生 物 工 程 学 报
Chinese Journal of Biotechnology
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
May 25, 2012, 28(5): 521−530
©2012 Chin J Biotech, All rights reserved

特邀综述

RNA 沉默——植物基因组免疫的安全防线

董丽，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 100101

董丽, 郭惠珊. RNA 沉默——植物基因组免疫的安全防线. 生物工程学报, 2012, 28(5): 521−530.
Dong L, Guo HH. RNA silencing, the fundamental security strategy of genomic immunity: a review. Chin J Biotech, 2012, 28(5): 521−530.

摘 要：在植物中，起始于双链 RNA 的长度为 21~24 个核苷酸的小 RNA，能够诱发两种形式的表观遗传学基因沉默。转录后基因沉默 (Post-transcriptional gene silencing，PTGS)，可以介导细胞质中同源 mRNA 的降解；转录基因沉默 (Transcriptional gene silencing，TGS)，则主要通过小 RNA 介导同源启动子区的 DNA 甲基化，从而抑制基因转录。文中针对 PTGS 和 TGS 通路的区别与联系、沉默传递研究的现状及内源与外源基因沉默的异同点等问题进行探讨。

关键词： RNA 沉默，基因组免疫，植物内源编码基因，RNA 介导的 DNA 甲基化 (RdDM) 途径

RNA silencing, the fundamental security strategy of genomic immunity: a review

Li Dong, and Huishan Guo

State Key Laboratory of Plant Genomics, *Institute of Microbiology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100101, *China*

Abstract: The 21-24 nucleotides small RNA that generated from double strands RNA can trigger two types of epigenetic gene silencing in plants. One is Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS), characterized by cleavage of homologous mRNA in cytoplasm. Transcriptional Gene Silencing (TGS) is another one, in which transcription inhibition is obtained through small RNA-directed DNA methylation of homologous promoter region. Here we summarized the relationship and differences between PTGS and TGS, the current achievement in the study of RNA silencing spreading, as well as the discrepancy of exogenous and endogenous gene silencing, and discussed the underlying reasons in the end.

Keywords: RNA silencing, genomic immunity, endogenous coding genes in plants, RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway

Received: January 18, 2012; **Accepted:** February 21, 2012
Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31030009).
Corresponding author: Huishan Guo. Tel: +86-10-64847989; E-mail: guohs@im.ac.cn
国家自然科学基金 (No. 31030009) 资助。

2006 年，美国马萨诸塞大学医学院的 Craig C. Mello 和斯坦福大学医学院的 Andrew Z. Fire 因在 RNA 干扰 (RNA interference，RNAi) 研究领域中的杰出贡献而获得诺贝尔生理学或医学奖。这一事件确立了 RNA 干扰在真核生物基因表达调控网络中的主导地位。RNA 干扰，又称 RNA 沉默 (RNA silencing)，是一种具有核苷酸序列特异性的，能够导致 RNA 降解，蛋白翻译抑制，DNA 甲基化，以及异染色质形成的表观遗传学效应。RNA 沉默现象广泛存在于植物、真菌、涡虫、锥虫、果蝇、大鼠、人等真核生物中。自 1990 年人类发现 RNA 沉默现象至今，20 多年的探索使植物 RNA 沉默的理论体系日臻成熟和完善。

1 转录后基因沉默 (Post-transcriptional gene silencing，PTGS)

1.1 RNA 沉默的发现

RNA 沉默的发现最早可以追溯到 1990 年。Jorgensen 等向矮牵牛中导入粉红色素合成相关基因，预期产生颜色更深的紫色牵牛花，结果发现许多花朵的颜色变成白色或花白色。分析表明：导入的基因与内源粉红色素基因同时被沉默，所以被称为共抑制 (Co-suppression)[1]。这一现象与真菌中的压制 (Quelling)[2]和动物中的 RNA 干扰 (RNA interference，RNAi)[3]类似，都是以靶标 mRNA 的降解为特征，所以又被称为转录后基因沉默 (Post-transcriptional gene silencing，PTGS)。植物中的 PTGS 主要过程如下：外源转基因 mRNA 在一种依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 RDR6 (RNA DEPENDENT RNA POLIMERASE6) 的作用下形成双链 RNA (dsRNA)，再由一种 RNA 酶 III 蛋白——Dicer 或 Dicer-like (DCL，植物中以 DCL4 为主) 切割，产生 21 nt 小干扰 RNA (Small interference RNA，siRNA)，siRNA 进入含有 Argonaut 蛋白 (AGO) 的 RISC 复合体 (RNA-induced silencing complex)[4-5]，介导与 dsRNA 有序列相似性的 mRNA 的降解[4,6-7]。之后，RDR6 又以 siRNA 为引物，外源 mRNA 为模板，合成新的 dsRNA，在 DCL 作用下产生更多的次级 siRNA；次级 siRNA 的再循环使沉默信号得以扩增，在宿主中产生系统性的沉默。

1.2 内源 PTGS 途径

外源 RNA 诱导 RNAi 的发现促使人们寻找内源性 RNAi 的存在。第一个内源小 RNA——线虫 lin4，是在 1993 年发现的[8]；时隔 7 年，线虫中另一个长度为 21 nt 的 let7 RNA 被发现[9]；此后，科研工作者们相继在线虫、Hela 细胞、果蝇、拟南芥等许多真核模式生物和细胞中找到了数百种相似的小分子 RNA，并将其称为 miRNA (microRNA)。这些 miRNA 在各种生物中对靶标 RNA 的调节功能也很保守[10]。miRNA，一般长度为 21~22 nt，是由非编码 RNA 折叠所形成的、短的、不完全配对的茎环结构经 DCL1 切割后产生的，小 RNA 进入 AGO1 复合体，介导 mRNA 的降解、翻译后水平的调控[11-13]。通过 miRNA 途径，生物体能够动态的调节编码基因的表达水平，以适应不同发育时期和应对外界环境刺激的需要。

植物体内还存在另外一种参与 PTGS 的小 RNA——反式作用 siRNA (Trans-acting siRNA，ta-siRNA)。ta-siRNA 途径中的主要环节就是次级

siRNA 的生成[14]。ta-siRNA 的前体是一类来源于 *TAS* (ta-siRNA transcript) 基因的非编码转录本。ta-siRNA 的产生需要 miRNA 的参与，miRNA 介导的 *TAS* 基因裂解之后，部分残留的转录本被 RDR6 转化为 dsRNA。dsRNA 经 DCL4 切割产生 ta-siRNA，ta-siRNA 介导其他靶标基因，而非 *TAS* 基因的降解，故此被称为反式 siRNA[15-18]。

nat-siRNA (Natural antisense transcripts siRNA) 途径也是植物内源 PTGS 途径的一个重要组成部分。拟南芥基因组编码 2 000 多个自然的顺-反义基因对，这些内源的顺-反义基因转录自不同的 DNA 链，各自的转录本在 3′末端互补。通常情况下，其中一个基因是组成型表达的，另一个基因仅在特定胁迫条件下被诱导表达，二者形成 dsRNA。dsRNA 作为 DCL 的底物，被切割成 21~24 nt nat-siRNA。nat-siRNA 靶向降解顺-反义基因的一个转录本，裂解的 RNA 分子又借助于 RDR6 和 SGS3 (SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3) 的功能被转化成 dsRNA。然后 RDR6/SGS3 合成的 dsRNA 分子被 DCL 处理成 nat-siRNA，进而被用于介导同源 mRNA 的沉默[19]。目前的研究结果表明：DCL1、DCL2、DCL4 可能在不同的基因对调控中发挥各自的作用[20-22]。

1.3 RNAi 技术

随着 PTGS 途径研究的深入，RNAi 技术应运而生。RNAi 技术就是利用人工方法向宿主中引入沉默诱导因子，达到降解靶基因转录本的目的。常用的方法有很多，如将体外合成的 siRNA，或包含其序列的 dsRNA，用注射等方法导入宿主细胞中；或者，在宿主体内表达与目的基因相关的 miRNA 的前体序列或反向重复 RNA (Invert repeat RNA，IR-RNA)，诱导靶基因 mRNA 降解。再有，研究发现植物病毒侵染会诱导基因沉默 (Virus induced gene silencing，VIGS)。利用 VIGS 原理，将目的基因与病毒载体重组，用以侵染植物也能诱导靶标基因的沉默。IR-RNA 法稳定、易行；病毒侵染法高效、周期短。因此，二者经常被用于基因敲除和 RNA 沉默机制的研究中。

2 转录基因沉默

2.1 植物内源 RdDM 途径

除了 PTGS，植物体内还存在一种与小 RNA 相关的转录基因沉默 (Transcriptional gene silencing，TGS)[23-25]。由于这里的 TGS 与 DNA 甲基化相关，因此相应的机制被定义为 RNA 介导的 DNA 甲基化 (RNA-directed DNA methylation，RdDM)[26]。RdDM 途径是植物特有的维持基因组稳定性的机制，其靶点主要是转座子、重复序列和编码短 RNA 的基因间区[27]。利用遗传学和生物化学方法，人们已经分离出很多参与 RdDM 途径的调控元件。这些元件在以下 3 个方面的一个或多个点上行使功能：hc-siRNA (Heterochromatic siRNA) 的合成；脚手架 RNA (Scaffold RNA) 的合成；参与 siRNA 和新生脚手架 RNA 互补配对的效应复合体的排布以招募 DNA 甲基化酶。

siRNA (以 24 nt 为主)的合成需要 Pol IV (RNA polymerase IV)、RDR2 和 DCL3 的参与[28-32]。而脚手架 RNA 是由 RNA 聚合酶 Pol V 或者 Pol II 合成的[33-37]。与 Pol V 相比，Pol II 倾向于合成基因间区低拷贝重复位点相关的脚手架 RNA[37]。不同的 RNA 聚合酶在 RdDM 过程中协同作用。Pol II 合成的脚手架转录本可能

有助于招募 Pol IV 和 Pol V 到 RdDM 靶点，分别促进 siRNA 的生成或 DNA 甲基化。Pol V 合成脚手架 RNA 的过程需要染色质调节蛋白 DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1)、染色质铰链结构域蛋白 DMS3 (DEFECTIVE MERISTEM SILENCING3) 和 RDM1 (RNA-DIRECTED DNA METHYLATION1) 的参与[36-40]；而 Pol II 合成脚手架 RNA 需要 DRD1，但不需要 DMS3[37]，是否需要 RDM1 还未经查考。siRNA 和脚手架 RNA 配对及 DNA 甲基化酶的招募过程则由 AGO4、AGO6 或者 AGO9、DRD1、Pol V、DMS3 (DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING3)、RDM1 和 DNA 甲基转移酶 DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLASE2) 负责[27,38-39,41-45]。细胞学分析结果表明：植物中 RdDM 途径对于靶位点的沉默调控具有时空分布的特点。高度重复序列主要聚集于核仁周边区，被 Pol V 介导的 RdDM 沉默。而对于基因间低拷贝位点，则有两种情况：分布在核仁周边区的，被依赖于 Pol V 的 RdDM 沉默；散布于核质中的，则成为依赖于 Pol II 的 RdDM 沉默靶点[36-37,46]。

目前在拟南芥中还发现 2 个反向重复序列与通常用于 RNAi 的转基因结构极其相似，有对应的靶点，均能产生 21~24 nt 的 siRNA。其中至少 IR71 的 siRNA 能被招募到 AGO 复合体中介导自身和靶基因的 PTGS 和 RdDM。嫁接实验表明，这些 siRNA 能够进行长距离运输，并能在目标组织中介导 RdDM [47]。

2.2 转基因诱导的 TGS

尽管 RdDM 途径是植物特有的维持基因组稳定性的机制，但该途径最早是在转基因诱导沉默实验中被发现的[23-25]。利用与启动子同源的序列构建 IR 转基因载体，在植物体内转录，其产物在细胞核里被加工成 24 nt siRNA 后，能够介导相应区域的 DNA 甲基化，从而抑制靶基因转录。植物中，诱导转基因和编码蛋白的内源基因的 TGS 效率有很大差别[48]。植物基因组中的转基因很容易被沉默，而且无论有无沉默诱导子，沉默状态都可以遗传[24]。而内源编码基因只有在诱导子存在的情况下才能被沉默，而且沉默效率远远低于转基因[49-50]。这一特点暗示：尽管存在诱导因子 (24 nt siRNA)，RdDM 途径也不大可能作用于内源编码基因。

3 RNA 沉默的传递

在植物中，沉默只有向起始细胞以外传递，才能更有效地抑制靶基因表达[51-52]。沉默的传递包含 3 个层面：沉默信号的扩增、传递和接收。

现已证明：双链 siRNA 是 RNA 沉默的信号之一[53-54]。DCL3 或 DCL4 生成的 siRNA 通过胞间连丝在细胞间运动；通过韧皮部进行长距离运输，形成系统性沉默。运动的 21 nt siRNA 与 AGO1 结合，介导 PTGS[6,53,55]；而运动的 24 nt siRNA 可能与 AGO4、AGO6 或 AGO9 结合，介导 DNA 甲基化或与转录基因沉默相关的染色质修饰[43,45]。两种小 RNA 在信号接收组织中都可能利用 RNA 聚合酶 Pol IV 或 RDR 的功能，起始信号的扩增过程[56-57]。然而，目前还不能排除 siRNA 前体 RNA，例如 dsRNA 作为信号的可能。

一般情况下，初级小 RNA 对靶基因转录本的积累仅具有微调作用，例如大部分 miRNA 与靶 mRNA 的关系；若要得到更强的沉默效果，

有赖于次级 siRNA 的合成，即信号的扩增过程。次级 siRNA 分为两类，一类是与原始激发子，如 dsRNA 相关的 siRNA 的再生产；另一类来自于原始靶标区段的两侧 (此现象即所谓的“沉默的漂移”)。二者的生成均需要 RDR6 的功能和靶标基因的转录[58-60]。而在 TGS 过程中，信号扩增伴随着次级 24 nt siRNA 的产生和启动子区甲基化的扩展，这一过程是通过依赖于 Pol IV-RDR2-DCL3 的 RdDM 途径逐步完成的。在 RdDM 途径突变体 *rdr2*，*nrpd1* (NRPD1 是 Pol IV 的大亚基)和 *dcl3* 中，次级 siRNA 消失，DNA 甲基化水平明显下降。Daxinger 等在其所使用的外源转基因 TGS 沉默系统中还发现：甲基化的扩展是从靶点区向下游单向延伸的[61]。

除了信号的扩增和传递过程，植物内源可能还存在一个信号接收系统，以便更好地协调整个沉默过程。在外源转基因 GFP 沉默系统中发现：RdDM 途径的重要元件 NRPD1、RDR2 和 DCL3 以及 RDR6 可能参与长距离 mRNA 沉默的信号接收过程[56]。

4 植物内源编码基因 RNA 沉默的研究

在自然状态下，植物利用 miRNA、ta-siRNA 和 nat-siRNA 等途径，适应不同生理或外界环境的需要，对部分编码基因的活性进行调节。大部分活跃表达的蛋白编码基因不受 PTGS 或 TGS 沉默途径的调节。当人们利用 RNAi 手段，向植物中转入外源诱导因子，诱导内源蛋白编码基因沉默时发现：无论诱导 PTGS 还是 TGS，都不能得到预期的效果，更不能产生系统性沉默。内源基因只有置于转基因构建中，作为转基因来表达，方能被有效地沉默[23,48,62]。然而，利用 RNA 病毒携带启动子区片段，建立针对内源基因的 VIGS 体系，则沉默效果大大加强[63]。这是因为病毒自身的复制及其在细胞间和系统性的扩散，使沉默诱发子 (启动子区片段) 也同时被不断的扩增，从而增强对内源基因的沉默效应。

由于植物内源基因很难被沉默，而以往的沉默研究大多借助于外源系统，不能完全体现内源编码基因在面对沉默诱导因子时的原初反应。因此，对于植物是通过何种方式调控和避免内源蛋白编码基因的 RNA 沉默，目前所知甚少。郭惠珊研究员等[64]早期通过一个可诱导的 *PDS* (Phytoene desaturese) 基因沉默系统 (*PDSi*，包含有沉默诱发子) 的研究，使这一问题露出了冰山一角。研究发现：在可诱导沉默的植株中，沉默诱发子诱导的内源 *PDS* 基因沉默仅限于局部被诱导的组织和极少量系统叶片，不能传递到整个植株[64]。我们近期将 *PDSi* 株系与 RdDM 途径相关突变体 *drd1*、*nrpd2* 和 *nrpe1* 进行杂交，发现在这些基因功能缺失背景下，*PDS* 沉默表型增强。分子遗传学分析结果表明：在野生型 *PDSi* 植株中，siRNA 的合成，DNA 甲基化及其从转录区向启动子区的传递，这些过程都只发生在外源沉默诱发子结构上，而内源 *PDS* 靶点不受影响。在 3 个 RdDM 突变体中，外源沉默诱发子转录本及相应的 siRNA 大量积累，甲基化水平显著低于野生型 *PDSi* 株系。我们的实验结果暗示：植物通过 RdDM 途径，加强外源沉默诱发子的自我沉默，从而阻止沉默信号的继续产生，有效地抑制了由沉默诱发子诱导的内源靶基因转录本的沉默。我们的研究揭示了植物对编码基因正常

表达的一种自我保护机制；同时也解释了利用RNAi 手段诱导内源编码基因沉默经常无法达到预期沉默效果这一普遍现象背后的原因。

5 植物中的“自我识别系统”

已有的研究结果表明：尽管与沉默诱发子存在序列同源性，内源功能基因很难被沉默[23]。我们的研究揭示：诱导内源编码基因沉默的低效率，与沉默过程中内源靶标上不能产生次级siRNA 和 DNA 的从头甲基化直接相关[65]。次级siRNA 的产生与 RDR6 等相关，DNA 的从头甲基化则依赖于 RdDM 途径，这两者均不能作用于内源编码基因[6,27,62]。这些现象都表明：植物体内可能存在一种天然的“自我识别系统”，这是植物利用基因沉默系统避免自身被沉默的最基本的保障。无论对于 RdDM 相关的 TGS 过程，还是在依赖于 RDR6 的 PTGS 扩展过程，“自我识别”都至关重要。然而，迄今为止，人们仍未揭开“植物自我识别系统”的神秘面纱。有研究者认为：这可能与 DNA 的甲基化水平相关。我们的研究发现：与内源靶基因不同，外源转基因DNA 结构有一定程度的甲基化，这可能就是植物识别“自己”或“异己”基因组的重要标志之一[65]。另外，T-DNA 本身可能具有与重复序列或病毒相似的 DNA 区段 (例如，通常所用的 35S 启动子本身就来源于病毒)；或者其插入位点常常与重复序列相毗邻，导致其更容易被 RdDM 途径沉默[66]。

简言之，植物利用基因沉默机制维持自身基因组的稳定性，是通过 PTGS 和 TGS 途径双管齐下的。对于常规表达的基因，主要通过 miRNA、ta-siRNA 和 nat-siRNA 等沉默途径进行微调；对于内源转座子等重复序列，则利用 siRNA 介导的甲基化途径使其保持低活性状态；对于转基因或病毒等外源 DNA 或 RNA 结构，植物一方面通过 PTGS 降解相关 RNA，另一方面利用 RdDM 途直接造成其转录沉默，从而缓解了其对内源功能基因的 PTGS 作用。从作用机制上讲，后两者有很多的相似之处。这可能是由于它们具备共同的结构特点，均能被植物的“识别系统”检测出来的缘故。

6 展望

每一种生物都具有特定的基因组，然而，生物基因组是如何在亿万年的遗传与变异中，保持相对稳定呢？RNA 沉默现象的发现与研究，为人类认识这一问题提供了一个新的视角。RNA 沉默能够抑制外源 DNA 入侵 (病毒、转基因)[67]；保持内源转座子、重复序列等的低活性[68-69]；在发育过程中调节基因表达[70-71]，是一种重要的基因组免疫机制。

尽管近年来的研究成果丰富了我们对于 RNA 沉默的知识，然而新的问题不断产生，原有问题仍然存在。例如，PTGS 和 TGS 途径中更多调控元件有待发现；与基因沉默信号传递直接相关的调控因子一直没有找到；在基因组中，什么特征决定了一个位点是否能产生 21~22 nt 或 24 nt 的 siRNA？植物内源系统如何识别“自己”和“异己”的 DNA 分子，从而特异地阻击外源 DNA 的进攻？

尽管植物如何识别外源 DNA 结构尚不清楚，但是利用转基因技术遇到以下现象已经不足为奇了：用来研究基因功能的过量表达转基因结构，处于内源 RdDM 沉默途径监控之下，其真正

的过表达功能难以发挥，常常产生共抑制现象；反之，用于敲除内源基因功能的 RNAi 构建，其表达也受 RdDM 途径的抑制，只能在起始部位发挥作用，难以向周围组织传递。而长期以来，人们用以研究基因沉默途径的系统往往与转基因技术有着千丝万缕的联系，所得出的部分结论可能还有待于后人的重新思索和验证。

REFERENCES

[1] Jorgensen R. Altered gene expression in plants due to *trans* interactions between homologous genes. Trends Biotechnol, 1990, 8: 340−344.

[2] Cogoni C, Romano N, Macino G. Suppression of gene expression by homologous transgenes. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994, 65(3): 205−209.

[3] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, 391(6669): 806−811.

[4] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev, 2001, 15(2): 188−200.

[5] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature, 2000, 404(6775): 293−296.

[6] Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. Nat Genet, 2005, 37(12): 1356−1360.

[7] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science, 1999, 286(5441): 950−952.

[8] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell, 1993, 75(5): 843−854.

[9] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000, 403(6772): 901−906.

[10] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. Nature, 2000, 408(6808): 86−89.

[11] Chen XM. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. Science, 2004, 303(5666): 2022−2025.

[12] Llave C, Kasschau KD, Rector MA, et al. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. Plant Cell, 2002, 14(7): 1605−1619.

[13] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, et al. MicroRNAs in plants. Genes Dev, 2002, 16(13): 1616−1626.

[14] Vaucheret H. MicroRNA-dependent trans-acting siRNA production. Sci STKE, 2005, 2005(300): pe43.

[15] Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, et al. A pathway for the biogenesis of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. Genes Dev, 2005, 19(18): 2164−2175.

[16] Xie ZX, Allen E, Wilken A, et al. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(36): 12984−12989.

[17] Makarova KS, Wolf YI, van der Oost J, et al. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. Biol Direct, 2009, 4(1): 29.

[18] Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, et al. microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. Cell, 2005, 121(2): 207−221.

[19] Eamens A, Wang MB, Smith NA, et al. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. Plant Physiol, 2008, 147(2): 456−468.

[20] Borsani O, Zhu JH, Verslues PE, et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense

transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. Cell, 2005, 123(7): 1279−1291.

[21] Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, et al. A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. Genes Dev, 2007, 21(23): 3123−3134.

[22] Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, et al. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(47): 18002−18007.

[23] Jones L, Hamilton AJ, Voinnet O, et al. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. Plant Cell, 1999, 11(12): 2291−2301.

[24] Jones L, Ratcliff F, Baulcombe DC. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. Curr Biol, 2001, 11(10): 747−57.

[25] Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, et al. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. EMBO J, 2000, 19(19): 5194−5201.

[26] Wassenegger M. RNA-directed DNA methylation. Plant Mol Biol, 2000, 43(2/3): 203−220.

[27] Huettel B, Kanno T, Daxinger L, et al. Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in *Arabidopsis*. EMBO J, 2006, 25(12): 2828−2836.

[28] Xie ZX, Johansen LK, Gustafson AM, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. PLoS Biol, 2004, 2(5): e104.

[29] Pontes O, Li CF, Costa Nunes P, et al. The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. Cell, 2006, 126(1): 79−92.

[30] Onodera Y, Haag JR, Ream T, et al. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. Cell, 2005, 120(5): 613−622.

[31] Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, et al. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. Science, 2005, 308(5718): 118−120.

[32] Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, et al. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6233−6246.

[33] Chinnusamy V, Zhu JK. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. Sci China C Life Sci, 2009, 52(4): 331−343.

[34] Haag JR, Pontes O, Pikaard CS. Metal A and metal B sites of nuclear RNA polymerases Pol IV and Pol V are required for siRNA-dependent DNA methylation and gene silencing. PLoS One, 2009, 4(1): e4110.

[35] Pikaard CS, Haag JR, Ream T, et al. Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. Trends Plant Sci, 2008, 13(7): 390−397.

[36] Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS. Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. Cell, 2008, 135(4): 635−648.

[37] Zheng BL, Wang ZM, Li SB, et al. Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. Genes Dev, 2009, 23(24): 2850−2860.

[38] Kanno T, Bucher E, Daxinger L, et al. A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. Nat Genet, 2008, 40(5): 670−675.

[39] Kanno T, Mette MF, Kreil DP, et al. Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. Curr Biol, 2004, 14(9): 801−805.

[40] Law JA, Ausin I, Johnson LM, et al. A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. Curr Biol, 2010, 20(10): 951−956.

[41] Cao XF, Jacobsen SE. Role of the *Arabidopsis DRM* methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. Curr Biol, 2002, 12(13): 1138−1144.

[42] Chan SWL, Henderson IR, Zhang XY, et al. RNAi, DRD1, and histone methylation actively target developmentally important non-CG DNA methylation in *Arabidopsis*. PLoS Genet, 2006, 2(6): e83.
[43] Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, et al. The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. Plant Cell, 2010, 22(2): 321−334.
[44] Matzke M, Kanno T, Daxinger L, et al. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(3): 367−376.
[45] Zilberman D, Cao XF, Jacobsen SE. *ARGONAUTE4* control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. Science, 2003, 299(5607): 716−719.
[46] Gao ZH, Liu HL, Daxinger L, et al. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. Nature, 2010, 465(7294): 106−109.
[47] Dunoyer P, Brosnan CA, Schott G, et al. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. EMBO J, 2010, 29(10): 1699−1712.
[48] Okano Y, Miki D, Shimamoto K. Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induces DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. Plant J, 2008, 53(1): 65−77.
[49] Heilersig BHJB, Loonen AEHM, Janssen EM, et al. Efficiency of transcriptional gene silencing of GBSSI in potato depends on the promoter region that is used in an inverted repeat. Mol Genet Genomics, 2006, 275(5): 437−449.
[50] Sijen T, Vijn I, Rebocho A, et al. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. Curr Biol, 2001, 11(6): 436−440.
[51] Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, et al. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. EMBO J, 1997, 16(15): 4738−4745.
[52] Voinnet O, Baulcombe DC. Systemic signalling in gene silencing. Nature, 1997, 389(6651): 553.
[53] Dunoyer P, Schott G, Himber C, et al. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. Science, 2010, 328(5980): 912−916.
[54] Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, et al. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. Science, 2010, 328(5980): 872−875.
[55] Dunoyer P, Himber C, Ruiz-Ferrer V, et al. Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. Nat Genet, 2007, 39(7): 848−856.
[56] Brosnan CA, Mitter N, Christie M, et al. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(37): 14741−14746.
[57] Schwach F, Vaistij FE, Jones L, et al. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. Plant Physiol, 2005, 138(4): 1842−1852.
[58] Parizotto EA, Dunoyer P, Rahm N, et al. *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. Genes Dev, 2004, 18(18): 2237−2242.
[59] Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. Plant Cell, 2002, 14(4): 857−867.
[60] Van Houdt H, Bleys A, Depicker A. RNA target sequences promote spreading of RNA silencing. Plant Physiol, 2003, 131(1): 245−253.
[61] Daxinger L, Kanno T, Bucher E, et al. A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. EMBO J, 2009, 28(1): 48−57.

[62] Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, et al. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. EMBO J, 2003, 22(17): 4523−4533.

[63] Kanazawa A, Inaba JI, Shimura H, et al. Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. Plant J, 2011, 65(1): 156−168.

[64] Guo HS, Fei JF, Xie Q, et al. A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. Plant J, 2003, 34(3): 383−392.

[65] Dong L, Liu M, Fang YY, et al. DRD1-Pol V-dependent self-silencing of an exogenous silencer restricts the non-cell autonomous silencing of an endogenous target gene. Plant J, 2011, 68(4): 633−645.

[66] Fischer U, Kuhlmann M, Pecinka A, et al. Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. Plant J, 2008, 53(1): 1−10.

[67] Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. Trends Genet, 2001, 17: 449−459.

[68] Ketting RF, Haverkamp THA, van Luenen HGAM, et al. *Mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. Cell, 1999, 99: 133−141.

[69] Wu-Scharf D, Jeong BR, Zhang CM, et al. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. Science, 2000, 290(5494): 1159−1162.

[70] Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. Cell, 2001, 106(1): 23−34.

[71] Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. Genes Dev, 2001, 15(20): 2654−2659.