

Interferencija RNA u odgovoru biljke na biotički i abiotički stres

Drmić, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:365999>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Josipa Drmić

**Interferencija RNA u odgovoru biljke na
biotički i abiotički stres**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Josipa Drmić

**RNA interference in the plant biotic and
abiotic stress response**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularna biologija na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Interferencija RNA u odgovoru biljke na biotički i abiotički stres

Josipa Drmić

Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Hrvatska

U biljkama, interferencija RNA ključna je u regulaciji brojnih razvojnih i fizioloških procesa te biljnog odgovora na stres. Brojni biotički i abiotički čimbenici koji uzrokuju stres u biljci izazivaju promjene u razini ekspresije specifičnih malih nekodirajućih molekula RNA, poput mikroRNA i malih interferirajućih RNA, koje mijenjaju ekspresiju gena uključenih u odgovor biljke na stres i uspostavljanje rezistencije. Navedeni mehanizam biljkama omogućuje preživljavanje različitih nepovoljnih uvjeta u okolišu, od suše, ekstremnih temperatura, UV zračenja, visokog saliniteta i teških metala, do napada patogena i nametnika. Male molekule RNA mogu djelovati na transkripcijskoj razini, potičući metilaciju DNA *de novo* i na taj način utišavajući ekspresiju ciljnog gena, ili pak na post-transkripcijskoj razini, sprječavajući translaciju sa ciljne mRNA i/ili potičući njezinu degradaciju. Tehnologija interferencije RNA ima veliki potencijal postati moćan, precizan i ekološki prihvatljiv alat za dobivanje poljoprivrednih kultura otpornih na razne abiotičke i biotičke čimbenike.

Ključne riječi: epigenetika, mikroRNA, siRNA, otpornost, poljoprivreda, biopesticidi
(25 stranica, 8 slika, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

RNA interference in the plant biotic and abiotic stress response

Josipa Drmić

Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Croatia

In plants, RNA interference is a key in regulation of various developmental and physiological processes, as well as the plant stress response. Many different biotic and abiotic factors which cause stress in plants trigger changes in expression levels of specific small non-coding RNAs, such as microRNAs and small interfering RNAs, which consequently change the expression of stress-responsive and resistance genes. This mechanism allows plants to survive various adverse conditions in the environment, such as drought, extreme temperatures, UV radiation, salinity, heavy metals, as well as pathogen and pest infestations. Small RNAs can operate on a transcriptional level, triggering *de novo* DNA methylation and thus inhibiting the expression of target genes, or on a post-transcriptional level, preventing the translation of target mRNAs and/or triggering their degradation. RNA interference technology has a great potential to become a powerful, precise and eco-friendly tool for producing crops resistant to various biotic and abiotic factors.

Keywords: epigenetics, miRNA, siRNA, resistance, agriculture, biopesticides
(25 pages, 8 figures, 60 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Interferencija RNA.....	1
1.2. Interferencija RNA u biljaka	1
2. Male molekule RNA u biljaka.....	2
2.1. Biogeneza i mehanizam djelovanja mikroRNA.....	3
2.2. Biogeneza i mehanizam djelovanja malih interferirajućih molekula RNA	5
2.3. Metilacija DNA posredovana malim molekulama RNA	6
3. Uloga interferencije RNA u odgovoru na biotički stres.....	7
3.1. Uloga mikroRNA u odgovoru na biotički stres	7
3.2. Uloga malih interferirajućih molekula RNA u odgovoru na biotički stres	10
4. Uloga interferencije RNA u odgovoru na abiotički stres.....	12
4.1. Uloga mikroRNA u odgovoru na abiotički stres.....	12
4.2. Uloga malih interferirajućih molekula RNA u odgovoru na abiotički stres	14
5. Primjena tehnologije RNA u poljoprivredi	16
6. Zaključak	18
7. Literatura	20
8. Životopis.....	25

1. Uvod

1.1. Interferencija RNA

Promjene u ekspresiji gena nužne su za uspješan rast i razvoj svih stanica živih organizama. Kod višestaničnih eukariota, ekspresija gena različita je u različitim tkivima i različitim fazama razvoja. Regulacija genske ekspresije složen je proces koji se odvija na više razina i u koji je uključen veliki broj mehanizama. Interferencija RNA (eng. *RNA interference*, RNAi) pojava je koja obuhvaća veliki broj visoko konzerviranih procesa u kojima male nekodirajuće molekule RNA duge 20-30 nukleotida reguliraju ekspresiju gena u biljaka, gljiva i životinja (Matzke i Mosher 2014). Procesima RNAi utišava se ekspresija gena i aktivnost transkripata uključenih u bitne biokemijske i fiziološke procese (Kaur i sur. 2021). Proces u kojem do vidljivih promjena fenotipa dolazi zbog utišavanja ciljnih gena uslijed ekspresije njima komplementarnih sekvenci opisan je po prvi puta u biljkama i nazvan ko-supresijom (Napoli i sur. 1990). Nakon toga, ovaj mehanizam opisan u gljivama nazvan je gušenjem (eng. *quelling*) (Romano i Macino 1992). Mehanizam koji je danas poznat pod nazivom interferencija RNA u potpunosti je opisan u obliku *Caenorhabditis elegans* (Fire i sur. 1998). Svojstvo na kojem se temelje svi procesi RNAi je komplementarnost male molekule RNA sa ciljnom molekulom mRNA ili DNA (Hung i Slotkin 2021). Svega 2% ukupne transkribirane eukariotske RNA čine mRNA koje kodiraju za proteine. Ostatak čine nekodirajuće RNA koje imaju razne regulatorne uloge na transkripcijskoj i post-transkripcijskoj razini (Tiwari i Rajam 2022). U procesu transkripcijskog utišavanja gena (eng. *transcriptional gene silencing*, TGS), male RNA u jezgri prepoznaju komplementarne dijelove DNA, potičući na njima epigenetičke promjene poput metilacije DNA i histona, s ciljem inhibicije ekspresije ciljnih gena (Movahedi i sur. 2018). U procesu post-transkripcijskog utišavanja gena (eng. *post-transcriptional gene silencing*, PTGS), male RNA komplementarno se sparuju s ciljnim molekulama mRNA u citoplazmi, potičući njihovu degradaciju ili sprječavajući njihovu translaciju (Matzke i Mosher 2014; Movahedi i sur. 2018).

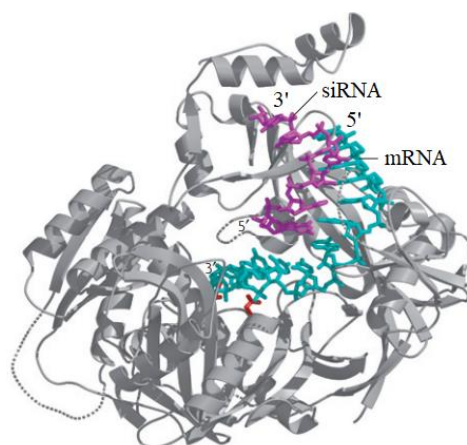
1.2. Interferencija RNA u biljaka

Posljedica sesilnog načina života biljaka je sposobnost da brzo i učinkovito mijenjaju svoj transkriptom kao odgovor na česte promjene uvjeta u okolišu. Neprestano izlaganje različitim izvorima biotičkog i abiotičkog stresa zahtijeva učestale i značajne promjene genske ekspresije koje rezultiraju adaptacijom (Šečić i sur. 2021). Važnu ulogu u toj regulaciji imaju epigenetički

mehanizmi koji promjenom strukture kromatina mijenjaju ekspresiju gena (Kaur i sur. 2021). Uz metilaciju DNA i modifikaciju histona, važan epigenetički mehanizam u biljkama upravo su procesi RNAi koji potiču brzi i efikasni odgovor biljke na abiotički i biotički stres, omogućujući joj preživljavanje raznih nepovoljnih uvjeta u okolišu (Kaur i sur. 2021; Tiwari i Rajam 2022). RNAi ima ulogu u obrani od biljnih patogena, kontroli razvoja patogenih tumora, te povećanju otpornosti biljke na abiotički stres (Matzke i Mosher 2014). Osim u odgovoru na stres, u biljaka je RNAi prisutna i u brojnim razvojnim procesima, poput očuvanja metilacijskih obrazaca u genomu, očuvanja stabilnosti genoma utišavanjem transpozona, međustanične komunikacije na male i velike udaljenosti, stvaranja epialela i specifikacije stanica gametofita (Matzke i Mosher 2014; Hung i Slotkin 2021).

2. Male molekule RNA u biljaka

Male molekule RNA uključene u procese biljne RNAi dijele se na mikroRNA (miRNA) i male interferirajuće RNA (eng. *small interfering RNAs*, siRNA), a podjela se vrši na temelju podrijetla dvolančane RNA od koje nastaju (Kaur i sur. 2021). U procesu nastanka malih molekula RNA sudjeluje skupina biljnih proteina Dicer-like (DCL), RNAza tipa III koje sadrže helikaznu i dvije RNAzne domene (Tiwari i Rajam 2022). Dok animalni proteini Dicer djeluju u citoplazmi, biljni proteini DCL djeluju u jezgri, gdje se odvija veći dio biosinteze miRNA. Zrele male molekule RNA ostvaruju izravne interakcije s proteinima iz visoko konzervirane porodice Argonaute (AGO), formirajući kompleks RISC (eng. *RNA-induced silencing complex*) unutar kojeg ih navode na ciljnu molekulu mRNA ili DNA (**Slika 1**) (Sashital i Doudna 2010).

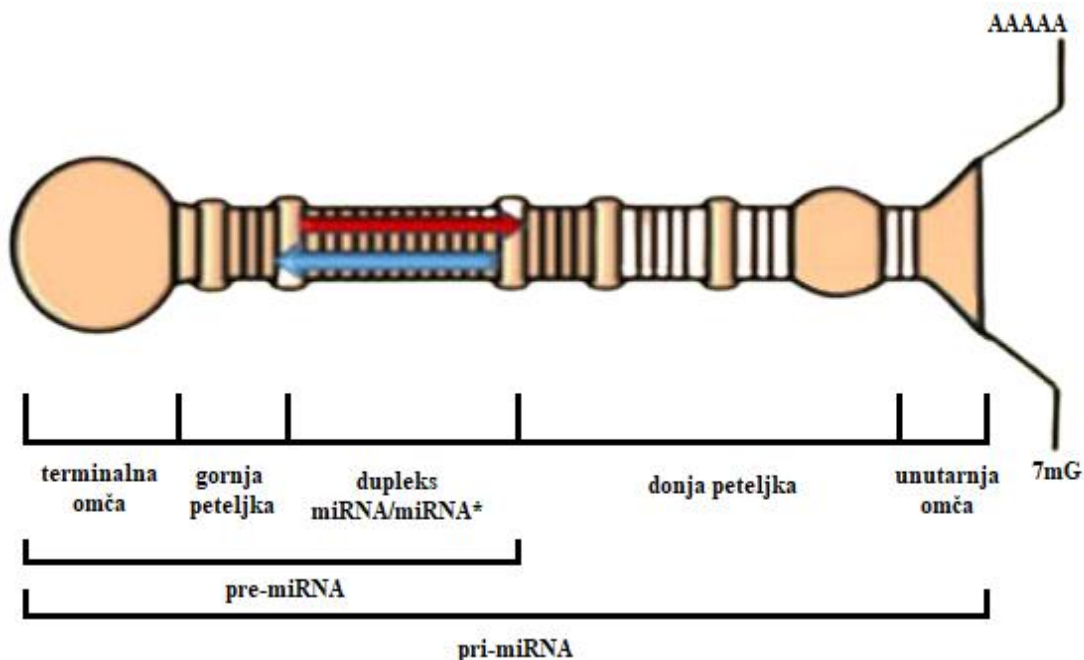


Slika 1. Kristalna struktura proteina Argonaute (AGO) iz bakterije *Pyrococcus furiosus* u kompleksu sa molekulom siRNA i ciljnom mRNA. Preuzeto iz Hutvagner i Simard (2008).

Glavni biljni modelni organizam u molekularnoj biologiji, uročnjak (*Arabidopsis thaliana*), ima četiri proteina iz porodice DCL, te čak deset proteina iz porodice AGO (Matzke i Mosher 2014).

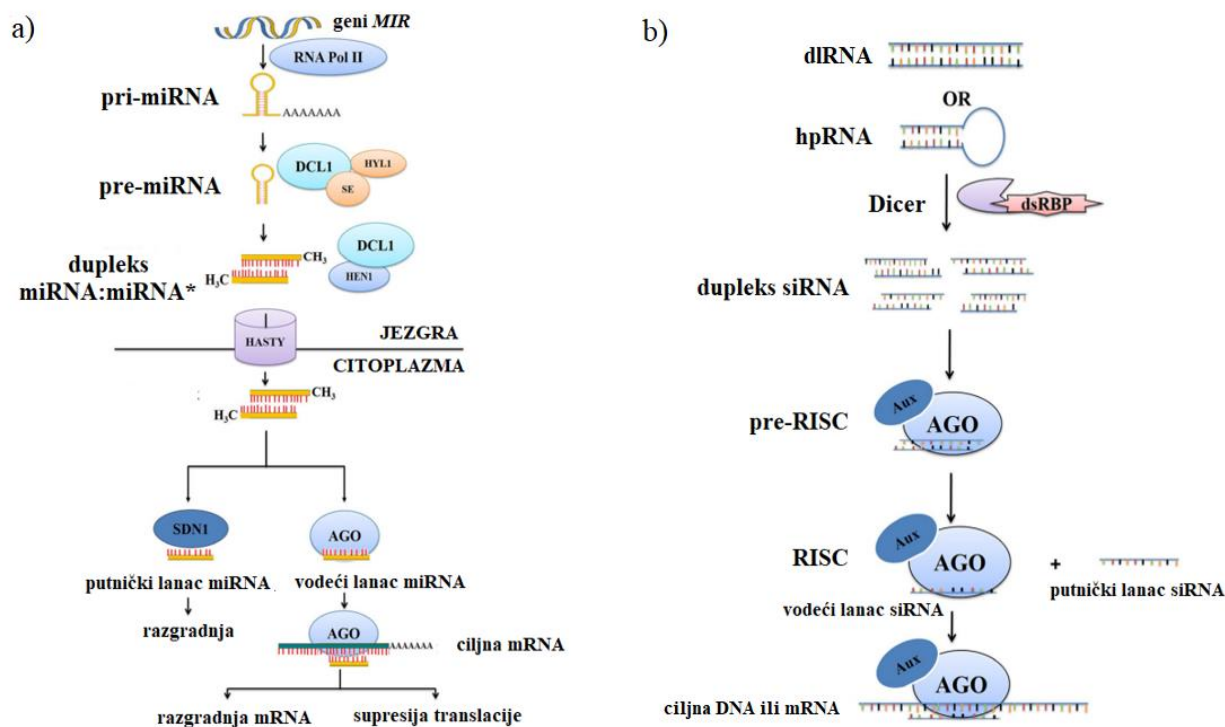
2.1. Biogeneza i mehanizam djelovanja mikroRNA

MikroRNA (miRNA) su nekodirajuće jednolančane molekule RNA duge 18-21 nukleotida koje u citoplazmi sudjeluju u procesu post-transkripcijskog utišavanja gena (Matzke i Mosher 2014, Meister 2013). Na temelju komplementarnosti prepoznaju ciljne molekule mRNA, označavajući ih za degradaciju ili sprječavajući njihovu translaciju u protein (Šečić i sur. 2021). Molekule miRNA endogenog su podrijetla (Kaur i sur. 2021). Njihova biosinteza počinje transkripcijom s jezgrinih gena *MIR* aktivnošću RNA polimeraze II, čime nastaju primarne molekule miRNA (eng. *primary miRNAs*, pri-miRNA) (Movahedi i sur. 2018). Transkripti pri-miRNA formiraju sekundarnu strukturu ukosnice (**Slika 2**) koja se sastoji od terminalne omče, gornje i donje regije dvolančane RNA slabije komplementarnosti (gornja i donja peteljka) između kojih se nalazi dvolančana regija miRNA:miRNA* visoke komplementarnosti, te bazalnih jednolančanih segmenata (Zhu i sur. 2013a). Donja peteljka sadrži unutarnju omču i predstavlja vezno mjesto za protein Dicer-like 1 (DCL1) (Movahedi i sur. 2018).



Slika 2. Struktura primarne molekule RNA iz koje daljnjim procesiranjem nastaju male regulatorne molekule miRNA. Kratice: 7mG – 7-metilgvanozin, pre-miRNA – prekursorska mikroRNA, pri-miRNA – primarna mikroRNA. Preuzeto i prilagođeno prema Movahedi i sur. (2018).

Prvi korak u doradi pri-miRNA (**Slika 3a**) je formacija strukture d-tijela (eng. *d-body*, *dicing-body*), kompleksa sačinjenog od proteina DCL1 i njegovih kofaktora, od kojih su ključni protein s motivom cinkovih prstiju SE (eng. *serrate*) i DNA-vezujući protein HYL1 (eng. *hyponastic leaves 1*) (Wang i sur. 2019). Protein CBP20/80 (eng. *Cap binding protein*) veže se na 5' kapu pri-miRNA, a čitav kompleks d-tijela dodatno je stabiliziran proteinom DAWDLE (Zhu i sur. 2013a; Movahedi i sur. 2018), čija je aktivnost regulirana djelovanjem specifičnih kinaza i fosfataza (Kaur i sur. 2021). DCL1 cijepa pri-miRNA u području donje peteljke, te nastaje prekursorska miRNA (pre-miRNA). U sljedećem koraku, DCL1 iz pre-miRNA odcjepljuje gornju peteljku i terminalnu omču, te preostaje samo nestabilni dupleks miRNA:miRNA* (Movahedi i sur. 2018; Kaur i sur. 2021). Jezgrina metiltransferaza HEN1 (eng. *Hua enhancer 1*) zatim metilira 3' krajeve oba lanca dupleksa za zaštitu od degradacije egz nukleazama. Zaštićeni dupleski izlaze iz jezgre u citoplazmu pomoću proteina HASTY, gdje ulaze u interakciju sa kompleksom RISC (Movahedi i sur. 2018). Protein Argonaute 1 (AGO1) ulazi u direktnu interakciju s vodećim (eng. *guide*) lancem miRNA, dok njemu komplementarni putnički (eng. *passenger*) lanac miRNA* disocira i podliježe razgradnji posredovanoj enzimom SDN (eng. *sRNA degrading enzyme*) (Kaur i sur. 2021). U nekim slučajevima, miRNA* također može imati određenu funkciju u stanici (Meister 2013). U sklopu nastalog kompleksa RISC-miRNA (RImR), miRNA navodi protein AGO1 do ciljane mRNA. Ukoliko se miRNA komplementarno sparuje s nekodirajućom 3'-UTR regijom mRNA, inhibira se translacija mRNA u protein. Ukoliko se sparivanje događa u kodirajućoj regiji, kompleks RImR potiče degradaciju ciljane mRNA uz pomoć proteina SQN i HSP90 (Movahedi i sur. 2018). S obzirom da se prepoznavanje ciljane mRNA zasniva isključivo na temelju komplementarnosti sekvenci, često jedna miRNA prepoznaje više različitih mRNA, ili pak više različitih miRNA ciljno prepoznaje i utišava istu molekulu mRNA (Šečić i sur. 2021). Pocijepani fragmenti mRNA mogu poslužiti kao kalup za ponovnu biosintezu prekursorskih dvolančanih RNA (dIRNA) iz kojih nastaju sekundarne molekule siRNA, pri čemu se mehanizmom pozitivne povratne sprege pojačava učinak RNAi na razini translacije (Hung i Slotkin 2021). Obrasci ekspresije miRNA visoko su konzervirani u svih eukariota, a uvelike ovise o razvojnem stadiju organizma i vrsti tkiva (Šečić i sur. 2021). Prema bazi podataka miRbase (v22.1, pristupljeno 27.7.2021.) do danas je opisano 428 zrelih miRNA iz uročnjaka (*A. thaliana*), 164 iz duhana (*Nicotiana tabacum*) te čak 738 iz riže (*Oryza sativa*).



Slika 3. Biosinteza malih molekula RNA i mehanizam interferencije RNA u biljaka. **a)** Biosinteza i mehanizam djelovanja miRNA. **b)** Biosinteza i mehanizam djelovanja siRNA. Kratice: AGO – Argonaute, Aux – pomoćni proteini (eng. *auxiliary proteins*), DCL1 – Dicer-like 1, dsRBP – dIRNA-vezujući proteini, dIRNA – dvolančana RNA, HEN1 – eng. *HUA enhancer 1*, hpRNA – RNA strukture ukosnice, HYL1 – eng. *hyponastic leaves 1*, MIR – geni koji kodiraju za mikroRNA, mRNA – glasnička RNA, pre-miRNA – prekursorska mikroRNA, pre-RISC – prekursorski utišavajući kompleks induciran molekulom RNA, pri-miRNA – primarna mikroRNA, RNA Pol II – RNA polimeraza II, SDN1 – enzim koji razgrađuje male molekule RNA, SE – eng. *serrate*, siRNA – mala interferirajuća RNA. Preuzeto i prilagođeno iz Kaur i sur. (2021).

2.2. Biogeneza i mehanizam djelovanja malih interferirajućih molekula RNA

Male interferirajuće molekule RNA (siRNA) su nekodirajuće jednolančane molekule RNA duge 21-24 nukleotida koje sudjeluju u raznim procesima biljne RNAi (Kaur i sur. 2021). Prekursorske dvolančane RNA iz kojih nastaju molekule siRNA mogu biti virusnog, transpozonskog ili transgeničnog podrijetla, ili pak aberantne mRNA nastale preuranjenom terminacijom transkripcije ili krivim izrezivanjem introna (Kaur i sur. 2021). Ipak, dIRNA najčešće nastaju u jezgri, transkripcijom DNA u oba smjera (*sense* i *antisense*), ili pak transkripcijom inverznih ponavljanja dugih 200-300 pb između kojih se nalazi intronska razmaknica, te nastaju dIRNA strukture ukosnice (Kaur i sur. 2021). Inverzne repeticije komplementarne su dijelovima genskih sekvenci, i daljnjim procesiranjem takvih ukosnica nastaju siRNA koje utišavaju ekspresiju ciljnih gena

(Kaur i sur. 2021). Protein Dicer, endoribonukleaza tipa III, cijepa prekursorske diRNA do kratkih dupleksa siRNA (**Slika 3b**). U sljedećem se koraku lanci dupleksa razdvajaju. Vodeći ili *antisense* lanac siRNA sa efektorskim proteinom AGO stvara kompleks RISC, dok *sense* ili putnički lanac siRNA podliježe razgradnji. *Antisense* siRNA u sklopu kompleksa RISC navodi protein AGO do komplementarne sekvence u genomu te potiče supresiju ciljnog gena (Kaur i sur. 2021). Ovisno o putu sinteze i funkciji, biljne siRNA mogu se dalje podijeliti na trans-djelujuće siRNA (ta-siRNA), phasiRNA (eng. *phased siRNAs*), heterokromatinske siRNA (hc-siRNA), nat-siRNA (eng. *natural antisense transcript-derived siRNAs*), i duge siRNA (lsiRNA) (Huang i Jin 2022).

2.3. Metilacija DNA posredovana malim molekulama RNA

Bitan epigenetički mehanizam u kojem sudjeluju molekule siRNA je metilacija DNA posredovana malim molekulama RNA (eng. *RNA-directed DNA methylation*, RdDM) (Kaur i sur. 2021). U tom biljno-specifičnom procesu, prvi put primjećenom u odgovoru biljke na infekciju RNA virusima, sudjeluju dvije DNA-ovisne RNA polimeraze, Pol IV i Pol V (Matzke i Mosher 2014; Kaur i sur. 2021). Ova dva enzima evoluirala su iz eukariotske RNA polimeraze II koja vrši transkripciju prekursorskih molekula mRNA (Matzke i Mosher 2014). Još uvijek nije najjasnije na koji se način Pol IV i Pol V navode na ciljna mjesta u genomu, no istraživanja su pokazala kako one najčešće djeluju u području eukromatina, specifičnije, na mjestima malih i aktivnih transpozona ili ponavljajućih sekvenci (Matzke i Mosher 2014). Transkripti RNA polimeraze IV duge su jednolančane molekule RNA (jlRNA) koje služe kao kalup RNA-ovisnoj RNA polimerazi 2 (RDR2) koja sintetizira i drugi lanac RNA. Nastaju duge molekule diRNA koje protein Dicer-like 3 (DCL3) cijepa na kraće prekursorske siRNA od 24 nukleotida. Nakon metilacije njihovih 3'-OH krajeva metiltransferazom HEN1, stabilizirane molekule siRNA odlaze u citoplazmu. Vodeći lanac siRNA u citoplazmi stvara kompleks sa proteinom Argonaute 4 (AGO4), koji se zatim vraća u jezgru (Matzke i Mosher 2014). Osim AGO4, u kanonskom putu RdDM u uročnjaka sudjeluju još AGO6 i AGO9 (Matzke i Mosher 2014). RNA polimeraza V djeluje na ciljnom mjestu za metilaciju *de novo*, proizvodeći duge, nekodirajuće potporne RNA (eng. *scaffold RNA*) koje se komplementarno sparuju sa molekulama siRNA iz kompleksa siRNA-AGO4/6/9. Jedan od proteina iz kompleksa DDR koji omogućuje vezanje Pol V na kromatin i njezinu transkripciju je protein RDM1 (eng. *RNA-directed DNA methylation 1*), koji istovremeno stupa u interakciju s AGO4/6/9 i metiltransferazom DRM2 (eng. *Domains rearranged methyltransferase 2*), navodeći

DRM2 na asimetričnu metilaciju ciljnog mjesta u molekuli DNA *de novo* (Matzke i Mosher 2014). Ovo rezultira utišavanjem transkripcije ciljnih gena, transpozona ili ponavljajućih sekvenci.

3. Uloga interferencije RNA u odgovoru na biotički stres

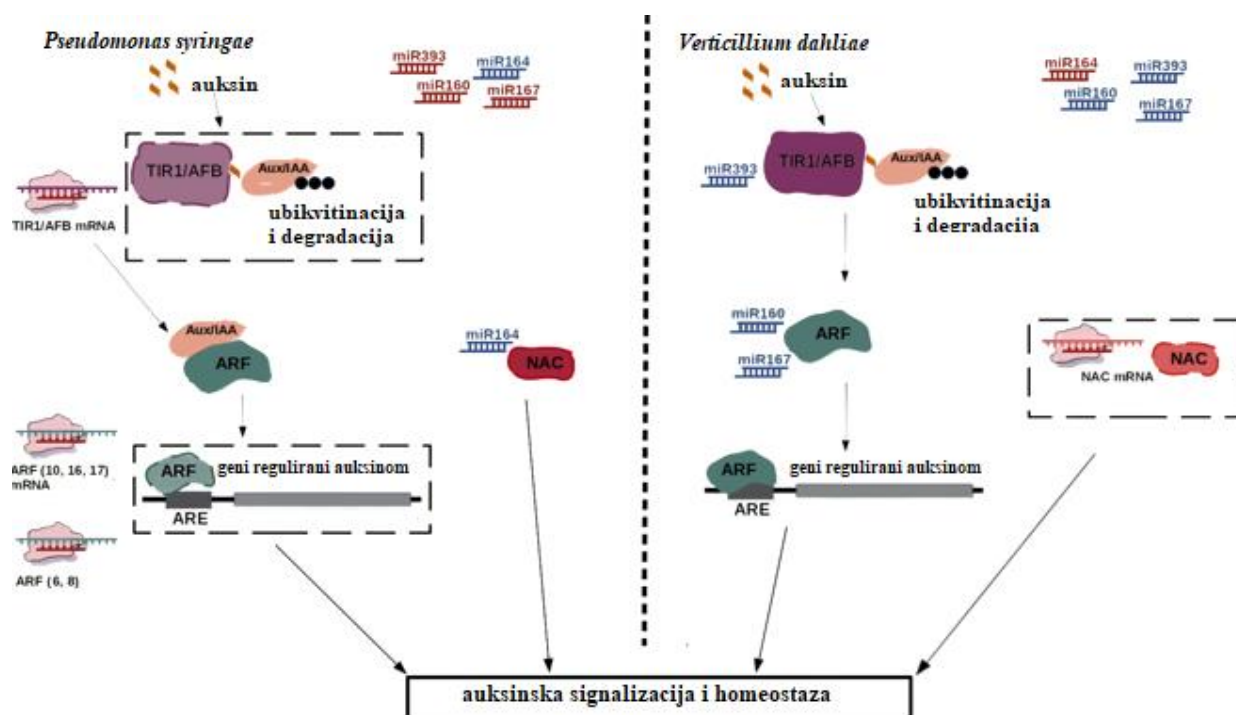
Biotički stres u biljaka podrazumijeva infekcije patogenim mikroorganizmima poput bakterija, gljiva, oomiceta i virusa, te napade nametnika poput oblića, ličinki i kukaca. Biljke posjeduju membranske receptore pomoću kojih prepoznaju visoko konzervirane molekularne obrasce patogenog podrijetla, PAMP (eng. *pathogen-associated molecular patterns*), što izaziva opći, nespecifični imunosni odgovor PTI (eng. *PAMP-triggered immunity*) (Huang i Jin 2022). Primjer PAMP-a je bakterijski peptid flagelin 22 (flg22) koji inducira promjenu ekspresije brojnih biljnih miRNA (Šečić i sur. 2021). Također, patogeni u biljnu stanicu šalju brojne efektorske molekule koje prepoznaju biljni receptori s nukleotid-vezujućom domenom i protein-vezujućom domenom bogatom leucinom (eng. *nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors*, NLRs), izazivajući brzi i snažni imunosni odgovor ETI (eng. *effector-triggered immunity*) (Šečić i sur. 2021; Huang i Jin 2022). Biljni obrambeni odgovor na infekcije uključuje brze promjene genske ekspresije regulirane na transkripcijskoj i post-transkripcijskoj razini, a veliku ulogu u njima imaju procesi RNAi (Huang i Jin 2022). Najintenzivnije promjene događaju se na razini hormonske signalizacije, posebno signalizacije salicilnom kiselinom (SA), jasmonskom kiselinom (JA) i etilenom (Huang i Jin 2022).

3.1. Uloga mikroRNA u odgovoru na biotički stres

Učinak biotičkog stresa na ekspresiju miRNA može biti pozitivan ili negativan (Šečić i sur. 2021). Prva miRNA čija je regulacija povezana sa biotičkim stresom je *MiR393* iz uročnjaka. Njezinu ekspresiju potiče infekcija bakterijskim patogenom, preciznije, bakterijski peptid flg22 (Navarro i sur. 2006; Šečić i sur. 2021). *MiR393* utišava transkripte gena za auksinske koreceptore TIR1 (eng. *transport inhibitor response 1*) i AFB (eng. *auxin-signalling F-box*) (Navarro i sur. 2006). To su proteini koji u prisutnosti auksina posreduju u ubikvitinaciji inhibitora auksinskog odgovora iz porodice AUX/IAA (eng. *auxin/indol acetic acid proteins*) i na taj način omogućavaju transkripciju gena auksinskog odgovora (eng. *auxin responsive genes*) (**Slika 4**) (Šečić i sur. 2021). Dakle, posljedica ekspresije *miR393* je represija auksinske signalizacije, koja dovodi do povećanja sinteze SA, što biljci omogućuje rezistenciju na infekciju brojnim biotrofnim i hemibiotrofnim

mikroorganizmima uključujući oomicete, gljive i bakterije (Fahlgren i sur. 2007; Naseem i sur. 2015; Šečić i sur. 2021). S druge strane, infekcija nekrotrofnim mikroorganizmima, poput gljive *Verticillium dahliae*, ima suprotan, negativni učinak na ekspresiju *miR393* (Yang i sur. 2013). *MiR393* također pozitivno utječe na sintezu velikog broja sekundarnih biljnih metabolita, od kojih mnogi imaju antimikrobna svojstva i time uvelike pridonose biljnoj obrani od patogena i nametnika (Šečić i sur. 2021). Regulacija auksinske signalizacije aktivnošću miRNA učestala je strategija biljaka u odgovoru na infekciju patogenima (**Slika 4**) (Šečić i sur. 2021). Osim *miR393*, bakterijski peptid flg22 potiče i ekspresiju *miR160* i *miR167*, čije su mete transkripcijski faktori iz porodice ARF (eng. *auxin response factors*). Nadalje, flg22 potiče i ekspresiju *miR164* koja regulira ekspresiju transkripcijskih faktora s domenom NAC (eng. *NAM - no apical meristem*, *ATAF1/2 - Arabidopsis transcription activation factor*, *CUC - cup-shaped cotyledon*) (Rhoades i sur. 2002; Šečić i sur. 2021). Suprotno od *miR393*, ekspresija *miR164* pozitivno je regulirana prilikom infekcije biljke s nekrotrofnom gljivom *V. dahliae* (**Slika 4, desno**) pri čemu dolazi do degradacije transkripata za proteine NAC što doprinosi rezistenciji biljke na infekciju gljivom (Guo i sur. 2005; Šečić i sur. 2021). Bakterijske infekcije uročnjaka dovode do pojačane ekspresije transkripcijskog faktora NAC4, čije su mete negativni regulatori hipersenzitivnog odgovora (HR), oblika programirane stanične smrti (Lee i sur. 2017). *MiR164* svojom aktivnošću negativno regulira aktivnost NAC4, i na taj način smanjuje stopu programirane stanične smrti, omogućujući biljci preživljavanje infekcije patogenom (Lee i sur. 2017; Šečić i sur. 2021). Ključnu ulogu u odgovoru na biotički stres i regulaciji hormonske signalizacije ima *miR169*, koja se u uročnjaku pojavljuje u čak 4 zrele izoforme (Zhang i sur. 2017; Šečić i sur. 2021). Njezinu ekspresiju također potiče flg22. Meta *miR169* je transkripcijski faktor HAP2 (eng. *heme activator protein 2*) koji djeluje kao supresor gena *YUC2* (eng. *Yucca 2*) uključenog u biosintezu auksina (Zhang i sur. 2017). U kukuruzu zaraženom gljivom *Colletotrichum graminicola* smanjena ekspresija *miR169* dovodi do pojačane ekspresije enzima AOS (eng. *allene oxide synthase*) koji je uključen u sintezu jasmonske kiseline. Ovo ukazuje da je u uvjetima bez biotičkog stresa uloga *miR169* supresija signalizacije jasmonskom kiselinom (Balmer i sur. 2017). Nadalje, *miR166* sudjeluje u odgovoru na infekcije patogenima u korijenju pamuka, uročnjaka i soje (Šečić i sur. 2021). Zanimljivo je da prisutnost *miR166* i *miR159* primjećena u hifama *V. dahliae* nakon infekcije pamuka dovodi do utišavanja gena ključnih za virulenciju gljive (Zhang i sur. 2016), što ukazuje na mogućnost prijenosa biljnih

miRNA u organizam patogena sa ciljem smanjenja njegove virulentnosti. Protein AGO1, ključan u velikom broju procesa RNAi, sam je reguliran aktivnošću kompleksa miRNA-AGO1. Njegovu aktivnost regulira *miR168*, na taj način utječući na razinu ekspresije čitavog niza transkripata koji su pod regulacijom kompleksa miRNA-AGO1 (Vaucheret i sur. 2006). Mnoga istraživanja ukazuju na pozitivnu ekspresiju *miR168* u odgovoru na infekciju patogenima (Šečić i sur. 2021). Mete *miR398* su enzimi iz porodice superoksid dismutaza (SOD), koji u uvjetima oksidativnog stresa prevode štetne superoksidne ione (O_2^-) do vodikova peroksida i molekularnog kisika (Jagadeeswaran i sur. 2009). Prilikom infekcije uročnjaka bakterijom *Pseudomonas syringae*, *flg22* utišava ekspresiju *miR398* i na taj način pojačava ekspresiju SOD, potičući obrambeni odgovor biljke na bakterijsku infekciju (Jagadeeswaran i sur. 2009). Čitav niz miRNA u normalnim uvjetima ciljno utišava gene za rezistenciju (geni *R*) koji kodiraju za receptore NLR (Šečić i sur. thlioomiceta i gljiva, potičući biljni odgovor na infekciju (Šečić i sur. 2021).

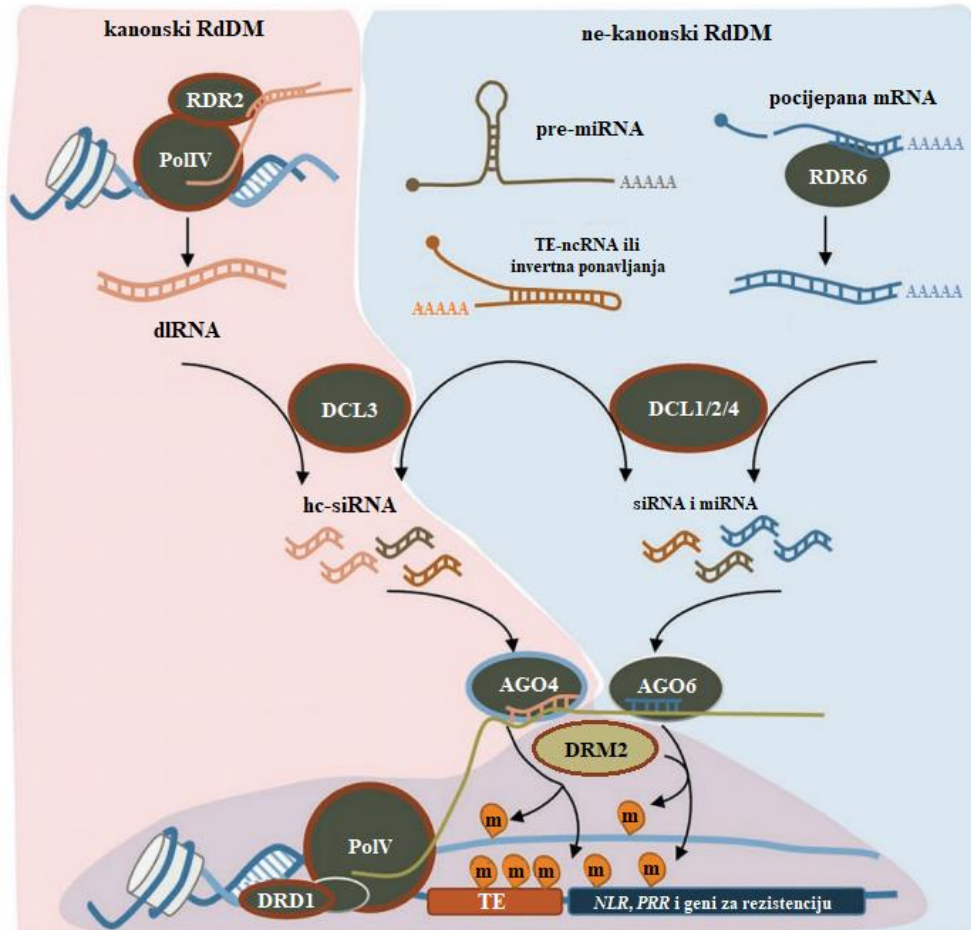


Slika 4. Suprotni učinci infekcije hemibiotrofnom bakterijom *Pseudomonas syringae* (lijevo) i nekrotrofnom gljivom *Verticillium dahliae* (desno) na ekspresiju i djelovanje *miR160*, *miR164*, *miR167* i *miR393* u regulaciji auksinske signalizacije. Crvenom bojom označene su miRNA čija je ekspresija pojačana, a plavom miRNA čija je ekspresija utišana prilikom infekcije. Kratice: AFB – eng. *auxin-signalling F-box*, ARE – eng. *auxin responsive element*, ARF – eng. *auxin response factors*, Aux/IAA – auksin/indol-3-octena kiselina, miR – mikroRNA, NAC – eng. *NAM - no apical meristem*, *ATAF1/2 - Arabidopsis transcription activation factor*, *CUC - cup-shaped cotyledon*, *TIR1* – eng. *transport inhibitor response 1*. Preuzeto i prilagođeno iz Šečić i sur. (2021).

Infekcija rajčice bakterijom *P. syringae*, infekcija pamuka gljivom *V. dahliae* i infekcija soje oomicetom *Phytophthora sojae* pokazuju negativnu regulaciju ekspresije *miR482*, inducirajući time ekspresiju gena *R* što omogućuje obrambeni odgovor biljke (Shivaprasad i sur. 2012; Zhu i sur. 2013b; Wong i sur. 2014). Mnoge 22 nukleotida duge miRNA regrutiraju enzime RDR6 i DCL4 za proizvodnju sekundarnih, 21 nukleotid dugih molekula siRNA na temelju kalupa putničkog lanca miRNA*, amplificirajući svoj učinak utišavanja gena *R* (Šečić i sur. 2021). Neke od njih su već spomenuta *miR482*, te *miR1507*, *miR2109* i *miR2118* (Zhai i sur. 2011; Wong i sur. 2014).

3.2. Uloga malih interferirajućih molekula RNA u odgovoru na biotički stres

Infekcija biljke patogenima i kolonizacija od strane simbiotskih mikroorganizama rezultiraju epigenetičkim promjenama na razini čitavog genoma. To podrazumijeva metilaciju DNA, modifikacije histona i promjene u strukturi kromatina (Zhang i sur. 2018; Huang i Jin 2022). Takve promjene mogu se zadržati i prenijeti na potomstvo, čineći ga otpornijim na izlaganje sličnim uvjetima (Huang i Jin 2022). Najčešća epigenetička posljedica zaraze patogenima je hipometilacija DNA, kao posljedica inhibicije metilacije ili procesa demetilacije (Kaur i sur. 2021). Mjesta na kojima najčešće dolazi do hipometilacije su regije kromatina u blizini gena uključenih u odgovor biljke na stres, u njihovim promotorima ili obližnjim transpozonskim elementima (Kaur i sur. 2021). Takve hipometilacije često dovode do transkripcijske aktivacije gena uključenih u obranu biljke od patogena. Primjer je gen *XA21G* u riži, čija se transkripcija aktivira u slučaju zaustavljene metilacije njegova promotora, omogućujući biljci razvijanje tolerancije prema bakterijskom patogenu *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Akimoto i sur. 2007). Veliku ulogu u induciranju epigenetičkih promjena u odgovoru na biotički stres imaju molekule siRNA u sklopu ranije opisanog procesa RdDM (**Slika 5**) (Huang i Jin 2022). Lokusi s genima za receptore NLR i receptore PRR (eng. *pattern recognition receptors*) koji prepoznaju elemente PAMP često se nalaze u blizini transpozona ili ponavljajućih sekvenci, stoga je njihova ekspresija regulirana aktivnošću hc-siRNA u procesu RdDM (Huang i Jin 2022). Primjer je lokus *Pigm* u riži koji kodira za skupinu gena *NLR* (Deng i sur. 2017). Konstitutivno eksprimirani gen *PigmR* odgovoran je za rezistenciju riže na infekciju gljivom *Magnaportheae oryzae*, dok gen *PigmS* djeluje antagonistički, poboljšavajući prinos riže no smanjujući njezinu otpornost na infekciju patogenom.



Slika 5. Uloga malih molekula RNA i procesa RdDM u epigenetičkoj regulaciji odgovora na biotički stres. Dva enzima ključna za RdDM su RNA polimeraza IV i V. Molekule hc-siRNA koje nastaju u kanonskom putu RdDM, za koji su specifični proteini RDR2, DCL3 i AGO4, ciljno utišavaju transpozonske elemente u blizini gena koji sudjeluju u odgovoru biljke na biotički stres, poput gena za rezistenciju i gena za receptore NLR i PRR. Osim kanonskog, postoji i nekanonski put RdDM koji uključuje male RNA nastale od aberantnih mRNA, invertiranih ponavljanja, TE-ncRNA ili pre-miRNA aktivnošću DCL1/2/4. Ovakve siRNA također sudjeluju u uspostavljanju metilacijskih obrazaca u DNA koji rezultiraju transkripcijski utišanim genima i pojačanom odgovoru na biotički stres. Kratice: AGO – Argonaute, DCL – Dicer-like, DRD1 – kromatin-remodelirajući protein *Defective in RNA-directed DNA methylation 1*, DRM2 – metiltransferaza 2, hc-siRNA – heterokromatinska mala interferirajuća RNA, mRNA – glasnička RNA, NLR – eng. *nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors*, PolIV – RNA polimeraza IV, PolV – RNA polimeraza V, pre-miRNA – prekursorska mikroRNA, PRR – eng. *pattern recognition receptors*, RdDM – metilacija DNA posredovana malim molekulama RNA, RDR2 – RNA-ovisna RNA polimeraza 2, TE – transpozonski element, TE-ncRNA – transpozonska nekodirajuća RNA. Preuzeto i prilagođeno iz Huang i Jin (2022).

Ekspresija gena *PigmS* pod strogom je regulacijom hc-siRNA na epigenetičkoj razini, što osigurava ravnotežu između rezistencije biljke na zaraze patogenima i prinosa (Deng i sur. 2017). Još jedan

primjer iz riže je gen *ST1* koji kodira za protein ključan u signalnom putu *WRKY45*, a čija je ekspresija također regulirana aktivnošću siRNA (Zhang i sur. 2016). Prepisivanjem transpozonskog elementa MITE (eng. *miniature inverted-repeat transposable element*) koji se nalazi unutar introna u sklopu gena *WRKY45-1* nastaje TE-siR815 koja reprimira ekspresiju *ST1* i time smanjuje rezistenciju riže na bakteriju *X. oryzae* pv. *oryzae* (Zhang i sur. 2016).

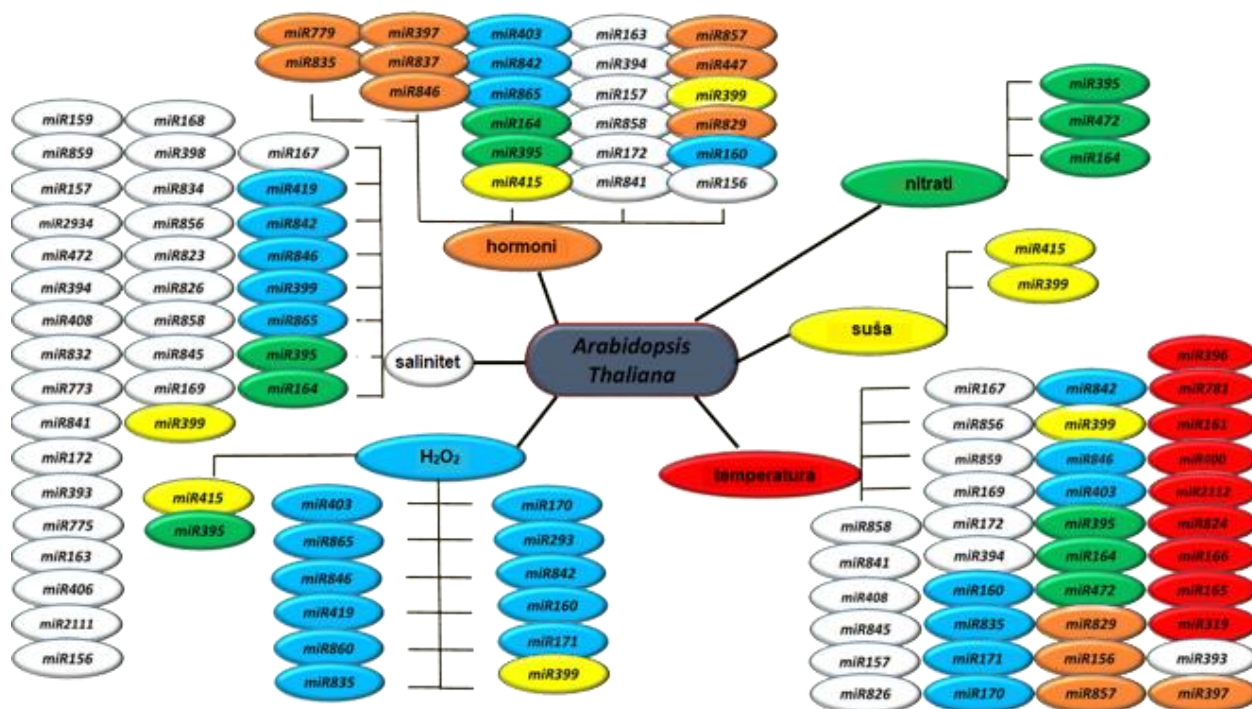
4. Uloga interferencije RNA u odgovoru na abiotički stres

Izrazita fenotipska plastičnost biljaka rezultat je potrebe za preživljavanjem učestalih i intenzivnih promjena uvjeta u okolišu (Abdellatef i sur. 2021; Tiwari i Rajam 2022). Primarni izvori abiotičkog stresa, poput suše, saliniteta, toplinskog stresa, UV zračenja, teških metala, hladnoće, smrzavanja i anoksije u biljci izazivaju sekundarni oksidativni stres. U biljnoj se stanici akumuliraju reaktivni kisikovi radikali (eng. *reactive oxygen species*, ROS) poput vodikova peroksida (H_2O_2), superoksidnih iona (O_2^-) i hidroksilnih radikala, što rezultira oštećenjem staničnih struktura i poremećajem osmotske homeostaze u biljci (Movahedi i sur. 2018; Tiwari i Rajam 2022). Ovo dovodi do inaktivacije staničnih mehanizama te, u konačnici, do smrti biljne stanice. Biljni odgovor na oksidativni stres temelji se na sintezi antioksidativnih enzima i neenzimskih molekula koje vežu i inaktiviraju ROS (Movahedi i sur. 2018). RNAi bitan je regulatorni mehanizam koji omogućuje biljkama brz i precizan odgovor na promjene abiotičkih uvjeta u okolišu. Molekule miRNA i siRNA ključni su regulatori koji mijenjaju razinu ekspresije ciljnih gena uključenih u odgovor biljke na abiotički stres, kako na transkripcijskoj, tako i na post-transkripcijskoj razini (Tiwari i Rajam 2022).

4.1. Uloga mikroRNA u odgovoru na abiotički stres

Ekspresija različitih miRNA mijenja se kao odgovor biljke na abiotički stres (Tiwari i Rajam 2022). Kao i kod biotičkog stresa, regulacija ekspresije pojedinih miRNA pod utjecajem abiotičkog stresa može biti pozitivna ili negativna (Movahedi i sur. 2018). Mnoge miRNA u pojedinoj biljnoj vrsti imaju veći broj uloga i različito su eksprimirane u odgovoru na različite stresore (**Slika 6**). Primjer je *miR393*, koja je različito eksprimirana u uvjetima temperaturnog, solnog i vodnog stresa (Fileccia i sur. 2017), a opisana je i njena uloga u odgovoru na biotički stres. Također, ista miRNA u različitim vrstama može imati različite uloge (Movahedi i sur. 2018). Najistaknutije miRNA u regulaciji biljnog odgovora na sušu su *miR169* i *miR160* (Tiwari i Rajam 2022). *MiR169* u pšenici

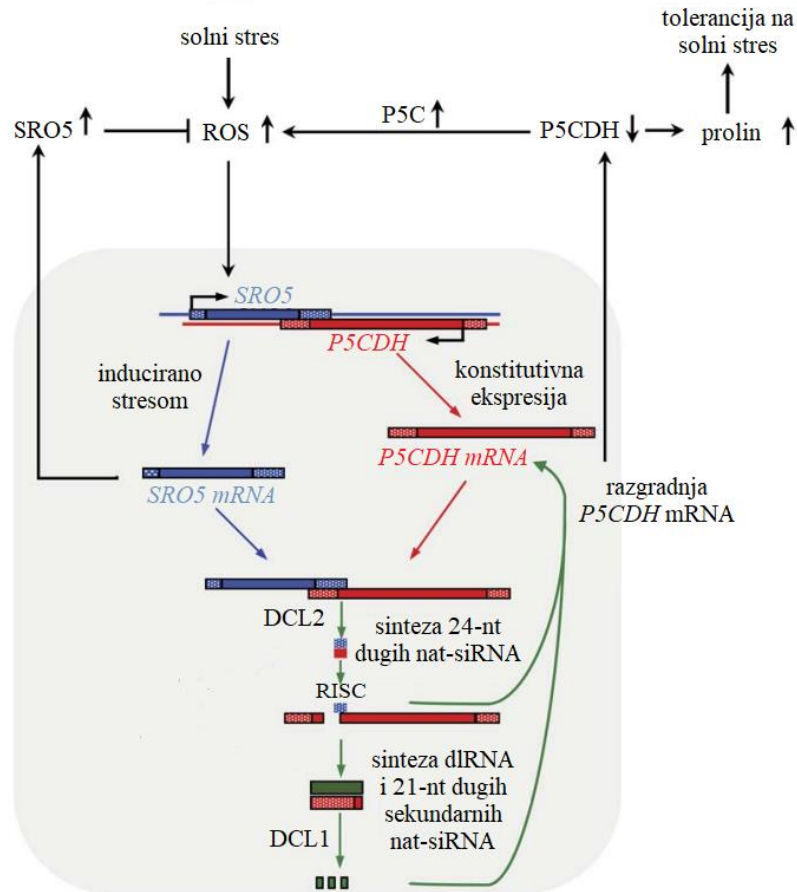
prepoznaje molekulu mRNA koja kodira za transkripcijski faktor iz porodice CCAAT-box vezujućih faktora (Gasparis i sur. 2017). Ekspresiju *miR169* u riži reguliraju transkripcijski faktori DREB (eng. *dehydration response element binding factors*) (Zhao i sur. 2007). Ciljne mRNA koje prepoznaje *miR160* kodiraju za transkripcijske faktore ARF10 i ARF16 uključene u signalizaciju na razini zajedničkog djelovanja auksina i abscizinske kiseline (ABA) u uvjetima suše (Ding i sur. 2013). Regulacija hormonske signalizacije pomoću miRNA prisutna je i u odgovoru biljke na solni stres (Movahedi i sur. 2018). Ding i sur. (2009) pokazali su pozitivnu regulaciju *miR162*, *miR168* i *miR395*, te negativnu regulaciju *miR164*, *miR167*, *miR156* i *miR396* iz kukuruza pod utjecajem solnog stresa. Također, *miR528* iz riže potiče uspješan odgovor biljke na povišeni salinitet (Yuan i sur. 2015). Iglesias i sur. (2014) pokazali su da u uvjetima povišenog saliniteta u uročnjaka dolazi do ekspresije *miR393* koja utišava ekspresiju gena *TIR1* i *AFB2*, i time inhibira signalizaciju auksinom. U odgovoru na hladnoću, *miR139* iz riže prepoznaje i utišava gene *OsPCF6* i *OsTCP2*, što rezultira pojačanom tolerancijom biljke na niske temperature (Yang i sur. 2013; Wang i sur. 2014). *MiR396* iz suncokreta regulira ekspresiju ciljnog gena *HaWRKY6* u ranim stadijima toplinskog stresa, što pojačava toleranciju na povišene temperature. S druge strane, negativni učinak u toleranciji biljke na toplinu i oksidativni stres povezan je s *miR398*, koja utišava ekspresiju gena *CSD1* i *CSD2* koji kodiraju za Cu/Zn superoksid dismutazu, pri čemu dolazi do akumulacije štetnih superoksidnih iona (Guan i sur. 2013) Pri visokim temperaturama aktivna je i *miR160* koja pozitivno regulira ekspresiju nekoliko proteina HSP (eng. *heat shock proteins*) potičući adaptaciju na toplinski stres (Lin i sur. 2018). *MiR166* djeluje u odgovoru biljke na prisutnost teških metala u tlu, utišavajući translaciju proteina *OsHB4* i na taj način smanjujući oksidativni stres uzrokovan povišenom koncentracijom kadmija i akumulaciju kadmija u transgeničnoj riži (Ding i sur. 2018). U biljkama uročnjaka izlaganim pojačanom UV zračenju primjećena je pozitivna regulacija 21 miRNA (Zhou i sur. 2007), dok je u transkripcijskoj regulaciji krizanteme (*Chrysanthemum morifolium*) pod utjecajem UV stresa primjećena uloga 137 različitih miRNA. Ciljni geni ovih miRNA vezani su uz glikolizu, te sintetske puteve sekundarnih biljnih metabolita poput flavonoida i klorogenične kiseline (Yang i sur. 2020). MikroRNA također imaju uloge u regulaciji unosa i transporta mineralnih tvari, pa je tako aktivnost *miR399* pojačana u uvjetima nedostatka fosfata, *miR395* djeluje u uvjetima nedostatka sumpora, a *miR398* sudjeluje u regulaciji homeostaze bakra i pojačano se eksprimira u uvjetima nedostatka bakra (Jones-Rhoades i sur. 2006; Abdel-Ghany Pilon 2008; Huang i sur. 2013).



Slika 6. Shematski prikaz miRNA koje sudjeluju u odgovoru na različite izvore abiotičkog stresa u uročnjaka (*A. thaliana*). Preuzeto i prilagođeno iz Movahedi i sur. (2018).

4.2. Uloga malih interferirajućih molekula RNA u odgovoru na abiotički stres

Veliku ulogu u adaptaciji biljke na abiotički stres ima i epigenetičko remodeliranje genoma (Tiwari i Rajam 2022). Kao rezultat izlaganja biljaka različitim izvorima abiotičkog stresa, primjećena je pojava različitih metilacijskih obrazaca kako na pojedinim lokusima tako i na razini čitavih genoma (Zhang i sur. 2018). Takvi specifični metilacijski obrasci, regulirani molekulama siRNA u procesu RdDM, služe kao memorija biljci, omogućujući joj toleranciju i preživljavanje prilikom budućih izlaganja stresnim uvjetima. U nekim je slučajevima moguće i mejojsko nasljeđivanje stresom induciranih promjena u strukturi kromatina na sljedeće generacije (Liu i sur. 2020). U regulaciji odgovora uročnjaka na solni stres sudjeluje 24 nukleotida duga siRNA potičući metilaciju promotorske regije gena koji kodira za transkripcijski faktor MYB74, te na taj način kontrolirajući razinu njegove ekspresije (Xu i sur. 2015). Genom uročnjaka sadrži i dva gena, *SR05* i *P5CDH*, koji također imaju ulogu u odgovoru na povišeni salinitet (Borsani i sur. 2005). Okviri čitanja ova dva gena se djelomično preklapaju u molekuli DNA. Gen *P5CDH* konstitutivno je eksprimiran, dok se gen *SR05* eksprimira samo u uvjetima solnog stresa, potičući biosintezu 24 nukleotida duge siRNA koja ciljno prepoznaje i potiče degradaciju transkripata gena *P5CDH* (Slika 7).



Slika 7. Mehanizam post-transkripcijskog utišavanja gena *P5CDH* pod utjecajem solnog stresa aktivnošću molekula nat-siRNA u uročnjaka. Solni stres u bilji izaziva akumulaciju ROS, što potiče ekspresiju gena *SRO5*, a time i sintezu 24 nukleotida dugih nat-siRNA, te posljedično i 21 nukleotid dugih sekundarnih nat-siRNA. Aktivnošću nat-siRNA dolazi do razgradnje transkripta *P5CDH*. Kratice: nat-siRNA – eng. *natural antisense transcript-derived siRNA*, P5C – pirolin-5-karboksilat, P5CDH – eng. *delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase*, ROS – reaktivni kisikovi spojevi, SRO5 – eng. *similar to RCD one 5*. Preuzeto i prilagođeno iz Borsani i sur. (2005).

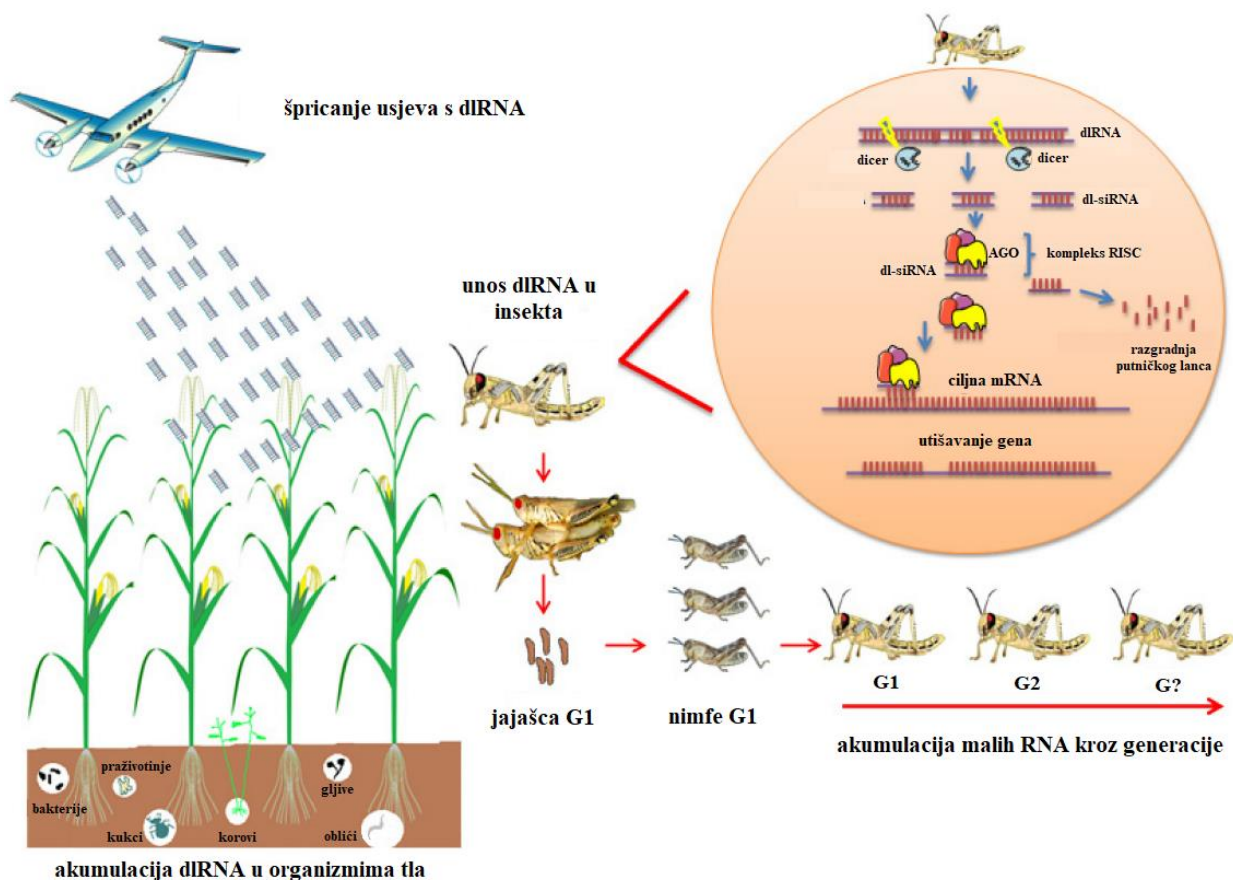
Degradacija transkripata *P5CDH* potiče nastanak 21 nukleotid dugačkih sekundarnih siRNA koje mehanizmom pozitivne povratne sprege pojačavaju učinak degradacije transkripata gena *P5CDH* (Borsani i sur. 2005). U toleranciji kasave na hladnoću također djeluje mehanizam RdDM, suprimirajući gen *ARF* uključen u auksinsku signalizaciju (Xia i sur. 2014). Na bitnu ulogu RdDM u termotoleranciji ukazuje povećana ekspresija podjedinica enzima Pol IV i Pol V u uročnjaku izlaganom povišenoj temperaturi (Naydenov i sur. 2015). Također, *null* mutanti uročnjaka za gene ključne u procesu RdDM, poput *nprp2*, *ago4*, *dcl3* i *rdr2* izrazito su osjetljivi na akutni toplinski stres (Popova i sur. 2013). Li i sur. (2014) opisali su dva gena regulirana aktivnošću ta-siRNA koja sudjeluju u odgovoru na toplinski stres, *HTT1* i *HTT2* (eng. *heat-induced TAS1 target*). Pojačana

transkripcija s lokusa *TASI*, čime nastaju prekursori ta-siRNA, rezultira smanjenom tolerancijom uročnjaka na toplinski stres, dok pojačana ekspresija gena *HTT1* i *HTT2* rezultira indukcijom ekspresije gena *Hsf* (eng. *heat stress transcription factors*) te pojačanom termotolerancijom.

5. Primjena tehnologije RNA u poljoprivredi

Interferencija RNA, kao jedan od ključnih mehanizama epigenetičke regulacije u biljaka, danas predstavlja moćan alat za zaštitu poljoprivrednih usjeva od raznih biotičkih i abiotičkih stresora koji predstavljaju veliki problem smanjujući kvalitetu i količinu prinosa (Kaur i sur. 2021). Dobivanje biljaka otpornih na stresne uvjete pomoću RNAi obećavajuća je strategija jer omogućuje gensku manipulaciju na transkripcijskoj i post-transkripcijskoj razini, pri čemu genom biljke ostaje nepromijenjen (Tiwari i Rajam 2022). Zbog svoje sigurnosti i neinvazivnosti predstavlja ekološki prihvatljivu alternativu zaštite usjeva, te ima potencijal zamijeniti upotrebu kemijskog tretiranja usjeva pesticidima koji imaju štetan utjecaj na ljude i okoliš (Kaur i sur. 2021). Također, tehnologija RNAi ima potencijal za razvoj kultivara s poželjnim svojstvima i velikim prinosom (Tiwari i Rajam 2022). Dvije strategije koje se temelje na tehnologiji RNAi su utišavanje gena inducirano domaćinom (eng. *host-induced gene silencing*, HIGS) i utišavanje gena inducirano prskanjem (eng. *spray-induced gene silencing*, SIGS) (Šečić i sur. 2021). Prvi korak obje strategije je proizvodnja prekursorskih molekula dIRNA koje na temelju komplementarnosti specifično prepoznaju ciljni gen i utišavaju njegovu ekspresiju u biljci, biljnom patogenu ili nametniku (Abdellatef i sur. 2021). HIGS podrazumijeva proizvodnju dIRNA u domaćinskoj biljci nakon što je ona transformirana konstruktom koji kodira željenu dIRNA. Prema tome, ova metoda uključuje promjenu na razini genoma i temelji se na genetičkom inženjerstvu. S druge strane, metoda SIGS podrazumijeva egzogeno nanošenje dIRNA na površinu biljke, a usmjerena je na zaštitu usjeva od biotičkog stresa (Šečić i sur. 2021). Ciljni patogen ili nametnik zatim unosi prekursorske dIRNA u svoj organizam i, koristeći vlastitu mašineriju RNAi, procesira i amplificira male RNA koje utišavaju njegove ciljne esencijalne gene (**Slika 8**) (Abdellatef i sur. 2021). Različite metode RNAi, uglavnom temeljene na strategiji HIGS, uspješno se koriste i za dobivanje kultivara otpornih na abiotički stres, uključujući promjene u razini ekspresije ciljnih miRNA koje sudjeluju u prirodnom odgovoru biljke na stres (Abdellatef i sur. 2021; Tiwari i Rajam 2022). Prva kultura odobrena za tržište čija je otpornost na patogene postignuta pomoću tehnologije RNAi bio je kukuruz

komercijalnog naziva SmartStax PRO (Head i sur. 2017; Šečić i sur. 2021). Ovaj transgenični kukuruz, osim što sadrži i dva insekticidna gena bakterijskog podrijetla, proizvodi molekule dIRNA čija je meta gen *DvSnf7* (eng. *sucrose non-fermenting 7*) patogenog oblića *Diabrotica virgifera virgifera* (Šečić i sur. 2021). SmartStax PRO je dobar, no rijedak primjer uspješno primijenjene strategije HIGS. Naime, zbog nedostatka metoda transformacije velikog broja poljoprivrednih kultura te još uvijek prisutnih predrasuda i zabrana prema primjeni genetski modificiranih organizama (GMO) u poljoprivredi, HIGS je još uvijek prilično ograničena i neiskoristiva metoda (Abdellatef i sur. 2021). S druge strane, SIGS se kao metoda koja ne zahtijeva uređivanje genoma domaćinske biljke pokazala mnogo prihvatljivijom strategijom proizvodnje otpornih kultura pomoću tehnologije RNAi (Šečić i sur. 2021). Brojna su istraživanja pokazala učinkovitost metode SIGS u postizanju otpornosti biljke na infekcije virusima, insektima i gljivama (Abdellatef i sur. 2021). U prilog ovoj strategiji ide i svojstvo patogenih gljiva poput *Botrytis cinerea* i *Fusarium graminearum* da u svoje hife unose male molekule jIRNA i dIRNA iz okoliša (Šečić i sur. 2021). Aplikacijom malih dIRNA čije su mete geni *DCL1* i *DCL2* iz *B. cinerea* na površinu biljnih organa poput listova, plodova i cvjetova, zapažena je inhibicija rasta gljive i povećana tolerancija biljke na infekciju (Wang i sur. 2016). Kako bi se ovi biopesticidi na bazi malih RNA proširili na komercijalnu upotrebu, potrebno je provesti niz mjera i testova koji bi utvrdili stabilnost površinski nanesenih dIRNA, učinkovitost i dugotrajnost njihovog djelovanja na zaštitu usjeva te neutralni učinak na okoliš (Kaur i sur. 2021). Jedan od najvećih problema koji se nameće je nepredvidljivi utjecaj velikih količina dIRNA koje bi bile ispuštene u okoliš na čitave ekosustave tla i potencijalne nespecifične mete (Abdellatef i sur. 2021). Iz tog je razloga potrebno još puno istraživanja u ovom području. Jedno od potencijalnih rješenja ovog problema je korištenje preciznih bioinformatičkih alata za odabir ciljnih gena, esencijalnih za život biljnog patogena, te konstrukciju dIRNA koje prepoznaju određenu regiju točno tih gena, uz izbjegavanje nespecifičnih meta (Kaur i sur. 2021). Ključno je spriječiti nespecifično utišavanje drugih gena s regijama homologije s ciljnim genom, poput npr. esencijalnih gena korisnih oprašivača koji bi mogli doći u kontakt sa dIRNA (Kaur i sur. 2021; Tiwari i Rajam 2022). Još jedan izazov predstavlja činjenica da su poljoprivredni usjevi konstantno izloženi većem broju abiotičkih i biotičkih izvora stresa, a međudjelovanje biljnog odgovora na abiotički i biotički stres još nije dovoljno dobro istraženo te je za sada nemoguće razviti strategiju učinkovite zaštite usjeva širokog spektra djelovanja (Huang i Jin 2022).



Slika 8. Utišavanje gena inducirano prskanjem (SIGS) i predviđeni dugoročni učinak dIRNA na transkriptom ciljnog nametničkog insekta. Nakon unosa prekursorskih dIRNA u insekta, one se obrađuju pomoću proteina Dicer do siRNA dugih 21 nukleotid. Zajedno sa proteinom Argonaute (AGO) čine kompleks RISC (eng. *RNA-induced silencing complex*) kojeg navigiraju do ciljnog transkripta ili gena čija ekspresija biva utišana. Kao dugoročni učinak predviđena je akumulacija malih RNA u insektu kroz nekoliko generacija. Preuzeto i prilagođeno iz Abdellatef i sur. (2021).

6. Zaključak

Procesi interferencije RNA imaju veliku ulogu u regulaciji eukariotske ekspresije gena na transkripcijskoj i post-transkripcijskoj razini. U ovim procesima sudjeluju male, nekodirajuće molekule RNA koje se u biljaka dijele na miRNA i siRNA. Molekule miRNA endogenog su podrijetla i nastaju transkripcijom jezgrinih gena *MIR*, dok siRNA mogu biti egzogenog (npr. virusnog) podrijetla, ili pak nastati prepisivanjem aberantnih mRNA, transpozonskih regija ili invertiranih ponavljanja. U procesiranju malih RNA sudjeluju biljni proteini Dicer-like, po funkciji RNA-ze tipa III. Zrele male molekule RNA formiraju kompleks sa proteinima iz porodice

Argonaute, čineći kompleks RISC koji se na temelju komplementarnosti lanca navodi do ciljne regije DNA ili mRNA. Rezultat interferencije RNA je epigenetičko utišavanje genske ekspresije metilacijom DNA *de novo* u procesu RdDM, ili pak spriječavanje translacije i degradacija molekule mRNA.

Interferencija RNA djeluje u brojnim procesima i fazama biljnog razvoja i fiziologije, poput stabilizacije genoma utišavanjem transpozonskih elemenata, specifikacije ženskih gameta, uspostavljanja epialela te međustanične komunikacije kako u vegetativnim, tako i u reproduktivnim tkivima, pa čak i na velike udaljenosti. No, jedna od najznačajnijih i najistraženijih uloga RNAi u biljaka je regulacija genske ekspresije u odgovoru na stres. Brojna istraživanja ukazala su na niz miRNA i siRNA čija se ekspresija mijenja kao rezultat stresnog čimbenika, što pokreće obrambeni odgovor biljke koji joj omogućava preživljavanje nepovoljnih uvjeta. To uključuje promjene u hormonskoj signalizaciji, razini antioksidativnih enzima, te aktivaciju niza gena za rezistenciju biljke na biotički i abiotički stres. Posebno je zanimljivo da su epigenetički obrasci potaknuti procesima RNAi u nekim slučajevima nasljedni, te omogućuju potomstvu bolje prilagodbe na stresne uvjete.

Saznanja o složenim regulatornim procesima u kojima sudjeluju male molekule RNA omogućila su razvoj novih, moćnih alata za zaštitu usjeva od sveprisutnih biotičkih i abiotičkih čimbenika koji postaju sve veći problem za poljoprivredu na globalnoj razini. Strategije HIGS i SIGS imaju veliki potencijal za zaštitu poljoprivrednih kultura od klimatske krize na ekološki prihvatljiv i održiv način. Prednosti ovih metoda u odnosu na upotrebu kemijskih agensa su slabija invazivnost, manja toksičnost i neutralniji učinak na okoliš. Metoda SIGS dodatno je poželjna jer se temelji isključivo na promjenama na razini transkriptoma. Za razliku od toga, HIGS je metoda temeljena na promjeni genoma ugradnjom konstrukta koji kodira za željenu RNA komplementarnu ciljnom genu koji se nastoji utišati. Zbog toga se ova metoda smatra kontroverznom i još uvijek nepoželjnom za tržište. Ipak, metoda HIGS pokazala se učinkovitim alatom za kontrolu abiotičkog stresa. Budući da ekspresija željene RNA može biti kontrolirana upotrebom specifičnih promotora koje induciraju različiti abiotički stresori, moguće je dizajnirati konstrukt čiju ekspresiju kontrolira promotor koji je aktivan samo prilikom izlaganja određenom stresnom čimbeniku. Na taj je način proces utišavanja ciljnog gena stavljen pod vremensku, tj. okolišnu kontrolu. Obje metode imaju nedostatak temeljen na kompleksnosti i isprepletenosti učinaka malih molekula RNA, kako u

odgovoru na stres, tako i u svim razvojnim fazama biljke. U svakom slučaju, kako bi tehnologija RNAi ušla u širu primjenu, potrebno je pronaći rješenja problema kao što su nespecifične mete na okolišnoj razini te na razini genoma i transkriptoma, dugotrajnost učinka te dostupnost i cijena ovih metoda u širokoj primjeni.

7. Literatura

- Abdel-Ghany, S. E. i Pilon, M. (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15932–15945.
- Abdellatif, E., Kamal, N. M. i Tsujimoto, H. (2021). Tuning beforehand: A foresight on RNA interference (RNAi) and *in vitro*-derived dsRNAs to enhance crop resilience to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7687.
- Balmer, A., Paoli, E. de, Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B. i Balmer, D. (2017). Signs of silence: Small RNAs and antifungal responses in *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Plant Engineering*.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R. i Zhu, J. K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 123(7), 1279–1291.
- Deng, Y., Zhai, K., Xie, Z., Yang, D., Zhu, X., Liu, J., Wang, X., Qin, P., Yang, Y., Zhang, G., Li, Q., Zhang, J., Wu, S., Milazzo, J., Mao, B., Wang, E., Xie, H., Tharreau, D. i He, Z. (2017). Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance. *Science*, 355(6328), 962–965.
- Ding, D., Zhang, L., Wang, H., Liu, Z., Zhang, Z. i Zheng, Y. (2009). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany*, 103(1), 29–38.
- Ding, Y., Gong, S., Wang, Y., Wang, F., Bao, H., Sun, J., Cai, C., Yi, K., Chen, Z. i Zhu, C. (2018). MicroRNA166 modulates cadmium tolerance and accumulation in rice. *Plant Physiology*, 177(4), 1691–1703.
- Ding, Y., Tao, Y. i Zhu, C. (2013). Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. *Journal of Experimental Botany*, 64(11), 3077–3086.
- Fahlgren, N., Howell, M. D., Kasschau, K. D., Chapman, E. J. i Sullivan, C. M. (2007). High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: Evidence for frequent birth and death of *MIRNA* genes. *PLoS ONE*, 2(2), 219.
- Fileccia, V., Bertolini, E., Ruisi, P., Giambalvo, D., Frenda, A. S., Cannarozzi, G., Tadele, Z., Crosatti, C. i Martinelli, F. (2017). Identification and characterization of durum wheat microRNAs in leaf and root tissues. *Functional and Integrative Genomics*, 17(5), 583–598.

- Fire, A. i Timmons, L. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395, 854.
- Gasparis, S., Yanushevska, Y. i Nadolska-Orczyk, A. (2017). Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 39, 236.
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y. i Zhu, J. (2013). Heat stress induction of *miR398* triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 74(5), 840-851.
- Guo, H.-S., Xie, Q., Fei, J.-F. i Chua, N.-H. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *The Plant Cell*, 17(5), 1376–1386.
- Guru Jagadeeswaran, Ajay Saini i Ramanjulu Sunkar. (2009). Biotic and abiotic stress down-regulate *miR398* expression in *Arabidopsis*. *Planta*, 229, 1009–1014.
- Head, G. P., Carroll, M. W., Evans, S. P., Rule, D. M., Willse, A. R., Clark, T. L., Storer, N. P., Flannagan, R. D., Samuel, L. W. i Meinke, L. J. (2017). Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Management Science*, 73(9), 1883–1899.
- Huang, C. Y. i Jin, H. (2022). Coordinated epigenetic regulation in plants: A potent managerial tool to conquer biotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 12,795274.
- Huang, T. K., Han, C. L., Lin, S. I., Chen, Y. J., Tsai, Y. C., Chen, Y. R., Chen, J. W., Lin, W. Y., Chen, P. M., Liu, T. Y., Chen, Y. S., Sun, C. M. i Chiou, T. J. (2013). Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 25(10), 4044–4060.
- Hung, Y. H. i Slotkin, R. K. (2021). The initiation of RNA interference (RNAi) in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 61, 102014.
- Hutvagner, G. i Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: Key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 22–32.
- Iglesias, M. J., Terrile, M. C., Windels, D., Lombardo, M. C., Bartoli, C. G., Vazquez, F., Estelle, M. i Casalengué, C. A. (2014). *MiR393* regulation of auxin signaling and redox-related components during acclimation to salinity in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 9(9).
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. i Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 19–53.
- Kaur, R., Choudhury, A., Chauhan, S., Ghosh, A., Tiwari, R. i Rajam, M. V. (2021). RNA interference and crop protection against biotic stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(10), 2357–2377.

- Lee, M. H., Jeon, H. S., Kim, H. G. i Park, O. K. (2017). An Arabidopsis NAC transcription factor NAC4 promotes pathogen-induced cell death under negative regulation by *microRNA164*. *New Phytologist*, 214(1), 343–360.
- Li, S., Liu, J., Liu, Z., Li, X., Wu, F., He, Y. (2014). *HEAT-INDUCED TAS1 TARGET1* mediates thermotolerance via HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A1a-directed pathways in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(4), 1764–1780.
- Lin, J. S., Kuo, C. C., Yang, I. C., Tsai, W. A., Shen, Y. H., Lin, C. C., Liang, Y. C., Li, Y. C., Kuo, Y. W., King, Y. C., Lai, H. M. i Jeng, S. T. (2018). *MicroRNA160* modulates plant development and heat shock protein gene expression to mediate heat tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Liu, J., & He, Z. (2020). Small DNA methylation, big player in plant abiotic stress responses and memory. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Matzke, M. A. i Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* 15(6), 394–408.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: Functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics* 14(7), 447–459.
- MiRBase: the microRNA database. (2010). v22.1. <https://mirbase.org/> (pristupljeno 27.7.2021.)
- Movahedi, A., Zhang, J., Sun, W., Kadkhodaei, S., Mohammadi, K., Almasizadehyaghuti, A., Yin, T. i Zhuge, Q. (2018). Plant small RNAs: definition, classification and response against stresses. *Biologia (Poland)* 73(3), 285–294.
- Napoli, C., Lemieux, C. i Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *Ín trans*. *The Plant Cell*, 2.
- Naseem, M., Srivastava, M., Tehseen, M. i Ahmed, N. (2015). Auxin crosstalk to plant immune networks: a plant-pathogen interaction perspective. *Current Protein & Peptide Science*, 16(5), 389–394.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. i Jones, J. D. G. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *New Series*, 312(5772).
- Naydenov, M., Baev, V., Apostolova, E., Gospodinova, N., Sablok, G., Gozmanova, M. i Yahubyan, G. (2015). High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 87, 102-108.
- Popova, O. v., Dinh, H. Q., Aufsatz, W. i Jonak, C. (2013). The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 6(2), 396–410.

- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B. i Bartel, D. P. (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell*, *110*, 513-520.
- Romano, N. i Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, *6*(22).
- Sashital, D. G. i Doudna, J. A. (2010). Structural insights into RNA interference. *Current Opinion in Structural Biology*, *20*(1), 90–97.
- Šečić, E., Kogel, K. H. i Ladera-Carmona, M. J. (2021). Biotic stress-associated microRNA families in plants. *Journal of Plant Physiology*, *263*.
- Shivaprasad, P. v., Chen, H. M., Patel, K., Bond, D. M., Santos, B. A. C. M. i Baulcombe, D. C. (2012). A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell*, *24*(3), 859–874.
- Tiwari, R. i Rajam, M. V. (2022). RNA- and miRNA-interference to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*.
- Vaucheret, H., Mallory, A. C. i Bartel, D. P. (2006). Preferential stabilization of *miR168* by AGO1. *Molecular Cell*, *22*, 129–136.
- Wang, J., Mei, J. i Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science*, *10*.
- Wang, J., Meng, X., Dobrovolskaya, O. B., Orlov, Y. L. i Chen, M. (2017). Non-coding RNAs and their roles in stress response in plants. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, *15*(5), 301–312.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F. M., Thomma, B. P. H. J., Huang, H. da i Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, *2*(10).
- Wang, S. T., Sun, X. L., Hoshino, Y., Yu, Y., Jia, B., Sun, Z. W., Sun, M. Z., Duan, X. B. i Zhu, Y. M. (2014). *MicroRNA319* positively regulates cold tolerance by targeting OsPCF6 and OsTCP21 in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS ONE*, *9*(3).
- Wong, J., Gao, L., Yang, Y., Zhai, J., Arikait, S., Yu, Y., Duan, S., Chan, V., Xiong, Q., Yan, J., Li, S., Liu, R., Wang, Y., Tang, G., Meyers, B. C., Chen, X. i Ma, W. (2014). Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection. *The Plant Journal*, *79*(6), 928–940.
- Xu, R., Wang, Y., Zheng, H., Lu, W., Wu, C., Huang, J., Yan, K., Yang, G. i Zheng, C. (2015). Salt-induced transcription factor MYB74 is regulated by the RNA-directed DNA methylation pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *66*(19), 5997–6008.
- Yang, L., Jue, D., Li, W., Zhang, R., Chen, M. i Yang, Q. (2013). Identification of miRNA from eggplant (*Solanum melongena* l.) by small RNA deep sequencing and their response to *Verticillium dahliae* infection. *PLoS ONE*, *8*(8).

- Yang, Y., Guo, J., Cheng, J., Jiang, Z., Xu, N., An, X., Chen, Z., Hao, J., Yang, S., Xu, Z., Shen, C. i Xu, M. (2020). Identification of UV-B radiation responsive microRNAs and their target genes in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) using high-throughput sequencing. *Industrial Crops and Products*, 151.
- Yuan, S., Li, Z., Li, D., Yuan, N., Hu, Q. i Luo, H. (2015). Constitutive expression of rice microRNA528 alters plant development and enhances tolerance to salinity stress and nitrogen starvation in creeping bentgrass. *Plant Physiology*, 169(1), 576–593.
- 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. i 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 & Development*, 25(23), 2540–2553.
- Zhang, H., Lang, Z. i Zhu, J. K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(8), 489–506.
- Zhang, H., Tao, Z., Hong, H., Chen, Z., Wu, C., Li, X., Xiao, J. i Wang, S. (2016). Transposon-derived small RNA is responsible for modified function of *WRKY45* locus. *Nature Plants*, 2(3).
- Zhang, M., Hu, X., Zhu, M., Xu, M. i Wang, L. (2017). Transcription factors NF-YA2 and NF-YA10 regulate leaf growth via auxin signaling in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 7(1395).
- Zhang, T., Zhao, Y. L., Zhao, J. H., Wang, S., Jin, Y., Chen, Z. Q., Fang, Y. Y., Hua, C. L., Ding, S. W. i Guo, H. S. (2016). Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants*, 2.
- Zhou, X., Wang, G. i Zhang, W. (2007). UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology*, 3.
- Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-González, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y. T., Duan, L., Li, Z., Axtell, M. J., Wang, X. J. i Zhang, X. (2013a). Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by *Arabidopsis* Dicer-like1. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(9), 1106–1115.
- Zhu, Q. H., Fan, L., Liu, Y., Xu, H., Llewellyn, D. i Wilson, I. (2013b). miR482 Regulation of NBS-LRR Defense Genes during Fungal Pathogen Infection in Cotton. *PLOS ONE*, 8(12).

8. Životopis

Josipa Drmić rođena je 19.06.2000. u Đakovu, gdje završava osnovnoškolsko (Osnovna škola „Ivan Goran Kovačić“ Đakovo, 2007-2015) i srednjoškolsko (Gimnazija A. G. Matoša Đakovo, prirodoslovno-matematički smjer, 2015-2019). Godine 2019. upisuje preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Aktivni je član Udruge studenata biologije – BIUS gdje je i voditeljica Sekcije za botaniku (2022-). U slobodno vrijeme sudjeluje u projektima za manifestacije Noć biologije i Dan i noć na PMF-u (2021, 2022) i volontira na Simpoziju studenata biologije (SiSB 2022).