

INSTRUMENTOS DE ENSINO EM BIOLOGIA VEGETAL: NOTAS PARA AS AULAS TEÓRICAS

O Mundo dos Pequenos RNAs

Os pequenos RNAs conferem especificidade a um conjunto de processos celulares, coletivamente designados por silenciamento mediado por RNA, os quais controlam a expressão de muitos genes e mantêm num estado quiescente vírus e transposões. Devido ao seu tamanho, os pequenos RNAs não foram reconhecidos como moléculas reguladoras até muito recentemente. A surpreendente velocidade a que os pequenos RNAs têm sido identificados e a sua ação decifrada é um testemunho do poderoso sinergismo existente entre a genética do século XXI, a bioquímica e as tecnologias genómicas. Os mecanismos de silenciamento mediado por RNA são idênticos (“estão conservados”) em grande medida em todos os grupos de seres eucarióticos e há evidência para a existência de mecanismos semelhantes de silenciamento pelo RNA nos procariontes. Este artigo foca-se nas funções dos pequenos RNAs nas plantas.

Os pequenos RNAs formam-se por clivagem específica de moléculas mais longas de RNA, por ação de RNases DICER ou tipo-DICER (DCL). Depois de formados, os pequenos RNAs ligam-se a uma ou várias proteínas ARGONAUTE (AGO) e, através do emparelhamento das bases nucleotídicas complementares, identificam os mRNAs alvos de ação das AGO. As proteínas AGO silenciam os seus alvos através de clivagem, de interferência ao nível da tradução ou por modificações da cromatina dos *loci* genómicos que codificam os alvos. O silenciamento pelo RNA foi primeiramente reconhecido como um processo que silencia RNAs de origem exógena, tais como vírus ou RNA ou DNA experimentalmente introduzido nas células. Subsequentemente, o silenciamento pelo RNA foi identificado como um processo regulador de DNA endógeno, incluindo tanto regiões não-génicas do genoma como genes, e verificou-se ser fundamental para o controlo de muitos processos fisiológicos e de desenvolvimento. No seu conjunto, estas descobertas revelaram importantes processos através dos quais os organismos controlam a expressão dos seus genes e mantêm a sua integridade genómica. Estas descobertas também constituem novas oportunidades de terapias para tratamento de doenças e ferramentas para modificar a expressão dos genes.

Embora sejam bioquimicamente muito próximos, os pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e os micro-RNAs (miRNAs) diferem do ponto de vista funcional e no seu processo de formação. Os miRNAs derivam de moléculas de RNA de cadeia simples (codificadas por genes MIR específicos), que adquirem uma estrutura característica enrolada em forma de haste e ansa (“stem-loop structure”). A porção de RNA de cadeia dupla (dsRNA) assim originada é clivada por uma endonuclease DICER em pequenos miRNAs, os quais vão atuar em “trans” sobre a transcrição de outros genes para modular a sua expressão espacial e temporal. Distintamente, os siRNAs derivam de longos precursores de dsRNA produzidos pela ação de RNA polimerases dependentes de RNA (RdRPs), quer celulares quer virais. Portanto, os siRNAs não são codificados por genes próprios e as suas funções são mais defensivas (isto é, defesa contra agentes patogénicos e stress genómico, como seja a atividade de transposões). Os siRNAs que atuam em “trans” (tasiRNAs) são uma classe especial de siRNAs que parece funcionar em processos de desenvolvimento (muito semelhantemente aos miRNAs), mas têm um modo de formação que lhes é único, que envolve componentes de ambos os metabolismos de miRNA e de siRNA. Serão primeiramente discutidas as funções de siRNAs, depois de miRNAs e, por último, de tasiRNAs e de outros pequenos RNAs menos abundantes.

siRNAs: DEFENSORES GENÓMICOS

Pensa-se que o silenciamento do RNA via siRNA se originou como um sistema através do qual as células se protegem contra a ação de moléculas patogênicas, que incluem os vírus e os transposões. Os fenômenos de silenciamento foram reconhecidos nas plantas na década de 1980 durante a investigação da resistência aos vírus e nos estudos iniciais de plantas transgênicas. Simultaneamente, fenômenos semelhantes foram identificados no nemátodo *Caenorhabditis elegans*. (A compreensão gradual pela comunidade científica do significado destes estudos é descrita de uma forma muito viva por Matzke and Matzke [2004]). Os siRNAs são produzidos a partir de longas moléculas de dsRNA, que podem originar-se, via replicação de dois genes sobreponíveis, um genoma viral, ou um intermediário da replicação viral, ou podem ser o produto de um RdRP. Independentemente da sua origem, os dsRNAs são reconhecidos pela célula como indesejáveis e, portanto, são rapidamente clivados pelas DCL RNases, em siRNAs (usualmente com comprimentos de 21 a 24 nucleótidos). Os siRNAs ligam-se às proteínas AGO e podem clivar, ou interferir com a tradução, de sequências complementares (silenciamento pós-transcricional de genes) ou então interferir com a transcrição de sequências de DNA equivalente (silenciamento transcricional de genes). Quando as longas moléculas de RNA têm origem viral, este processo é frequentemente designado por silenciamento de genes induzido pelos vírus.

SILENCIAMENTO DE GENES INDUZIDO POR VÍRUS

As plantas, como os animais, são suscetíveis à infecção por vírus mas, contrariamente aos animais, não produzem anticorpos para se defenderem dessas infecções. Contudo, apesar de não possuírem a imunidade baseada em anticorpos que nós temos, as plantas podem recuperar da infecção viral e adquirir resistência específica à subsequente infecção pelo mesmo vírus ou vírus relacionados. A resistência viral pode ser sistêmica, significando que os tecidos não infetados adquirem imunidade ao vírus e sugerindo que algum tipo de sinal é produzido e se move por toda a planta.

A imunidade das plantas aos vírus pode ser conferida pela introdução de genes virais na planta, exigindo quer a transcrição de um gene do vírus quer a replicação viral através de um RNA intermediário. Em 1999, Hamilton e Baulcombe sugeriram que os RNAs virais copiados em RNAs anti-sentido ("antisense RNAs"), formariam a base da resistência viral, e identificaram pequenos RNAs anti-sentido correlacionados com o silenciamento de genes. Sabe-se agora que dsRNAs são processados por RNases DCL em siRNAs, os quais se ligam a proteínas AGO e têm como alvo vírus ou sequências nucleotídicas relacionadas. Em alguns casos, um intermediário da replicação de um dsRNA viral é o substrato para a clivagem pela DCL, mas, aparentemente, a DCL também reconhece e processa estruturas emparelhadas semelhantes a um "gancho de cabelo" ("hairpin-like structures"), que são formadas por alguns RNAs virais de cadeia simples. Plantas mutantes que são incapazes de produzir siRNAs são mais suscetíveis a doenças virais.

A resistência viral sistêmica também é mediada por silenciamento através de siRNA, o qual se difunde a partir do local da infecção para as regiões não infetadas da planta. O sinal espalha-se localmente através dos plasmodesmos (conexões citoplasmáticas entre células vegetais) e transloca-se extensamente através do floema. A resistência sistêmica exige que o sinal primário seja amplificado pelos RdRPs das células hospedeiras. Há muito que se suspeitava de que o sinal sistêmico fosse siRNA e, no ano de 2010, dois grupos de investigadores mostraram que os pequenos RNAs podiam movimentar-se sistemicamente através da planta e que eram necessários e suficientes

para o silenciamento sistêmico. Os resultados mais recentes sugerem que o siRNA se movimenta sistemicamente na forma de um pequeno duplex de RNA.

Na corrida aos armamentos, típica entre hospedeiro e agente patogênico, a maioria dos vírus codifica supressores dos mecanismos de silenciamento pelo RNA da célula hospedeira; os vírus em que se eliminou esses supressores experimentalmente são significativamente menos patogênicos. Os alvos dos supressores virais incluem, DCLs, RdRPs, e AGOs. Recentemente, os siRNAs também foram reconhecidos como supressores de bactérias patogênicas, o que indica que o silenciamento pelo siRNA é um componente integral e essencial do arsenal defensivo da planta. É interessante verificar que, comparativamente a outros eucariotas, nas plantas a maioria dos componentes do mecanismo de silenciamento pelos pequenos RNAs são amplificados através da duplicação de genes. Esta amplificação confere maior garantia (devido a efeito de redundância) e maior diversidade no silenciamento dos agentes patogênicos.

SILENCIAMENTO INDUZIDO POR GENES EXÓGENOS

Na década de 1980 os cientistas desenvolveram métodos para introduzir DNA, de forma estável, no genoma nuclear das plantas. Foram introduzidos certos genes (transgenes) para adicionar uma característica, nomeadamente um gene que confere resistência a antibióticos, ou adicionou-se um gene viral para tentar aumentar a resistência a vírus. Outros transgenes foram introduzidos para tentar aumentar o nível de expressão de um gene endógeno, através de sobre-expressão, ou para suprimir a sua expressão, através de um transcrito anti-sentido que se liga ao mRNA, impedindo a sua tradução. Muitas destas plantas transgênicas expressaram as características desejadas, mas também se observaram fenótipos anómalos. Particularmente confusos (e reveladores) foram os resultados descritos em dois artigos marcantes, publicados na década de 1990, nos quais a expressão de uma enzima-chave da biossíntese de pigmentos vegetais, a chalcona sintase, foi modificada experimentalmente. Nas plantas com o gene anti-sentido (isto é, as que expressavam um transcrito complementar do mRNA em causa), por vezes o efeito da supressão era originar plantas de pigmentação variegada. Mais surpreendentemente, algumas das plantas controlo, que expressavam a cadeia nucleotídica em sentido direto, mostravam efeitos idênticos às plantas que continham a sequência anti-sentido; o gene endógeno tinha sido silenciado. Este fenómeno, em que se verificava, não só, o silenciamento do gene introduzido na planta mas, também, se induzia o silenciamento de genes endógenos relacionados ou de outros transgenes, foi designado por co-supressão. Este efeito sobre a expressão da cadeia nucleotídica em sentido direto não podia ter sido causado pela formação do duplex (cadeia de sentido direto/cadeia anti-sentido) porque o gene introduzido e o gene endógeno eram idênticos e não complementares. Os resultados sugeriam que um fenómeno mais complexo estava a ocorrer, que hoje se sabe ser um silenciamento mediado por siRNA, no qual um nível anormalmente elevado do transcrito pode desencadear a formação de siRNA e a degradação do mRNA. Nos animais-modelo, um efeito semelhante foi designado por interferência de RNA. Em 1998, Fire e Mello publicaram um estudo de interferência de RNA em *C. elegans* que mostrou ser o dsRNA o desencadeador ótimo do silenciamento; estes cientistas receberam, em 2006, o prémio Nobel pelos seus estudos.

SILENCIAMENTO TRANSCRICIONAL GÉNICO DE DNA ENDÓGENO

No fenómeno do silenciamento transcricional de genes, os siRNAs atuam, de um certo modo, sobre as enzimas de DNA que lhes estão associadas e que modificam covalentemente o DNA ou as proteínas das histonas à volta das quais o DNA cromossómico se encontra enrolado. O silenciamento transcricional de genes foi caracterizado pela primeira vez em plantas transformadas com dois transgenes, em que um deles interferia com a expressão do outro através da indução da sua metilação e silenciamento. Apesar de decorridos muitos anos de estudo, o mecanismo preciso através do qual os siRNAs efetuam o silenciamento transcricional de genes não está completamente elucidado, em parte devido à sua notória complexidade, particularmente nas plantas. Contudo, todos os anos surgem novas descobertas surpreendentes, como foi o caso da identificação de dois complexos de RNA polimerase específicos das plantas. Enquanto que os outros seres eucarióticos usam três RNA polimerases, as plantas possuem cinco. As RNA polimerases específicas das plantas, IV e V, funcionam especificamente nos mecanismos de silenciamento génico mediado pelos pequenos RNAs. A descoberta destas RNA polimerases especializadas realça a importância e o papel central destes mecanismos na regulação dos genes vegetais.

Recentemente, tornou-se possível sequenciar centenas de milhares de moléculas de pequenos RNAs de um único tecido ou população de células. Estes estudos de sequenciação em larga escala revelaram que as classes mais abundantes de siRNAs estão envolvidas no silenciamento transcricional de transposões e de outras regiões heterocromáticas do genoma silenciadas, nas quais esses siRNAs contribuem para a metilação do DNA e a modificação de histonas, de um modo dependente do RNA. A produção de siRNAs depende da transcrição pela RNA polimerase IV, da cópia dos transcritos em dsRNA pelas RdRP e da clivagem pelas DCLs. Os siRNAs interatuam com as AGO e os transcritos produzidos pela acção da RNA polimerase V para desencadear o silenciamento da sequência de DNA associado, através da modificação de histonas e da metilação de DNA. Este processo também pode ocorrer de forma autónoma não-celular. Durante a reprodução das angiospérmicas, os siRNAs produzidos em células específicas do gametófito movem-se para as células reprodutoras para reforçar o silenciamento de genes. Embora a maioria dos siRNAs tenha origem em regiões repetitivas e não-codificantes do genoma, o silenciamento epigenético mediado por siRNAs também controla a expressão de muitos genes, processos de desenvolvimento e respostas ambientais.

miRNA: REGULADORES ENDÓGENOS DA EXPRESSÃO DE GENES

Os miRNAs são codificados por genes MIR e actuam em “trans” sobre os transcritos de outros genes. Os miRNAs de algumas plantas funcionam como os miRNAs dos animais, interferindo com a tradução do mRNA dos seus alvos, mas a maioria dos miRNAs de plantas cliva os seus mRNAs alvo. Os miRNAs de plantas ligam-se, frequentemente, na região codificante ou na região 5’ não-traduzida (UTR), exigindo uma quase perfeita complementaridade com os seus alvos. Devido a esta exigência de forte complementaridade, pensa-se que os genes MIR de plantas estão relacionados com os seus genes-alvo, tendo resultado de um processo de duplicação génica. Os precursores dos genes MIR possivelmente adquiriram uma duplicação anti-sentido, seguida de deriva genética, ficando apenas com uma curta região de complementaridade com o gene-alvo. Nas células animais, as interações dos miRNAs com os seus alvos são fundamentalmente diferentes das que ocorrem nas plantas. Uma muito maior proporção de genes animais é regulada por miRNAs, ligando-se a maioria dos miRNAs animais na região 3’ UTR dos seus alvos, sem necessidade de uma complementaridade muito extensa. Pensa-se que

alterações graduais das regiões 3' UTR das sequências dos mRNAs animais tenham levado a uma deriva que as transformou em alvos de miRNAs.

Os genes MIR codificam longos transcritos designados por miRNAs primários, ou pri-miRNAs, os quais possuem regiões de auto-complementaridade extensa mas imperfeita. Os transcritos pri-miRNA dobram-se sobre si próprios, adquirindo uma estrutura parcial de hélice dupla de haste com ansa, ou estrutura em "gancho de cabelo" ("hairpin structure", hpRNA), que é clivada por ação de DCL1. O produto desta clivagem é um dsRNA que possui nas extremidade 3' dois nucleótidos "pendurados" e que se designa por duplex miRNA-miRNA*. Este duplex sai do núcleo com a ajuda de uma HASTY homóloga de uma exportina-5, cujo gene foi identificado como crítico para o desenvolvimento juvenil, como mais abaixo se descreverá. Muitos dos genes envolvidos no processamento do miRNA foram primeiramente identificados como genes que controlam o desenvolvimento, o que ressalta as importantes funções dos miRNAs como reguladores do desenvolvimento.

Os miRNAs foram inicialmente descobertos por cientistas que estudavam dois genes, lin-14 e lin-4, que promoviam ou reprimiam o desenvolvimento do nemátodo *C. elegans*. Os estudos genéticos mostraram que o lin-4 tinha ação antagônica do lin-14, mas que o lin-4 não codificava nenhuma proteína. O domínio funcional do lin-4 foi identificado, tendo-se verificado ser complementar de várias regiões 3' UTR de lin-14. Demonstrou-se, subsequentemente, que a interação entre estas sequências complementares era necessária para ocorrer a repressão de lin-14 por lin-4, revelando, assim, a base da regulação de genes pelos miRNAs. Para que o desenvolvimento progredisse adequadamente em *C. elegans*, a atividade promotora de juvenildade do gene lin-14 tinha de ser reprimida pela ação do miRNA codificado por lin-4.

Embora relativamente poucos genes das plantas sejam regulados por miRNAs, muitos genes MIR podem ser identificados nos genomas vegetais, mas a maior parte deles não são conservados e, presumivelmente, não conferem nenhuma vantagem seletiva. Tem sido sugerido que os genes MIR têm altas taxas de "nascimento e morte", e que apenas alguns terão tido por acaso sobrevivência benéfica. Em 2013 havia quase 250 genes MIR identificados em *Arabidopsis thaliana*, agrupados em mais de 50 famílias, cada família codificando um miRNA "maduro" idêntico ou essencialmente idêntico. Mais de metade das famílias de genes MIR de *Arabidopsis* incluem um único membro. Oito famílias estão conservadas entre todas as plantas multicelulares, incluindo os musgos, e outras 10 famílias estão conservadas entre todas as angiospérmicas.

Entre os miRNAs evolutivamente conservados contam-se os que atuam sobre reguladores do desenvolvimento, como sejam os fatores de transcrição. São exemplos, miR160, que atua sobre fatores de transcrição ARF que respondem às auxinas; miR172, que atua sobre fatores de transcrição do tipo AP2, que afetam a identidade dos órgãos florais e o ritmo do seu desenvolvimento; miR390, que atua sobre fatores de transcrição do tipo TCP, que afetam a morfogénese da folha. Muitos processos de desenvolvimento são influenciados por miRNAs, nomeadamente, a transição para o desenvolvimento reprodutivo, a mudança da fase vegetativa e o padrão de desenvolvimento. Os miRNAs também contribuem para o controlo da homeostase nutricional e das respostas ao stress. Serão ilustradas algumas das formas através das quais os miRNAs contribuem para os processos vegetais, descrevendo-se, brevemente, as suas funções na mudança da fase vegetativa, no padrão de desenvolvimento e na absorção de fósforo.

CONTROLO PELO miRNA DE ALTERAÇÕES NA FASE VEGETATIVA

Muitas plantas exibem um desenvolvimento progressivo das fases vegetativas, de embrionária, a juvenil, a adulta, a reprodutiva. A progressão de juvenil a adulta é designada por mudança da fase vegetativa, a qual afeta características que incluem a forma da folha e seu arranjo, comprimento dos entrenós e acumulação de pêlos epidérmicos e de ceras epicuticulares. O gene HASTY codifica uma exportina, que é necessária para a saída do miRNA do núcleo. Mutantes com perda de função de Hasty aceleram o momento da mudança da fase vegetativa, o que evidencia um papel do miRNA neste processo. De forma idêntica, os mutantes de perda de função do gene ZIPPY, que codifica uma proteína AGO, expressam prematuramente as características adultas da fase vegetativa.

A transição da fase juvenil para adulta envolve a ação sequencial de miR156 e miR172, cada um deles atuando sobre fatores de transcrição que regulam mudanças de fase. No milho (*Zea mays*), três mutantes (Corngrass1, teopod1 e teopod2) que manifestam um atraso no estabelecimento da fase adulta, todos eles sobre-expressam o altamente conservado miR156, cujos alvos incluem genes com o domínio SBP (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-box) (genes designados SPL, em Arabidopsis) que promovem a transição para o crescimento adulto. As proteínas com domínios SBP são fatores de transição cujos alvos incluem os reguladores-chave de floração FT, SOC1, LFY e AP1. A introdução de genes com domínio SBP, resistentes a miRNA, ou a eliminação de miR156, acelera a mudança de fase e o crescimento reprodutivo. A interação entre miR156 e SPL foi demonstrada em plantas lenhosas de grande longevidade e no musgo (*Physcomitrella patens*), o que indica que ela tem persistido há, pelo menos, 400 milhões de anos.

Um dos alvos transcricionais de SPL é o gene MiR172B. À medida que os níveis de miR156 decrescem, os níveis de SPL e de miR172 aumentam. Os alvos de miR172 incluem mRNAs que codificam fatores de transcrição que estão correlacionados com um atraso na transição de fase de juvenil a adulta. Ao eliminar a sua ação, miR172 promove a mudança de fase.

CONTROLO PELOS miRNAs DO PADRÃO DE DESENVOLVIMENTO

Um dos primeiros papéis funcionais dos miRNAs nas plantas foi determinado a partir de estudos de desenvolvimento foliar. As folhas têm uma página superior (adaxial) e uma inferior (abaxial), as quais são especificadas pela restrição de padrões de expressão de fatores de transcrição, que incluem a proteína HD-ZIP III PHABULOSA (PHB). O gene que codifica PHB foi inicialmente identificado como um alelo de ganho-de-função, que posteriormente se constatou afetar a ligação do mRNA pelo miR165/6. Nas plantas do tipo selvagem, a atividade de PHB está restringida à página adaxial da folha pela ação do miR165/6 na página abaxial. O mRNA de ganho-de-função resistente ao miRNA permite a acumulação de PHB durante o desenvolvimento da folha e uma perda de polaridade da folha.

A repressão da atividade PHB mediada pelo miR165/6 também afeta o padrão radial de desenvolvimento na raiz. Os genes miR165a e miR166b são expressos na endoderme, a camada de células que se localiza precisamente no exterior do cilindro vascular. Pensa-se que os miRNAs codificados se movem para o tecido vascular central, onde contribuem para a formação de um gradiente de atividade de PHB que, por seu turno, contribui para o estabelecimento do adequado padrão radial dos tecidos vasculares.

Pela interferência com a tradução dos mRNAs, os miRNAs controlam pós-transcricionalmente os padrões de expressão temporal e espacial de genes, particularmente genes reguladores que codificam fatores de transcrição. Assim, as suas contribuições para a regulação do proteoma que é expresso têm, essencialmente, tanto significado como as dos próprios fatores de transcrição. Através do trabalho de diversos laboratórios começa-se a perceber que os miRNAs participam em muitos, senão na maioria, dos processos dos padrões de desenvolvimento. As funções reguladoras dos miRNAs estão particularmente bem estudadas nos mecanismos de desenvolvimento foliar, nos quais eles contribuem para definir os padrões e a progressão da filotaxia (disposição das folhas), o crescimento, a forma, a diferenciação e a senescência.

CONTROLO PELO miRNA DA HOMEOSTASE DE NUTRIENTES

As plantas vasculares obtêm os nutrientes minerais através das suas raízes, mas na maior parte dos casos, o grosso da biomassa vegetal está na parte aérea. Por conseguinte, deverá haver uma extensa comunicação entre as células da parte aérea e da raiz para ocorrer uma adequada regulação da absorção e homeostase dos iões. O fósforo é necessário para a síntese de ácidos nucleicos e lípidos membranares e é, frequentemente, um nutriente limitante do crescimento vegetal. As plantas respondem às condições de fósforo limitante através da alteração do seu padrão de crescimento da raiz, modificando atividades bioquímicas e incrementando a expressão de genes que codificam proteínas transportadoras.

O gene *PHO2* codifica uma enzima E2 conjugadora de ubiquitina que está envolvida na resposta da planta à deficiência de fósforo. O *PHO2* “desliga” a absorção de fósforo quando este não é limitante. A expressão de *PHO2* é inibida em condições de deficiência de fósforo pela ação de miR399. Nos mutantes com perda de função *pho2* ou em plantas que sobre-expressam miR399, os genes de deficiência de fósforo são expressos mesmo quando o fósforo não é limitante. A deficiência de fósforo leva à acumulação de miR399 e ao silenciamento de *PHO2*, permitindo que sejam expressos os genes de resposta à deficiência de fósforo.

Experiências usando enxertia mostraram que o fenótipo dos mutantes *pho2* é independente da expressão de *PHO2* na parte aérea, demonstrando que o local de ação de *PHO2* é nas raízes. Em contraste, a sobre-expressão de miR399 na parte aérea ou nas raízes induz o fenótipo de sobre-acumulação de fósforo. Este resultado é inesperado. Como consegue a expressão de miR399 apenas na parte aérea interferir com a atividade *PHO2* nas raízes? Aparentemente, o miR399 é translocado da parte aérea para as raízes, no floema; em plantas que sobre-expressam miR399 exclusivamente na parte aérea, os níveis de miR399 aumentam na raiz. Em apoio a este modelo, foi isolado miR399 no floema, aumentando aí a sua abundância durante a deficiência de fósforo. Estes estudos apoiam fortemente a ideia de que o miR399 atua como um sinal de deficiência de fósforo que é translocado da parte aérea para a raiz, onde atua na promoção da absorção de fósforo através da inibição da expressão de *PHO2*.

Os próprios miRNAs podem estar sujeitos a regulação pós-transcricional, como se verificou pela descoberta do gene INDUZIDO-PELA-DEFICIÊNCIA-DE-FOSFATO1 (*IPS1*, INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION1), que atua como um alvo mimético de controlo da acção de miR399. O *IPS1* tem uma complementaridade imperfeita com a sequência de miR399, pois essa complementaridade é interrompida por uma ansa de desemparelhamento no esperado local de clivagem de miRNA. Devido a esta interrupção de complementaridade o RNA do *IPS1* sequestra o miR399 e impossibilita-o de degradar o mRNA de *PHO2*. Este tipo de mimetismo de alvo tem uma aplicação mais geral e pode controlar de uma maneira fina a ação de outros miRNAs. Alvos miméticos sintéticos, designados esponjas miRNA ou antagomirs, estão a ser desenvolvidos como agentes terapêuticos para o tratamento de

doenças humanas associadas a miRNAs e têm o potencial de serem usados na regulação da ação dos miRNAs nas plantas.

OUTRAS CLASSES DE PEQUENOS RNAs

tasiRNAs

Os tasiRNAs são codificados por genes TAS e atuam em *trans* para regular os produtos de outros genes. Os transcritos de TAS são processados por clivagem de miRNAs, copiados em dsRNAs por RdRPs e clivados em siRNAs, sendo produzidos em cada *locus* vários diferentes tasiRNAs em fase. Tal como os miRNAs, os tasiRNAs interatuam com AGO1 para dirigir a clivagem de alvos específicos. A Arabidopsis tem 4 famílias TAS. Os tasiRNAs de TAS1 e TAS2 atuam sobre uma grande família de proteínas designadas PENTATRICOPEPTIDE REPEATs; os tasiRNAs de TAS3 atuam sobre fatores de transcrição ARF e os tasiRNAs de TAS4 atuam sobre fatores de transcrição MYB. Tal como os miRNAs, os tasiRNAs podem ser importantes reguladores dos processos de desenvolvimento. Mutações nos genes TAS3 ou nos genes de processamento dos tasiRNAs, RDR6, DCL4 ou AGO7 (aka ZIPPY), levam à sobre-expressão de ARF3 alvos de tasiRNAs. Entre as consequências fenotípicas destas mutações contam-se, a aceleração do tempo de mudança da fase vegetativa e as alterações na polaridade das folhas.

siRNAs que actuam naturalmente em *cis*

Os nat-siRNAs (“natural cis-acting siRNAs”) são uma outra classe de siRNAs recentemente identificada. Derivam de transcritos naturais anti-sentido, os quais resultaram de codificação na cadeia oposta do mesmo *locus* de DNA que forma o mRNA complementar. O par de mRNAs é processado em nat-siRNA, o qual atua em *cis* para regular um dos transcritos naturais anti-sentido, da parceria. Os *loci* que codificam nat-si RNAs e que até à data foram caracterizados são induzidos por stress, o que sugere que os nat-siRNAs poderão ter um papel especial nas respostas de defesa.

APLICAÇÕES

Perceber como os pequenos RNAs regulam a expressão génica fornece-nos um conjunto admirável de ferramentas com as quais é possível investigar a função dos genes e modificar as características das plantas. Sem surpresa, uma das primeiras utilizações desta tecnologia tem sido a de produzir plantas resistentes aos vírus, pela introdução de um gene que origina um RNA com estrutura do tipo “gancho de cabelo”, complementar do genoma viral, para iniciar o processo de silenciamento. É interessante constatar que a expressão nas plantas de um RNA com estrutura do tipo “gancho de cabelo” que tenha como alvo genes de insetos ou de nemátodos pode iniciar o silenciamento génico nesses parasitas e tornar as plantas resistentes a nemátodos parasitas e lagartas herbívoras. Genes endógenos das plantas podem ser silenciados de forma específica através da sua introdução nas plantas em vetores de expressão especializados, os quais possam desencadear um forte silenciamento desses genes endógenos. Esta metodologia é importante nas tentativas de descoberta de genes, para identificar as funções génicas, mas também tem aplicações comerciais. Compostos indesejáveis podem ser eliminados das culturas de plantas alimentares, usando o silenciamento de genes para “desligar” processos bioquímicos. Por exemplo, será

possível eliminar o composto tóxico gossipol das sementes do algodoeiro, por forma a que elas possam ser utilizadas como fonte alimentar, eliminar compostos alergénicos do amendoim, ou produzir café descafeinado.

A tecnologia dos pequenos RNAs também tem grande potencial no tratamento de doenças humanas; várias terapias baseadas no silenciamento mediado pelos pequenos RNAs estão em ensaio clínico. Nos animais, os miRNAs modulam os níveis de expressão de um número tão apreciável como um terço dos genes. Diversos processos metabólicos são controlados coordenadamente por atividades de miRNAs. Muitos genes envolvidos na síntese do colesterol são regulados pelo miR122 e, portanto, interferir com a sua ação pode coordenadamente alterar a expressão de todo o processo metabólico. Em estudos animais, o antagomir-122 pode reprimir seletivamente a biossíntese do colesterol e baixar os níveis de colesterol no plasma. O silenciamento de genes pelo siRNA, baseado na introdução de dsRNA ou de RNA com estrutura do tipo “gancho de cabelo”, está a ser explorado para o tratamento de várias doenças e agentes patogénicos.

CONCLUSÕES

As células eucarióticas produzem vários tipos de pequenos RNAs não codificantes que contribuem para a regulação e defesa do seu genoma. Os siRNAs são produzidos a partir de regiões silenciadas do genoma, ricas em repetições heterocromáticas, e são necessários para garantir que essas regiões se mantenham no estado silenciado. Os siRNAs também são produzidos em resposta a DNA externo e dão importante contribuição na defesa contra os agentes patogénicos. Os miRNAs e os tasiRNAs, codificados por genes MIR e TAS, regulam espacial e temporariamente os seus alvos, muitos dos quais estão envolvidos no desenrolar dos processos de desenvolvimento e seus padrões, na absorção de nutrientes, ou nas respostas ao stress. A descoberta de processos regulatórios por pequenos RNAs tem-nos fornecido novas ferramentas para modular a expressão génica, para o melhoramento das culturas agrícolas e para as terapias médicas. As recentes e rápidas revelações do mundo dos pequenos RNAs chamam-nos a atenção para o facto de as células ainda terem a capacidade de nos surpreender com a sua complexidade e de ainda nos aguardarem grandes descobertas.

Mary E. Williams mwilliams@aspb.org Features Editor, The Plant Cell American Society of Plant Biologists c/o Plant Science Research Group University of Glasgow

Tradução de Cândido Pinto Ricardo (Instituto de Tecnologia Química e Biológica/UNL)

Revisão: Inês Chaves (Instituto de Tecnologia Química e Biológica/UNL), José António Matos (Instituto Nacional de Investigação Agrária), Nelson Saibo (Instituto de Tecnologia Química e Biológica/UNL) e Ana Paula Santos (Instituto de Tecnologia Química e Biológica/UNL).

BIBLIOGRAFIA ACONSELHADA

Artigos de Revisão

- Axtell, M.J., and Bowman, J.L.** (2008). Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci.* 13: 343–349. doi:10.1016/j.tplants.2008.03.009.
- Axtell, M.J.** (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: ([in press]) 10.1146/annurev-arplant050312-120043.
- Baulcombe, D.** (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356–363. doi:10.1038/nature02874.
- Bonnet, E., Van de Peer, Y., and Rouzé, P.** (2006). The small RNA world of plants. *New Phytol.* 171: 451–468. doi:10.1111/j.14698137.2006.01806.x.
- Bourchis, D., and Voinnet, O.** (2010). A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development. *Science* 330: 617–622. doi:10.1126/science.1194776.
- Chapman, E.J., and Carrington, J.C.** (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.* 8: 884–896. doi:10.1038/nrg2179.
- Chen, X.** (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25: 21–44. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113417.
- Chen, X.** (2012). Small RNAs in development -insights from plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22: 361–367. doi:10.1016/j.gde.2012.04.004.
- Chuck, G., and O'Connor, D.** (2010). Small RNAs going the distance during plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 40–45. doi:10.1016/j.pbi.2009.08.006.
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N., and Carrington, J.C.** (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23: 431–442. doi:10.1105/tpc.110.082784.
- Czech, B., and Hannon, G.J.** (2011). Small RNA sorting: Matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* 12: 19–31. doi:10.1038/nrg2916. **Díaz-Pendón, J.A., and Ding, S.-W.** (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 303–326. doi:10.1146/annurev.phyto.46.081407.104746.
- Ding, S.W., and Voinnet, O.** (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130: 413–426. doi:10.1016/j.cell.2007.07.039.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., and Green, R.** (2011). A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science* 331: 550–553. doi:10.1126/science.1191138.
- Eamens, A., Wang, M.-B., Smith, N.A., and Waterhouse, P.M.** (2008). RNA silencing in plants: Yesterday, today and tomorrow. *Plant Physiol.* 147: 456–468. doi:10.1104/pp.108.117275.
- Feng, X., Zilberman, D., and Dickinson, H.** (2013). A conversation across generations: Soma-germ cell crosstalk in plants. *Dev. Cell* 24: 215–225. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.014.
- Ghildiyal, M., and Zamore, P.D.** (2009). Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10: 94–108. doi:10.1038/nrg2504.

Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2011). Multisubunit RNA polymerases IV and V: Purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 483–492. doi:10.1038/nrm3152.

Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 19–53. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218.

Jones-Rhoades, M.W. (2012). Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Mol. Biol.* 80: 3–16. doi:10.1007/s11103-011-9829-2.

Kuo, H.-F., and Chiou, T.-J. (2011). The role of microRNAs in phosphorus deficiency signaling. *Plant Physiol.* 156: 1016–1024. doi:10.1104/pp.111.175265.

Llave, C. (2010). Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.* 15: 701–707. doi:10.1016/j.tplants.2010.09.001.

Mallory, A.C., and Bouché, N. (2008). Micro-RNA-directed regulation: To cleave or not to cleave. *Trends Plant Sci.* 13: 359–367. doi:10.1016/j.tplants.2008.03.007.

Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J., and Waterhouse, P.M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett.* 580: 2442–2450. doi: 10.1016/j.febslet.2006.03.072.

Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., and Matzke, A.J.M. (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 367–376. doi:10.1016/j.ceb.2009.01.025.

Matzke, M.A., and Matzke, A.J.M. (2004). Planting the seeds of a new paradigm. *PLoS Biol.* 2: e133. doi:10.1371/journal.pbio.0020133.

McCue, A.D., and Slotkin, R.K. (2012). Transposable element small RNAs as regulators of gene expression. *Trends Genet.* 28: 616–623. doi:10.1016/j.tig.2012.09.001.

Melnyk, C.W., Molnar, A., and Baulcombe, D.C. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* 30: 3553–3563. doi:10.1038/emboj.2011.274.

Mlotshwa, S., Pruss, G.J., and Vance, V. (2008). Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci.* 13: 375–382. doi:10.1016/j.tplants.2008.04.009.

Moazed, D. (2009). Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defense. *Nature* 457: 413–420. doi:10.1038/nature07756.

Neilson, J.R., and Sharp, P.A. (2008). Small RNA regulators of gene expression. *Cell* 134: 899–902. doi:10.1016/j.cell.2008.09.006.

Obbard, D.J., Gordon, K.H.J., Buck, A.H., and Jiggins, F.M. (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364: 99–115. doi: 10.1098/rstb.2008.0168.

Pikaard, C.S., Haag, J.R., Ream, T., and Wierzbicki, A.T. (2008). Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci.* 13: 390–397. doi:10.1016/j.tplants.2008.04.008.

Poethig, R.S. (2009). Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19: 374–378. doi:10.1016/j.gde.2009.06.001.

Pulido, A., and Laufs, P. (2010). Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development. *J. Exp. Bot.* 61: 1277–1291. doi:10.1093/jxb/erp397.

Ruiz-Ferrer, V., and Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 485–510. doi:10.1146/annurev.arplant.043008.092111.

Simon, S.A., and Meyers, B.C. (2011). Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 148–155. doi: 10.1016/j.pbi.2010.11.007.

Sunkar, R., Li, Y.-F., and Jagadeeswaran, G. (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci.* 17: 196–203. doi:10.1016/j.tplants.2012.01.010.

Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* 20: 759–771. doi: 10.1101/gad.1410506.

Vazquez, F., Legrand, S., and Windels, D. (2010). The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends Plant Sci.* 15: 337–345. doi:10.1016/j.tplants.2010.04.001.

Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669–687. doi:10.1016/j.cell.2009.01.046.

Xie, Z., Khanna, K., and Ruan, S. (2010). Expression of microRNAs and its regulation in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21: 790–797. doi:10.1016/j.semcd.2010.03.012.

Artigos Fundamentais

Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C. (2005). MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207–221. doi:10.1016/j.cell.2005.04.004.

Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13079–13084. doi:10.1073/pnas.95.22.13079.

Bari, R., Pant, B.D., Stitt, M., and Scheible, W.-R. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* 141: 988–999. doi:10.1104/pp.106.079707.

Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilgan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., and Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25: 1322–1326. doi:10.1038/nbt1359.

Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.-Y., Hunter, C., Berardini, T.Z., and Poethig, R.S. (2003). HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* 130: 1493–1504. doi:10.1242/dev.00362.

Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., and Zhu, J.K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 123: 1279–1291. doi:10.1016/j.cell.2005.11.035.

Breakfield, N.W., Corcoran, D.L., Petricka, J.J., Shen, J., Sae-Seaw, J., Rubio-Somoza, I., Weigel, D., Ohler, U., and Benfey, P.N. (2012). High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in Arabidopsis. *Genome Res.* 22: 163–176. doi:10.1101/gr.123547.111.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.-H., Ding, S.-W., and Baulcombe, D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17: 6739–6746. doi:10.1093/emboj/17.22.6739.

- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y., Sieburth, L., and Voinnet, O.** (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320: 1185–1190. doi:10.1126/science.1159151.
- Buhtz, A., Springer, F., Chappell, L., Baulcombe, D.C., and Kehr, J.** (2008). Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J.* 53: 739–749. doi:10.1111/j.1365313X.2007.03368.x.
- Calarco, J.P., Borges, F., Donoghue, M.T., Van Ex, F., Jullien, P.E., Lopes, T., Gardner, R., Berger, F., Feijó, J.A., Becker, J.D., and Martienssen, R.A.** (2012). Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell* 151: 194–205. doi:10.1016/j.cell.2012.09.001.
- Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K.B., Montgomery, T.A., Nguyen, T., Cuperus, J.T., and Carrington, J.C.** (2012). Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* 24: 3613–3629. doi:10.1105/tpc.112.099945.
- Carlsbecker, A., et al.** (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465: 316–321. doi:10.1038/nature08977.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M., and Hannon, G.J.** (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465: 584–589. doi:10.1038/nature09092.
- Chiou, T.J., Aung, K., Lin, S.I., Wu, C.C., Chiang, S.F., and Su, C.L.** (2006). Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 412–421. doi:10.1105/tpc.110.tt0110/tpc.105.038943.
- Chitwood, D.H., Nogueira, F.T.S., Howell, M.D., Montgomery, T.A., Carrington, J.C., and Timmermans, M.C.P.** (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev.* 23: 549–554. doi:10.1101/gad.1770009.
- Chuck, G., Cigan, A.M., Saeteurn, K., and Hake, S.** (2007). The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nat. Genet.* 39: 544–549. doi:10.1038/ng2001.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., Wolfe, S.A., and Giraldez, A.J.** (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328: 1694–1698. doi:10.1126/science.1190809.
- Debernardi, J.M., Rodriguez, R.E., Mecchia, M.A., and Palatnik, J.F.** (2012). Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA-target interactions. *PLoS Genet.* 8: e1002419. doi:10.1371/journal.pgen.1002419.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K., Carrington, J.C., and Voinnet, O.** (2006). Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313: 68–71. doi:10.1126/science.1128214.
- Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R., and Bartel, D.P.** (2009). RNAi in budding yeast. *Science* 326: 544–550. doi:10.1126/science.1176945.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C., and Voinnet, O.** (2010). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* 328: 912–916. doi:10.1126/science.1185880.
- Fahlgren, N., Howell, M.D., Kasschau, K.D., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A., Law, T.F., Grant, S.R., Dangl, J.L., and Carrington, J.C.** (2007). High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: Evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE* 2: e219. doi:10.1371/journal.pone.0000219.

- Fahlgren, N., Montgomery, T.A., Howell, M.D., Allen, E., Dvorak, S.K., Alexander, A.L., and Carrington, J.C.** (2006). Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 16: 939–944. doi:10.1016/j.cub.2006.03.065.
- Felippes, F.F., Wang, J.W., and Weigel, D.** (2012). MIGS: miRNA-induced gene silencing. *Plant J.* 70: 541–547. doi:10.1111/j.1365313X.2011.04896.x.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811. doi:10.1038/35888.
- Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J.A., and Paz-Ares, J.** (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Genet.* 39: 1033–1037. doi:10.1038/ng2079.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R.P., Höhmann, S., Cardon, G.H., Saedler, H., and Huijser, P.** (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J.* 49: 683–693. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02983.x.
- Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–952. doi:10.1126/science.286.5441.950.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., and Baulcombe, D.C.** (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308: 118–120. doi:10.1126/science.1106910.
- Huang, G., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., and Hussey, R.S.** (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 14302–14306. doi:10.1073/pnas.0604698103.
- Hunter, C., Sun, H., and Poethig, R.S.** (2003). The Arabidopsis heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member. *Curr. Biol.* 13: 1734–1739. doi:10.1016/j.cub.2003.09.004.
- Hunter, C., Willmann, M.R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutierrez-Nava, M., and Poethig, R.S.** (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis. *Development* 133: 2973–2981. doi:10.1242/dev.02491.
- Ibarra, C.A., Feng, X., Schoft, V.K., Hsieh, T.F., Uzawa, R., Rodrigues, J.A., Zemach, A., Chumak, N., Machlicova, A., Nishimura, T., Rojas, D., and Fischer, R.L., et al.** (2012). Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *Science* 337: 1360–1364. doi:10.1126/science.1224839.
- Jouannet, V., Moreno, A.B., Elmayan, T., Vaucheret, H., Crespi, M.D., and Maizel, A.** (2012). Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. *EMBO J.* 31: 1704–1713. doi:10.1038/emboj.2012.20.
- Kalantidis, K., Schumacher, H.T., Alexiadis, T., and Helm, J.M.** (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell* 100: 13–26. doi:10.1042/BC20070079.
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Böhmendorfer, G., Gregor, W., Kreil, D.P., Matzke, M., and Matzke, A.J.M.** (2008). A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nat. Genet.* 40: 670–675. doi:10.1038/ng.119.
- Kasschau, K.D., and Carrington, J.C.** (1998). A counter defensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461–470. doi:10.1016/S0092-8674(00)81614-1.

- Kasschau, K.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A., and Carrington, J.C.** (2007). Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol.* 5: e57. doi:10.1371/journal.pbio.0050057.
- Kim, J.H., Woo, H.R., Kim, J., Lim, P.O., Lee, I.C., Choi, S.H., Hwang, D., and Nam, H.G.** (2009). Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. *Science* 323: 1053–1057. doi:10.1126/science.1166386.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambrose, V.** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–845. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., and Baker, B.** (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 1790–1795. doi:10.1073/pnas.1118282109.
- Lin, S., Chiang, S., Lin, W., Chen, J., Tseng, C., Wu, P., and Chiou, T.** (2008). Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol.* 147: 732–746. doi:10.1104/pp.108.116269.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., and Dougherty, W.G.** (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749–1759. doi:10.1104/tpc.5.12.1749.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., and Carrington, J.C.** (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14: 1605–1619. doi:10.1104/tpc.14.10.1605.
- Lu, C., Tej, S.S., Luo, S., Haudenschild, C.D., Meyers, B.C., and Green, P.J.** (2005). Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* 309: 1567–1569. doi:10.1126/science.1114112.
- Lu, C., et al.** (2008). Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 4951–4956. doi:10.1073/pnas.0708743105.
- Lu, J., Zhang, C., Baulcombe, D.C., and Chen, Z.J.** (2012). Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of Arabidopsis seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 5529–5534. doi:10.1073/pnas.1203094109.
- MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J.A.** (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311: 195–198. doi:10.1126/science.1121638.
- Manavella, P.A., Koenig, D., and Weigel, D.** (2012). Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 2461–2466. doi:10.1073/pnas.1200169109.
- Manavella, P.A., Koenig, D., Rubio-Somoza, I., Burbano, H.A., Becker, C., and Weigel, D.** (2013). Tissue-specific silencing of Arabidopsis SU(VAR)3-9 HOMOLOG8 by miR171a. *Plant Physiol.* 161: 805–812. doi:10.1104/pp.112.207068.
- Mao, Y.B., Cai, W.-J., Wang, J.-W., Hong, G.-J., Tao, X.-Y., Wang, L.-J., Huang, Y.-P., and Chen, X.-Y.** (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.* 25: 1307–1313. doi:10.1038/nbt1352.
- Matzke, M., Primig, M., Trnovsky, J., and Matzke, A.** (1989). Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed plants. *EMBO J.* 8: 643–649.

- McCue, A.D., Nuthikattu, S., Reeder, S.H., and Slotkin, R.K.** (2012). Gene expression and stress response mediated by the epigenetic regulation of a transposable element small RNA. *PLoS Genet.* 8: e1002474. doi:10.1371/journal.pgen.1002474.
- Mi, S., et al.** (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133: 116–127. doi:10.1016/j.cell.2008.02.034.
- Molnár, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R., and Baulcombe, D.C.** (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328: 872–875. doi:10.1126/science.1187959.
- Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D.J., Thuenemann, E.C., and Baulcombe, D.C.** (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447: 1126–1129. doi:10.1038/nature05903.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., and Carrington, J.C.** (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133: 128–141. doi:10.1016/j.cell.2008.02.033.
- Mosher, R.A., Melnyk, C.W., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Studholme, D.J., and Baulcombe, D.C.** (2009). Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis. *Nature* 460: 283–286. doi:10.1038/nature08084.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279–289. doi:tpc.110.tt0110/tpc.2.4.279.
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S.Y., and Voinnet, O.** (2008). Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 321: 964–967. doi:10.1126/science.1159505.
- Nogueira, F.T., Chitwood, D.H., Madi, S., Ohtsu, K., Schnable, P.S., Scanlon, M.J., and Timmermans, M.C.** (2009). Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *PLoS Genet.* 5: e1000320. doi:10.1371/journal.pgen.1000320.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Costa-Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.S.** (2005). Plant nuclear RNA Polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120: 613–622. doi:10.1016/j.cell.2005.02.007.
- Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D.** (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J.* 53: 674–690. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03328.x.
- Palauqui, J., Elmayan, T., Pollien, J., and Vaucheret, H.** (1997). Systemic acquired silencing: Transgene-specific posttranscriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16: 4738–4745. doi:10.1093/emboj/16.15.4738.
- Pant, B.D., Buhtz, A., Kehr, J., and Scheible, W.-R.** (2008). MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J.* 53: 731–738. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03363.x.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., and Poethig, R.S.** (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 3691–3696. doi:10.1073/pnas.0405570102.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L., and Poethig, R.S.** (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* 18: 2368–2379. doi:10.1101/gad.1231804.

Ratcliff, F., Henderson, B.D., and Baulcombe, D.C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276: 1558–1560. doi:10.1126/science.276.5318.1558.

Schwab, R., Maizel, A., Ruiz-Ferrer, V., Garcia, D., Bayer, M., Crespi, M., Voinnet, O., and Martienssen, R.A. (2009). Endogenous tasiRNAs mediate non-cell autonomous effects on gene regulation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 4: e5980. doi:10.1371/journal.pone.0005980.

Schwarz, S., Grande, A.V., Bujdoso, N., Saedler, H., and Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 67: 183–195. doi:10.1007/s11103-008-9310-z.

Shivaprasad, P.V., Chen, H.M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A., and Baulcombe, D.C. (2012). A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* 24: 859–874. doi:10.1105/tpc.111.095380.

Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdžić, M., Becker, J.D., Feijó, J.A., and Martienssen, R.A. (2009). Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136: 461–472. doi:10.1016/j.cell.2008.12.038.

Smith, M.R., Willmann, M.R., Wu, G., Berardini, T.Z., Möller, B., Weijers, D., and Poethig, R.S. (2009). Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 5424–5429. doi:10.1073/pnas.0812729106.

Sunilkumar, G., Campbell, L.M., Puckhaber, L., Stipanovic, R.D., and Rathore, K.S. (2006). Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 18054–18059. doi:10.1073/pnas.0605389103.

Teixeira, F.K., et al. (2009). A role for RNAi in the selective correction of DNA methylation defects. *Science* 323: 1600–1604. doi:10.1126/science.1165313.

Todesco, M., Balasubramanian, S., Cao, J., Ott, F., Sureshkumar, S., Schneeberger, K., Meyer, R.C., Altmann, T., and Weigel, D. (2012). Natural variation in biogenesis efficiency of individual *Arabidopsis thaliana* microRNAs. *Curr. Biol.* 22: 166–170. doi:10.1016/j.cub.2011.11.060.

Van der Krol, A., Mur, L., Beld, M., Mol, J.N.M., and Stuitje, A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291–299. doi:10.1105/tpc.2.4.291.

Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbet, J.-L., Bartel, D.P., and Crété, P. (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol. Cell* 16: 69–79. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.028. Voinnet, O., and Baulcombe, D. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389: 553. doi:10.1038/39215.

Wang, J.-W., Park, M.Y., Wang, L.-J., Koo, Y., Chen, X.-Y., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2011). MiRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genet.* 7: e1002012. doi:10.1371/journal.pgen.1002012.

Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., and Sanger, H. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567–576. doi:10.1016/0092-8674(94)90119-8.

Wierzbicki, A.T., Cocklin, R., Mayampurath, A., Lister, R., Rowley, M.J., Gregory, B.D., Ecker, J.R., Tang, H., and Pikaard, C.S. (2012). Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. *Genes Dev.* 26: 1825–1836. doi:10.1101/gad.197772.112.

- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., and Pikaard, C.S.** (2009). RNA polymerase V guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.* 41: 630–633. doi:10.1038/ng.365.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G.** (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855–862. doi:10.1016/00928674(93)90530-4.
- Wu, G., and Poethig, R.S.** (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133: 3539–3547. doi:10.1242/dev.02521.
- Wu, L., Mao, L., and Qi, Y.** (2012). Roles of dicer-like and argonaute proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation. *Plant Physiol.* 160: 990–999. doi:10.1104/pp.112.200279.
- Yan, J., Gu, Y., Jia, X., Kang, W., Pan, S., Tang, X., Chen, X., and Tang, G.** (2012). Effective small RNA destruction by the expression of a short tandem target mimic in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 415–427. doi:10.1105/tpc.111.094144.
- Yang, L., Conway, S.R., and Poethig, R.S.** (2011). Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156. *Development* 138: 245–249. doi:10.1242/dev.058578.
- Ye, R., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., Zhou, X., and Qi, Y.** (2012). Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* Argonaute4/siRNA complexes. *Mol. Cell* 46: 859–870. doi:10.1016/j.molcel.2012.04.013.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y., and Poethig, R.S.** (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 19: 2164–2175. doi:10.1101/gad.1352605.
- Zemach, A., Kim, M.Y., Hsieh, P.H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S.L., and Zilberman, D.** (2013). The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* 153: 193–205. doi:10.1016/j.cell.2013.02.033.
- Zhai, J., Jeong, D.H., De Paoli, E., Park, S., Rosen, B.D., Li, Y., Gonzalez, A.J., Yan, Z., Kitto, S.L., Grusak, M.A., Jackson, S.A., and Stacey, G., et al.** (2011). MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev.* 25: 2540–2553. doi:10.1101/gad.177527.111.
- Zhang, X., Xia, J., Lii, Y.E., Barrera-Figueroa, B.E., Zhou, X., Gao, S., Lu, L., Niu, D., Chen, Z., Leung, C., Wong, T., and Zhang, H., et al.** (March 22, 2012). Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biol.* 13: R20 (online). doi:10.1186/gb-2012-13-3-r20.
- Zhong, X., Hale, C.J., Law, J.A., Johnson, L.M., Feng, S., Tu, A., and Jacobsen, S.E.** (2012). DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19: 870–875. doi:10.1038/nsmb.2354.