

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Michaela Hromadová**

Úloha malých nekódujících RNA v regulaci generativního vývoje rostlin  
The role of small non-coding RNAs in the regulation of plant reproductive  
development

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. David Honys, Ph.D.  
Konzultant: Mgr. Alena Náprstková

Praha, 2017

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17. 8. 2017

.....

Michaela Hromadová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Davidu Honysovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování bakalářské práce. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Aleně Náprstkové za všechny čas, který mi v průběhu psaní ochotně věnovala, za nespočet konzultací, pomoc při práci s odbornou literaturou, a v neposlední řadě za získání prvních laboratorních zkušeností.

## **Abstrakt**

Malé RNA (sRNA) jsou zpravidla definovány jako 21-24 nukleotidů dlouhé molekuly RNA s regulační funkcí, které spadají do kategorie nekódujících RNA. Obvykle vznikají jako odpověď na přítomnost dvouvláknových molekul RNA v buňkách a umožňují umlčování komplementárních sekvencí na transkripční a posttranskripční úrovni. Jejich role spočívá nejen v obraně proti cizorodým nukleovým kyselinám, ale především v regulaci vlastních genů. Typickými cílovými molekulami rostlinných sRNA jsou transponovatelné elementy či transkripční faktory podílející se na řízení přechodů mezi jednotlivými vývojovými fázemi, například na zahájení reprodukčního vývoje. Cílem této práce je shrnutí jednotlivých funkčních rolí malých RNA při regulaci generativní fáze, vzniku samičího a samčího gametofytu a způsobu ochrany před transpozicí v následujících generacích. Endogenní i exogenní sRNA jsou rostlinami hojně využívány, neboť poskytují okamžitou a přímou odpověď organismu na rychle se měnící podmínky prostředí, a nepochybně tak patří mezi klíčové faktory přispívající k jejich fenotypové plasticitě.

Klíčová slova: vývoj rostlin, generativní fáze, rozmnožování rostlin, nekódující RNA, miRNA, kvetení, květ, gametofyt

## **Abstract**

Small RNAs (sRNA) are broadly defined as regulatory molecules of 21-24 nucleotides in length which belong to the class of noncoding RNAs. They usually originate in response to the presence of double-stranded RNA in the cells and facilitate transcriptional and posttranscriptional gene silencing of complementary sequences. Their role lies not only in defence against exogenous nucleic acids, but primarily in the regulation of endogenous genes. Typical target molecules of plant sRNA are transposable elements and genes encoding the transcription factors involved in the control of key developmental transitions like the initiation of the reproductive phase and the regulation of its progress. The aim of this thesis is a summary of functional roles of individual small RNA in plant reproductive development, with focus to the female and male gametophytes and in the protection against the transition of transposable elements to following generations. Both endogenous and exogenous sRNA are amply utilized in plants, because they provide an immediate and direct response of the organism to rapidly changing conditions, and thus undoubtedly belong to the key factors which contribute to their phenotypic plasticity.

Key words: plant development, plant reproduction, generative phase, non-coding RNA, miRNA, flowering, flower, gametophyte

## Obsah

Abstrakt/Abstract

Seznam použitých zkratek

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Biogeneze sRNA</b> .....	<b>1</b>
2.1. DICER-like.....	2
2.2. ARGONAUT.....	3
2.2.1. Třída I.....	4
2.2.2. Třída II.....	4
2.2.3. Třída III.....	4
2.3. Modifikace sRNA.....	5
2.4. RNA dependentní RNA polymerázy.....	6
<b>3. Klasifikace sRNA</b> .....	<b>7</b>
<b>4. Mechanismus působení sRNA</b> .....	<b>9</b>
4.1. Regulace transkripce.....	10
4.2. Posttranskripční regulace.....	11
4.3. Pohyb sRNA.....	12
<b>5. Generativní vývoj rostlin</b> .....	<b>13</b>
5.1. Fáze ontogeneze a rodozměna.....	13
5.2. Role sRNA v regulaci kvetení.....	14
5.3. Vývoj samčího gametofytu.....	15
5.4. Vývoj samičího gametofytu.....	15
5.5. Role sRNA v umlčování transponovatelných elementů během reprodukčního vývoje.....	16
5.6. Proteiny AGO specifické pro zárodečnou linii.....	18
5.7. Role sRNA v samčím a samičím gametofytu.....	18
<b>6. Závěr</b> .....	<b>22</b>
<b>7. Seznam použité literatury</b> .....	<b>23</b>

## Seznam použitých zkratk

AGO – ARGONAUT

AP2-like – APETALA 2-like

ARF – AUXIN RESPONSE FACTOR, faktor auxinové odpovědi

ARI14 – ARIADNE 14

CHS – Chalcone synthase, chalkon syntáza

CMV – Cucumber mosaic virus

CTD – C-terminal domain, C-terminální doména

DCL – DICER-like

DDM1 – DECREASED DNA METHYLATION 1

diRNA – double-strand DNA break-induced RNA

DME – DEMETER

DRM1, DRM2 – DOMAINS REARRANGED METHYLASE 1, DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2

dsRNA/DNA – double-stranded RNA/DNA, dvouvláknová RNA/DNA

DUO1 – DUO POLLEN 1

easiRNA – epigenetically-activated short interfering RNA

GFP – green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein

HEN1 – HUA ENHANCER 1

HESO1 – HEN1 SUPPRESSOR 1

hetsiRNA = rasiRNA – heterochromatic short interfering RNA, repeat associated short interfering RNA

HSVd – Hop stunt viroid, viroid zakrslosti chmele

KPL – KOKOPELLI

lmiRNA – long microRNA

lsiRNA – long short interfering RNA

LTR – long terminal repeat

MEL1 – MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE 1

MET1 – METHYLTRANSFERASE 1

miRNA – microRNA, mikroRNA

nat-siRNA – natural antisense transcript short interfering RNA

ORF – open reading frame, otevřený čtecí rámec, kódující oblast

phasiRNA – phased short interfering RNA

Pms1 – PHOTOPERIOD-SENSITIVE GENIC MALE STERILITY 1

Pol II/IV/V – DNA dependentní RNA polymeráza II/IV/V

PPR – PENTATRICOPEPTIDE REPEAT

PSRP1 – PHLOEM SMALL-RNA BINDING PROTEIN 1

PTGS – posttranscriptional gene silencing, posttranskripční umlčování genů  
RdDM – RNA-directed DNA methylation, RNA řízená metylace DNA  
RDR – RNA dependentní RNA polymeráza  
RISC – RNA-induced silencing complex  
SAM – shoot apical meristem, stonkový apikální meristém  
SDN1, SDN2 – SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE 1, SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE 2  
siRNA – short interfering RNA, krátké interferující RNA  
SPL – SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-like  
sRNA – small RNA, malá RNA  
ssRNA/DNA – single-stranded RNA/DNA, jednovláknová RNA/DNA  
tasiRNA – trans-acting short interfering RNA  
TE – transposable element, transponovatelný element  
TGS – transcriptional gene silencing, transkripční umlčování genů  
TuMV – Turnip mosaic virus, virus mozaiky vodnice  
URT1 – UTP:RNA URIDYLTRANSFERASE 1  
UTR – untranslated region, nepřekládaná oblast  
vasiRNA – virus-activated short interfering RNA  
vsiRNA = viRNA – virus-derived short interfering RNA, viral short interfering RNA  
ZEP1 – SYNAPTONEMAL COMPLEX PROTEIN ZEP1  
5meC – metylace cytosinu v pozici 5

## 1. Úvod

Mechanismus umlčování genů pomocí malých RNA neboli RNA interference je eukaryotickými organismy hojně využíván. S drobnými modifikacemi byl popsán u rostlin, živočichů i hub. Klíčovým objevem v této oblasti byl popis kosuprese u petúnií (*Petunia hybrida*) v roce 1990. Původní snaha vyvolat nadměrnou expresi genu pro chalkon syntázu (CHS) a tím získat výrazněji pigmentované květy, přinesla neočekávaný výsledek. Petúnie nesoucí transgenní CHS vykazovaly zcela opačnou tendenci – jejich květy byly buď zcela bílé, nebo se na nich objevily bílé oblasti vytvářející rozmanité vzory na temně fialovém pozadí (Napoli et al., 1990). Jakým mechanismem k tomuto jevu může docházet, však bylo odhaleno až v roce 1998 u hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*). Na základě komplementarity bází párovala cizorodá RNA s mRNA endogenního původu, což mělo za následek snížení exprese dané mRNA (Fire et al., 1998). O rok později již byla popsána role samotných malých RNA při posttranskripčním umlčování genů (Hamilton and Baulcombe, 1999).

Rostliny jakožto přisedlé organismy nemají v případě nepříznivých podmínek možnost uniknout ze svého stanoviště, a proto jsou nuceny se na dané podmínky rychle adaptovat. Malé RNA představují velmi účinný prostředek regulace, pomocí kterého může být genová exprese okamžitě modulována při odpovědi na změny prostředí a v přítomnosti biotických či abiotických stresových faktorů, což vede k aktivaci příslušných obranných mechanismů.

## 2. Biogeneze sRNA

Malé RNA mohou být odvozeny z endogenních i exogenních sekvencí. Endogenní sRNA pochází z kódujících i nekódujících oblastí přepisovaných nejčastěji DNA dependentní RNA polymerázou II (Pol II). U třídy hetsiRNA (angl. heterochromatic small interfering RNA) u rostlin se nicméně na transkripci podílí další dvě příbuzné DNA dependentní RNA polymerázy – Pol IV a Pol V (Herr et al., 2005; Kanno et al., 2005; Lee et al., 2004; Onodera et al., 2005). Vzniklý transkript buď rovnou zaujímá vláskovitou strukturu (typicky miRNA, angl. micro RNA), páruje s jiným komplementárním transkriptem (nat-siRNA, angl. natural antisense siRNA) nebo je do podoby dvouvláknové RNA přepsán některou z RNA dependentních RNA polymeráz (RDR). V případě exogenních sRNA dochází k tvorbě dvouvláknových RNA (dsRNA) opět činností RDR nebo při virové replikaci v napadených buňkách (Baulcombe, 2004; Borsani et al., 2005; Dalmay et al., 2000; Reinhart et al., 2002). Dvouvláknová molekula RNA je dále rozštěpena proteinem DCL (DICER-like) na kratší segmenty, opatřena stabilizační metylací a vložena do proteinu AGO (ARGONAUT) (Bernstein et al., 2001; Schauer et al., 2002; Song et al., 2003, 2004; Yu et al., 2005). Ten kromě vybraného vlákna malé RNA váže také molekulu, která je k němu komplementární, a umožňuje tak její následnou regulaci (Song et al., 2003, 2004). Biogeneze malých RNA se účastní i řada dalších proteinů vázajících jednovláknovou či dvouvláknovou RNA, remodelujících chromatin,



stabilizačních či účastnících se transportu mezi jádrem a cytoplazmou. Tyto proteiny však již bývají specifické pro danou třídu malých RNA.

## 2.1. DICER-like

Členové rodiny proteinů DICER-like s endoribonukleázovou aktivitou štěpí dvouvláknové RNA či vlásenkové struktury na menší, 21-24 nt dlouhé duplexy (Bernstein et al., 2001; Schauer et al., 2002). Proteiny DICER-like jsou homologické s proteinem DICER, který je přítomný u většiny ostatních eukaryot, ale zatímco DICER se u živočichů nachází pouze v jedné, případně ve dvou kopiích, rostlinný genom kóduje nejméně čtyři paralogy – DCL1, DCL2, DCL3 a DCL4 (Margis et al., 2006; Mukherjee et al., 2013). Přítomnost čtyř proteinů DCL je typická také pro modelový organismus huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*), nicméně u některých zástupců jednoděložných rostlin bylo dokonce objeveno až šest genů kódujících tento protein (Margis et al., 2006).

Všechny čtyři enzymy DCL se vyskytují jak u jednoděložných, tak u dvouděložných rostlin, některé DCL lze nalézt dokonce u mechů a vranečků, tudíž k jejich vzniku došlo zřejmě již velmi brzy v evoluci rostlin. Proteiny DCL jsou rostlině specifické, DICER se tedy patrně vyvíjel u rostlin a živočichů nezávisle (Mukherjee et al., 2013). Jednotlivé DCL se mezi sebou liší typem a délkou malých RNA, které produkují, svojí afinitou k dvouvláknové RNA, odlišnou specifitou vůči jejímu 5' a 3' konci a závislostí na ATP (Nagano et al., 2014; Parent et al., 2015). Většina proteinů DCL je však funkčně redundantní, což ale neplatí pro DCL1 (Gascioli et al., 2005; Schauer et al., 2002). Výskyt těchto nukleáz je vázán na jádro. Protein DCL1 se společně s dalšími enzymy biogeneze miRNA nachází ve speciálních jaderných kompartmentech, tzv. D-tělískách (angl. dicing bodies) (Fang and Spector, 2007).

Klíčovým enzymem v produkci 21 nt dlouhých miRNA z vlásenkových prekurzorů je DCL1 (Kurihara and Watanabe, 2004; Reinhart et al., 2002). Kompletní ztráta funkce tohoto proteinu je dokonce embryonálně letální (Schauer et al., 2002), ostatní DCL jej tedy nejsou schopny funkčně zastoupit. Naopak u trojitých mutantů *dcl2/dcl3/dcl4* je samotný DCL1 zcela dostačující pro produkci miRNA. Kromě své primární role v tvorbě miRNA se také podílí na vzniku sRNA z endogenních invertovaných repetitiv (Henderson et al., 2006). Enzym DCL2 se účastní produkce nat-siRNA (Borsani et al., 2005) a také 22nt siRNA odvozených z virových nukleových kyselin (Deleris et al., 2006). Funkce DCL3 spočívá ve tvorbě 24nt siRNA z dvouvláknové RNA vzniklé činností RNA dependentní RNA polymerázy 2 (RDR2). Tyto siRNA poté zprostředkovávají RNA řízenou metylaci DNA (RNA-directed DNA methylation, RdDM) cílových molekul, zejména transponovatelných elementů a jiných repetitivních sekvencí, což vede k jejich transkripčnímu umlčování (Herr et al., 2005; Xie et al., 2004). Další homolog, DCL4, produkuje 21nt siRNA odvozené z genomu virů a transgenů a hraje tedy důležitou roli v obraně proti virové infekci a cizorodé DNA (Bouché et al., 2006; Deleris et al., 2006; Parent et al., 2015). Pokud je rostlina napadena virem a zároveň u ní dojde k narušení funkce DCL4, dokáže jej zastoupit DCL2 produkující 22nt siRNA s antivirovou aktivitou (Deleris et al., 2006).

Při nadměrné produkci vloženého transgenu v rostlinách *dcl4* dochází k jeho vyššímu umlčování než u kontrolních rostlin. Jedním z možných vysvětlení je vyšší afinita DCL4 ke dvouvláknové RNA, čímž brání vazbě proteinu DCL2 (Parent et al., 2015). Podobně je DCL4 schopen nahradit poškozený DCL3 a produkovat 21 nt dlouhé siRNA závislé na činnosti RDR2 (Gascioli et al., 2005). Protein DCL4 se stejně jako DCL1 a DCL3 podílí na zpracovávání endogenních RNA, konkrétně 21 nt dlouhých tasiRNA závislých na aktivitě RNA dependentní RNA polymerázy 6, RDR6 (Gascioli et al., 2005).

## 2.2. ARGONAUT

Protein ARGONAUT navazuje na aktivitu enzymu DCL. Vyskytuje se nejen v cytoplazmě, ale také v jádře, kde může být součástí Cajalových tělísek (Li et al., 2006; Sen and Blau, 2005). Jakmile činností DCL vznikne dvouvláknová molekula sRNA, jedno vlákno z tohoto duplexu (tzv. guide strand neboli vedoucí vlákno) je vybráno proteinem AGO, zatímco druhé vlákno (passenger strand) je uvolněno a zřejmě degradováno (Eamens et al., 2009; Iki et al., 2010; Khvorova et al., 2003; Rand et al., 2005; Schwarz et al., 2003). Úlohou AGO není pouze vazba vlákna, ale i vyhledání molekuly RNA, která je k němu komplementární, zprostředkování jejich vzájemné vazby a následné štěpení cílové molekuly. Vlákno malé RNA a na ní navázaný protein AGO dohromady vytváří tzv. RISC komplex (RNA-induced silencing complex) (Song et al., 2003, 2004). Genom huseníčku kóduje 10 homologních proteinů AGO, které se dále dělí do tří skupin na základě své fylogenetické podobnosti (Morel et al., 2002; Vaucheret, 2008). U rýže (*Oryza sativa*) existuje dokonce 18 homologů tohoto proteinu.

Pro všech 10 proteinů AGO je charakteristická přítomnost čtyř domén – domény na aminovém (N-) konci, domény PAZ v centrální části a domén MID a PIWI na karboxylovém (C-) konci aminokyselinového řetězce. Doména na aminovém konci slouží k separaci sRNA od mRNA, doména PAZ je schopna rozpoznat přesah dvou nukleotidů na 3' konci sRNA a doména MID rozeznává malé RNA podle jejich 5' konce. Katalytické místo proteinů AGO se nachází v doméně PIWI, jež svou činností štěpí cílovou molekulu RNA. Samotná katalytická funkce je obecně zajištěna aminokyselinovým motivem DEDH nebo motivem DEDD u AGO2 a AGO3 (Singh et al., 2015; Song et al., 2004).

Specificita rostlinných proteinů AGO obvykle není vázána na konkrétní typ malé RNA, její velikost či způsob biogeneze, ale především na charakter nukleotidu na 5' konci vybraného vlákna. Nicméně toto pravidlo 5' konce není zcela univerzální, protože některé proteiny AGO rozeznávají své substráty také na základě jejich sekundární struktury, vazebných faktorů a koexprese všech komponent (Mi et al., 2008).

### 2.2.1. Třída I

Do třídy I lze zařadit proteiny AGO1, AGO5 a AGO10, přičemž nejprozkoumanějším z nich je AGO1. Podobně jako u nukleázy DCL1 vykazují jeho mutace nejzávažnější vývojové defekty a ostatní členové rodiny ARGONAUT jej nejsou schopni funkčně nahradit (Bohmert et al., 1998). Protein AGO1 je hlavním efektozem miRNA, nicméně dokáže asociovat i s tasiRNA (angl. trans-acting siRNA), siRNA odvozenými z transgenů a podílí se také na odstraňování virové RNA (Qu et al., 2008). Přesto, že jsou miRNA primárně vázány AGO1, existují výjimky. Enzym AGO10 váže miR166/165 s mnohem vyšší afinitou nežli AGO1. Funkce komplexu AGO10-miR166/165 spočívá v udržování identity stonkového apikálního meristému (SAM). Cílovou molekulou miR166/165 jsou transkripční faktory HD-ZIP III podílející se právě na jeho vývoji. Úlohou AGO10 je vyvázat miRNA, aby nebyly přístupné pro vazbu AGO1 a komplex AGO1-miR166/165 nemohl potlačovat expresi těchto transkripčních faktorů. Protein AGO10 tedy funguje jako pozitivní regulátor HD-ZIP III a je nejbližším paralogem AGO1, avšak co se týče identity SAM, nejsou tyto enzymy redundantní (Zhu et al., 2011). Ve sporofytických pletivech přiléhajících k samičímu gametofytu se specificky vyskytuje AGO5 s klíčovou úlohou v megagametogenezi (Tucker et al., 2012).

### 2.2.2. Třída II

Do třídy II spadají proteiny AGO2, AGO3 a AGO7. Protein AGO7 se podílí na vzniku tasiRNA. Specificky váže miR390 a spouští tak produkci tasiRNA z transkriptů *TAS3*, které se účastní auxinové signalizace (Montgomery et al., 2008). Mezi nejméně prozkoumané homology patří AGO2 a AGO3. Navzájem jsou si velmi podobné, ale výrazně se liší od ostatních proteinů AGO strukturou svojí katalytické domény. U AGO2 byla prokázána nejen schopnost asociace s miRNA, ale i role v obraně proti virům či bakteriím (Harvey et al., 2011; Zhang et al., 2011). Také se podílí na opravách DNA – váže 21nt diRNA, jejichž vznik je vyvolán dvouvláknovými zlomy. Společně zřejmě spouští aktivaci různých reparačních mechanismů (Wei et al., 2012). Úloha AGO3 byla objasněna teprve nedávno. I přes vysokou sekvenční podobnost s AGO2 není AGO3 schopen zastoupit jeho funkci při virové infekci. Protein AGO3 váže zejména 24 nt dlouhé sRNA pocházející z oblastí s častým výskytem metylací (pericentromerické oblasti, transponovatelné elementy (TE)), čímž se podobá AGO4. Jeho exprese bývá za běžných podmínek poměrně nízká, ale je indukována zvýšenou salinitou. Možnou funkcí AGO3 tedy může být stimulace epigenetických změn při stresové reakci, například v důsledku zvýšeného zasolení (Zhang et al., 2016).

### 2.2.3. Třída III

Do třídy III patří celkem čtyři proteiny AGO – AGO4, AGO6, AGO8 a AGO9. Role AGO4 i AGO6 spočívá v RNA řízené metylaci DNA, jejímž spouštěčem jsou siRNA vzniklé z transponovatelných elementů a repetitivních sekvencí. U AGO4 se však jedná zejména o vazbu 24nt siRNA závislých na Pol IV a RDR2, zatímco AGO6 váže siRNA o délce 21-22 nukleotidů

vznikající činností RDR6. Protein AGO6 se specificky vyskytuje v mladých květních meristémech a zajišťuje umlčení TE před tím, než dojde k vývoji reprodukčních orgánů a gametogenezi (McCue et al., 2015; Zilberman et al., 2003, 2004).

Protein AGO9 je podobně jako AGO5 klíčovým faktorem při přechodu z vegetativní do generativní fáze. K jeho expresi dochází v somatických buňkách prašníků i vajíček. V těchto místech, ale také přímo v gametách se podílí na umlčování transpozonů pomocí 24nt siRNA. Jeho další funkcí je zajistit, aby se z mateřské buňky megasporu vyvinula pouze jedna funkční gameta (Olmedo-Monfil et al., 2010). Funkce AGO8 zatím nebyla dostatečně prostudována. Jeho exprese je velmi nízká a zřejmě se jedná o pseudogen (Vaucheret, 2008).

### 2.3. Modifikace sRNA

Malé RNA mohou v průběhu své biogeneze podstupovat různé typy úprav. Jejich úlohou je udržování homeostázy sRNA, tedy rovnováhy mezi jejich tvorbou a degradací, která je nezbytná pro optimální vývoj rostliny. Nejdůležitější modifikací je úvodní metylace duplexu, jejímž účelem je stabilizace vláken, jejich ochrana před uridyací a následnou degradací. Katalyzuje ji metyltransferáza HEN1 (HUA ENHANCER 1) na skupině 2' OH ribózy poslední nukleotidu 3' konce sRNA (Yu et al., 2005). Dojde-li k mutaci v tomto proteinu, dochází buď k úplnému vymizení odpovídajících sRNA, anebo k výraznému snížení jejich hladiny (Li et al., 2005).

Degradace molekul RNA obsahujících na 3' konci řetězec polyU je u eukaryotních organismů rozšířeným fenoménem. Za uridyací RNA je u rostlin zodpovědná nukleotidyltransferáza HESO1 (HEN1 SUPPRESSOR 1), která přidává uracil na 3' konec molekuly a směřuje ji k degradaci. Funkční vyřazení tohoto enzymu způsobuje potlačení fenotypových projevů mutace *hen1*. Příslušná sRNA tak nemůže plnit svoji úlohu, tj. umlčovat či štěpit komplementární RNA. Enzym HESO1 je schopný přidávat na 3' konec vlákna i ostatní nukleotidy, ale vykazuje výraznou preferenci pro UTP. Jeho činnost je zcela inhibována aktivitou HEN1, tudíž k uridyací dochází pouze u nemetylovaných sRNA (Ren et al., 2012; Zhao et al., 2012). Uridylaci typicky předchází zkracování sRNA (Zhai et al., 2013). Předpokládá se, že HESO1 je zodpovědný pouze za uridyací a vlastní degradace je zřejmě zprostředkována dalším, zatím neznámým enzymem.

Podobnou funkci jako HESO1 má také uridylyltransferáza URT1 (UTP:RNA URIDYLYLTRANSFERASE 1). Obě terminální nukleotidyl transferázy však mají různou substrátovou specifitu vůči koncovému nukleotidu. Odlišná je také jejich účinnost – monouridyací zajišťuje převážně enzym URT1, zatímco HESO1 je zodpovědný především za oligouridyací. Monouridylované produkty URT1 mohou být využity jako substrát pro další uridyací HESO1 (Tu et al., 2015). Zkrácení 3' konce před uridyací způsobují exonukleázy SDN1 a SDN2 (SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE 1, SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE 2). Jedná se o enzymy štěpící výhradně jednovláknové molekuly miRNA od 3' k 5' konci (Ramachandran and Chen, 2008; Yu et al., 2017; Zhai et al., 2013).

U většiny výše popsaných enzymů byla prokázána schopnost asociace s dalšími proteiny účastnicími se biogeneze malých RNA (např. s AGO1 či DCL1) do větších komplexů, což zřejmě napomáhá stabilizaci všech přítomných molekul (Baranauskė et al., 2015; Tu et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhai et al., 2013).

#### 2.4. RNA dependentní RNA polymerázy

Zatímco miRNA vznikají z vlásenkových prekurzorů, siRNA jsou tvořeny z dvouvláknových molekul RNA. Jejich tvorbu obstarává rodina RNA dependentních RNA polymeráz, které jsou schopné produkovat komplementární vlákno k jednovláknovému templátu. Je tak zajištěna amplifikace nejen virových siRNA či siRNA vznikajících z transgenů, ale i endogenních siRNA podílejících se především na tvorbě heterochromatinu pomocí mechanismu RdDM. Některé malé RNA vznikající touto cestou pravděpodobně pochází také z oblastí intronů (Qin et al., 2015). Virové dsRNA mohou vznikat buď činností polymerázy kódované přímo virem, nebo využívají hostitelské RDR. Polymerázy rodiny RDR produkují komplementární vlákna za pomoci očka nebo *de novo*. Jako očko může sloužit funkční hydroxylová skupina na 3' konci aberantní mRNA, která není opatřena polyA a zaujímá vlásenkovou strukturu (Devert et al., 2015). Polymeráza RDR6 dokáže jako templát využívat i jednovláknovou DNA (Curaba and Chen, 2008).

U huseničku bylo popsáno celkem 6 různých RNA dependentních RNA polymeráz spadajících do dvou odlišných tříd – RDR $\alpha$  a RDR $\gamma$ . Do třídy RDR $\alpha$  jsou řazeny RDR1, RDR2 a RDR6, do třídy RDR $\gamma$  pak RDR3, RDR4 a RDR5, jejichž funkce zatím nebyla prozkoumána. S polymerázami třídy RDR $\alpha$  se lze setkat nejen u huseničku (*Arabidopsis thaliana*), ale také u rýže (*Oryza sativa*), topolu (*Populus trichocarpa*) a s ortologem RDR6 dokonce již u mechu čepenky odstálé (*Physcomitrella patens*), jedná se tedy o evolučně velmi konzervované enzymy. Zástupci třetí třídy RDR $\beta$  u rostlin chybí a je možné je nalézt pouze u živočichů a hub (Zong et al., 2009).

Nejzajímavější a nejlépe prostudovaný je protein RDR6 – účastní se produkce hned několika různých typů sRNA (vsiRNA, sRNA vzniklých z transgenů, nat-siRNA, tasiRNA apod.) a reguluje největší množství funkcí v rostlinném organismu ze všech RDR (Willmann et al., 2011). Poprvé byla jeho funkce popsána právě v souvislosti s posttranskripčním umlčováním genů (post-transcriptional gene silencing, PTGS) indukovaným virovou infekcí. Rostliny defektní v genu *rdr6* byly náchylnější k virové infekci a nebyly schopné posttranskripčního umlčování buď vůbec, nebo toto bylo alespoň výrazně potlačeno. Tato studie také potvrdila přímou souvislost mezi PTGS a obranou proti virové infekci (Mourrain et al., 2000).

Polymeráza RDR2 úzce spolupracuje s DNA dependentní RNA polymerázou IV; společně se účastní tvorby malých RNA z oblastí s nízkou transkripční aktivitou (hetsiRNA). Tyto heterochromatinové úseky jsou nejprve přepisovány pomocí RNA polymerázy IV do podoby jednovláknové RNA a poté se stávají substrátem pro RDR2. Za účasti DCL3 následně dochází ke vzniku příslušných hetsiRNA o délce 24 nt, které mohou být vázány různými typy proteinů AGO a

vyvolávat tvorbu heterochromatinu či modifikaci histonů mechanismem RdDM (Blevins et al., 2015; Daxinger et al., 2009; Haag et al., 2012; Xie et al., 2004). Právě RDR2 je u rostlin jedním z klíčových enzymů, protože hetsiRNA u nich představují nejhojněji zastoupenou třídu. U jedinců nesoucích mutaci *rdr2* tak dochází ke ztrátě všech siRNA odvozených z repetitivních sekvencí a transponovatelných elementů (Kasschau et al., 2007).

Z rodiny RDRα je nejméně prozkoumaný protein RDR1, který se účastní produkce virových siRNA (virus-derived siRNA, vsiRNA). U huseníčku napadeného virem okurkové mozaiky (*Cucumber mosaic virus*, CMV) dochází ke zvýšené syntéze kyseliny salicylové, která aktivuje činnost RDR1, a tím i produkci vsiRNA, které jsou schopné virus umlčet. Polymeráza RDR1 tedy pravděpodobně hraje významnou roli v antivirové imunitě. Dále se podílí na tvorbě endogenních virem aktivovaných siRNA (virus-activated siRNA, vasiRNA), jejichž vznik je vyvolán již probíhajícím umlčováním viru. Cílem těchto siRNA jsou na rozdíl od vsiRNA protein kódující hostitelské geny (Cao et al., 2014; Wang et al., 2010).

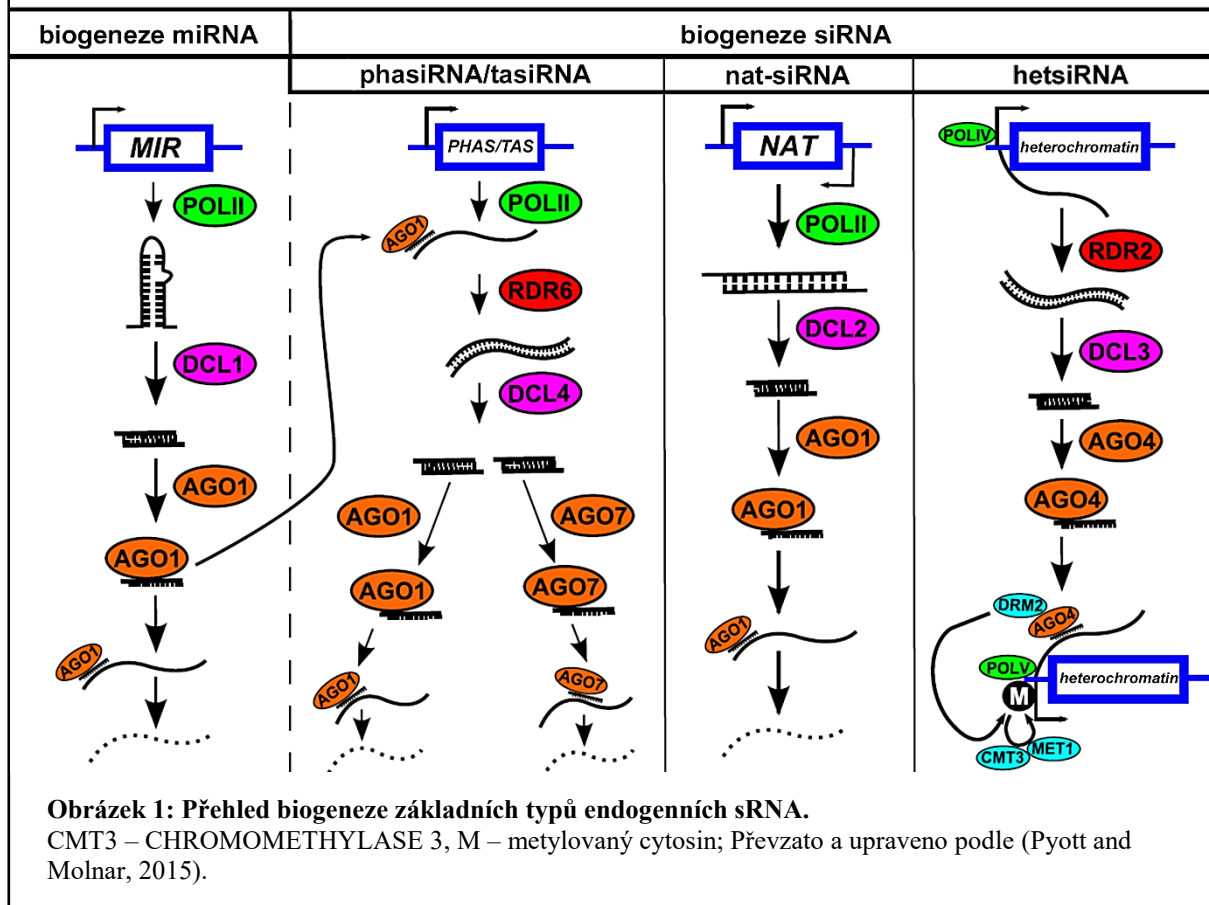
U některých virových onemocnění je dokonce nezbytná kooperace několika RDR najednou. Při napadení huseníčku virem mozaiky vodnice (*Turnip mosaic virus*, TuMV) je k prevenci infekce nutná činnost RDR1 i RDR6, samostatně nejsou k ochraně před infekcí dostačující. Avšak i u trojitých mutantů *rdr1/rdr2/rdr6* dochází alespoň k bazální produkci vsiRNA (Garcia-Ruiz et al., 2010). Polymeráza RDR6 se také účastní posttranskripčního umlčování transgenů (Dalmay et al., 2000). Její další důležitou funkcí je produkce sekundárních sRNA, např. tasiRNA (Allen et al., 2005; Peragine et al., 2004; Yoshikawa et al., 2005), které jsou poté schopny štěpení cílových molekul, což jsou u rostlin nejčastěji transkripční faktory auxinové odpovědi (Allen et al., 2005).

### 3. Klasifikace sRNA

Malé RNA lze dělit dle různých kritérií, a proto se způsob jejich klasifikace na základě získávání nových poznatků velmi rychle mění. Jednou z možností je rozdělení na exogenní a endogenní. Endogenní sRNA (viz Obrázek 1) vznikají přepisováním z genů, které jsou danému organismu vlastní. Exogenní sRNA pocházejí z cizorodých sekvencí – transgenů, či virových dsRNA v případě napadení rostliny virovou infekcí. U rostlin je možné se setkat se dvěma třídami malých RNA, a to s miRNA (microRNA) a siRNA (short interfering RNA) (Pyott and Molnar, 2015).

MicroRNA vznikají úpravou vlásenkových prekurzorů, které jsou produktem transkripce nekódujících endogenních genů *MIR* (Reinhart et al., 2002). Štěpení vlásenkové sekundární struktury proteinem DCL může být i několikastupňové, což umožňuje tvorbu různě dlouhých miRNA z jednoho prekurzoru (Bologna et al., 2009; Zhang et al., 2010). Nejčastější délka miRNA je 21 či 22 nt, ale u rostlin byla popsána také třída dlouhých (lmiRNA) o délce 24 nt (Reinhart et al., 2002; Wu et al., 2010).

# Endogenní sRNA



Oproti tomu siRNA většinou pocházejí z delších dsRNA prekurzorů, jejichž tvorba je převážně podmíněna předchozí činností RNA dependentní RNA polymerázy (Baulcombe, 2004; Dalmay et al., 2000). Jejich délka se pohybuje typicky kolem 21-24 nt (Kasschau et al., 2007), či 30-40 nt v případě dlouhých siRNA, lsiRNA (Katiyar-Agarwal et al., 2007). Podle způsobu biogeneze lze siRNA dále rozlišit na primární siRNA a sekundární siRNA. Po štěpení cílové molekuly pomocí primární siRNA mohou být vzniklé produkty využity jako templát pro opětovnou syntézu dvouvláknové RNA za účasti RDR, která slouží jako substrát pro tvorbu dalších, tzv. sekundárních siRNA (Himber et al., 2003). Syntéza tohoto typu siRNA bývá spuštěna také předchozím štěpením jejich prekurzoru miRNA (Allen et al., 2005).

Mezi primární siRNA se řadí hetsiRNA a nat-siRNA. Heterochromatinové siRNA pocházejí především z oblastí repetitivních sekvencí a transponovatelných elementů a jejich funkcí je metylace *de novo* komplementárních sekvencí (Zilberman et al., 2003). Tyto oblasti jsou přepisovány prostřednictvím Pol IV a Pol V, zatímco většina ostatních sRNA je závislá na Pol II (Herr et al., 2005; Kanno et al., 2005; Lee et al., 2004; Onodera et al., 2005; Wang et al., 2008; Wierzbicki et al., 2008). Druhým typem jsou u rostlin minoritní nat-siRNA. Jedná se o produkty obousměrné transkripce překrývajících se (*cis*-nat-siRNA) či nepřekrývajících se genů (*trans*-nat-siRNA), které jsou k sobě

zcela nebo jen částečně komplementární, a formují tak dsRNA (Borsani et al., 2005; Wang et al., 2006). Ta je rozštěpena na primární nat-siRNA, jejichž cílem je právě jeden z překrývajících se transkriptů. Tento krok může následně spustit tvorbu sekundárních nat-siRNA zajišťujících amplifikaci signálu (Borsani et al., 2005). Vznik nat-siRNA bývá typicky vyvolán stresovými podmínkami (Borsani et al., 2005; Jin et al., 2008; Katiyar-Agarwal et al., 2006).

Hlavní třídu sekundárních siRNA představují phasiRNA (phased siRNA), které vznikají v 21nt nebo 24nt intervalech od místa štěpení miRNA (Johnson et al., 2009). Jejich speciálním typem jsou 21 nt dlouhé tasiRNA, jejichž tvorba je na rozdíl od phasiRNA spuštěna štěpením konkrétních transkriptů *TAS* (Allen et al., 2005; Peragine et al., 2004) a společně s hetsiRNA reprezentují třídu sRNA specifické výhradně pro rostliny. Další, nepříliš prozkoumanou skupinou pravděpodobně sekundárních siRNA jsou easiRNA (epigenetically activated siRNA), které pochází z reaktivovaných transpozónů a repetitivních sekvencí. K reaktivaci těchto oblastí může dojít např. v důsledku narušené funkce enzymů DDM1 (DECREASED DNA METHYLATION 1) a MET1 (METHYLTRANSFERASE 1). Podle recentních informací jsou indukovány předchozím štěpením příslušné repeticce či transpozónu aktivitou miRNA, což je považováno za důkaz jejich sekundární povahy (Creasey et al., 2014).

Typickým spouštěčem tvorby exogenních sRNA je přítomnost transgenů či virové nukleové kyseliny v rostlinném genomu (Hamilton and Baulcombe, 1999). Virové siRNA (vsiRNA) vznikají z virové dsRNA, která je rozpoznána hostitelskými proteiny biogeneze malých RNA, a posléze umlčují komplementární virové sekvence. Odpověď rostliny na přítomnost cizorodé RNA dále spočívá v syntéze vasiRNA, které regulují expresi endogenních genů, a tím přispívají k aktivaci obranných mechanismů rostliny (Cao et al., 2014).

Zcela speciálním typem malých RNA jsou diRNA (double-strand DNA break-induced RNA), které se tvoří z dsRNA komplementárních k oblasti dvouvláknového zlomu. Navedením reparačních enzymů do poškozených míst se podílí na ochraně integrity genomu. Pro svou funkci také vyžadují aktivitu Pol IV a Pol V (Wei et al., 2012).

#### **4. Mechanismus působení sRNA**

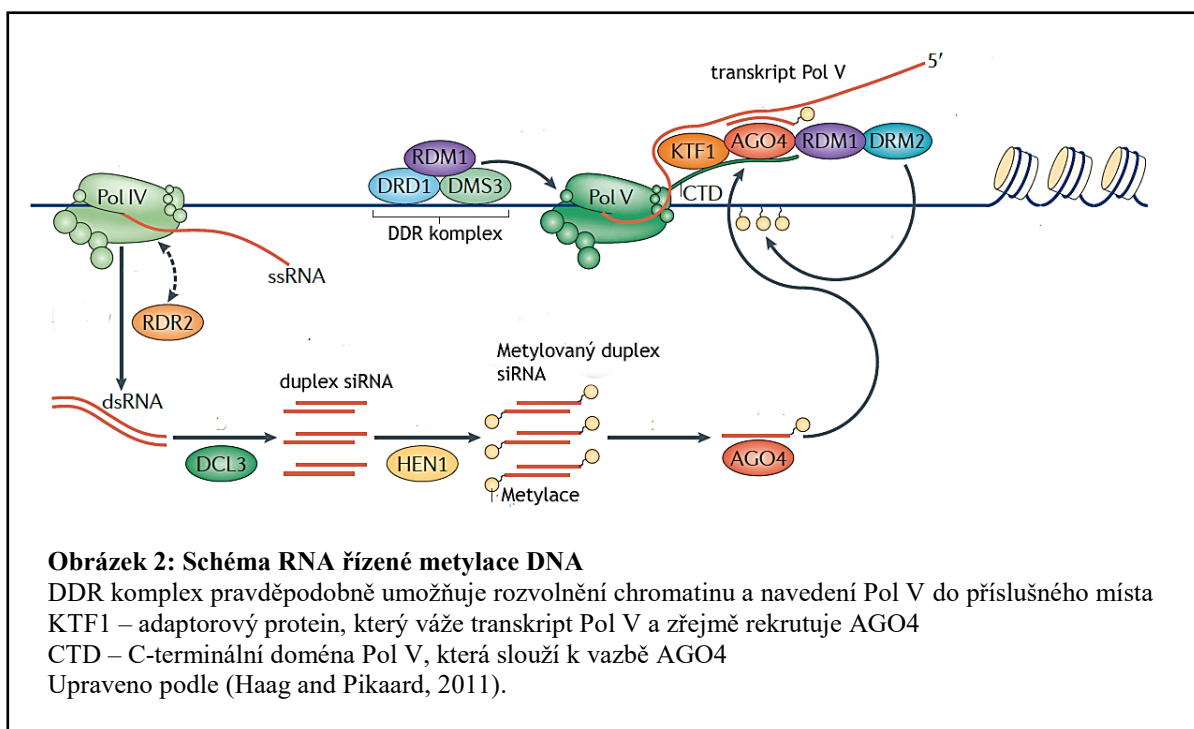
Malé RNA mohou ovlivňovat buď svoji vlastní transkripční jednotku umlčením v *cis* (angl. autosilencing) nebo zcela odlišné lokusy při působení *trans* (angl. heterosilencing). Zatímco pro miRNA je typické umlčování *in trans*, siRNA většinou slouží k regulaci vlastních sekvencí. Kontakt mezi malou RNA a její cílovou molekulou probíhá prostřednictvím Watson-Crickovského párování. Stupeň umlčení může být závislý nejen na samotné expresi malé RNA, ale i na jejím poměru k množství cílové molekuly (Li et al., 2014a).



#### 4.1. Regulace transkripce

Ústředním mechanismem umožňujícím regulaci malými RNA na úrovni transkripce (TGS, angl. transcriptional gene silencing) je RNA řízená metylace DNA (viz Obrázek 2), která slouží ke značení cytosinu v jakémkoli kontextu (Mette et al., 2000; Pélissier et al., 1999; Wassenegger et al., 1994). Proces RdDM je závislý na aktivitě dvou specificky rostlinných DNA dependentních RNA polymeráz, Pol IV a Pol V, a jeho funkcí je zejména umlčování repetitivních sekvencí a transponovatelných elementů (Haag and Pikaard, 2011; Herr et al., 2005; Kanno et al., 2005; Onodera et al., 2005; Wierzbicki et al., 2008). Umlčení je nejúčinnější, dojde-li k metylaci v promotoru (Zhang et al., 2006). Transkripty syntetizované Pol IV jsou činností RDR2 přetvořeny v dvouvláknové molekuly, rozštěpeny DCL3 na 24 nt dlouhé siRNA a vázány AGO4, AGO6 či AGO9 (Duan et al., 2015; Haag et al., 2012; Havecker et al., 2010; He et al., 2009; Wang and Axtell, 2017; Xie et al., 2004; Zheng et al., 2007; Zilberman et al., 2004). Stejně sekvence DNA jsou rozeznávány také Pol V, jejíž produkty slouží jako lešení pro vazbu příslušného proteinu AGO s navázanou malou RNA (Wierzbicki et al., 2008, 2009).

Pro správný průběh transkripce Pol V je také nutná přítomnost faktorů remodelujících chromatin, proteinů vázajících jednovláknovou RNA a dalších (Zhong et al., 2012). Ty asociují s AGO4 a s metyltransferázou DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2), která již zajišťuje vlastní metylaci DNA *de novo* (Cao and Jacobsen, 2002). Na stejném procesu se může podílet také příbuzná metyltransferáza DRM1 (DOMAINS REARRANGED METHYLASE 1), jejíž exprese je ale ve srovnání s DRM2 výrazně nižší, a tudíž je možno považovat její celkový příspěvek v rámci RdDM za zanedbatelný (Cao et al., 2000). S RdDM je velmi úzce spjata také množství enzymů podílejících se na modifikacích histonů (Greenberg et al., 2013).

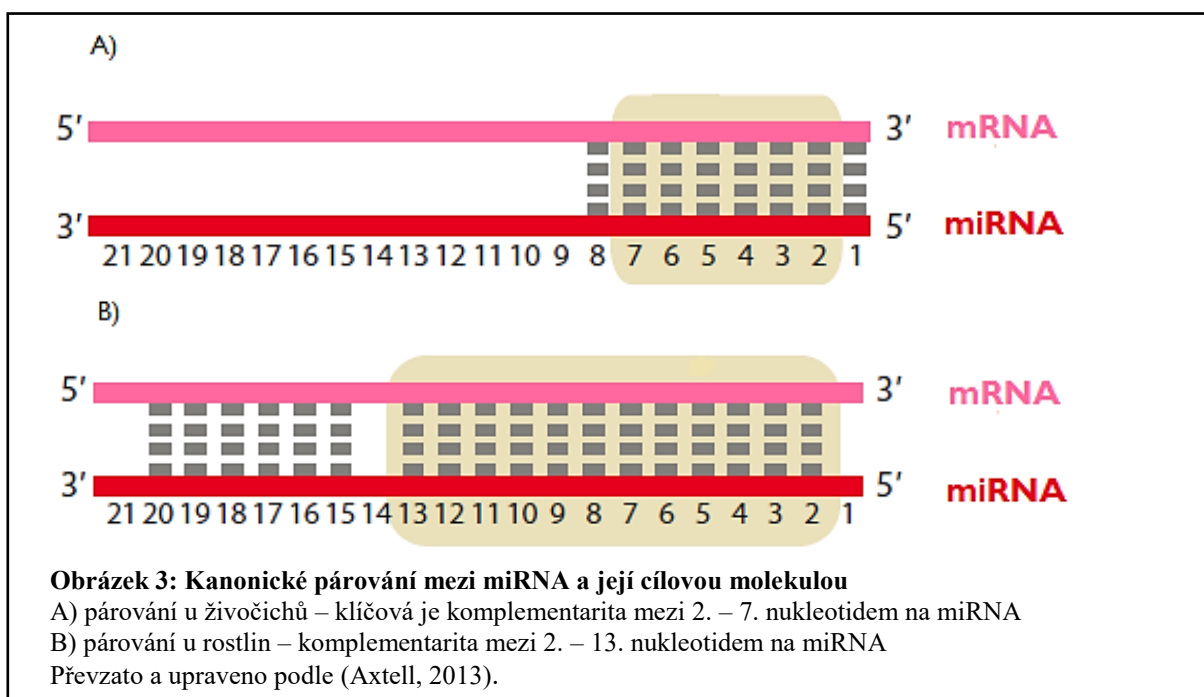


U rýže navíc za snížení exprese vlivem metylace zodpovídají speciální dlouhé miRNA (lmiRNA) o délce 24 nukleotidů. Jsou schopny metylovat jak svůj vlastní lokus, tak i cílovou molekulu a na rozdíl od hetsiRNA tedy mohou působit nejen v *cis*, ale i v *trans* (Wu et al., 2010). Podobně jako u hetsiRNA je jejich biogeneze umožněna ortology DCL3 a AGO4, konkrétně DCL3a, AGO4a, AGO4b a AGO16. Také u čepenky odstálé se na metylaci genů mohou podílet miRNA, avšak pouze při mutaci enzymu DCL1b či při nestandardním poměru miRNA a její cílové molekuly (Khraiwesh et al., 2010).

Proces metylace DNA řízené siRNA je patrně ještě komplexnější, neboť k ní může v určitých případech docházet i nezávisle na Pol IV či RDR2. U těchto nekanonických drah je využívána aktivita jiných enzymů, např. Pol II a RDR6 či pouze Pol II a DCL3 – RdDM tedy zřejmě může probíhat i bez účasti RDR (Panda and Slotkin, 2013; Panda et al., 2016; Pontier et al., 2012).

#### 4.2. Posttranskripční regulace

Na posttranskripční úrovni dochází k regulaci malými RNA prostřednictvím štěpení cílové mRNA či inhibice translace; tato schopnost byla prokázána u miRNA i siRNA (Brodersen et al., 2008). Pro rostliny je typická vysoká míra komplementarity mezi miRNA a jejím cílem (Axtell, 2013; Llave et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Rhoades et al., 2002), čímž se výrazně liší od miRNA u živočichů, kde nároky na komplementaritu nejsou tak vysoké – k rozpoznání cílové molekuly je často dostačující párování 2. až 8. nukleotidu miRNA (angl. seed pairing) (Lewis et al., 2003). U rostlin je tato klíčová oblast o něco rozsáhlejší (2.-12. nukleotid) a je velmi citlivá na přítomnost nepárujících bází, které mohou efektivitu sRNA značně omezit (viz Obrázek 3) (Liu et al., 2014; Mallory et al., 2004; Schwab et al., 2005). K přítomnosti nepárujících bází je pak nejcitlivější samotné místo štěpení, tj. oblast mezi 10. a 11. nukleotidem (Schwab et al., 2005).



Požadavky na přesné párování jsou tedy zejména na 5' konci miRNA velmi vysoké, a právě tyto oblasti miRNA proto bývají nejvíce konzervovány. Naopak neúplná komplementarita bází v okolí 3' konce miRNA u rostlin ani živočichů účinnost štěpení nijak výrazně nesnižuje (Mallory et al., 2004). Avšak zatímco živočišné miRNA se vážou zejména do 3' nepřekládané oblasti cílové mRNA (Lee et al., 1993), u rostlinných miRNA dochází převážně k vazbě do kódující oblasti (open reading frame, ORF), případně také do oblastí 5' UTR či 3' UTR (Allen et al., 2005; Rhoades et al., 2002). Nedokonalé párování u živočichů má nejčastěji za následek umlčení na úrovni repress translace, při vyšší míře komplementarity naopak převládá štěpení cílové mRNA. Z tohoto důvodu bylo předpokládáno, že u rostlin bude hlavním mechanismem působení malých RNA právě štěpení (Hutvagner and Zamore, 2002). Ale i přes téměř dokonalé párování jsou rostlinné sRNA schopny indukovat jak štěpení, tak translační represi (Chen, 2004). Zajímavé je, že je-li molekula regulována na úrovni inhibice translace, dochází u ní vždy alespoň k minimální míře štěpení mRNA. Zatím tedy nebyly nalezeny takové miRNA, které by regulovaly cílovou molekulu výhradně na úrovni translace (Li et al., 2014b).

U všech rostlinných proteinů AGO je přítomná katalytická doména PIWI, která umožňuje štěpení mRNA (Bohmert et al., 1998). Schopnost repress translace byla zatím prokázána jen u AGO1, AGO2 a AGO10 (Brodersen et al., 2008; Fátýol et al., 2016) a pravděpodobně k ní dochází na povrchu endoplazmatického retikula ve fázi iniciace či elongace (Iwakawa and Tomari, 2013; Li et al., 2013). Vazba proteinu AGO1 do 5' nepřekládané oblasti či otevřeného čtecího rámce (ORF) cílové molekuly zřejmě stericky brání translokaci ribozomů při elongaci, zatímco párováním s 3' UTR je inhibována spíše iniciace translace (Iwakawa and Tomari, 2013). Kromě integrálních proteinů endoplazmatického retikula jsou k represi translace pomocí sRNA zapotřebí i další komponenty - faktory vázané na mikrotubuly, P-tělíska, či proteiny podílející se na odstranění metylguanositové čepičky z mRNA (Brodersen et al., 2008; Li et al., 2013).

Mezi typické cíle mikroRNA se řadí regulační proteiny, například různé transkripční faktory ovlivňující vývoj rostliny. Moduluje-li daná miRNA více molekul, jedná se většinou o proteiny jedné genové rodiny či regulační dráhy, o faktory související s podobnou funkcí či kontrolující vývoj stejného rostlinného orgánu (Chorostecki et al., 2012; Jones-Rhoades, 2012; Rhoades et al., 2002). Nabízí se také možná funkční role nejen vedoucího, ale i jeho komplementárního vlákna či různých velikostních izoforem jedné miRNA (Devers et al., 2011; Ebhardt et al., 2010; Reinhart et al., 2002; Zhang et al., 2011).

#### 4.3. Pohyb sRNA

U některých malých RNA byla prokázána schopnost pohybu z místa jejich vzniku do okolních buněk. K pohybu sRNA může docházet jak na krátké vzdálenosti (cca do 10-15 buněk od místa vzniku), tak na vzdálenosti delší (Himber et al., 2003; Pyott and Molnar, 2015). Transport na krátké vzdálenosti probíhá symplasticky, pravděpodobně skrze plasmodesmy, ale je také možné, že je

zprostředkován pouze pasivní difuzí nebo aktivitou vazebného proteinu (Palauqui et al., 1997; Yoo et al., 2004). Není ani známo, zdali jsou sRNA transportovány ve formě jednovláknových nebo dvouvláknových molekul. Pohyb na krátké vzdálenosti byl prokázán u siRNA (Himber et al., 2003) a některých miRNA (Carlsbecker et al., 2010; Juarez et al., 2004). Obecně ale platí, že tasiRNA mají zpravidla větší dosah než miRNA. Způsob biogeneze je tedy zřejmě jedním z faktorů, které ovlivňují mobilitu sRNA (de Felippes et al., 2011).

Pohyb malých RNA na delší vzdálenosti také začíná transportem do vzdálenosti 10-15 buněk. Zde dochází k produkci sekundárních sRNA aktivitou RDR6, jež mají opět schopnost putovat do okruhu 10-15 buněk (Himber et al. 2003). Popsaný jev se nazývá tranzitivita a umožňuje výraznou amplifikaci umlčovacího signálu (Sijen et al., 2001). Třetím způsobem pohybu sRNA je systémový pohyb floémem (Buhtz et al., 2008; Yoo et al., 2004). Ten probíhá z místa jejich vzniku do sinku, místa potřeby, tedy stejně jako v případě klasického transportu asimilátů floémovým tokem. Tímto způsobem jsou transportovány exogenní i endogenní siRNA, ale i miRNA (Yoo et al., 2004). Ve floému tykve velkoplodé (*Cucurbita maxima*) byl nalezen protein PSRP1 (PHLOEM SMALL-RNA BINDING PROTEIN 1), který váže sRNA a zřejmě umožňuje jejich transport do sinku (Ham et al., 2014; Yoo et al., 2004). Malé RNA účastníci se RdDM mohou být také mobilní, putovat floémem ze zdroje (např. stonku) do místa potřeby (kořen) a zde umlčovat příslušné lokusy (Brosnan et al., 2007; Molnar et al., 2010). Jedná se hlavně o 24nt sRNA a jimi řízenou metylaci retrotranspozonů v kontextech CHH či CHG, závislou na aktivitě DRM1 a DRM2 (Lewsey et al., 2016; Molnar et al., 2010).

Pohybem z místa vzniku do okolních buněk se vytváří gradienty malých RNA, respektive jejich cílových molekul, které poté slouží jako poziční informace nutná ke správnému vývoji různých rostlinných orgánů. Tímto způsobem fungují některé tasiRNA či miRNA, čímž se podobají živočišným morfogenům (Carlsbecker et al., 2010; Chitwood et al., 2009). Malé RNA jsou ale zřejmě transportovány ještě dalším, dosud neznámým mechanismem. Pravděpodobně totiž dochází k jejich pohybu mezi vegetativní a generativní buňkou samčího gametofytu; v těchto místech však propojení plasmodesmy zjevně chybí, byť jsou oba buněčné typy ve fyzickém kontaktu (Slotkin et al. 2009; McCue et al. 2011). Pohyb sRNA může probíhat také mezi rostlinou a jejími patogeny (Huang et al., 2006).

## 5. Generativní vývoj rostlin

### 5.1. Fáze ontogeneze a rodozměna

Během životního cyklu rostliny dochází ke střídání generací – diploidního sporofytu a haploidního gametofytu, tzv. rodozměně. Ve stádiu sporofytu není rostlina schopna dát vznik nové generaci, může se rozmnožovat pouze nepohlavní cestou a setrvává v juvenilní fázi. Po ní následuje fáze přechodná, která se u krytosemenných rostlin vyznačuje tvorbou květu. Specializované struktury květu umožňují vznik a následnou ochranu pohlavních buněk, a později také jejich splynutí a vývoj

v semeno. Období, ve kterém rostlina získává schopnost pohlavního rozmnožování, se nazývá fáze generativní (Hafidh et al., 2016; Huijser and Schmid, 2011). Buňky sporofytu se meioticky dělí a vytváří haploidní spory, ze kterých posléze vzniká gametofyt, pohlavní generace (Hafidh et al., 2016). V průběhu evoluce cévnatých rostlin byl gametofyt výrazně potlačen a u semenných rostlin se stal závislým na mateřském sporofytu do té míry, že bylo zpočátku dokonce pochybováno, že i semenné rostliny procházejí rodozměnou (tzv. skrytá rodozměna; (Hofmeister, 1851)). Mitotickým dělením buněk gametofytu konečně dochází k produkci vlastních pohlavních buněk neboli gamet. Splynutí samčí a samičí gamety v diploidní zygotu umožňuje vznik nového jedince (Hafidh et al., 2016). Přechody mezi výše popsanými vývojovými fázemi podléhají velmi komplexní regulaci, mezi jejíž klíčové složky patří právě malé RNA. Na molekulární úrovni se účastní i tvorby epigenetických značek a ochrany integrity genomu, neboť mimo jiné zajišťují umlčování mobilních genetických elementů v gametách, a tím i v následujících generacích.

## 5.2. Role sRNA v regulaci kvetení

Má-li se stonkový meristém diferencovat v meristém květní, je nutné, aby byla rostlina ke kvetení kompetentní. Získání kompetence ke kvetení závisí na řadě endogenních a exogenních činitelů, jakými jsou např. vytvoření určitého počtu listů, teplota či délka slunečního svitu (Huijser and Schmid, 2011). Jejich vzájemné působení je doprovázeno i změnami na úrovni molekulární. Mění se nejen exprese příslušných genů a transkripčních faktorů, ale také malých RNA, které slouží k jejich regulaci. Nástup kvetení je ovlivněn pěti základními drahami, které jsou velmi úzce propojeny – dráhou závislou na stáří rostliny (1), na fotoperiodě (2), jarovizaci (3), hladině kyseliny giberelové (4) a tzv. autonomní dráhou (5), která je na předchozích nezávislá (Khan et al., 2014; Mouradov et al., 2002). Nejprozkoumanější z nich je, co se týče regulace pomocí malých RNA, dráha závislá na stáří rostliny. Jak rostlina stárne, dochází ke snižování či naopak zvyšování exprese různých sRNA, respektive jejich cílových molekul. Nejznámějším příkladem je dvojice příbuzných miRNA – miR156 a miR157, jejichž úkolem je represe transkripčních faktorů rodiny SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-like). Během juvenilní fáze je exprese *SPL* potlačována pomocí miR156. Teprve při určitém stáří rostliny dojde k takovému poklesu množství miR156, že je hladina SPL dostatečná pro vyvolání tvorby květů (Wang et al., 2009; Wu and Poethig, 2006). Umělým zvýšením exprese *MIR156* jsou déle zachovány juvenilní znaky doprovázené opožděným kvetením postižených rostlin (Wu et al., 2009). Jedná se o vysoce konzervovanou dráhu vyskytující se u jednoděložných i dvouděložných rostlin (Zhang et al., 2015). Zcela opačnou tendenci má u huseničku miR172. Jejimi cíli jsou transkripční faktory AP2-like (APETALA 2-like), jejichž aktivita udržuje rostlinu v juvenilní fázi. Jak množství miR172 s postupným vývojem stoupá, hladina transkriptu *AP2-like* je posttranskripčně snížena a rostlině je tak umožněn nástup kvetení (Wu et al., 2009).

Pomocí malých RNA, především miRNA, ale také např. tasiRNA, je regulována i řada dalších genů a transkripčních faktorů s úlohou při tvorbě květu. Častými vazebnými partnery těchto sRNA,

ať už přímými, nebo nepřímými, jsou geny podílející se na tvorbě květního meristému či určující charakter jednotlivých květních částí, jako např. *LEAFY* či *APETALA2* (Achard et al., 2004; Wollmann et al., 2010; Wu et al., 2009, 2013). Ve vysoké míře dochází také k interakcím miRNA a jejich cílových molekul s různými fytohormony, geny podílejícími se na jejich biosyntéze, či transkripčními faktory regulujícími homeostázu dusíku nebo fosforu (Achard et al., 2004; Chen et al., 2011; Kim et al., 2011; Rubio-Somoza and Weigel, 2013; Schommer et al., 2008; Si-Ammour et al., 2011; Xu et al., 2014). Téměř vždy však platí, že míra exprese regulačních molekul je závislá na působení hned několika faktorů současně (stáří rostliny, teplota, fotoperioda, stresové podmínky, hladina cukru ve stonkovém apikálním meristému aj.) a na jejich vzájemné souhře (Teotia and Tang, 2015).

### 5.3. Vývoj samčího gametofytu

Samčí gametofyt neboli mikrogametofyt krytosemenných rostlin představuje zralé pylové zrno. Jeho vývoj je vázán na specializované struktury sporofytu – mikrosporangia (prašná pouzdra) v prašnicích tyčinek. V prašných pouzdrech se diferencují diploidní mikrosporocyty (mateřské buňky mikrospor). Jejich redukčním dělením vznikají čtyři haploidní mikrospory spojené v tetradu. Uvolněním jednotlivých mikrospor z tetrády, které představuje důležitý kontrolní bod zprostředkovaný sporofytem (konkrétně tapetem), končí proces mikrosporogeneze a začíná mikrogametogeneze. Během ní mikrospory podstupují dvě mitotická dělení. První pylová mitóza je výrazně asymetrická a na jejím konci jsou dvě buňky – větší buňka vegetativní a menší buňka generativní. Generativní buňka, která je posléze zcela obklopena buňkou vegetativní, se dále dělí v rámci druhé pylové mitózy. Ta je již symetrická a umožňuje vznik dvou buněk spermatických, tedy samčích gamet. U rostlin s tzv. trojbuněčným pylem, mezi které patří právě huseníček, probíhá druhá pylová mitóza ještě před dozráním pylového zrna v prašníku. U pylu dvojbuněčného jsou pylová zrna z prašníku uvolněna dříve a k dělení generativní buňky dochází až po vyklíčení, v pylové láčce (Hafidh et al., 2016).

Po dopadu pylového zrna na bliznu a jeho rehydrataci jsou obnoveny metabolické procesy vedoucí ke klíčení pylové láčky. Pylová láčka vzniká z buňky vegetativní a jejím úkolem je dopravení spermatických buněk skrz čnělku do zárodečného vaku (samičího gametofytu). Tam se spermatické buňky účastní dvojitého oplození – jedna z nich splývá s oosférou (samičí gametou, vaječnou buňkou) a vytváří diploidní zygotu, zatímco druhá spermatická buňka splývá s centrálním jádrem zárodečného vaku za vzniku triploidního endospermu, který slouží k výživě embrya (Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013; Hamamura et al., 2012).

### 5.4. Vývoj samičího gametofytu

Samičí gametofyt, zárodečný vak, se vyvíjí uvnitř vajíčka (megasporangia) z diploidní mateřské buňky megasporu. Na rozdíl od samčího gametofytu, který se v určité fázi vývoje

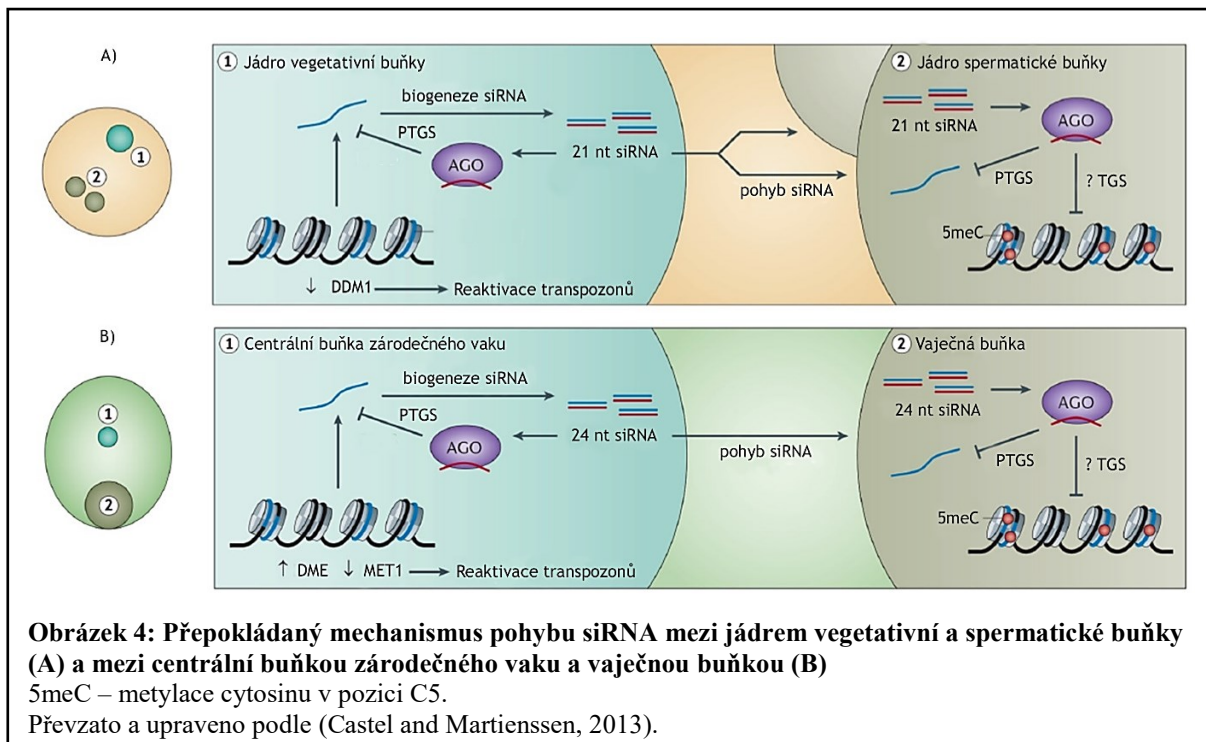
od sporangia oddělí, zůstává samičí gametofyt uvnitř megasporangia i po oplození. Mateřská buňka megaspory podstupuje meiózu, kterou se vytváří čtyři haploidní megaspory. Obvykle je pouze jedna z nich schopna další diferenciaci, zbylé tři buňky degenerují. Výsledná funkční megaspóra se dále mitoticky dělí v procesu megagametogeneze, čímž vzniká zárodečný vak. Zralý, typicky osmijaderný zárodečný vak krytosemenných rostlin sestává ze sedmi buněk – dvou synergid, vaječné buňky (oosféry), tří antipod (neboli protistojných buněk) a jedné diploidní centrální buňky zárodečného vaku. Zde je však nutné zmínit, že popsané osmijaderné uspořádání není jediné možné, byla popsána celá řada dalších variant lišících se jak anatomicky, tak z hlediska vývoje (Yadegari and Drews, 2004).

### 5.5. Role sRNA v umlčování transponovatelných elementů během reprodukčního vývoje

Podstatná úloha rostlinných malých RNA spočívá v umlčování transponovatelných elementů a jiných repetitivních sekvencí. Transponovatelné elementy patří mezi mobilní genetické elementy. Jedná se o parazitické sekvence DNA, které jsou schopny se v rámci genomu pohybovat. Dojde-li k jejich včlenění do oblasti esenciálního genu, může to mít pro organismus fatální následky. Jedním z obranných mechanismů je právě tvorba siRNA, které se následně podílí na umlčování komplementárních sekvencí transpozonů. K tomuto procesu dochází během vývoje rostliny neustále pomocí RdDM. Rozhodující význam má však především v průběhu reprodukce, čímž snižuje přítomnost a aktivitu TE v budoucích generacích. Mezigenerační ochranu před transpozicí zabezpečují opět siRNA v kombinaci s enzymy podílejícími se na metylaci cytosinu.

Symetrické metylace CG a CHG zůstávají u gamet víceméně zachovány, ale buňky přiléhající jak k samčím, tak k samičím gametám jsou v těchto kontextech demetylovány. Ke snížení metylace ve vegetativní buňce dochází na základě nízké exprese enzymu DDM1 (DECREASE IN DNA METHYLATION 1), který je nutný k udržování symetrické metylace, a také v důsledku aktivity glykosylázy DME (DEMETER) nejen ve vegetativní buňce, ale i v centrální buňce zárodečného vaku (Castel and Martienssen, 2013; Hsieh et al., 2009; Park et al., 2016; Schoft et al., 2011; Slotkin et al., 2009). Demetylace pravděpodobně způsobuje reaktivaci transponovatelných elementů v uvedených buňkách, která je doprovázena zvýšenou tvorbou siRNA (viz Obrázek 4). Transkripty těchto transpozonů lze detekovat ve vegetativní buňce, ale příslušné siRNA se překvapivě akumulují v buňkách spermatických. Zde zřejmě způsobují metylaci odpovídajících TE a přispívají tak k jejich umlčování v příštích generacích (Slotkin et al., 2009). S nejvyšší pravděpodobností probíhá také transport siRNA mezi centrální buňkou zárodečného vaku a vaječnou buňkou. Demetylace v centrální buňce zárodečného vaku se přenáší i do budoucího endospermu (Hsieh et al., 2009; Ibarra et al., 2012; Li et al., 2017; Park et al., 2016).

Jestli opravdu probíhá transport sRNA mezi vegetativní a spermatickou buňkou, případně mezi centrální buňkou zárodečného vaku a vaječnou buňkou, a jakým způsobem, nebylo zatím nevyvratitelně prokázáno a také názory na tuto jinak velice atraktivní hypotézu jsou dosud rozporuplné. Nicméně miRNA štěpící GFP v centrální buňce zárodečného vaku byla schopna



**Obrázek 4: Přepokládaný mechanismus pohybu siRNA mezi jádrem vegetativní a spermatické buňky (A) a mezi centrální buňkou zárodečného vaku a vaječnou buňkou (B)**

5meC – metylace cytosinu v pozici C5.

Převzato a upraveno podle (Castel and Martienssen, 2013).

podstatně umlčet fluorescenci ve vaječné buňce (Ibarra et al., 2012), podobně tomu bylo i v případě miRNA z vegetativní buňky a fluorescencí v buňkách spermatických (Slotkin et al., 2009). Problematickou v této souvislosti zůstává alespoň v případě pylu otázka kontrol a specifity použitého promotoru LAT52 a jeho (ne)specifické exprese výhradně ve vegetativní buňce (nepublikovaná data).

V samčích gametách pro změnu dochází ke ztrátě metylace v kontextu CHH, především u retrotranspozonů LTR. Ve vegetativní buňce je sice tato metylace obnovena pomocí metyltransferázy DRM2, ale ve spermatických buňkách není její exprese dostatečná. Opětovné získání metylace CHH je umožněno až po oplození, pravděpodobně působením maternálních siRNA o délce 24 nt (Calarco et al., 2012).

Změny v metylaci mohou vznikat také jako reakce na napadení rostliny patogenem. Kupříkladu u infikovaných rostlin okurky (*Cucumis sativus*) napadených viroidem způsobujícím zakrslost chmele (*Hop stunt viroid*, HSVd) jsou demetylovány geny pro rRNA a transponovatelné elementy, a to nejen ve vegetativních pletivech, ale také v samčím gametofytu. Tento viroid je totiž schopný vniknout přímo do pylových zrn, kde se hromadí a způsobuje rozvolnění chromatinu generativní buňky. Infekce je navíc doprovázena zvýšenou akumulací malých RNA všech velikostí, které jsou odvozeny z viroidu, ale především ze zmíněných repetitivních oblastí se sníženou metylací (Castellano et al., 2016).



## 5.6. Proteiny AGO specifické pro zárodečnou linii

V okolí samčích a samičích reprodukčních buněk specificky dochází k expresi dvou proteinů AGO, které se významně podílí na správném průběhu megasporogeneze a následné megagametogeneze. První z nich – AGO9, je exprimován ve vajíčkách a prašnicích, přímo v gametách ani megasporách se nevyskytuje. Mutace *ago9* byla u rostlin doprovázena tvorbou několika abnormálních buněk v subepidermální oblasti premeiotického vajíčka. Tyto somatické buňky jsou zřejmě schopné produkovat gamety, aniž by prošly meiotickým dělením, neboť následně došlo k vytvoření dvou gametofytů v jednom vajíčku. Protein AGO9 váže především 24nt siRNA vznikající z transponovatelných elementů, a proto jeho funkce nejspíše spočívá v umlčování mobilních elementů ve vajíčku, čímž je umožněn vývoj jediné vaječné buňky v zárodečném vaku (Olmedo-Monfil et al., 2010).

Dalším proteinem specifickým pro reprodukční pletiva je AGO5, jehož výskyt je vázán na somatické buňky v okolí mateřské buňky megaspory a následně i megaspor. Již heterozygotní rostliny *ago5<sup>+</sup>/<sup>-</sup>* trpí poruchami při iniciaci megagametogeneze a produkují šešule s abortovanými vajíčky. U homozygotů jsou defekty zřejmě ještě vážnější, neboť nebyli identifikováni vůbec. Přítomnost AGO5 v průběhu megasporogeneze je tedy nezbytná pro iniciaci série mitotických dělení (Tucker et al., 2012). K expresi AGO5 dochází ve velké míře také ve spermatických buňkách, nicméně zde jeho funkce zůstává zatím neznámá. Ústřední protein asociující s miRNA, AGO1, byl sice detekován v pylu, ale ve spermatických buňkách zaznamenán nebyl (Borges et al., 2008; Chambers and Shuai, 2009).

## 5.7. Role sRNA v samčím a samičím gametofytu

Zatímco u huseníčku je pro reprodukci zásadní právě aktivita AGO5 a AGO9 a s nimi vázaných miRNA, resp. hetsiRNA, u jednoděložných rostlin se vyskytuje zcela odlišná dráha závislá na phasiRNA. Tyto sekundární siRNA vznikají na základě štěpení příslušného transkriptu *PHAS* za účasti miRNA a následné aktivity RDR6 a DCL4. Způsobem biogeneze se tedy podobají tasiRNA, ale na rozdíl od nich zatím nemají žádné známé cílové molekuly (Dukowic-Schulze et al., 2016). Štěpení miR2118 spouští tvorbu 21 nt dlouhých phasiRNA, miR2275 vyvolává produkci 24nt phasiRNA (Komiya et al., 2014; Zhai et al., 2015). Obě velikostní třídy byly popsány u rýže a kukuřice (*Zea mays*) a bohatě se vyskytují v jejich květenstvích (Johnson et al., 2009; Komiya et al., 2014; Zhai et al., 2015). Regulace reprodukčního vývoje pomocí phasiRNA je tedy u jednoděložných rostlin zřejmě konzervovaným mechanismem. Kratší phasiRNA jsou vázány na subepidermální vrstvu premeiotických prašníků, v následných fázích jejich hladina klesá, až nakonec zcela vymizí. Přítomnost 24nt phasiRNA je nejvyšší v průběhu meiózy v tapetu a také přímo v meiocytech, a na rozdíl od 21nt phasiRNA jsou detekovatelné i ve zralém pylu (Zhai et al., 2015). U sterilních rostlin s defekty v různých buněčných vrstvách prašníků či s nadměrným počtem mikrosporocytů docházelo vždy ke ztrátě buď 21nt nebo 24nt phasiRNA. Pro vznik premeiotických phasiRNA je tedy

vyžadována funkční epidermis, meiotické phasiRNA vyžadují funkční tapetum. Jejich přesná funkce v koordinaci vývoje prašníků však opět není známa (Fei et al., 2016; Zhai et al., 2015).

U rýže s phasiRNA asociuje protein MEL1 (MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE 1) specifický pro buňky zárodečné linie (Nonomura et al., 2007). Přestože se jedná o ortolog AGO5, váže přednostně 21nt phasiRNA namísto miRNA. Rostliny *mell* jsou sterilní v důsledku špatné lokalizace proteinu synaptonemálního komplexu ZEP1. Komplex MEL1-phasiRNA zřejmě umožňuje správný přechod buňky z leptotene do dalších fází meiózy (Komiya et al., 2014).

Cílovými molekulami těchto sekundárních siRNA pravděpodobně nejsou mobilní elementy, jako je tomu u sRNA asociujících s AGO9 u huseníčku, neboť k nim postrádají potřebnou komplementaritu (Zhai et al., 2015). Nabízí se však jejich možná role v remodelaci chromatinu, DNA metylaci a tvorbě synapsí v průběhu meiózy. Tato hypotéza je podpořena pozorováními – phasiRNA u kukuřice pocházejí z oblastí se sníženou metylací DNA, zejména v kontextu CHH (Dukowic-Schulze et al., 2016). Mutace *mell* u rýže pro změnu způsobila sníženou metylaci histonu H3 v pozici K9 (Nonomura et al., 2007). Na základě uvedených příkladů by se phasiRNA tedy mohly podílet na doplnění metylace v demetylovaných oblastech, a sloužit jako značka pro potenciální faktory remodelující chromatin (Dukowic-Schulze et al., 2016). Avšak vzhledem k tomu, že tvorba phasiRNA bývá často spuštěna předchozím štěpením genů kódujících proteiny, je také možné, že jejich účelem je umlčování těchto genů *in cis* (Zheng et al., 2015). Další, tentokrát již prokázanou funkci mají phasiRNA v indukci samčí sterility závislé na fotoperiodě u rýže. Zvýšená akumulace 21nt phasiRNA z PHAS lokusu *Pms1* způsobuje samčí sterilitu u rostlin rostoucích na dlouhém dni (Fan et al., 2016).

S phasiRNA se lze setkat i u dvouděložných rostlin, nicméně převážně jen s jejich kratší (21nt) variantou. Úloha těchto phasiRNA spočívá pravděpodobně v rezistenci proti chorobám. Oproti tomu 24nt phasiRNA, vyskytující se téměř výhradně u lipnicovitých (*Poaceae*), se účastní regulace reprodukce (Zheng et al., 2015).

Na regulaci generativního vývoje rostlin se významně podílí i další typ fázovaných siRNA, tzv. tasiRNA. Mezi jejich typické cílové molekuly patří ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR), které u rostlin ovlivňují hlavně přechody mezi jednotlivými vývojovými fázemi, či proteiny PPR (PENTATRICOPEPTIDE REPEAT), jejichž funkce zatím není zcela objasněna (Allen et al., 2005). Regulace genů a transkriptů *ARF* prostřednictvím tasiRNA je klíčová především při přechodu z juvenilní fáze do období dospělosti a při tvorbě květních orgánů. Nedostatečná represe *ARF3* způsobuje podobný fenotyp jako nadměrná tvorba miR156, tj. u rostlin se dříve projevují dospělé znaky. Dochází však také k defektům květních orgánů, především tyčinek (Fahlgren et al., 2006). Přítomnost tasiRNA byla detekována i v pylu, ale jejich přesná funkce nebyla zatím blíže prozkoumána (Grant-Downton et al., 2009a). Nejnovější poznatky se týkají regulace samčí zárodečné linie pomocí tasiRNA pocházejících z transkriptů *TAS3*. Tyto tasiRNA brání expresi *ARF3* v epidermálních buňkách budoucího vajíčka, čímž je zajištěn vznik pouze jedné mateřské buňky

megaspory (Su et al., 2017). Tato studie opět podtrhuje, jak je tento regulační krok pro úspěšný vývoj rostliny důležitý, neboť se na jeho kontrole podílí také AGO9.

Regulace členů rodiny ARF, konkrétně proteinů ARF6, ARF8, ARF10, ARF16 a ARF18, a PPR se kromě tasiRNA účastní také miRNA (Rhoades et al., 2002). Stabilita transkriptů *ARF6* a *ARF8* je narušena miR167, čímž je umožněn optimální vývoj samčích i samičích reprodukčních orgánů a elongace pylové láčky (Rhoades et al., 2002; Ru et al., 2006; Wu et al., 2006). Oba tyto geny jsou transkribovány ve sporofytických pletivech vajíčka, v poutku, v placentě a také v tyčinkách, zatímco miR167 se jako jejich hlavní regulátor vyskytuje hlavně v integumentech a cévních svazcích tyčinek, ale nikdy v poutku. Nedojde-li ke štěpení *ARF6* a *ARF8*, rostliny produkují sterilní květy s neobvyklými integumenty. Negativně bylo ovlivněno také vedení pylové láčky a u prašníků nedocházelo k jejich vysychání, a tudíž ani k uvolnění pylu. Přílišná exprese těchto faktorů auxinové odpovědi v integumentech je evidentně nežádoucí, a proto musí být pečlivě regulována (Wu et al., 2006). U čínské zelí (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) je výskyt proteinů PPR modulován aktivitou miR158. Při její zvýšené expresi se vytváří pyl s nízkou životaschopností, pylová zrna jsou často abortovaná a jejich obsah je degradován. Narušené je i klíčení a vedení pylové láčky (Ma et al., 2017).

Přímo v samčím i samičím gametofytu se vyskytuje řada miRNA, jejichž přítomnost byla odhalena četnými analýzami transkriptomu (Abdurakhmonov et al., 2008; Borges et al., 2008; Grant-Downton et al., 2009a, 2009b; He et al., 2015; Yang et al., 2017). Patří mezi ně mimo jiné i miR159, která byla detekována v pylu a reguluje transkripční faktory MYB podílející se zejména na kontrole kvetení (Achard et al., 2004; Grant-Downton et al., 2009a; Palatnik et al., 2003, 2007). Do této rodiny transkripčních faktorů spadá také DUO1 (DUO POLLEN 1). Jeho funkce je nejen nezbytná pro správný průběh druhé pylové mitózy, tj. k rozdělení generativní buňky na dvě buňky spermatické, ale zejména je klíčovým faktorem při nastolení a udržování identity samčí zárodečné linie (Borg et al., 2011, 2014; Rotman et al., 2005). Transkript *DUO1* je také pod kontrolou miR159, ale dvojití mutanti *miR159a/miR159b* překvapivě vytváří zcela normální pylová zrna (Allen et al., 2010; Palatnik et al., 2007). Znalost miRNA nacházejících se v samčím či samičím gametofytu je povětšinou omezena pouze na skutečnost, že se určitým způsobem účastní řízení reprodukčního vývoje. Množství z nich má podíl na regulaci kvetení, jiné jsou specifické pouze pro gametofyty, jejich funkce není zcela objasněna a vyžaduje hlubší zkoumání (Abdurakhmonov et al., 2008; Borges et al., 2008; Grant-Downton et al., 2009a, 2009b; He et al., 2015; Yang et al., 2017).

Posledním krokem, který předchází vývoji nového jedince, tedy embrya, je u krytosemenných rostlin dvojitě oplození. Za jeho správnost zodpovídá na molekulární úrovni dvojice překrývající se genů KPL (KOKOPELLI) a ARI14 (ARIADNE 14), jejichž obousměrnou transkripcí vznikají *cis*-nat-siRNA. K transkripci *KPL* dochází ve spermatických buňkách, zatímco *ARI14* je přepisován jak ve vegetativních, tak ve spermatických buňkách, kde není možné detekovat odpovídající protein. Aby se mohlo dvojitě oplození uskutečnit, musí být ve spermatických buňkách přítomny oba dva

transkripty. Nedostatek *KPL* se projevuje oplozením pouze vaječné buňky či pouze centrální buňky zárodečného vaku a kolapsem semen (Ron et al., 2010). Následná embryogeneze a přetvoření vajíčka v semeno jsou umožněny pouze za předpokladu, že dojde k oplození obou těchto buněk, tj. ke vzniku embrya i jeho živného pletiva, endospermu.

## 6. Závěr

Cílem této práce bylo shrnout současné znalosti týkající se malých RNA v rostlinném organismu, enzymů účastnících se jejich biogeneze a vlivu těchto nekódujících RNA na regulaci generativního vývoje. Na molekulární úrovni se malé RNA podílí na řízení širokého spektra endogenních i exogenních sekvencí. Zajišťují také ochranu před poškozením genetické informace mobilními elementy či dvouvláknovými zlomy. Na úrovni makroskopické tyto regulace umožňují mimo jiné optimální načasování tvorby květu, přechodu do generativní fáze a vzniku zárodečné linie a pohlavních buněk. Všechny popsané faktory společně přispívají k vyšší konkurenceschopnosti rostliny v dalších generacích.

Malé RNA jsou velmi často mezidruhově konzervovány, mohou však nabývat také nových doplňujících funkcí. Výjimkou není ani vznik zcela nových sRNA. O jejich mimořádně rychlé evoluci vypovídá skutečnost, že u každého rostlinného druhu lze nalézt miRNA, které se u žádných jiných druhů, ani úzce příbuzných, nevyskytují (Chen, 2009). Studium těchto vysoce komplexních drah přináší nejen hlubší porozumění mechanismům, jimiž rostlina dokáže reagovat na napadení či měnící se podmínky prostředí, ale má i výrazné praktické využití. Syntetické miRNA představují moderní nástroj genového inženýrství a jejich vnesení do rostliny umožňuje dosáhnout vyšší odolnosti vůči biotickým i abiotickým stresovým faktorům, a tím samozřejmě i vyšších výnosů u zemědělských plodin. V neposlední řadě je pomocí RNA interference možné také uměle zvýšit obsah organismu prospěšných látek v potravinách (tzv. biofortifikace).

Přestože v posledních letech došlo k velkému rozvoji tohoto oboru, znalosti o rostlinných sRNA výrazně zaostávají za živočišnými a mnoho otázek zůstává dosud nezodpovězených. Jedná se například o přesný mechanismus transportu malých RNA mezi různými typy buněk, především symplasticky izolovaných. Nepochybně bude také objevena řada dosud neznámých enzymů podílejících se na biogenezi sRNA. K vytvoření celkové představy o roli sRNA v řízení generativního vývoje, zejména pak obou gametofytů, je však v každém případě zapotřebí získání mnohem většího množství znalostí.

## 7. Seznam použité literatury

- Abdurakhmonov, I.Y., Devor, E.J., Buriev, Z.T., Huang, L., Makamov, A., Shermatov, S.E., Bozorov, T., Kushanov, F.N., Mavlonov, G.T., and Abdugarimov, A. (2008). Small RNA regulation of ovule development in the cotton plant, *G. hirsutum* L. *BMC Plant Biol.* 8, 93.
- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C., and Harberd, N.P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Dev. Camb. Engl.* 131, 3357–3365.
- 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.
- Allen, R.S., Li, J., Alonso-Peral, M.M., White, R.G., Gubler, F., and Millar, A.A. (2010). MicroR159 regulation of most conserved targets in *Arabidopsis* has negligible phenotypic effects. *Silence* 1, 18.
- Axtell, M.J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 137–159.
- Baranauskė, S., Mickutė, M., Plotnikova, A., Finke, A., Venclovas, Č., Klimašauskas, S., and Vilkaitis, G. (2015). Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Res.* 43, 2802–2812.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356–363.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363.
- Blevins, T., Podicheti, R., Mishra, V., Marasco, M., Wang, J., Rusch, D., Tang, H., and Pikaard, C.S. (2015). Identification of Pol IV and RDR2-dependent precursors of 24 nt siRNAs guiding de novo DNA methylation in *Arabidopsis*. *eLife* 4, e09591.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J.* 17, 170.
- Bologna, N.G., Mateos, J.L., Bresso, E.G., and Palatnik, J.F. (2009). A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J.* 28, 3646–3656.
- Borg, M., Brownfield, L., Khatab, H., Sidorova, A., Lingaya, M., and Twell, D. (2011). The R2R3 MYB Transcription Factor DUO1 Activates a Male Germline-Specific Regulon Essential for Sperm Cell Differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 534–549.
- Borg, M., Rutley, N., Kagale, S., Hamamura, Y., Gherghinoiu, M., Kumar, S., Sari, U., Esparza-Franco, M.A., Sakamoto, W., Rozwadowski, K., et al. (2014). An EAR-Dependent Regulatory Module Promotes Male Germ Cell Division and Sperm Fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 2098–2113.
- Borges, F., Gomes, G., Gardner, R., Moreno, N., McCormick, S., Feijó, J.A., and Becker, J.D. (2008). Comparative Transcriptomics of *Arabidopsis* Sperm Cells. *Plant Physiol.* 148, 1168–1181.
- 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.
- Bouché, N., Laressergues, D., Gascioli, V., and Vaucheret, H. (2006). An antagonistic function for *Arabidopsis* DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J.* 25, 3347–3356.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., and Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185–1190.
- Brosnan, C.A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N.A., Waterhouse, P.M., and Carroll, B.J. (2007). Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14741–14746.
- 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. Cell Mol. Biol.* 53, 739–749.

- Calarco, J.P., Borges, F., Donoghue, M.T.A., Van Ex, F., Jullien, P.E., Lopes, T., Gardner, R., Berger, F., Feijó, J.A., Becker, J.D., et al. (2012). Reprogramming of DNA Methylation in Pollen Guides Epigenetic Inheritance via Small RNA. *Cell* *151*, 194–205.
- Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2002). Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* *CB 12*, 1138–1144.
- Cao, M., Du, P., Wang, X., Yu, Y.-Q., Qiu, Y.-H., Li, W., Gal-On, A., Zhou, C., Li, Y., and Ding, S.-W. (2014). Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 14613–14618.
- Cao, X., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Phillips, R.L., Kaeppler, S., and Jacobsen, S.E. (2000). Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 4979–4984.
- Carlsbecker, A., Lee, J.-Y., Roberts, C.J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Lindgren, O., Moreno-Risueno, M.A., Vatén, A., Thitamadee, S., et al. (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* *465*, 316–321.
- Castel, S., and Martienssen, R. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 100–112.
- Castellano, M., Martinez, G., Marques, M.C., Moreno-Romero, J., Köhler, C., Pallas, V., and Gomez, G. (2016). Changes in the DNA methylation pattern of the host male gametophyte of viroid-infected cucumber plants. *J. Exp. Bot.* *67*, 5857–5868.
- Creasey KM, Borges F, Van Ex F, Regulski M, Martienssen RA, Zhai J and Meyers BC (2014) MiRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in Arabidopsis. *Nature* *508(7496)*: 411–415.
- Curaba, J., and Chen, X. (2008). Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *J. Biol. Chem.* *283*, 3059–3066.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* *101*, 543–553.
- Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., Winden, J. van der, Naumann, U., Matzke, A.J.M., and Matzke, M. (2009). A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *EMBO J.* *28*, 48–57.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., and Voinnet, O. (2006). Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-like Proteins in Antiviral Defense. *Science* *68*.
- Devers, E.A., Branscheid, A., May, P., and Krajinski, F. (2011). Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA\*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* *156*, 1990–2010.
- Devert, A., Fabre, N., Floris, M., Canard, B., Robaglia, C., and Crété, P. (2015). Primer-Dependent and Primer-Independent Initiation of Double Stranded RNA Synthesis by Purified Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerases RDR2 and RDR6. *PLOS ONE* *10*, e0120100.
- Dresselhaus, T., and Franklin-Tong, N. (2013). Male-female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization. *Mol. Plant* *6*, 1018–1036.
- Duan, C.-G., Zhang, H., Tang, K., Zhu, X., Qian, W., Hou, Y.-J., Wang, B., Lang, Z., Zhao, Y., Wang, X., et al. (2015). Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO4 and AGO6 in RNA-directed DNA methylation. *EMBO J.* *34*, 581–592.
- Dukowic-Schulze S, Sundararajan A, Ramaraj T, Kianian S, Pawlowski WP, Mudge J and Chen C (2016) Novel Meiotic miRNAs and Indications for a Role of PhasiRNAs in Meiosis. *Frontiers in Plant Science* *7*.
- Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Wang, M.-B., and Waterhouse, P.M. (2009). The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA* *15*, 2219–2235.

- Ebhardt, H.A., Fedynak, A., and Fahlman, R.P. (2010). Naturally occurring variations in sequence length creates microRNA isoforms that differ in argonaute effector complex specificity. *Silence* 1, 12.
- 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. CB* 16, 939–944.
- Fan, Y., Yang, J., Mathioni, S.M., Yu, J., Shen, J., Yang, X., Wang, L., Zhang, Q., Cai, Z., Xu, C., et al. (2016). PMS1T, producing phased small-interfering RNAs, regulates photoperiod-sensitive male sterility in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 15144–15149.
- Fang, Y., and Spector, D.L. (2007). Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living Arabidopsis Plants. *Curr. Biol. CB* 17, 818–823.
- Fátyol, K., Ludman, M., and Burgyán, J. (2016). Functional dissection of a plant Argonaute. *Nucleic Acids Res.* 44, 1384–1397.
- Fei, Q., Yang, L., Liang, W., Zhang, D., and Meyers, B.C. (2016). Dynamic changes of small RNAs in rice spikelet development reveal specialized reproductive phasiRNA pathways. *J. Exp. Bot.* 67, 6037–6049.
- de Felippes, F.F., Ott, F., and Weigel, D. (2011). Comparative analysis of non-autonomous effects of tasiRNAs and miRNAs in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.* 39, 2880–2889.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J., and Carrington, J.C. (2010). Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerases and Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense and Small Interfering RNA Biogenesis during Turnip Mosaic Virus Infection. *Plant Cell* 481.
- Gascioli, V., Vaucheret, H., Mallory, A. c., and Bartel, D. p. (2005). Partially redundant functions of arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-Acting siRNAs. *Curr. Biol.* 15, 1494–1500.
- Grant-Downton, R., Le Trionnaire, G., Schmid, R., Rodriguez-Enriquez, J., Hafidh, S., Mehdi, S., Twell, D., and Dickinson, H. (2009a). MicroRNA and tasiRNA diversity in mature pollen of Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics* 10, 643.
- Grant-Downton, R., Hafidh, S., Twell, D., and Dickinson, H.G. (2009b). Small RNA Pathways Are Present and Functional in the Angiosperm Male Gametophyte. *Mol. Plant* 2, 500–512.
- Greenberg, M.V.C., Deleris, A., Hale, C.J., Liu, A., Feng, S., and Jacobsen, S.E. (2013). Interplay between Active Chromatin Marks and RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis thaliana. *PLOS Genet.* 9, e1003946.
- 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.
- Haag, J.R., Ream, T.S., Marasco, M., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Pasa-Tolic, L., and Pikaard, C.S. (2012). In vitro transcription activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 reveal coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA synthesis in plant RNA silencing. *Mol. Cell* 48, 811–818.
- Hafidh, S., Fíla, J., and Honys, D. (2016). Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reprod.* 29, 31–51.
- Ham, B.-K., Li, G., Jia, W., Leary, J.A., and Lucas, W.J. (2014). Systemic delivery of siRNA in pumpkin by a plant PHLOEM SMALL RNA-BINDING PROTEIN 1-ribonucleoprotein complex. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 80, 683–694.
- Hamamura, Y., Nagahara, S., and Higashiyama, T. (2012). Double fertilization on the move. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 70–77.
- Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952.
- Harvey, J.J.W., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J.P., and Baulcombe, D.C. (2011). An Antiviral Defense Role of AGO2 in Plants. *PLoS ONE* 6.



- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H., and Baulcombe, D.C. (2010). The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22, 321–334.
- He, H., Yang, T., Wu, W., and Zheng, B. (2015). Small RNAs in pollen. *Sci. China Life Sci.* 58, 246–252.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.-L., Wang, C.-S., Jin, H., and Zhu, J.-K. (2009). An effector of RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* 137, 498–508.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., and Jacobsen, S.E. (2006). Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.* 38, 721–725.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., and Baulcombe, D.C. (2005). RNA Polymerase IV Directs Silencing of Endogenous DNA. *Science* 118.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., and Voinnet, O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* 22, 4523–4533.
- Hofmeister, W.F.B. (1851). Vergleichende Untersuchungen der Keimung, Entfaltung und Fruchtbildung höherer Kryptogamen (Moose, Farn, Equisetaceen, Rhizocarpeen und Lycopodiaceen) und der Samenbildung der Coniferen. (Leipzig,: F. Hofmeister,).
- Hsieh, T.-F., Ibarra, C.A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R.L., and Zilberman, D. (2009). Genome-Wide Demethylation of Arabidopsis Endosperm. *Science* 324, 1451–1454.
- 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. U. S. A.* 103, 14302–14306.
- Huijser, P., and Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development* 138, 4117–4129.
- Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056–2060.
- Chambers, C., and Shuai, B. (2009). Profiling microRNA expression in Arabidopsis pollen using microRNA array and real-time PCR. *BMC Plant Biol.* 9, 87.
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 303, 2022–2025.
- Chen, X. (2009). Small RNAs and Their Roles in Plant Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 21–44.
- Chen, Z.-H., Bao, M.-L., Sun, Y.-Z., Yang, Y.-J., Xu, X.-H., Wang, J.-H., Han, N., Bian, H.-W., and Zhu, M.-Y. (2011). Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein1 is involved in normal development in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 77, 619–629.
- 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.
- Chorostecki, U., Crosa, V.A., Lodeyro, A.F., Bologna, N.G., Martin, A.P., Carrillo, N., Schommer, C., and Palatnik, J.F. (2012). Identification of new microRNA-regulated genes by conserved targeting in plant species. *Nucleic Acids Res.* 40, 8893–8904.
- Ibarra, C.A., Feng, X., Schoft, V.K., Hsieh, T.-F., Uzawa, R., Rodrigues, J.A., Zemach, A., Chumak, N., Machlicova, A., Nishimura, T., et al. (2012). Active DNA Demethylation in Plant Companion Cells Reinforces Transposon Methylation in Gametes. *Science* 337, 1360–1364.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhashi, I., Meshi, T., and Ishikawa, M. (2010). In Vitro Assembly of Plant RNA-Induced Silencing Complexes Facilitated by Molecular Chaperone HSP90. *Mol. Cell* 39, 282–291.
- Iwakawa, H., and Tomari, Y. (2013). Molecular Insights into microRNA-Mediated Translational Repression in Plants. *Mol. Cell* 52, 591–601.

- Jin, H., Vacic, V., Girke, T., Lonardi, S., and Zhu, J.-K. (2008). Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in Arabidopsis. *BMC Mol. Biol.* 9, 6.
- Johnson, C., Kasprzewska, A., Tennessen, K., Fernandes, J., Nan, G.-L., Walbot, V., Sundaresan, V., Vance, V., and Bowman, L.H. (2009). Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Res.* 19, 1429–1440.
- Jones-Rhoades, M.W. (2012). Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Mol. Biol.* 80, 3–16.
- Juarez, M.T., Kui, J.S., Thomas, J., Heller, B.A., and Timmermans, M.C.P. (2004). microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* 428, 84–88.
- Kanno, T., Huettel, B., Mette, M.F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D.P., Matzke, M., and Matzke, A.J.M. (2005). Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat. Genet.* 37, 761–765.
- 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.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.-K., Staskawicz, B.J., and Jin, H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18002–18007.
- Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A., and Jin, H. (2007). A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* 21, 3123–3134.
- Khan, M.R.G., Ai, X.-Y., and Zhang, J.-Z. (2014). Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, 347–359.
- Khraiwesh, B., Arif, M.A., Seumel, G.I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R., and Frank, W. (2010). Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 140, 111–122.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216.
- Kim, W., Ahn, H.J., Chiou, T.-J., and Ahn, J.H. (2011). The role of the miR399-PHO2 module in the regulation of flowering time in response to different ambient temperatures in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cells* 32, 83–88.
- Komiya, R., Ohyanagi, H., Niihama, M., Watanabe, T., Nakano, M., Kurata, N., and Nonomura, K.-I. (2014). Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *Plant J.* 78, 385–397.
- Kurihara, Y., and Watanabe, Y. (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12753–12758.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.
- Lewis, B.P., Shih, I.-hun., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 115, 787–798.
- Lewsey, M.G., Hardcastle, T.J., Melnyk, C.W., Molnar, A., Valli, A., Urich, M.A., Nery, J.R., Baulcombe, D.C., and Ecker, J.R. (2016). Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E801–E810.
- Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W.-L., Lagrange, T., Pikaard, C.S., and Jacobsen, S.E. (2006). An ARGONAUTE4-Containing Nuclear Processing Center Colocalized with Cajal Bodies in Arabidopsis thaliana. *Cell* 126, 93–106.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., and Chen, X. (2005). Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 15, 1501–1507.

- Li, J., Reichel, M., and Millar, A.A. (2014a). Determinants beyond Both Complementarity and Cleavage Govern MicroR159 Efficacy in Arabidopsis. *PLOS Genet.* *10*, e1004232.
- Li, J., Reichel, M., Li, Y., and Millar, A.A. (2014b). The functional scope of plant microRNA-mediated silencing. *Trends Plant Sci.* *19*, 750–756.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X., Mo, B., et al. (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell* *153*, 562–574.
- Li, X., Shahid, M.Q., Xia, J., Lu, Z., Fang, N., Wang, L., Wu, J., Chen, Z., and Liu, X. (2017). Analysis of small RNAs revealed differential expressions during pollen and embryo sac development in autotetraploid rice. *BMC Genomics* *18*, 129.
- Liu, Q., Wang, F., and Axtell, M.J. (2014). Analysis of complementarity requirements for plant microRNA targeting using a *Nicotiana benthamiana* quantitative transient assay. *Plant Cell* *26*, 741–753.
- 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.
- Ma, Z., Jiang, J., Hu, Z., Lyu, T., Yang, Y., Jiang, J., and Cao, J. (2017). Over-expression of miR158 causes pollen abortion in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Plant Mol. Biol.* *93*, 313–326.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J.* *23*, 3356–3364.
- 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.
- McCue, A.D., Cresti, M., Feijó, J.A., and Slotkin, R.K. (2011). Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *J. Exp. Bot.* *62*, 1621–1631.
- McCue, A.D., Panda, K., Nuthikattu, S., Choudury, S. g., Thomas, E. n., and Slotkin, R. k. (2015). ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *EMBO J.* *34*, 20–35.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., and Matzke, A.J.M. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* *19*, 5194–5201.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., et al. (2008). Article: Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell* *133*, 116–127.
- Molnar, 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.
- 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). Article: Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell* *133*, 128–141.
- Morel, J.-B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., and Vaucheret, H. (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* *14*, 629–639.
- Mouradov, A., Cremer, F., and Coupland, G. (2002). Control of Flowering Time. *Plant Cell* *14*, s111–s130.
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., et al. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* *101*, 533–542.
- Mukherjee, K., Kolaczowski, B., and Campos, H. (2013). Evolution of animal and plant dicers: Early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. *Mol. Biol. Evol.* *30*, 627–641.

- Nagano, H., Fukudome, A., Hiraguri, A., Moriyama, H., and Fukuhara, T. (2014). Distinct substrate specificities of Arabidopsis DCL3 and DCL4. *Nucleic Acids Res.* *42*, 1845–1856.
- 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*, 79.
- Nonomura, K.-I., Morohoshi, A., Nakano, M., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H., and Kurata, N. (2007). A Germ Cell-Specific Gene of the ARGONAUTE Family Is Essential for the Progression of Premeiotic Mitosis and Meiosis during Sporogenesis in Rice. *Plant Cell* *19*, 2583–2594.
- Olmedo-Monfil, V., Durán-Figueroa, N., Arteaga-Vázquez, M., Demesa-Arévalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., Slotkin, R.K., Martienssen, R.A., and Vielle-Calzada, J.-P. (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature* *464*, 628–632.
- 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.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C., and Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* *425*, 257–263.
- Palatnik, J.F., Wollmann, H., Schommer, C., Schwab, R., Boisbouvier, J., Rodriguez, R., Warthmann, N., Allen, E., Dezulian, T., Huson, D., et al. (2007). Sequence and expression differences underlie functional specialization of Arabidopsis microRNAs miR159 and miR319. *Dev. Cell* *13*, 115–125.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., and Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* *16*, 4738–4745.
- Panda, K., and Slotkin, R.K. (2013). Proposed mechanism for the initiation of transposable element silencing by the RDR6-directed DNA methylation pathway. *Plant Signal. Behav.* *8*.
- Panda, K., Ji, L., Neumann, D.A., Daron, J., Schmitz, R.J., and Slotkin, R.K. (2016). Full-length autonomous transposable elements are preferentially targeted by expression-dependent forms of RNA-directed DNA methylation. *Genome Biol.* *17*, 170.
- Parent, J.-S., Bouteiller, N., Elmayan, T., and Vaucheret, H. (2015). Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing. *Plant J.* *81*, 223–232.
- Park, K., Kim, M.Y., Vickers, M., Park, J.-S., Hyun, Y., Okamoto, T., Zilberman, D., Fischer, R.L., Feng, X., Choi, Y., et al. (2016). DNA demethylation is initiated in the central cells of Arabidopsis and rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 15138–15143.
- Pélissier, T., Thalmeir, S., Kempe, D., Sängler, H.L., and Wassenegger, M. (1999). Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* *27*, 1625–1634.
- 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.
- Pontier, D., Picart, C., Roudier, F., Garcia, D., Lahmy, S., Azevedo, J., Alart, E., Laudié, M., Karlowski, W.M., Cooke, R., et al. (2012). NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in Arabidopsis. *Mol. Cell* *48*, 121–132.
- Pyott, D.E., and Molnar, A. (2015). Going mobile: non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants. *Plant Biotechnol. J.* *13*, 306–318.
- Qin, J., Ma, X., Yi, Z., Tang, Z., and Meng, Y. (2015). Intronic regions of plant genes potentially encode RDR (RNA-dependent RNA polymerase)-dependent small RNAs. *J. Exp. Bot.* *66*, 1763–1768.
- Qu, F., Ye, X., and Morris, T.J. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14732–14737.
- Ramachandran, V., and Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* *321*, 1490–1492.

- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* *123*, 621–629.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* *16*, 1616–1626.
- Ren, G., Chen, X., and Yu, B. (2012). Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in Arabidopsis. *Curr. Biol.*
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* *110*, 513–520.
- Ron, M., Saez, M.A., Williams, L.E., Fletcher, J.C., and McCormick, S. (2010). Proper regulation of a sperm-specific cis-nat-siRNA is essential for double fertilization in Arabidopsis. *Genes Dev.* *24*, 1010–1021.
- Rotman, N., Durbarry, A., Wardle, A., Yang, W.C., Chaboud, A., Faure, J.-E., Berger, F., and Twell, D. (2005). A Novel Class of MYB Factors Controls Sperm-Cell Formation in Plants. *Curr. Biol.* *15*, 244–248.
- Ru, P., Xu, L., Ma, H., and Huang, H. (2006). Plant fertility defects induced by the enhanced expression of microRNA167. *Cell Res.* *16*, 457–465.
- Rubio-Somoza, I., and Weigel, D. (2013). Coordination of Flower Maturation by a Regulatory Circuit of Three MicroRNAs. *PLOS Genet.* *9*, e1003374.
- Schauer, S., Jacobsen, S., Meinke, D., and Ray, A. (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *TRENDS PLANT Sci.* *7*, 487–491.
- Schoft, V.K., Chumak, N., Choi, Y., Hannon, M., Garcia-Aguilar, M., Machlicova, A., Slusarz, L., Mosiolek, M., Park, J.-S., Park, G.T., et al. (2011). Function of the DEMETER DNA glycosylase in the Arabidopsis thaliana male gametophyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 8042–8047.
- Schommer, C., Palatnik, J.F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E.E., Nath, U., and Weigel, D. (2008). Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets. *PLOS Biol.* *6*, e230.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., and Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev. Cell* *8*, 517–527.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199–208.
- Sen, G.L., and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 633–636.
- Si-Ammour, A., Windels, D., Arn-Boulidoires, E., Kutter, C., Ailhas, J., Meins, F., and Vazquez, F. (2011). miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the TIR1/AFB2 auxin receptor clade and auxin-related development of Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.* *157*, 683–691.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* *107*, 465–476.
- Singh, R.K., Gase, K., Baldwin, I.T., and Pandey, S.P. (2015). Molecular evolution and diversification of the Argonaute family of proteins in plants. *BMC Plant Biol.* *15*, 23–23.
- 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.
- Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 1026–1032.
- Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science* *305*, 1434–1437.
- Su, Z., Zhao, L., Zhao, Y., Li, S., Won, S., Cai, H., Wang, L., Li, Z., Chen, P., Qin, Y., et al. (2017). The THO Complex Non-Cell-Autonomously Represses Female Germline Specification through the TAS3-ARF3 Module. *Curr. Biol.* *27*, 1597–1609.e2.

- Teotia, S., and Tang, G. (2015). To bloom or not to bloom: role of microRNAs in plant flowering. *Mol. Plant* 8, 359–377.
- Tu, B., Liu, L., Xu, C., Zhai, J., Li, S., Lopez, M., Zhao, Y., Yu, Y., Ramachandran, V., Ren, G., et al. (2015). Distinct and Cooperative Activities of HESO1 and URT1 Nucleotidyl Transferases in MicroRNA Turnover in Arabidopsis. *PLOS Genet.* 11.
- Tucker, M., Okada, T., Hu, Y., Scholefield, A., Taylor, J., and Koltunow, A. (2012). Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in Arabidopsis. *DEVELOPMENT* 139, 1399–1404.
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.*
- Wang, F., and Axtell, M.J. (2017). AGO4 is specifically required for heterochromatic siRNA accumulation at Pol V-dependent loci in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 90, 37–47.
- Wang, H., Chua, N.-H., and Wang, X.-J. (2006). Prediction of trans-antisense transcripts in Arabidopsis thaliana. *Genome Biol.* 7, R92.
- Wang, J.-W., Czech, B., and Weigel, D. (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. *Cell* 138, 738–749.
- Wang, M.-B., Helliwell, C.A., Wu, L.-M., Waterhouse, P.M., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (2008). Hairpin RNAs derived from RNA polymerase II and polymerase III promoter-directed transgenes are processed differently in plants. *RNA* 14, 903–913.
- Wang, X., Zhang, S., Dou, Y., Zhang, C., Chen, X., Yu, B., and Ren, G. (2015). Synergistic and independent actions of multiple terminal nucleotidyl transferases in the 3' tailing of small RNAs in Arabidopsis. *Plos Genet.* 11, e1005091–e1005091.
- Wang, X.-B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.-X., Chen, X., Yu, J.-L., and Ding, S.-W. (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 484–489.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., and Sanger, H.L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76, 567–576.
- Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, C.I., Rendtlew Danielsen, J.M., Yang, Y.-G., and Qi, Y. (2012). A Role for Small RNAs in DNA Double-Strand Break Repair. *Cell* 149, 101–112.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2008). Noncoding transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* 135, 635–648.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.* 41, 630–634.
- Willmann, M.R., Endres, M.W., Cook, R.T., and Gregory, B.D. (2011). The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* 9.
- Wollmann, H., Mica, E., Todesco, M., Long, J.A., and Weigel, D. (2010). On reconciling the interactions between APETALA2, miR172 and AGAMOUS with the ABC model of flower development. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3633–3642.
- Wu, G., and Poethig, R.S. (2006). Temporal Regulation of Shoot Development in Arabidopsis Thaliana By Mir156 and Its Target SPL3. *Dev. Camb. Engl.* 133, 3539–3547.
- Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.-W., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. *Cell* 138, 750–759.
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C., and Qi, Y. (2010). DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol. Cell* 38, 465–475.
- Wu, L., Liu, D., Wu, J., Zhang, R., Qin, Z., Liu, D., Li, A., Fu, D., Zhai, W., and Mao, L. (2013). Regulation of FLOWERING LOCUS T by a MicroRNA in Brachypodium distachyon[C][W]. *Plant Cell* 25, 4363–4377.
- Wu, M.-F., Tian, Q., and Reed, J.W. (2006). Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Dev. Camb. Engl.* 133, 4211–4218.

- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Leilis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C. (2004). Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. *PLoS Biol.* *2*, 642–652.
- Xu, M.Y., Zhang, L., Li, W.W., Hu, X.L., Wang, M.-B., Fan, Y.L., Zhang, C.Y., and Wang, L. (2014). Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* *65*, 89–101.
- Yadegari, R., and Drews, G.N. (2004). Female Gametophyte Development. *Plant Cell Online* *16*, S133–S141.
- Yang, L., Wu, Y., Wang, W., Mao, B., Zhao, B., and Wang, J. (2017). Genetic Subtraction Profiling Identifies Candidate miRNAs Involved in Rice Female Gametophyte Abortion. G3 Bethesda Md.
- Yoo, B.-C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., and Lucas, W.J. (2004). A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. *Plant Cell* *16*, 1979–2000.
- 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.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* *307*, 932–935.
- Yu, Y., Ji, L., Le, B.H., Zhai, J., Chen, J., Luscher, E., Gao, L., Liu, C., Cao, X., Mo, B., et al. (2017). ARGONAUTE10 promotes the degradation of miR165/6 through the SDN1 and SDN2 exonucleases in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* *15*, e2001272.
- Zhai, J., Zhao, Y., Simon, S.A., Huang, S., Petsch, K., Arikiti, S., Pillay, M., Ji, L., Xie, M., Cao, X., et al. (2013). Plant MicroRNAs Display Differential 3' Truncation and Tailing Modifications That Are ARGONAUTE1 Dependent and Conserved Across Species. *Plant Cell* *25*, 2417–2428.
- Zhai, J., Zhang, H., Arikiti, S., Huang, K., Nan, G.-L., Walbot, V., and Meyers, B.C. (2015). Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phasiRNAs in maize anthers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 3146–3151.
- Zhang, T., Wang, J., and Zhou, C. (2015). The role of miR156 in developmental transitions in *Nicotiana tabacum*. *Sci. China Life Sci.* *58*, 253–260.
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Xia, J., Chellappan, P., Zhou, X., Zhang, X., and Jin, H. (2010). Multiple distinct small RNAs originate from the same microRNA precursors. *Genome Biol.* *11*, R81.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W.-L., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., et al. (2006). Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Cell* *126*, 1189–1201.
- Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W.-C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H.-D., Raikhel, N., and Jin, H. (2011). *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393(\*)-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Mol. Cell* *42*, 356–366.
- Zhang, Z., Liu, X., Guo, X., Wang, X.-J., and Zhang, X. (2016). *Arabidopsis* AGO3 predominantly recruits 24-nt small RNAs to regulate epigenetic silencing. *Nat. Plants* *2*, 16049.
- Zhao, Y., Yu, Y., Zhai, J., Ramachandran, V., Dinh, T.T., Meyers, B.C., Mo, B., and Chen, X. (2012). The *Arabidopsis* nucleotidyl transferase HESO1 uridylates unmethylated small RNAs to trigger their degradation. *Curr. Biol. CB* *22*, 689–694.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., and Zhu, J.-K. (2007). Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J.* *26*, 1691–1701.
- Zheng, Y., Wang, Y., Wu, J., Ding, B., and Fei, Z. (2015). A dynamic evolutionary and functional landscape of plant phased small interfering RNAs. *BMC Biol.* *13*, 32.
- 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.

- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S.-H., Liou, L.W., Barefoot, A., Dickman, M., and Zhang, X. (2011). Arabidopsis Argonaute10 Specifically Sequesters miR166/165 to Regulate Shoot Apical Meristem Development. *Cell*.
- Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2003). ARGONAUTE4 Control of Locus-Specific siRNA Accumulation and DNA and Histone Methylation. *Science* 716.
- Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C., and Jacobsen, S.E. (2004). Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-Directed DNA Methylation Triggered by Inverted Repeats. *Curr. Biol.* 14, 1214–1220.
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., and Ma, H. (2009). Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene* 447, 29–39.