

MILENA KULASEK, JACEK KESY, PAULINA GLAZIŃSKA

*Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
Lwowska 1, 87-100 Toruń  
E-mail: Paulina.Glazińska@umk.pl  
milena.kulasek@gmail.com  
kesy@umk.pl*

## miRNA NARZĘDZIEM DO OPTYMALIZACJI PLONOWANIA ROŚLIN UPRAWNYCH\*

### WSTĘP

Stale rosnąca populacja ludzi na świecie wymaga zwiększonej produkcji żywności. Próba sprostania temu wyzwaniu jest tworzenie roślin transgenicznych za pomocą inżynierii genetycznej. Nowym sposobem osiągnięcia tego celu jest modyfikacja genów związanych z funkcjonowaniem miRNA (miRNA) (ZHANG i WANG 2015). miRNA są klasą małych cząsteczek regulatorowych RNA o długości 20-24 nukleotydów (REINHART i współaut. 2002, BARTEL 2004), obecnych zarówno u roślin, jak i u zwierząt (TARVER i współaut. 2012).

Roślinne miRNA są kodowane przez geny *MIR*, ulegające transkrypcji z udziałem polimerazy RNA II (XIE i współaut. 2005), w wyniku czego powstaje cząsteczka prekursora pierwszego rzędu pri-miRNA (ang. primary micro RNA), która zapętla się w jedno- i dwuniciowe struktury, tworzące tzw. spiniki do włosów (JONES-RHOADES i współaut. 2006). Następnie pri-miRNA jest cięte przez endorybonukleazę Dicer-like 1 (DCL1), najpierw do cząsteczki prekursora pre-miRNA, a następnie do dwuniciowego dupleksu dojrzałego miRNA i cząsteczki komplementarnej (miRNA/miRNA\*). W odróżnieniu od biogenezy miRNA u zwierząt, u roślin występuje dodatkowy etap, w którym ryboza ostatniego nukleotydu jest metylowana przez metylotransferazę HUA Enhancer 1 (HEN1). Doj-

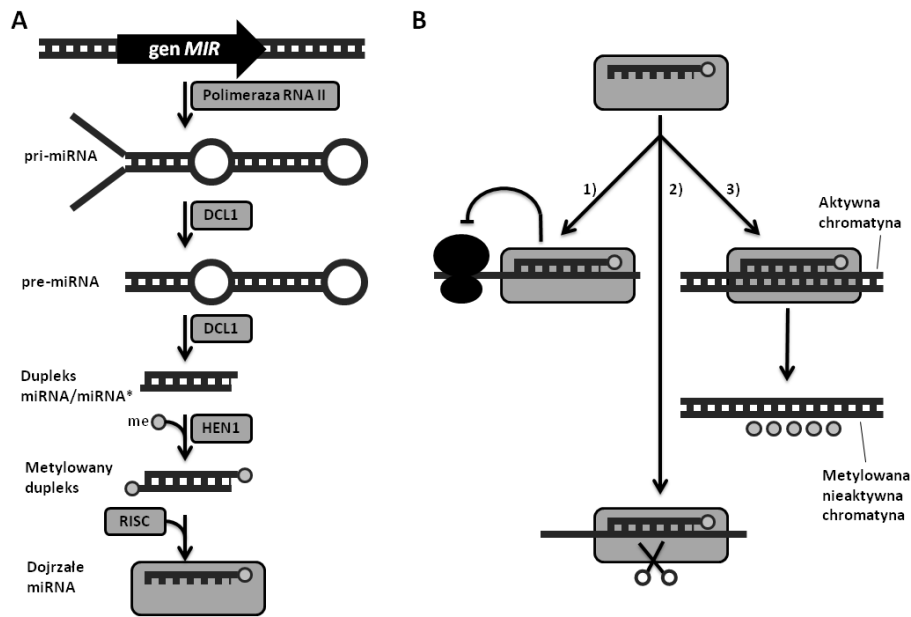
rzałe miRNA jest przyłączane do kompleksu RISC (ang. RNA-induced silencing complex), gdzie ulega aktywacji przez degradację nici sensownej. Pozostała nić antysensowna jest komplementarna do części sekwencji mRNA genu docelowego, co umożliwia jego precyzyjne wyciszenie (VAUCHERET 2006, SOBKO-WIAK i współaut. 2008) (Ryc. 1A).

Regulacja ekspresji genów przez miRNA może odbywać się na trzech poziomach (Ryc. 1B). Po pierwsze, przez represję translacji (AUKERMAN i SAKAI 2003, BRODERSEN i współaut. 2008, CHEN 2004), sposób rozpowszechniony w królestwie zwierząt, polegający na niedoskonale komplementarnym wiązaniu miRNA do 3'UTR (ang. 3' untranslated region) transkryptu danego genu (WITKOS i współaut. 2011). Po drugie, poprzez cięcie transkryptu (LLAVE i współaut. 2002, XIE i współaut. 2003), sposób dominujący w królestwie roślin oraz po trzecie, inhibicję transkrypcji (BAO i współaut. 2004, KHRAIWESH i współaut. 2010).

Roślinne miRNA pełnią kluczową rolę w regulacji szeregu procesów rozwojowych (LI i ZHANG 2016), adaptacyjnych (TOLEDO-FILHO i LAUBINGER 2015) i obronnych (LIU i współaut. 2017), a ich geny docelowe kodują ważne czynniki transkrypcyjne, elementy ścieżek sygnałowych fitohormonów oraz białka enzymatyczne. Ingerencja w naturalnie istniejące szlaki, w których funkcjonują miRNA regulujące biosyntezę specyficznych białek, dają

**Słowa kluczowe:** amiRNA, miRNA, plonowanie, rośliny modyfikowane genetycznie, stres

\*Praca finansowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM nr 2017/25/N/NZ3/00524 oraz z programu Rady Ministrów RM-111-222-15 we współpracy z Instytutem Genetyki Roślin PAN



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie: A) szlaku biogenezy i B) różnych mechanizmów hamowania ekspresji genów przez miRNA. Numerowane strzałki oznaczają: 1) hamowanie translacji, 2) cięcie transkryptu, 3) inhibicja transkrypcji genu docelowego przez zmianę aktywności transkrypcyjnej.

Tabela 1. Zestawienie przykładów miRNA i ich genów docelowych będących potencjalnym obiektem modyfikacji w celu poprawy wielkości i jakości plonów.

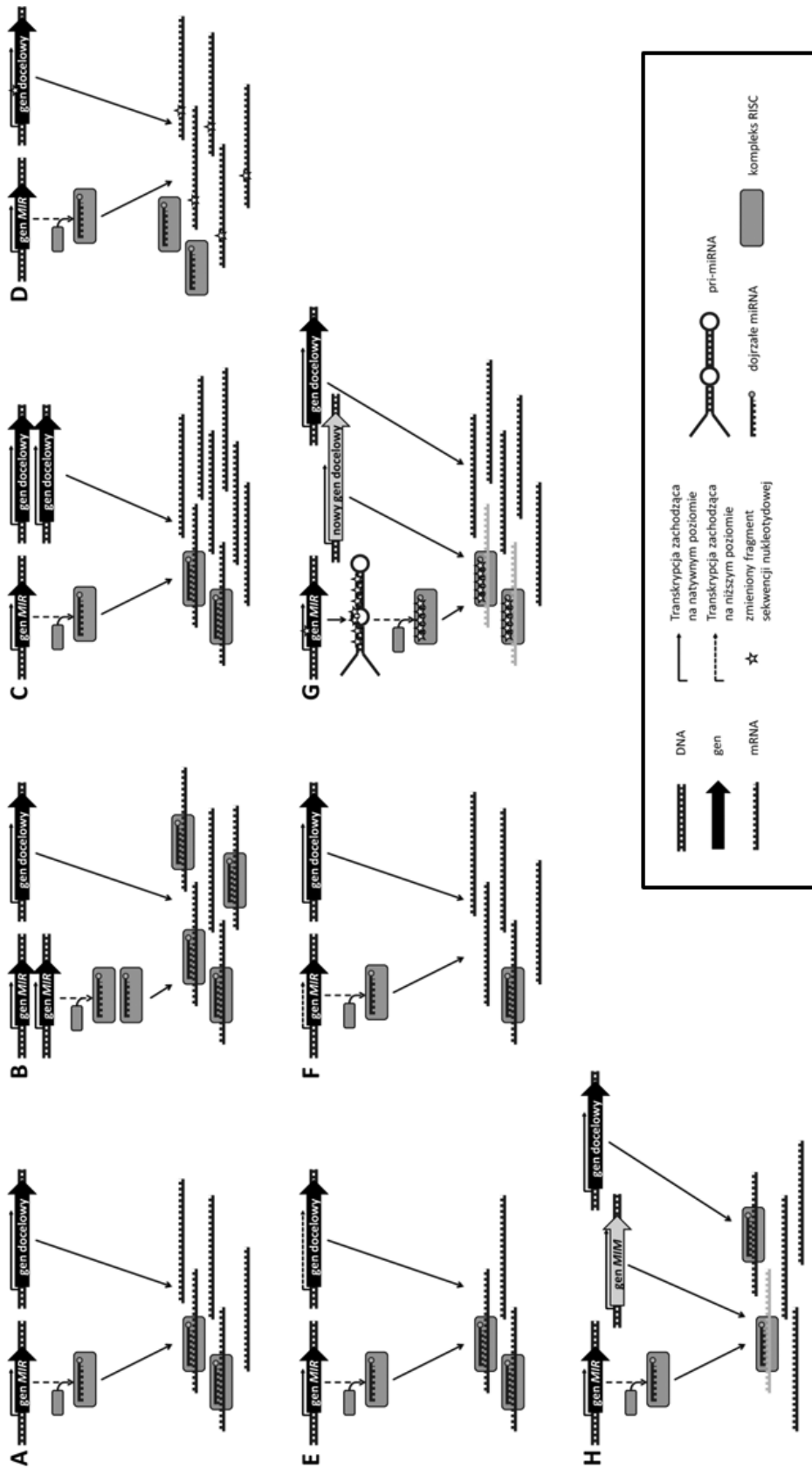
Objaśnienia: 1 – nadekspresja genu *MIR*, 2 – nadekspresja genów docelowych, 3 – mutacja w genie docelowym prowadząca do niewrażliwości transkryptu na inhibicję przez miRNA, 4 – obniżenie ekspresji genów docelowych, 5 – obniżenie ekspresji genu *MIR*, 6 – sztuczne miRNA (amiRNA) zaprojektowane tak, by był komplementarny do transkryptu kodowanego przez określony gen i w konsekwencji mógł wpływać na regulowany przez niego proces, 7 – ekspresja transgeny *MIM* (ang. mimicry target), posiadającego w swojej sekwencji tak zmienione miejsce docelowe dla miRNA, aby rozpoznanie jej przez miRNA nie powodowało cięcia transkryptu i będącego w ten sposób cząsteczką wychwytyjącą miRNA.

miRNA	Gen docelowy	Rodzaj modyfikacji (1-7)	Gatunek ([-] - efekt niekorzystny)	Źródło
<b>Modyfikacja wzrostu wegetatywnego</b>				
miR156	Rodzina genów SPL	1	kukurydza	FU i współaut. 2012
			proso różgowe	FU i współaut. 2012
			ryż [-]	XIE i współaut. 2012
		2	<i>A. thaliana</i>	WU i współaut. 2009
			topola	RUBINELLI i współaut. 2013
miR171	Rodzina genów HAM	3	ryż	MIURA i współaut. 2010
			1	<i>A. thaliana</i> [-]
		4	jęczmień [-]	CURABA i współaut. 2013
			pomidor	HUANG i współaut. 2017
			ryż [-]	FAN i współaut. 2015

miR172	Glossy15 (homolog Apetala 2)	2	kukurydza	LAUTER i współaut. 2005
miR397	OsLAC	1	ryż	ZHANG i współaut. 2013
Polepszenie jakości plonu				
miR156	CNR	1	pomidor	MOLESINI i współaut. 2012; MOXON i współaut. 2008
		5	pomidor	KARLOVA i współaut. 2013
miR172	Apetala 2	5	pomidor	KARLOVA i współaut. 2013
miR167	ARF8	3	<i>A. thaliana</i>	GOETZ i współaut. 2007
			pomidor	GOETZ i współaut. 2007
Odporność na stres biotyczny				
miR444	MADS23, 27a, 57	1	ryż	WANG i współaut. 2016
amiRNA	P69 z TYMV	6	<i>A. thaliana</i>	NIU i współaut. 2006
amiRNA	HC-Proof z TuMV	6	<i>A. thaliana</i>	NIU i współaut. 2006
amiRNA	VSR 2b z CMV	6	tytoń	QU i współaut. 2007
amiRNA	TGBp1/p25 z PVX	6	tytoń	AI i współaut. 2011
amiRNA	HC-Pro z PVY	6	tytoń	AI i współaut. 2011
amiRNA	AV1	6	pomidor	VU i współaut. 2013
amiRNA	AV1 i AV2	6	pomidor	VU i współaut. 2013
miR393	TIR1	1	<i>A. thaliana</i>	NAVARRO i współaut. 2006; XIA i współaut. 2012
miR398	CSD1, Nodulin19	1	tytoń [-]	NAYA i współaut. 2014
miR7695	OsNramp6	1	ryż	CAMPO i współaut. 2013
miR482e	Geny z rodziny NBS-LRR	1	ziemniak	YANG i współaut. 2015
miR169	NF-YA	7	ryż	LI i współaut. 2017
Tolerancja stresów abiotycznych				
miR393	TIR1	3	<i>M. truncatula</i>	CHEN i współaut. 2015
miR169a	NF-YA5	2	<i>A. thaliana</i>	LI i współaut. 2008
miR169	GmNFYA3	2	<i>A. thaliana</i>	NI i współaut. 2013
miR169c	NF-YA1/2/3, MRP1	1	pomidor	ZHANG i współaut. 2011a
miR319	AsPCF5,6,8, AsTCP14, AsNAC60	1	mietlica rozłogowa	ZHOU i współaut. 2013
miR171	LOM1,2,3	3	<i>A. thaliana</i>	XUE i współaut. 2014
miR319	OsPFC5	1	ryż [+/-]	YANG i współaut. 2013
	OsTCP21	4	ryż	YANG i współaut. 2013
miR398	CSD1, CSD2, CCS	3 (CCS1)	<i>A. thaliana</i>	SUNKAR i współaut. 2006

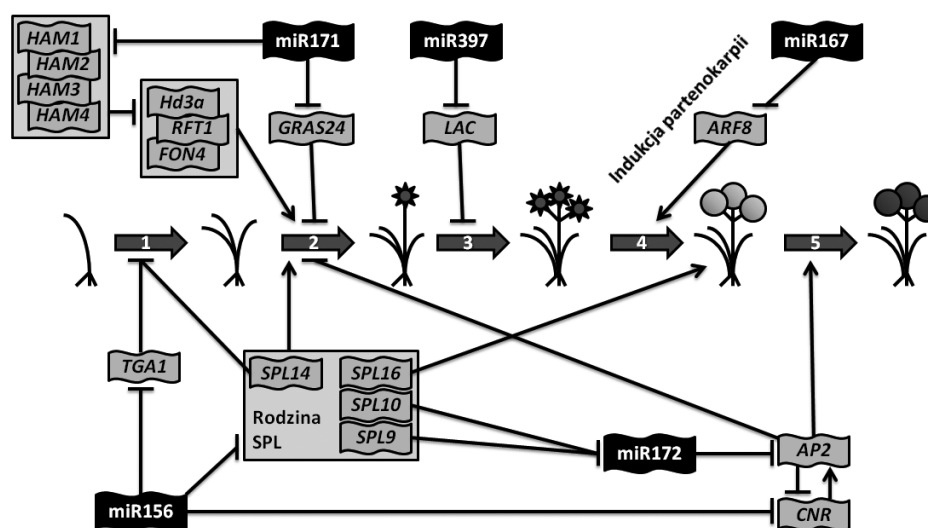
możliwość precyzyjnej kontroli procesów, w których te białka funkcjonują. Opracowano szereg metod pozwalających na tego typu modyfikacje: przez nadekspresję genu *MIR* (Ryc. 2B), nadekspresję genów docelowych

(Ryc. 2C), mutację w genie docelowym prowadzącą do niewrażliwości transkryptu na inhibicję przez miRNA (Ryc. 2D), obniżenie ekspresji genów docelowych (Ryc. 2E), obniżenie ekspresji genu *MIR* (Ryc. 2F). Ponad-



Ryc. 2. Schematy obrazujące zasadę działania modyfikacji genów związanych z funkcjonowaniem miRNA.

A – sytuacja wyjściowa w roślinie dzikiego typu, B – nadekspresja genu *MIR*, C – nadekspresja genów docelowych, D – mutacja w genie docelowym prowadząca do nie-wrażliwości transkryptu na inhibicję przez miRNA, E – obniżenie ekspresji genów docelowych, F – obniżenie ekspresji genu *MIR*, G – sztuczne miRNA (amiRNA) zaprojektowane tak, by był komplementarny do transkryptu kodowanego przez określony gen i w konsekwencji mógł wpływać na regulowany przez niego proces, H - ekspresja transgenu *MIM* (ang. mimicry target), posiadającego w swojej sekwencji tak zmienione miejsce docelowe dla miRNA, aby rozpoznanie jej przez miRNA nie powodowało cięcia transkryptu i będącego w ten sposób cząsteczką wychwytyjącą miRNA.



Ryc. 3. Wybrane procesy rozwojowe, regulowane przez miRNA będące potencjalnym celem manipulacji genetycznych. Numerowane strzałki oznaczają: 1) krzewienie, 2) kwitnienie, 3) rozgałęzianie kwiatostanu, 4) zawiązywanie owoców, 5) dojrzewanie owoców.

to w sytuacji, kiedy w regulacji wybranego procesu nie uczestniczy żadne miRNA, istnieje możliwość stworzenia sztucznego miRNA (ang. artificial micro RNA, amiRNA), zaprojektowanego tak, by był komplementarny do transkryptu kodowanego przez określony gen i w konsekwencji mógł wpływać na regulowany przez niego proces (Ryc. 2G). Stosunkowo nowym i ciekawym rozwiązaniem jest wprowadzenie do rośliny transgenu *MIM* (ang. mimicry target), jako cząsteczki wychytującej miRNA (Ryc. 2H), ale posiadającego w swojej sekwencji tak zmienione miejsce docelowe dla miRNA, że jej rozpoznanie nie powodowało cięcia transkryptu. Opracowanie takich modyfikacji funkcjonowania miRNA w regulacji przebiegu różnych procesów wzrostowych i rozwojowych staje się obiecującym narzędziem polepszenia plonowania.

W literaturze istnieje już wiele doniesień na temat zastosowania opisanych strategii do regulacji plonowania roślin (Ryc. 3, Tabela 1). Niniejszy artykuł stanowi próbę uporządkowania tej wiedzy.

## MODYFIKACJA WZROSTU WEGETATYWNEGO

### OPÓŹNIANIE PRZEJŚCIA DO GENERATYWNEJ FAZY ROZWOJU

Rozwój generatywny rośliny jest zawsze poprzedzony dłuższą lub krótszą fazą wzrostu juwenilnego i następującą po nim fazą wzrostu dojrzałego (KOPCEWICZ 2002). Ilość i jakość owoców są w dużej mierze zależne od ilości materiałów zapasowych nagromadzo-

nych w wegetatywnej fazie wzrostu, zatem jej wydłużenie powinno prowadzić do zwiększenia i polepszenia plonu. Stanowi to jedną ze strategii, jaką można obrać, dążąc do zwiększenia plonowania rośliny.

Jednym z negatywnych regulatorów przejścia z juwenilnej do dojrzałej i dalej, do generatywnej fazy wzrostu jest rodzina genów *MIR156*. Geny docelowe tych miRNA kodują czynniki transkrypcyjne z rodziny SPL (ang. squamosa-promoter binding protein-like), które są zaangażowane m.in.: w rozwój organów o cechach dojrzałych, indukcję kwitnienia, określaniu tożsamości merystemu kwiatowego oraz hamowanie indukcji korzeni przybyszowych (WANG i współaut. 2008, XU i współaut. 2016). Jak dotychczas pozytywny wpływ nadekspresji *MIR156* na plonowanie wykazano w uprawach kukurydzy, prosa (FU i współaut. 2012), ryżu, *Arabidopsis* (WU i współaut. 2009) i topoli (RUBINELLI i współaut. 2013). U kukurydzy było to spowodowane bezpośrednio przez opóźnienie wejścia rośliny w fazę generatywną i, dodatkowo, modyfikacja ta powodowała polepszenie jakości kolb przez zwiększenie ich strawności i podniesienie zawartości skrobi. W przypadku prosa różgowego (*Panicum virgatum*) wykazano, że nadekspresja egzogennej *Osa-MIR156b* powoduje zwiększenie krzewienia, co prowadzi do zwiększenia biomasy rośliny o 58-101%. Dodatkowo zaobserwowano u tych roślin zwiększenie ilości rozpuszczalnych cukrów i strawności produkowanej z nich paszy. Jednak nadmierna nadekspresja *Osa-MIR156b* prowadzi do zahamowania kwitnienia i karłowatości (FU i współaut. 2012). Z kolei transgenicz-



ne topole o zwiększonej ekspresji genu *Corngrass1*, kodującego dwa tandemowo ułożone miR156, wykazywały istotny przyrost merystemów bocznych, skrócenie długości międzywęzła i redukcję zawartości ligniny w pniu, nawet do 30% w porównaniu z typem dzikim (RUBINELLI i współaut. 2013).

Innym miRNA, regulującym przejście z fazy wegetatywnej do generatywnej, jest miR171. W przypadku ryżu obniżenie poziomu ekspresji jego genów docelowych, kodujących czynniki transkrypcyjne OsHAM1-4 (ang. hairy meristem), powoduje brak determinacji merystemu apikalnego pędu i inhibicję regulatorów kwitnienia: *Hd3a* (ang. *Heading date 3a*), *RFT1* (ang. *RICE FLOWER LOCUS T1*) i *FON4* (ang. *Flower Organ Number 4*) (FAN i współaut. 2015) (Ryc. 3). U *Arabidopsis* nadekspresja *MIR171* lub utrata funkcjonalnych białek AtHAM1-3 powodowała szereg zmian, w tym: mniejszą liczbę liści, zmniejszoną liczbę rozgałęzień pędu, zwiększoną zawartość chlorofilu, krótsze korzenie pierwotne, zmieniony pokrój kwiatu (WANG i współaut. 2010, ENGSTROM i współaut. 2011). Co więcej, potrójny mutant *atham1,2,3* cechuje się brakiem niezróżnicowanych komórek merystematycznych w korzeniu i pędzie, aberracjami w rozmieszczeniu liści (filotaksji) i organów bocznych, a także zmienioną morfologią merystemu (ENGSTROM i współaut. 2011). Bardziej szczegółowa analiza tego mutantu pozwoliła odkryć, że HAM1 i HAM2 biorą udział w promowaniu różnicowania komórek na peryferiach merystemów pędu oraz pomagają zachować ich polarną organizację (SCHULZE i współaut. 2010). W przypadku jęczmienia, nadekspresja genu kodującego miR171 także wywoływała efekt plejotropowy: wydłużoną fazę wegetatywną, zwiększoną liczbę krótkich wegetatywnych fitomeristemów pędu i opóźnienie różnicowania merystemów szczytowych w kwiaty (CURABA i współaut. 2013).

Niedawno grupa naukowców z Chongqing (Chiny) stworzyła linie transgeniczných pomidorów, które pozwoliły zweryfikować przydatność miR171 jako celu modyfikacji genetycznych prowadzących do zwiększenia plonu także u roślin dwuliściennych. Wprawdzie rośliny z obniżoną ekspresją *SIGRAS24*, genu docelowego miR171, nie różniły się od roślin dzikiego typu, jednak linie z nadekspresją *MIR171* były wyższe i szybciej kwitły, co pozytywnie przekładało się na uzyskany plon (HUANG i współaut. 2017).

W badaniach prowadzonych na kukurydzy (LAUTER i współaut. 2005) i *Arabidopsis* (AUKERMAN i SAKAI 2003) wykazano, że przejście z juwenilnej fazy wzrostu do dojrzałej regulowane jest przez czynnik transkrypcyjny APETALA 2 (AP2), którego gen

regulowany jest przez miR172. Gen kukurydzy *Glossy15* (homolog AP2) ulega najwyższej ekspresji w wegetatywnej fazie wzrostu, a hamowanie jego translacji przez miR172 jest sygnałem do wejścia rośliny w fazę generatywną. Nadekspresja tego genu nie tylko opóźnia wkroczenie rośliny w fazę generatywną, ale także powoduje zwiększenie liczby liści o cechach juwenilnych (LAUTER i współaut. 2005). U *Arabidopsis* akumulacja miR172 jest regulowana przez miR156 za pośrednictwem białka SPL9, które razem z SPL10 bezpośrednio stymuluje transkrypcję *MIR172b* (WU i współaut. 2009) (Ryc. 3). Modulacja równowagi między ekspresją genów kodujących AP2 i miR172 jest potencjalnym narzędziem sterowania przejściami w kolejne fazy wzrostu.

#### WPLYW NA POKRÓJ ROŚLINY

Stopień rozkrzewienia rośliny determinuje takie cechy jak: rozmiar korony, powierzchnię fotosyntetyczną i, co ważne, liczbę pędów płodnych, które są kluczowym elementem plonu. Na plonowanie roślin uprawnych korzystnie wpływa utrzymywanie optymalnej liczby pędów generatywnych na roślinie. Znaczenie regulowanego przez miRNA krzewienia rośliny dla plonowania widać najlepiej na przykładzie kukurydzy zwyczajnej. Pokrój tej rośliny zależy od aktywności genu *TGA1* (ang. teosinte glume architecture1), regulowanego przez wspomniany wcześniej, należący do rodziny genów *MIR Corngrass1*. Udomowienie kukurydzy z jej dzikiego, bardziej rozkrzewionego przodka (teosinte) zawdzięczamy mutacji właśnie w genie *TGA1*, jaka miała miejsce ok. 9 tys. lat temu (CHUCK i współaut. 2007, WANG i współaut. 2015).

Wykazano, że podobne znaczenie u ryżu ma gen *OsSPL14*. Jego nadekspresja lub punktowa mutacja prowadząca do braku wrażliwości jego transkryptu na regulację przez miR156, przejawia się modyfikacją architektury tej rośliny. Z jednej strony zmniejsza się liczba pędów wegetatywnych, a z drugiej, zwiększa liczba rozgałęzień wiechy, co w konsekwencji daje zwiększenie plonu ziarna (JIAO i współaut. 2010, MIURA i współaut. 2010). *OsSPL14* ulega transkrypcji zarówno w liściach, podstawie pędów, jak i młodych wiechach, jednak w wyniku represji przez miRNA pełnej ekspresji ulega on tylko w wiechach. Mutacja w miejscu docelowym dla miR156, powodująca niewrażliwość transkryptu *OsSPL14* na represję miRNA, występuje także w japońskiej odmianie ryżu Aikawa 1, charakteryzującej się zmniejszonym stopniem krzewienia (MIURA i współaut. 2010). Nadekspresja *Osa-MIR156* prowadzi do zwiększenia liczby pędów wegetatywnych,

a nawet karłowatości, silnie zredukowanej wielkości wiechy i opóźnienia kwitnienia (XIE i współaut. 2006). Inny przedstawiciel rodziny *SPL*, *OsSPL16*, jest pozytywnym regulatorem proliferacji komórkowej, a ziarna ryżu transgenicznego o jego zwiększonej ekspresji są szersze i dają wyższy plon. Zmniejszona aktywność *OsSPL16* miała odwrotny skutek: ziarna były smuklejsze i miały lepszą jakość (WANG i współaut. 2012). Wyniki przedstawionych badań pokazują, że precyzyjna manipulacja poziomem miR156 i mRNA jego genów docelowych, *OsSPL14*, *OsSPL16*, lub *TGA1*, może być skutecznym narzędziem do stworzenia odmian ryżu o wyższym i lepszym potencjale plonowania.

Podobne znaczenie może mieć także sterowanie interakcjami OsmiR444a i OsMIR397 z ich genami docelowymi, odpowiednio, *OsMADS57* i *OsLAC* (GUO i współaut. 2013, ZHANG i współaut. 2013). Ten ostatni jest o tyle istotny, że koduje lakazę, która jest jednym z czynników warunkujących wrażliwość na brasinosteroidy (BR), ważną grupę fitohormonów, kontrolujących kluczowe dla zbóż cechy pokroju roślin jak: wysokość rośliny, kąt nachylenia liści, elongację korzenia oraz kształt i wielkość nasion (YANG i współaut. 2017, XIAO i współaut. 2017). Transgeniczny ryż o zwiększonej wrażliwości na te fitohormony produkował większe ziarna, jednak kąt nachylenia jego liści był większy, co wymuszałoby mniej gęstą uprawę i w rezultacie plon z hektara mógłby się nie zmienić lub nawet obniżyć. Utrata wrażliwości na BR w wyniku mutacji *brd1* i *brd2* skutkuje co prawda zmniejszonym kątem nachylenia liści, jednak takie rośliny są karłowate (HONG i współaut. 2005). Być może niewielka zmiana wrażliwości na te fitohormony za pomocą modulacji szlaku zależnego od miR397 nadawałaby roślinie korzystne cechy, przy jednoczesnym zminimalizowaniu skutków ubocznych, pozytywnie wpływając na plonowanie. Biorąc pod uwagę, że miR397 jest silnie konserwowany w różnych gatunkach, modulacja jego ekspresji może okazać się dobrą strategią zwiększania plonu nasion także w innych zbożach (ZHANG i współaut. 2013).

#### miRNA A JAKOŚĆ PLONU

Powszechnie wiadomo, że istotne znaczenie ekonomiczne ma nie tylko ilość, ale i jakość uzyskiwanego plonu. Wypracowano dwie strategie z udziałem miRNA prowadzące do poprawy jakości plonu. Pierwszą jest spowalnianie dojrzewania, które prowadzi do zwiększonego czasu przydatności do spożycia po zbiorach, i umożliwia m.in. transport na duże odległości bez użycia specjalnych warunków przechowywania. Druga to mani-

pulacje zmierzające do wytworzenia owoców partenokarpicznych (patrz dalej).

#### WYDŁUŻANIE OKRESU DOJRZEWANIA OWOCÓW

Jedną z pożądanых cech owoców jest długi okres przydatności do spożycia, wynikający ze spowolnionego procesu ich dojrzewania. Rośliną modelową stosowaną w badaniach nad rozwojem i dojrzewaniem owoców jest pomidor. Odkryto wiele różnych miRNA zaangażowanych w rozwój i dojrzewanie owoców pomidora (PILCHER i współaut. 2007, ITAYA i współaut. 2008, MOXON i współaut. 2008, ZHANG i współaut. 2011a, MOLESINI i współaut. 2012, KARLOVA i współaut. 2013). Jednym z nich jest miR156, którego genem docelowym jest *CNR* (ang. colorless non-ripening) (MOXON i współaut. 2008, MOLESINI i współaut. 2012). Transgeniczne pomidory o zwiększonej ekspresji *slly-MIR156* mają nieco jaśniejsze owoce w porównaniu z typem dzikim, a osiągnięcie przez nie pełnej dojrzałości trwa dłużej. Jednak owoce są mniejsze, a rośliny niższe i mają więcej liści o mniejszej powierzchni (ZHANG i współaut. 2011b).

*CNR* jest czynnikiem transkrypcyjnym, który bezpośrednio stymuluje ekspresję *APE-TALA2a* (*SLAP2a*), genu odpowiedzialnego u pomidora za opóźnienie dojrzewania owoców i hamowanie syntezy etylenu. Wykazano również, że aktywność genów *SLAP2a* i *CNR* regulowana jest przez istnienie negatywnego sprzężenia zwrotnego, umożliwiającego precyzyjne dostrojenie ich poziomu względem siebie (KARLOVA i współaut. 2011). Dodatkowo, podczas rozwoju i dojrzewania owocu pomidora transkrypt genu *SLAP2a* jest cięty z udziałem miR172 (KARLOVA i współaut. 2013), powodując zwiększoną ekspresję *CNR*. Zatem dłuższy czas dojrzewania u pomidora może być osiągnięty albo przez zredukowanie ilości miR156 lub miR172, albo przez mutacje w miejscach docelowych dla tych miRNA w sekwencjach genów *CNR* i *AP2a*.

#### INDUKCJA PARTENOKARPII

Partenokarpia jest procesem tworzenia owoców bez nasion, rozwijających się głównie z niezapłodnionych zalążni. Zjawisko to jest ekonomicznie korzystne, również z uwagi na możliwość uzyskiwania wysokiego plonu nawet w warunkach niesprzyjających zapyleniu. Główną rolę w tym procesie pełnią fitohormony takie jak auksyna i gibbereliny (MOLESINI i współaut. 2012), których działanie jest z kolei regulowane m.in. poprzez miRNA (np. ACHARD i współaut. 2004, REYES i CHUA 2007, GLAZIŃSKA i współaut. 2016). Na przykład ekspresja genu kodującego czynnik transkrypcyjny zależny od auksyn *ARF8* (ang. auxin response factor) jest

negatywnie regulowana przez miR167 (RU i współaut. 2006, WU i współaut. 2006, MOLESINI i współaut. 2012). Wykazano, że *Arabidopsis* i pomidor transformowane zmodyfikowanym genem *ARF8*, którego produkt jest niewrażliwy na negatywną regulację miR167, wytwarzają owoce partenokarpiczne (GOETZ i współaut. 2007). Manipulacja poziomem ekspresji genów kodujących elementy ścieżki sygnałowej fitohormonów za pomocą modulacji ekspresji miRNA lub ich genów docelowych jest zatem obiecującym instrumentem do wytwarzania owoców partenokarpicznych.

## ZWIĘKSZENIE ODPORNOŚCI NA STRES BIOTYCZNY

Fitopatogeny są przyczyną wielu chorób roślin prowadzących do istotnego zmniejszenia produkcji roślinnej, a przez to poważnych strat ekonomicznych. Tradycyjnie stosowane środki ochrony roślin nie są jednak obojętne dla zdrowia człowieka i zwierząt, dlatego warto szukać alternatywnych rozwiązań. Skutecznym instrumentem do zwalczania takich zagrożeń jak wirusy, bakterie, grzyby i nicienie, może być modyfikacja mechanizmów obronnych z udziałem miRNA.

### ODPORNOŚĆ NA WIRUSY

Jedną z możliwych reakcji rośliny na zakażenie wirusowe jest indukcja genu kodującego polimerazę RNA 1 zależną od RNA (ang. RNA-dependent RNA polymerase 1, RDR1), która syntetyzuje siRNA, wyciszające ekspresję genów wirusa (VOINNET 2008). Aktywność transkrypcyjna genu *RDR1* regulowana jest pośrednio przez miR444, którego geny docelowe, *OsMADS23*, *OsMADS27a* i *OsMADS57*, kodują represory transkrypcji tej polimerazy. Zwiększenie ekspresji miR444, spowodowane infekcją wirusową, prowadzi do uwolnienia *RDR1* z represji transkrypcyjnej i w konsekwencji aktywację syntezy siRNA. Badania potwierdziły, że nadekspresją *MIR444* u ryżu zwiększono odporność na wirusa pasiastości ryżu (ang. rice stripe virus, RSV) (WANG i współaut. 2016).

Wiele wirusów uruchamia biosyntezę tzw. wirusowych represorów wyciszania (ang. viral silencing repressors, VSR) (BURGYÁN i HAVELDA 2011), których celem jest neutralizacja aktywowanego przez rośliny przeciwwirusowego wyciszania RNA. Innowacyjna strategia prowadząca do zwiększenia odporności przeciwwirusowej polega na zastosowaniu odpowiedniego miRNA przeciwko VSR. Ponieważ nie odkryto jeszcze natywnych miRNA o takim działaniu, stworzono sztuczne (amiRNA), w których wycinaną w procesie dojrzewania sekwencję natywnego miRNA zastąpiono sztuczną, komplementarną do wy-

ciszanego genu (Ryc. 2G). Bazujące na prekursorze miR159 amiRNA, skierowane przeciwko sekwencjom dwóch VRS, *P69* z TYMV i *HC-Pro* z TuMV, nadawały transgenicznym liniom *Arabidopsis* specyficzną odporność na wirusa żółtej mozaiki rzepy (ang. turnip yellow mosaic virus, TYMV) i wirusa mozaiki rzepy (ang. turnip mosaic virus, TuMV) (NIU i współaut. 2006). Stosując tę metodę stworzono także tytoń odporny na wirusa mozaiki ogórka (ang. cucumber mosaic virus, CMV). W tym przypadku sekwencja miR171 z prekursora z *Arabidopsis* została zamieniona na amiRNA komplementarne do genu *VSR 2b* CMV (QU i współaut. 2007). Dwie kolejne linie tytoniu modyfikowane amiRNA, stworzone na bazie prekursorów miR159a, miR167b i miR171a pochodzących z *A. thaliana*, wykazywały odporność na wirusa X ziemniaka (ang. potato virus X, PVX) i wirusa Y ziemniaka (ang. potato virus Y, PVY) (AI i współaut. 2011).

Inną obiecującą strategią zwiększania odporności roślin na patogeny jest użycie miRNA do hamowania namnażania i rozprzestrzeniania się wirusa w tkankach. Genami docelowymi takich miRNA są geny wirusa zaangażowane w jego replikację i transmisję. VU i współaut. (2013) użyli dwóch amiRNA skierowanych przeciwko: (i) środkowemu regionowi transkryptu kodującego białko płaszczka AV1 (amiR-AV1-3) oraz (ii) regionowi, w którym sekwencje AV1 i białka osłonki wewnętrznej AV2 nakładają się (amiR-AV1-1) u wirusa kędzierzawki liści pomidora (ang. Tomato Leaf Curl Virus, ToLCV). Transgeniczne linie pomidora eksprymujące amiR-AV1-1 tolerowały ToLCND (ang. tomato leaf curl New Delhi virus) i wykazywały cechy prawidłowego rozwoju.

### ODPORNOŚĆ NA INFEKCJE BAKTERYJNE

W 2008 r. we Włoszech pojawił się szczególnie agresywny szczep *Pseudomonas syringae*, który rozprzestrzenił się na obszar Europy, Azji, Oceanii i Ameryki Południowej, przynosząc ogromne straty w uprawie kiwi (FERRANTE i SCORTICHINI 2010). Zwiększona synteza i percepcja auksyny u gospodarza są kluczowe dla rozwoju infekcji wywołanej przez te bakterie (MUTKA i współaut. 2013). Reakcją rośliny na obecność bakterii jest synteza miR393, którego genem docelowym jest *TIR1* (ang. transport inhibitor response), kodujący receptor auksyny (NAVARRO i współaut. 2006). Ograniczenie percepcji auksyny przez wyciszenie genów kodujących jej receptory stało się jedną z dróg prowadzących do zapobiegania infekcji wywołanej przez tę bakterię. Transgeniczna linia *Arabidopsis* nadekspresyjująca *MIR393* cechuje się zwiększoną odpornością anty-



bakteryjną. Jednak obniżona wrażliwość na auksynę skutkuje zwiększonym rozkrzewieniem, przyspieszonym kwitnieniem oraz obniżoną tolerancją na stres suszy i zasolenia (NAVARRO i współaut. 2006, XIA i współaut. 2012), a dodatkowo całkowite pozbawienie rośliny funkcjonalnego genu receptora u mutantu *tir1* powoduje utratę systemicznej nabytej odporności (ang. systemic acquired resistance, SAR) (TRUMAN i współaut. 2010).

Wykazano, że podczas infekcji bakteryjnej dochodzi również do obniżenia poziomu ekspresji *MIR398* (JAGADEESWARAN i współaut. 2009), którego geny docelowe kodują dwie cynkowo-miedziowe dysmutazy ponadtlenkowe (CSD1 i CSD2), ważne enzymy w tolerancji stresu oksydacyjnego. Podwyższenie ekspresji *CSD1* było proporcjonalne do stopnia obniżenia akumulacji *miR398*. Nie opublikowano jednak jeszcze badań z udziałem mutantów ani roślin transgenicznych, które pozwoliłyby sprawdzić, czy strategia oparta na tej wiedzy rzeczywiście pozwoli stworzyć rośliny bardziej odporne na infekcje bakteryjne.

U roślin strączkowych i psiankowatych występuje kilka rodzin miRNA hamujących ekspresję genów kodujących receptory NBS-LRR (ang. nucleotide-binding site leucine-rich repeat), elementy wrodzonej odporności roślin (ZHAI i współaut. 2011, SHIVAPRASAD i współaut. 2012). Najlepiej opisanym przedstawicielem wspomnianych miRNA jest *miR482/2118*. NBS-LRR biorą udział w reakcji nadwrażliwości na atak patogenu, która polega na miejscowej indukcji programowanej śmierci komórki, ograniczającej rozprzestrzenienia się infekcji (BELKHADIR i współaut. 2004). Kontrolowana przez *miR482/2118* ekspresja genów kodujących NBS-LRR, utrzymywana jest na niskim poziomie podczas nieobecności patogenu, co wiąże się z pewnymi korzyściami dla rośliny, gdy presja infekcyjna jest niska lub gdy są aktywne inne mechanizmy obrony przeciw patogenom. Dodatkowo, obniżony poziom tych białek jest wymagany w procesie nodulacji, czyli tworzenia brodawek na korzeniach roślin motylkowych przez symbiotyczne bakterie (LI i współaut. 2010). W sytuacji, gdy presja infekcyjna jest wysoka lub gdy roślina nie dysponuje dodatkowymi mechanizmami obronnymi, korzyści płynące z uruchomienia szlaku odpowiedzi na patogen zależnego od NBS-LRR są ograniczane przez poniesione koszty metaboliczne i inne niekorzystne zjawiska. Dla przykładu, podwyższony poziom białek NBS-LRR powoduje nasilenie wyzwalanej efektem reakcji nadwrażliwości (MARONE i współaut. 2013), co zwiększa zasięg uszkodzeń tkanek roślin

często atakowanych przez patogeny (SHIVAPRASAD i współaut. 2012).

Różnice w sekwencjach paralogów genów *NBS-LRR* wymuszają różnice w sekwencjach rozpoznających je miRNA, co powoduje wzrost specyficzności represji przez dane miRNA. Gdy w danym gatunku sekwencje te są bardziej heterogenne, poszczególne miRNA regulują ekspresję tylko kilku genów z całej omawianej rodziny, a w odwrotnej sytuacji jedno miRNA wystarczy, by wyciszyć wszystkie geny kodujące NBS-LRR (ZHANG i współaut. 2016). Prawdopodobnie wyjątkowo duże różnice w sekwencjach i poziomie ekspresji nadrodziny *miR482/2118* odzwierciedlają zmiany w równowadze kosztów i korzyści u różnych gatunków roślin, w zależności od warunków środowiska i obecności innych układów obronnych (TIAN i współaut. 2003, SHIVAPRASAD i współaut. 2012). Zatem modyfikacja poziomu tych miRNA w celu ochrony rośliny przed infekcjami bakteryjnymi może przynieść różne efekty w zależności od gatunku rośliny.

#### ODPORNOŚĆ NA PATOGENY GRZYBOWE

Również choroby grzybowe u roślin mają poważny wpływ na powstawanie strat w plonach, a odpowiedź na te patogeny także jest modulowana przez miRNA. I tak u pszenicy znaleziono aż 24 miRNA zaangażowane w odpowiedź na atak grzyba *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* (Bgt), który wywołuje wyniszczającą chorobę tego zboża – mączniaka prawdziwego (ang. powdery mildew) (XIN i współaut. 2010).

W przypadku ryżu zainfekowanego grzybem *Magnaporthe oryzae*, transkrypt genu *OsNramp6* (ang. natural resistance-associated macrophage protein 6) ulega alternatywnemu splicingowi, w wyniku czego staje się on podatny na wyciszenie przez osamiR7695. Nadekspresja *MIR7695* powoduje zwiększoną odporność ryżu na tę chorobę (CAMPO i współaut. 2013).

Z kolei grzyb z gatunku *Verticillium dahliae* powoduje znaczne straty w uprawie wielu roślin, w tym ziemniaka. Młoda roślina porażona werciliozą w krótkim czasie więdnie i umiera. Mimo dużej powszechności choroby, jak dotąd rośliny nie wykształciły skutecznych mechanizmów obrony przed tym patogenem. Brakuje także na rynku skutecznych środków przeciwdziałających werciliozie, w związku z tym podejmuje się jedynie działania profilaktyczne (ROWE i POWELSON 2002). Duże nadzieje wiąże się tutaj z użyciem modyfikacji aktywności *MIR482e*. Ilość *miR482e* w zainfekowanych sadzonkach ziemniaka ulega wyraźnemu obniżeniu, a jednocześnie zwiększa się poziom mRNA kilku jego genów docelowych należących do

rodziny *NBS-LRR*. Odkryto, że w wyniku zależnego od miR482e cięcia transkryptów *NBS-LRR* powstają ta-siRNA, których genami docelowymi są w głównej mierze geny kodujące białka związane z mechanizmami obronnymi. Przeprowadzone badania wykazały, że siewki transgenicznego ziemniaka z nadekspresją *MIR482e* były bardziej podatne na zakażenie *V. dahliae*. Wyciszenie genu *MIR481e* może być zatem skutecznym narzędziem do podwyższenia odporności ziemniaka na tę chorobę (YANG i współaut. 2015).

Innym groźnym grzybem, powodującym duże straty plonu, jest twardnica pasożytnicza (*Sclerotinia sclerotiorum*), atakująca blisko 400 gatunków roślin. Wywoływana przez grzyba choroba, zgnilizna twardzikowa, objawia się brunatnieniem, zamieraniem i gniciem tkanek, co prowadzi do obumarcia rośliny. Ponieważ patogen może przeżyć w glebie nawet do 10 lat, choroba jest trudna do opanowania za pomocą konwencjonalnych środków ochrony roślin (FIEDOROW i WEBER 1996, KORBAS i JAJOR 2011). Wykazano, że podczas infekcji *Sclerotinia sclerotiorum* ulega obniżeniu poziom ekspresji m.in. przytoczonego wcześniej *MIR398*. Liście tytoniu z nadekspresją *MIR398* zainfekowane tym grzybem cechowały się rozległymi zmianami nekrotycznymi, co prawdopodobnie spowodowane było niższą ekspresją jego genów docelowych, m.in. związanych ze stresem oksydacyjnym *CSD1* i *Nodulin 19* (NAYA i współaut. 2014).

Ostatnie badania dotyczące zarazy ryżu powodowanej przez grzyba z gatunku *Magnaporthe oryzae* łączą poziom dojrzałego miR169 z odpornością rośliny na ten patogen; w odmianach podatnych na chorobę ilość tego miRNA była wyższa niż w odmianach bardziej odpornych. Genem docelowym miR169 jest *NF-YA* (ang. nuclear transcription factor Y subunit alpha), kodujący jedną z trzech podjednostek kompleksu NF-Y, będącego czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym się do elementu CCAAT (PETRONI i współaut. 2012). Wykazano, że ekspresja transgenu, posiadającego w swojej sekwencji zmienione miejsce docelowe dla miR169 (*MIM169a* - mimicry target), będącego w ten sposób cząsteczką wychwytyjącą to miRNA (ang. miRNA sponge) (Ryc. 2H), powodowała zwiększenie odporności ryżu na zarazę (LI i współaut. 2017).

Większość odkrytych miRNA zaangażowanych w obronę przed grzybami jest negatywnymi regulatorami odpowiedzi rośliny. Prawdopodobnie transgeneza prowadząca do nadekspresji genów docelowych miRNA, bądź mutacja w miejscach przez nie rozpoznawanych, prowadząca do niewrażliwości trans-

kryptu na cięcie lub wprowadzanie imitacji genów docelowych wychwytyjących miRNA, okaże się dobrą strategią zwiększenia odporności roślin użytkowych na grzyby.

#### ODPORNOŚĆ NA NICIENIE

Szacuje się, że na całym świecie nicienie powodują średnio aż 12% zmniejszenie plonu. Na tak duże straty wpływa między innymi nieprawidłowa diagnoza chorób wywoływanych przez te organizmy, ponieważ objawy są niespecyficzne i przypominają raczej oznakę stresu abiotycznego lub zakażenia innymi patogenami. Pewnym sposobem na zahamowanie zakażenia nicieniami jest stworzenie roślin, które będą mogły podjąć skuteczną walkę z patogenem przed rozwojem objawów chorobowych. Odkryto, że również w interakcje roślina-nicień zaangażowane jest wiele miRNA.

Korzenie *Arabidopsis* porażone nicieniem *H. schachtii* wykazują spadek poziomu ekspresji genów kodujących miR161, miR164, miR167a, miR172c, miR396a,b,c i miR398a (HEWEZI i współaut. 2008, KHRAIWESH i współaut. 2012). Z kolei zakażenie matwiką sojowym (*Heterodera glycines*), najbardziej wyniszczającym patogenem soi, indukuje zmiany w akumulacji 101 różnych miRNA, z których 20 ulegało istotnej odmiennej ekspresji w odmianach odpornych i wrażliwych na tego nicienia (LI i współaut. 2012). Sugeruje się, że indukowane zakażeniem miRNA są zaangażowane w ustalenie miejsca żerowania (HEWEZI i współaut. 2008). Stworzenie roślin transgenicznych z nadekspresją wspomnianych miRNA i/lub wyciszeniem ich genów docelowych może przyczynić się do lepszego zrozumienia relacji pasożytniczej roślina-nicień, a także może doprowadzić do stworzenia roślin uprawnych odpornych na nicienie. Odporność na te patogeny może być też osiągnięta przez nadekspresję amiRNA nakierowanego na geny istotne dla funkcjonowania danego nicienia (KAMTHAN i współaut. 2015).

#### WZMOCNIENIE ODPORNOŚCI NA STRES ABIOTYCZNY

Przeciwdziałanie abiotycznym czynnikom stresowym, przynoszącym największe straty w uprawach roślin, jest szczególnie trudne z uwagi na naturę bodźca. Najprostszym i najtańszym sposobem na zmniejszenie strat jest stosowanie odmian tolerujących niekorzystne czynniki środowiskowe. Uzyskanie nowych odmian może być osiągnięte dzięki genetycznym modyfikacjom, w wyniku których zaangażowane w stresse abiotyczne *MIR*, lub ich geny docelowe, będą ulegały zmniejszonej ekspresji w tkankach roślin.

## SUSZA I ZASOLENIE

W badaniach nad udziałem miRNA w odpowiedzi na suszę u rośliny modelowej *Medicago truncatula* wykazano, że geny docelowe zidentyfikowanych miRNA są zaangażowane w różnorodne procesy, w tym: transkrypcję, degradację białek, detoksykację itd. (WANG i współaut. 2011). Wykazano, że w korzeniach i pędach podczas stresu suszy silnie akumulowane są miR398a/b i miR408, a ich geny docelowe, kodujące białka miedziowe: podjednostkę 5b mitochondrialnej oksydazy cytochromu c COX5b (ang. mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 5b), miedziowo-cynkową dysmutazę nadtlenkową CSD1 (ang. copper/zinc superoxide dismutase 1) i plantacyjaninę, ulegają obniżonej ekspresji (TRINDADE i współaut. 2010).

U *Arabidopsis* w czasie odwodnienia, stresu chłodu, wysokiego zasolenia i traktowania kwasem abscysynowym (ABA) zaobserwowano wysoką akumulację miR393, regulującego ekspresję receptorów auksyny (SUNKAR i ZHU 2004). Z drugiej jednak strony, transgeniczne linie o zwiększonej ekspresji *TIR1*, zmodyfikowanego w taki sposób, żeby jego transkrypt był niewrażliwy na negatywną regulację miR393, wykazywały większą odporność na stres zasolenia. Rośliny te charakteryzowały się wyższym potencjałem kiełkowania nasion, mniejszą utratą wody, niezahamowanym wzrostem korzeni, opóźnionym starzeniem, zmniejszonym obumieraniem (CHEN i współaut. 2015).

Odkryto, że podczas stresu suszy u *Arabidopsis* zmniejszonej ekspresji ulega *MIR169*, co powoduje wzrost ekspresji jego genu docelowego *NF-YA5*, a transgeniczne rośliny z nadekspresją *MIR169a* wykazywały zwiększoną utratę wody przez liście w porównaniu do dzikiego typu. Natomiast linie transgeniczne wykazujące nadekspresję *NF-YA5* lepiej tolerowały suszę (LI i współaut. 2008). Ponadto, transgeniczna linia *Arabidopsis* z dodatkową kopią pochodzącego z soi genu *GmNFYA3*, który jest genem docelowym dla miR169, cechowała się obniżoną transpiracją i lepiej tolerowała stres suszy, jednak rośliny te były bardziej podatne na stres zasolenia (NI i współaut. 2013). Odwrotną zależność obserwuje się u pomidora (*Solanum lycopersicum*), u którego miR169 jest akumulowany podczas suszy, a jego cztery geny docelowe ulegają zmniejszonej ekspresji. Konstytutywna nadekspresja *MIR169c* w transgenicznym pomidorze prowadziła do zmniejszenia rozwarcia aparatów szparkowych i obniżenia transpiracji, w konsekwencji do zwiększenia tolerancji na stres suszy (ZHANG i współaut. 2011a). Zarówno u *Arabidopsis*, jak i u pomidora, miR169 lub jego geny docelowe mogą być potencjalnymi

kandydatami dla inżynierii genetycznej do osiągnięcia zwiększonej tolerancji na stres abiotyczny u roślin transgenicznych.

Obiecującym przedmiotem modyfikacji genetycznych w kontekście obrony rośliny przed suszą jest miR319. Transgeniczna trawa mietlica rozłogowa (*Agrostis stolonifera*) z nadekspresją pochodzącego z ryżu *Osa-MIR319* wykazywała zwiększoną tolerancję zarówno na stres suszy, jak i zasolenia. Było to związane ze zwiększoną zawartością wosków w liściach i wyższą retencją wody, a także ze zmniejszonym pobieraniem sodu. Analiza ekspresji genów wykazała, że zwiększona tolerancja na stres może być przypisana zmniejszonej aktywności transkrypcyjnej co najmniej czterech genów należących do rodziny *TCP* (ang. teosinte branched/cycloidea/proliferating factors): *AsPCF5*, *AsPCF6*, *AsPCF8* i *AsTCP14*, oraz homologa genu *NAC* z ryżu, będących przypuszczalnie genami docelowymi dla miR319. Trzeba jednak dodać, że nadekspresja *Osa-MIR319* wywoływała zmiany plejotropowe, w tym: szersze liście z większą liczbą wiązek przewodzących, szersze łodygi i zmniejszoną liczbę rozgałęzień (ZHOU i współaut. 2013), co u trawy wykorzystywanej do celów ozdobnych i sportowych jest niekorzystne. W tej sytuacji być może bardziej specyficzny efekt można by uzyskać modyfikując ekspresję genów docelowych dla miR319.

Redukcja ekspresji genów docelowych *LOM1* (ang. lost meristems), *LOM2* i *LOM3*, kodujących białka z rodziny GRAS, spowodowana nadekspresją *MIR171* u *Arabidopsis thaliana*, skutkowała między innymi zmniejszeniem liczby trichomów – wytworów epidermy liści ograniczających transpirację. Konstytutywna ekspresja genów *LOM* niewrażliwych na regulację przez miR171 dawała odwrotny efekt (XUE i współaut. 2014).

## STRES TERMICZNY

Wykazano, że poziom ekspresji *MIR319* zmienia się w czasie stresu chłodu u *Arabidopsis* (SUNKAR i ZHU 2004, LIU i współaut. 2008), ryżu (LV i współaut. 2010) i trzciny cukrowej (THIEBAUT i współaut. 2012). Okazało się jednak, że opracowanie na tej podstawie strategii zwiększenia tolerancji na ten stres nie jest wcale proste. Badania z użyciem roślin transgenicznych wykazały wprawdzie, że nadekspresja *Osa-MIR319* prowadzi do zwiększonej tolerancji na stres chłodu po uprzedniej aklimacji do umiarkowanego chłodu, jednak rośliny takie miały silne opóźnienia rozwojowe. Tego niekorzystnego efektu ubocznego uniknięto konstruując linie zawierające RNAi wyciszające dwa geny docelowe dla tego miRNA: *OsPFC5* i *OsTCP21*, jednak w tym przypadku tolerancja na stres chłodu



była mniejsza (YANG i współaut. 2013), prawdopodobnie z powodu niedostatecznego wyciszenia genu docelowego.

GUAN i współaut. (2013) odkryli mechanizm termotolerancji u roślin, który szczególnie chroni organy generatywne. Obejmuje on indukcję akumulacji miR398, który hamuje ekspresję genów kodujących: miedziowo-cynkowe dysmutazy ponadtlenkowe CSD1 i CSD2 oraz miedziowe białko opiekuńcze (ang. chaperone) CCS dla obu tych białek. Mutanty *csd1*, *csd2* i *ccs* wykazywały zwiększoną tolerancję na stres wysokich temperatur w stosunku do roślin typu dzikiego, co było związane ze zwiększoną akumulacją czynników transkrypcyjnych stresu cieplnego i białek szoku cieplnego, oraz mniejszymi uszkodzeniami kwiatów podczas tego stresu (GUAN i współaut. 2013). Manipulacja miR398 lub jego genami docelowymi może być użyteczną strategią zwiększenia tolerancji stresu cieplnego u roślin użytkowych, zwłaszcza w kukurydzy, której tkanki reprodukcyjne ulegają uszkodzeniu w przedłużających się okresach letnich upałów (KAMTHAN i współaut. 2015).

#### STRES OKSYDACYJNY

W odpowiedzi na bodźce ze środowiska, takie jak: wysoka intensywność światła, ekstremalne temperatury, promieniowanie UV, obecność metali ciężkich, stres zasolenia i suszy oraz stresse mechaniczne, w roślinie wytwarzane są reaktywne formy tlenu (BAXTER i współaut. 2014, YOU i CHAN 2015). Enzymami katalizującymi detoksykację rodników ponadtlenkowych przez przekształcenie ich do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru są dysmutazy ponadtlenkowe (SOD). Podjęto kilka prób mających na celu zwiększenie tolerancji na stresse przez nadekspresję miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej (Cu/Zn-SOD) w roślinach transgenicznych (TEPPERMAN i DUNSMUIR 1990, PITCHER i współaut. 1991, GUPTA i współaut. 1993, PERL i współaut. 1993, SUNKAR i współaut. 2006), jednak w niektórych przypadkach nie wykazywały one w ogóle (lub w minimalnym stopniu) wzrostu tolerancji na stres (PITCHER i współaut. 1991, TEPPERMAN i DUNSMUIR 1990). Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem tego fenotypu jest wyciszenie przez miR398 ekspresji genu *CCS1*, kodującego białko opiekuńcze, którego rola jest dostarczanie miedzi do białka Cu/Zn-SOD (BOUCHÉ 2010). Problem ten został rozwiązany przez nadekspresję formy *CSD2* niewrażliwej na regulację poprzez miR398, co prowadziło do zwiększonej tolerancji na wysoką intensywność światła, metale ciężkie i inne stresse oksydacyjne (SUNKAR i współaut. 2006).

#### PODSUMOWANIE

Biologia molekularna jest silnie rozwijającą się gałęzią biologii, która stwarza ogromne możliwości udoskonalania roślin. Zastosowanie najnowszej wiedzy o roli i funkcjonowaniu miRNA umożliwia wpływanie na różne procesy wzrostu, rozwoju i mechanizmy obronne poprzez precyzyjne regulowanie aktywności odpowiednich genów. Przedstawione w niniejszej pracy przeglądowej badania wykazały, że manipulacja pojedynczym genem kodującym miRNA może w istotnym stopniu zwiększyć plon i biomasę, a także zwiększyć tolerancję na stresse biotyczne i abiotyczne (Tabela 1). Z jednej strony silniejsze wyciszenie danego genu docelowego można osiągnąć przez nadekspresję natywnego lub stworzenie sztucznego miRNA. Z drugiej strony, proces ten można ograniczać przez nadekspresję genu docelowego, wprowadzenie do genomu rośliny zmienionego genu docelowego z wyciętym miejscem rozpoznawanym przez miRNA lub przez wprowadzenie transgeny imitującego gen docelowy. Wiele badań potwierdziło, że te strategie mogą być z powodzeniem użyte do tworzenia roślin o zmienionym pokroju i/lub odporności na stresse biotyczne i abiotyczne, co prowadzi do podniesienia ilości i jakości plonu.

Jednak takie podejście ma także swoje ograniczenia. Manipulacja miRNA może prowadzić do niekorzystnych zmian plejotropowych, spowodowanych tym, że jedno miRNA ma często kilka genów docelowych, pełniących czasami kluczowe role w rozwoju czy reakcjach obronnych. Ta trudność może być przezwyciężona przez mutację knock-out w konkretnym genie docelowym lub obniżenie jego ekspresji za pomocą sztucznego miRNA, którego miejsce docelowe w tym genie jest sekwencją unikatową. Trzeba zdawać sobie również sprawę z faktu, że zmiana ekspresji miRNA lub jego genów docelowych u różnych gatunków roślin może wywoływać skrajnie różne reakcje. Dlatego w każdym konkretnym przypadku konieczne jest dogłębne poznanie funkcjonowania modyfikowanego szlaku regulowanego przez miRNA.

Wprowadzanie do sprzedaży żywności modyfikowanej genetycznie wzbudza w społeczeństwie wiele kontrowersji. Chociaż manipulacje poziomem ekspresji genów dają szansę na udoskonalenie roślin i zwiększenie ich produktywności, a dotychczasowe badania żywności modyfikowanej genetycznie nie dostarczyły dowodów na temat jej szkodliwości (patrz np. PAPINENI i współaut. 2017, SHARBATI i współaut. 2017, JIN i współaut. 2018), wykazano możliwość przenikania roślinnego miRNA do krwi zwierząt, oraz że u zwierząt istnieją potencjalne geny docelo-



we dla tych cząsteczek (ZHANG i współaut. 2012). Nie znaczy to jednak, że powinniśmy rezygnować z szansy, jaką daje technologia modulacji funkcjonowania miRNA, szczególnie, że wiele stosowanych naturalnych ziołowych preparatów leczniczych działa na organizm ludzki za pośrednictwem miRNA (HONG i współaut. 2015, XIE i współaut. 2016). Oczywiście taka żywność przed dopuszczeniem na rynek powinna zostać przebadana, ze szczególnym uwzględnieniem interakcji miRNA, którego dana modyfikacja dotyczy, z potencjalnymi genami docelowymi konsumenta.

#### Streszczenie

Rosnące światowe zapotrzebowanie na żywność wymaga wypracowania nowych strategii udoskonalania roślin celem zwiększenia ilości i jakości plonu. Obiecujące możliwości rozwiązania tego problemu oparte są na wykorzystaniu wciąż poszerzającej się wiedzy na temat miRNA, klasy endogennych małych cząsteczek RNA, negatywnie regulujących ekspresję genów na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Opracowywane technologie bazują na zmianie metodami inżynierii genetycznej ekspresji miRNA, zastosowaniu sztucznego miRNA (amiRNA) lub modyfikacji ich genów docelowych, polegającej na pozbawieniu ich wrażliwości na miRNA. Wśród wielu procesów fizjologicznych, poprzez które można wpływać na plonowanie roślin, na szczególną uwagę zasługują: regulacja czasu wejścia w fazę dojrzałą i generatywną, kształtowanie architektury rośliny (krzewienie), dojrzewanie owoców, indukcja partenokarprii, reakcje na stresy biotyczne oraz abiotyczne.

#### LITERATURA

- ACHARD P., HERR A., BAULCOMBE D. C., HARBERD N. P., 2004. *Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA*. *Development* 131, 3357-3365.
- AI T., ZHANG L., GAO Z., ZHU C. X., GUO X., 2011. *Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants*. *Plant Biol.* 13, 304-316.
- AUKERMAN M. J., SAKAI H., 2003. *Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes*. *Plant Cell* 15, 2730-2741.
- BAO N., LYE K.-W., BARTON M. K., 2004. *MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome*. *Dev. Cell* 7, 653-662.
- BARTEL D. P., 2004. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell* 116, 281-297.
- BAXTER A., MITTLER R., SUZUKI N., 2014. *ROS as key players in plant stress signalling*. *J. Exp. Bot.* 65, 1229-1240.
- BELKHADIR Y., SUBRAMANIAM R., DANGL J. L., 2004. *Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 391-399.
- BOUCHÉ N., 2010. *New insights into miR398 functions in Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 5, 684-686.
- BRODERSEN P., SAKVARELIDZE-ACHARD L., BRUN-RASMUSSEN M., DUNOYER P., YAMAMOTO Y. Y., SIEBURTH L., VOINNET O., 2008. *Wide spread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs*. *Science* 320, 1185-1190.
- BURGYÁN J., HAVELDA Z., 2011. *Viral suppressors of RNA silencing*. *Trends Plant Sci.* 16, 265-272.
- CAMPO S., PERIS-PERIS C., SIRÉ C., MORENO A. B., DONAIRE L., ZYTNIICKI M., NOTREDAME C., LLAVE C., SAN SEGUNDO B., 2013. *Identification of a novel microRNA (miRNA) from rice that targets an alternatively spliced transcript of the Nramp6 (Natural resistance-associated macrophage protein 6) gene involved in pathogen resistance*. *New Phytol.* 199, 212-227.
- CHEN X., 2004. *A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development*. *Science* 303, 2022-2025.
- CHEN Z., HU L., HAN N., HU J., YANG Y., XIANG T., ZHANG X., WANG L., 2015. *Overexpression of a miR393-resistant form of Transport Inhibitor Response protein 1 (mTIR1) enhances salt tolerance by increased osmoregulation and Na<sup>+</sup> exclusion in Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 56, 73-83.
- CHUCK G., CIGAN A. M., SAETEURN K., HAKE S., 2007. *The heterochronic maize mutant Corn-grass1 results from overexpression of a tandem microRNA*. *Nat. Genet.* 39, 544-549.
- CURABA J., TALBOT M., LI Z., HELLIWELL C., 2013. *Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley*. *BMC Plant Biol.* 13, 6.
- ENGSTROM E. M., ANDERSEN C. M., GUMULAK-SMITH J., HU J., ORLOVA E., SOZZANI R., BOWMAN J. L., 2011. *Arabidopsis homologs of the petunia hairy meristem gene are required for maintenance of shoot and root indeterminacy*. *Plant Physiol.* 155, 735-750.
- FAN T., LI X., YANG W., XIA K., OUYANG J., ZHANG M., 2015. *Rice osa-miR171c mediates phase change from vegetative to reproductive development and shoot apical meristem maintenance by repressing four OsHAM transcription factors*. *PLoS One* 10, e0125833.
- FERRANTE P., SCORTICHINI M., 2010. *Molecular and phenotypic features of Pseudomonas syringae pv. actinidiae isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (Actinidia chinensis) in central Italy*. *Plant Pathol.* 59, 954-962.
- FIEDOROW Z., WEBER Z., 1996. *Choroby roślin uprawnych*. Multum.
- FU C., SUNKAR R., ZHOU C., SHEN H., ZHANG J.-Y., MATTS J., WOLF J., MANN D. G. J., STEWART C. N., TANG Y., WANG Z.-Y., WANG Z.-Y., 2012. *Overexpression of miR156 in switchgrass (Panicum virgatum L.) results in various morphological alterations and leads to improved biomass production*. *Plant Biotechnol. J.* 10, 443-452.
- GLAZIŃSKA P., KULASEK M., GRZECA M., WOJCIECHOWSKI W., MARCINIĄK K., WILMOWICZ E., KOPCEWICZ J., 2016. *Udział niskocząsteczkowych regulatorowych RNA (siRNA i miRNA) w regulacji szlaku transdukcji sygnału auksyn*. *Kosmos* 65, 399-410.
- GOETZ M., HOOPER L. C., JOHNSON S. D., RODRIGUES J. C. M., VIVIAN-SMITH A., KOLTUNOW A. M., 2007. *Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarp in Arabidopsis and tomato*. *Plant Physiol.* 145, 351-366.
- GUAN Q., LU X., ZENG H., ZHANG Y., ZHU J., 2013. *Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis*. *Plant J.* 74, 840-851.

- GUO S., XU Y., LIU H., MAO Z., ZHANG C., MA Y., ZHANG Q., MENG Z., CHONG K., 2013. *The interaction between OsMADS57 and OsTB1 modulates rice tillering via DWARF14*. Nat. Commun. 4, 1566.
- GUPTA A. S., HEINEN J. L., HOLADAY A. S., BURKE J. J., ALLEN R. D., 1993. *Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1629-1633.
- HEWEZI T., HOWE P., MAIER T. R., BAUM T. J., 2008. *Arabidopsis small RNAs and their targets during cyst nematode parasitism*. Mol. Plant-Microbe Interact. 21, 1622-1634.
- HONG M., WANG N., TAN H. Y., TSAO S.-W., FENG Y., 2015. *MicroRNAs and chinese medicinal herbs: new possibilities in cancer therapy*. Cancers 7, 1643-1657.
- HONG Z., UEGUCHI-TANAKA M., FUJIOKA S., TAKATSUTO S., YOSHIDA S., HASEGAWA Y., KITANO H., MATSUOKA M., 2005. *The rice brassinosteroid-deficient dwarf2 mutant, defective in the rice homolog of Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone*. Plant Cell 17, 2243-2254.
- HUANG W., PENG S., XIAN Z., LIN D., HU G., YANG L., REN M., LI Z., 2017. *Overexpression of a tomato miR171 target gene SlGRAS24 impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis*. Plant Biotechnol. J. 15, 472-488.
- ITAYA A., BUNDSCHUH R., ARCHUAL A., JOUNG J., FEI Z., DAI X., ZHAO P., TANG Y., NELSON R., DING B., 2008. *Small RNAs in tomato fruit and leaf development*. Biochim. Biophys. Acta 1779, 99-107.
- JAGADEESWARAN G., SAINI A., SUNKAR R., 2009. *Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis*. Planta 229, 1009-1014.
- JIAO Y., WANG Y., XUE D., WANG J., YAN M., LIU G., DONG G., ZENG D., LU Z., ZHU X., QIAN Q., LI J., 2010. *Regulation of OsSPL14 by Os-miR156 defines ideal plant architecture in rice*. Nat. Genet. 42, 541-544.
- JIN Y., HE X., ANDOH-KUMI K., FRASER R.Z., LU M., GOODMAN R.E., 2018. *Evaluating risks of food allergy and toxicity of soy leghemoglobin expressed in Pichia pastoris*. Mol. Nutr. Food Res. 62, 1700297.
- JONES-RHOADES M. W., BARTEL D. P., BARTEL B., 2006. *MicroRNAs and their regulatory roles in plants*. Annu. Rev. Plant Biol. 57, 19-53.
- KAMTHAN A., CHAUDHURI A., KAMTHAN M., DATTA A., 2015. *Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement*. Front. Plant Sci. 6, 208.
- KARLOVA R., ROSIN F. M., BUSSCHER-LANGE J., PARAPUNOVA V., DO P. T., FERNIE A. R., FRASER P. D., BAXTER C., ANGENENT G. C., DE MAAGD R. A., 2011. *Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening*. Plant Cell 23, 923-941.
- KARLOVA R., VAN HAARST J. C., MALIEPAARD C., VAN DE GEEST H., BOVY A. G., LAMMERS M., ANGENENT G. C., DE MAAGD R. A., 2013. *Identification of microRNA targets in tomato fruit development using high-throughput sequencing and degradome analysis*. J. Exp. Bot. 64, 1863-78.
- KHRAIWESH B., ARIF M. A., SEUMEL G. I., OSSOWSKI S., WEIGEL D., RESKI R., FRANK W., 2010. *Transcriptional control of gene expression by microRNAs*. Cell 140, 111-122.
- KHRAIWESH B., ZHU J.-K., ZHU J., 2012. *Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants*. Biochim. Biophys. Acta 1819, 137-148.
- KOPCEWICZ J., 2002. *Rozwój wegetatywny*. [W:] Fizjologia roślin. KOPCEWICZ J., LEWAK S. (red.). PWN, Warszawa, 498-519.
- KORBAS M., JAJOR E., 2011. *Zgnilizna twardzikowa coraz groźniejsza, Zwalczanie zgnilizny twardzikowej*. Top Agrar Polska 4, 104-108.
- LAUTER N., KAMPANI A., CARLSON S., GOEBEL M., MOOSE S. P., 2005. *microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 9412-9417.
- LI C., ZHANG B., 2016. *MicroRNAs in control of plant development*. J. Cell Physiol. 231, 303-313.
- LI H., DENG Y., WU T., SUBRAMANIAN S., YU O., 2010. *Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation*. Plant Physiol. 153, 1759-1770.
- LI W.-X., OONO Y., ZHU J., HE X.-J., WU J.-M., IIDA K., LU X.-Y., CUI X., JIN H., ZHU J.-K., 2008. *The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and post-transcriptionally to promote drought resistance*. Plant Cell 20, 2238-2251.
- LI X., WANG X., ZHANG S., LIU D., DUAN Y., DONG W., 2012. *Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing*. PLoS One 7, e39650.
- LI Y., ZHAO S.-L., LI J.-L., HU X.-H., WANG H., CAO X.-L., XU Y.-J., ZHAO Z.-X., XIAO Z.-Y., YANG N., FAN J., HUANG F., WANG W.-M., 2017. *Osa-miR169 negatively regulates rice immunity against the blast fungus Magnaporthe oryzae*. Front. Plant Sci. 8, 2.
- LIU H.-H., TIAN X., LI Y.-J., WU C.-A., ZHENG C.-C., 2008. *Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana*. RNA 14, 836-843.
- LIU S.-R., ZHOU J.-J., HU C.-G., WEI C.-L., ZHANG J.-Z., 2017. *MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense*. Front. Microbiol. 8, 1801.
- LLAVE C., XIE Z., KASSCHAU K. D., CARRINGTON J. C., 2002. *Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA*. Science 297, 2053-2056.
- LV D.-K., BAI X., LI Y., DING X.-D., GE Y., CAI H., JI W., WU N., ZHU Y.-M., 2010. *Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays*. Gene 459, 39-47.
- MARONE D., RUSSO M. A., LAIDÒ G., DE LEONARDIS A. M., MASTRANGELO A. M., 2013. *Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses*. Int. J. Mol. Sci. 14, 7302-7326.
- MIURA K., IKEDA M., MATSUBARA A., SONG X.-J., ITO M., ASANO K., MATSUOKA M., KITANO H., ASHIKARI M., 2010. *OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice*. Nat. Genet. 42, 545-549.
- MOLESINI B., PII Y., PANDOLFINI T., 2012. *Fruit improvement using intragenesis and artificial microRNA*. Trends Biotechnol. 30, 80-88.
- MOXON S., JING R., SZITTYA G., SCHWACH F., RUSHOLME PILCHER R. L., MOULTON V., DALMAY T., 2008. *Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening*. Genome Res. 18, 1602-1609.



- MUTKA A. M., FAWLEY S., TSAO T., KUNKEL B. N., 2013. *Auxin promotes susceptibility to Pseudomonas syringae via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses*. Plant J. 74, 746-754.
- NAVARRO L., DUNOYER P., JAY F., ARNOLD B., DHARMASIRI N., ESTELLE M., VOINNET O., JONES J. D. G., 2006. *A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling*. Science 312, 436-439.
- NAYA L., PAUL S., VALDÉS-LÓPEZ O., MENDOZA-SOTO A. B., NOVA-FRANCO B., SOSA-VALENCIA G., REYES J. L., HERNÁNDEZ G., 2014. *Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean*. PLoS One 9, e84416.
- NI Z., HU Z., JIANG Q., ZHANG H., 2013. *GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress*. Plant Mol. Biol. 82, 113-129.
- NIU Q.-W., LIN S.-S., REYES J. L., CHEN K.-C., WU H.-W., YEH S.-D., CHUA N.-H., 2006. *Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance*. Nat. Biotechnol. 24, 1420-1428.
- PAPINENI S., GOLDEN R.M., THOMAS J., 2017. *The aryloxyalkanoate dioxygenase-12 (AAD-12) protein is not acutely toxic in mice*. Food Chem. Toxicol. 110, 200-203.
- PERL A., PERL-TREVES R., GALILI S., AVIV D., SHALGI E., MALKIN S., GALUN E., 1993. *Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases*. Theor. Appl. Genet. 85, 568-576.
- PETRONI K., KUMIMOTO R.W., GNESUTTA N., CALVENZANI V., FORNARI M., TONELLI C., HOLT B.F., MANTOVANI R., 2012. *Promiscuous life of plant NUCLEAR FACTOR Y transcription factors*. Plant Cell 24, 4777-4792.
- PILCHER R. L. R., MOXON S., PAKSERESHT N., MOULTON V., MANNING K., SEYMOUR G., DALMAY T., 2007. *Identification of novel small RNAs in tomato (Solanum lycopersicum)*. Planta 226, 709-717.
- PITCHER L. H., BRENNAN E., HURLEY A., DUNSMUIR P., TEPPERMAN J. M., ZILINSKAS B. A., 1991. *Overproduction of petunia chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco*. Plant Physiol. 97, 452-455.
- QU J., YE J., FANG R., 2007. *Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants*. J. Virol. 81, 6690-6699.
- REINHART B. J., WEINSTEIN E. G., RHOADES M. W., BARTEL B., BARTEL D. P., 2002. *MicroRNAs in plants*. Genes Dev. 16, 1616-1626.
- REYES J. L., CHUA N.-H., 2007. *ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination*. Plant J. 49, 592-606.
- ROWE R. C., POWELSON M. L., 2002. *Potato early dying: management challenges in a changing production environment*. Plant Disease 86, 1184-1193.
- RU P., XU L., MA H., HUANG H., 2006. *Plant fertility defects induced by the enhanced expression of microRNA167*. Cell Res. 16, 457-465.
- RUBINELLI P. M., CHUCK G., LI X., MEILAN R., 2013. *Constitutive expression of the Corngrass1 microRNA in poplar affects plant architecture and stem lignin content and composition*. Biomass Bioenergy 54, 312-321.
- SCHULZE S., SCHÄFER B. N., PARIZOTTO E. A., VOINNET O., THERES K., 2010. *LOST MERISTEMS genes regulate cell differentiation of central zone descendants in Arabidopsis shoot meristems*. Plant J. 64, 668-678.
- SHARBATI J., BOHMER M., BOHMER N., KELLER A., BACKES C., FRANKE A., STEINBERG P., ZELJENKOVÁ D., EINSPIANIER R., 2017. *Transcriptomic analysis of intestinal tissues from two 90-day feeding studies in rats using genetically modified MON810 maize varieties*. Front. Genet. 8, 222.
- SHIVAPRASAD P. V., CHEN H.-M., PATEL K., BOND D. M., SANTOS B. A. C. M., BAULCOMBE D. C., 2012. *A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs*. Plant Cell 24, 859-874.
- SOBKOWIAK L., SZARZYŃSKA B., SZWEJKOWSKA-KULIŃSKA Z., 2008. *Biogeneza roślinnych RNA*. Post. Bioch. 54, 308-316.
- SUNKAR R., ZHU J.-K., 2004. *Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis*. Plant Cell 16, 2001-2019.
- SUNKAR R., KAPOOR A., ZHU J.-K., 2006. *Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance*. Plant Cell 18, 2051-2065.
- TARVER J. E., DONOGHUE P. C. J., PETERSON K. J., 2012. *Do miRNAs have a deep evolutionary history?* BioEssays 34, 857-866.
- TEPPERMAN J. M., DUNSMUIR P., 1990. *Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity*. Plant Mol. Biol. 14, 501-511.
- THIEBAUT F., ROJAS C. A., ALMEIDA K. L., GRATIVOL C., DOMICIANO G. C., LAMB C. R. C., DE ALMEIDA ENGLER J., HEMERLY A. S., FERREIRA P. C. G., 2012. *Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane*. Plant. Cell Environ. 35, 502-512.
- TIAN D., TRAW M. B., CHEN J. Q., KREITMAN M., BERGELSON J., 2003. *Fitness costs of R gene-mediated resistance in Arabidopsis thaliana*. Nature 423, 74-77.
- TOLEDO-FILHO L. A. A., LAUBINGER S., 2015. *Role of small RNAs in regulation of plant responses to stress*. [W:] Molecular mechanisms in plant adaptation. LAITINEN R. (red.). Wiley Blackwell, Hoboken, 147-170.
- TRINDADE I., CAPITÃO C., DALMAY T., FEVEIREIRO M. P., DOS SANTOS D. M., 2010. *miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in Medicago truncatula*. Planta 231, 705-716.
- TRUMAN W. M., BENNETT M. H., TURNBULL C. G. N., GRANT M. R., 2010. *Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds*. Plant Physiol. 152, 1562-1573.
- VAUCHERET H., 2006. *Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations*. Genes Develop. 20, 759-771.
- VOINNET O., 2008. *Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants*. Trends Plant Sci. 13, 317-328.
- VU T. VAN ROY CHOUDHURY N., MUKHERJEE S. K., 2013. *Transgenic tomato plants expressing artificial microRNAs for silencing the pre-coat and coat proteins of a begomovirus, Tomato leaf curl New Delhi virus, show tolerance to virus infection*. Virus Res. 172, 35-45.
- WANG H., STUDER A. J., ZHAO Q., MEELEY R., DOEBLEY J. F., 2015. *Evidence that the origin of naked kernels during maize domestication was caused by a single amino acid substitution in tga1*. Genetics 200, 965-974.

- WANG H., JIAO X., KONG X., HAMERA S., WU Y., CHEN X., FANG R., YAN Y., 2016. A signaling cascade from miR444 to RDR1 in rice antiviral RNA silencing pathway. *Plant Physiol.* 170, 2365-2377.
- WANG J.-W., SCHWAB R., CZECH B., MICA E., WEIGEL D., 2008. Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20, 1231-1243.
- WANG L., MAI Y.-X., ZHANG Y.-C., LUO Q., YANG H.-Q., 2010. MicroRNA171c-targeted SCL6-II, SCL6-III, and SCL6-IV genes regulate shoot branching in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 3, 794-806.
- WANG S., WU K., YUAN Q., LIU X., LIU Z., LIN X., ZENG R., ZHU H., DONG G., QIAN Q., ZHANG G., FU X., 2012. Control of grain size, shape and quality by OsSPL16 in rice. *Nat. Genet.* 44, 950-954.
- WANG T., CHEN L., ZHAO M., TIAN Q., ZHANG W.-H., 2011. Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Genomics* 12, 367.
- WITKOS T. M., KOSCIANSKA E., KRZYZOSIAK W. J., 2011. Practical aspects of microRNA prediction. *Curr. Mol. Med.* 11, 93-109.
- WU G., PARK M. Y., CONWAY S. R., WANG J.-W., WEIGEL D., POETHIG R. S., 2009. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138, 750-759.
- WU M.-F., TIAN Q., REED J. W., 2006. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* 133, 4211-4218.
- XIA K., WANG R., OU X., FANG Z., TIAN C., DUAN J., WANG Y., ZHANG M., 2012. OsTIR1 and OsAFB2 downregulation via OsmiR393 overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *PLoS One* 7, e30039.
- XIAO Y., LIU D., ZHANG G., TONG H., CHU C., 2017. Brassinosteroids regulate OFP1, a DLT interacting protein, to modulate plant architecture and grain morphology in rice. *Front. Plant Sci.* 8, 1698.
- XIE K., WU C., XIONG L., 2006. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol.* 142, 280-293.
- XIE W., WENG A., MELZIG M., 2016. MicroRNAs as new bioactive components in medicinal plants. *Planta Med.* 82, 1153-1162.
- XIE Z., ALLEN E., FAHLGREN N., CALAMAR A., GIVAN S. A., CARRINGTON J. C., 2005. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol.* 138, 2145-2154.
- XIE Z., KASSCHAU K. D., CARRINGTON J. C., 2003. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr. Biol.* 13, 784-789.
- XIN M., WANG Y., YAO Y., XIE C., PENG H., NI Z., SUN Q., 2010. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol.* 10, 123.
- XU M., HU T., ZHAO J., PARK M. Y., EARLEY K. W., WU G., YANG L., POETHIG R. S., 2016. Developmental functions of miR156-regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 12, e1006263.
- XUE X.-Y., ZHAO B., CHAO L.-M., CHEN D.-Y., CUI W.-R., MAO Y.-B., WANG L.-J., CHEN X.-Y., 2014. Interaction between two timing microRNAs controls trichome distribution in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 10, e1004266.
- YANG C., LI D., MAO D., LIU X., JI C., LI X., ZHAO X., CHENG Z., CHEN C., ZHU L., 2013. Overexpression of microRNA319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant. Cell Environ.* 36, 2207-2218.
- YANG C., MA Y., HE Y., TIAN Z., LI J., 2017. OsOPF19 modulates plant architecture by integrating the cell division pattern and brassinosteroid signaling. *Plant J.* 93, 489-501.
- YANG L., MU X., LIU C., CAI J., SHI K., ZHU W., YANG Q., 2015. Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection. *J. Integr. Plant Biol.* 57, 1078-1088.
- YOU J., CHAN Z., 2015. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Front. Plant Sci.* 6, 1092.
- ZHAI J., JEONG D.-H., DE PAOLI E., PARK S., ROSEN B. D., LI Y., GONZÁLEZ A. J., YAN Z., KITTO S. L., GRUSAK M. A., JACKSON S. A., STACEY G., COOK D. R., GREEN P. J., SHERRIER D. J., MEYERS B. C., 2011. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev.* 25, 2540-2553.
- ZHANG B., WANG Q., 2015. MicroRNA-based biotechnology for plant improvement. *J. Cell Physiol.* 230, 1-15.
- ZHANG L., HOU D., CHEN X., LI D., ZHU L., ZHANG Y., LI J., BIAN Z., LIANG X., CAI X., YIN Y., WANG C., ZHANG T., ZHU D., ZHANG D., XU J., CHEN Q., BA Y., LIU J., WANG Q., CHEN J., WANG J., WANG M., ZHANG Q., ZHANG J., ZEN K., ZHANG C.-Y., 2012. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* 22, 107-126.
- ZHANG X., ZOU Z., GONG P., ZHANG J., ZIAF K., LI H., XIAO F., YE Z., 2011. Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnol. Lett.* 33, 403-409.
- ZHANG X., ZOU Z., ZHANG J., ZHANG Y., HAN Q., HU T., XU X., LIU H., LI H., YE Z., 2011. Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. *FEBS Lett.* 585, 435-439.
- ZHANG Y., XIA R., KUANG H., MEYERS B. C., 2016. The diversification of plant NBS-LRR defense genes directs the evolution of microRNAs that target them. *Mol. Biol. Evol.* 33, 2692-2705.
- ZHANG Y.-C., YU Y., WANG C.-Y., LI Z.-Y., LIU Q., XU J., LIAO J.-Y., WANG X.-J., QU L.-H., CHEN F., XIN P., YAN C., CHU J., LI H.-Q., CHEN Y.-Q., 2013. Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nat. Biotechnol.* 31, 848-852.
- ZHOU M., LI D., LI Z., HU Q., YANG C., ZHU L., LUO H., 2013. Constitutive expression of a miR319 gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant Physiol.* 161, 1375-1391.



**KOSMOS Vol. 68, 1, 167–183, 2019**

MILENA KULASEK, JACEK KEŚY, PAULINA GLAZIŃSKA

*Faculty of Biology and Environmental Science, Department of Plant Physiology and Biotechnology, Nicolaus Copernicus University,  
1 Lwowska Str., 87-100 Toruń, E-mail: Paulina.Glazinska@umk.pl, milena.kulasek@gmail.com, kesy@umk.pl*

## miRNA AS A TOOL FOR OPTIMIZATION OF CROP YIELD IN CULTIVATED PLANTS

## Summary

The growing global food demand requires the development of new strategies for improvement of cultivated plants in order to increase crop yield and quality. Some promising approaches to solving this problem are based on the application of the ever-expanding knowledge about miRNAs, a class of endogenous small RNA molecules that negatively regulate gene expression at the transcriptional and post-transcriptional level. The emerging technologies are based on genetic manipulations leading to: changes in miRNA expression, creation of an artificial miRNA (amiRNA) or modifications of their target genes conferring loss of sensitivity to miRNA. Among many physiological processes through which crop yield can be influenced, the following deserve particular attention: regulation of juvenile-to-adult and adult-to-generative phase transitions, shaping plant architecture (tillering), fruit ripening, parthenocarp induction, reactions to biotic and abiotic stresses.

Keywords: amiRNA, crop yield, genetically modified plants, miRNA, stress