

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00829

植物非编码 RNA 调控春化作用的表观遗传

张绍峰, 李晓荣, 孙传宝, 何玉科

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032

摘要: 在自然界中许多高等植物需要通过冬季的低温阶段实现从营养生长到生殖生长的时期转化, 这一生物学过程称作春化作用。小麦(*Triticum aestivum* L.)和油菜(*Brassica napus* L.)等作物以种子为产品器官, 生产上往往通过茬口安排和栽培措施使植株尽早通过春化作用, 以促进花芽形成和花器官发育, 而大白菜 (*B. rapa* ssp. *pekinensis*)和甘蓝(*B. oleracea*)等作物以叶球等营养器官作为产品器官, 生产上则设法避免低温引起的春化作用, 以保证产品器官的充分生长。FLOWERING LOCUS C(FLC)作为一种重要的开花抑制蛋白负调控春化作用, 参与植株从营养生长到生殖生长的转化过程。文章综述了春化中FLC表达受抑制主要通过低温诱导表达FLC基因区域的非编码RNA以及VRN1、VRN2、VIN3 等蛋白参与介导组蛋白甲基化, 从而在表观遗传上控制春化作用的进程和产品器官的正常发育。

关键词: FLC; 表观遗传; 春化作用; 非编码 RNA; 天然反向转录本

Epigenetics of plant vernalization regulated by non-coding RNAs

ZHANG Shao-Feng, LI Xiao-Rong, SUN Chuan-Bao, HE Yu-Ke

State Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Shanghai Institute of Plant Physiology & Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: Many higher plants must experience a period of winter cold to accomplish the transition from vegetative to reproductive growth. This biological process is called vernalization. Some crops such as wheat (*Triticum aestivum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) produce seeds as edible organs, and therefore special measures of rotation and cultivation are necessary for plants to go through an early vernalization for flower differentiation and development, whereas the other crops such as Chinese cabbage (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) and cabbage (*Brassica napus* L.) produce leafy heads as edible organs, and additional practice should be taken to avoid vernalization for a prolonged and fully vegetative growth. Before vernalization, flowering is repressed by the action of a gene called *Flowering Locus C* (FLC). This paper reviewed the function of non-coding RNAs and some proteins including VRN1, VRN2, and VIN3 in epigenetic regulation of FLC during vernalization.

Keywords: FLC; epigenetics; vernalization; non-coding RNA; natural antisense transcripts

收稿日期: 2011-12-13; 修回日期: 2012-02-02

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(编号: 30730053)和上海市科委基础重点项目(编号, 09JC1416000)资助

作者简介: 张绍峰, 博士, 专业方向: 植物分子遗传学。E-mail: shfzhang@sibs.ac.cn

通讯作者: 何玉科, 博士, 研究员, 研究方向: 植物发育生物学。E-mail: ykhe@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2012-5-22 02:42:27

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120522.1442.002.html>

在自然界中许多高等植物需要通过冬季的低温阶段实现从营养生长到生殖生长的时期转化,这一生物学过程称作春化作用。小麦(*Triticum aestivum* L.)和油菜(*Brassica napus* L.)等作物以种子为产品器官,生产上往往通过茬口安排和栽培措施使植株尽早通过春化作用,以促进花芽形成和花器官发育。而大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)和甘蓝(*Brassica oleracea*)等作物以叶球等营养器官作为产品器官,生产上则设法避免低温引起的春化作用,以保证产品器官的充分生长。在叶球等食用器官未成熟时就抽薹开花的现象叫未熟抽薹。这种现象在大白菜和甘蓝生产上相当普遍,所造成的产品的产量和质量损失也相当可观。

植物抽薹标志由营养生长时期转换到生殖生长时期,调控这一进程的基因表达是多层次的,依赖于内部转录因子以及外部环境条件相互作用等。近年来的研究表明,植物体内存在一种复杂的基因表达网络,在春化作用的时期、强度和效果等方面起重要的精细调控作用^[1,2]。

1 开花抑制因子 FLC 在春化过程中的调控作用

二年生草本植物需要经历一个冬天才能开花,春化的低温感受位点是叶片和茎端生长点。在植物中, FLOWERING LOCUS C (FLC) 作为一种重要的开花抑制蛋白负调控春化作用,参与植株从营养生长向生殖生长的转化过程。FLC 编码 MADS 盒转录因子,含有 7 个外显子和 6 个内含子,它通过抑制 FT (FLOWERING LOCUS T) 和 SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1) 的表达实现了对植物开花时间的控制^[3-8]。物种对春化的敏感程度取决于 FLC 的表达量: FLC 越高,越难以通过春化,反之亦然。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 生态型 Columbia 自身 FLC 表达较弱,所以不经过春化也可以开花,但在一些开花时间推迟的突变体中发现 FLC 表达会上调。在油菜、大白菜和甘蓝等芸薹属作物中, FLC 有 4 个同源基因^[4,6-8],在拟南芥中过量表达其中的 3 个基因都会延迟植株的开花时间^[7,8]。

FLC 在春化中受到表观遗传负调控,低温可以打乱原有的 FLC 组蛋白甲基化水平,去除激活型组蛋白的修饰(乙酰化和 H3K4me3),添加抑制型组蛋

白的修饰(H3K9me3, H3K27me3)^[9],从而改变 FLC 染色质活性状态,以表观遗传调控方式抑制 FLC 表达,进而解除下游开花基因的抑制作用来实现开花的快速转变^[3-8]。VIN3 (VERNALIZATION INSENSITIVE 3) 只在拟南芥春化过程中表达,它结合 FLC 的启动子和第一个内含子区域,导致在春化中,该区域的组蛋白去乙酰化^[8]。组蛋白的 H3K4me3 去甲基化由 FLD (FLOWERING LOCUS D) 催化的^[5]。VRN2 (VERNALISATION2) 和 LHP1 (LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1) 分别通过调节 H3K27me3 和 H3K9me3 甲基化来维持 FLC 的抑制状态^[10]。非编码 RNA 同样会参与到 FLC 在春化中的表观遗传学抑制,其中就包括 FLC 的反向转录本、内含子上的非编码 RNA 以及反向转录本启动子区域的短 RNA^[11-13]。

组蛋白的修饰(H3 甲基化)是 FLC 表观遗传调控的另一方面。在动物中的研究结果表明:如果启动子区域含 H3K4me3 (Trithorax-group 蛋白与 H3K4me3 结合),则基因是表达的;如果含 H3K27me3 (Polycomb-group 蛋白与 H3K27me3 结合),则通常不表达。拟南芥中也有类似的发现,即 Trithorax group 和 PcG 蛋白结合染色质,然后催化 H3K4me3 和 H3K27me3 甲基化修饰来调控 FLC 的表达。但 Trithorax-group 和 Polycomb-group 蛋白如何结合染色质,并介导 H3 的甲基化的机理并不清楚^[14,15]。已经知道,在拟南芥的抽薹过程中, FLC 受到表观遗传调控,这种调控主要涉及启动子区域组蛋白甲基化的改变。低温春化之前 FLC 组蛋白 H3 的 ly4、ly36、ly79 甲基化和 ly9、ly14 乙酰化, FLC 处于活性的表达状态,在低温春化过程中 FLC 组蛋白 H3 的 ly4 去甲基化和组蛋白的 ly9、ly14 去乙酰化,与此同时组蛋白 H3 也富含 ly9、ly27 甲基化, FLC 处于被抑制状态。

2 非编码 RNA 对春化过程的调控作用

在植物感受到春化信号之后是如何靶向地识别 FLC 基因,沉积抑制型组蛋白甲基化标记的?随着研究的不断深入,拟南芥 FLC 基因上非编码 RNA COOLAIR (Cold induced long antisense intragenic RNA) 和 COLDAIR (Cold assisted intronic noncoding RNA) 进入了人们的视野,成为了诠释 FLC 响应春化反应进行染色质表观遗传学修饰的候选因子^[11,12]。

COOLAIR 是植物体内天然存在的 FLC 反向转

录本, 人们将这种与自身mRNA片段反向互补的天然反义RNA称为NATs(Natural antisense transcripts), 对其功能的研究揭示了NATs可与靶基因RNA序列反向互补, 以转录后调控的方式干扰编码和非编码基因的表达和功能^[16-18]。同时, 由它产生的RNA干扰作用是植物抗逆基因沉默或低水平表达的一个重要原因。除此之外, NATs参与RNA编辑、内含子不规则剪切、DNA和组蛋白甲基化和基因组印记(Genome imprinting)等生物化学过程和遗传现象^[19,20]。更为有趣的是, 这种双链RNA在DCL1(DICER-LIKE 1)和HYL1(HYPONASTIC LEAVES 1)等双链RNA结合蛋白的作用下可产生nat-siRNA。nat-siRNA与其NATs完全互补, 可降解NATs, 也可以通过不完全互补对其他基因实现转录后调节^[21]。NATs和nat-siRNA对植物生长发育和作物农艺性状的调控作用是RNA干扰研究领域的一个热点问题。在理论上, 这种正义和反义RNA之间的关系是一种反馈调节关系, 它有助于NATs和靶基因之间在表达和沉默水平上的相对平衡, 也是植物抵御外来基因的屏障。要定向地过量表达抗逆相关基因, 就必须打破植物体内NATs和靶基因之间的平衡, 消除植物对外来目标基因的屏障。在这里, NATs作为目标基因沉默的调控序列, 对于植物内源或外源基因时空表达有重要的控制能力。

拟南芥COOLAIR是具有典型的5'帽子和3'POLY A结构的非编码RNA, 由POL II转录。在春化过程中, 位于*FLC* 3'端下游的启动子起始了反向转录本COOLAIR的表达^[11]。根据剪切方式的不同, COOLAIR又分为近端和远端两种类型(图1)。其中, COOLAIR的远端外显子延伸至正向转录本的第一个外显子和启动子区域。其表达丰度在春化后迅速积累, 在表达水平达到一个高峰时, *FLC*的表达开始降低。Liu等^[22]通过筛选抑制子突变体, 得到了2个与3'端加工相关的突变体*CstF77*和*CstF64*, 在这两个突变体中*FLC*正向转录本的3'端加工是没有受到影响的。进一步的证据表明, *CstF*(Cleavage stimulatory Factor)77和*CstF64*通过与特异的RNA结合蛋白结合并锚定到近端COOLAIR的POLY A位点, 这种靶向的加工导致了该位点处组蛋白激活型甲基标记的清除, 从而引发了*FLC*正向转录本的转录沉默, 继而改变植株的抽苔时间。

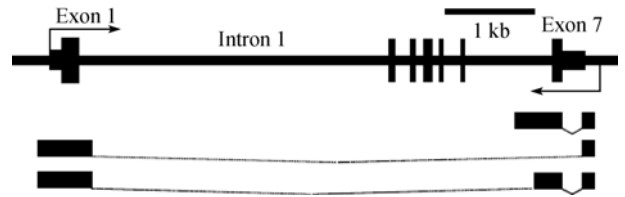


图1 *FLC* 基因结构及其天然反义转录本 COOLAIR
第1行表示*FLC*基因, 其中的黑色方框是外显子, 第2行表示*FLC*基因近端天然反义转录本COOLAIR, 其中的黑色方框是外显子, 而第3、4行表示*FLC*基因远端两个天然反义转录本COOLAIR^[11]。

另外一个非编码RNA COLDAIR是具有5'帽子结构但缺乏POLY A的非编码RNA(图2)。它是由*FLC*第一个内含子转录出来的^[12,13]。春化处理可以诱导COLDAIR表达量的增加。通过RNAi干扰手段抑制COLDAIR的表达影响了植物体对春化作用的响应。生化和遗传实验表明, COLDAIR可以结合PcG蛋白质复合体进而起始*FLC*染色质组蛋白抑制型甲基化, 因此它对于染色质抑制型甲基化的维持具有重要作用。低温春化过程发生在植株营养生长过程, 而后开花结实, 因此春化效应通过细胞有丝分裂传递, 并不传递给子代。因此, 这种表现遗传调控产生的效应可以通过有丝分裂, 在当代将*FLC*保持在被抑制状态。当其他因素适合时促进开花, 这种低温产生的效应会因减数分裂或其他有性生殖过程而消失, 在下一代中需要被重新激活。目前还不清楚为什么有丝分裂能够保持春化效应, 而减数分裂使之丧失。这种效应具体包括两个方面, 一是DNA的甲基化(胞嘧啶), 另一个是组蛋白的修饰(H3 甲基化)^[23]。

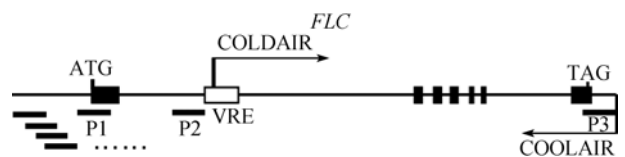


图2 从 *FLC* 基因第一个内含子中转录生产的非编码RNA COLDAIR
图中的实框表示外显子。第1和第2个外显子之间的空白方框为COLDAIR的位置^[12]。

在2007年, 有人发现在距*FLC*基因3'末端不远的地方存在两个非编码siRNA, 大小分别为24nt和30nt。由于该siRNA在花和果夹中特异高表达, 因此推测该siRNA可能参与抑制*FLC*的表达^[24,25], 但目前还不清楚该siRNA如何在表现遗传水平上调控

FLC 基因的表达。

3 春化作用的稳定性与基因表达的关系

通过研究突变体, 鉴定到抽薹过程中 *FLC* 基因上组蛋白修饰的基因, 主要包括: *VIN3*、*VRN2* 和 *VRN1*。这些基因都在 Trithorax-group 和 Polycomb-group 蛋白介导的组蛋白 H3 甲基化中起作用。拟南芥 *vrn1* 突变体中 *FLC* 不含组蛋白 H3 的 ly9 三甲基化修饰, 在低温处理后不能有效维持春化状态, 说明 *VRN1* 起维持拟南芥低温春化状态的作用。对拟南芥 *vrn1* 和 *vrn2* 突变体与野生型的研究中发现在低温春化过程中突变体和野生型 *FLC* 的表达都受抑制, 但当植株返回温暖环境后, *vrn1* 和 *vrn2* 突变体植株的 *FLC* 抑制状态被解除, 而野生型仍保持稳定的抑制状态。因此, *VRN1* 和 *VRN2* 在维持稳定春化状态的过程中起重要的作用。拟南芥还编码一种 HP1 类蛋白 LHP1, 其与 *FLC* 组蛋白 H3 的 ly9 甲基化位点连接起到稳定地维持 *FLC* 的被抑制状态 [3,5,10]。

低温春化完成后, 拟南芥 *FLC* 的抑制状态可以稳定地保持在有丝分裂过程中, 即这种抑制效应通过有丝分裂在营养生长阶段保持稳定, 直到进入生殖生长时这种效应才会被扭转。*FLC* 的表观遗传特征表明了产生细胞效应的分子机制与其他真核生物不同, 拟南芥低温春化的细胞效应被长时间的低温诱导产生。已知 *VRN1*、*VRN2*、*VIN3* 和 *LHP1* 是参与拟南芥春化效应维持的 4 个关键基因, *vrn1*、*vrn2*、*vin3* 和 *lhp1* 突变体在低温春化过程中, *FLC* 染色质特异区的乙酰化水平下降, 同时伴随组蛋白 H3 的 ly27 甲基化发生。*VIN3* 是染色质改变的决定因素, 在 *vin3* 突变体中没有发现 *FLC* 染色质组蛋白修饰的变化。在 *vrn1*、*vrn2* 和 *lhp1* 突变体春化过程中有大量的乙酰化作用, 乙酰化作用和 *FLC* 抑制在温度回暖后并不维持稳定。在 *vrn2* 突变体中 *FLC* 组蛋白没有任何甲基化修饰作用; 在 *vrn1* 突变体中, 没有组蛋白 H3 的 ly9 甲基化作用, 只有组蛋白 H3 的 ly27 甲基化, 但是组蛋白的 H3 的 ly27 的甲基化和 *FLC* 抑制在温度回暖后不维持稳定; *lhp1* 突变体中有大量乙酰化和组蛋白 H3 的 ly27、ly9 甲基化修饰, 这种甲基化修饰和 *FLC* 抑制在温度回暖后也不维持稳定。这些研究结果说明, 低温春化过程中 *FLC* 的表达抑制是通过 *VIN3* 对 *FLC* 组蛋白去乙酰化作用来实现。组蛋

白 H3 的 ly27 和 ly9 的甲基化作用进一步增强对 *FLC* 抑制作用, 组蛋白去乙酰化和 H3 的 ly27、ly9 的甲基化为 *LHP1* 与 *FLC* 染色体的连接提供结合位点。*LHP1* 与 *FLC* 染色体的连接对 *FLC* 的抑制作用在温度回暖后维持稳定状态 [3,5,10]。

4 植物春化过程中其他相关基因表达

在拟南芥中除了 *FLC* 外还存在 *MAF1* (*MADS AFFECTING FLOWERING1*)、*MAF2*、*MAF3*、*MAF4*、*MAF5*、*AGL19* 和 *AGL24* (*AGAMOUS-LIKE 24*) 7 个与 MADS 盒相关的转录调控因子。研究表明, *MAF1*、*MAF2*、*MAF3*、*MAF4* 表达对开花产生抑制作用, 它们的功能缺失突变体促使拟南芥提前开花, 其中 *MAF1* 不参与低温春化作用而是在光周期途径中调节开花时间, *MAF2*、*MAF3*、*MAF4* 和 *MAF5* 在低温春化途径起作用: 低温抑制 *MAF2*、*MAF3* 和 *MAF4* 的表达但诱导 *MAF5* 表达, *MAF2* 阻止早期的春化作用, 延长低温春化能解除其阻止从而引起拟南芥的低温春化应答反应, 这可能是产生低温春化作用的临界点的原因。在拟南芥低温春化途径中, *MAF2*、*AGL19* 和 *AGL24* 是独立于 *FLC* 的低温春化应答基因。与 *FLC* 一样, *MAF2* 为开花抑制因子。低温处理可以抑制 *MAF2* 表达, 进而解除对下游开花因子 *SOC1* 和 *FT* 的抑制促进开花。*AGL19* 和 *AGL24* 为开花促进因子, 低温可以诱导 *AGL19* 和 *AGL24* 表达而促进开花。在拟南芥低温春化应答过程中, *MAF2*、*AGL19* 和 *FLC* 一样都是依赖 *VIN3* 来调节的。*AGL19* 在春化之前染色体只含组蛋白 H3 的 ly27 三甲基化修饰而没有组蛋白 H3 的 ly9 三甲基化修饰。随着低温春化时间的延长, 组蛋白 H3 的 ly27 三甲基化修饰水平降低 [26~33]。

5 春化相关基因的应用前景

我们在研究中发现, 低温春化过程中大白菜幼苗能够诱导产生 *FLC* 天然反义转录本, 负调控 *FLC* 正向转录本, 促使大白菜提早抽薹。大白菜抽薹性不同的品系中 *FLC* 序列相同, 在春化过程中 *FLC* 的表观遗传调控有差异。同时, 表现在维持春化相关一些基因表达模式也有差异。这一发现促使我们研究春化过程中大白菜 *FLC* 的表观遗传调控分子机制。大白菜是严格需要春化才能开花的。和拟南芥

相比, 大白菜中 FLC 的表达量要高。2007 年报道大白菜基因组中共有 3 个 FLC , 即 $BrpFLC1$ 、 $BrpFLC2$ 和 $BrpFLC3$ 。其中 $BrpFLC2$ 位于 2 号染色体上, $BrpFLC1$ 位于 10 号染色体上, $BrpFLC3$ 位于 3 号染色体上^[8]。然而, 早在 2002 年就有报道大白菜中存在 4 个 FLC 同源基因, 即 $BrpFLC1$ 、 $BrpFLC2$ 、 $BrpFLC3$ 和 $BrpFLC5$ ^[4,34], 它们在春化中都会受到表观遗传上的抑制, 从而起始开花基因的表达。大白菜和模式植物拟南芥同属十字花科植物, 我们通过比较生物学的方法结合生物学试验验证, 确定大白菜 FLC 基因表达受低温诱导的表观遗传调控, 具体关注以下几个问题, 一个是低温处理诱导 FLC 反向转录本的表达, 是否产生 nat -siRNA, FLC 基因受抑制是与反向转录本直接相关还是与siRNA相关, 表观遗传调控主要表现在基因组DNA甲基化还是组蛋白修饰; 另外一个就是低温处理强度与时间不同对春化中 FLC 表观遗传调控程度及春化阈值的影响, 抽薹特性不同的大白菜品系, 在低温处理条件下, 其维持春化的能力不同, 这个与哪些调控网络具体相关; 还有一个就是产生 FLC 表观遗传调控效应的基础是什么, 即在有丝分裂过程中这种表观遗传调控是怎样被保持的, 以及这种表观遗传调控效应的维持与调控春化进程之间的关系。尽管植物从营养生长转变为生殖生长的过程是多种信号和途径参与的, 春化过程是一个多基因协同控制, 然而深入认识大白菜春化过程中 FLC 表观遗传调控网络, 能够从一条途径中深入理解春化作用和开花时间之间的协调关系, 并能进一步为培育大白菜和甘蓝等作物耐未熟抽薹的高产优质品种提供新的科学依据。

参考文献(References):

- [1] Swiezewski S, Crevillen P, Liu F, Ecker JR, Jerzmanowski A, Dean C. Small RNA-mediated chromatin silencing directed to the 3' region of the Arabidopsis gene encoding the developmental regulator, FLC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3633–3638. DOI
- [2] Groszmann M, Greaves IK, Albert N, Fujimoto R, Helliwell CA, Dennis ES, Peacock WJ. Epigenetics in plants: vernalization and hybrid. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(8): 427–437. DOI
- [3] Kole C, Quijada P, Michaels SD, Amasino RM, Osborn TC. Evidence for homology of flowering-time genes VFR2 from *Brassica rapa* and FLC from *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet*, 2001, 102(2–3): 425–430. DOI
- [4] Schranz ME, Quijada P, Sung S, B, Lukens L, Amasino R, Osborn TC. Characterization and effects of the replicated flowering time gene FLC in *Brassica rapa*. *Genetics*, 2002, 162(3): 1457–1468. DOI
- [5] Kim SY, Michaels SD. SUPPRESSOR OF FRI 4 encodes a nuclear-localized protein that is required for delayed flowering in winter-annual *Arabidopsis*. *Development*, 2006, 133(23): 4699–4707. DOI
- [6] Yang TJ, Kim JS, Kwon SJ, Lim KB, Choi BS, Kim JA, Jin M, Park JY, Lim MH, Kim HI, Lim YP, Kang JJ, Hong JH, Kim CB, Bhak J, Bancroft I, Park BS. Sequence-level analysis of the diploidization process in the triplicated FLOWERING LOCUS C region of *Brassica rapa*. *Plant Cell*, 2006, 18(6): 1339–1347. DOI
- [7] Lin SI, Wang JG, Poon SY, Su CL, Wang SS, Chiou TJ. Differential regulation of FLOWERING LOCUS C expression by vernalization in cabbage and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2005, 137(3): 1037–1048. DOI
- [8] Kim SY, Park BS, Kwon SJ, Kim J, Lim MH, Park YD, Kim DY, Suh SC, Jin YM, Ahn JH, Lee YH. Delayed flowering time in *Arabidopsis* and *Brassica rapa* by the overexpression of FLOWERING LOCUS C (FLC) homologs isolated from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep*, 2007, 26(3): 327–336. DOI
- [9] Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature*, 2004, 427(6970): 164–167. DOI
- [10] Sung S, He Y, Eshoo TW, Tamada Y, Johnson L, Nakahigashi K, Goto K, Jacobsen SE, Amasino RM. Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat Genet*, 2006, 38(6): 706–710. DOI
- [11] Swiezewski S, Liu F, Magusin A, Dean C. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature*, 2009, 462(10): 799–802. DOI
- [12] Heo JB, Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science*, 2011, 331(6013): 76–79. DOI
- [13] Turck F, Coupland G. When vernalization makes sense. *Science*, 2011, 331(6013): 36–37. DOI
- [14] Rank G, Prestel M, Paro R. Transcription through intergenic chromosomal memory elements of the *Drosophila* bithorax complex correlates with an epigenetic switch.

- Mol Cell Biol*, 2002, 22(22): 8026–8034. [DOI](#)
- [15] Schmitt S, Prestel M, Paro R. Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev*, 2005, 19(6): 697–708. [DOI](#)
- [16] Lavorgna G, Dahary D, Lehner B, Sorek R, Sanderson CM, Casari G. In search of antisense. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(2): 88–94. [DOI](#)
- [17] Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD. Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(24): 9357–9362. [DOI](#)
- [18] Yelin R, Dahary D, Sorek R, Levanon EY, Goldstein O, Shoshan A, Diber A, Biton S, Tamir Y, Khosravi R, Nemzer S, Pinner E, Walach S, Bernstein J, Savitsky K, Rotman G. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 379–386. [DOI](#)
- [19] Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*, 2002, 415(6873): 810–813. [DOI](#)
- [20] Thakur N, Tiwari VK, Thomassin H, Pandey RR, Kanduri M, Gondor A, Grange T, Ohlsson R, Kanduri C. An antisense RNA regulates the bidirectional silencing property of the *kcnq1* imprinting control region. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(18): 7855–7862. [DOI](#)
- [21] Vacic V, Jin H, Zhu JK, Lonardi S. A probabilistic method for small RNA flowgram matching. *Pac Symp Biocomput*, 2008: 75–86. [DOI](#)
- [22] Liu FQ, Marquardt S, Lister C, Swiezewski S, Dean C. Targeted 3. Processing of antisense transcripts triggers *Arabidopsis FLC* chromatin silencing. *Science*, 2010, 327(5961): 94–97. [DOI](#)
- [23] Camblong J, Iglesias N, Fickentscher C, Dieppois G, Stutz F. Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell*, 2007, 131(4): 706–717. [DOI](#)
- [24] Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. The molecular basis of vernalization: the central role of FLOWERING LOCUS C (*FLC*). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3753–3758. [DOI](#)
- [25] Swiezewski S, Crevillen P, Liu F, Ecker JR, Jerzmanowski A, Dean C. Small RNA-mediated chromatin silencing directed to the 3' region of the *Arabidopsis* gene encoding the developmental regulator, *FLC*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3633–3638. [DOI](#)
- [26] Bushey AM, Dorman ER, Corces VG. Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol Cell*, 2008, 32(1): 1–9. [DOI](#)
- [27] Sheldon CC, Hills MJ, Lister C, Dean C, Dennis ES, Peacock WJ. Resetting of FLOWERING LOCUS C expression after epigenetic repression by vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2214–2219. [DOI](#)
- [28] Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J*, 2000, 24(4): 457–466. [DOI](#)
- [29] Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(3): 464–489. [DOI](#)
- [30] Ratcliffe OJ, Nadzan GC, Reuber TL, Riechmann JL. Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an FLC homologue. *Plant Physiol*, 2001, 126(1): 122–132. [DOI](#)
- [31] Yu H, Ito T, Wellmer F, Meyerowitz EM. Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development. *Nat Genet*, 2004, 36(2): 157–161. [DOI](#)
- [32] Gregis V, Sessa A, Colombo L, Kater MM. AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18(6): 1373–1382. [DOI](#)
- [33] Schönrock N, Bouveret R, Leroy O, Borghi L, Köhler C, Gruissem W, Hennig L. Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev*, 2006, 20(12): 1667–1678. [DOI](#)
- [34] Schranz ME, Quijada P, Sung SB, Lukens L, Amasino R, Osborn TC. Characterization and effects of the replicated flowering time gene *FLC* in *Brassica rapa*. *Genetics*, 2002, 162(3): 1457–1468. [DOI](#)