有分布,与一些病毒siRNA的产生有关^[27];DCL4在细胞中的定位虽不清楚,但已知其主要与ta-siRNA (trans-acting siRNA)的形成有关^[26,27]。ta-siRNA是一类作用于编码蛋白的mRNA的siRNA,主要在转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)中起作用。最近,在水稻中也克隆到了这4类同源DCL1~4^[28]。由此可见,不同Dicer可作用于不同的底物而产生不同的小RNA。

另外,不同Dicer识别不同底物也说明miRNA与siRNA的来源不同,miRNA来自于基因组DNA的非编码区,存在于小的单链发夹状转录前体,是内源性的。siRNA也可以由内源基因产生,如由DCL3产生的siRNA;其他siRNA来源于外源核酸入侵或病毒复制

形成的双链RNA。miRNA存在于前体的一条臂,最终产生的是单链RNA,结合于miRNPs(miRISCs)复合物而行使功能。而siRNA初为双链,能精确识别位于外显子区域的互补靶序列,并可能由反义链和RISC组成siRNA-RISC(siRISC)复合物^[29,30],最终导致靶序列的降解而诱导RNA沉默。

PAZ和PIWI域(PAZ and PIWI domain protein, PPD)家族蛋白Argonaute是RISC(miRNPs)沉默复合物的主要结合蛋白之一。与动物一样,植物RNA沉默途径的多样性也与Argonaute蛋白的多样性有关。拟南芥的Argonaute有10种之多,而且不同Argonaute蛋白结合的RISC复合体指导不同的siRNA和miRNA介导的调控途径,如Ago1与miRNA途径、ta-siRNA及转基因产生的siRNA引起的RNA沉默途径有关,而与病毒来源的siRNA沉默途径无关^[31];Ago4则与内源基因产生的siRNA引起的RNA沉默途径(epigenetic silencing)有关^[32,33]。

在作用方式上,siRNA介导的沉默最终导致靶标RNA的降解,而miRNA介导的RNA调节可以是对靶标RNA的剪切或对靶标RNA翻译的阻遏,这主要取决于miRNA与其靶标mRNA的序列互补的程度。与动物miRNA相比,植物miRNA与靶标mRNA的转录区互补程度更高,在作用方式上与siRNA更为接近,即主要造成靶标mRNA的降解。但也有例外,如植物中的miR172是目前已知惟一一个抑制靶标基因翻译的植物miRNA,miR172与其靶序列AP2 mRNA高度互补,却引起AP2蛋白表达受抑,而没有检测到AP2 mRNA水平的降低^[34,35]。动物miRNA靶点主要位于mRNA的3'非翻译区(3' UTR),大多数动物的miRNA被认为是通过与靶序列非精确的碱基配对而引起翻译的抑制。如果提供高度互补的人工序列,动物miRNA也能进入RNA降解(在动物中称为RNAi)途径,触发靶序列的裂解。最新的研究发现,动物miRNA,如lin4, let7以前被认为是抑制蛋白翻译,最近发现它们同样也对其靶标mRNA具有降解作用^[36]。动物的miR196也同样指导靶标RNA HOXB8的剪切^[37],说明动物miRNP在作用方式上类似于RISC^[38],也就是说miRNA和siRNA的功能在某种意义上是可以互换的。RISC与miRNP有相似的成分,即都含有PAZ和PIWI域的PPD家族蛋白,也支持这种观点。在RISC介导的序列降解中在一定部位允许非Watson-Crick配对的存在,所以一些动物的miRNA除了抑制蛋白翻

译,在一定程度上也可引起mRNA的降解。

3 miRNA 介导的 RNA 沉默调控植物生长发育

3.1 改变 miRNA 代谢影响植物的生长发育

植物miRNA通过与靶基因的序列互补造成靶基因的降解或翻译的阻断,从而实现对内源基因的负调控。在miRNA代谢途径中,核酸酶Dicer和PPD家族蛋白Argonaute对于miRNA的合成及发挥作用都是不可或缺的。无论在植物还是动物中,Dicer或特异的Argonaute蛋白的功能完全缺失突变都会导致胚发育的致死效应^[39,40]。干扰miRNA合成或破坏其功能的突变体,如dcl1, ago1会导致miRNA靶标基因的表达上调,造成植物生长发育异常^[22,41,42]。另外,dsRNA结合蛋白HYL1,对miRNA-miRNA*双体特异甲基化的甲基转移酶HEN1和与miRNA运输相关的HST蛋白都是miRNA合成途径中相关基因的编码产物。这些基因的功能缺失突变体,如hyl1, hen1和hst都和dcl1一样会导致miRNA积累减少,且表现出异常的发育表型,如叶片卷曲、无极性生长、侧生器官小、花序密集不正常、花期推迟(如dcl1, hyl1, hen1)或花期提早(如hst)、结果率低等^[22,41,42]。因此,miRNA产生、加工活性的部分丧失或胚萌后活性丧失都会产生多种缺陷型,这些结果都显示了miRNA在调控发育阶段上的重要性及普遍性。

鉴于miRNA本身较小,直接敲除miRNA制造miRNA缺失突变体较难,植物miRNA的功能最初主要是利用其前体序列进行过量表达来研究^[43,44],或通过直接改变miRNA的核苷酸降低与靶mRNA的碱基配对程度,或相反地通过改造靶mRNA与miRNA互补区域的序列,使之具有抵抗miRNA降解能力来研究miRNA对靶标mRNA的调节作用。

在转基因植物中过量表达miRNA前体可增加miRNA的水平,从而降低靶标mRNA的水平,正如预测的一样,转基因植物表现出目标mRNA缺陷突变表型。相反,抗miRNA的突变mRNA的过量表达可以稳定遗传信息,使植物表现出与野生型mRNA过量表达相似的表型^[10,11,35,42,45,46]。但也有许多miRNA基因的突变并没有产生很明显的表型,主要的原因是在植物中一个miRNA常可由多个miRNA前体(pre-miRNA)编码产生,所以一个miRNA前体突变有时并不会产生明显的表型改变。另外,植物中同一miRNA可以

作用于多个靶标 mRNA, miRNA 前体的组织和表达时间的特异性则可能造成同一突变体在某一器官组织表现出相对应的表型缺失, 而在另一器官组织不表现出表型. 比如, 在拟南芥 miR164 前体之一 *MIR164b* 位点的 T-DNA 插入突变 (*mir164b-1*) 小苗中, miR164 的积累水平是野生型的 1/16, 但小苗观察不到明显的表型变化^[47]. 然而, 虽然在根部 miR164 水平只是野生型的 1/3~1/4, 根部却出现与野生型不同的表型, 在相同的发育时期比野生型长出更多的侧根^[10]. 这一发现不但证明了 miR164 有多个基因组位点(前体)编码^[5], 也表明 miRNA 对靶标 mRNA 的调控具有组织特异性及特异发育阶段的调节作用.

3.2 miRNA 对植物靶基因的调控影响植物的生长发育

基于与植物 miRNA 相近配对原则并运用生物信息学方法预测出了大量靶基因^[48], 一些 miRNA 的调节功能及靶标基因列于表 1. 植物中的 miRNA 靶标基因大多是编码控制植物发育阶段的转录因子^[49,50]. 例如, 第一个被实验证明作为 miR171 靶标的 Scare-like 家族基因就是一类植物特异转录因子, 含 GRAS 结构域的 3 个成员, 即 *SCL6-II*, *SCL6-III* 和 *SCL6-IV*^[5,51], 该家族蛋白成员控制多个发育过程, 包括根的放射状生长^[52]和激素信号^[53]等. 随后发现控制叶片发育的含 TCP 域的 TCPs 转录因子受到

miRJAW 的调控, 高表达 miRJAW 造成叶片弯曲并呈锯齿状^[54]. 控制花发育的 AP2 基因是 miR172 的靶标基因, 过量表达 miR172 造成类似 AP2 缺失突变的花型, 如心皮螺旋状卷曲等^[35,55]. 再如, miR164 预测靶点包括含 NAC 域的转录因子家族中 5 个成员的 mRNA^[49]. 其中, *NAC1* 与侧根发育有关^[56,57], *CUC1/CUC2* 与分生组织发育及顶端器官分离有关^[58,59]. miR164 的表达量及定位对临近器官的胚萌、生长及花器官发育有重要影响^[9,41,44]. HD-ZIP 基因 (*PHB*, *PHV* 和 *REV*) 在绿色植物中高度保守地受 miRNA 调控^[14]. 无论是单子叶还是双子叶植物, miR165/miR166 的调控对于器官的对称性、维管发育以及分生功能都是必需的^[47,60,61]. 另外, ARF 家族基因 *ARF10*, *ARF16* 和 *ARF17* 等都是 miR160 的靶标基因, miR160 对 ARF 基因的正常表达和准确定位的调控对植物根冠细胞的正常分化或胚芽、叶子形态和花器官发育^[11,46]都非常重要. 由此可见, 植物 miRNA 通过清除细胞中特定发育过程的调控因子控制着植物的正常发育, 表明了 miRNA 介导的 RNA 沉默在内源基因的表达调控层面发挥重要作用.

3.3 miRNA 参与调控植物信号传导途径

miRNA 不仅参与了植物器官的形态建成, 还参与调控植物的信号转导系统(表 1). 如 miRNA 合成缺失突变体 *hyl1* 影响植物对脱落酸、生长素和细胞分

表 1 拟南芥中部分 miRNA 及其靶标基因

功能	拟南芥 miRNA	靶标基因
miRNA 合成调控	miR162	<i>DCL1</i>
	miR168	<i>AGO1</i>
发育模式	miR164	<i>CUC1</i> , <i>CUC2</i>
	miR165/166	<i>PHB</i> , <i>PHV</i> , <i>REV</i>
控制细胞分裂	miRJAW	<i>TCP2</i> , <i>TCP3</i> , <i>TCP4</i> , <i>TCP10</i> , <i>TCP24</i>
开花	miR156	<i>SPBL2</i> , <i>SPBL10</i>
	miR172	<i>AP2</i> , <i>TOE</i> (阻止翻译)
激素应答	miR159	<i>GA-MYB</i> (<i>MYB33</i> , <i>MYB65</i>)
	miR160	ARFs
	miR167	<i>ARF8</i>
	miR164	<i>NAC1</i>
	miR393	F-box 蛋白, bHLH 转录因子
	miR169	CCAAT-结合因子, <i>HAP2-like</i>
其他转录因子	miR396	生长调控因子
	miR171	GRAS domain (<i>SCR</i>)
	miR398	铜超氧化物歧化酶, 细胞色素 C 氧化酶亚单位 V
环境胁迫应答	miR395	ATP 硫酸化酶

裂素的应答^[62]。近来的研究发现为此提供了更直接的证据。很多受 miRNA 调控的植物转录因子都参与植物激素信号传导途径, 如 *NAC1* mRNA (miR164 的靶标基因) 受生长素(Auxin)诱导, 传导生长素信号, 编码侧根发育的正调控转录因子^[56,57]。我们的研究发现, miR164 可以指导 *NAC1* mRNA 的剪切并产生 3' 特异剪切片段^[10]; 同时, miR164 也和 *NAC1* mRNA 一样受到 Auxin 的诱导, 而且随着 miR164 的增加 *NAC1* mRNA 的 3' 特异剪切片段也增加, 同时全长 *NAC1* mRNA 减少, 表明生长素诱导了 miR164 介导的清除 *NAC1* mRNA 过量积累的过程, 体现了生长素信号传导途径精密的自我调控机制, 以控制侧根正常的生长发育^[10]。 *GAMYB* mRNA (miR159 的靶标 RNA) 受赤霉素诱导调节花的形成及花器官的发育, 处于 *GAMYB* 下游并受之正调控的是花分生组织特异的 *LEAFY* 及花粉囊发育调控的一类转录因子, miR159 同样受到赤霉素的诱导以负调控 *GAMYB* mRNA, 调节短日照植物开花时间及花粉囊的正常发育, 过量表达 miR159 的转基因植物表现出开花时间延迟, 花粉囊发育紊乱的表型^[13]。尽管 miR160 本身不受生长素的诱导^[11,46], 但是 miR160 的靶标基因之一 *ARF16* 却受生长素的诱导, 而且 *ARF16* 的表达和正确定位影响到另一生长素响应因子 *DR5* 的定位^[11]; 另一 miR160 介导的对 *ARF17* 的调节不仅对一些早期生长素诱导因子如 GH3-like RNA 具有调节作用^[11,46], 而且在维持生长素水平的动态平衡及植物器官发育(包括不定根的形成)中起着重要的作用^[46,63]。另一生长素应答因子 *ARF8* (miR167 的靶标 RNA) 调节茉莉酸积累和花粉的释放而影响花成熟期^[64], 同时影响胚轴的延长、根生长习性^[65]。这些研究结果表明, miRNA 参与调控植物的信号转导过程, 而且 miRNA 对靶标基因的这种调控作用对应答植物激素信号诱导、控制植物正常发育都是至关重要的。

4 病毒沉默抑制子干扰 miRNA 途径影响植物的发育及抗病机制

4.1 病毒沉默抑制子及其对 RNAi 的干扰作用

植物中, 小 RNA 介导的 RNA 沉默(或 RNAi)是作为一种抵御病毒入侵的适应性免疫系统而存在的, 与之相对应, 病毒则进化出了沉默抑制子蛋白来拮抗寄主对病毒基因组的沉默效应^[66], 迄今为止, 已从植物病毒中鉴定出了约 30 种 RNA 沉默抑制子^[67]。如

最早被鉴定的是烟草蚀纹病毒 TEV 的 HcPro 和黄瓜花叶病毒 CMV 的 2b 蛋白^[68]; 随后, 番茄不育病毒 TAV 的 2b 蛋白、马铃薯 X 病毒 PVX 的 p25、番茄丛矮病毒 TBSV 的 p19 蛋白等沉默抑制子也相继被发现^[69-71]。另外, 有的病毒可以编码多个抑制子, 如最近发现的柑橘衰退病毒 CTV 就编码 3 个抑制子 p20, p23 和 CP^[72]。研究发现, 这些抑制子蛋白结构和功能各异, 作用于 RNA 沉默的不同阶段, 如抑制沉默的起始、沉默信号的系统传播、沉默的保持、延续阶段^[70,73,74]; 抑制作用的分子机制也是多种多样, 如 HcPro 是通过阻止 siRNA 的形成或干扰 siRNA 的稳定性^[75], 或干扰 siRNA 与 RISC 的结合^[76]; 2b 蛋白则是作用于 Dicer 的下游, 通过失活沉默信号而阻止植物的系统性 RNA 沉默^[77]; p19 主要是通过结合 siRNA, 阻止 siRNA-RISC 复合体的形成^[78]; p25 干扰 dsRNA 的合成而抑制 RNA 沉默^[79]; 而 CTV 的 3 个抑制子分别作用于 PTGS 的不同步骤: p20 和 p23 抑制细胞间的 RNA 沉默, 同时 p20 和 CP 阻止沉默信号的向外运输, 以此确保 CTV 能在多年生的木本植物上得以存活^[68]。除了直接作用于 PTGS 途径之外, 有的沉默抑制子, 如 DNA 双生病毒基因 AC2, 通过干扰调节寄主 PTGS 的正、负调控因子来达到抑制效应^[80,81]。

4.2 沉默抑制子干扰 miRNA 途径影响植物发育及抗病作用

在发现 miRNA 及 miRNA 调控途径之前, 很多高表达沉默抑制子植物表现出的发育缺陷表型都找不到恰当的分子机理来解释, 直到鉴定出了 miRNA 途径缺失突变体, 问题才找到了答案。miRNA 合成缺失突变体如 *dcl1* 的表型大部分与表达 HcPro 的拟南芥严重的发育缺陷表型极为相似, 如植株矮化、节间距变短、叶片边缘突起等营养缺陷; 生殖器官的发育也表现出诸如萼片变窄、心皮无法融合或只能部分融合等缺陷^[82], 两种植物在根部也同样出现侧根大量生长的表型^[10]。联想到 miRNA 和 siRNA 介导的 RNA 调控途径的相似性, 以及沉默抑制子对 siRNA 途径干扰, 病毒学家们很自然地推测病毒沉默抑制子可能也干扰了 miRNA 途径从而影响了植物的正常发育。近来的研究证实了这一推测: 在高表达 HcPro 的拟南芥中, 非特异性地提高了 miRNA 的积累水平, 但 miR171 的靶标基因 *SCL*-like 家族 mRNA 非但没有降低反而升高^[82], 一个可能的解释就是 HcPro 干扰了 miR171 介导的 *SCL* mRNA 的降解。这在体外瞬时表达实验中得到

了证实^[82]。据认为, HcPro是干扰了miRISC和靶标RNA的相互作用而阻止miRNA对靶子的剪切^[82], 也可能像干扰siRNA途径一样干扰miRNA和RISC的结合^[76]。由于DCL1自身的表达受miR162的负调控^[83], 因此HcPro在抑制miR162介导的对DCL1 mRNA剪切的同时也就稳定了DCL1蛋白, 使HcPro植物中miRNA的合成非特异性地增强。

p69蛋白是芜菁黄花花叶病毒TYMV (Turnip yellow mosaic virus)编码的一种毒性因子, 同时具有沉默抑制子活性^[84]。高表达p69蛋白的拟南芥能表现出与病毒感染类似的症状^[85], 说明p69和HcPro一样, 除了能抑制寄主siRNA介导的抗病毒的RNA沉默之外还干扰了寄主的其他与发育相关的途径而使植物表现出病症。进一步研究发现, 转p69拟南芥总miRNA的积累水平也上调, 但与转HcPro植物不同的是转p69拟南芥中miRNA对靶标基因的剪切并没有受到抑制, 反而受到促进, 如miR156和miR171的靶标mRNA的3'剪切产物都提高了^[84], 这说明p69并不干扰miRNA对靶子mRNA的剪切。然而有趣的是, 转p69植物的DCL1 mRNA水平也上调^[84], 从p69非特异性地提高miRNA对靶标RNA的剪切来看, p69特异抑制miR162介导的对DCL1 mRNA的剪切而造成DCL1水平上调的可能性不大, 所以推测p69可能触发了植物体内的miRNA反馈调控系统^[84]。

另一直接与miRNA相互作用的沉默抑制子是非洲木薯花叶病毒ACMV (African cassava mosaic virus Cameroon Strain)编码的AC4蛋白。AC4能够与单链形式的miRNA或siRNA结合, 从而抑制了miRNA介导的对植物基因表达的负调控, 使植物出现不正常发育表型^[85]。核酸结合实验表明, AC4蛋白在体内体外都能与单链形式的miR159结合而不能与miR159-miR159*双体结合。不仅如此, AC4还可以和动物miRNA如lin4单链形式结合, 表明AC4蛋白可以非特异性地结合单链miRNA从而干扰了miRNA的正常功能。

由于表达某些病毒沉默抑制子的植物会表现出类似的表型, 所以抑制子还被用来探测控制器官发育的基因子集(a common subset of RNA)^[78,86]。例如, 转HcPro, p19或p15拟南芥都表现出窄长和锯齿型叶子, 表明与该叶子表型相关的基因群在这3种抑制子转基因植物中可能都受到同样的调控, 如CUC1 mRNA水平在这3种植物中都被上调^[86]。另外, 通

过比较转抑制子植物的表型和Northern杂交检测可以探测到控制同一表型的基因子集被调控的方式, 如被上调还是下调。所以, 利用沉默抑制子也可能鉴定到新的控制表型的miRNA的靶标基因。

由此可见, 病毒沉默抑制子不仅能抑制siRNA介导的抗病毒RNA沉默, 还能干扰miRNA介导的内源RNA沉默。由沉默抑制子引起的RNA调控的混乱远比单纯的与miRNA途径相关的功能缺失突变来得复杂。一方面, 抑制子对miRNA介导的对发育相关基因的调控的干扰会使植物表现出发育异常的表型; 另一方面, 抑制子对miRNA介导的对病毒抗性相关基因的调控途径的干扰又会改变植物对病毒感染的敏感性, 而且这两种情况可以同时发生。如转HcPro烟草除了表现出发育异常, 还表现出对病毒的广泛抗性^[87]。一个可能的解释就是HcPro干扰了内源小RNA (包括siRNA和miRNA)对其靶标基因的调控, 而其中就包括控制植物正常发育和对植物抗病毒具有正调控作用的基因。研究还发现, 在烟草中表达另一抑制子2b蛋白可以干扰植物另一广谱抗性途径: 水杨酸(SA)-抗性途径^[88], 这表明沉默抑制子可能干扰了miRNA对作用于SA抗性途径中的靶标基因的调控。由此可见, 病毒抑制子可通过干扰miRNA的调控途径, 直接或间接地改变植物对病毒的抗性作用。

5 结语

多细胞生物在发育的过程中要在适当的时空条件下产生特异类型的细胞或器官, 需要协同调节相关基因的表达。真核生物中, 对单个基因而言, 其表达调控可以发生在各个水平, 在这些调控过程中, 转录因子作为一种发育的调节因子已被广泛的研究和认同。与转录因子一样, miRNA是细胞分化命运的重要决定因子, 它不仅具有器官特异性, 而且可以在器官的特定组织中表达。miRNA作为一种新型的调控小RNA, 在植物中主要作为转录后的负调控因子发挥其生物学作用^[17,89]。miRNA介导的基因沉默调控途径的发现不仅丰富了真核生物基因表达调控系统, 同时使人们对RNA这一新的调控分子潜在的生物学功能产生了浓厚的兴趣与探索的欲望。miRNA不仅参与了植物器官的形态建成, 还参与调控植物的信号转导系统, 对植物正常生长发育起着极其重要的作用。miRNA介导的基因表达调控其独特性还在于

其靶基因的多样性及其调控的反馈控制机制,如近来在植物中一个有趣的发现是两个在 miRNA 途径上起重要作用的基因 DCL1 和 AGO1,各自受到 miR162 和 miR168 的负调控^[26,90,91]。不仅如此,miRNA 还在植物的抗病反应中发挥着非常重要和特殊的作用。病毒编码的沉默抑制子与宿主植物 miRNA/siRNA 介导的沉默途径之间的相互作用以及来源于病毒的小 RNA 参与植物的抗病反应等这些新的发现极大地扩展了人们对植物与病原之间相互作用机制的认识。

RNA 沉默作为植物的一种抗性反应和调控机制的研究虽取得了很大的进展和突破,但也仅仅是揭开了冰山的一角,可以肯定的是植物 RNA 沉默的防御、调控反应与病原抑制 RNA 沉默的反防御、干扰作用机制远比现在了解的复杂。对 miRNA 调控植物生长发育和潜在的抗病作用的更深入的研究,将帮助我们进一步地理解真核生物基因表达调控的多层次性及复杂性,也为研究植物与病原的相互作用带来新的挑战 and 机遇。

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号:30530500)。

参 考 文 献

- 1 Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901~906[DOI]
- 2 Lee R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294(5543): 862~864[DOI]
- 3 Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294(5543): 858~862[DOI]
- 4 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294(5543): 853~858[DOI]
- 5 Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 2002, 16(13): 1616~1626[DOI]
- 6 Arazi T, Talmor-Neiman M, Stav R, et al. Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *Plant J*, 2005, 43(6): 837~848[DOI]
- 7 Ambros V, Bartel B, Bartel D P, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 2003, 9: 277~279[DOI]
- 8 Kim V N. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 376~385[DOI]
- 9 Zamore P D, Haley B. Ribo-gnome: The big world of small RNAs. *Science*, 2005, 309(5740): 1519~1524[DOI]
- 10 Guo H S, Xie Q, Fei J F, et al. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for arabidopsis lateral root development. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1376~1386[DOI]
- 11 Wang J W, Wang L J, Mao Y B, et al. Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2204~2216[DOI]
- 12 Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001~2019[DOI]
- 13 Achard P, Herr A, Baulcombe D C, et al. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 2004, 131(14): 3357~3365[DOI]
- 14 Bao N, Lye K W, Barton M K. MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell*, 2004, 7(5): 653~662
- 15 Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, 301(5631): 336~338[DOI]
- 16 陈芳, 殷勤伟. 调控基因表达的 miRNA. *科学通报*, 2005, 50(13): 1289~1299
- 17 Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281~297[DOI]
- 18 Lee Y, Kim M, Han J. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051~4060[DOI]
- 19 Bohnsack M T, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 2004, 10(2): 185~191[DOI]
- 20 Yi R, Qin Y, Macara I G, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNA. *Genes Dev*, 2003, 17(24): 3011~3016[DOI]
- 21 Li J, Yang Z, Yu B, et al. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, 15(16): 1501~1507[DOI]
- 22 Park M Y, Wu G, Gonzalez-Sulser, et al. Nuclear processing and export of microRNA in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(10): 3691~3696[DOI]
- 23 Klahre U, Crete P, Leuenberger S A, et al. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(18): 11981~11986[DOI]
- 24 Winston W M, Molodowitch C, Hunter C P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 2002, 295(5564): 2456~2459[DOI]
- 25 Kurihara Y, Watanabe Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(34): 12753~12758[DOI]
- 26 Xie Z, Johansen L K, Gustafson A M, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2004, 2(5): 642~652
- 27 Yoshikawa M, Peragine A, Park M Y, et al. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2005, 19(18): 2164~2175[DOI]
- 28 Liu B, Li P, Li X, et al. Loss of function of OsDCL1 affects microRNA accumulation and causes developmental defects in rice. *Plant Physiol*, 2005, 139: 296~305[DOI]
- 29 Khvorova A, Reynolds A, Jayasena S D. Functional siRNAs and

- miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003, 115(2): 209~216[DOI]
- 30 Schwarz D S, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003, 115(2): 199~208[DOI]
- 31 Baumberger N, Baulcombe D C. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(33): 11928~11933[DOI]
- 32 Zilberman D, Cao X, Jacobsen S E. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003, 299(5607): 716~719[DOI]
- 33 Zilberman D, Cao X, Johansen L K, et al. Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol*, 2004, 14(13): 1214~1220[DOI]
- 34 Aukerman M J, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2730~2741[DOI]
- 35 Chen X M. A microRNA as a transcriptional repressor of AP2 in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 2004, 303(5666): 2022~2025[DOI]
- 36 Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 2005, 122(4): 553~563[DOI]
- 37 Yekta S, Shih I H, Bartel D P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 2004, 304(5670): 594~596[DOI]
- 38 Schwarz D S, Zamore P D. Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev*, 2002, 16(9): 1025~1031[DOI]
- 39 Bernstein E., Kim S Y, Carmell M A, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 2003, 35: 215~217[DOI]
- 40 Schauer S E, Jacobsen S E, Meinke D W, et al. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(11): 487~491[DOI]
- 41 Boutet S, Vazquez F, Liu J, et al. *Arabidopsis* HEN1: A genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr Biol*, 2003, 13(10): 843~848[DOI]
- 42 Han M H, Goud S, Song L, et al. The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(4): 1093~1098[DOI]
- 43 Bartel B, Bartel D P. MicroRNAs: At the root of plant development? *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 709~717[DOI]
- 44 Dugas D V, Bartel B. MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(5): 512~520[DOI]
- 45 Laufs P, Peaucelle A, Morin H, et al. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development*, 2004, 131(17): 4311~4322[DOI]
- 46 Mallory A C, Bartel D P, Bartel B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1360~1375[DOI]
- 47 Mallory A C, Dugas D V, Bartel D P, et al. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol*, 2004, 14(12): 1035~1046[DOI]
- 48 Wang X J, Reyes J L, Chua N H, et al. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol*, 2004, 5(9): R65[DOI]
- 49 Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, et al. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 2002, 110(4): 513~520[DOI]
- 50 Hobert O. Common logic of transcription factor and microRNA action. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(9): 462~468[DOI]
- 51 Llave C, Xie Z, Kasschau K D, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 2002, 297(5589): 2053~2056[DOI]
- 52 Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, et al. The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, 2000, 101(5): 555~567[DOI]
- 53 Silverstone A L, Ciampaglio C N, Sun T. The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell*, 1998, 10(2): 155~169
- 54 Palatnik J F, Allen E, Wu X, et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 2003, 425(6955): 257~263
- 55 Aukerman M J, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2730~2741[DOI]
- 56 Xie Q, Frugis G, Colgan D, et al. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev*, 2000, 14(23): 3024~3036[DOI]
- 57 Xie Q, Guo H S, Dallman G, et al. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature*, 2002, 419(6903): 167~170[DOI]
- 58 Aida M, Ishida T, Fukaki H, et al. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 841~857[DOI]
- 59 Takada S, Hibara K, Ishida T, et al. The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development*, 2001, 128(7): 1127~1135
- 60 Kidner C A, Martienssen R A. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, 2004, 428(6978): 81~84[DOI]
- 61 Juarez M T, Kui J S, Thomas J, et al. microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature*, 2004, 428(6978): 84~88[DOI]
- 62 Lu C, Fedoroff N. A mutation in the *Arabidopsis* HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell*, 2000, 12(12): 2351~2366[DOI]
- 63 Sorin C, Bussell J D, Camus I, et al. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1343~1359[DOI]
- 64 Nagpal P, Ellis C M, Weber H, et al. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*, 2005, 132(18): 4107~4118[DOI]

- 65 Tian C E, Muto H, Higuchi K, et al. Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. *Plant J*, 2004, 40(3): 333~343
- 66 Llave C. MicroRNAs: More than a role in plant development? *Mol Plant Pathol*, 2004, 5:361~366[DOI]
- 67 Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet C M. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(16): 9632~9636[DOI]
- 68 Brigneti G, Voinnet O, Li W X, et al. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J*, 1998, 17(22): 6739~6746
- 69 Li H, Li W X, Ding S W. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, 2002, 296(5571): 1319~1321
- 70 Voinnet O, Lederer C, Baulcombe D C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 2000, 103(1): 157~167[DOI]
- 71 Qiu W, Park J W, Scholthof H B. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15(3): 269~280
- 72 Lu R, Folimonov A, Shintaku M, et al. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(44): 15742~15747[DOI]
- 73 Kasschau K D, Carrington J C. A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 1998, 95(4): 461~470[DOI]
- 74 Voinnet O, Pinto Y M, Baulcombe D C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(24): 14147~14152[DOI]
- 75 Mallory A C, Reinhart B J, Bartel D, et al. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 15228~15233[DOI]
- 76 Chapman E J, Prokhnovsky A I, Gopinath K, et al. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*, 2004, 18(10): 1179~1186[DOI]
- 77 Guo H S, Ding S W. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J*, 2002, 21(3): 398~407[DOI]
- 78 Dunoyer P, Lecellier C H, Parizotto E A, et al. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, 2004, 16(5): 1235~1250
- 79 Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4671~4679
- 80 Trinks D, Rajeswaran R, Shivaprasad P V, et al. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J Virol*, 2005, 79(4): 2517~2527[DOI]
- 81 Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet C M. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(3): 144~151
- 82 Kasschau K D, Xie Z, Allen E, et al. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell*, 2003, 4(2): 205~217[DOI]
- 83 Xie Z, Kasschau K D, Carrington J C. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol*, 2003, 13(9): 784~789[DOI]
- 84 Chen J, Li W X, Xie D, et al. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell*, 2004, 16(5): 1302~1313[DOI]
- 85 Chellappan P, Vanitharani R, Fauquet C M. MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(29): 10381~10386[DOI]
- 86 Dunoyer P, Voinnet O. The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(4): 415~423[DOI]
- 87 Pruss G J, Lawrence C B, Bass T, et al. The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology*, 2004, 320(1): 107~120[DOI]
- 88 Ji L H, Ding S W. The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol Plant Microbe Interact*, 2001, 14(6): p. 715~724
- 89 He L, Hannon G J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522~531[DOI]
- 90 Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, et al. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev*, 2004, 18(10): 1187~1197[DOI]
- 91 Vazquez F, Gascolioli, V, Crete, P, et al. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol*, 2004, 14(4): 346~351[DOI]

(2005-10-24 收稿, 2005-12-26 接受)