



UNIwersytet
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU

Wydział Biologii
Zakład Ekspresji Genów

Rozprawa doktorska

**Charakterystyka genów z rodziny *MIR444*
w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*) i ich
potencjału kodującego**

Aleksandra Chojnacka

**Praca napisana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej – Kulińskiej**

Poznań, 2023

Składam serdeczne podziękowania:

Pani prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej – Kulińskiej

za możliwość rozwoju naukowego w Zakładzie Ekspresji Genów,
za przekazaną wiedzę oraz wsparcie,

Panu prof. dr hab. Arturowi Jarmołowskiemu

za liczne naukowe dyskusje i cenne uwagi.

Dziękuję **Koleżankom i Kolegom z Zakładu Ekspresji Genów**, a w szczególności dr Aleksandrze Smoczyńskiej, dr Dawidowi Bielewiczowi, prof. UAM dr hab. Andrzejowi Pacakowi, dr Łukaszowi Szewcowi, dr Michałowi Taube oraz dr Halinie Pietrykowskiej za wspólną atmosferę pracy, dzielenie się doświadczeniami i nieocenioną pomoc.

Dziękuję **prof. UAM dr hab. Ewie Sobieszczuk-Nowickiej** oraz **dr Magdalenie Grabsztunowicz** z Zakładu Fizjologii Roślin za wspólne przeprowadzenie analizy fenotypowej roślin z wyprowadzonych linii transgenicznych.

Dziękuję **dr Jochenowi Kumlehn** oraz **dr Goetzowi Hensel** za możliwość odbycia stażu w Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research w Gatersleben.

Dziękuję również moim Najbliższym, a w szczególności Rodzicom oraz Mężowi za cierpliwość, wyrozumiałość oraz wsparcie w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej.

FINANSOWANIE

Niniejsza praca powstała przy finansowym udziale:

1. Narodowego Centrum Nauki (projekt badawczy o nr rejestracyjnym 2019/35/N/NZ9/01971 złożony w ramach konkursu PRELUDIUM 18 oraz projekt badawczy o nr rejestracyjnym 2016/23/B/NZ9/00862 złożony w ramach konkursu OPUS 12).
2. Paszport do przyszłości - Interdyscyplinarne studia doktoranckie na Wydziale Biologii UAM (POWR.03.02.00-00-I006/17) współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój (PO WER), Osi priorytetowej III Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju, Działania 3.2 Studia doktoranckie.
3. KNOW Poznańskie Konsorcjum RNA (01/KNOW2/2014).

PUBLIKACJE

Dorobek naukowy opublikowany w okresie trwania studiów doktoranckich:

1. Grabowska A., Bhat S.S., Smoczyńska A., Bielewicz D., Jarmołowski A., Szweykowska-Kulińska Z. 2020. Regulation of Plant microRNA Biogenesis. Springer Nature Switzerland AG 2020 C. Miguel et al. (eds.), Plant microRNAs, Concepts and Strategies in Plant Sciences.
2. Grabowska A*, Smoczyńska A*, Bielewicz D, Pacak A, Jarmołowski A, Szweykowska-Kulińska Z. 2020. Barley microRNAs as metabolic sensors for soil nitrogen availability. Plant Sci 299:110608. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110608.
3. Smoczyńska A, Pacak A, Grabowska A, Bielewicz D, Zadworny M, Singh K, Dolata J, Bajczyk M, Nuc P, Kęsy J, Woźniak M, Ratajczak I, Harwood W, Karłowski WM, Jarmołowski A, Szweykowska-Kulińska Z. Excess nitrogen responsive HvMADS27 transcription factor controls barley root architecture by regulating abscisic acid level. Front Plant Sci. 2022 Sep 12; 13:950796. doi: 10.3389/fpls.2022.950796.

* autorzy równorzędni

Spis treści

Wykaz skrótów	7
Streszczenie	9
Abstract	10
1. Wstęp	11
1.1. Biogeneza roślinnych mikroRNA	11
1.2. Rodzina genów <i>MIR444</i>	15
1.3. miPEP– peptydy kodowane przez geny <i>MIR</i>	20
2. Cel pracy	25
3. Materiały	26
3.1. Materiał roślinny	26
3.2. Oligonukleotydy	26
3.3. Wektory	29
3.4. Odczynniki, roztwory i zestawy gotowe	36
3.5. Materiały do hodowli bakterii	38
3.6. Materiały do analiz białkowych	39
3.7. Bufory i roztwory wykorzystane do pracy z DNA i RNA	42
3.8. Materiały do uprawy roślin	43
3.9. Materiały do przeprowadzenia transformacji, selekcji i regeneracji zarodków jęczmiennych	43
3.10. Materiały wykorzystane w eksperymencie profilowania polisomów	46
4. Metody	48
4.1. Uprawa roślin	48
4.2. Eksperymenty z wykorzystaniem kwasów nukleinowych	48
4.3. Eksperymenty z wykorzystaniem białek	54
4.4. Profilowanie polisomów	56
4.5. Izolacja i transformacja zarodków jęczmiennych	56
4.6. Analiza fenotypowa roślin z wyprowadzonych linii transgenicznych	58
4.7. Analizy bioinformatyczne	59

5. Wyniki	61
5.1. Analiza elementów regulatorowych w promotorach genów <i>MIR444</i>	61
5.2. Struktura genów <i>MIR444</i> w jęczmieniu oraz analiza poziomu ekspresji pri-miRNA444	68
5.3. Identyfikacja otwartych ramek odczytu (ORF) w pri-miRNA444	76
5.4. Analiza zdolności translacyjnej sekwencji kodujących wybrane peptydy z wykorzystaniem techniki profilowania polisomów	79
5.5. Nadekspresja PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c w komórkach <i>Escherichia coli</i> i ich detekcja z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał.	84
5.6. Charakterystyka roślin transgenicznych z mutacjami w sekwencjach kodujących peptydy kodowane przez geny <i>MIR444</i>	87
5.7. Wpływ PEP444c na akumulację mikroRNA444c	98
6. Dyskusja	101
6.1. Rodzina genów <i>MIR444</i> w jęczmieniu zwyczajnym	101
6.2. Asocjacja pri-miRNA444 z rybosomami	106
6.3. Wykorzystanie technologii CRISPR/Cas9 do edycji genów <i>MIR444</i>	107
6.4. Znaczenie PEP444c w biogenezie mikroRNA444c	109
7. Wnioski	112
Aneks sekwencji nukleotydowych pri-miRNA444	113
8. Literatura	121

Wykaz skrótów

aa	aminokwas (y)
ADP1	ADP – ribosylation factor 1
AGO1	ARGONAUTE 1
AMP1	ALTERED MERISTEM PROGRAM 1
ANR1	ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1
APS	nadsiarczan amonu
BAP	6 – benzyloaminopuryna
Brij-35	eter polioksyetyleno (23) laurylowy
BRD1	BR-DEFICIENT DWARF 1
cDNA	komplementarny DNA
CHI	izomeraza chalkonowa
CHS	syntaza chalkonowa
DCL1	DICER LIKE 1
DEPC	dietylopirowęglan
DOC	deoksycholany sodu
DRB1	DOUBLE STRANDED RNA-BINDING PROTEIN 1
DTT	1, 4 – ditriotreitol
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy
EGTA	kwasy etylenoglikol-tetraoctowy
<i>ENOD40-1</i>	<i>EARLY NODULIN-40</i>
F ₀	minimalna fluorescencja
F3H	3-hydroksylaza flawonoidowa
FLS	syntaza flawonolu
F _m	fluorescencja maksymalna
gDNA	genomowy DNA
<i>Hb2</i>	<i>HEMOGLOBIN 2</i>
HEN1	HUA ENHANCER 1
HESO1	HEN1 SUPPRESOR 1
HY11	HYPONASTIC LEAVES 1
miPEP	ang. <i>miRNA – encoded peptide</i>
MG132	karbobenzoksy-Leu-Leu-leucyna

NCBI	ang. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>NIN</i>	<i>NODULE INCEPTION PROTEIN</i>
<i>NLA</i>	<i>NITROGEN LIMITATION ADAPTATION</i>
NNC1	AP2 NODULE NUMBER CONTROL1
NPQ	stacjonarne wygaszanie niefotochemiczne
NP – 40	eter nonylofenolowy glikolu polietylenowego
NRT1.1	NITRATE TRANSPORTER 1.1
<i>NSP1</i>	<i>NODULATION SIGNALING PATHWAY 1</i>
<i>PHB</i>	<i>PHABULOSA</i>
<i>PHT5</i>	<i>PHOSPHATE TRANSPORTER 5</i>
<i>PHV</i>	<i>PHAVOLUTA</i>
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu
PTE	polioksyetylenu (10) eter cetylowy
pZmUbi	promotor ubikwityny pochodzący z <i>Zea mays</i>
<i>RDR1</i>	<i>RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE1</i>
<i>REV</i>	<i>REVOLUTA</i>
Rfd	współczynnik spadku fluorescencji
RISC	ang. <i>RNA induced silencing complex</i>
RPM	ang. <i>reads per milion</i>
RSV	ang. <i>rice stripe virus</i>
SDS	dodecylosiarczan sodu
SE	SERRATE
sgRNA	ang. <i>single guide RNA</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetrametyloetylenodiamina
TSS	ang. <i>Transcription Start Site</i>
Tween 20	monolaurynian polioksyetylenusorbitanu
U1 snRNP	jądrowa cząstka rybonukleoproteinowa zawierająca U1 snRNA ang. <i>U1 small nuclear ribonucleoprotein</i>
WT	roślina typu dzikiego

Streszczenie

MikroRNA (miRNA) są krótkimi jednoniciowymi cząsteczkami RNA, regulującymi poziom ekspresji innych genów. Geny *MIR444* zidentyfikowano jedynie u roślin jednoliściennych i ich charakterystyczną cechą jest obecność intronu, który rozdziela dwie połowy struktury prekursora mikroRNA. Sekwencja mikroRNA* znajduje się w jednym egzonie, natomiast mikroRNA zlokalizowana jest w kolejnym egzonie.

W jęczmieniu zidentyfikowano trzy geny *MIR444* o złożonej budowie egzonowo-intronowej. Ich transkrypty, pri-miRNA444, podlegają alternatywnemu splicingowi generując izoformy, które można podzielić na funkcjonalne (mikroRNA jest produkowany) i niefunkcjonalne (mikroRNA nie jest produkowany). Z wykorzystaniem analizy bioinformatycznej i techniki profilowania polisomów wykazano, że zidentyfikowane izoformy pri-miR444 posiadają otwarte ramki odczytu, które mogą kodować peptydy o długościach 119 (PEP444a), 51 (miPEP444b) oraz 168 (PEP444c) aminokwasów. Przy użyciu specyficznych przeciwciał potwierdzono obecność PEP444a w pędach jęczmienia w warunkach stresu nadmiaru azotu oraz PEP444c w pędach i korzeniach, zarówno w warunkach kontrolnych jak i w stresie nadmiaru azotu. Wykazano, że mutacje wprowadzone w rejonie sekwencji kodującej PEP444a mają najprawdopodobniej efekt letalny. Mutacje w sekwencji kodującej PEP444c wprowadziły przedwczesny kodon stop. U roślin transgenicznych *pep444c* ze zmienioną sekwencją aminokwasową PEP444c zaobserwowano obniżony poziom mikroRNA444c w korzeniach, co wskazuje na istotną rolę PEP444c w regulacji poziomu ekspresji genu *MIR444c*.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small single-stranded RNA molecules that regulate the level of expression of their target genes. *MIR444* family genes have been identified in monocots and their characteristic feature is the presence of an intron that separates two halves of microRNA precursor structure. The microRNA* is in one exon, while the microRNA is in the next exon.

Three *MIR444* genes with a complex exon-intron structure have been identified in barley. Their transcripts, pri-miRNA444, undergo alternative splicing events generating isoforms that can be divided into functional (microRNA is produced) and non-functional (microRNA is not produced). Using bioinformatic analysis and polysome profiling technique, it was shown that identified isoforms contain open reading frames (ORFs) that can encode peptides of 119 (PEP444a), 51 (miPEP444b) and 168 (PEP444c) amino acids. Using specific antibodies, we confirmed the presence of PEP444a in barley shoots under nitrogen excess stress and PEP444c in shoots and roots, both under control and nitrogen excess conditions. Mutations introduced in the sequence encoding PEP444a have been shown to be most likely lethal. Mutations in the *PEP444c* coding sequence have introduced a premature stop codon. Moreover, *pep444c* transgenic plants with mutations in the sequence encoding PEP444c showed reduced level of microRNA444c in barley roots. This result indicates an important role of PEP444c in regulating the expression level of the *MIR444c*.

1. Wstęp

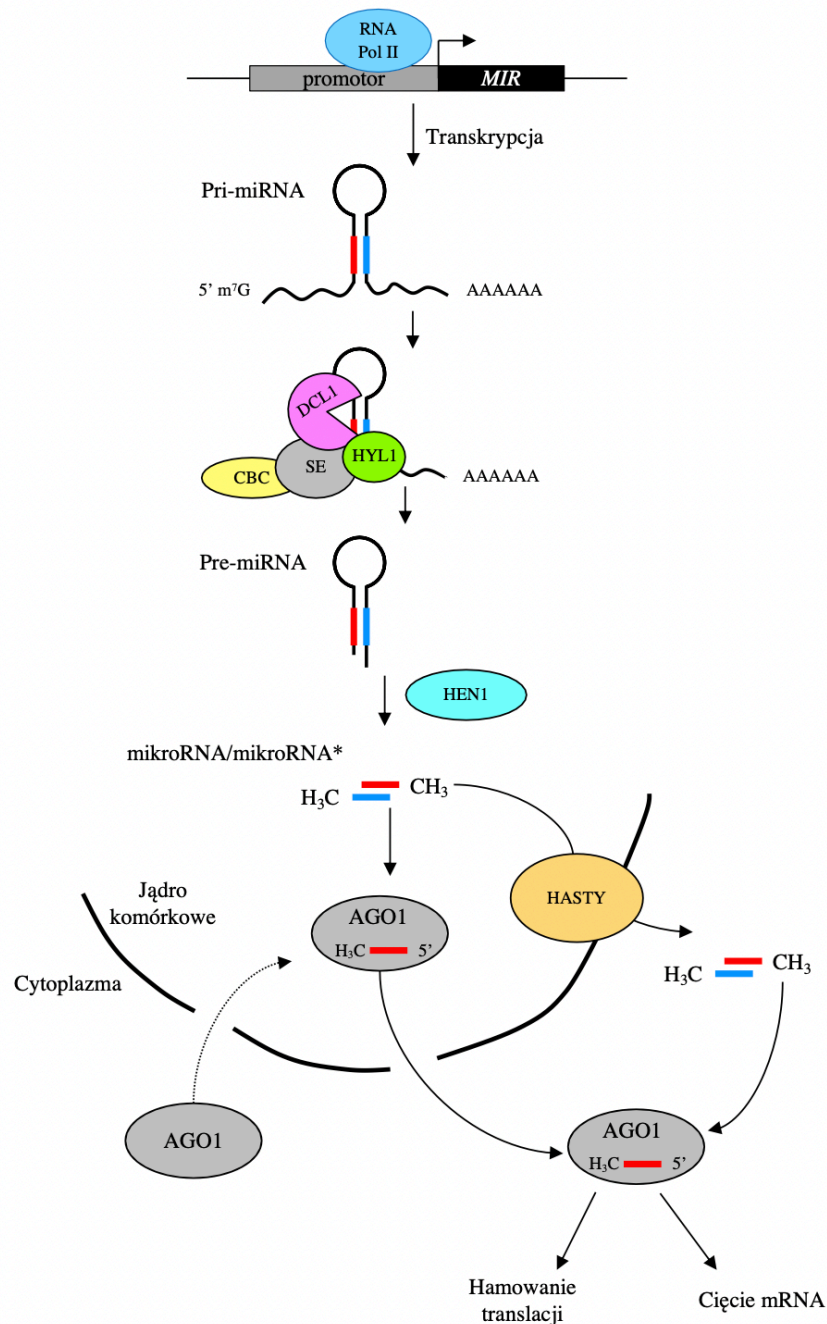
1.1. Biogeneza roślinnych mikroRNA

mikroRNA (miRNA) to krótkie cząsteczki kwasu rybonukleinowego o długości 21-24 nukleotydów, które regulują poziom ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Geny mikroRNA (*MIR*) u roślin stanowią zazwyczaj niezależne jednostki transkrypcyjne i są transkrybowane są przez polimerazę RNA II (RNA Pol II) (Reinhart i in., 2002; Lee i in., 2004; Xie i in., 2005). W wyniku transkrypcji genów *MIR* powstają długie transkrypty, tzw. pierwotne transkrypty miRNA (pri-miRNA, ang. *primary miRNA*), które podobnie do innych produktów RNA Pol II posiadają na 5' końcu kap (ang. *cap*), tj. 7-metyloguanozynę, a na 3' końcu od kilkudziesięciu do kilkuset nukleotydów zawierających jako zasadę azotową adeninę, tzw. ogon poliA (Jones-Rhoades i Bartel, 2004; Xie i in., 2005).

Biogeneza mikroRNA regulowana jest między innymi przez czynniki regulujące transkrypcję. Jednym z nich jest wielobiałkowy kompleks Mediatora, którego brak powoduje zmniejszenie ilości RNA Pol II zasocjowanej z chromatyną w rejonie genów *MIR*, a co za tym idzie obniżenie poziomu pri-miRNA i dojrzałych mikroRNA (Kim i in., 2011). Ponadto promotory genów mikroRNA zawierają motywy umożliwiające wiązanie się różnych czynników transkrypcyjnych, co również wpływa na poziom transkrypcji genów *MIR*, często w odpowiedzi na czynniki środowiskowe (Megraw i in., 2006; Yamasaki i in., 2009; Rogers i Chen, 2013; Barciszewska-Pacak i in., 2015; Segal i in., 2020).

Pierwotne transkrypty miRNA tworzą charakterystyczną strukturę typu spinki do włosów, składającą się z pętli i fragmentu dwuniciowego (Ryc. 1). Endorybonukleaza typu III – DCL1 (DICER-LIKE 1) skraca pri-miRNA do pre-miRNA (ang. *precursor miRNA*) (Kurihara i Watanabe, 2004). W kolejnym etapie z pre-miRNA uwalniany jest dupleks miRNA/miRNA*, tj. dwuniciowy RNA o długości 21-24 nukleotydów. DCL1 do prawidłowego funkcjonowania wymaga obecności białek HYL1 (HYPONASTIC LEAVES 1) i SE (SERRATE), z którymi tworzy kompleks zwany Mikroprocesorem (Kurihara, 2006; Lobbes i in., 2006; Laubinger i in., 2008). HYL1, nazywane również DRB1 (DOUBLE STRANDED RNA-BINDING PROTEIN 1), zawiera dwie domeny wiążące dwuniciowy RNA (Hiraguri i in., 2005). Pierwsza z nich odpowiada za wiązanie RNA, a druga za oddziaływanie z DCL1 i SE oraz za homodimeryzację białka, konieczną

do prawidłowego przebiegu biogenezy mikroRNA (Yang i in., 2010; Yang i in., 2014). Białko SE z kolei zwiększa efektywność i precyzję cięcia poprzez zapewnienie prawidłowej orientacji pri-miRNA w domenie katalitycznej DCL1 (Lobbes i in., 2006; Laubinger i in., 2008). W dojrzewaniu pri-miRNA uczestniczy również kompleks białek wiążący kap (CBC, ang. *cap binding complex*), składający się z podjednostek CBP20 oraz CBP80 (Kmieciak i in., 2002). CBC, wspólnie z SE, pełni istotną rolę w regulacji splicingu pre-mRNA i pre-miRNA (Laubinger i in., 2008).



Ryc. 1. Schemat biogenezy roślinnych mikroRNA, na podstawie Zhang i in., 2022.

Na biogenezę mikroRNA wpływ ma również splicing (Bielewicz i in., 2013; Schwab i in., 2013; Knop i in., 2017). Wykazano, że obecność intronów oraz aktywnego miejsca donorowego (miejsce cięcia po stronie 5' intronu, 5'ss) stymuluje biogenezę mikroRNA – ułożonych w pierwszym egzonie pri-miRNA zawierających intron „poniżej” struktury spinki do włosów. Rośliny *Arabidopsis thaliana* z unieczynnionym genem *MIR163* transformowano konstruktami, w których w genie *MIR163* usunięto intron lub unieczynniono miejsce 5'ss. W obydwóch przypadkach zaobserwowano spadek poziomu ekspresji dojrzałego mikroRNA163 (Bielewicz i in., 2013). Podobne wyniki uzyskano w przypadku obserwacji dojrzewania mikroRNA161 i mikroRNA172b (Bielewicz i in., 2013; Schwab i in., 2013).

W przypadku mikroRNA zlokalizowanych z intronach (intronowe miRNA), inaktywacja miejsca donorowego 5'ss prowadzi do zwiększenia poziomu ekspresji dojrzałych mikroRNA (Knop i in., 2017). Efekt ten zaobserwowano w trakcie badań nad biogenezą intronowego mikroRNA402 u *A. thaliana*. Unieczynnienie miejsca donorowego 5'ss skutkowało podwyższonym poziomem intronowego mikroRNA402. Następnie sekwencję tworzącą strukturę spinki do włosów, znajdującą się w pierwszym intronie genu kodującego białko, przeniesiono do poprzedzającego go egzonu, otrzymując w ten sposób egzonowy mikroRNA. Zaobserwowano stymulację biogenezy mikroRNA. W przypadku mikroRNA zlokalizowanego w egzonie, po unieczynnieniu miejsca donorowego 5' ss zaobserwowano spadek poziomu ekspresji mikroRNA402 (Knop i in., 2017).

Zaproponowano następujący model wyjaśniający opisane zjawiska: w przypadku egzonowych mikroRNA, związany z miejscem 5'ss U1 snRNP stabilizuje oddziaływania SE z pozostałymi białkami wchodzącymi w skład Mikroprocesora, prowadząc do zwiększenia wydajności biogenezy mikroRNA. W sytuacji, gdy mikroRNA zlokalizowany jest w intronach, wiązanie U1 snRNP do miejsca donorowego ogranicza dostęp SE do kompleksu Mikroprocesora, co skutkuje obniżeniem poziomu mikroRNA. Unieczynnienie miejsca donorowego w przypadku intronowych mikroRNA znosi efekt inhibicji (Bielewicz i in., 2013; Knop i in., 2017).

Znaczenie wycinania intronów w prawidłowym przebiegu biogenezy mikroRNA zostało udokumentowane w przypadku rodziny genów *MIR444* u roślin jednoliściennych, takich jak ryż, kłosownica, jęczmień, trzcina cukrowa, kukurydza i pszenica. Charakterystyczną cechą tej rodziny genów jest obecność intronu, który rozdziela dwie połowy struktury prekursora mikroRNA. Jedna część, zawierająca mikroRNA* znajduje

się w jednym egzonie, natomiast druga obejmująca sekwencję mikroRNA zlokalizowana jest w kolejnym egzonie. Wycięcie intronu jest niezbędne do utworzenia prawidłowej struktury spinki do włosów i powstania dojrzałego mikroRNA (Lu i in., 2008; Sunkar i in., 2008). Wycięcie intronu jest również konieczne w przypadku biogenezy mikroRNA400, znajdującego się w intronie genu kodującego białko u *A. thaliana*. Zaobserwowano, że stres wysokiej temperatury (37°C) stymuluje wycinanie intronu co koreluje z podniesionym poziomem dojrzałego mikroRNA400 (Yan i in., 2012).

Uwolniony z pre-miRNA dupleks miRNA/miRNA* ulega 2'-O-metylacji na 3' końcach obydwu nici przez białko HEN1 (HUA ENHANCER 1) (Yang i in., 2006). Modyfikacja ta stabilizuje dupleks miRNA/miRNA* i chroni przed degradacją (Li, i in., 2005; Yu i in., 2005). W przypadku braku HEN1, białko HESO1 (HEN1 SUPPRESSOR 1) oligourydyluje 3' końce miRNA co prowadzi do szybkiej degradacji miRNA (Ren i in., 2012).

Jedna z cząsteczek dupleksu miRNA/miRNA* zostaje włączona do białkowego kompleksu efektorowego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), którego głównym komponentem jest białko AGO1 (Vaucheret i in., 2004; Baumberger i Baulcombe, 2005). Wybór nici uwarunkowany jest termostabilnością 5' końców dupleksu miRNA/miRNA*. Nici o niższej termostabilności końca 5' zostaje włączona do kompleksu RISC (a konkretnie do AGO1) jako nici wiodąca, podczas gdy druga nici ulega na ogół degradacji (Eamens i in., 2009). Liczne dane literaturowe wskazują jednak na akumulację niektórych mikroRNA* na poziomie wyższym od odpowiadających im mikroRNA (Devers i in., 2011; Peng i in., 2011). Jak wspomniano wyżej, kluczowym elementem kompleksu RISC jest białko AGO1 (ARGONAUTE 1) zawierające domenę katalityczną wymaganą do cięcia docelowego mRNA (Swarts i in., 2014; Zhang i in., 2015). Do niedawna uważano, że włączanie mikroRNA do kompleksu efektorowego RISC następuje w cytoplazmie po wyeksportowaniu dupleksu miRNA/miRNA* z jądra do cytoplazmy przez białko HST (HASTY) (Park i in., 2005). Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują jednak na to, że proces składania kompleksu RISC zachodzi już w jądrze komórkowym, a głównym eksporterem mikroRNA z jądra do cytoplazmy jest białko AGO1 (Bologna i in., 2018). Już w cytoplazmie, nakierowywany przez mikroRNA kompleks RISC rozpoznaje docelowy mRNA i reguluje jego poziom poprzez cięcie docelowego mRNA lub hamowanie jego translacji. Cięcie transkryptu, katalizowane przez AGO1, wymaga niemal doskonałej komplementarności między mikroRNA a docelowym mRNA i ma miejsce między 10 a 11 nukleotydem mRNA licząc od 5'

końca sekwencji mikroRNA hybrydującej z mRNA (Llave i in., 2002; Mallory i in., 2004). Drugi sposób regulacji ekspresji genów przez mikroRNA polega na hamowaniu translacji mRNA. Mechanizm ten nie jest jednak u roślin dokładnie poznany. Dane literaturowe wskazują, że w procesie tym uczestniczy białko AMP1 (ALTERED MERISTEM PROGRAM 1), zasocjowane z siateczką endoplazmatyczną (Li i in., 2013). Ponadto badania przeprowadzone przez Reis i in., 2015 wykazały, że o tym czy mRNA zostanie przecięty, czy dojdzie do zahamowania translacji decyduje obecność białek HYL1 lub DRB2. Obecność HYL1 prowadzi do rozcięcia mRNA, natomiast DRB2 do hamowania translacji.

1.2. Rodzina genów *MIR444*

Geny *MIR444* zostały zidentyfikowane jedynie u roślin jednoliściennych takich jak ryż (*Oryza sativa*), pszenica (*Triticum aestivum*), jęczmień (*Hordeum vulgare*), kukurydza (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), kłosownica (*Brachypodium*) i trzcina cukrowa (*Saccharum officinarum*) (Sunkar i in., 2005). Wykazano również, że sekwencje genów *MIR444* stanowią naturalne antysensowne nici dla genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny MADS-box, których mRNA jest sekwencją docelową dla mikroRNA444 (Sunkar i in., 2005; Lu i in., 2008). W ryżu mikroRNA z rodziny *MIR444* regulują poziom ekspresji czterech czynników transkrypcyjnych MADS-box, kodowanych przez *OsMADS23*, *OsMADS27a*, *OsMADS27b* oraz *OsMADS57* (Sunkar i in., 2005; Lu i in., 2008; Wu i in., 2009; Li i in., 2010). Z przeprowadzonej analizy filogenetycznej wynika, że są one homologami czynników transkrypcyjnych ANR1 (ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED1) u *Arabidopsis*, biorących udział w regulacji szlaku sygnałowego jonów azotanowych (NO_3^-) i we wzroście korzeni bocznych (Zhang i Forde, 1998; Lee i in., 2003; Arora i in., 2007).

Badanie przeprowadzone przez Yan i in., 2014 wykazały, że nadekspresja mikroRNA444a ryżu spowodowała spadek poziomu ekspresji omawianych czynników transkrypcyjnych MADS-box. Towarzyszył temu ograniczony wzrost korzeni bocznych, zależny od stężenia NO_3^- w podłożu. Podobną rolę wybranych czynników MADS-box stwierdzono w eksperymentach przeprowadzonych nad *Arabidopsis* (Zhang i Forde, 1998). Zaobserwowano również, że nadekspresja mikroRNA444a w ryżu wywołała zwiększony poziom ekspresji genów kodujących transportery azotanowe oraz zmniejszoną translokację związków azotowych ze starych liści do młodych w warunkach

stresu braku azotu (Yan i in., 2014). Wyniki te wskazują, że mikroRNA444a pełni istotną rolę w szlaku sygnałowym NO_3^- oraz w rozwoju korzeni i pędów. Natomiast eksperymenty przeprowadzone nad jęczmieniem zwyczajnym wykazały, że w warunkach zwiększonego stężenia NO_3^- dochodzi do obniżenia poziomu ekspresji genu *MADS27*, co skutkuje skróceniem korzeni. W regulację tę nie jest jednak zaangażowany mikroRNA444c (Smoczyńska i in., 2022).

W ryżu mikroRNA444a bierze udział również w odpowiedzi na stres braku fosforu (P_i) (Yan i in., 2014). Rośliny z nadekspresją mikroRNA444a poddano stresowi braku P_i , po czym zaobserwowano zmiany w architekturze korzeni w porównaniu do roślin typu dzikiego (WT). Ponadto odnotowano wzrost zawartości P_i w korzeniach i pędach ryżu oraz zwiększony poziom ekspresji trzech genów kodujących transportery fosforanów (*OsPT1*, *OsPT7* oraz *OsPT11*). Powyższe dane wskazują na udział mikroRNA444a w interakcjach pomiędzy szlakami sygnałowymi NO_3^- i P_i w ryżu, chociaż mechanizm ten wymaga jeszcze dalszych badań.

Eksperymenty przeprowadzone przez Guo i in., 2013 wykazały, że mikroRNA444a, poprzez regulację poziomu czynnika transkrypcyjnego OsMADS57, kontroluje poziom białka DWARF14 będącego negatywnym regulatorem krzewienia w ryżu. U roślin z nadekspresją mikroRNA444a zaobserwowano spadek poziomu ekspresji OsMADS57 oraz zmniejszoną liczbę rozkrzewień w porównaniu do roślin typu dzikiego. U roślin ryżu z nadekspresją OsMADS57 odnotowano natomiast wzrost liczby rozkrzewień (Guo i in., 2013). MikroRNA444a odpowiada zatem za kontrolę krzewienia w ryżu, co bezpośrednio wpływa na wielkość plonów.

MikroRNA444 pełni także kluczową rolę w przekazywaniu sygnałów w odpowiedzi rośliny na atak wirusa pasiastości ryżu (RSV, ang. *Rice stripe virus*) (Wang i in., 2016). Regulowane przez mikroRNA444 czynniki transkrypcyjne OsMADS23, OsMADS27a oraz OsMADS57 ryżu są represorami ekspresji genu *OsRDRI* (*RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE I*). Owe czynniki transkrypcyjne wiążą się bezpośrednio do sekwencji regulatorowych CArG w promotorze genu *OsRDRI* (Wang i in., 2016). Infekcja RSV wywołuje akumulację mikroRNA444, a co za tym idzie, obniżenie poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych z rodziny MADS-box. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia poziomu ekspresji genu *OsRDRI* kodującego polimerazę RNA 1 zależną od RNA, która syntetyzuje na bazie wirusowego RNA dwuniciowy RNA, co prowadzi do powstania siRNA. Te z kolei, poprzez aktywację kompleksu RISC prowadzą do rozpoznania i degradacji wirusowego RNA (Voinnet i in.,

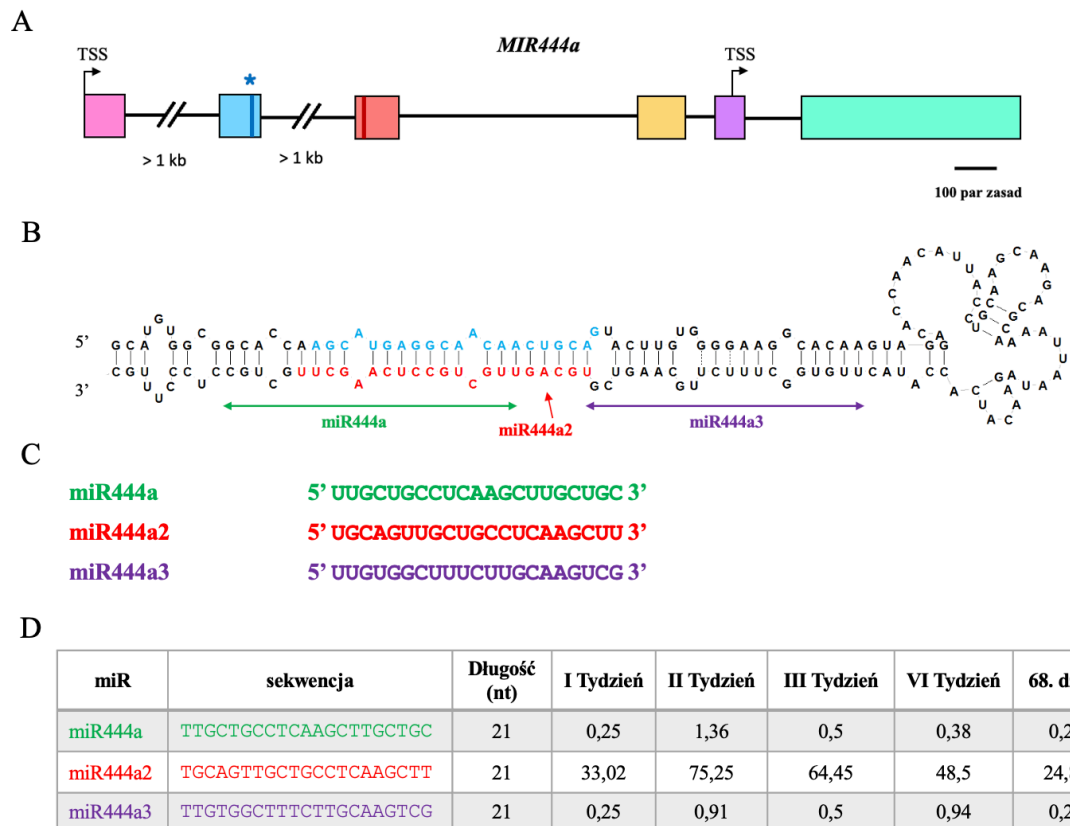
2009; Wang i in., 2016). Wykazano, że nadekspresja mikroRNA444 wywołuje zwiększenie odporności ryżu na wirusa RSV, a z kolei nadekspresja OsMADS57 prowadzi do obniżenia tej odporności poprzez hamowanie ekspresji *OsRDR1* (Wang i in., 2016).

Późniejsze badania przeprowadzone przez Jiao i in., 2020 wykazały, że w ryżu jony amonowe (NH_4^+) stymulują biosyntezę brassinosteroidów (BR) poprzez zależną od mikroRNA444 regulację czynników transkrypcyjnych MADS-box. Owe czynniki transkrypcyjne hamują transkrypcję genu *BR-deficient dwarf 1* (*OsBRD1*). Ten ostatni koduje oksydazę C-6, kluczowy enzym biorący udział w końcowych etapach biosyntezy BR (Makarevitch i in., 2012). Eksperymenty wykazały zwiększoną wrażliwość na jony amonowe transgenicznego ryżu z nadekspresją mikroRNA444, a z kolei u ryżu z nadekspresją MADS57 efekt ten był odwrotny.

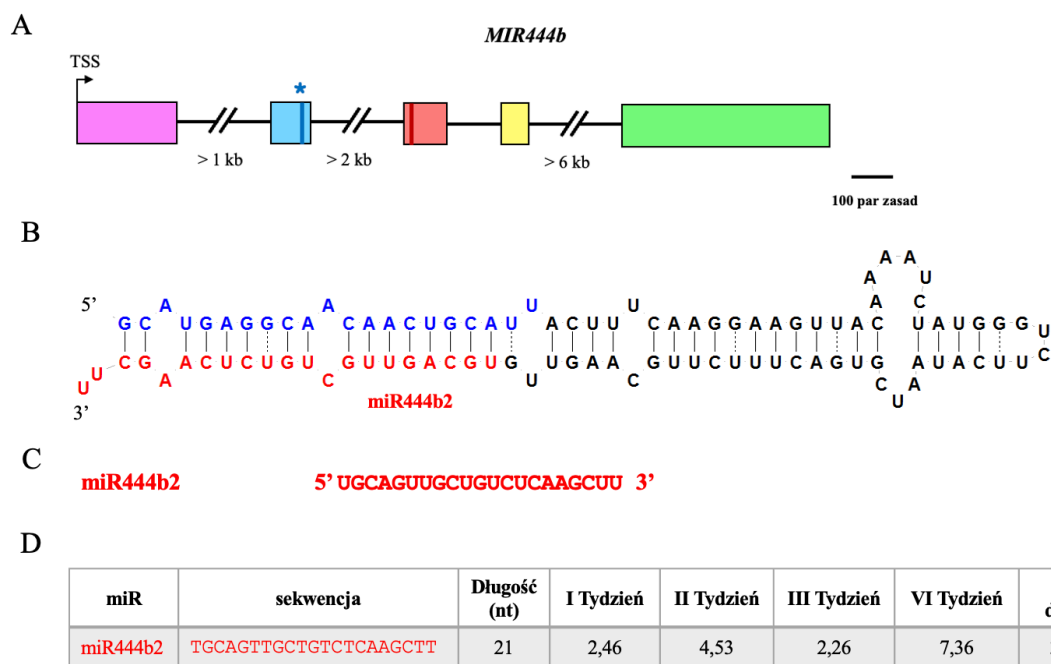
Udział mikroRNA444 w regulacji czynników transkrypcyjnych MADS-box, pełniących kluczowe funkcje w wielu procesach biochemicznych wskazuje na niezwykle istotną rolę rodziny genów *MIR444* we wzroście i rozwoju roślin (Schilling i in., 2018; Schilling i in., 2020; Kuijer i in., 2021). Ponadto, udział mikroRNA444 w regulacji szlaków sygnałowych NO_3^- , P_i i NH_4^+ oraz w odpowiedzi na atak wirusa pasiastości ryżu sugeruje możliwość wykorzystania rodziny genów *MIR444* do osiągnięcia celów agronomicznych (Yan i in., 2014; Wang i in., 2016; Jiao i in., 2020). Wiedza dotycząca genów *MIR444* u innych jednoliściennych jest jednak bardzo ograniczona. Brakuje informacji zarówno o ich budowie jak i o funkcjach jakie mikroRNA444 mogą jeszcze pełnić w roślinie.

Badania przeprowadzone w Zakładzie Ekspresji Genów pozwoliły na zidentyfikowanie trzech genów *MIR444* (*MIR444a*, *MIR444b* oraz *MIR444c*) w jęczmieniu zwyczajnym, które stanowią przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej. Ich dokładną strukturę oraz analizę poziomu ekspresji odpowiadających im pri-miRNA przedstawiono w rozdziale 5.2. Z genu *MIR444a*, w szlaku biogenezy mikroRNA, mogą powstać trzy różne mikroRNA (miR444a, miR444a2, miR444a3). Analiza wyników z głębokiego sekwencjonowania małych RNA wykazała, że najliczniej występującą cząsteczką jest mikroRNA444a2 i z tego względu wybrano ją do dalszych analiz (Ryc. 2). W przypadku genu *MIR444b* zidentyfikowano jeden mikroRNA (miR444b2), najliczniej występujący w szóstym tygodniu rozwoju jęczmienia (Ryc. 3). Natomiast z genu *MIR444c*, w procesie biogenezy mikroRNA, mogą powstać dwa różne mikroRNA (miR444c, miR444c2). Dominującą cząsteczką pod względem liczby znormalizowanych

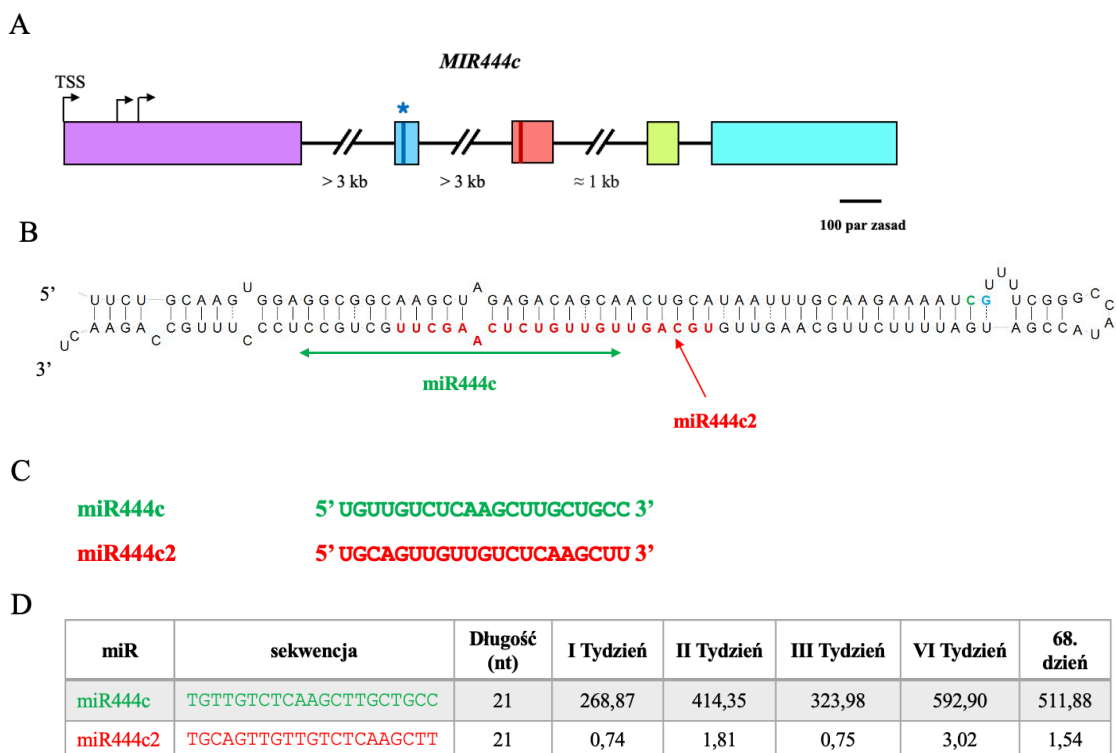
zliczeń, a w szczególności w szóstym tygodniu rozwoju jęczmienia, stanowi mikroRNA444c i dlatego wybrano ją do dalszych analiz (Ryc. 4).



Ryc. 2. Gen *MIR444a*, struktura spinki do włosów prekursora mikroRNA i zidentyfikowane mikroRNA. (A) Budowa genu *MIR444a*; kolorowe prostokąty reprezentują egzony a czarne linie introny. Niebieski słupek oraz niebieska gwiazdka * w drugim egzonie reprezentują pozycję mikroRNA*, natomiast czerwony słupek w trzecim egzonie przedstawia pozycję mikroRNA. TSS – miejsce inicjacji transkrypcji, kb – tysiąc par zasad. (B) pre-miRNA444a ($\Delta G = -80,80$ kcal/mol); na czerwono zaznaczono sekwencję miR444a2; na niebiesko sekwencję miR444a2*; na zielono sekwencję miR444a; na fioletowo miR444a3. (C) Sekwencje nukleotydowe miR444a, miR444a2 oraz miR444a3. (D) Liczba znormalizowanych zliczeń miR444a, miR444a2 oraz miR444a3 w poszczególnych stadiach rozwojowych jęczmienia zwyczajnego.



Ryc. 3. Gen *MIR444b*, struktura spinki do włosów prekursora mikroRNA i zidentyfikowany mikroRNA. (A) Budowa genu *MIR444b*; kolorowe prostokąty reprezentują egzony a czarne linie introny. Niebieski słupek oraz niebieska gwiazdka * w drugim egzonie przedstawiają pozycję mikroRNA*, natomiast czerwony słupek w trzecim egzonie reprezentuje pozycję mikroRNA. TSS – miejsce inicjacji transkrypcji, kb – tysiąc par zasad. (B) pre-miRNA444b ($\Delta G = -61,20$ kcal/mol); na czerwono zaznaczono sekwencję miR444b2; na niebiesko sekwencję miR444b2*. (C) Sekwencja nukleotydomi miR444b2. (D) Liczba znormalizowanych zliczeń miR444b2 w poszczególnych stadiach rozwojowych jęczmienia zwyczajnego.



Ryc. 4. Gen *MIR444c*, struktura spinki do włosów prekursora mikroRNA i zidentyfikowane mikroRNA. (A) Budowa genu *MIR444c*; kolorowe prostokąty reprezentują egzony a czarne linie introny. Niebieski słupek oraz niebieska gwiazdka * w drugim egzonie przedstawiają pozycję mikroRNA*, natomiast czerwony słupek w trzecim egzonie reprezentuje pozycję mikroRNA. TSS – miejsce inicjacji transkrypcji, kb – tysiąc par zasad. (B) pre-miRNA444c ($\Delta G = -97,40$ kcal/mol); na zielono zaznaczono sekwencję miR444c; na czerwono sekwencję miR444c2. (C) Sekwencje nukleotydowe miR444c oraz miR444c2. (D) Liczba znormalizowanych zliczeń miR444c oraz miR444c2 w poszczególnych stadiach rozwojowych jęczmienia zwyczajnego.

1.3. miPEP– peptydy kodowane przez geny *MIR*

W roślinnych genach *MIR* zidentyfikowano obecność krótkich otwartych ramek odczytu (ORFs, ang. *Open reading frames*), które kodują peptydy (Laouressergues i in., 2015; Couzigou i in., 2016; Chen i in., 2020, Sharma i in., 2020; Zhang i in., 2020). Badania przeprowadzone przez Laouressergues i in., wykazały, że otwarte ramki odczytu (miORFs), które kodują peptydy (miPEPs), zlokalizowane są powyżej sekwencji mikroRNA. Ponadto wszystkie dotychczas zidentyfikowane miPEP stymulują biogenezę odpowiadających im mikroRNA (Laouressergues i in., 2015; Couzigou i in., 2016; Chen i in., 2020, Sharma i in., 2020; Zhang i in., 2020).

U *Medicago truncatula* w obrębie pri-miRNA171b zaobserwowano otwartą ramkę odczytu kodującą peptyd o długości 20 aminokwasów (miPEP171b). Wykazano, że nadekspresja zidentyfikowanego peptydu wywołuje akumulację mikroRNA171b, co z kolei prowadzi do obniżenia poziomu docelowych transkryptów, mRNA *HAM* (*HAIRY MERISTEM*) i *HAM2* (*HAIRY MERISTEM 2*) (Lauessergues i in., 2015). Spadek poziomu ekspresji *HAM* i *HAM2*, zaangażowanych w rozwój systemu korzeniowego, prowadzi do zmniejszenia liczby korzeni bocznych (Lauessergues i in., 2015; Lv i in., 2016).

U soi warzywnej (*Glycine max*) wykazano z kolei, że pri-miRNA172c zawiera ORF kodujący miPEP172 (Couzigou i Combier, 2016). Nadekspresja mikroRNA172c prowadzi do zwiększenia liczby brodawek korzeniowych, struktur roślin związanych z symbiozą z bakteriami. Proces ten odbywa się przy udziale czynnika transkrypcyjnego NNC1 (AP2 NODULENUMBER CONTROL1), którego mRNA stanowi sekwencję docelową dla mikroRNA172c (Wang i in., 2014). Egzogenna aplikacja miPEP172c stymuluje biogenezę mikroRNA172, prowadząc do wzrostu liczby brodawek (Couzigou i Combier, 2016). Ponadto u roślin traktowanych sztucznym miPEP172c zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji genów *ENOD40-1* (*EARLY NODULIN-40*), *NIN* (*NODULE INCEPTION PROTEIN*), *NSP1* (*NODULATION SIGNALING PATHWAY 1*) i *Hb2* (*HEMOGLOBIN 2*), pełniących kluczową rolę w procesach rozwojowych rośliny oraz w interakcjach roślina motylkowa – bakterie brodawkowe (Wang i in., 2014).

Badania przeprowadzone nad *Arabidopsis* wykazały obecność czterech peptydów kodowanych geny *MIR*: miPEP164a, miPEP165a, miPEP319a oraz miPEP858a (Lauessergues i in., 2015; Sharma i in., 2020). Potraktowanie siewek *Arabidopsis* sztucznym miPEP165a wywołało akumulację dojrzałego mikroRNA165a i spadek poziomu ekspresji docelowych genów: *PHV* (*PHAVOLUTA*), *PHB* (*PHABULOSA*) i *REV* (*REVOLUTA*), co z kolei spowodowało wzrost długości korzeni (Carlsbecker i in., 2010; Lauessergues i in., 2015). Podobne rezultaty uzyskano w przypadku miPEP164a oraz miPEP319a. U *Arabidopsis* potraktowanych sztucznym miPEP164a zaobserwowano dwukrotny wzrost poziomu mikroRNA164a (Lauessergues i in., 2015). Z kolei nadekspresja miPEP319 wywołała akumulację dojrzałego mikroRNA319a (Nag i in., 2009; Combier i in., 2020).

MikroRNA858 pełni kluczową rolę w rozwoju i regulacji szlaku fenylopropanoidowego u *Arabidopsis* poprzez regulację poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych MYB obejmujących MYB11, MYB12 oraz MYB111 (Sharma i in.,

2016; Wang i in., 2016). Te czynniki transkrypcyjne MYB z kolei pozytywnie wpływają na proces biosyntezy flawonoli poprzez regulację genów kodujących syntazę chalkonową (CHS), izomerazę chalkonową (CHI), 3-hydroksylazę flawonoidową (F3H) i syntazę flawonolu (FLS) (Mehrtens i in., 2005; Stracke i in., 2010; Pandey i in., 2014). Badania przeprowadzone przez Sharma i in., wykazały, że pri-miRNA858a zawiera sekwencję kodującą miPEP858a. Egzogenna aplikacja miPEP858a powoduje akumulację mikroRNA858a, a tym samym obniżenie poziomu ekspresji genów docelowych zaangażowanych w szlak fenylopropanoidowy (Sharma i in., 2016). Natomiast u roślin, w których zmodyfikowano sekwencję kodującą miPEP858a z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas9 zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego MYB12, co spowodowało zwiększoną akumulacją CHS (Sharma i in., 2016). Przeprowadzone eksperymenty wykazały również, że miPEP858a nie wpływa na poziom ekspresji innych przeanalizowanych mikroRNA (łącznie z mikroRNA858b) u *Arabidopsis*, co sugeruje jego wysoką specyficzność działania względem mikroRNA858a (Sharma i in., 2016).

U winorośli (*Vitis vinifera*) wykazano, że gen *MIR171d1* koduje miPEP171d1, który stymuluje biogenezę mikroRNA171d1 (Chen i in., 2020). Wiadomo, że miR171 w znaczący sposób reguluje rozwój korzeni (Wang i in., 2010; Engstrom i in., 2011; Laressergues i in., 2015; Zhou i in., 2015). Po zastosowaniu egzogennej aplikacji miPEP171d1 na sadzonki winorośli zaobserwowano wzmożony rozwój korzeni przybyszowych, czemu towarzyszył wzrost poziomu ekspresji genu *MIR171d1*. Nie zaobserwowano jednak żadnych efektów po aplikacji miPEP171d1 na rośliny *Arabidopsis*. Podobnie nie odnotowano zmian po przeprowadzeniu nadekspresji sekwencji kodującej miPEP171d1 u *Arabidopsis* (Chen i in., 2020). Z kolei zastosowanie syntetycznego ath-miPEP171c, ortologa miPEP171d1, doprowadziło do zwiększenia liczby korzeni przybyszowych u *Arabidopsis*, podobnie jak w przypadku aplikacji miPEP171d1 na sadzonki winorośli. Uzyskane wyniki wskazują na to, że zarówno miPEP171d1 jak i ath-miPEP171c, pomimo zbliżonego sposobu regulacji rozwoju korzeni, funkcjonują wyłącznie w ramach danego gatunku (Chen i in., 2020). Informacje dotyczące zidentyfikowanych do tej pory peptydów kodowanymi przez geny *MIR* przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Lista zidentyfikowanych miPEP wraz z odpowiadającymi im mikroRNA i genami docelowymi, na podstawie Yadav i in., 2021.

Roślina	miPEP	mikroRNA	Gen docelowy	Funkcja	Referencja
<i>Arabidopsis thaliana</i>	miPEP164a	miR164a	<i>CUC</i>	Rozwój liści	Nikovics i in., 2006; Lauressergues i in., 2015; Combier i in., 2020
	miPEP165a	miR165a	<i>HD-ZIP III</i>	Tworzenie merystemu wierzchołkowego pędu	Zhou i in., 2007; Lauressergues i in., 2015; Ormancey i in., 2020; Combier i in., 2020
	miPEP319a	miR319a	<i>TCP</i>	Rozwój liści i kwiatów	Nag i in., 2009; Combier i in., 2020
	miPEP858a	miR858a	<i>MYB</i>	Regulacja szlaku fenylopropanoidowego	Sharma i in., 2016
<i>Medicago truncatula</i>	miPEP171b	miR171b	<i>SCL</i>	Regulacja kwitnienia	Wang i in., 2010; Lauressergues i in., 2015; Combier i in., 2020
<i>Glycine max</i>	miPEP172c	miR172c	<i>AP2</i>	Wytwarzanie brodawek korzeniowych	Wang i in., 2014; Couzigou i Combier, 2016
	miPEP167c	miR167c	<i>ARF</i>	Rozwój korzeni bocznych i wytwarzanie brodawek korzeniowych	Wang i in., 2015; Combier i in., 2018
<i>Brassica rapa</i>	miPEP156a	miR156a	<i>SPB-box</i>	Rozwój kwiatów	Cheng i in., 2016; Morozov i in., 2019
<i>Vitis vinifera</i>	miPEP396a	miR396a	<i>MYB5</i>	Regulacja szlaku fenylopropanoidowego	Rodrigues, 2019
	miPEP171d1	miR171d	<i>SCL</i>	Tworzenie korzeni przybyszowych	Chen i in., 2020; Julkowska, 2020

Dotychczasowe doniesienia literaturowe jednoznacznie wskazują, że peptydy kodowane przez geny *MIR* stymulują biogenezę mikroRNA, a w konsekwencji mają istotny wpływ na poziom ekspresji ich docelowych mRNA. Ze względu na udział miPEP w procesach rozwojowych roślin takich jak stymulacja wzrostu systemu korzeniowego, regulacja kwitnienia czy szlaku metabolizmu fenylopropanoidów przypuszcza się, że peptydy kodowane przez geny *MIR* mogą mieć istotne znaczenie agronomiczne. Modyfikacje korzeni zostały udokumentowane po wykorzystaniu (poprzez spryskiwanie lub podlewanie) sztucznego miPEP165a u *Arabidopsis* oraz miPEP171b u *Medicago* (Lauressergues i in., 2015; Ormancey i in., 2020). Wykazano również, że miPEP172c oraz miPEP167c stymulują powstawanie brodawek korzeniowych roślin strączkowych (Couzigou i Combier, 2016; Combier i in., 2018). Podobnie, miPEP171d1 stymuluje powstawanie korzeni przybyszowych winorośli, dzięki czemu może okazać się bardzo przydatny w rozmnażaniu tej istotnej pod względem ekonomicznym rośliny (Chen i in.,

2020). Ponadto ostatecznym celem niemal każdego programu poprawy upraw jest zwiększenie plonów. Peptydy kodowane przez geny *MIR* mogą zatem stać się nowym narzędziem inżynierii genetycznej wykorzystywanym w rolnictwie.

Przedstawiony powyżej krótki opis peptydów kodowanych przez geny *MIR* wskazuje na naszą bardzo ograniczoną wiedzę o ich powstawaniu, sposobach działania i funkcjach jakie sprawują. Niedostępne są informacje na temat tego czy wszystkie pri-miRNA w roślinach posiadają krótkie ramki odczytu, które mogą ulegać translacji. Ponadto nieznanym jest mechanizm kierowania pri-miRNA na drogę translacji oraz w jaki sposób peptydy miPEP wpływają na biogenezę odpowiadających im mikroRNA. Ze względu na niewielkie rozmiary przypuszcza się, że peptydy miPEP mogą być transportowane na duże odległości w odpowiedzi na niezidentyfikowane jeszcze sygnały. Ze względu na istotę regulacji mikroRNA i ich sekwencji docelowych przez peptydy miPEP, jak i możliwości wykorzystania peptydów kodowanych przez geny *MIR* jako narzędzie inżynierii genetycznej, niezbędne jest pogłębienie wiedzy w tym zakresie.

2. Cel pracy

Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują na niezwykle istotną rolę mikroRNA444 z rodziny genów *MIR444* we wzroście i rozwoju roślin jednoliściennych. Wiedza jednak na ich temat jest bardzo ograniczona, szczególnie w przypadku jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*), jednej z najważniejszych roślin uprawnych na świecie, zajmującej czwarte miejsce w globalnej produkcji zbóż (Punda, 2009). Ponadto kluczową funkcję w poznaniu mechanizmów działania wybranych mikroRNA mogą też pełnić peptydy kodowane przez geny *MIR*. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było więc scharakteryzowanie genów z rodziny *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*) i ich potencjału kodującego. **Postawiliśmy hipotezę, zgodnie z którą pri-miRNA444 są eksportowane z jądra do cytoplazmy, gdzie mogą ulegać translacji jak mRNA.** Kodowane peptydy mogą wpływać na wydajność biogenezy dojrzałych mikroRNA z rodziny *MIR444*.

W celu weryfikacji postawionej przez nas hipotezy zaplanowano następujące zadania badawcze:

- Charakterystyka struktury genów *MIR444* oraz analiza poziomu ekspresji pri-miRNA444.
- Analiza elementów regulatorowych w promotorach genów *MIR444*.
- Identyfikacja otwartych ramek odczytu (ORF) w pri-miRNA444.
- Analiza zdolności translacyjnej sekwencji kodujących wybrane peptydy z wykorzystaniem techniki profilowania polisomów.
- Nadekspresja PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c w komórkach *Escherichia coli* i ich detekcja z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał.
- Charakterystyka roślin transgenicznych z mutacjami w sekwencjach kodujących peptydy kodowane przez geny *MIR444*.
- Analiza wpływu wybranych PEP444 na akumulację odpowiednich mikroRNA444.

3. Materiały

3.1. Materiał roślinny

W trakcie eksperymentów wykorzystano następujące linie roślin jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*) odmiana Golden Promise:

1. Rośliny typu dzikiego (WT).
2. Rośliny transgeniczne z mutacjami sekwencji kodującej miPEP444c:
 - *pep444c-332.10* – linia, w której nastąpiła insercja 1 pary zasad i delecja 9 par zasad w rejonie sekwencji kodującej miPEP444c, co spowodowało zmianę sekwencji aminokwasowej miPEP444c oraz powstanie przedwczesnego kodonu stop. Powstały peptyd jest krótszy o 29 aminokwasów od końca karboksylowego z porównaniu do peptydu występującego w roślinach typu dzikiego.
 - *pep444c-336.4* oraz *miPEP444c-336.6* – dwie linie, w których wskutek insercji 1 pary zasad oraz delecji 1 pary zasad w sekwencji kodującej miPEP444c doszło do zmiany sekwencji aminokwasowej miPEP444c.

3.2. Oligonukleotydy

Nazwa	Sekwencja	Zastosowanie
OG/8	GCACCATGCTGGTGTAGTGGACACAAA	5' RACE PCR dla mRNA genu <i>MIR444a</i>
OG/2	GGTGCCACCACATGCAATAACTCAAACC	5' RACE PCR dla mRNA genu <i>MIR444b</i>
OG/14	GAAACGCCGACCCGGAGGAG	5' RACE PCR dla mRNA genu <i>MIR444c</i>
OG/18	GGCCAAAGCAAGCCATCAGATGATACG	
OG650	TTGTTGTCTCAAGCTTGCTGCCTCC	
OG651	ATAGTTCTGGCAAAGGGAGGCAGCA	
OG654	CCAAAGCAAGCCATCAGATGATACGG	
OG655	AGCGGTGGCTGAGCAATGATATGG	
OG/9	TGTTTGGGCTCTGCTTCAGTCCTCAC	3' RACE PCR mRNA genu <i>MIR444a</i>
OG/15	ATGGCTGCCCCGATCGGCAGTG	3' RACE PCR mRNA genu <i>MIR444c</i>
OG648	AAGTGGAGGCGGCAAGCTAGAGACA	
OG649	AGGCGGCAAGCTAGAGACAGCAACT	
OG653	CCCTCCCAAATCGTAGTCGCCAAT	

OG652	GCATCTGTGCAGCTGGTGCATGTT	
M13F	CACGACGTTGTAAAACGAC	PCR kolonijna dla wektora pGEM-T Easy
M13R	GGATAACAATTCACACAGG	
APO387	CGTGACGCTGTGTTGCTTGT	Amplifikacja fragmentu sekwencji kodującej ADP1 (ADP – ribosylation factor 1) w celu normalizacji w reakcjach PCR w czasie rzeczywistym
APO388	CCGCATTCATCGCATTAGG	
OG406MIR444	ATCAGCGCTCGCTCGCAC	Amplifikacja pri-miRNA444a
OG407MIR444	AGATATTCCTTCCGTGAAGAAA	
OG410MIR444	CTCCGACTTTTCTTCCCTCG	Amplifikacja pri-miRNA444b
OG411MIR444	TCAATCACGCATCTTCTCATTTT	
AC210 MIR444	CCTCGTTCCTCTCGGTTTC	Amplifikacja pri-miRNA444c
AC211 MIR444	AGGTCGTCGTCCCTTCTACA	
AC2600	GTTTGGGCTCTGCTTCAGTC	Amplifikacja pełnej izoformy (A) pri-miRNA444a
AC2601	CGAGTCAAAGAGTAGAACTGCAAA	
OG1168	AAACATAAATCTTAGGCAGCTACTCC	Amplifikacja pełnej izoformy (E) pri-miRNA444a
OG1169	CAAGAAGTTGTACTAAACTGCGACA	
OG1038	GCGGAGGACTCGAGTTTAGT	Amplifikacja pełnej izoformy (G) pri-miRNA444a
OG1039	TACTCTGAAGATACTCCCTATTTTTCC	
OG1118	AGGACTCGAGGGTCCCAAC	Amplifikacja pełnej izoformy (H) pri-miRNA444a
OG1119	CCAGGCAGCTTTGGAATAAC	
OG1120	GCGAATGAATGATCATAACGAATAAG	Amplifikacja pełnej izoformy (A) pri-miRNA444b
OG1121	AGAGTGAATAGTTTAGAGTCGAATGTC	
OG1058	TGTTCTCCAATCGCTGAAT	Amplifikacja pełnej izoformy (B) pri-miRNA444b
OG1059	AGTTTCAGGGAGGCTGGACT	
OG1056	CGAGGGTTTGAGGTAAATACTGG	Amplifikacja pełnej izoformy (E) pri-miRNA444b
OG1057	TTTAAGGTGTGGAGGGGTGAC	
OSx7	CTCATCTGCTCCCGATGAGC	Amplifikacja pełnej izoformy (B) pri-miRNA444c
OSx9	AAAATGAAATGTAAGACCAACAGGA	
OSx5	GTCGGCGTTTCAGATGAGC	Amplifikacja pełnej izoformy (E) pri-miRNA444c
OSx6	CAGAATCCTAACCTCCTGCGC	
OG658	TGCAGTACTTGTGGGGAAGG	Amplifikacja pełnej izoformy (A) pri-miRNA444c; amplifikacja zbiorczej puli pri-miRNA444a
OG659	AGTATGGTGATGTTCTATTAATTTTGC	
OG660	GGCAACAACCTGCATTACTTTCA	

OG661	CGATTATGAAGACCCATAGATTTTG	amplifikacja zbiorczej puli pri-miRNA444b
OG662	AGCAACTGCATAATTTGCAAGAA	Amplifikacja zbiorczej puli pri-miRNA444c
OG664	ATCATCGGTATGGCCCGAAA	
Zpep1for	ACAGGGTCCCAACTTTGACTTTAT	Amplifikacja fragmentu sekwencji kodującej PEP444a w celu analizy asocjacji pri-miRNA444a z rybosomami
Zpep1rev	GCTGGTGTAGTGGACACAAAATA	
1264	TGCTTGGTGCCACCACAT	Amplifikacja fragmentu sekwencji kodującej miPEP444b w celu analizy asocjacji pri-miRNA444b z rybosomami
2613	TCCGCTCGTAGATCCTTCAC	
ORF168For	ATGGCTGCCCCGATCGG	Amplifikacja fragmentu sekwencji kodującej miPEP444c w celu analizy asocjacji z rybosomami
ORF168Rev	TCAAGGCCAAAGCAAGCCATCAGA	
ADP56-R	TGTA AAACCACGGCACAGAA	Amplifikacja fragmentu cDNA ADP1 w RT-PCR
ADP57-F	CTTGAAGCGTATCGAGGAC	
AS104	TCGGTCTCGTCATCTTCTCC	Amplifikacja fragmentu cDNA MADS27 (MADS-box transcription factor 27) w celu analizy poziomu ekspresji
AS105	TTCGCTCGGCCATATCGATC	
AS916	TGTACCTTGCCTGTACCTG	Amplifikacja fragmentu cDNA NRT1.1 (NITRATE TRANSPORTER 1.1) w celu analizy poziomu ekspresji
AS917	ACTTCTCGGTGCTGTTGGAC	
Pep1HaloFor	ATCGATCGGGATGTTGGGCTCTGCTTCAGTC	Amplifikacja sekwencji kodującej PEP444a (Wyniki, podrozdział 5.3) w celu nadekspresji w <i>E. coli</i>
Pep1HaloRev	ATAAGAATGCGGCCGCCTAAATTGCACCATGCTGGTGTAGTG	
Pep2HaloFor	ATCGATCGGGATGGAGTCCTCGTCCGCTC	Amplifikacja sekwencji kodującej miPEP444b (Wyniki, podrozdział 5.3) w celu nadekspresji w <i>E. coli</i>
Pep2HaloRev	ATAAGAATGCGGCCGCTCATGCTTGGTGCCACCA	
Pep3HaloFor	ATCGATCGGGATGGCTGCCCCGATCGG	Amplifikacja sekwencji kodującej PEP444c (Wyniki, podrozdział 5.3) w celu nadekspresji w <i>E. coli</i>
Pep3HaloRev	ATAAGAATGCGGCCGCTCAAGGCCAAAGCAAGCCATCAGA	
PS436-F	TGCAAGAAGACAACCCGGACC	Kolonijna PCR dla wektora pH6HTN His6 HaloTaq®T7
PS437-R	CCCCTCAAGACCCGTTTAGAGG	
orf444.1_1_ex-F	TGGCAAGACATGCCCTTGGTAGC	RNA naprowadzający Cas9 (sgRNA1) do sekwencji kodującej PEP444a
orf444.1_1_ex-R	AAACGCTACCAAGGGGCATGTCTT	
orf444.1_2_ex-F	TGGCACAAAAGTGCCAGGCAGCTT	RNA naprowadzający Cas9 (gRNA2) do sekwencji kodującej PEP444a
orf444.1_2_ex-R	AAACAAGCTGCCTGGGACTTTTGT	
orf444.2_2_ex1-F	TGGCAAACCTCGGCGCATGCAGG	RNA naprowadzający Cas9 (sgRNA1) do sekwencji kodującej miPEP444b
orf444.2_2_ex1-R	AAACCCTGCATGCGCCGAGGGTTT	

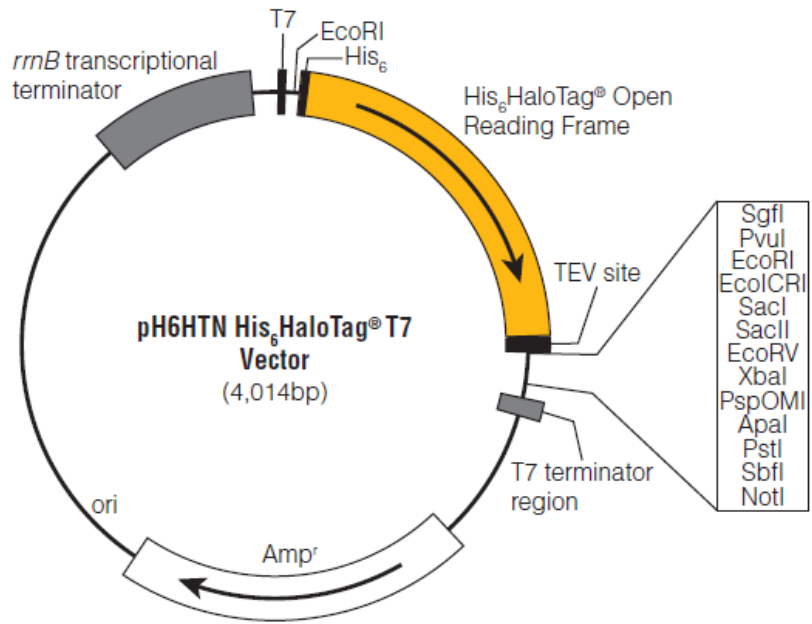
orf444.2_3_ex1-F	TGGCAGCCGGGAGTGCTTGGTCTT	RNA naprowadzający Cas9 (sgRNA2) do sekwencji kodującej miPEP444b
orf444.2_3_ex1-R	AAACAAGACCAAGCACTCCCGGCT	
orf444.3_4-F	TGGCGTGGGGAGTAGAATATGCGG	RNA naprowadzający Cas9 (sgRNA3) do sekwencji kodującej PEP444c
orf444.3_4-R	AAACCCGCATATTCTACTCCCCAC	
orf444.3_5-F	TGGCGGGGCGGTGGTGCTCTTGTA	RNA naprowadzający Cas9 (sgRNA4) do sekwencji kodującej PEP444c
orf444.3_5-R	AAACTACAAGAGCACCACCGCCCC	
IK70	GCTCACATGTTCTTTCCTGCG	Kolonijna PCR dla wektorów pIK
IK71	CACCTGACGTCTAAGAAACC	
Wpep2for	AAAATAAGCGGTAAATTCCAGGAT	Genotypowanie roślin z linii transgenicznym miPEP444b
Wpep2rev	TATACTATTGCTCCCGCTAGGGTTC	
Wpep3for	AGCACCGCCCACTGGAAAAT	Genotypowanie roślin z linii transgenicznym PEP444c
Wpep3rev	ATCGATCTCTCCGATCCCGAAACC	

3.3. Wektory

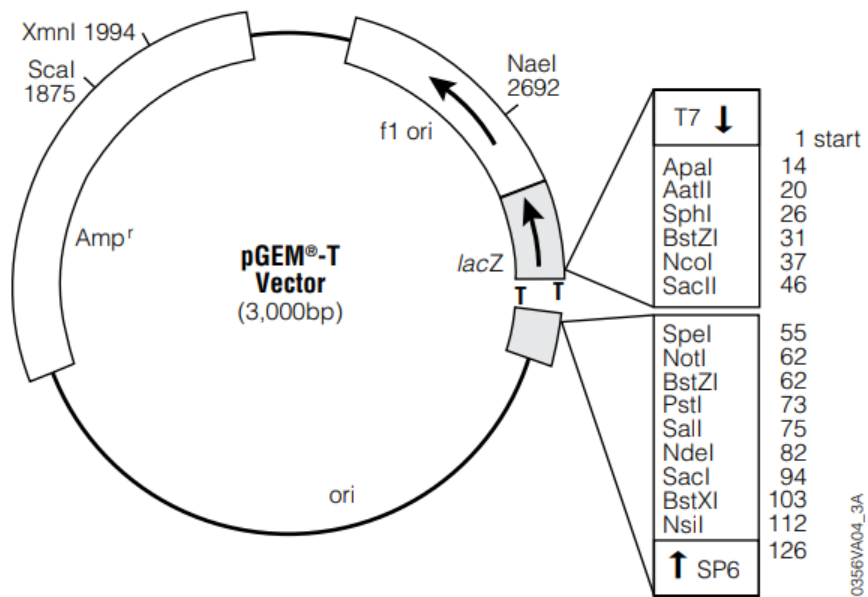
Do nadekspresji sekwencji kodujących PEP444a, miPEP444b i PEP444c w komórkach *Escherichia coli* wykorzystano wektor pH6HTN His₆ HaloTaq[®]T7 (Promega) (Ryc. 5). Gotowy wektor zawiera promotor T7 oraz dwa znaczniki białkowe (HisTaq i HaloTaq), znajdujące się na końcu aminowym analizowanego peptydu.

Do wklonowania produktów PCR uzyskanych przy użyciu techniki 5' i 3' RACE użyto wektor pGEM-T Easy (Promega) (Ryc. 6).

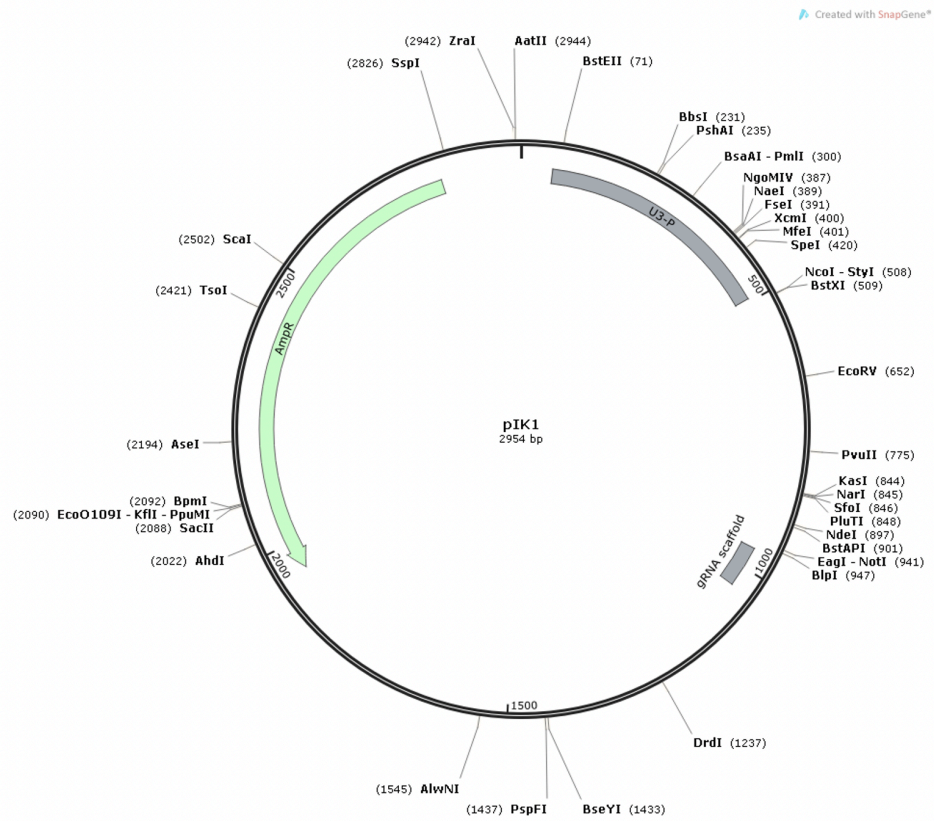
W celu przygotowania konstruktów umożliwiających edycję sekwencji kodujących analizowane peptydy z wykorzystaniem metody CRISPR/Cas użyto zestawu wektorów pIK (Ryc. 7-15), uprzejmie użyczonych przez dr Jochena Kumlehn (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Niemcy).



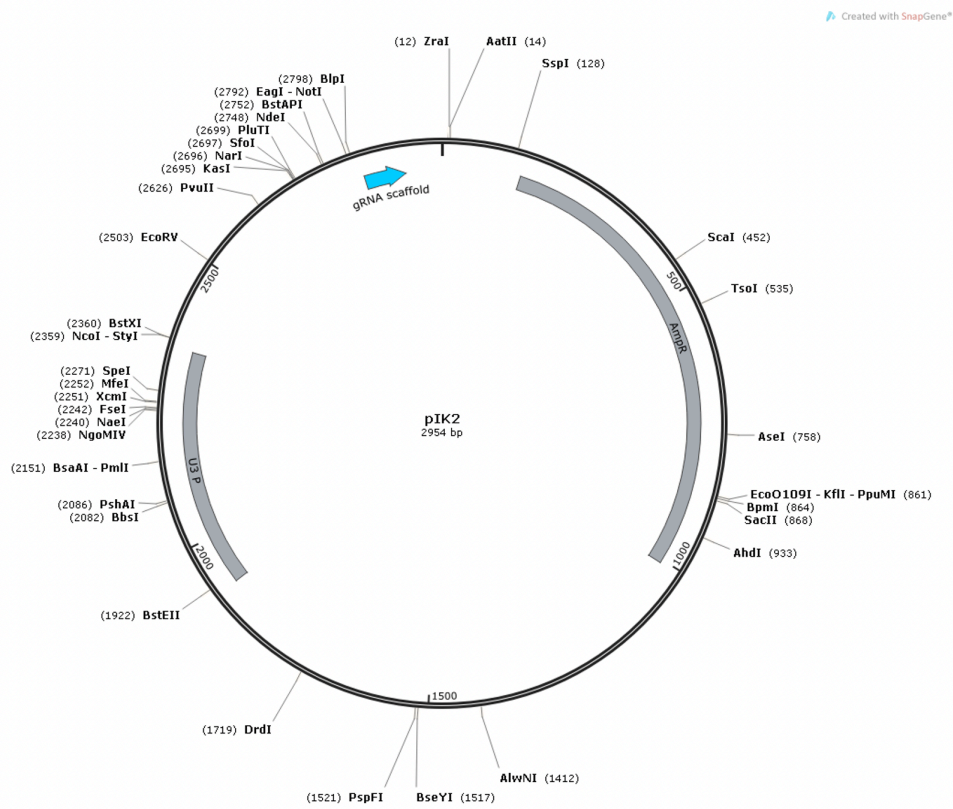
Ryc. 5. Schemat przedstawiający wektor pH6HTN His₆ HaloTag®T7 (Promega).



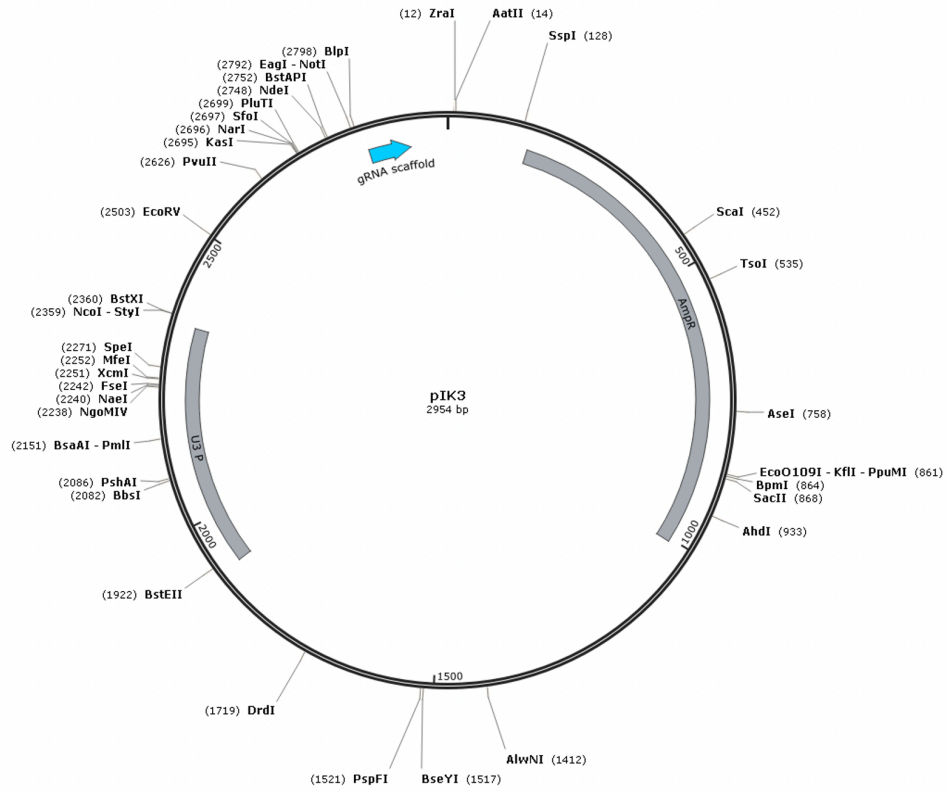
Ryc. 6. Schemat przedstawiający wektor pGEM-T Easy (Promega).



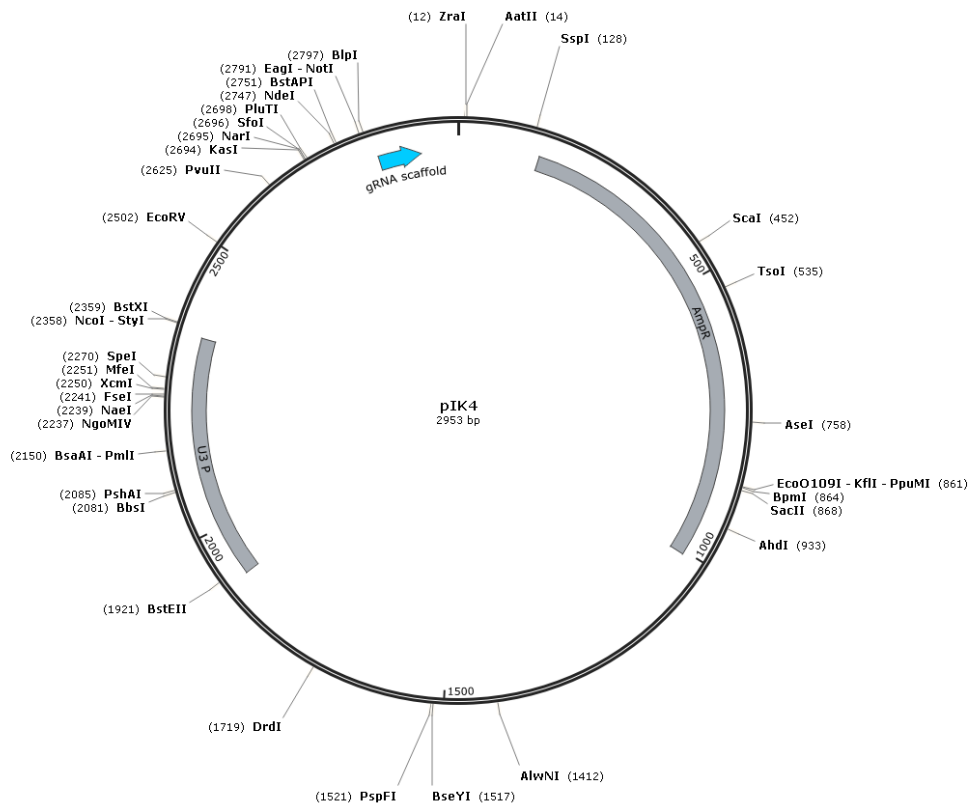
Ryc. 7. Schemat przedstawiający wektor pIK1.



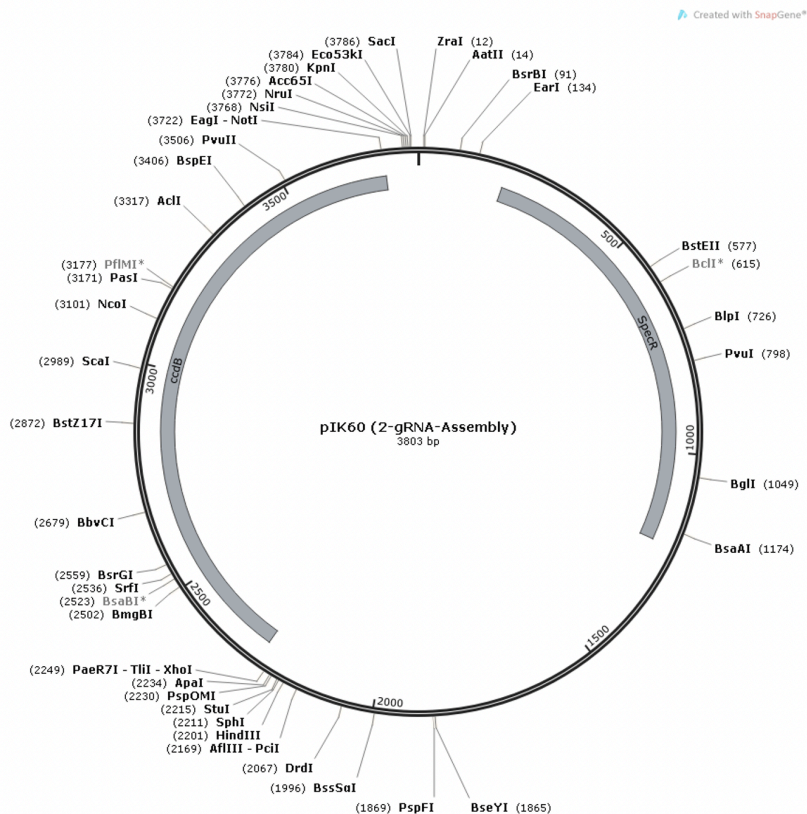
Ryc. 8. Schemat przedstawiający wektor pIK2.



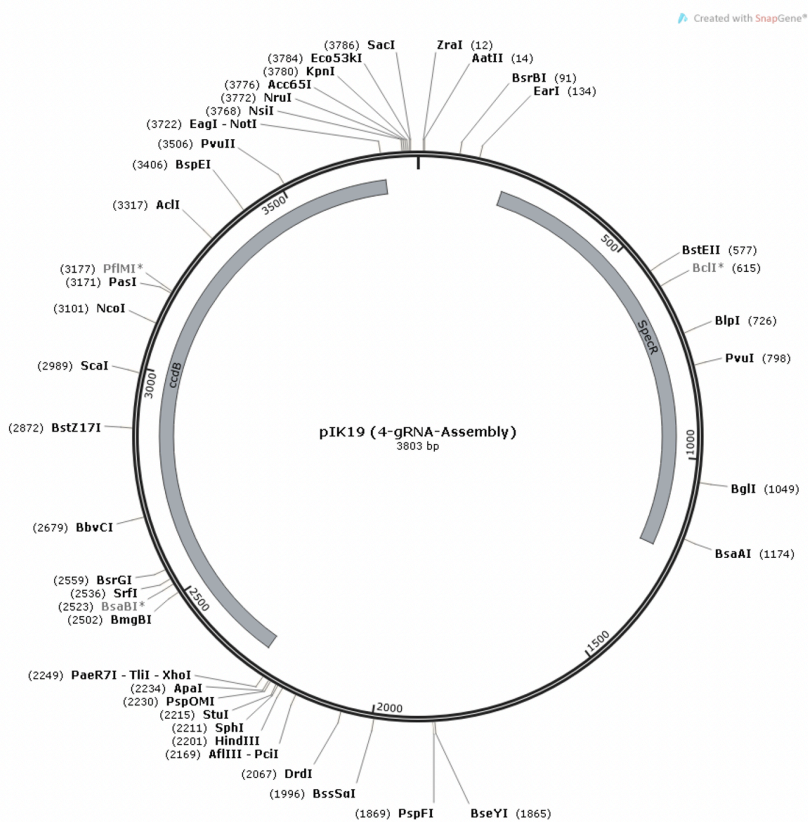
Ryc. 9. Schemat przedstawiający wektor pIK3.



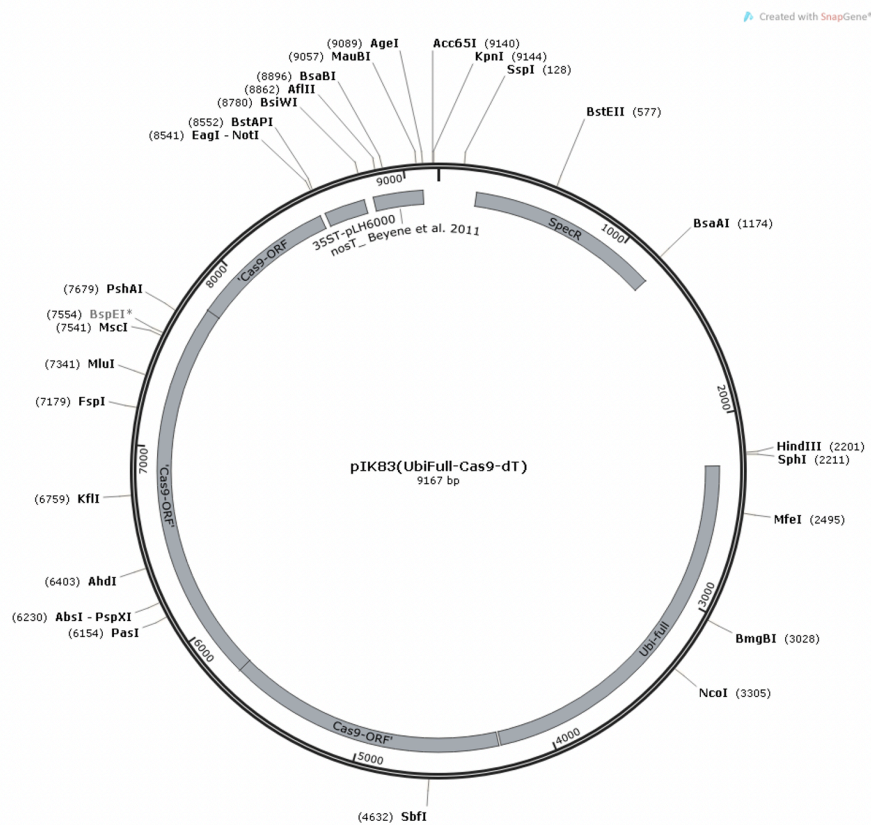
Ryc. 10. Schemat przedstawiający wektor pIK4.



Ryc. 11. Schemat przedstawiający wektor pIK60.



Ryc. 12. Schemat przedstawiający wektor pIK19.



Ryc. 15. Schemat przedstawiający wektor pIK83.

3.4. Odczynniki, roztwory i zestawy gotowe

Odczynniki

Agaroza	Prona
Akrylamid	Sigma Aldrich
Alkohol izoamylowy	Chempur
Amersham™ Protran® membrana	Sigma Aldrich
Antybiotyki	Sigma Aldrich
Azotan amonu	Sigma Aldrich
Baktotrypton	Difco Laboratories
Błękit bromofenolowy	Sigma Aldrich
Bibuła Whatmann 3MM	GE Healthcare
Bromek etydyny	Bio-Rad
β-merkaptoetanol	Sigma Aldrich
Chlorek żelaza (FeCl ₃)	Sigma Aldrich
Chlorek magnezu (MgCl ₂)	Merck
Chlorek sodu (NaCl)	Merck
Chloroform	Chempur
Dicamba	Sigma Aldrich
Diwodorofosforan potasu (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich
Deoksycholan sodu (DOC)	Sigma Aldrich
Dietylopirowęglan (DEPC)	Promega
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	USB
Ekstrakt drożdżowy	Difco Laboratories
1, 4 – ditiotretitol (DTT)	Roth
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	Sigma Aldrich
Kwas etylenoglikol-tetraoctowy (EGTA)	Sigma Aldrich
Kwas solny (HCl)	POCH Gliwice
Etanol 96%	POCH Gliwice
Fenol	POCH Gliwice
Glicerol	Sigma Aldrich
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich
GlycoBlue	ThermoFisher Scientific
Immobilon®-P PVDF membrana	Merck Millipore

Izopropylo-β-D-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	Boehringer Mainheim
Kwas borowy	Sigma Aldrich
MG132	Merck
Mocznik	Sigma Aldrich
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma Aldrich
NP – 40 (Eter nonylofenolowy glikolu polietylenowego)	United States Biochemical
Phytigel	Sigma Aldrich
Polioksyetylenu (10) eter cetylowy (PTE)	Pol-Aura
Pożywka Murashige i Skoog	Duchefa
Sacharoza	Sigma Aldrich
Siarczan magnezu (MgSO ₄)	Sigma Aldrich
Siarczan manganu (MnSO ₄)	Sigma Aldrich
Siarczan miedzi (CuSO ₄)	Sigma Aldrich
Siarczan potasu (K ₂ SO ₄)	Sigma Aldrich
Tris – HCl	Sigma Aldrich
Triton X-100	USB
Tween 20	Sigma Aldrich
N, N, N', N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Sigma Aldrich

Enzymy

Enzymy restrykcyjne	New England BioLabs
Enzymy restrykcyjne Fast Digest	ThermoFisher Scientific
Inhibitor fosfataz (Pierce™ Mini Tablets)	ThermoFisher Scientific
Inhibitor proteaz Complete Mini EDTA - free	Roche
Inhibitor rybonukleaz RNasin®	Promega
Odwrotna transkryptaza Super Script III (20U/μl)	Invitrogen
Phire Plant Direct PCR Master Mix	ThermoFischer Scientific
Polimeraza DNA Advantage 2	Takara Bio
Polimeraza DNA DreamTaq (5U/μl)	ThermoFisher Scientific
Polimeraza DNA Q5® High-Fidelity	New England BioLabs
SYBR® Green PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific
TURBO™ DNase	ThermoFisher Scientific
T4 DNA Ligaza (5U/μl)	New England BioLabs

Markery molekularne

PageRuler™ Prestained	ThermoFisher Scientific
PageRuler™ Plus Prestained	ThermoFisher Scientific
Gene Ruler™ 1kb Plus	ThermoFisher Scientific
Gene Ruler™ 100bp Plus	ThermoFisher Scientific

Zestawy odczynników

Direct-zol RNA Mini Prep Kit	Zymo Research
GelElute Gel Extraction Kit	Sigma Aldrich
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma Aldrich
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma Aldrich
GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup	ThermoFisher Scientific
Quick Ligation™ Kit	New England BioLabs
SMARTer® RACE cDNA Amplification Kit	Takara Bio
Trizol® Reagent	Invitrogen
TruSeq® Small RNA Library Prep Kit	Illumina
ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit	Zymo Research

Przeciwciała

Anty-aktyna (AS13 2640)	Agrisera
F2DAQ5 (anty-PEP444c)	Agrisera
F2DYV0 (anty-miPEP444b)	Agrisera
HORVU6 (anty-PEP444a)	Agrisera

3.5. Materiały do hodowli bakterii

W pracy wykorzystano następujące szczepy bakterii:

- *Escherichia coli* szczep DH5α;
- *Escherichia coli* szczep BL21 (DE3) (Novagen), transformowany wcześniej mieszaniną plazmidów pBB540, pBB535 zgodnie z pracą de Marco i in., 2007, uprzejmie udzielony przez dr Michała Taube;
- *Agrobacterium tumefaciens* szczep AGL1.

Pożywka LB

1%	Baktotrypton
0,5%	Ekstrakt drożdżowy
1%	NaCl

Mieszaninę poddano sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w temperaturze 121°C. W celu przygotowania pożywki stałej, do mieszaniny dodano agar do stężenia końcowego 1,5%.

Pożywka MG/L (Garfinkel i in., 1980), 1000 ml

5 g	Baktotrypton
5 g	Mannitol
2,5 g	Ekstrakt drożdżowy
1 g	Kwas L-glutaminowy
250 mg	KH ₂ PO ₄
100 mg	NaCl
100 mg	MgSO ₄ ×7 H ₂ O
10 µl	Biotyna – roztwór 0,1 mg/l

Po przygotowaniu mieszaniny ustalono pH 7,2 przy użyciu 1 M NaOH. Następnie mieszaninę poddano sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w temperaturze 121°C. W celu przygotowania pożywki stałej, do mieszaniny dodano 15 g agaru oraz dodano odpowiedni antybiotyki po ostudzeniu pożywki do 50°C.

Stężenia końcowe używanych antybiotyków

50 µg/ml	Ampicylina
34 µg/ml	Chloramfenikol
50 µg/ml	Kanamycyna
200 µg/ml	Ryfampicyna
100 µg/ml	Spektynomycyna

3.6. Materiały do analiz białkowych

Bufor do sonikacji komórek bakteryjnych

5 mM	DTT
50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
200 mM	NaCl

1 mM	EDTA
0,1%	Triton X-100
1x	Inhibitory proteaz (Complete Mini EDTA – free protease inhibitors, Roche)

Bufor do ekstrakcji białek z materiału roślinnego

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
100 mM	NaCl
1%	Triton X-100
1 mM	EDTA
1%	NP-40
1mM	PMSF
10 μM	MG132 (inhibitor proteasomu)
1x	Inhibitory proteaz (Complete Mini EDTA – free protease inhibitors, Roche)
1x	Inhibitory fosfataz (Pierce™ Phosphatase Inhibitor Mini Tablets, ThermoFisher Scientific)

30% roztwór akrylamid:bisakrylamid (100 ml) (30% AA)

30 g	Akrylamid
0,8 g	Bisakrylamid
100 ml	Woda dejonizowana MiliQ

5% żel poliakrylamidowy zagęszczający

300 μl	30% AA
220 μl	1M Tris-HCl, pH 6,8
1,22 ml	Woda dejonizowana MiliQ
17,5 μl	10% SDS
10 μl	10% APS
2 μl	TEMED

13% żel poliakrylamidowy rozdzielający

2,48 ml	30% AA
1,83 ml	1M Tris-HCl, pH 8,6
670 μl	Woda dejonizowana MiliQ

50 μ l	10% SDS
30 μ l	10% APS
3 μ l	TEMED

Obciążacz do białek 6×SSB

0,375M	Tris-HCl, pH 6,8
60%	glicerol
12%	SDS
0,6M	β -merkптоetanol
0,06%	błękit bromofenolowy

Obciążacz do białek 2×SSB

0,06M	Tris-HCl, pH 6,8
5%	glicerol
2%	SDS
4%	β -merkптоetanol
0,0025%	błękit bromofenolowy

Bufor do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym (10×Laemmli)

250 mM	Tris, pH 6,8
1,92 M	glicyna
1%	SDS

Bufor do transferu półsuchego

25 mM	Tris, pH 8,3
192 mM	glicyna
20%	metanol
0,1%	SDS

Bufor 10×TBS, 1000 ml

24 g	Tris
88 g	NaCl

Mieszanie uzupełniono wodą dejonizowaną MiliQ do 1000 ml oraz ustalono pH 7,6 przy użyciu 1M HCl.

Bufor TBST, 1000 ml

100 ml	bufor TBS
900 ml	woda dejonizowana MiliQ
1 ml	Tween 20

Bufor fosforanowy, 1000 ml

25 mM	KH_2PO_4
25 mM	K_2HPO_4

3.7. Bufory i roztwory wykorzystane do pracy z DNA i RNA

Bufor 1×TBE, pH 8,3

89 mM	Tris
2 mM	EDTA
89 mM	kwask borowy

Bufor 0,5×TBE, pH 8,3

44,5 mM	Tris
1 mM	EDTA
44,5 mM	kwask borowy

Żel agarozowy (1-2%) do elektroforezy DNA i RNA

1-2% (w/v)	agaroz
1×	bufor TBE

40% (w/v) roztwór akrylamid:bisakrylamid (40% AA)

38%	Akrylamid
2%	Bisakrylamid

15% Żel poliakrylamidowy do rozdzielania RNA

65,62 ml	40% AA
17,5 ml	10×bufor TBE
87,5 g	mocznik
31,5 ml	woda dejonizowana MiliQ
660 µl	APS
3,75 µl	TEMED

Bufor EBR, 20 ml

1 ml	1 M octan magnezu
10 ml	1 M octan amonu
40 µl	0,5 M EDTA
200 µl	10% SDS
8,76 ml	woda dejonizowana MiliQ

3.8. Materiały do uprawy roślin

Pożywka roślinna

28 mM	NH ₄ NO ₃
20 mM	KH ₂ PO ₄
4 mM	K ₂ SO ₄
16 mM	MgSO ₄ ×7 H ₂ O
53 µM	H ₃ BO ₃
8 µM	CuSO ₄
4 µM	MnSO ₄ ×H ₂ O
120 µM	FeCl ₃ ×6 H ₂ O

Pożywkę po przygotowaniu przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,2 µm). W przypadku stresu nadmiaru azotu w pożywce wykorzystano 10-krotnie większą ilość NH₄NO₃ w porównaniu do warunków kontrolnych.

3.9. Materiały do przeprowadzenia transformacji, selekcji i regeneracji zarodków jęczmiennych

100×stężony roztwór witamin do pożywki indukującej tworzenie się tkanki kalusowej

100 mg/l	Tiamina HCl
35 g/l	Mio-inozytol
69 g/l	Prolina

100×stężony roztwór witamin do pożywki przejściowej

40 mg/l	Tiamina HCl
10 g/l	Mio-inozytol

Powyższe mieszaniny przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,2 μm) oraz przechowywano w 4°C.

Roztwór CuSO₄

125 mg	CuSO ₄ ×5 H ₂ O
100 ml	H ₂ O

Roztwór Timentin

160 mg/ml	Timentin
1 ml	H ₂ O

Roztwór Dicamba

2,5 mg/l	Dicamba
1000 ml	H ₂ O

Roztwór kwasu 2,4 – dichlorofenoksyoctowego (2, 4 – D)

2,5 mg/l	2,4 – D
1 ml	100% C ₂ H ₅ OH

Powyższe mieszaniny przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,2 μm) oraz przechowywano w -20°C.

Roztwór 6 – benzyloaminopuryna (BAP)

1 mg	BAP
1 ml	H ₂ O

Do przygotowanej mieszaniny dodano dwie krople 1 M NaOH, przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,2 μm) oraz przechowywano w -20°C.

Pożywka indukująca tworzenie się tkanki kalusowej

4,3 g/l	Pożywka Murashige i Skoog (MO221 Duchefa)
30 g/l	Maltoza
1 g/l	Hydrolizat kazeiny
10 ml/l	100×stężony roztwór witamin
1 ml/l	Roztwór Dicamba
1 ml/l	Roztwór CuSO ₄ × 5 H ₂ O
3,5 g/l	Phytigel

Po przygotowaniu mieszaniny ustalono pH 5,8 przy użyciu 1 M NaOH. Następnie mieszaninę poddano sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w temperaturze 121°C. 100×stężony roztwór witamin, roztwór Dicamba i roztwór $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ dodano po sterylizacji, po ostygnięciu pożywki, bezpośrednio przed wylaniem na szalki.

Pożywka przejściowa

2,7 g/l	Pożywka Murashige i Skoog pozbawiona NH_4NO_3 (Duchefa MO238)
20 g/l	Maltoza
165 mg/l	NH_4NO_3
750 mg/l	Glutamina
10 ml/l	100×stężony roztwór witamin
1 ml/l	Roztwór kwasu 2,4 – dichlorofenoksyoctowego (2, 4 – D)
1 ml/l	Roztwór $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
100 $\mu\text{l/l}$	Roztwór BAP
3,5 g/l	Phytigel
1 ml/l	Timentin 160 mg/l
50 mg/l	Hygromycyna

Po przygotowaniu mieszaniny ustalono pH 5,8 przy użyciu 1 M NaOH. Następnie mieszaninę poddano sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w temperaturze 121°C. 100×stężony roztwór witamin, 2,4 – D, roztwór $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, roztwór BAP, timentin i higromycynę dodano po sterylizacji, po ostygnięciu pożywki, bezpośrednio przed wylaniem na szalki.

Pożywka regenerująca

2,7 g/l	Pożywka Murashige i Skoog pozbawiona NH_4NO_3 (Duchefa MO238)
20 g/l	Maltoza
165 mg/l	NH_4NO_3
750 mg/l	Glutamina
10 ml/l	100×stężony roztwór witamin
1 ml	Timentin 160 mg/l
3,5 g/l	Phytigel
50 mg/l	Hygromycyna

Po przygotowaniu mieszaniny ustalono pH 5,8 przy użyciu 1 M NaOH. Następnie mieszaninę poddano sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w temperaturze 121°C. Po ostudzeniu pożywki dodano 100×stężony roztwór witamin, timentin i higromycynę.

3.10. Materiały wykorzystane w eksperymencie profilowania polisomów

Bufor do ekstrakcji polisomów, 50 ml

0,2 M	Tris, pH 9,0
0,2 M	KCl
0,025 M	EGTA
0,035 M	MgCl ₂
1%	Mieszanina detergentów
1%	DOC
1%	PTE
5 mM	DTT
1 mM	PMSF
100 µg/ml	Cykloheksymid
50 µg/ml	Chloramfenikol
1000 U	Inhibitor rybonukleaz Rnasin®

Bufor przygotowano w dniu eksperymentu i przechowywano na lodzie.

20% Mieszanina detergentów

20% (w/v) Brij-35

20% (v/v) Triton X-100

20% (v/v) glikol oktylofenylo-polietylenowy (Igepal CA 630)

20% (v/v) Monolaurynian polioksyetylenusorbitanu (Tween 20)

Po przygotowaniu roztwór przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,2 µm) i przechowywano w temperaturze pokojowej.

DOC

10% Deoksycholalan sodu (DOC)

Po przygotowaniu roztwór przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,2 µm) i przechowywano w temperaturze pokojowej.

PTE

20% (v/v) Polioksyetylenu (10) eter cetylowy

Po przygotowaniu roztwór przefiltrowano (filtr o średnicy porów 0,2 µm) i przechowywano w temperaturze pokojowej.

DTT

0,5 M Dithiothreitol

Po przygotowaniu przechowywano w -20 °C.

PMSF

0,5 M fluorek fenylometylosulfonylu rozpuszczony w izopropanolu

Po przygotowaniu przechowywano w temperaturze -20°C.

Gradienty gęstości sacharozy

Sacharoza (%)	2 M Sacharoza	10 × Roztwór soli	H₂O (ml)	Cykloheksymid i chloramfenikol (µl)	Objętość na gradient (ml)
60	22	2,5	0,5	2,5	1,65
45	24,75	3,75	9	3,75	3,3
30	16,5	3,75	17,25	3,75	3,3
15	5,5	2,5	17	2,5	1,65

Do probówek wirówkowych (Seton Scientific, open – top polyclear™, 7030) napipetowano 1,65 ml sacharozy o stężeniu 60% i umieszczono w temperaturze -80°C na jedną godzinę. Następnie dodano 3,3 ml sacharozy o stężeniu 45% i ponownie umieszczono w temperaturze -80°C na jedną godzinę. W ten sam sposób postępowano z dwiema pozostałymi warstwami sacharozy o stężeniu 30% i 15%. Gradienty przechowywano w temperaturze -80°C. W dniu eksperymentu gradienty umieszczono w temperaturze 37°C na jedną godzinę, a następnie w temperaturze 4°C na jedną godzinę.

10×Roztwór soli

0,4 M Tris-HCl pH 8,4

0,2 M KCl

0,1 M MgCl₂

Roztwór poddano sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w temperaturze 121°C i przechowywano w temperaturze 4°C.

4. Metody

4.1. Uprawa roślin

Nasiona jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare*) odmiana Golden Promise poddano kiełkowaniu na zwilżonej wodą sterylnej bibule filtracyjnej typu Whatman® przez 3 dni w komorze fitotronowej (MLR35-1H, Sanyo, Panasonic) w warunkach długiego dnia (16 h) w temperaturze 20°C. Następnie rośliny przeniesiono do doniczek zawierających perlit, poddany wcześniej sterylizacji w autoklawie. Rośliny uprawiano w kontrolowanych warunkach, które obejmowały fotoperiod 16 godzin światła/8 godzin ciemności w temperaturze 20°C w dzień i 15°C w nocy. Rośliny podlano pożywką, w przypadku stresu nadmiaru azotu zastosowano 10-krotnie większą ilość NH₄NO₃ (280 mM) w porównaniu do warunków kontrolnych (28 mM) (Heuermann i in., 2021; Yao i in., 2011; Lips i in., 1990).

Nasiona roślin transgenicznych kiełkowano w ten sam sposób jak opisano wyżej, dalszą uprawę prowadzono w doniczkach zawierających ziemię z piaskiem w stosunku 7:2, poddanej wcześniej sterylizacji.

4.2. Eksperymenty z wykorzystaniem kwasów nukleinowych

Izolacja RNA i przygotowanie cDNA

Izolację RNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników Direct-zol RNA Mini Prep Kit (Zymo Research) zgodnie z zaleceniami producenta. RNA wykorzystany do przygotowania bibliotek małych RNA został poddany analizie integralności RNA wyznaczając wartość RIN (ang. *RNA integrity number*) z wykorzystaniem RNA Nano Chips i Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies). RNA o wartości RIN powyżej 7 wykorzystano do przygotowania bibliotek małych RNA.

W celu przygotowania matrycy cDNA, 15 µg całkowitego RNA traktowano enzymem TURBO™ DNase (Thermo Fischer Scientific) według zaleceń producenta w celu usunięcia zanieczyszczeń genomowym DNA (gDNA). 3 µg tak przygotowanego RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu odwrotnej transkryptazy SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fischer Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta enzymu.

Izolacja DNA

Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific) według zaleceń producenta.

Szybka amplifikacja końców cDNA techniką 5'/3' RACE

Amplifikację pełnej długości cDNA genów *MIR444a*, *MIR444b* i *MIR444c* wykonano przy użyciu zestawu odczynników SMARTer® RACE 5'/3' (Takara Bio, USA). W celu przygotowania matrycy cDNA do eksperymentów 5' RACE i 3' RACE wykorzystano RNA wyizolowany z dwutygodniowych roślin jęczmienia uprawianego w warunkach kontrolnych oraz w warunkach stresu nadmiaru azotu.

PCR w czasie rzeczywistym

Reakcję prowadzono z wykorzystaniem odczynnika Power SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) i aparatu Quant Studio™ Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Mieszanina reakcyjna (10 µl) składała się z 5 µl odczynnika 2×Power SYBR Green PCR Master Mix, 1 µl matrycy cDNA oraz pary specyficznych oligonukleotydów (200 nM każdy).

Wykorzystano następujący profil termiczny:

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95°C	10 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	40
Przyłączanie starterów i amplifikacja	60°C	1 min	
Krzywa topnienia	95°C	15 s	1
	60°C - 95°C	30 min	1

Względny poziom ekspresji wyliczono stosując metodę $2^{-\Delta Ct}$ i przedstawiono jako $\log_{10}(2^{-\Delta Ct}) + 7$, natomiast krotność zmiany wyliczono przy zastosowaniu metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$. W celu normalizacji danych wykorzystano poziom mRNA *ADPI* (GeneBank: AJ508228.2), który oznaczano jednocześnie z badanymi transkryptami. Do analizy istotności różnic pomiędzy próbkami kontrolnymi i badanymi wykorzystano test *t*-Studenta (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Istotność statystyczną obliczono z zastosowaniem wartości poziomu ekspresji genów uzyskanych metodą $2^{-\Delta Ct}$.

Przygotowanie konstruktów wykorzystanych w pracy

Edycja sekwencji kodujących PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas9

W celu delekcji sekwencji kodujących analizowane peptydy zaprojektowano dwa RNA naprowadzające (ang. *single guide RNA*, *sgRNA*) Cas9 do sekwencji kodującej PEP444a, dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodującej miPEP444b oraz dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodującej PEP444c. RNA naprowadzający zaprojektowano z wykorzystaniem oprogramowania DESKGEN™ CRISPR Libraries, następnie zweryfikowano przy użyciu RNAfold web serwer zgodnie z pracą Kumlehn i in, 2018. Następnie, do sekwencji naprowadzających dołączono miejsca cięcia dla enzymu restrykcyjnego BsaI-HF (New England BioLabs). Tak przygotowane fragmenty ligowano z wektorami potraktowanymi tym samym enzymem restrykcyjnym. Jeden z dwóch RNA naprowadzających do sekwencji kodującej PEP444a wprowadzono do wektora pIK1, a drugi do wektora pIK2. Z kolei dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodujących miPEP444b oraz dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodujących PEP444c ligowano odpowiednio z wektorami pIK1, pIK2, pIK3 oraz pIK4. Ligację prowadzono z wykorzystaniem zestawu Quick Ligation™ Kit (New England BioLabs) zgodnie z zaleceniami producenta. Połową mieszaniny ligacyjnej transformowano komórki kompetentne (szczep DH5α bakterii *Escherichia coli*) metodą szoku cieplnego (1 minuta w temperaturze 42°C, następnie krótka inkubacja na lodzie, a następnie przez 1 godzinę w temperaturze 37°C). 70 µl hodowli wysiano na szalkę ze stałą pożywką LB z dodatkiem ampicyliny i inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 h. W celu identyfikacji odpowiednich kolonii przeprowadzono PCR kolonijną, następnie wybrane kolonie zaszczipiono do pożywki płynnej z dodatkiem ampicyliny. Wyizolowano plazmidy i przeprowadzono trawienie restrykcyjne z wykorzystaniem enzymu PstI. Następnie plazmidy poddano sekwencjonowaniu w celu zweryfikowania wklonowanych sekwencji.

Następnie przeklonowano docelowe sekwencje z plazmidów pIK1 i pIK2 do wektora pIK60 (w celu edycji *MIR444a*), natomiast sekwencje z plazmidów pIK1, pIK2, pIK3 i pIK4 do wektora pIK19 (w celu edycji *MIR444b* oraz *MIR444c*). Reakcję tę przeprowadzono z wykorzystaniem metody Golden Gate. Wykorzystano enzym restrykcyjny Esp3I-FD (ThermoFisher Scientific) oraz T4 DNA Ligazę (ThermoFisher Scientific). 5 µl mieszaniny reakcyjnej wykorzystano do transformacji komórek

kompetentnych w ten sam sposób jak opisano powyżej. Bakterie wysiano na szalkę ze stałą pożywką LB z dodatkiem spektynomycyny. Przeprowadzono PCR kolonijną, a wybrane kolonie bakteryjne zaszczepiono do pożywki płynnej. Wyizolowano plazmidy i sekwencjonowano.

Po stwierdzeniu poprawności wklonowanych sekwencji przeprowadzoną kolejną reakcją Golden Gate. W tym celu zarówno pIK60, jak i pIK19 połączono z pIK22, pIK23 i pIK83. Wykorzystano enzym restrykcyjny BsaI-HF (New England BioLabs) oraz T4 DNA Ligazę (ThermoFisher Scientific). Następnie postępowano tak jak po poprzedniej reakcji Golden Gate, zamiast spektynomycyny wykorzystano ampicylinę. W ten sposób otrzymano dwa plazmidy: pZmUbi:sgRNA1:sgRNA2:pZmUbi:SpCas9 (pZmUbi – promotor ubikwityny pochodzący z kukurydzy *Zea mays*; sgRNA – RNA naprowadzający do sekwencji docelowej; SpCas9 – transgen kodujący Cas9 otrzymany ze *Streptococcus pyogenes*) w celu edycji genu *MIR444a* kodującego peptyd PEP444a oraz pZmUbi:sgRNA1:sgRNA2:gsRNA3:sgRNA4:pZmUbi:SpCas9 wykorzystanego do jednoczesnej edycji *MIR444b* kodującego miPEP444b oraz *MIR444c* kodującego PEP444c. Plazmidy przeznaczone do transformacji bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, po stwierdzeniu poprawności sekwencji poprzez sekwencjonowanie, wyizolowano z użyciem ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit (Zymo Research).

Nadekspresja sekwencji kodujących PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c w bakteriach *Escherichia coli*

Sekwencje kodujące analizowanych w niniejszej rozprawie peptydów amplifikowano przy zastosowaniu polimerazy Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs). Wykorzystano w tym celu matrycę cDNA uzyskaną z RNA wyizolowanego z pędów i korzeni 2-tygodniowych roślin jęczmienia zwyczajnego typu dzikiego (WT) i oligonukleotydy specyficzne dla danej sekwencji. Oligonukleotydy zawierały również miejsca rozpoznawane przez wybrane enzymy restrykcyjne.

Po amplifikacji sekwencji kodujących produkty PCR rozdzielono w 1,2% żelu agarozowym i oczyszczono z wykorzystaniem zestawu odczynników GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup (ThermoFisher Scientific). Tak przygotowane fragmenty DNA ligowano z wektorem pH6HTN His₆ HaloTaq®T7 (Promega) przygotowanym przez trawienie tymi samymi enzymami restrykcyjnymi. Ligację prowadzono przez 3 godziny w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem Ligazy T4 DNA (ThermoFisher Scientific). Następnie transformowano komórki kompetentne *Escherichia coli*

i posiewano na stałą pożywkę LB z dodatkiem antybiotyku. Następnie przeprowadzono PCR kolonijną. Po rozdzieleniu produktów PCR w żelu agarozowym wybrano kolonie zawierające wstawkę o odpowiedniej długości, prowadzono ich hodowlę w pożywce płynnej LB i wyizolowano plazmidy, które sekwencjonowano.

Transformacja bakterii *Escherichia coli* szczep DH5 α i DB3 oraz *Agrobacterium tumefaciens* szczep AGL1

Komórki bakterii *Escherichia coli* po wprowadzeniu w stan kompetencji przechowywano w temperaturze -80°C w probówkach typu Eppendorf. Przed przystąpieniem do transformacji komórki inkubowano w lodzie przez 20 minut. Następnie, do rozmrożonych komórek dodano 10 μl mieszaniny ligacyjnej, mieszano i inkubowano w lodzie przez 30 minut. Po inkubacji mieszaninę poddano stresowi termicznemu w temperaturze 42°C przez 1 minutę i ponownie umieszczono w lodzie na 2 minuty. Następnie dodano 300 μl płynnej pożywki LB i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę z wytrząsaniem 350 rpm. Całość wysiano na szalki ze stałą pożywką LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku i inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 h. Po wyselekcjonowaniu odpowiednich kolonii bakterii *Escherichia coli* zaszczepiano nimi 5 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku i hodowano w temperaturze 37°C przez 16 godzin z wytrząsaniem 200 rpm. Po tym czasie przystąpiono do izolacji plazmidów zgodnie z protokołem producenta zestawu odczynników GenEluteTMHP plazmid Miniprep Kit (Thermo Fischer Scientific).

Komórki bakterii *Agrobacterium tumefaciens* po wprowadzeniu w stan kompetencji przechowywano w temperaturze -80°C w probówkach typu Eppendorf. Przed przystąpieniem do transformacji komórki inkubowano w lodzie przez 10 minut. Następnie dodano 100 ng plazmidu pZmUbi:sgRNA1:sgRNA2:pZmUbi:SpCas9 lub pZmUbi:sgRNA1:sgRNA2:gsRNA3:sgRNA4:pZmUbi:SpCas9. Bakterie przeniesiono do kuwety do elektroporacji o szerokości szczeliny 1 mm (Carl Roth GmbH + Co. KG) oraz poddano elektroporacji przy użyciu Bio-Rad Gene Pulser Xcell. Następnie komórki inkubowano w temperaturze 28°C przez 48 godzin. Po wyselekcjonowaniu odpowiednich kolonii niosących pożądaną wstawkę zaszczepiono wybrane kolonie bakterii *Agrobacterium tumefaciens* do pożywki płynnej MG/L z odpowiednimi antybiotykami i inkubowano w temperaturze 28°C przy wytrząsaniu 200 rpm. Przygotowane w ten sposób *inoculum* wykorzystano do transformacji zarodków jęczmiennych.

Genotypowanie roślin z wyprowadzonych linii transgenicznych

Z roślin transgenicznych wyizolowano genomowy DNA (gDNA) z wykorzystaniem zestawu odczynników Phire Plant Direct PCR Master Mix (ThermoFischer Scientific). Następnie przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem oligonukleotydów amplifikujących fragment DNA obejmujący mutacje wprowadzone z użyciem technologii CRISPR/Cas9. Produkty PCR sekwencjonowano i analizowano z użyciem programów Chromas (Technelysium DNA Sequencing Software) oraz DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd). Do analiz wykorzystano drugie pokolenie (G2, ang. *second generation*) roślin transgenicznych.

Przygotowanie bibliotek małych RNA

Totalny RNA o wartości RIN powyżej 7 rozdzielono w 15% żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem w buforze 1×TBE przy napięciu 300 V. Po skończonej elektroforezie żel inkubowano z wykorzystaniem odczynnika SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (ThermoFischer Scientific) przez 20 min w ciemności. Następnie, z żelu wycięto fragment RNA odpowiadający długości 17-30 nukleotydów, który przeniesiono do probówki typu Eppendorf. Fragmenty żelu podzielono na mniejsze fragmenty, dodano 450 µl buforu EBR i inkubowano w temperaturze 25°C przez jedną noc z wytrząsaniem 300 rpm. W następnej kolejności, do prób dodano 225 µl mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamyłowego, 225 µl kwaśnego fenolu, wymieszano i wirowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut z prędkością 18620×g. Do fazy wodnej dodano 1,5 µl odczynnika GlycoBlue (ThermoFischer Scientific) oraz 45 µl octanu sodu i 1350 µl 96% etanolu. Mieszaninę inkubowano w temperaturze -20°C przez jedną noc, po czym wirowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut z prędkością 18 620×g. Uzyskany osad rozpuszczono w 5 µl wody dołączonej do zestawu komercyjnego TruSeq® Small RNA Library Prep Kit (Illumina). Następnie, w celu przygotowania bibliotek małych RNA postępowano zgodnie z zaleceniami producenta. Otrzymane biblioteki cDNA oczyszczono poprzez rozdział elektroforetyczny w 15% żelu poliakrylamidowym z glicerolem przy napięciu 150 V. Przeprowadzono precypitację jak poprzednio oraz oceniono jakość bibliotek z wykorzystaniem High Sensitivity DNA Chips i Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies). Następnie, zmierzono stężenie przy użyciu Fluorometru Qbit 2.0 (ThermoFischer Scientific) i przygotowano mieszaninę bibliotek o stężeniu 10 nM każda. Sekwencjonowanie zlecono firmie Genesupport SA (Szwajcaria).

4.3. Eksperymenty z wykorzystaniem białek

Nadekspresja białek w *Escherichia coli* szczep BL21 (DE3)

5 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), chloramfenikolu (34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) i spektynomycyny (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zaszczerpiono jedną kolonię komórek i inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny z wytrząsaniem 300 rpm (kultura wstępna). Następnie całość hodowli przeniesiono do świeżej pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), chloramfenikolu (34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) i spektynomycyny (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) i prowadzono hodowlę do uzyskania zawiesiny o $\text{OD}_{600} = 0,5-0,6$. W celu indukcji nadekspresji dodano 1M IPTG (Izopropyllo β -d-1-tiogalaktopiranozyd) do uzyskania ostatecznego stężenia 0,4 mM. Następnie prowadzono hodowlę w temperaturze 18°C przez 16 godzin z wytrząsaniem 170 rpm. Po odpowiednim czasie hodowlę zwirowano w temperaturze 4°C przez 15 minut z prędkością 4500 \times g, odrzucono supernatant i przystąpiono bezpośrednio do sonikacji komórek.

Komórki zawieszono w buforze do sonikacji, sonikowano (15 cykli: 35 s ON i 35 s OFF), następnie wirowano w temperaturze 4°C przez 15 minut z prędkością 14000 \times g. Po wirowaniu zebrano supernatant (frakcja rozpuszczalna) a uzyskany osad zawieszono w wyjściowej objętości buforu do sonikacji (frakcja nierozpuszczalna). Obie frakcje wykorzystano bezpośrednio w dalszych etapach badań lub przechowywano w temperaturze -80°C, po uprzednim zamrożeniu w ciekłym azocie.

Elektroforeza białek

Elektroforezę prowadzono w 13% poliakrylamidowym żelu rozdzielającym (30;0,8) po uprzednim zatężeniu prób w 5% żelu zagęszczającym (30;0,8). Rozdział prób prowadzono przy natężeniu 25 mM w buforze Laemmla.

Ekstrakcja białek z materiału roślinnego

Do 300 mg rozartego w ciekłym azocie materiału roślinnego dodano 1 ml buforu ekstrakcyjnego i inkubowano w temperaturze 4°C przez 1 godzinę z wytrząsaniem 1000 rpm. Następnie próby wirowano w temperaturze 4°C przez 30 minut z prędkością 10000 \times g. Otrzymany supernatant stanowiący ekstrakt białkowy wykorzystano do pomiaru stężenia białek przy użyciu krzywej BSA i odczynników Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, który rozcieńczono wodą w stosunku 1:4.

Transfer białek na membranę

W przypadku pracy z PEP44a i PEP444c, po wyjęciu żelu z szybek odcięto żel zagęszczający i korek. Membranę (Immobilon®-P PVDF Membrane; 0,45 µm; Merck) aktywowano w metanolu przez 15 sekund po czym inkubowano po 2 minuty w wodzie dejonizowanej i buforze do transferu. Zaktywowaną membranę nałożono na zamoczony wcześniej w buforze do transferu papier z włókna bawełnianego (Bio-Rad), przykryto kolejną warstwą papieru i rolowano w celu usunięcia pęcherzyków powietrza. Transfer prowadzono przy napięciu 15V przez 1 godzinę.

Podczas eksperymentów z miPEP444b wykorzystano membranę nitrocelulozową (Amersham™ Protran®; 0,2 µm; Sigma Aldrich), którą nałożono na zamoczony wcześniej w buforze fosforanowym papier z włókna bawełnianego (Bio-Rad), przykryto kolejną warstwą papieru i rolowano w celu usunięcia pęcherzyków powietrza. Transfer prowadzono przy napięciu 15V w temperaturze 4°C przez całą noc.

Western blot

W przypadku pracy z PEP44a i PEP444c, po zakończonym procesie transferu membranę blokowano 5% mlekiem odtłuszczonym rozpuszczonym w TBST przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po blokowaniu membranę inkubowano w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciała I-rzędowego (1:000 HORVU6 przeciwko PEP444a, 1:5000 F2DAQ5 przeciwko PEP444c, 1:3000 anty-aktyna), sporządzonego w 2% roztworze mleka odtłuszczonego. Następnie membranę czterokrotnie płukano buforem TBST (jeden raz przez 15 min i trzy razy przez 5 min) i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciała II-rzędowego (1:25000), koniugowanego z peroksydazą chrzanową. Po inkubacji membranę czterokrotnie płukano buforem TBST i nakładano na 3 min substrat Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (500 µl odczynnik A + 500 µl odczynnik B, uprzednio zmieszane). Detekcję prowadzono przy zastosowaniu urządzenia G-Box i oprogramowania Gene-Sys.

Podczas eksperymentów z miPEP444b, po zakończonym procesie transferu membranę inkubowano w buforze fosforanowym z dodatkiem 0,2% glutaraldehydu w temperaturze pokojowej przez 45 minut. Następnie membranę trzykrotnie płukano buforem TBS (3 razy przez 10 min) i blokowano 5% mlekiem odtłuszczonym rozpuszczonym w TBST w temperaturze 4°C przez 8 godzin. Po tym czasie membranę trzykrotnie płukano buforem TBST (3 razy przez 10 min) i inkubowano w temperaturze

4°C przez całą noc w roztworze przeciwciała I-rzędowego (1:5000 F2DYV0 przeciwko miPEP444b), sporządzonego w 2% roztworze mleka odtłuszczonego. Następnie membranę trzykrotnie płukano buforem TBST (3 razy przez 10 min) i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciała II-rzędowego (1:25000), koniugowanego z peroksydazą chrzanową. Po inkubacji membranę trzykrotnie płukano buforem TBST (3 razy przez 10 min), nakładano na 3 min substrat Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents i dalej postępowano jak w przypadku pracy z PEP444a i PEP444c.

4.4. Profilowanie polisomów

Zastosowano protokół Muströph i in., 2009 z modyfikacjami.

Osobno pędy oraz korzenie jęczmienia roztarto w ciekłym azocie. 1,2 g sproszkowanych pędów i 2 g sproszkowanych korzeni umieszczono w probówce typu falkon o pojemności 50 ml i dodano dwie objętości buforu do ekstrakcji polisomów. Całość inkubowano na lodzie przez 10 minut, sporadycznie mieszając. Następnie mieszaninę wirowano przez 30 minut z prędkością 10 304×g. Supernatant przeniesiono do nowej probówki typu falkon o pojemności 50 ml. 700 µl otrzymanych ekstraktów nałożono na schłodzone gradienty gęstości sacharozy i wirowano w temperaturze 4°C przez 2 godziny 45 minut z prędkością 151 000×g z użyciem rotora SW 41 Ti (Beckman Coulter Life Sciences). Po zwirowaniu gradienty zostały zebrane jako frakcje od góry do dołu przy jednoczesnym pomiarze absorbancji przy długości fali 254 nm. Frakcje zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

4.5. Izolacja i transformacja zarodków jęczmiennych

Izolacja zarodków jęczmiennych

Kłosa jęczmienia zebrano, gdy średnica zarodków wynosiła 2 mm. Nasiona poddano sterylizacji w 70% etanolu przez 2 minuty, następnie w sterylnych warunkach przemywano je dwa razy wodą i kontynuowano sterylizację w 10% podchlorynie sodu przez 4 minuty. Nasiona czterokrotnie przemywano w wodzie po czym przy użyciu sterylnej pęsety i przy użyciu binokularu wyekstrahowano niedojrzałe zarodki. Następnie po usunięciu osi zarodkowych, materiał przeniesiono na szalkę z pożywką indukującą tworzenie się tkanki kalusowej. 25 zarodków zostało umieszczonych na jednej szalce,

300 zarodków zostało przeznaczonych do transformacji jednym konstruktem. Szalki z zarodkami przechowywano w temperaturze 23°C w ciemności przez jedną noc.

Przygotowanie kultury *Agrobacterium tumefaciens* do transformacji zarodków jęczmiennych

Kolonie bakteryjną *Agrobacterium tumefaciens* szczep AGL1 niosącą odpowiedni plazmid zaszczerpiono do 10 ml pożywki MG/L z odpowiednimi antybiotykami i inkubowano w temperaturze 28°C przez 40 godzin z wytrząsaniem 200 rpm. Następnie do kultury bakteryjnej dodano 10 ml 30% glicerolu i wymieszano. Powstałą mieszaninę rozdzielono na mniejsze próby po 400 µl i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny sporadycznie mieszając. Tak przygotowane *inoculum* przechowywano w temperaturze -80°C. W dniu poprzedzającym planowaną transformację częścią *inoculum* zaszczerpiono 10 ml pożywki MG/L bez antybiotyków i inkubowano w temperaturze 28°C przez 18 godzin przy wytrząsaniu 200 rpm.

Transformacja zarodków jęczmiennych

Krople *inoculum* naniesiono na powierzchnię wcześniej inkubowanych przez noc w ciemności zarodków jęczmiennych. Szalki ułożono tak, aby pozbyć się nadmiaru kultury bakteryjnej i pozostawiono do wyschnięcia przez 10 minut. Następnie zarodki przeniesiono na nowe szalki z pożywką indukującą tworzenie się tkanki kalusowej i inkubowano w temperaturze 23°C w ciemności przez 3 dni.

Selekcja i regeneracja roślin transgenicznych

Zarodki przeniesiono na pożywkę przejściową, którą suplementowano roztworem Timentin (160 mg/l) i higromycyną (50 mg/l). Etap ten wykonano trzy razy w dwutygodniowych odstępach uzyskując całkowity okres selekcji na pożywce przejściowej wynoszący 6 tygodni. Otrzymane kalusy przeniesiono na pożywkę regeneracyjną i inkubowano przez 2 tygodnie w świetle w temperaturze 24°C. Następnie kalusy wykazujące obecność zielonych rejonów zostały przeniesione na świeżą pożywkę regeneracyjną, na której pozostały do momentu utworzenia sadzonek z pędami o długości 2-3 cm. Powstałe sadzonki przeniesiono w celu ukorzenia do plastikowych tub z pożywką regeneracyjną. Gdy pęd roślin wypełnił wnętrze tub, sadzonki przeniesiono do doniczek.

4.6. Analiza fenotypowa roślin z wyprowadzonych linii transgenicznych

Analizy przeprowadzono w oparciu o pomiary morfologiczne roślin oraz pomiary fluorescencji chlorofilu α z wykorzystaniem maszyny fenotypującej PlantScreen™ Systems, Photon Systems Instruments. Wykorzystano oprogramowanie PlantScreen Scheduler z użyciem protokołu Quenching (Shin i in., 2021). Przed rozpoczęciem eksperymentu 2-tygodniowe rośliny transgeniczne *pep444c-332.10*, *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6* poddano 20-minutowej adaptacji do ciemności w celu wygaszenia wzbudzeń w fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów. Tak przygotowane rośliny zostały poddane analizom.

W celu pomiaru fluorescencji chlorofilu α rośliny potraktowano krótkimi pulsami czerwonego światła o natężeniu nie wystarczającym do wybicia elektronów z centrum reakcji PSII. Sygnał fluorescencji chlorofilu α zebrany w tym momencie określono jako minimalna fluorescencja (F_0). W następnym etapie rośliny traktowano krótkim pulsem światła białego o natężeniu wysycającym, powodującym wybicie elektronów ze wszystkich centrów reakcji PSII. Odnotowano wzrost pomiaru fluorescencji chlorofilu α do wartości maksymalnej (F_m). W następnej kolejności rośliny trzymano w ciemności w celu wygaszenia fluorescencji, po czym potraktowano je ciągłym światłem białym o natężeniu $600 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ przerywanym pulsami światła wysycającego. W ten sposób zmierzono podstawowe wartości fluorescencji chlorofilu i wyliczono kluczowe parametry przedstawione w tabeli poniżej.

Mierzona wartość	Obliczony parametr	Wzór
minimalna fluorescencja (F_0)	Zmienność fluorescencji w stanie adaptacji do ciemności (F_v)	$F_v = F_m - F_0$
maksymalna fluorescencja (F_m)	Maksymalna wydajność kwantowa PSII (QY_{max})	$QY_{\text{max}} = F_v/F_m$
Stacjonarna fluorescencja maksymalna na świetle (F_{m_Lss})	Stacjonarne wygaszanie niefotochemiczne (NPQ_{Lss})	$NPQ_{Lss} = (F_m - F_{m_Lss})/F_{m_Lss}$
Ustabilizowana fluorescencja na świetle	współczynnik spadku fluorescencji (Rfd)	$Rfd = (F_p - F_{t_Lss})/F_{t_Lss}$

Po wykonaniu pomiarów fluorescencji chlorofilu, rośliny sfotografowano z wykorzystaniem zainstalowanej w maszynie fenotypującej kamery rgb. Otrzymane

w ten sposób obrazy wykorzystano do określenia podstawowych wartości morfometrycznych (powierzchnia pędów i korzeni). Analizy przeprowadzono z użyciem oprogramowania PlantScreen Data Analyzer i wykorzystano następujące parametry:

Parametr	Analiza morfometryczna pędów	Analiza morfometryczna korzeni
The formula	4*G-3*B-R	R*G
Threshold	0,15	0,10028
Median Filter Size	5	1
Min Size	150	1000
Min Hol Size	50	50
Crop Objects on Borders	True	True
Use Reflection Reduction	True	True
Use Reflection Reduction	False	True

4.7. Analizy bioinformatyczne

Analiza struktury genów *MIR444*

W celu poznania budowy genów z rodziny *MIR444* przeprowadzono eksperymenty 5' oraz 3' RACE. Do analizy sekwencji wykorzystano programy Chromas (Technelysium DNA Sequencing Software) oraz DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd). Sekwencje cDNA przyrównano do genomu jęczmienia zwyczajnego zdeponowanego w bazie danych Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/>) oraz NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) z wykorzystaniem oprogramowania MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) (Kato i in., 2019).

Analiza elementów regulatorowych zlokalizowanych w promotorach genów *MIR444*

Do analizy elementów regulatorowych promotorów genów z rodziny genów *MIR444* wykorzystano bazę danych New PLACE (A database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements) (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>).

Analiza wyników sekwencjonowania małych RNA

Dane w postaci surowej pobrano z serwerów firmy Fasteris, następnie z wykorzystaniem programu Fastqc przeprowadzono wstępną analizę jakości sekwencjonowania małych RNA (Wingett i Andrews, 2018). W następnym etapie usunięto sekwencje adapterów z użyciem programu cutadapt (Martin i in., 2011). Do dalszej analizy wybrano odczyty o długościach od 18 do 28 nukleotydów. Następnie w celu zliczenia odczytów wykorzystano funkcję fastx_collapser z pakietu FASTX-

toolkit. Dalsze analizy (normalizacja odczytów do RPM oraz testy statystyczne) wykonano w środowisku programowania R. Do wizualizacji uzyskanych w ten sposób wyników wykorzystano pakiet ggplot2.

5. Wyniki

5.1. Analiza elementów regulatorowych w promotorach genów *MIR444*

W Zakładzie Ekspresji Genów zidentyfikowano trzy geny *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*): *MIR444a*, *MIR444b* i *MIR444c*. W celu poznania ich biologicznej funkcji przeprowadzono analizę bioinformatyczną rejonów promotorowych. Wykorzystano bazę danych New PLACE (www.dna.affrc.go.jp), zawierającą roślinne elementy regulatorowe działające w układzie *cis* (Higo i in., 1999). Najliczniej występującym motywem *cis*-regulatorowym we wszystkich trzech analizowanych genach z rodziny *MIR444* jest CACTFTPPCA1, element związany z regulacją metabolizmu azotowego u roślin (Bai, i in., 2013). Do innych, równie licznych motywów promotorowych należą motywy biorące udział w odpowiedzi rośliny na światło (EBOXBNNAPA, GT1CONSENSUS, GATABOX, SORLIP1AT, SORLIP2AT, IBOXCORE, INRNTPSADB), stres wysokiej temperatury (CAATBOX1, PRECONSCRHSP70A, CCAATBOX1) czy na obecność miedzi (CURECORECR). Zidentyfikowane elementy regulatorowe przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Elementy regulatorowe w promotorach genów *MIR444a*, *MIR444b* oraz *MIR444c*. Przedstawiono listę najczęściej występujących motywów działających w układzie *cis*.

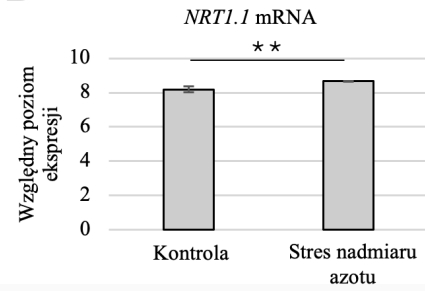
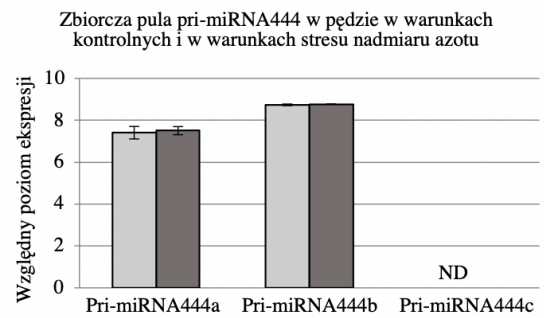
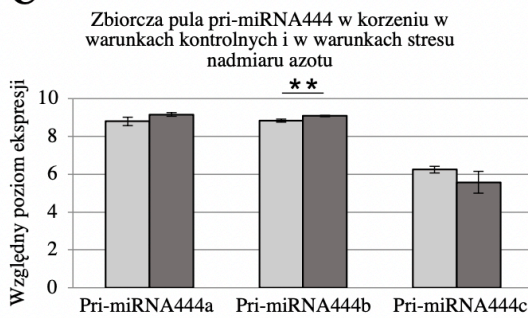
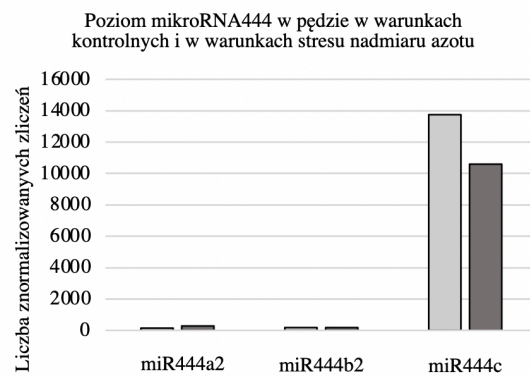
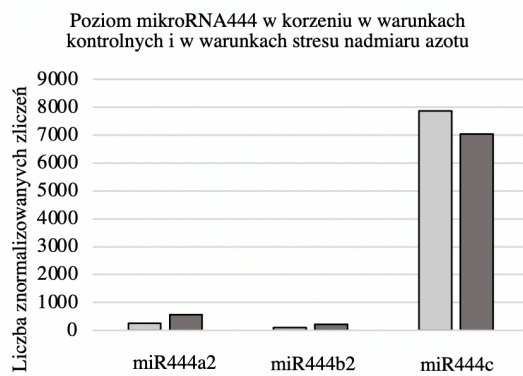
Motyw	Sekwencja	Liczba			Funkcja
		<i>MIR444a</i>	<i>MIR444b</i>	<i>MIR444c</i>	
CACTFTPPCA1	YACT	22	23	22	Regulacja metabolizmu azotowego u roślin (Bai i in., 2013); Regulacja karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (Gowik i in., 2004)
ARR1AT	NGATT	14	27	14	Udział w odpowiedzi na cytokininy (Sakai i in., 2000)
EBOXBNNAPA	CANNTG	7	26	20	Regulacja odpowiedzi na światło (Tiwari i in., 2016)
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	7	26	20	Powszechny w promotorach genów odpowiedzi na odwodnienie (Tiwari i in., 2016)
DOFCOREZM	AAAG	12	21	17	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych DOF (Yanagisawa i Schmidt, 1999)
CAATBOX1	CAAT	11	23	15	Powszechny w promotorach genów odpowiedzi na stres

					wysokiej temperatury (Rieping i Schöffl, 1992)
GT1CONSENSUS	GRWAAW	12	24	6	Udział w odpowiedzi na światło i kwas salicylowy (Villain i in., 1996; Buchel i in., 1999)
CGCGBOXAT	VCGCGB	14	4	18	Regulacja aktywności auksyn (Yang i Poovaiah, 2002; Wong i in., 2017)
WRKY71OS	TGAC	11	12	11	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych WRKY71OS regulujących szlak sygnałowy giberelin (Zhang i in., 2004)
GATABOX	GATA	9	15	7	Regulacja odpowiedzi na światło (Terzaghi i Cashmore, 1995)
CURECORECR	GTAC	4	18	8	Regulacja odpowiedzi na miedź (Tiwari i in., 2016)
CGACGOSAMY3	CGACG	10	3	15	Obecny w promotorach genów kodujących amylazy (Hwang i in., 1998)
ACGTATERD1	ACGT	14	6	6	Obecny w promotorze genu <i>ERD1</i> u Arabidopsis (Yamamoto i in., 2007)
GTGANTG10	GTGA	15	0	11	Regulacja ekspresji genów specyficznych dla pyłku (Rogers i in., 2001)
POLLEN1LELAT52	AGAAA	5	13	5	Element kluczowy w aktywacji genu <i>LAT52</i> (Bate i Twell, 1998)
LTRECOREATCOR15	CCGAC	8	1	11	Regulacja odpowiedzi na niską temperaturę (Baker i in., 1994)
MYBCORE	CNGTTR	5	4	11	Miejsce wiązania białek MYB (Chen i in., 2019)
SORLIP1AT	GCCAC	7	6	6	Regulacja odpowiedzi na światło (Hudson i Quail, 2003)
PRECONSCRHSP70A	SCGAYNR NNNNNNN NNNNNNN NHD	11	1	5	Udział w odpowiedzi na stres wysokiej temperatury (Belity i in., 2022)
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	5	8	2	Element związany z regulacją ekspresji genów w komórkach korzenia (Zhang i in., 2019)
BIHD1OS	TGTCA	6	4	3	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych BIHD1 (Liu i in., 2017)
RAV1AAT	CAACA	4	6	3	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych RAV1 (Hwang i in., 2008)
CCAATBOX1	CCAAT	2	6	4	Udział w odpowiedzi na stres wysokiej temperatury (Rieping i Schöffl, 1992)

SEF4MOTIFGM7S	RTTTTTR	2	8	2	Element związany z rozwojem zarodka (Silva i in., 2022)
WBOXNTERF3	TGACY	3	5	4	Obecny w promotorze genu kodującego ERF3 (Finkelstein i in., 2002)
CARGCW8GAT	CWWWW WWWWG	3	6	2	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych MADS (Aerts i in., 2018)
CBFHV	RYCGAC	2	2	7	Regulacja odpowiedzi na stres niskiej temperatury (Zarka i in., 2003)
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	5	2	4	Element związany z odpowiedzią na kwas abscysynowy (ABA) (Kim i in., 1997)
MYBCOREATCYCB1	AACGG	1	2	8	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych MYB, regulacja odpowiedzi na ABA (Abe i in., 2003)
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	1	3	7	
SORLIP2AT	GGGCC	2	0	9	Regulacja odpowiedzi na światło (Hudson i Quail, 2003)
TATABOX5	TTATTT	1	9	1	Sekwencja TATA, miejsce wiązania białka TBP, umożliwiającego rozpoczęcie transkrypcji (Patikoglou i in., 1999)
ABRERATCAL	MACGYG B	5	3	2	Element związany z odpowiedzią na kwas abscysynowy (Yang i in., 2011; Kaur i in., 2017)
ABRELATERD1	ACGTG	8	1	1	
TAAAGSTKST1	TAAAG	2	5	3	Miejsce wiązania białek DOF (Plesch i in., 2001)
WBOXATNPR1	TTGAC	3	4	3	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych WRKY (Yu i in., 2001)
CIACADIANLELHC	CAANNNN ATC	1	4	4	Element związany z rytmem dobowym (Piechulla i in., 1998)
GT1GMSCAM4	GAAAAA	2	5	2	Regulacja odpowiedzi na zasolenie (Liang i in., 2017)
IBOXCORE	GATAA	1	7	1	Regulacja odpowiedzi na światło (Li i in., 2014)
NODCON2GM	CTCTT	1	4	4	Element związany z regulacją ekspresji genów w komórkach korzenia (Wang i in., 2022)
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	1	4	4	
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	2	2	4	Regulacja odpowiedzi na auksyny i kwas salicylowy (Luo i in., 2013)
INRNTPSADB	YTCANTY Y	0	5	2	Regulacja odpowiedzi na światło (Li i in., 2014)
POLASIG3	AATAAT	1	6	0	Sekwencja konsensusowa, sygnał poliadenylacji (Joshi, 1987)

RHERPATEXPA7	KCACGW	2	2	3	Element związany z regulacją ekspresji genów w komórkach korzenia (Ahmadi i in., 2018)
TBOXATGAPB	ACTTTG	3	2	2	Regulacja odpowiedzi na światło (Yamamoto i in., 2007)

Biorąc pod uwagę liczebność elementu regulatorowego CACTFTPPCA1 oraz znaczenie azotu w prawidłowym rozwoju roślin postanowiono przeanalizować wpływ stresu nadmiaru azotu na 2-tygodniowe rośliny jęczmienia zwyczajnego. Eksperyment ten przeprowadzono wspólnie z dr Aleksandrą Smoczyńską, a wyniki zostały opublikowane w pracy Grabowska i in., 2020. U roślin rosnących w warunkach stresu nadmiaru azotu zaobserwowano skrócenie korzeni (Ryc. 16A). Następnie przeanalizowano poziom ekspresji genu transportera azotowego, *NRT1.1* (Ryc. 16B). Odnotowano istotny statystycznie wzrost poziomu mRNA tego genu, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi przez Filleur i in., 1999 oraz Lejay i in., 1999. Efekt ten świadczy o poprawności przeprowadzonego przez nas eksperymentu. Ponadto zmierzono poziom ekspresji pri-miRNA444 w korzeniu i pędzie w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu (Ryc. 16C). Odnotowano wzrost poziomu pri-miRNA444b w korzeniu w warunkach stresu w porównaniu do kontroli. Nie zaobserwowano natomiast istotnych statystycznie różnic między poziomem pri-miRNA444b w pędzie. W przypadku pri-miRNA444a również nie odnotowano istotnych statystycznie różnic zarówno w korzeniu jak i pędzie. Szczególnie interesującym wynikiem jest brak detekcji pri-miRNA444c w pędzie. Z kolei wyniki analizy uzyskanych z głębokiego sekwencjonowania małych RNA wskazują, że dojrzały mikroRNA444c występuje zarówno w korzeniu jak i pędzie, a jego poziom nie zmienia się istotnie w warunkach stresu nadmiaru azotu (Ryc. 16D). Efekt ten może świadczyć o szybkim i wydajnym procesie dojrzewania pierwotnych transkryptów mikroRNA444c. Liczba znormalizowanych zliczeń miR444a2 oraz miR444b2 świadczy z kolei o niskim poziomie tych mikroRNA zarówno w korzeniu jak i pędzie. Uzyskane przez nas wyniki wskazują na brak bezpośredniej korelacji między poziomem pri-miRNA i dojrzałych mikroRNA.

A**B****C****D**

□ Kontrola
 ■ Stres nadmiaru azotu
 ND – Nie wykryto

Ryc. 16. Wpływ stresu nadmiaru azotu na 2-tygodniowe rośliny jęczmienia zwyczajnego. (A) 2-tygodniowe rośliny jęczmienia zwyczajnego w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. (B) Poziom ekspresji genu *NRT1.1*. (C) Analiza RT-qPCR dla zbiorczej puli pri-miRNA444a/b/c w korzeniu (lewy panel) i w pędzie (prawy panel) w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Względny poziom ekspresji oznacza różnicę poziomu ekspresji między genem badanym a genem referencyjnym obliczoną z wykorzystaniem metody $2^{-\Delta Ct}$ (patrz rozdział 4.2). (D) Liczba znormalizowanych zliczeń mikroRNA444a/b/c w korzeniu (lewy panel) i w pędzie (prawy panel) w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. (B i C) Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe ($n = 3$), gwiazdki wskazują poziom istotności statystycznej ($*P < 0,05$; $**P < 0,01$). Do obliczeń statystycznych wykorzystano test *t*-Studenta.

Ze względu na obecność alternatywnego miejsca startu transkrypcji (TSS) w rejonie piątego egzonu genu *MIR444a* postanowiono przeanalizować również rejon powyżej 1 kb w celu identyfikacji elementów regulatorowych (patrz rozdział 5.2). Zaobserwowano obecność elementu INR, który określa miejsce startu transkrypcji w promotorach pozbawionych kasety TATA (tabela 3). Uzyskany wynik potwierdza możliwość powstawania transkryptu zainicjowanego w egzonie piątym genu *MIR444a* jako niezależnej jednostki transkrypcyjnej, nakładającej się częściowo z sekwencją kodującą pri-miR444a.

Tabela 3. Elementy regulatorowe w obrębie 1 kb powyżej alternatywnego TSS genu *MIR444a*. Zaprezentowano listę najczęściej występujących motywów działających w układzie *cis*. Na czerwono zaznaczono element INR.

Motyw	Sekwencja	Liczba	Funkcja
CACTFTPPCA1	YACT	23	Regulacja metabolizmu azotowego u roślin (Bai i in., 2013); Regulacja karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (Gowik i in., 2004)
GTGANTG10	GTGA	13	Regulacja ekspresji genów specyficznych dla pyłku (Rogers i in., 2001)
EBOXBNNAPA	CANNTG	12	Regulacja odpowiedzi na światło (Tiwari i in., 2016)
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	12	Powszechny w promotorach genów odpowiedzi na odwodnienie (Tiwari i in., 2016)
DOFCOREZM	AAAG	10	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych DOF (Yanagisawa i Schmidt, 1999)
ARR1AT	NGATT	9	Udział w odpowiedzi na cytokininy (Sakai i in., 2000)
CURECORECR	GTAC	8	Regulacja odpowiedzi na miedź (Tiwari i in., 2016)
POLLENILELAT52	AGAAA	6	Element kluczowy w aktywacji genu <i>LAT52</i> (Bate i Twell, 1998)
GATABOX	GATA	6	Regulacja odpowiedzi na światło (Terzaghi i Cashmore, 1995)

ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	6	Element związany z regulacją ekspresji genów w komórkach korzenia (Zhang i in., 2019)
RAV1AAT	CAACA	5	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych RAV1 (Hwang i in., 2008)
GT1CONSENSUS	GRWAAW	4	Udział w odpowiedzi na światło i kwas salicylowy (Villain i in., 1996; Buchel i in., 1999)
MYBCORE	CNGTTR	4	Miejsce wiązania białek MYB (Chen i in., 2019)
CIACADIANLELHC	CAANNNNATC	4	Element związany z rytmem dobowym (Piechulla i in., 1998)
CAATBOX1	CAAT	4	Powszechny w promotorach genów odpowiedzi na stres wysokiej temperatury (Rieping i Schöffl, 1992)
WRKY71OS	TGAC	4	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych WRKY71OS regulujących szlak sygnałowy giberelin (Zhang i in., 2004)
MYCATERD1	CATGTG	3	Udział w odpowiedzi na stres suszy (Li i in., 2019)
MYCATRD22	CACATG	3	
WBOXHVIS01	TGACT	3	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych SUSIBA2, regulacja odpowiedzi na sacharozę (Sun i in., 2003)
WBOXNTERF3	TGACY	3	Obecny w promotorze genu kodującego ERF3 (Finkelstein i in., 2002)
EECCRCAH1	GANTTNC	2	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych MYB (Deb i Kundu, 2015)
RHERPATEXPA7	KCACGW	2	Element związany z regulacją ekspresji genów w komórkach korzenia (Ahmadi i in., 2018)
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	2	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych MYB, regulacja odpowiedzi na ABA (Abe i in., 2003)
GT1GMSCAM4	GAAAAA	2	Regulacja odpowiedzi na zasolenie (Liang i in., 2017)
CCAATBOX1	CCAAT	2	Udział w odpowiedzi na stres wysokiej temperatury (Rieping i Schöffl, 1992)
MYB1AT	WAACCA	2	Powszechny w promotorach genów odpowiedzi na odwodnienie (Tiwari i in., 2016)
REALPHALGLHCB21	AACCAA	2	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych MYB (Yadav i in., 2017)
POLASIG3	AATAAT	2	Sekwencja konsensusowa, sygnał poliadenylacji (Joshi, 1987)
P1BS	GNATATNC	2	Regulacja odpowiedzi na niedobór fosforanów (Li i in., 2015)
CATATGGMSAUR	CATATG	2	Regulacja odpowiedzi na auksyny (Tiwari i in., 2015)
-10PEHVPSBD	TATTCT	2	Regulacja odpowiedzi na światło (Yazaki i in., 2004)
ACGTATERD1	ACGT	2	Obecny w promotorze genu <i>ERD1</i> u <i>Arabidopsis</i> (Yamamoto i in., 2007)
INRNTPSADB	YTCANTYY	2	Miejsce startu transkrypcji w promotorach pozbawionych kasety TATA (Xi i in., 2007)
WBOXATNPR1	TTGAC	2	Miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych WRKY (Yu i in., 2001)

5.2. Struktura genów *MIR444* w jęczmieniu oraz analiza poziomu ekspresji pri-miRNA444

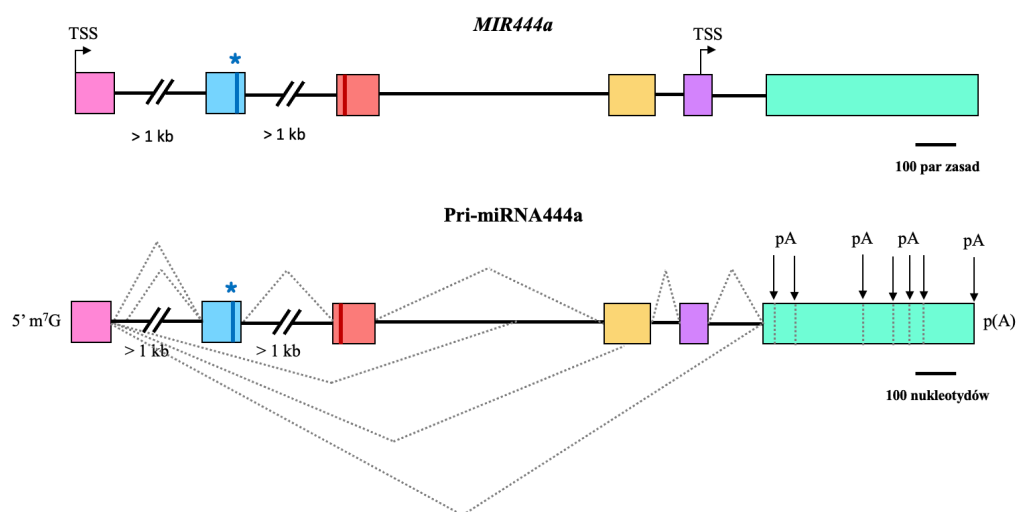
W celu określenia pełnej długości sekwencji transkryptów genów *MIR444a/b/c* zaprojektowano startery do analiz 5' i 3' RACE. Przeprowadzono dwie reakcje RACE-PCR, pierwszą z użyciem startera genowo specyficznego (GSP1) i startera uniwersalnego (UPM), drugą z użyciem wewnętrznego startera genowo specyficznego (GSP2) i wewnętrznego startera uniwersalnego (NUP). Wykorzystano cDNA pochodzące z pędów i korzeni 2-tygodniowych roślin jęczmienia uprawianych zarówno w warunkach kontrolnych jak i w warunkach stresu nadmiaru azotu oraz zestaw odczynników SMARTer® RACE cDNA Amplification Kit. Produkty reakcji PCR klonowano i sekwencjonowano, po czym przyrównano do sekwencji genomowej jęczmienia zwyczajnego zdeponowanej w bazie danych Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/>) oraz NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Długość sekwencji pri-miRNA obliczono na podstawie najdłuższych otrzymanych produktów 5' i 3' RACE. Aby wykazać, że najdłuższe końce 5' i 3' pri-miRNA należą do tego samego transkryptu przeprowadzono eksperymenty RT-PCR dla pri-miRNA444a/b/c przy użyciu starterów zaprojektowanych na najdłuższe zidentyfikowane końce 5' i 3'. Ponadto technikę 5' RACE wykorzystano do identyfikacji alternatywnych miejsc startu transkrypcji (TSS, ang. *Transcription Start Site*) a 3' RACE do zlokalizowania alternatywnych miejsc poliadenylacji (pA).

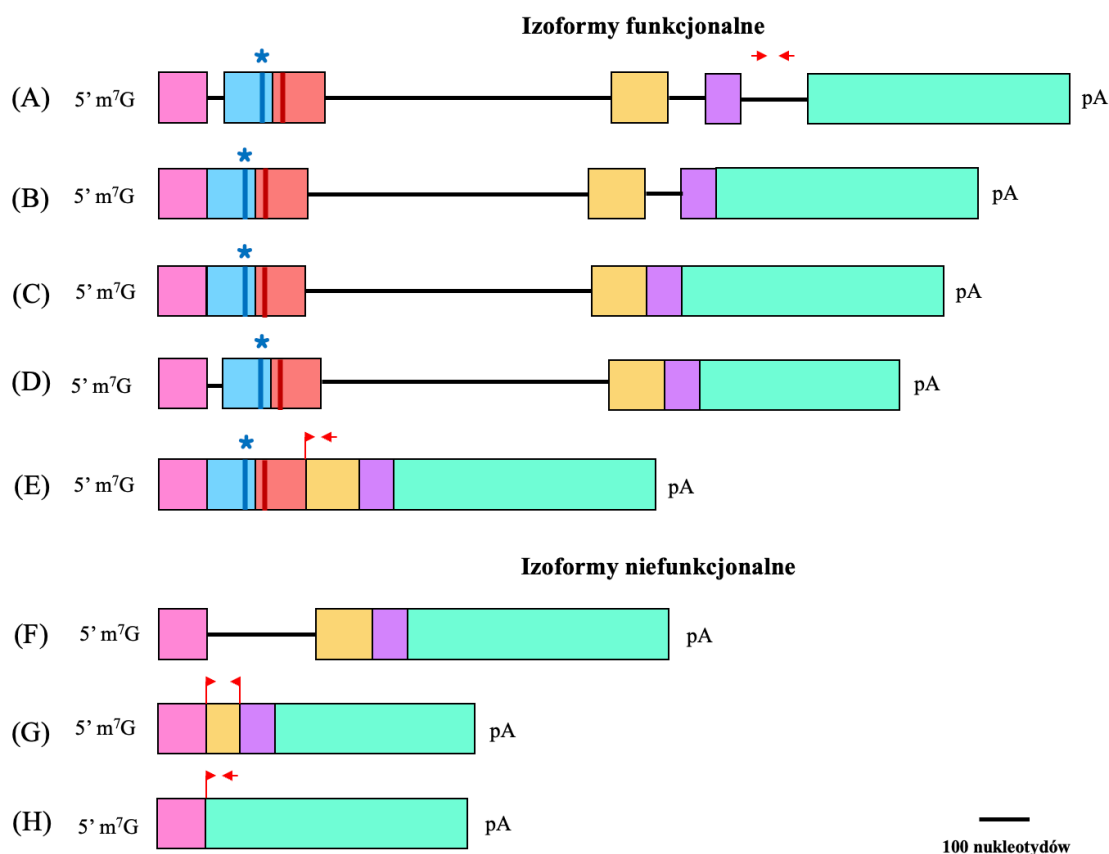
Przeprowadzone w Zakładzie Ekspresji Genów eksperymenty wykazały, że we wszystkich trzech genach *MIR444* w jęczmieniu mikroRNA* zlokalizowany jest w drugim egzonie, natomiast mikroRNA znajduje się w egzonie trzecim. Oba egzony oddzielone są intronem o średniej długości 2500 par zasad. Do utworzenia prawidłowej struktury pri-miRNA spinki do włosów zawierającej miRNA/miRNA* i powstania dojrzałego miRNA niezbędne jest wycięcie intronu. Długości poszczególnych egzonów i intronów zidentyfikowanych w genach *MIR444a/b/c* przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Struktura i długość genów *MIR444a/b/c*.

Gen <i>MIR</i>	Chromosom	Pozycja (nić) (wg Ensembl Plants)	Długość (pz)	Liczba egzonów (długość w pz)	Liczba intronów (długość w pz)
<i>444a</i>	6	490703243- 490708100 (-)	4858	6 (96, 96, 104, 113, 70, 520)	5 (1142, 1940, 572, 71, 134)
<i>444b</i>	7	117611827- 117622532 (+)	10706	5 (240, 62, 109, 66, 445)	4 (1019, 2378, 130, 6257)
<i>444c</i>	2	512343713- 512352484 (-)	8772	5 (569, 57, 97, 74, 454)	4 (3245, 3204, 992, 80)

Gen *MIR444a* (lokalizacja na genomie: 6H:490703243-490708100) zawiera sześć egzonów i pięć intronów. Najdłuższy egzon (szósty) ma długość 520 par zasad (pz), natomiast najkrótszy (piąty) 70 pz. W obrębie piątego egzonu zidentyfikowano alternatywne miejsce startu transkrypcji (TSS, ang. *Transcription Start Site*). Transkrypt *MIR444a*, pri-miRNA444a, podlega alternatywnemu splicingowi generując izofomy, które możemy podzielić na funkcjonalne (z takiej izofomy możliwe jest powstanie mikroRNA) i niefunkcjonalne (z takiej izofomy niemożliwe jest powstanie mikroRNA) (Ryc. 17). Wyróżniono pięć izofom funkcjonalnych (A – E) oraz trzy niefunkcjonalne (F – H), ich sekwencje nukleotydowe przedstawiono w aneksie na końcu niniejszej rozprawy. W przypadku izofom niefunkcjonalnych (F - H) niemożliwe jest powstanie mikroRNA z powodu wycięcia egzonu drugiego (zawierającego mikroRNA*) i trzeciego (zawierającego mikroRNA) na skutek splicingu. Ponadto analiza wyników eksperymentu 3' RACE umożliwiła identyfikację sześciu alternatywnych miejsc poliadenylacji (pA) w egzonie szóstym, poniżej alternatywnego TSS.

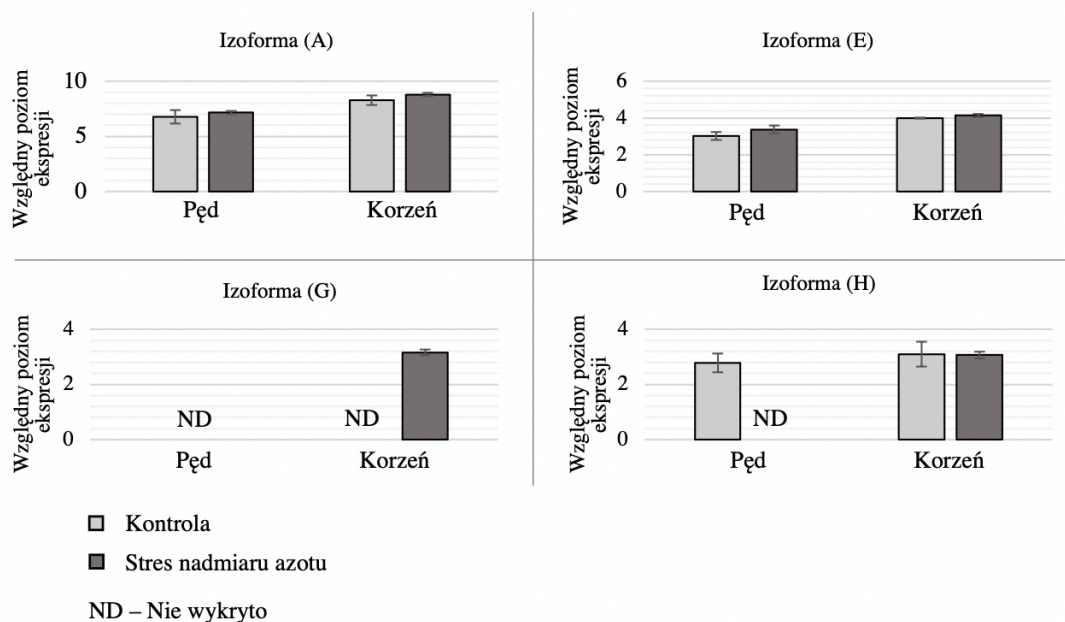




Ryc. 17. Gen *MIR444a* oraz transkrypt pri-miRNA444a. Izoformy funkcjonalne podpisano literami (A) – (E), natomiast izoformy niefunkcjonalne (F) – (H). Kolorowe prostokąty reprezentują egzony a czarne linie introny. Niebieski słupek oraz niebieska gwiazdka * w drugim egzonie przedstawiają pozycję mikroRNA444a*, natomiast czerwony słupek w trzecim egzonie reprezentuje pozycję mikroRNA444a. Szare kropkowane linie przedstawiają wszystkie zidentyfikowane zdarzenia splicingowe. Czerwone strzałki reprezentują lokalizacje starterów wykorzystanych w reakcji RT-qPCR. TSS – miejsce inicjacji transkrypcji; 5' m⁷G – 7 – metyloguanozyna, pA – ogon poliA, kb – tysiąc par zasad.

Przeanalizowano poziom ekspresji czterech izoform ((A), (E), (G) i (H)) w pędach i korzeniach 2-tygodniowych roślin uprawianych w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu (Ryc. 18). Analiza poziomu ekspresji pozostałych izoform nie była możliwa ze względu na brak możliwości zaprojektowania specyficznych starterów. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy między poziomem ekspresji dwóch funkcjonalnych izoform (A) i (E). Wykazano natomiast, że izoforma niefunkcjonalna (G) występuje tylko w korzeniach w warunkach stresu nadmiaru azotu,

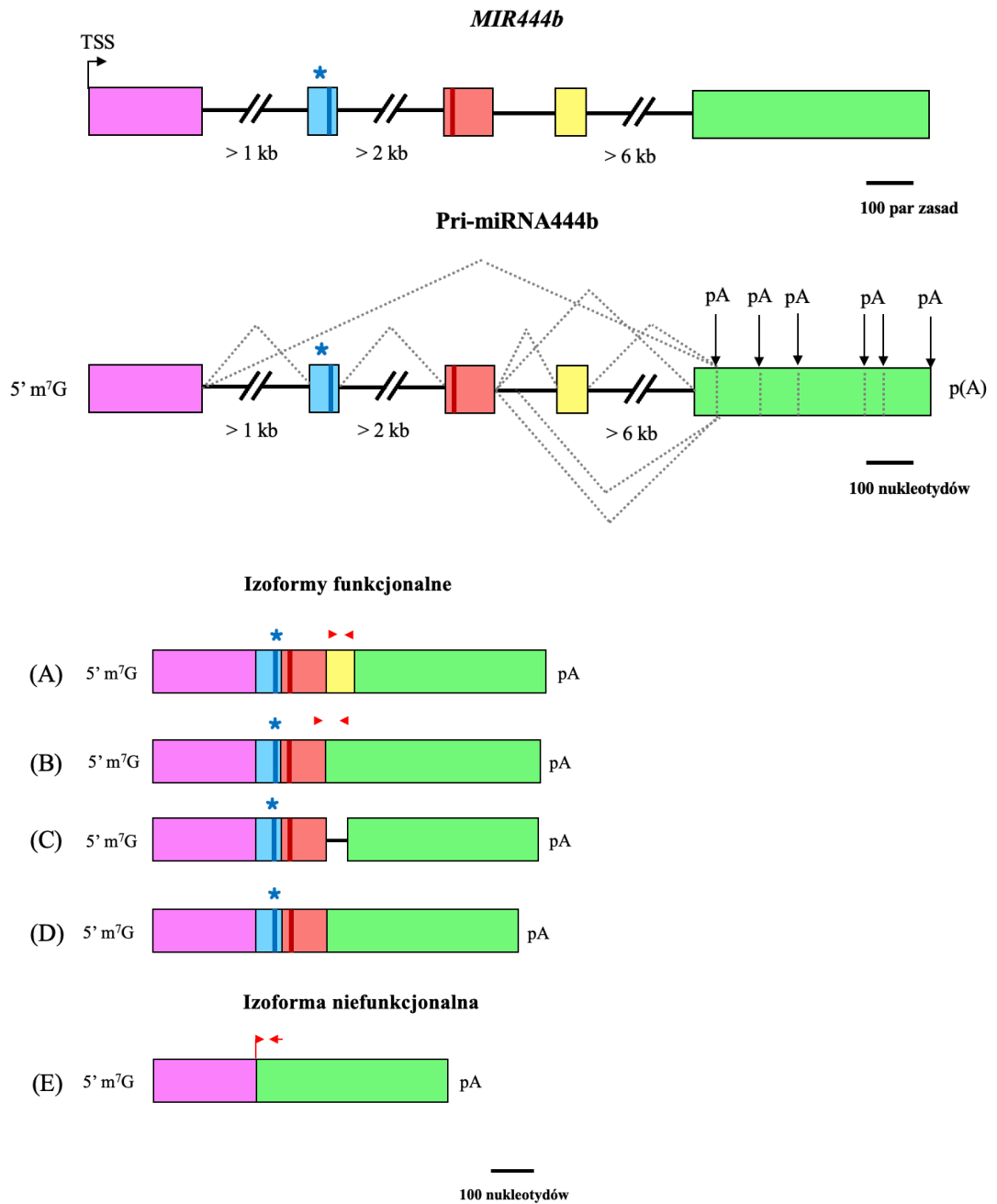
podczas gdy izoforma niefunkcjonalna (H) została zidentyfikowana w pędach i korzeniach w warunkach kontrolnych oraz w korzeniach w warunkach stresu nadmiaru azotu.



Ryc. 18. Poziom ekspresji zidentyfikowanych izoform pri-miRNA444a w korzeniach i pędach jęczmienia w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe ($n = 3$). Względny poziom ekspresji oznacza różnicę poziomu ekspresji między genem badanym a genem referencyjnym obliczoną z wykorzystaniem metody $2^{-\Delta Ct}$ (patrz rozdział 4.2). Do obliczeń statystycznych wykorzystano test t -Studenta.

Gen *MIR444b* (lokalizacja na genomie: 7H:117611827-117622532) składa się z pięciu egzonów i czterech intronów. Najdłuższy egzon (piąty) liczy 500 par zasad a najkrótszy (czwarty) 66 pz. Z kolei czwarty i piąty egzon są oddzielone intronem o długości ponad 6 tysięcy pz i jest to najdłuższy zidentyfikowany intron w tej rodzinie genów.

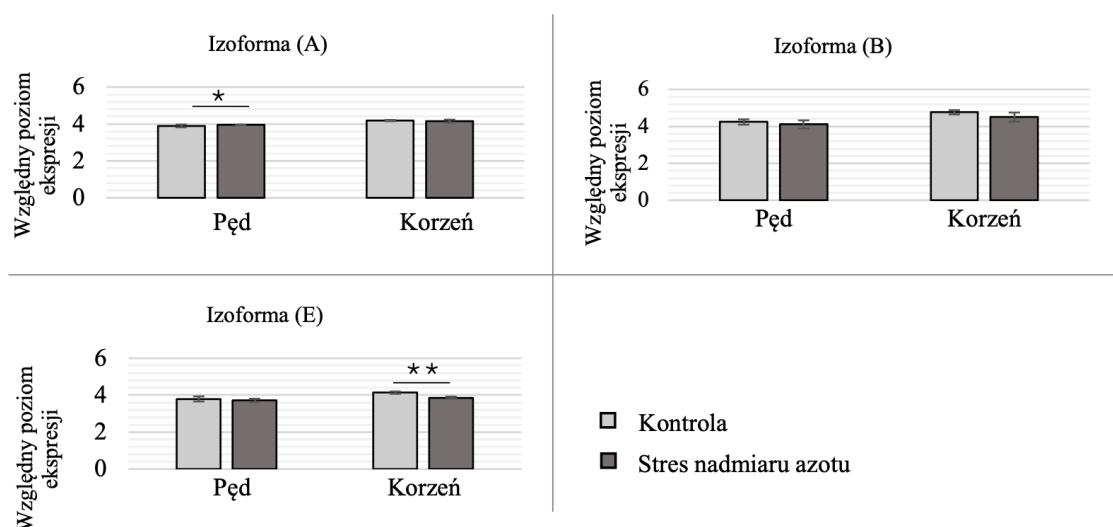
W przypadku pri-miRNA444b zidentyfikowano cztery izoformy funkcjonalne (A-D) i jedną niefunkcjonalną (E) (Ryc. 19). W przypadku izoformy (E) niemożliwe jest powstanie mikroRNA z powodu wycięcia egzonu drugiego (zawierającego mikroRNA*) i trzeciego (zawierającego mikroRNA) na skutek splicingu. Z wykorzystaniem techniki 3' RACE zidentyfikowano pięć alternatywnych miejsc poliadenylacji w piątym egzonie. Nie zidentyfikowano innych potencjalnych TSS.



Ryc. 19. Gen *MIR444b* oraz transkrypty pri-miRNA444b. Izoformy funkcjonalne podpisano literami (A) – (D), natomiast izoformę niefunkcjonalną – (E). Kolorowe prostokąty reprezentują egzony a czarne linie introny. Niebieski słupek oraz niebieska gwiazdka * w drugim egzonie przedstawiają pozycję mikroRNA444b*, natomiast czerwony słupek w trzecim egzonie reprezentuje pozycję mikroRNA444b. Szare kropkowane linie przedstawiają wszystkie zidentyfikowane zdarzenia splicingowe. Czerwone strzałki reprezentują lokalizacje starterów wykorzystanych w reakcji RT-

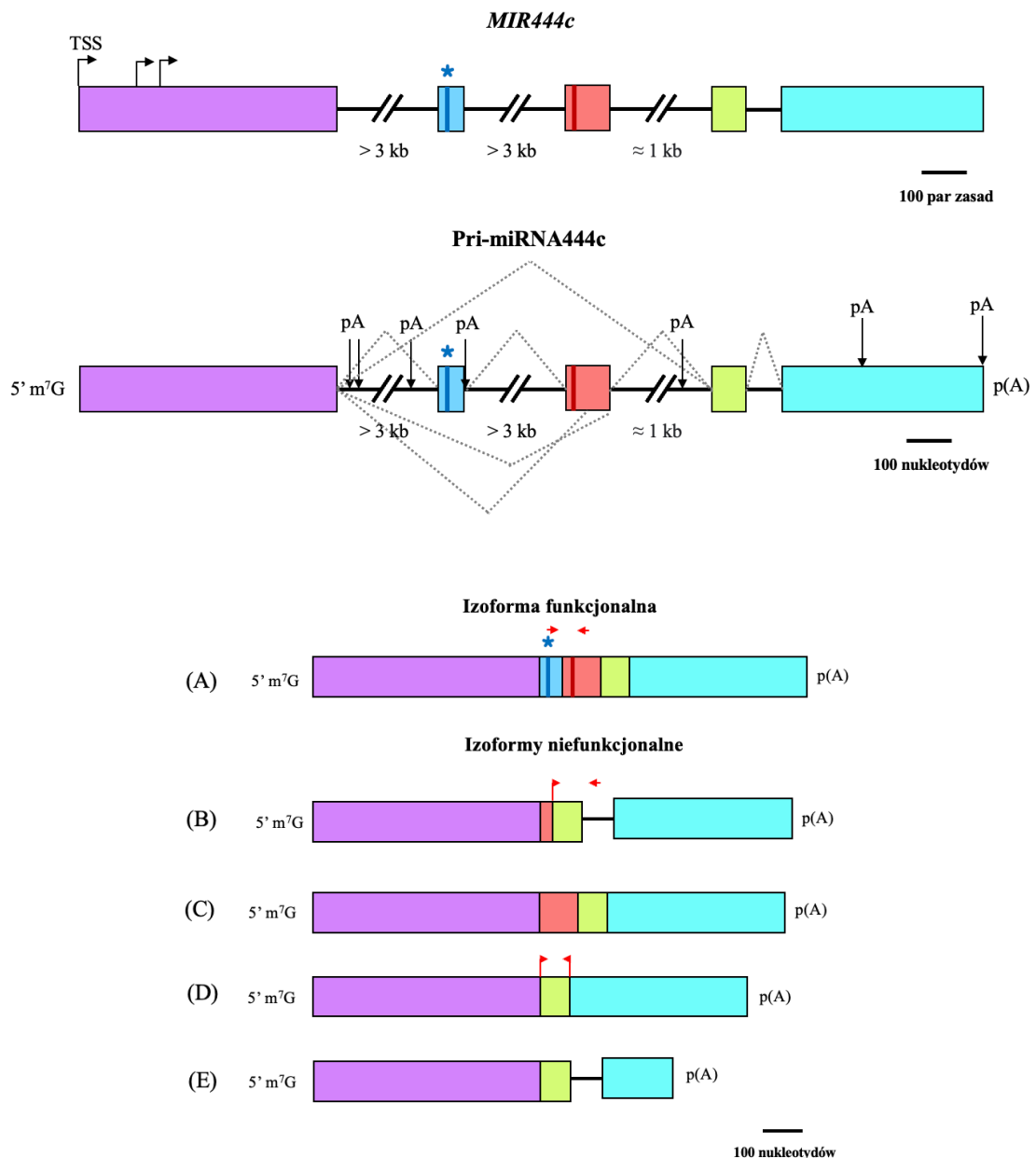
qPCR. TSS – miejsce inicjacji transkrypcji; 5' m⁷G – 7 – metyloguanozyna, pA – ogon poliA, kb - tysiąc par zasad.

Dla dwóch izoform funkcjonalnych i jednej niefunkcjonalnej przeprowadzono analizę poziomu ekspresji wykorzystując pędy i korzenie 2-tygodniowych roślin jęczmienia uprawianych zarówno w warunkach kontrolnych jak i w warunkach stresu nadmiaru azotu (Ryc. 20). Analiza poziomu ekspresji dla izoform: (C) i (D) nie była możliwa z powodu braku możliwości zaprojektowania specyficznych starterów. Zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji izoformy funkcjonalnej (A) w pędzie w warunkach stresu nadmiaru azotu w porównaniu do kontroli. Nie wykazano natomiast istotnej statystycznie różnicy między poziomem ekspresji w korzeniu. Stwierdzono również, że poziom ekspresji izoformy funkcjonalnej (B) nie zmienia się istotnie w warunkach stresu nadmiaru azotu. Natomiast w przypadku izoformy niefunkcjonalnej (E) zaobserwowano spadek poziomu ekspresji w korzeniu w warunkach stresu nadmiaru azotu.



Ryc. 20. Poziom ekspresji zidentyfikowanych izoform pri-miRNA444b w korzeniach i pędach jęczmienia w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (n = 3), gwiazdki wskazują poziom istotności statystycznej (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Względny poziom ekspresji oznacza różnicę poziomu ekspresji między genem badanym a genem referencyjnym obliczoną z wykorzystaniem metody $2^{-\Delta Ct}$ (patrz rozdział 4.2). Obliczenia statystyczne wykonano z użyciem testu t -Studenta.

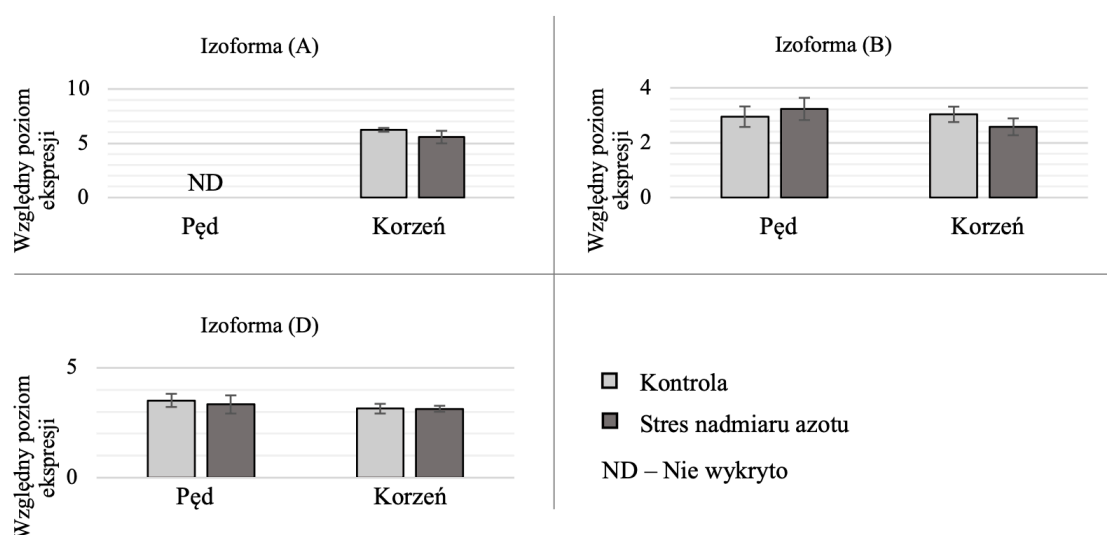
Gen *MIR444c* (lokalizacja na genomie: 2H:512343713-512352484) zawiera pięć egzonów, z czego najdłuższy (pierwszy) liczy 534 pz a najkrótszy (drugi) 57 pz. W rejonie pierwszego egzonu zidentyfikowano dwa alternatywne miejsca TSS. Transkrypt *MIR444c*, podobnie jak w przypadku dwóch poprzednich, podlega alternatywnemu splicingowi. Zidentyfikowano jedną izofornę funkcjonalną (A) i cztery niefunkcjonalne (B-E) (Ryc. 21). Z wykorzystaniem techniki 3' RACE wykazano obecność sześciu alternatywnych miejsc poliadenylacji.



Ryc. 21. Gen *MIR444c* oraz pri-miRNA444c. Izoformę funkcjonalną podpisano literą (A), natomiast izoformy niefunkcjonalne literami (B) – (E). Kolorowe prostokąty reprezentują egzony a czarne linie introny. Niebieski słupek oraz niebieska gwiazdka *

w drugim egzonie przedstawiają pozycję mikroRNA444c*, natomiast czerwony słupek w trzecim egzonie reprezentuje pozycję mikroRNA444c. Szare kropkowane linie przedstawiają wszystkie zidentyfikowane zdarzenia splicingowe. Czerwone strzałki reprezentują lokalizacje oligonukleotydów wykorzystanych w reakcji RT-qPCR. TSS – miejsce inicjacji transkrypcji; 5' m⁷G – 7 – metyloguanozyna, pA – ogon poliA, kb - tysiąc par zasad.

Przeanalizowano poziom ekspresji trzech izoform (A), (B) i (D) i wykazano, że funkcjonalna izoforma (A) występuje jedynie w korzeniu, natomiast niefunkcjonalne (B) i (D) zarówno w pędach jak i korzeniach w warunkach kontrolnych jak i w stresie nadmiaru azotu. Nie odnotowano jednak istotnie statystycznie różnic między ich poziomami ekspresji (Ryc. 22). Analiza dwóch pozostałych izoform ((C) i (E)) nie była możliwa ze względu na brak możliwości zaprojektowania specyficznych starterów.



Ryc. 22. Poziom ekspresji zidentyfikowanych izoform pri-miRNA444c w korzeniach i pędach jęczmienia w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (n = 3). Względny poziom ekspresji oznacza różnicę poziomu ekspresji między genem badanym a genem referencyjnym obliczoną z wykorzystaniem metody $2^{-\Delta Ct}$ (patrz rozdział 4.2). Do obliczeń statystycznych wykorzystano test *t*-Studenta.

5.3. Identyfikacja otwartych ramek odczytu (ORF) w pri-miRNA444

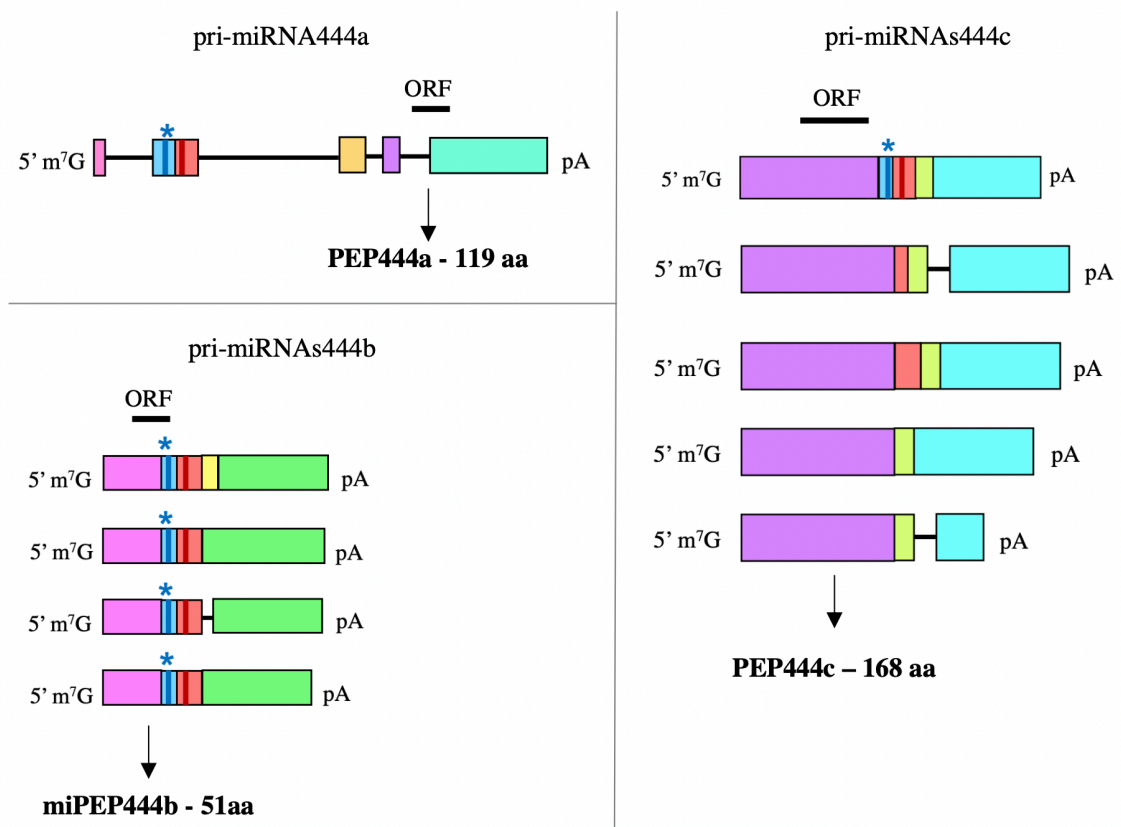
Biorąc pod uwagę złożoną strukturę genów *MIR444*, występowanie wielu izoform oraz doniesienia literaturowe o potencjale kodującym genów *MIR* przeanalizowano pri-miRNA pod kątem obecności otwartych ramek odczytu. Z wykorzystaniem programu dostępnego na stronie <https://www.bioinformatics.org/> (Stothard, 2000) stwierdzono obecność 1-6 różnych ORF w pri-miRNA444a, 5-6 różnych ORF w pri-miRNA444b oraz 3 różne ORF w pri-miRNA444c. Listę zidentyfikowanych ORF przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 5. Otwarte ramki odczytu w pri-miRNA444a/b/c. Na czerwono zaznaczono sekwencje peptydów wybranych do dalszych analiz. W przypadku różnych izoform pri-miRNA 444a/b/c ORF zaznaczona na czerwono jest zawsze tą samą ORF. Z każdego genu *MIR444* wybrano po jednej ORF.

Pri-miRNA	Izoforma	Liczba różnych ORF	Seqwencja	Długość peptydu
Pri-miRNA444a	(A)	6	1) MYRVLSGFGFKYFGENRITAVIILEILCIQDFWQSRDRTSCD VM 2) MYVPGLQICLKVKISHVWALLQSSHFAVLLFDSSKSAIVS 3) MELMVFLSSRVVVCNLYSLCKEIQKRLDQ 4) MLMVCRLARYACGGTKHEATTAVLVGKAQVGHQHYLQ ARRKINRTSPYLWLSCKSCSCLKLAASLCQSYQKKT 5) MASSSICMIPLEERQHNHFHFKSLPLSLRQLLPPIHITCRSLVQ LLGSWRSRYTVTLPRWEK 6) MFGLCFSPHILQFYSLTRLNQLLCDITSQGNPNDFIFEQEV GWWLFVDAEPLKFGFRKKGATECSSGYSSYMPKYQLP RGMSSVLSNKHVIPKLPGETFVLIEIHLFLCPLHQHGAI	44 aa 40 aa 29 aa 74 aa 61 aa 119 aa
	(B) (C)	4	1) MASSSICMIPLEERQHNHFHFKSLPLSLRQLLPPIHITCRSLVQ LLGSWRSRYTVTLPRWEK 2) MELMVFLSSRVVVCNLYSLCKEIQKRLDQ 3) MYRVLSGFGFKYFGENRITAVIILEILCIQDFWQSRDRTSCD VM 4) MYMPKYQLPRGMSSVLSNKHVIPKLPGETFVLIEIHLFLCPL HQHGAI	61 aa 29 aa 44 aa 47 aa
	(D)	4	1) MYRVLSGFGFKYFGENRITAVIILEILCIQDFWQSRDRTSCD VM 2) MYMPKYQLPRGMSSVLSNKHVIPKLPGETFVLIEIHLFLCPL HQHGAI 3) MLMVCRLARYTCGGTKHEATTAVLVGKAQVGHQHYLQ ARRKINRTSPYLWLSCKSCSCLKLAASLCQSYQKKT 4) MASSSICMIPLEERQHNHFHFKSLPLSLRQLLPPIHITCRSLVQ LLGSWRSRYTVTLPRWEK	44 aa 47 aa 74 aa 61 aa
	(E) (H)	2	1) MELMVFLSSRVVVCNLYSLCKEIQKRLDQ 2) MYMPKYQLPRGMSSVLSNKHVIPKLPGETFVLIEIHLFLCPL HQHGAI	29 aa 47 aa
	(F)	3	1) MELMVFLSSRVVVCNLYSLCKEIQKRLDQ 2) MYMPKYQLPRGMSSVLSNKHVIPKLPGETFVLIEIHLFLCPL HQHGAI 3) MASSSICMIPLEERQHNHFHFKSLPLSLRQLLPPIHITCRSLVQ LLGSWRSRYTVTLPRWEK	29 aa 47 aa 61 aa

	(G)	1	1) MYMPKYQLPRGMSSVLSNKHVIPKLPGTFVLIIEHLFLCPL HQHGAI	47 aa
Pri-miRNA444b	(A)	6	1) MRRGFELLHVVAPSMRQQLHYFQGSYKIYGSS 2) MNDHTNKFEETFDSKLFVNTGNMDPWSISSPRHPSTP 3) MKPQIFVCCMWTKNKQINSCSRPSSCTLVVLF 4) MESSARRSFTSRLLVLPPLLPQPGVGLGRAWPPACAE GLSYCMWWHQ 5) MGLHNRDFLASCVAVSSLLTPSARPQCEIGNLVSFSE 6) MEHFFTASPLHTLKRTHLKASPASLKLTFDILN	32 aa 39 aa 32 aa 51 aa 38 aa 34 aa
	(B)	5	1) MRRGFELLHVVAPSMRQQLHYFQGSYKIYGSS 2) MEHFFTASPLHTLKRTHLKASPASLKLTFDILS 3) MESSARRSFTSRLLVLPPLLPQPGVGLGRAWPPACAE GLSYCMWWHQ 4) MGLHNRDFLASCVAVSSLLTPSARPQCEIGNLVRRFCRM FLQSLNLELMCTQVNTGNMDPWSISSPRHPSTP 5) MKPQIFVCCMWTKNKQINSCSRPSSCTLVVLF	32 aa 34 aa 51 aa 73 aa 32 aa
	(C)	5	1) MRRGFELLHVVAPSMRQQLHYFQGSYKIYGSS 2) MEHFFTASPLHTLKRTHLKASPASLKLTFDILN 3) MESSARRSFTSRLLVLPPLLPQPGVGLGRAWPPACAE GLSYCMWWHQ 4) MGLHNRDFLASCVAVSSLLTPSARPQCEIGNLVRFLLTS KSFFGCIGN 5) MKPQIFVCCMWTKNKQINSCSRPSSCTLVVLF	32 aa 34 aa 51 aa 50 aa 32 aa
	(D)	5	1) MRRGFELLHVVAPSMRQQLHYFQGSYKIYGSS 2) MKPQIFVCCMWTKNKQINSCSRPSSCTLVVLF 3) MESSARRSFTSRLLVLPPLLPQPGVGLGRAWPPACAE GLSYCMWWHQ 4) MGLHNRDFLASCVAVSSLLTPSARPQCEIGNLVLR 5) MEHFFTASPLHTLKRTHLKASPASLKLTFDILN	32 aa 32 aa 51 aa 35 aa 34 aa
	(E)	5	1) MKPQIFVCCMWTKNKQINSCSRPSSCTLVVLF 2) MESSARRSFTSRLLVLPPLLPQPGVGLGRAWPPACAE GLR 3) MEHFFTASPLHTLKRTHLKASPASLKLTFDILN	32 aa 43 aa 34 aa
	Pri-miRNA444c	(A) (C)	3	1) MEFELTMSSGAKMPHSIHFMEGVKLSEHGRRRLGF 2) MVSYSRIPTTFVSSWANICMVLRPPIIEVIL 3) MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSA AYSTPHKRAQTPTCSPLRPNPPPSALQEHRPRRLLPHQSI RPKSSSNPSPRRAPAGARWPASFLSVSDRRDRFPWCLV QWLA AACCRICAAGACSPLPNRSRQWLTICPYHCSATAPV SSDGLLWP
(B)		3	1) MEFELTMSSGAKMPHSIHFMEGVKLSEHGRRYMFP 2) MVSYSRIPTTFVSSWANICMVLRPPIIEVIL 3) MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSA AYSTPHKRAQTPTCSPLRPNPPPSALQEHRPRRLLPHQSI RPKSSSNPSPRRAPAGARWPASFLSVSDRRDRFPWCLV QWLA AACCRICAAGACSPLPNRSRQWLTICPYHCSATAPV SSDGLLWP	35 aa 32 aa 168 aa
(D)		3	1) MVSYSRIPTTFVSSWANICMVLRPPIIEVIL 2) MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSA AYSTPHKRAQTPTCSPLRPNPPPSALQEHRPRRLLPHQSI RPKSSSNPSPRRAPAGARWPASFLSVSDRRDRFPWCLV QWLA AACCRICAAGACSPLPNRSRQWLTICPYHCSATAPV SSDGLLWP 3) MMSGAKMPHSIHFMEGVKLSEHGRRRLGF	32 aa 168 aa 29 aa
(E)		3	1) MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSA AYSTPHKRAQTPTCSPLRPNPPPSALQEHRPRRLLPHQSI RPKSSSNPSPRRAPAGARWPASFLSVSDRRDRFPWCLV QWLA AACCRICAAGACSPLPNRSRQWLTICPYHCSATAPV SSDGLLWP 2) MMSGAKMPHSIHFMEGVKLSEHGRRYMFP 3) MVSYSRIPTTFVSSWANICMVLRPPIIEVIL	168 aa 29 aa 32 aa

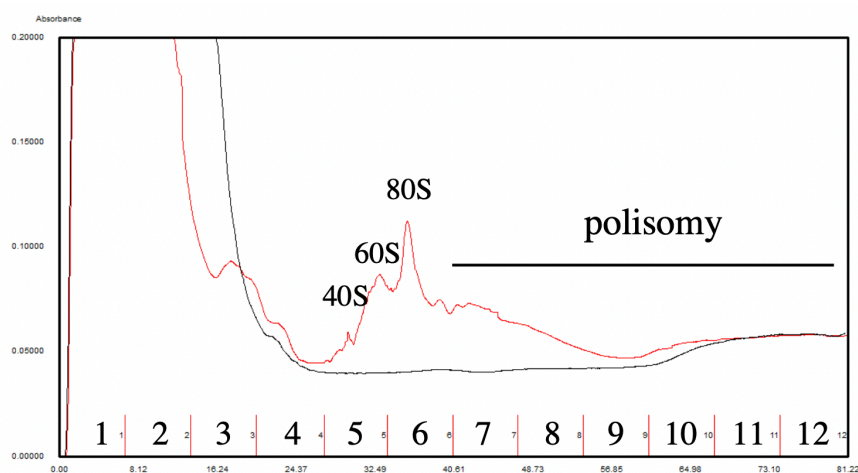
Do dalszych eksperymentów wybrano peptydy o długościach 119, 51 oraz 168 aminokwasów. Zgodnie z danymi literaturowymi (Laouressergues i in., 2015) sekwencja miPEP kodowanych przez geny *MIR* (miPEP) zlokalizowana jest powyżej struktury typu spinka do włosów, a długość miPEP najczęściej liczy od kilku do kilkudziesięciu aminokwasów. Sekwencja kodująca peptyd o długości 119 aa znajduje się poniżej sekwencji pri-miRNA444a, jednak ze względu na obecność alternatywnego TSS wraz z elementami regulatorowymi działającymi w układzie *cis* oraz długość peptydu, postanowiono poddać go analizie i nazwać **PEP444a**. Natomiast peptyd o długości 51 aa postanowiono nazwać **miPEP444b**, ponieważ jego sekwencja zlokalizowana jest powyżej sekwencji spinki do włosów pri-miRNA444b. Główną uwagę zwrócono na peptyd o długości 168 aa kodowany przez *MIR444c*. Jego sekwencja kodująca zlokalizowana jest powyżej sekwencji spinki do włosów pri-miRNA444c, jednak ze względu na długość nazwano go **PEP444c**. Lokalizacja sekwencji kodujących PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c została przedstawiona na ryc. 23.



Ryc. 23. Jęczmienne pri-miRNA444 zawierają ORFy, które mogą kodować peptydy. Schemat pri-miRNA444a/b/c z zaznaczoną lokalizacją ORFów.

5.4. Analiza zdolności translacyjnej sekwencji kodujących wybrane peptydy z wykorzystaniem techniki profilowania polisomów

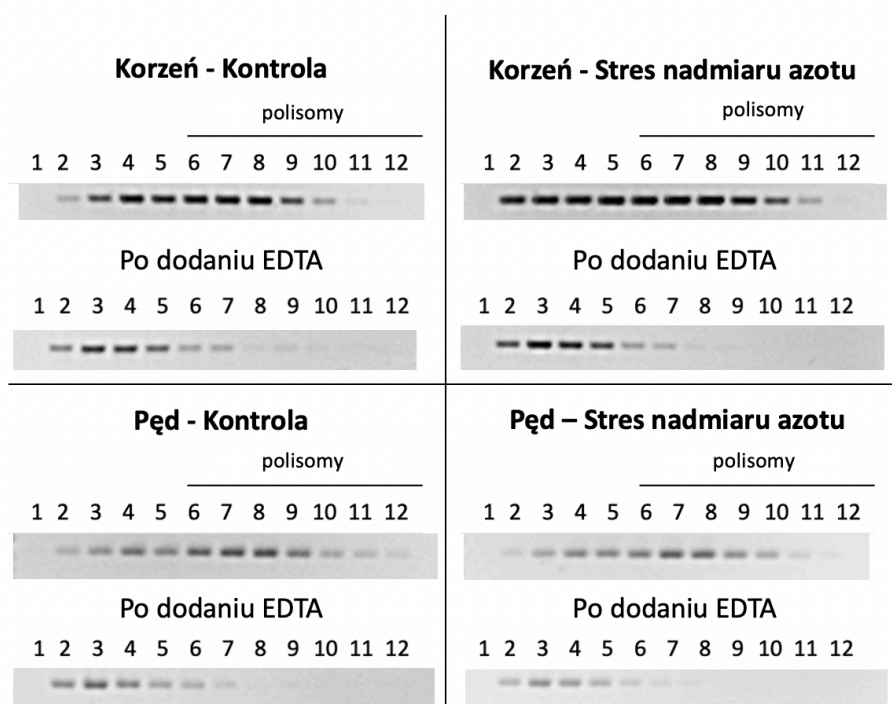
W celu oceny czy sekwencje kodujące PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c są eksportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie mogą ulegać translacji jak mRNA, postanowiono wyizolować frakcję cytoplazmatyczną z komórek korzenia i pędu i przeanalizować pod kątem obecności wybranych pri-miRNA. Wykorzystując uzyskaną frakcję cytoplazmatyczną przeprowadzono eksperyment profilowania polisomów zgodnie z protokołem Muströph i in., 2009. Wykorzystano 2-tygodniowe pędy i korzenie jęczmienia zwyczajnego uprawianego w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Rycina 24 przedstawia przykładowy profil polisomów otrzymany na podstawie ich absorbancji w świetle UV przy długości fali 254 nm.



Ryc. 24. Przykładowy profil absorbancji (oś OY, czerwona linia na wykresie) otrzymany w wyniku wirowania w gradiencie gęstości sacharozy frakcji cytoplazmatycznej uzyskanej z komórek 2-tygodniowych pędów jęczmienia uprawianego w warunkach kontrolnych. Czarna linia przedstawia profil absorbancji po zastosowaniu inhibitorów translacji, cykloheksymidu i chloramfenikolu. Podpisano podjednostki rybosomu (40S i 60S), rybosom (80S) oraz zespół rybosomów związanych z mRNA i prowadzących translację (polisomy).

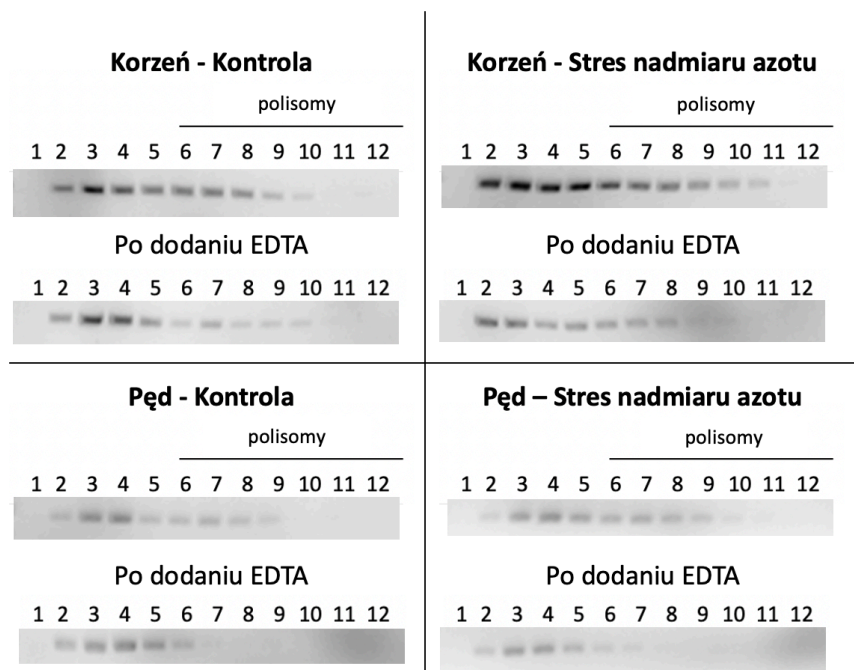
Z każdej zebranej frakcji gradientu wyizolowano RNA, a następnie przygotowano cDNA. W kolejnym etapie przeprowadzono eksperymenty RT-PCR, w których amplifikowano sekwencje pri-miR444a/b/c w rejonie kodującym wybrane peptydy. Jako

kontrolę wykorzystano mRNA genu *ADPI* (Ryc. 25). W przypadku tego genu zaobserwowano obecność specyficznego produktu PCR we frakcjach polisomalnych (frakcje nr 6-12) w korzeniach i pędach, w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Po dodaniu EDTA zaobserwowano charakterystyczne przesunięcie produktu w stronę RNA nie zasocjowanego z polisomami. Wynik ten świadczy o tym, że mRNA *ADPI* jest w sposób specyficzny, aktywny zasocjowany z polisomami i podlega translacji.



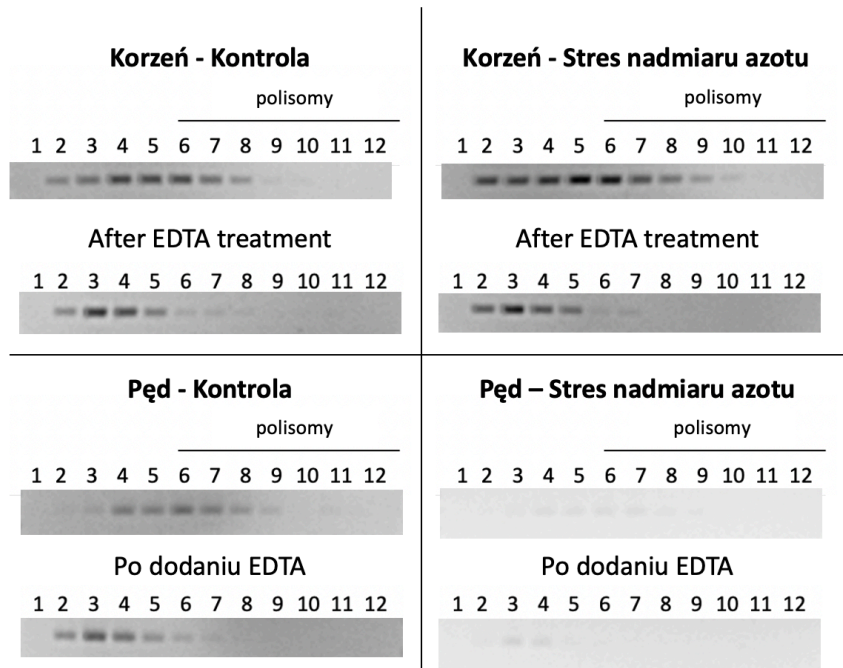
Ryc. 25. Analiza RT-PCR mRNA genu *ADPI* w pędach i korzeniach jęczmienia w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Od szóstej frakcji odnotowano występowanie polisomów.

Analogicznie przeprowadzono analizę dla sekwencji kodującej PEP444a. Wykorzystano startery amplifikujące ORF. Zaobserwowano asocjację analizowanego transkryptu z polisomami w pędach, w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. W przypadku korzeni nie zaobserwowano zdecydowanego przesunięcia produktów PCR po dodaniu EDTA w kierunku frakcji zawierających RNA, wolne rybosomy i podjednostki rybosomowe, co może wskazywać na obecność pri-miRNA444a lub niezależnego mRNA kodującego PEP444a we frakcjach polisomalnych, i być może jedynie częściową specyficzną asocjację z rybosomami (Ryc. 26).



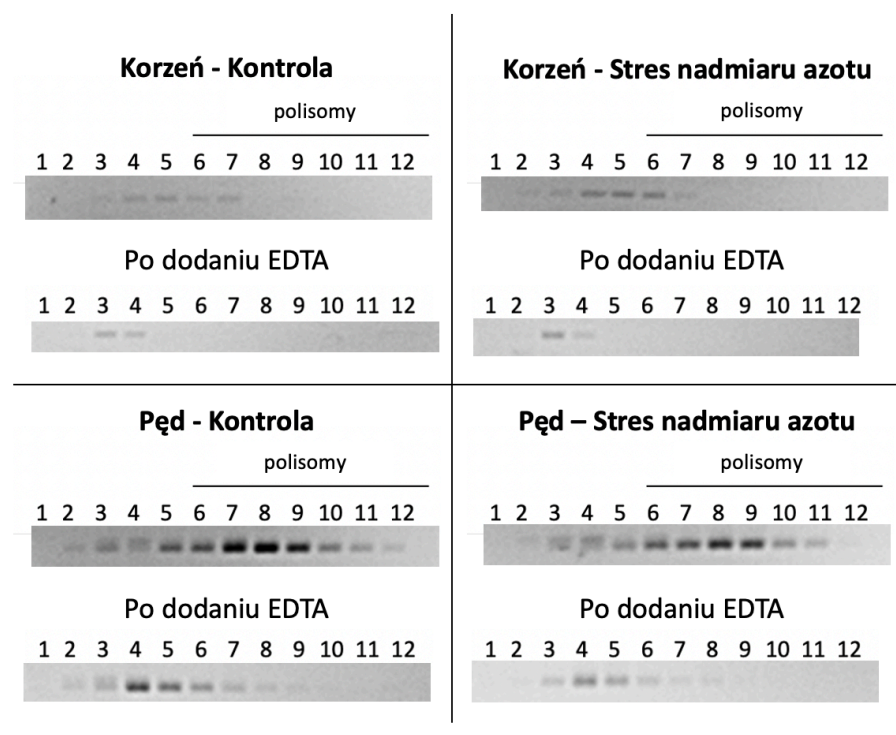
Ryc. 26. Analiza RT-PCR pri-miR444a w rejonie sekwencji kodującej PEP444a w pędach i korzeniach jęczmienia w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu.

W ten sam sposób przeprowadzono analizę dla sekwencji kodującej miPEP444b. Wykazano asocjację analizowanego transkryptu kodującego ORF z polisomami głównie w korzeniach zarówno w warunkach kontrolnych i jak w stresie nadmiaru azotu oraz w pędach w warunkach kontrolnych (Ryc. 27).



Ryc. 27. Analiza RT-PCR sekwencji pri-miR444b w rejonie kodującym miPEP444b w pędach i korzeniach jęczmienia w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu.

W przypadku sekwencji kodującej PEP444c, specyficzna asocjacja z polisomami występuje głównie pędzie w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Bardzo słabą asocjację wykazano w korzeniu zarówno w warunkach kontrolnych, jak i pod wpływem stresu nadmiaru azotu. Produkt PCR zaobserwowano tylko w dwóch pierwszych frakcjach polisomalnych (Ryc. 28). W tabeli 6 przedstawiono podsumowanie asocjacji pri-miR444a/b/c w rejonie sekwencji kodujących analizowane peptydy z polisomami.



Ryc. 28. Analiza RT-PCR pri-miR444c w rejonie sekwencji kodującej PEP444c w pędach i korzeniach jęczmienia w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu.

Tabela 6. Podsumowanie asocjacji sekwencji kodujących PEP444a, miPEP444b i PEP444c z polisomami w pędach i korzeniach 2-tygodniowych roślin jęczmienia zwyczajnego w warunkach kontrolnych i pod wpływem stresu nadmiaru azotu, na podstawie wyników z eksperymentów profilowania polisomów i RT-PCR. Plus (+) oznacza asocjację z rybosomami a minus (-) wskazuje na brak asocjacji.

Sekwencja kodująca	Asocjacja z rybosomami			
	Warunki kontrolne		Warunki stresu nadmiaru azotu	
	Korzeń	Pęd	Korzeń	Pęd
PEP444a	+/-	+	+/-	+
miPEP444b	+	+	+	-
PEP444c	+	+	+	+

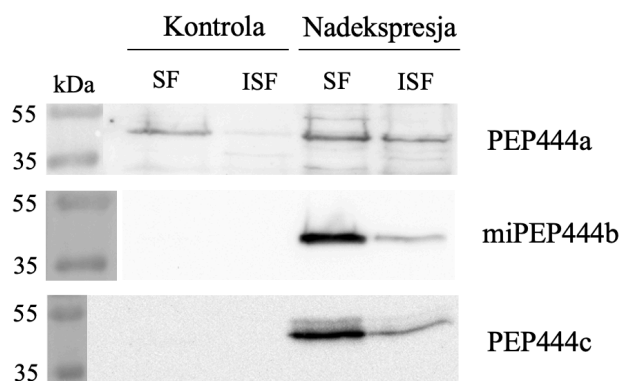
5.5. Nadekspresja PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c w komórkach *Escherichia coli* i ich detekcja z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał.

W celu potwierdzenia zachęcających wyników uzyskanych techniką profilowania polisomów i sprawdzenia czy zidentyfikowane peptydy powstają w jęczmieniu, przeprowadzono ich nadekspresję w komórkach *Escherichia coli*. Następnie w celu ich detekcji wykorzystano specyficzne przeciwciała (HORVU6 przeciwko PEP444a, F2DYV0 przeciwko miPEP444b i F2DAQ5 przeciwko PEP444c; Agrisera) (Ryc. 29). Konstrukty do nadekspresji zaprojektowano tak, by analizowane peptydy uległy ekspresji w fuzji z HisTaq oraz HaloTaq. Następnie przygotowanymi konstruktami transformowano komórki *Escherichia coli*.

<p>PEP444a MFGLCFSPHILQFYSLTRLNQLL<u>CRDITSQGNFDF</u>IFEQEVGWLFLVDAEPLKFLGFRRKGATECSSGYSS YMYMPKYQLPRGMSSVLSNKHVIPKLPGETFVLIEIHLFLCPLHQHGAI</p> <p>miPEP444b <u>MESSARRSFTSRL</u>LVLGPPLLQPQVGLGLGRAWPPACAEGLSYCMWWHQ</p> <p>PEP444c MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSAAYSTPHKRAQTPTC<u>SPLRPNPPPSAL</u>QEHRP RRLPHQSIRPKSSNPSPPRRAPAGARWPASFLSVSDRRDRFPWPCLVQWLA AACCRICAAGAC SPLPNR SRQWLTICPYHCSATAPVSSDGLLWP</p>

Ryc. 29. Sekwencje aminokwasowe zidentyfikowanych peptydów. Na czerwono zaznaczono rejon rozpoznawany przez przeciwciało.

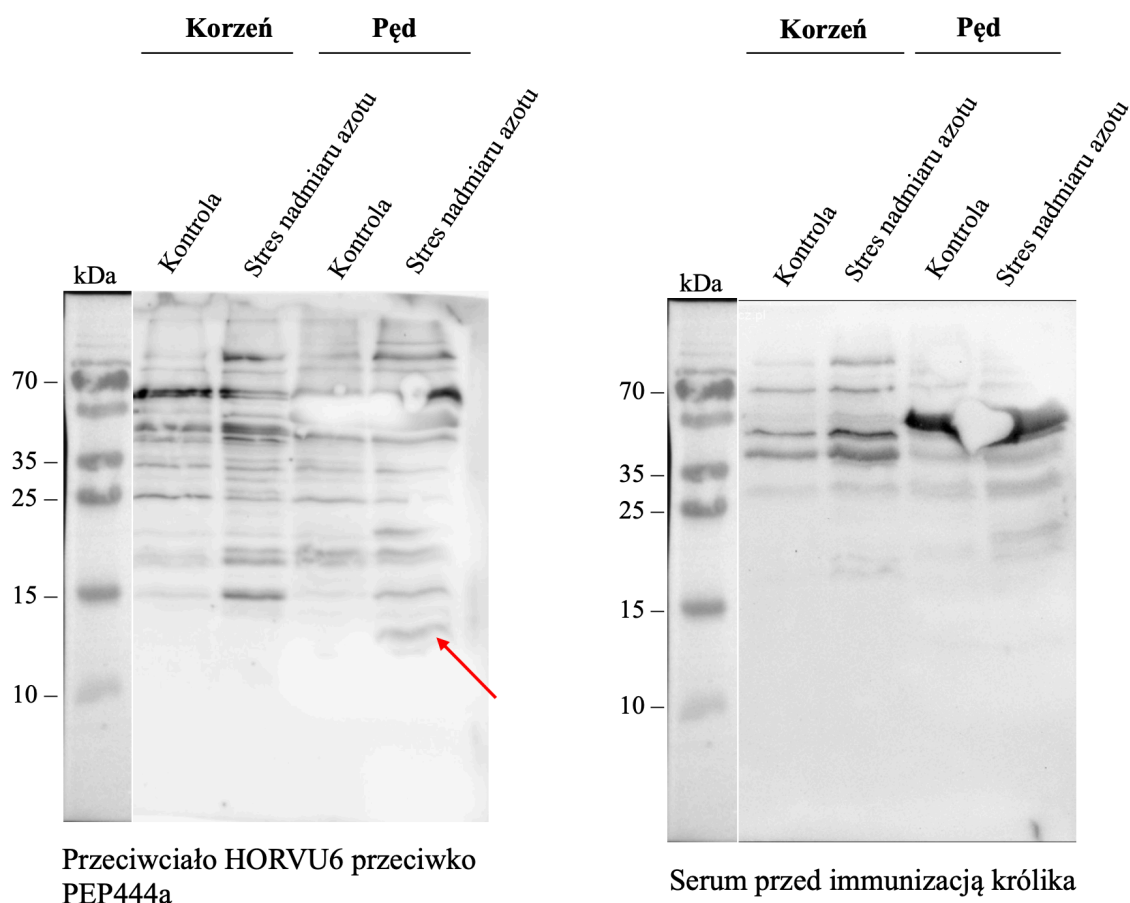
Nadekspresję prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 18°C. Następnie po wirowaniu i sonikacji, ekstrakty bakteryjne nałożono na żel, rozdzielono elektroforetycznie, przeniesiono na membranę i przeprowadzono eksperyment Western blot z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych do fragmentów analizowanych peptydów. Zaobserwowano obecność PEP444a zarówno we frakcji nierozpuszczalnej, jak i rozpuszczalnej. Słabszy sygnał odnotowano również w próbach kontrolnych (przy braku induktora), co świadczyć może o „przeciekaniu” promotora plazmidu (ang. *plasmid leakage*) (Gołda i in., 2007). W przypadku miPEP444b oraz PEP444c specyficzny sygnał zaobserwowano głównie we frakcji rozpuszczalnej (SF) i w niewielkim stopniu we frakcji nierozpuszczalnej (ISF) (ryc. 30).



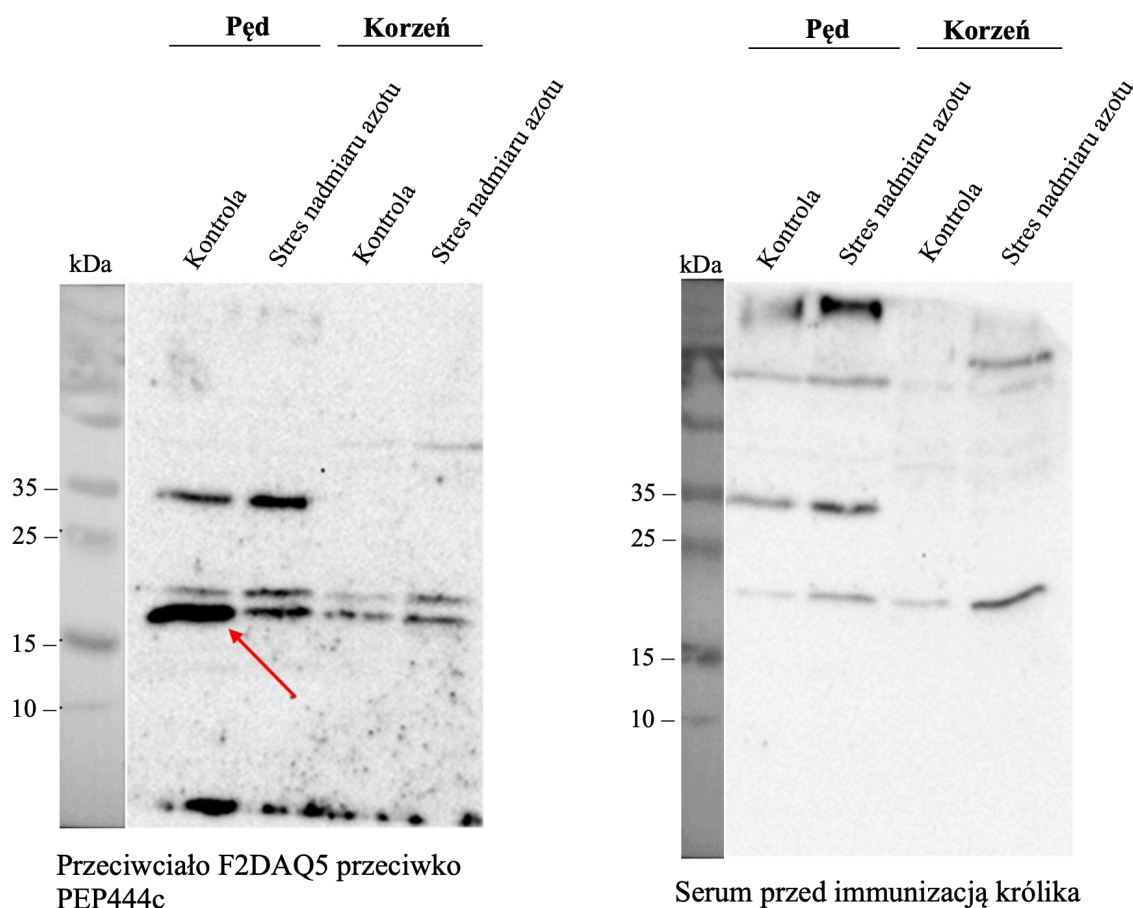
Ryc. 30. Analiza Western blot po nałożeniu na żel ekstraktów bakteryjnych i zastosowaniu przeciwciał specyficznych do fragmentów analizowanych peptydów. Liczbami oznaczono masę cząsteczkową poszczególnych białek markera. SF – frakcja rozpuszczalna (ang. *soluble fraction*), ISF – frakcja nierozpuszczalna (ang. *insoluble fraction*)

W kolejnym etapie badań sprawdzono czy analizowane peptydy mogą ulegać ekspresji w roślinach jęczmienia zwyczajnego typu dzikiego (WT). Na żel nałożono ekstrakty roślinne z korzeni i pędów 2-tygodniowych roślin i analogicznie jak w przypadku ekstraktów bakteryjnych, przeprowadzono eksperyment Western blot. W celu określenia specyficzności przeciwciała wykorzystano serum pobrane przed immunizacją królika. Specyficznego sygnału nie zidentyfikowano w przypadku membrany inkubowanej z serum przed immunizacją królika (ryc. 31, prawy panel). Po przeprowadzeniu właściwego doświadczenia zaobserwowano, że PEP444a (13,7 kDa) występuje w pędzie w warunkach stresu nadmiaru azotu (ryc. 31, lewy panel).

W ten sam sposób poddano analizie peptyd kodowany przez *MIR444c*. PEP444c (18,8 kDa) zidentyfikowano głównie w pędach jęczmienia w warunkach kontrolnych. Niewielką ilość zaobserwowano też w pędach w warunkach stresu nadmiaru azotu oraz w korzeniach w warunkach kontrolnych i pod wpływem stresu azotowego (ryc. 32, lewy panel). Brak sygnału na membranie inkubowanej z serum bez przeciwciała świadczy o specyficzności rozpoznawania przez przeciwciało (ryc. 32, prawy panel). Nie potwierdzono obecności miPEP444b w jęczmieniu z uwagi na bardzo małą masę cząsteczkową białka i niezakończone sukcesem próby jego detekcji po zastosowaniu specjalistycznego transferu białek, dedykowanemu krótkim peptydom (Laressergues i in., 2015).



Ryc. 31. Analiza Western blot po nałożeniu na żel ekstraktów roślinnych uzyskanych z korzeni i pędów jęczmieni uprawianych w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Lewy panel przedstawia wynik analizy Western blot z wykorzystaniem przeciwciała specyficznego do fragmentu PEP444a (HORVU6), z kolei prawy panel przedstawia wynik analizy Western blot z użyciem serum uzyskanego przed immunizacją (nie zawierającym przeciwciała). Czerwona strzałka wskazuje sygnał specyficzny dla PEP444a i odpowiadający jego szacowanej masie cząsteczkowej. Liczbami oznaczono masę cząsteczkową poszczególnych białek markera.

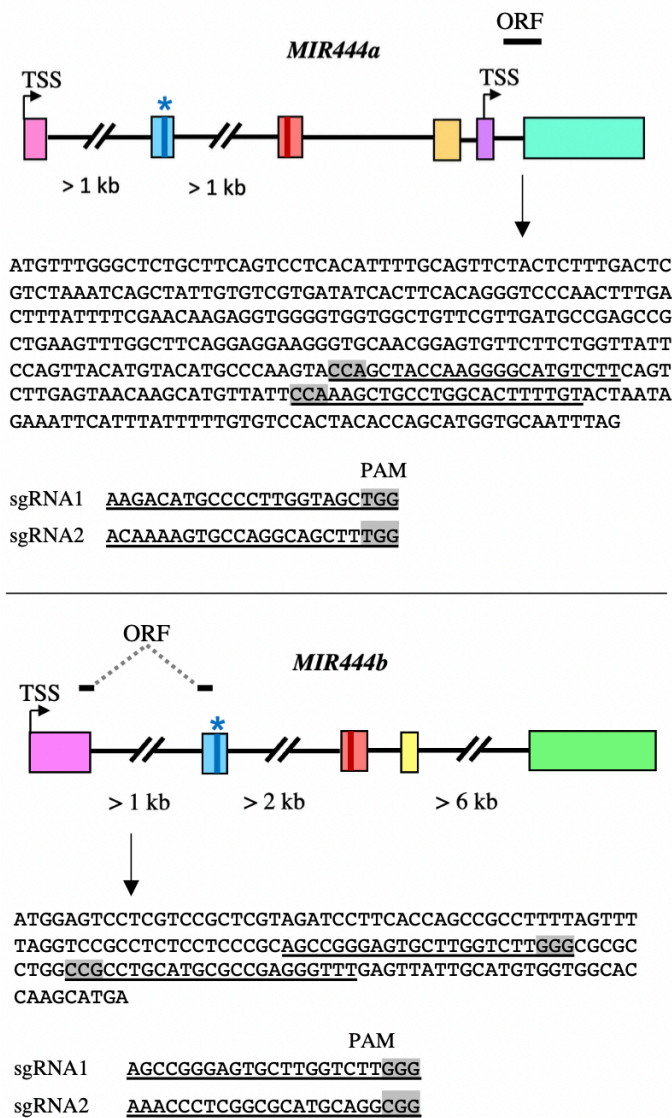


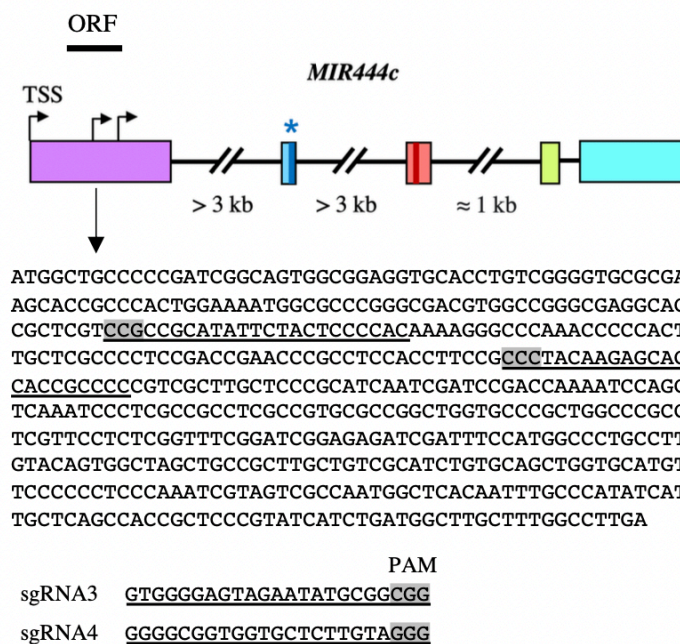
Ryc. 32. Analiza Western blot po nałożeniu na żel ekstraktów roślinnych uzyskanych z pędów i korzeni jęczmieni uprawianych w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Lewy panel pokazuje wynik analizy Western blot z wykorzystaniem przeciwciała specyficznego do fragmentu PEP444c (F2DAQ5), z kolei prawy panel przedstawia wynik analizy Western blot z użyciem serum uzyskanego przed immunizacją (nie zawierającym przeciwciała). Czerwona strzałka wskazuje sygnał specyficzny dla PEP444c. Liczbami oznaczono masę cząsteczkową poszczególnych białek markera.

5.6. Charakterystyka roślin transgeniczných z mutacjami w sekwencjach kodujących peptydy kodowane przez geny *MIR444*

Zgodnie z postawioną w niniejszej pracy hipotezą, pri-miRNA444 są eksportowane z jądra do cytoplazmy, gdzie ulegają translacji. Z użyciem specyficznych przeciwciał wykazano, że przynajmniej dwa peptydy kodowane przez geny *MIR444* (PEP444a i PEP444c) występują w jęczmieniu zwyczajnym typu dzikiego. W celu

poznania funkcji pełnionych przez analizowane peptydy postanowiono wyprowadzić linie transgeniczne jęczmienia z mutacjami w sekwencjach kodujących analizowane peptydy. Konstrukty do transformacji niedojrzałych zarodków jęczmiennych oraz sam proces transformacji przeprowadzono we współpracy z Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research w Gatersleben (Niemcy). Do przygotowania roślin transgenicznych wykorzystano technologię CRISPR/Cas9. Zaprojektowano dwa RNA naprowadzające (ang. *single guide RNA*, *sgRNA*) Cas9 do sekwencji kodującej PEP444a, dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodującej miPEP444b oraz dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodującej PEP444c. Celem była delecja możliwie jak największych fragmentów DNA kodujących analizowane peptydy (ryc. 33).





Ryc. 33. Struktura genów *MIR444a*, *MIR444b* oraz *MIR444c* z zaznaczoną lokalizacją ORF i ich sekwencjami nukleotydowymi. Na szaro zaznaczono sekwencje PAM. Dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodującej PEP444a (sgRNA1 oraz sgRNA2) wprowadzono do jednego konstruktów, którym transformowano niedojrzałe zarodki jęczmienne przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens*. Natomiast dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodującej miPEP444b (sgRNA1 oraz sgRNA2) oraz PEP444c (sgRNA3 i sgRNA4) wprowadzono wspólnie do drugiego konstruktów wykorzystanego do transformacji.

W następnym etapie badań poddano analizie pierwsze pokolenie (G1, ang. *first generation*) roślin transgeniczných. Nie otrzymano roślin transgeniczných z mutacją w obrębie sekwencji kodującej PEP444a. Wynik ten sugeruje, że wprowadzone w tym rejonie mutacje z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas9 mają efekt letalny. Otrzymano natomiast 57 roślin transgeniczných niosących mutacje w obrębie sekwencji kodującej miPEP444b i/lub PEP444c. Spośród 60 analizowanych roślin z pokolenia G1, zidentyfikowano 14 heterozygotycznych względem genu *MIR444b* oraz *MIR444c*, 8 homozygotycznych (mutacja nastąpiła w obu allelach) względem *MIR444b* i jednocześnie heterozygotycznych względem *MIR444c* oraz 13 homozygotycznych względem *MIR444c* i jednocześnie heterozygotycznych względem *MIR444b*. Ponadto 8 roślin transgeniczných było homozygotycznych zarówno względem *MIR444b*, jak i *MIR444c*. Zidentyfikowano 5 roślin transgeniczných homozygotycznych względem *MIR444b*, które nie niosły mutacji w genie *MIR444c* oraz 9 roślin transgeniczných

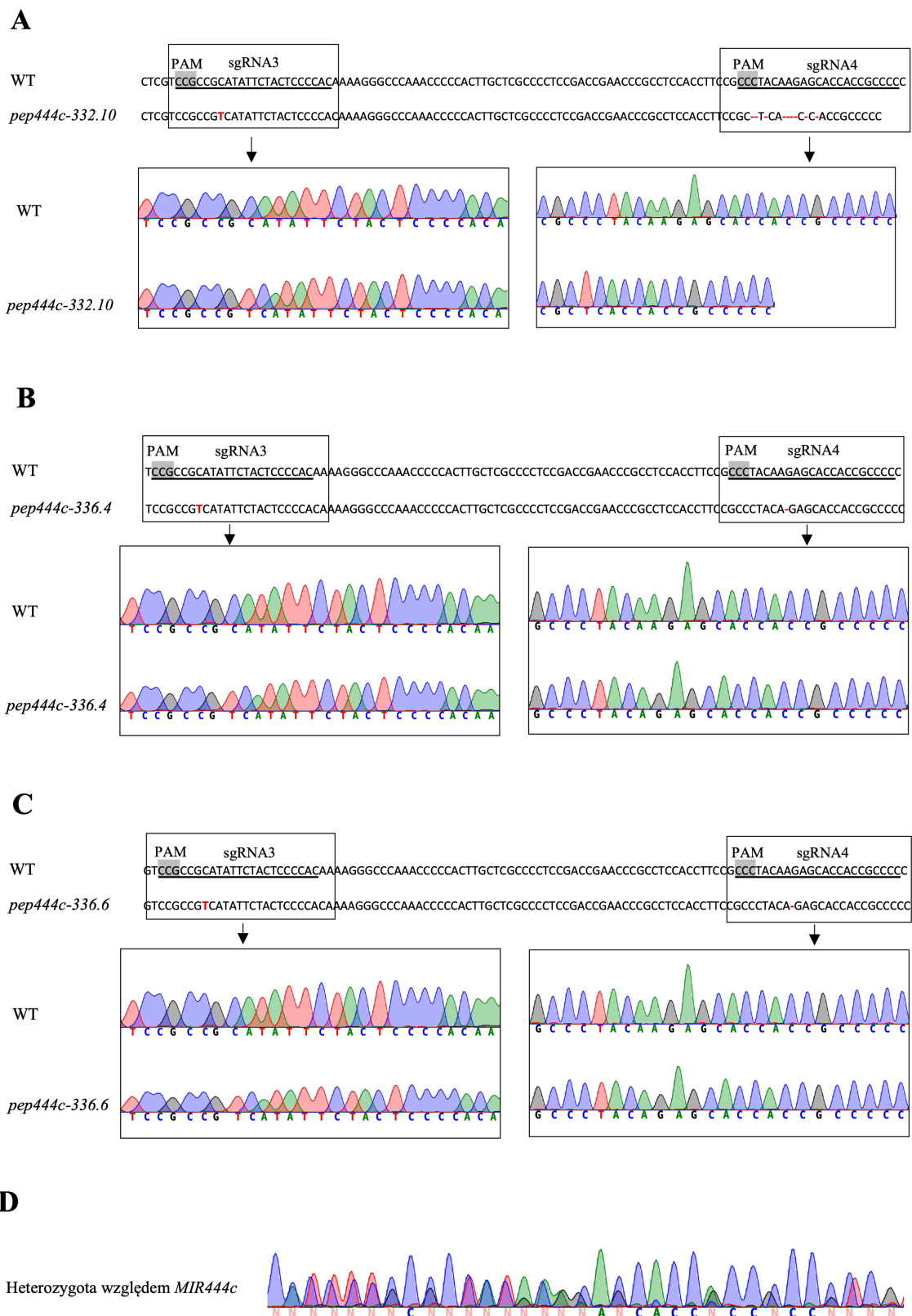
homozygotycznych względem *MIR444c* bez mutacji w rejonie *MIR444b*. Dane te podsumowano w tabeli 7.

Tabela 7. Podsumowanie efektywności CRISPR/Cas9 w pierwszym pokoleniu (G1) roślin transgeniczných. Do transformacji wykorzystano konstrukt zawierający dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodującej miPEP444b (sgRNA1 oraz sgRNA2) oraz dwa RNA naprowadzające do sekwencji kodującej PEP444c (sgRNA3 i sgRNA4).

Konstrukt CRISPR/Cas9	pZmUbi:gRNA1:gRNA2:gRNA3:gRNA4:pZmUbi:SpCas9
Liczba analizowanych roślin w pokoleniu G1	60
Liczba roślin typu dzikiego (WT)	3
Częstotliwość mutacji w pokoleniu G1	95%
Liczba roślin transgeniczných heterozygotycznych względem genu <i>MIR444b</i> oraz <i>MIR444c</i>	14
Liczba roślin transgeniczných homozygotycznych względem genu <i>MIR444b</i> i jednocześnie heterozygotycznych względem genu <i>MIR444c</i>	8
Liczba roślin transgeniczných homozygotycznych względem genu <i>MIR444c</i> i jednocześnie heterozygotycznych względem genu <i>MIR444b</i>	13
Liczba roślin homozygotycznych względem genu <i>MIR444b</i> oraz <i>MIR444c</i>	8
Liczba roślin transgeniczných homozygotycznych względem <i>MIR444b</i> (WT względem genu <i>MIR444c</i>)	5
Liczba roślin transgeniczných homozygotycznych względem <i>MIR444c</i> (WT względem genu <i>MIR444b</i>)	9

Do dalszych analiz postanowiono wybrać rośliny transgeniczne niosące mutacje w rejonie kodującym PEP444c i homozygotyczne względem tej mutacji, a także nie niosące mutacji w genie *MIR444b*. Wysiano drugie pokolenie (G2) roślin transgeniczných i ponownie sprawdzono pod kątem wprowadzonych mutacji. Wyselekcjonowano 3 linie roślin transgeniczných z mutacjami w obrębie sekwencji kodującej PEP444c, jednocześnie pozbawionych mutacji w rejonie sekwencji kodującej miPEP444b. Wybrano linię *pep444c-332.10*, w której nastąpiła insercja 1 pary zasad i delecja 9 par zasad w rejonie sekwencji kodującej miPEP444c oraz linię *pep444c-336.4*

oraz *pep444c-336.6*, w których zidentyfikowano insercję 1 pary zasad oraz delecję 1 pary zasad w sekwencji kodującej miPEP444c (Ryc. 34).



Ryc. 34. Wzorzec mutacji w liniach transgeniczných *pep444c-332.10* (panel A), *pep444c-336.4* (panel B), *pep444c-336.6* (panel C). Linie *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6* reprezentują ten sam wzorzec mutacji. Panel D przedstawia przykładowy fragment chromatogramu reprezentujący roślinę transgeniczną heterozygotyczną względem *MIR444c*. Podkreślono sekwencję RNA naprowadzających (sgRNA3 oraz sgRNA4), na szaro zaznaczono PAM.

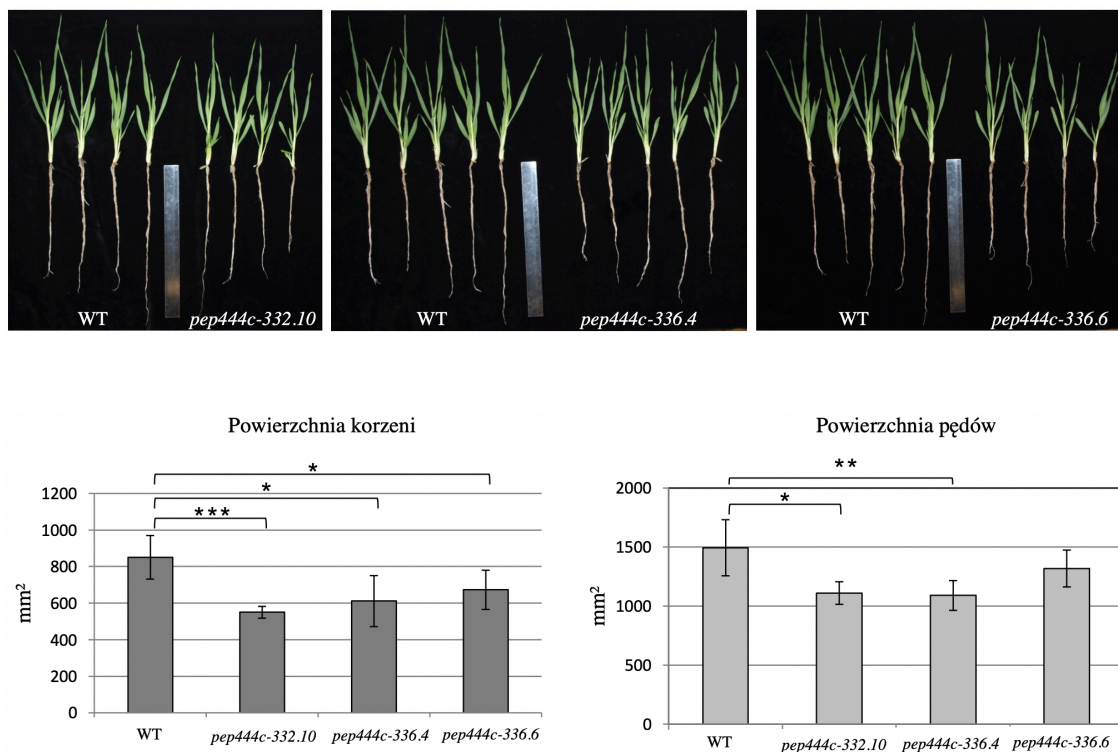
Mutacje wprowadzone w obrębie sekwencji kodującej PEP444c spowodowały zmianę w sekwencji aminokwasowej. W roślinach z linii *pep444c-332.10* zidentyfikowano przedwczesny kodon stop. Powstały peptyd jest krótszy o 29 aminokwasów od końca karboksylowego z porównaniu do peptydu występującego w roślinach typu dzikiego. Natomiast w przypadku linii *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6* mutacje wywołały zmianę 28 aminokwasów (Ryc. 35).

WT	
MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSAAYSTPHKRAQTPTCSPLRPNPPPSALQEHRPRRLLPH QSIRPKSSSNPSPRRAPAGARWPASFLSVSDRRDRFPWPCLVQWLA AACCRICAAGAC SPLNRSRQWL TICPYHCSAT APVSSDGLLWP	168 aa
<i>pep444c-332.10</i>	
MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSA VIFYSPQKGNPHLLAPTEPASTFRSPPPSLAPASIDPT KIQLKSLAASPCAGWCPLARLVPLGFGSERSISMALPCTVASCRLLSHLCSWCMFPPPKS	139 aa
<i>pep444c-336.4</i> oraz <i>pep444c-336.6</i>	
MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSA VIFYSPQKGNPHLLAPTEPASTFRPT EHHRPRRLLPHQ SIRPKSSSNPSPRRAPAGARWPASFLSVSDRRDRFPWPCLVQWLA AACCRICAAGAC SPLNRSRQWL TICPYHCSATA PVSSDGLLWP	168 aa

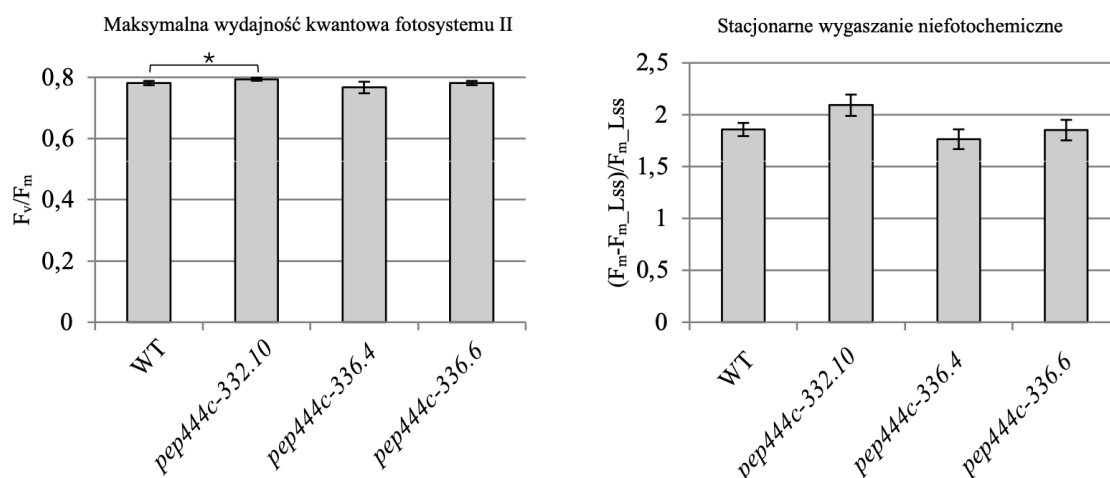
Ryc. 35. Porównanie sekwencji aminokwasowych rośliny typu dzikiego i roślin z linią transgeniczných *pep444c-332.10*, *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6*.

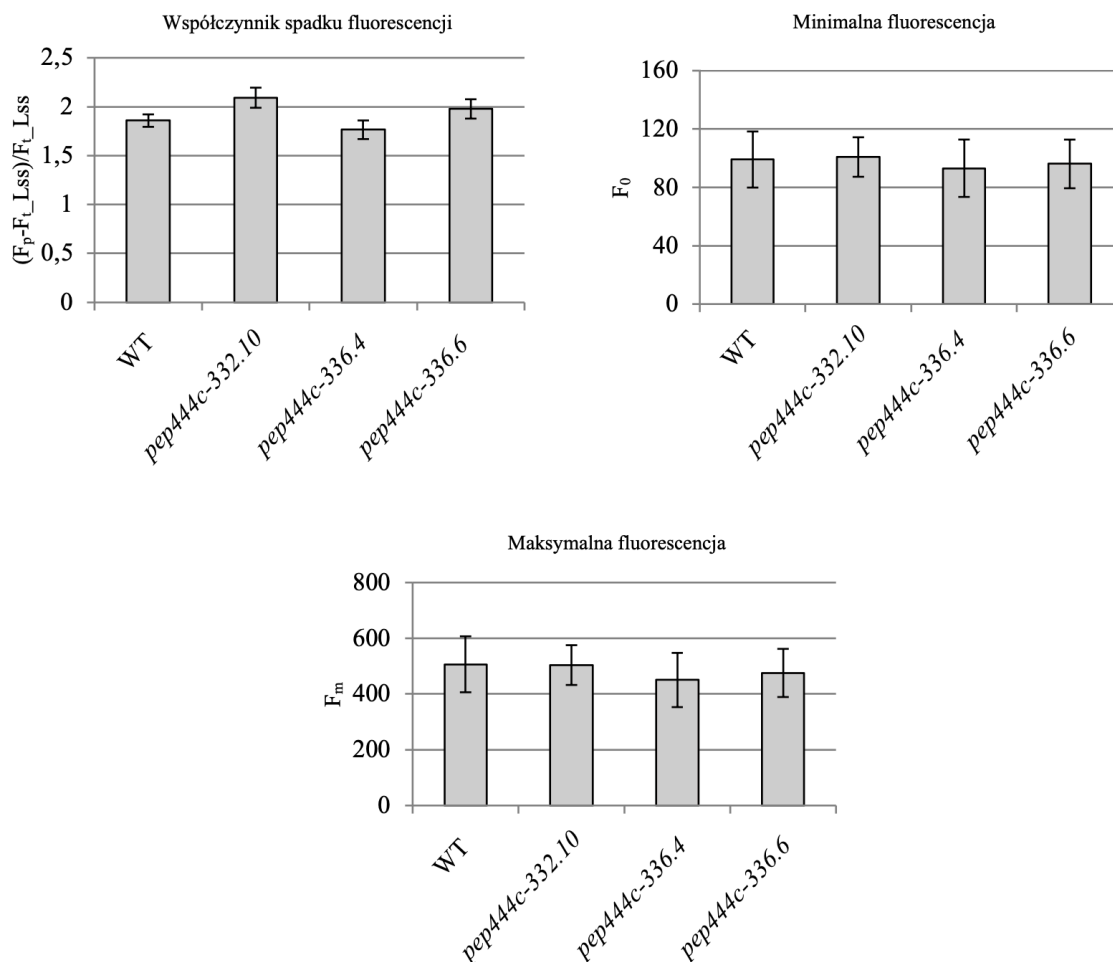
Przeprowadzono analizę fenotypową i we wszystkich liniach transgeniczných wykazano zmniejszoną powierzchnię pędów i korzeni roślin z wyprowadzonych linii transgeniczných (pokolenie G2) w porównaniu do roślin typu dzikiego (Ryc. 36). Przeanalizowano również wybrane parametry fluorescencji: QY max (F_v/F_m), NPQ, Rfd, F_0 i F_m . Odnotowano niewielki wzrost wartości QY max, określającą maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II, u roślin *pep444c-332.10* w porównaniu do WT. Nie zaobserwowano jednak zmian w wartościach parametrów NPQ (stacjonarne wygaszanie niefotochemiczne), Rfd (współczynnik spadku fluorescencji), F_0 (minimalna

fluorescencja) i F_m (maksymalna fluorescencja) (ryc. 37). Wyniki te wskazują, że w roślinach transgenicznych nie doszło do zmian w procesie fotosyntezy.



Ryc. 36. Dwutygodniowe rośliny jęczmienia z pokolenia G2 (WT; *pep444c-332.10*; *pep444c-336.4*; *pep444c-336.6*) oraz powierzchnia korzeni i pędów analizowanych roślin z wybranych linii transgenicznych. Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem stacji fenotypującej PlantScreen™ Systems. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (n = 5), gwiazdki wskazują poziom istotności statystycznej (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Statystykę przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta.

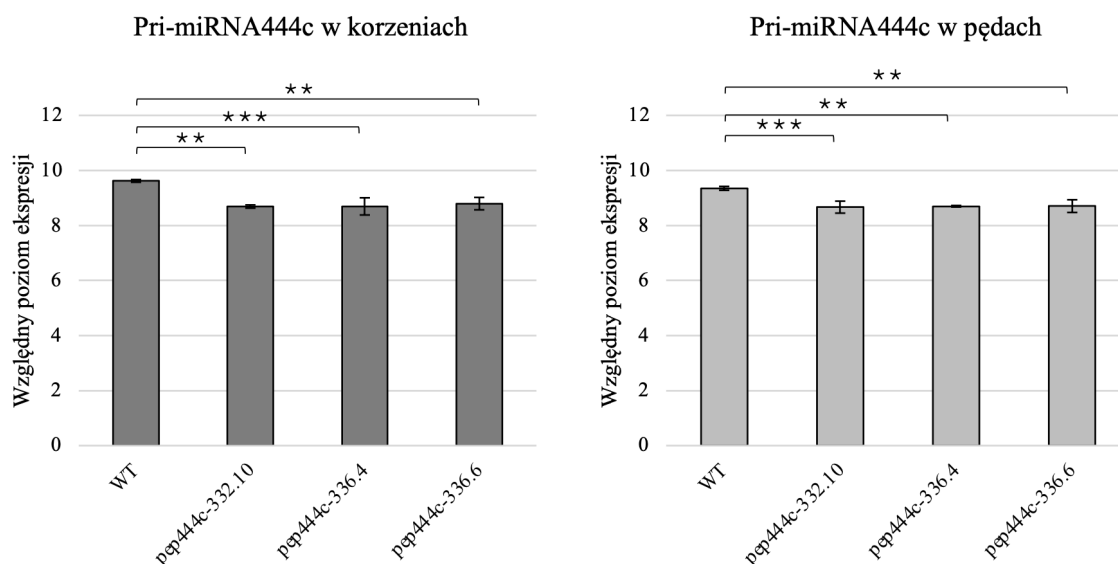




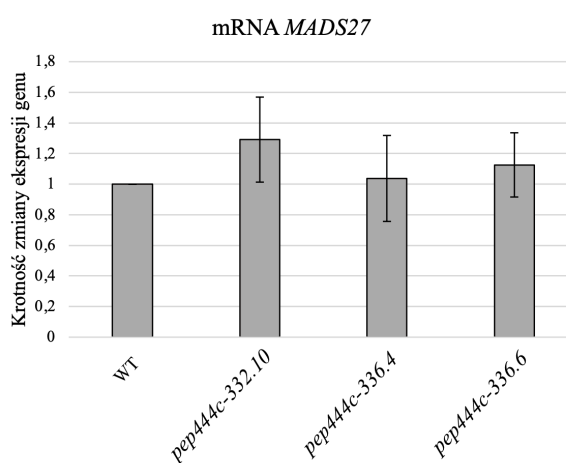
Ryc. 37. Wykresy przedstawiające pomiary wybranych parametrów fluorescencji przeprowadzone z wykorzystaniem roślin typu G2 (WT; *pep444c-332.10*; *pep444c-336.4*; *pep444c-336.6*). Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (n = 5), gwiazdki wskazują poziom istotności statystycznej (* $P < 0,05$). Obliczenia statystyczne wykonano z użyciem testu *t*-Studenta.

W kolejnym etapie badań sprawdzono poziom ekspresji *MIR444c* z wykorzystaniem starterów amplifikujących sekwencję kodującą PEP444c. Odnotowano spadek poziomu ekspresji zarówno w korzeniach jak i pędach roślin z wszystkich trzech analizowanych linii transgenicznych (ryc. 38). Ponadto wcześniejsze badania przeprowadzone w Zakładzie Ekspresji Genów wykazały, że na nici DNA przeciwległej do nici zawierającej *MIR444c* znajduje się gen *MADS27* kodujący czynnik transkrypcyjny z rodziny MADS-box (Smoczyńska i in., 2022). W celu sprawdzenia, że wprowadzone przez nas mutacje z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas9 w obrębie genu *MIR444c* nie wywołały zmian w rejonie *MADS27*, przeanalizowano poziom ekspresji mRNA *MADS27* w roślinach z wyprowadzonych linii transgenicznych. Nie

odnotowano istotnych różnic pomiędzy próbą kontrolną (WT) a próbkami badanymi (*pep444c-332.10*, *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6*) (ryc. 39). Wynik ten wskazuje, że mutacje zostały wprowadzone w rejonie genu *MIR444c* nie spowodowały zaburzeń w syntezie mRNA MADS27.

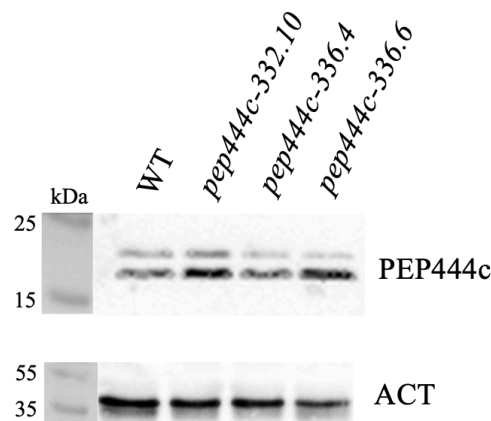


Ryc. 38. Analiza poziomu ekspresji genu *MIR444c* w korzeniach (lewy panel) i pędach (prawy panel) dwutygodniowych roślin z pokolenia G2 (WT; *pep444c-332.10*; *pep444c-336.4*; *pep444c-336.6*). Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (n = 3), gwiazdki wskazują poziom istotności statystycznej (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Względny poziom ekspresji oznacza różnicę poziomu ekspresji między genem badanym a genem referencyjnym obliczoną z wykorzystaniem metody $2^{-\Delta Ct}$ (patrz rozdział 4.2). Do obliczeń statystycznych wykorzystano test *t*-Studenta.



Ryc. 39. Analiza poziomu ekspresji genu *MADS27* w korzeniach 2-tygodniowych roślin z pokolenia G2 (WT; *pep444c-332.10*; *pep444c-336.4*; *pep444c-336.6*). Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (n = 3). Obliczenia statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta.

Podjęto również próbę oceny poziomu peptydu PEP444c w roślinach z wyprowadzonych linii transgenicznych. Po nałożeniu 50 µg białek oraz przy zastosowaniu przeciwciała F2DAQ5 przeciwko PEP444c nie zaobserwowano jednak różnic między próbą kontrolną (WT) a próbkami badanymi (*pep444c-332.10*, *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6*) (ryc. 40, górny panel). W celu produkcji wspomnianego przeciwciała wykorzystano jedynie 13-aminokwasowy region znajdujący się na karboksylowym końcu peptydu (dr Joanna Porankiewicz-Asplund, konsultacja). Region ten przyrównano do sekwencji aminokwasowych peptydów z wyprowadzonych linii transgenicznych i zarejestrowano znaczące podobieństwo (ryc. 40). Z tego powodu wynik analizy Western blot zinterpretowano jako skutek niespecyficznego wiązania się przeciwciała do regionów *pep444c*. Ocena ilości peptydu PEP444c w roślinach *pep444c-332.10*, *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6* była więc niemożliwa.



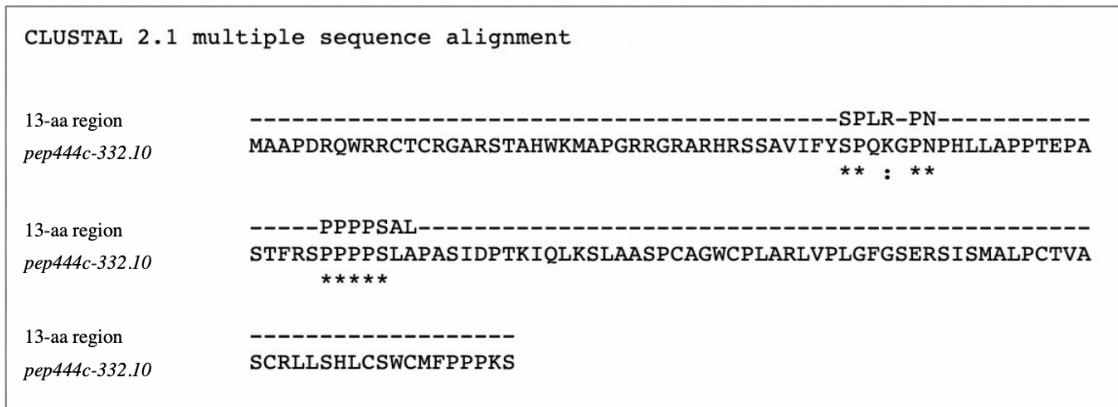
WT

13-aa region rozpoznawany przez przeciwciało

MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSAAYSTPHKRAQTPTC **SPLRPNPPPSAL** QEHHRRR
 LLPHQSIRPKSSSNPSPRRAPAGARWPASFLSVSDRRDRFPWPCLVQWLAACCRICAAGACSPLPNRSRQW
 LTICPYHCSATAPVSSDGLLWP 168 aa

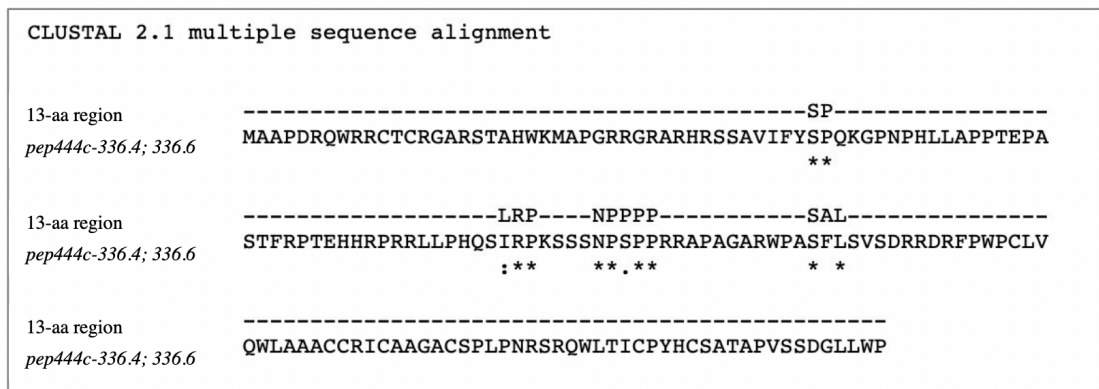
pep444c-332.10

MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSAVIFY **SE** **QKGNPHLL** APTEPASTFRS **PPPPS** LAP
 ASIDPTKIQLKSLAASPCAGWCPLARLVPLFGSERSISMALPCTVASCRLLSHLCSWCMFPPPKS 139 aa



pep444c-336.4; pep444c-336.6

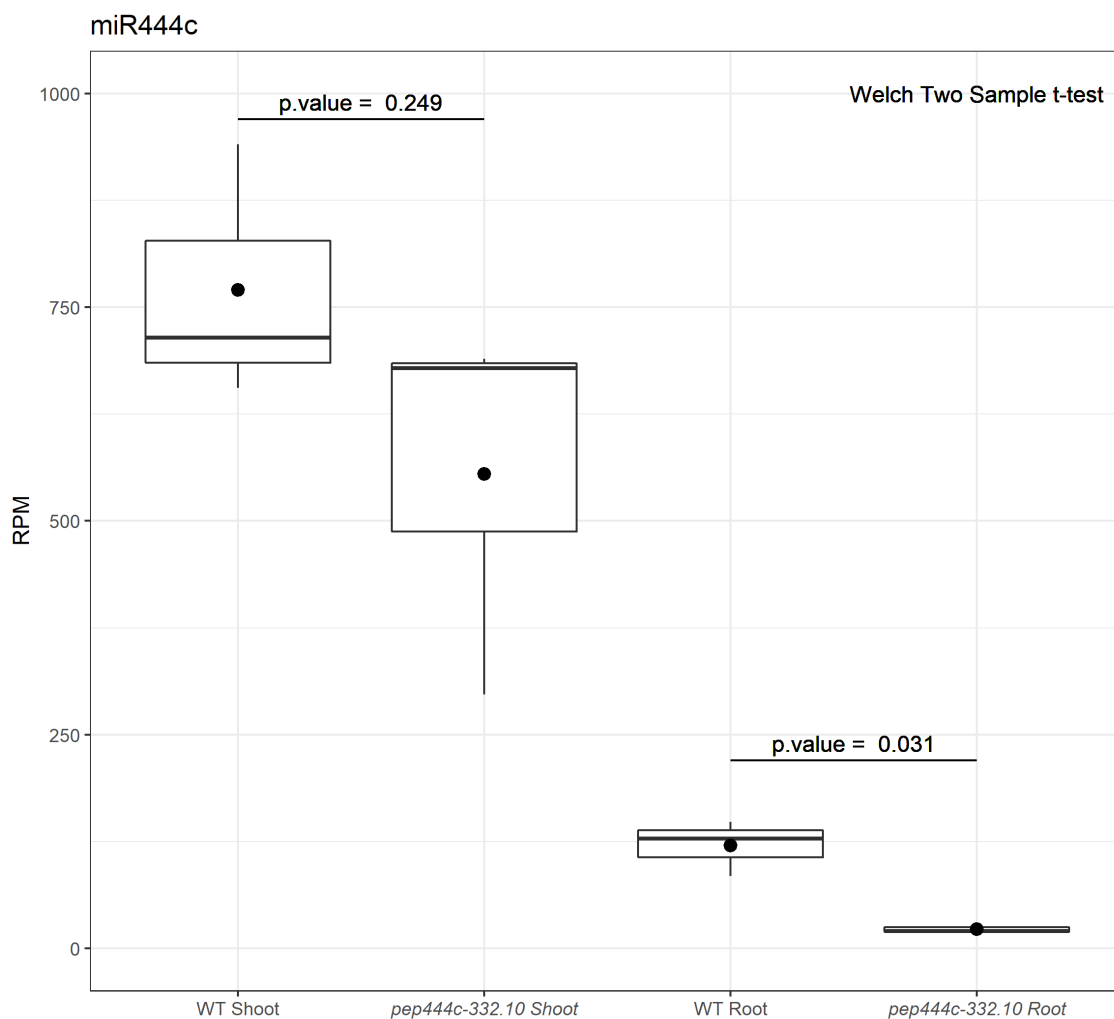
MAAPDRQWRRCTCRGARSTAHWKMAPGRRGRARHRSSAVIFY**SP**QKGNPHLLAPPTPEPASTFRPTEHHRPRR
 LLPHQ**SIRPKSSSNPSPPRR**APAGARWPAS**FL**SVSDRRDRFPWPCLVQWLAACCRICAAGAC**SPLPNRSRQW**
 LTICPYHCSATAPVSSDGLLWP 168 aa



Ryc. 40. Analiza poziomu ekspresji PEP444c w roślinach typu dzikiego (WT) oraz roślinach z linii transgenicznych *pep444c-332.10*, *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6*. Górny panel przedstawia wynik analizy Western blot po nałożeniu na żel mieszaniny białek (50 µg) i zastosowaniu przeciwciał specyficznych do fragmentu analizowanego peptydu (F2DAQ5) i aktyny (anty – aktyna). Liczbami oznaczono masę cząsteczkową poszczególnych białek markera. Poniżej pokazano sekwencję aminokwasową PEP444c z zaznaczonym regionem rozpoznawanym przez przeciwciało oraz sekwencje aminokwasowe PEP444c. Na żółto zaznaczono aminokwasy mapujące się do 13-aa regionu rozpoznawanego przez przeciwciało. Przedstawiono również przyrównanie sekwencji aminokwasowych, które wykonano z wykorzystaniem programu Clustal (wersja 2.1). Gwiazdka (*) wskazują identyczne aminokwasy, dwukropek (:) oznacza substytucje aminokwasów o podobnych właściwościach, natomiast kropka (.) wskazuje substytucje aminokwasów o nieznacznie podobnych właściwościach.

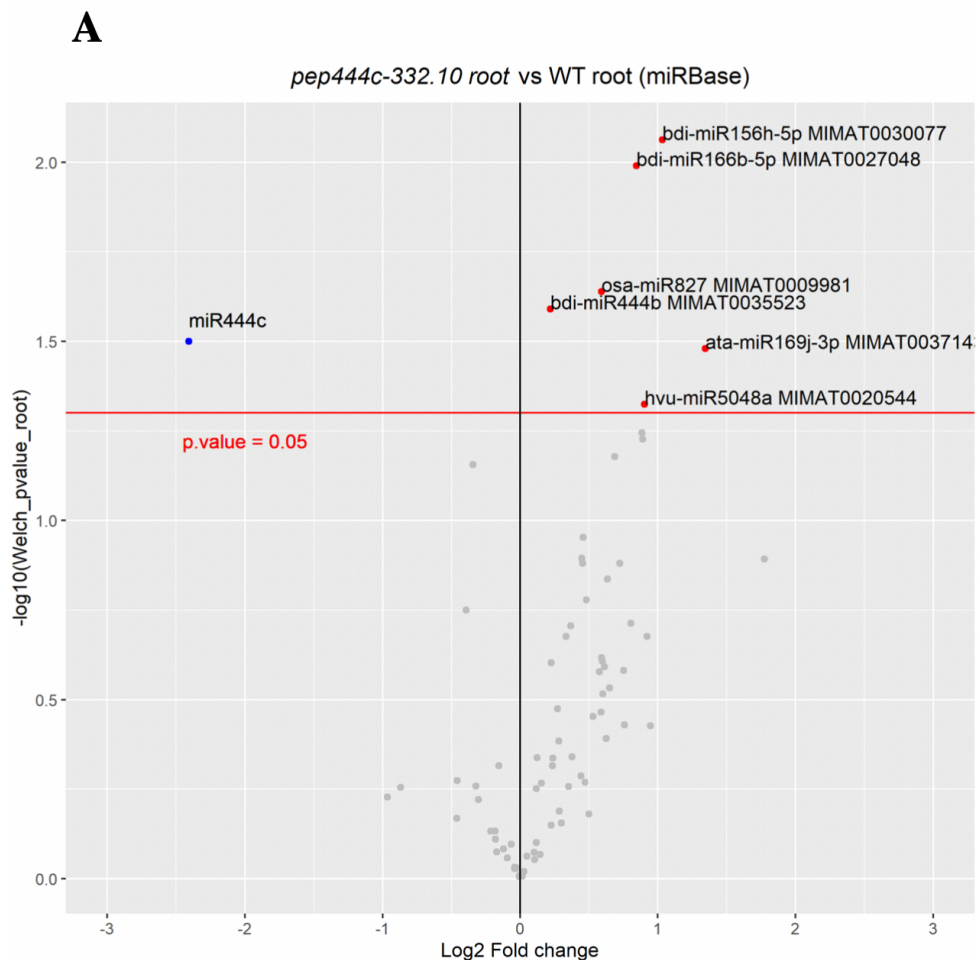
5.7. Wpływ PEP444c na akumulację mikroRNA444c

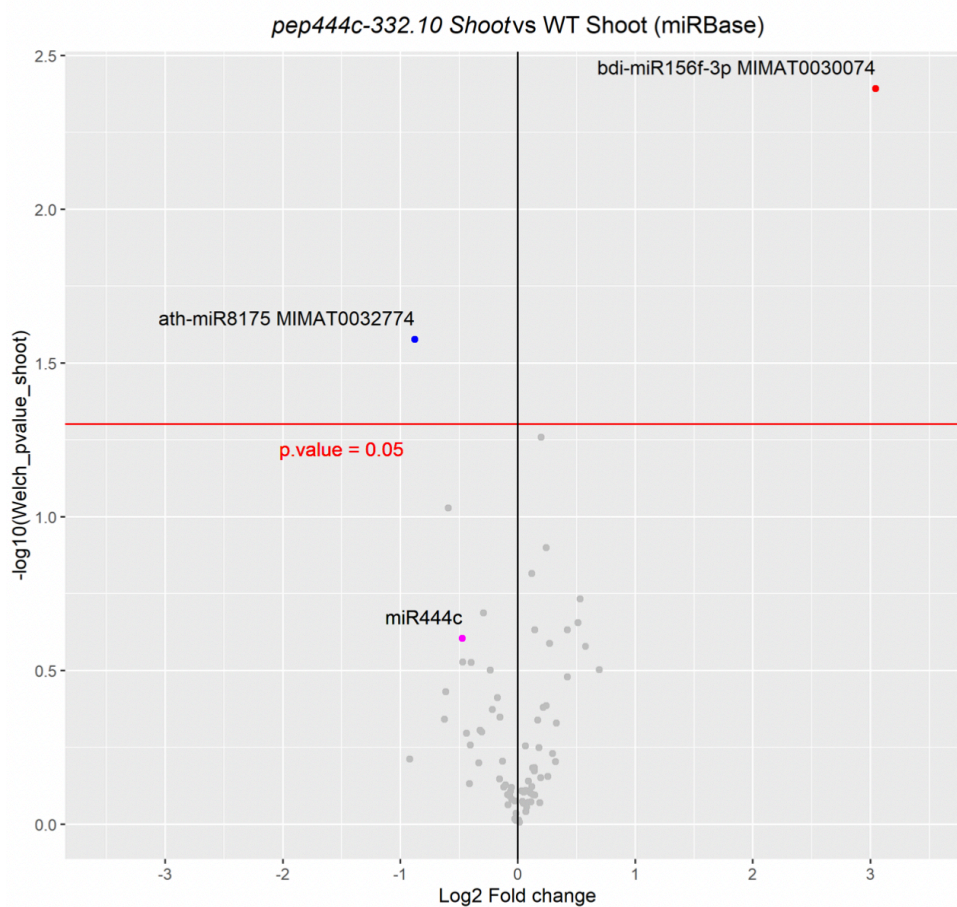
W celu ustalenia czy mutacje wprowadzone w obrębie sekwencji kodującej PEP444c mają wpływ na akumulację mikroRNA444c przeprowadzono eksperyment głębokiego sekwencjonowania małych RNA. Wykorzystano 2-tygodniowe pędy i korzenie roślin typu dzikiego oraz roślin z wyprowadzonej linii transgenicznej *pep444c-332.10*. Linia ta została wybrana do dalszych badań ze względu na zmiany i skrócenie sekwencji aminokwasowej PEP444c spowodowane wprowadzonymi mutacjami. Wyniki analizy wykazały istotny statystyczny spadek poziomu mikroRNA444c w korzeniu w roślinach *pep444c-332.10* w porównaniu do roślin typu dzikiego (ryc. 41). W przypadku pędów zarejestrowano natomiast niewielki (nieistotny statystycznie) spadek poziomu mikroRNA444c w roślinach *pep444c-332.10*. Wynik ten wskazuje na istotny wpływ PEP444c na akumulację mikroRNA444c, a co za tym idzie na proces biogenezy.



Ryc. 41. Analiza poziomu mikroRNA444c w pędach i korzeniach roślin typu dzikiego i *pep444c-332.10*. Przedstawiono liczbę znormalizowanych zliczeń dla trzech powtórzeń biologicznych (RPM, ang. *reads per milion*). Wykorzystano test t Welcha, p.value wskazuje poziom istotności. Dla pędów odnotowano poziom istotności równy 0,249 ($P > 0,05$; wynik nieistotny statystycznie) a dla korzeni 0,031 ($P < 0,05$; wynik istotny statystycznie).

W dalszym etapie badań, odczyty otrzymane w wyniku analizy wyników z głębokiego sekwencjonowania małych RNA przyrównano do sekwencji mikroRNA zdeponowanych w bazie miRBase (<https://www.mirbase.org/>; wersja 22.1). Zidentyfikowano sześć mikroRNA (bdi-miR444b; osa-miR827; bdi-miR166b-5p; hvu-miR5048a; bdi-miR156h-5p oraz ata-miR169j-3p), których poziom był podwyższony w korzeniach roślin *pep444c-332.10* w porównaniu do roślin WT (ryc. 42A). Ponadto, odnotowano tylko jeden mikroRNA (bdi-miR156f-3p), którego poziom był podwyższony w pędach *pep444c-332.10* oraz jeden mikroRNA (ath-miR8175), którego poziom był obniżony w pędach *pep444c-332.10* w porównaniu do WT (ryc. 42B).



B

Ryc. 42. Wykresy przedstawiające analizę wyników głębokiego sekwencjonowania małych RNA z korzeni (A) oraz pędów (B) roślin *pep444c-332.10* i WT. Do analizy wybrano mikroRNA mapujące się do cząsteczek zdeponowanych w bazie miRBase. Każda kropka reprezentuje jeden mikroRNA. (A) Niebieską kropką zaznaczono mikroRNA444c, czerwone kropki wskazują mikroRNA, których poziom był podwyższony w *pep444c-332.10* w porównaniu do WT. (B) Różowa kropka wskazuje mikroRNA444c, niebieska reprezentuje mikroRNA o poziomie obniżonym, natomiast czerwona kropka wskazuje mikroRNA o poziomie podwyższonym w *pep444c-332.10* w porównaniu do WT. Szare kropki reprezentują mikroRNA nieistotne statystycznie.

6. Dyskusja

6.1. Rodzina genów *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym

Zidentyfikowane u roślin jednoliściennych mikroRNA z rodziny *MIR444*, poprzez regulację poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych z rodziny MADS-box, pełnią wiele istotnych funkcji we wzroście i rozwoju roślin (Schilling i in., 2018; Schilling i in., 2020; Kuijer i in., 2021). W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej scharakteryzowano trzy geny *MIR444* (*MIR444a*, *MIR444b*, *MIR444c*) w jęczmieniu zwyczajnym oraz dokonano analizy poziomu ekspresji pri-miRNA444 zarówno w warunkach kontrolnych, jak i pod wpływem stresu nadmiaru azotu. Wykazano, że wszystkie trzy analizowane geny *MIR444* w jęczmieniu charakteryzują się złożoną budową egzonowo-intronową. Sekwencja mikroRNA* znajduje się w drugim egzonie, natomiast mikroRNA zlokalizowany jest w egzonie trzecim. Niedostępne są jednak informacje dotyczące dokładnej struktury genów *MIR444* u innych roślin jednoliściennych.

Analiza poziomu ekspresji zbiorczej puli pri-miRNA444a/b/c wykazała niewielką (nieistotną statystycznie) akumulację pri-miRNA444a w pędach i korzeniach jęczmienia w warunkach stresu nadmiaru azotu, a także istotny statystycznie wzrost poziomu pri-miRNA444b w korzeniach jęczmienia w warunkach stresu nadmiaru azotu. Nie zidentyfikowano natomiast pri-miRNA444c w pędach zarówno w warunkach kontrolnych jak i pod wpływem stresu nadmiaru azotu. Obserwacje te nie odpowiadają jednak wynikom analizy głębokiego sekwencjonowania małych RNA, zgodnie z którymi dojrzały mikroRNA444c występuje zarówno w pędach jak i korzeniach jęczmienia. Brak korelacji między poziomem dojrzałego mikroRNA a pri-miRNA opisano wcześniej u *Arabidopsis*. Zaobserwowano spadek/wzrost poziomu kilkudziesięciu pri-miRNA w warunkach stresu suszy, nie odnotowano jednak zmian poziomu odpowiadającym im mikroRNA. Podobne efekty uzyskano analizując poziom pri-miRNA i dojrzałych mikroRNA w warunkach stresu wysokiej temperatury, zasolenia, stresu niedoboru i nadmiaru miedzi, nadmiaru kadmu i niedoboru siarki (Barciszewska-Pacak i in., 2015). Brak zależności między poziomem pri-miRNA a mikroRNA wynikać może ze złożonej regulacji procesu biogenezy, na którą wpływ mogą mieć splicing, alternatywny splicing i wybór miejsca poliadenylacji (pA) (Bielewicz i in., 2013; Yan i in., 2012). Nie można

również wykluczyć możliwości transportu mikroRNA na dalekie odległości, kwestię tę przedyskutowano w dalszej części tego rozdziału.

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że transkrypty genów *MIR444* podlegają procesom alternatywnego splicingu, generując wiele izoform, które podzielono na funkcjonalne (mikroRNA jest produkowany) i niefunkcjonalne (mikroRNA nie jest produkowany). Zidentyfikowano pięć izoform funkcjonalnych oraz trzy izoformy niefunkcjonalne pri-miRNA444a, cztery izoformy funkcjonalne i jedną niefunkcjonalną pri-miRNA444b oraz jedną funkcjonalną i cztery niefunkcjonalne pri-miRNA444c. Zjawisko alternatywnego splicingu zostało dobrze scharakteryzowane u *Arabidopsis*. Gen *MIR156g* ma długość 9759 bp i składa się z sześciu egzonów oraz pięciu intronów, z czego najdłuższy liczy 4666 bp (Kruszka i in., 2013). Transkrypt *MIR156g* podlega alternatywnemu splicingowi generując osiem izoform, pięć funkcjonalnych i trzy niefunkcjonalne. Ponadto w rejonie pri-miRNA156g zidentyfikowano alternatywne miejsca pA w drugim intronie oraz w ostatnim egzonie. Transkrypt genu *MIR116* u *Arabidopsis* również może podlegać alternatywnemu splicingowi w wyniku czego powstaje pięć izoform (Kruszka i in., 2013). W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano również akumulację jednej z niefunkcjonalnej izoformy pri-miRNA444a (izoformy G) w korzeniach jęczmienia w warunkach stresu nadmiaru azotu. Z kolei w przypadku innej niefunkcjonalnej izoformy pri-miRNA444a (izoformy H) zaobserwowano akumulację w pędach jęczmienia w warunkach kontrolnych. Dane literaturowe wskazują na istotny wpływ stresu abiotycznego na splicing alternatywny transkryptów genów *MIR*. U *Arabidopsis* miR400 występuje w intronie genu kodującego białko. W wyniku stresu wysokiej temperatury dochodzi do wycięcia intronu zawierającego sekwencję miR400 i spadku poziomu dojrzałego miRNA400 (Yan i in., 2012). W przypadku badań nad znaczeniem poszczególnych izoform funkcjonalnych/niefunkcjonalnych pri-miR444a/b/c w naszym zakładzie przeprowadzono odpowiednie badania w różnego rodzaju stresach abiotycznych. Badania te wykazały, że nie ma istotnych zmian w profilu jakościowym i ilościowym poszczególnych izoform w stresach wysokiej niskiej i temperatury, zasolenia i suszy (dane niepublikowane).

Przeprowadzone przez nas eksperymenty wykazały również obecność wielu alternatywnych miejsc poliadenylacji (pA). W przypadku pri-miRNA444a i pri-miRNA444b zidentyfikowano je jedynie w ostatnim egzonie, z kolei w pri-miRNA444c obecność alternatywnych pA odnotowano również w pierwszym, drugim i trzecim

intronie. Zróznicowanie 3' końców pri-miRNA pod względem występowania pA przedstawiono z kolei w pracy Szarzyńska i in., 2009. Spośród sześciu zidentyfikowanych izoform pri-miRNA160 u *Arabidopsis*, trzy charakteryzują się obecnością pA w intronie, dwie posiadają pA w pierwszym egzonie i u jednej zidentyfikowano pA w obrębie drugiego egzonu. Eksperymenty przeprowadzone przez Szarzyńska i in., 2009 wykazały również obecność ośmiu różnych pA w prekursorze miR166a w roślinach typu WT i sześciu w analizowanym prekursorze w mutantach *hyl1*. Ponadto zaobserwowano, że tylko jedno pA było wspólne dla roślin WT i *hyl1*. Dane literaturowe wskazują, że ponad 75% genów u *Arabidopsis* podlega alternatywnej poliadenylacji (Guo i in., 2016). Chociaż większość zidentyfikowanych alternatywnych pA znajduje się w rejonach 3' UTR (ang. *untranslated region*), udokumentowano również obecność takich, które zlokalizowane są w regionach 5' UTR, intronach lub egzonach. Wykazano, że wybór miejsca poliadenylacji może wpływać na lokalizację mRNA, jego stabilność oraz wydajność translacji (Wu i in., 2011; Guo i in., 2016). W przypadku pri-miRNA 402 *A.thaliana* wykazano, że zahamowanie splicingu intronu, w którym znajduje się miRNA402, indukuje aktywację alternatywnej poliadenylacji w obrębie intronu, co koreluje równocześnie ze wzrostem ilości powstającego dojrzałego mikroRNA402 (Knop i in., 2017). Zatem nie można wykluczyć, że niektóre z zaobserwowanych miejsc poliadenylacji pri-miR444a/b/c mogą mieć znaczenie funkcjonalne.

Przeprowadzona przez nas analiza elementów regulatorowych w promotorach genów *MIR444* w jęczmieniu zwyczajnym wykazała obecność licznych motywów związanych z odpowiedzią rośliny na azot, światło, stres wysokiej temperatury oraz miedź. Przeprowadzono eksperymenty mające na celu analizę wpływu światła, miedzi i azotu na wzrost i rozwój jęczmienia zwyczajnego. Nie odnotowano zmian w przypadku przeprowadzenia stresu niedoboru/nadmiaru miedzi oraz braku światła (Smoczyńska i in., 2022). Natomiast u roślin uprawianych w warunkach stresu nadmiaru azotu zaobserwowano skrócenie korzeni. Odnotowano również wzrost poziomu pri-miRNA444b w korzeniach pod wpływem badanego stresu. Natomiast poziom dojrzałego miR444b2 był bardzo niski w warunkach kontrolnych i nie zmienił się w sposób statystycznie istotny w warunkach badanego stresu. Szczególnie interesującym wynikiem jest brak detekcji pri-miRNA444c w pędach jęczmienia zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w warunkach stresu nadmiaru azotu. Natomiast dane uzyskane z głębokiego sekwencjonowania małych RNA wskazują, że dojrzały mikroRNA444c

występuje w korzeniach i pędach jęczmienia, a jego poziom nie zmienia się istotnie pod wpływem stresu nadmiaru azotu. Wynik ten może świadczyć o bardzo szybkim i wydajnym procesie dojrzewania pri-miRNA444c lub o eksporcie miR444c z korzeni do części nadziemnych. Eksperymenty przeprowadzone przez Buhtz i in., 2008 oraz Yoo i in., 2004 wykazały obecność mikroRNA w tkance przewodzącej (floemie) rośliny rzepaku (*Brassica napus*) i dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima*), co świadczyć może o transporcie analizowanych mikroRNA na dalekie odległości. Obserwacje te potwierdzono badaniami nad miR399, którego ekspresja jest indukowana w warunkach niedoboru fosforu (Bari i in., 2006). Pędy roślin *Arabidopsis* z nadekspresją *MIR399* zaszczerpiono na pędach podkładek *Arabidopsis* typu dzikiego. Zaobserwowano akumulację miR399 w korzeniach przy jednoczesnym obniżeniu poziomu jego mRNA docelowego, transkryptu genu *PHO2*, co wskazywać może na transport miR399 z pędu do korzeni (Lin i in., 2008). Zaobserwowano również, że transkrypcja genu *MIR399* indukowana jest w pędach w warunkach stresu braku Pi, podczas gdy dojrzały miR399 akumulowany jest w korzeniach. Dane te sugerują, że transport miR399 z pędu do korzenia stanowi sygnał do pobierania Pi przez korzenie (Lin i in., 2008; Chen i Rechavi, 2022). W mutancie białka *HEN1* u *Arabidopsis* (*hen1-1*), na skutek zaburzenia procesy biogenezy mikroRNA odnotowano obniżenie poziomu ekspresji kilku mikroRNA, w tym miR395 oraz miR399 (Buhtz i in., 2010). Kiedy zaszczerpiono pędy roślin *Arabidopsis* typu dzikiego na pędach podkładek mutantów *hen1-1*, zaobserwowano akumulację miR395 oraz miR399 w korzeniach *hen1-1* na poziomie porównywalnym do poziomu ekspresji w korzeniach roślin typu dzikiego (Buhtz i in., 2010). Nie wykazano z kolei obecności we floemie miR171 oraz jego transportu z pędów do korzeni (Buhtz i in., 2010; Pant i in., 2009; Varkonyi-Gasic i in., 2007). Transport mikroRNA z korzeni do pędów udokumentowano z kolei z wykorzystaniem szczepienia między dwoma różnymi gatunkami roślin, *Arabidopsis thaliana* i *Nicotiana benthamiana*. Wykazano transport 82 mikroRNA z pędu do korzenia oraz 6 mikroRNA z korzenia do pędu (Deng i in., 2021).

Doniesienia literaturowe z ostatnich lat wskazują na zupełnie nową rolę pri-miRNA. Zidentyfikowano w ich rejonach otwarte ramki odczytu (ORF), które mogą kodować peptydy stymulujące biogenezę mikroRNA kodowanych w tych samych genach *MIR* (Laouressergues i in., 2015; Couzigou i Combier, 2016; Chen i in., 2020, Sharma i in., 2020; Zhang i in., 2020). Z przeprowadzonych przez nas eksperymentów wynika, że pri-miRNA444 również posiadają w swojej sekwencji ORF. Zidentyfikowaliśmy łącznie 8 różnych ORF w rejonie pri-miRNA444a, 11 ORF w obrębie pri-miRNA444b

oraz 6 ORF w rejonie pri-miRNA444c. Do dalszych analiz wybrano peptydy o długościach 119 (PEP444a), 51 (miPEP444b) oraz 168 (PEP444c) aminokwasów. Przeprowadzona przez nas analiza bioinformatyczna z użyciem bazy danych NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wykazała podobieństwo sekwencji kodującej PEP444a (81% identyczności sekwencji aminokwasowej) do hipotetycznego białka w jęczmieniu zwyczajnym. Zgodnie z definicją, hipotetyczne białko to takie, którego istnienie zostało przewidziane, ale brakuje eksperymentalnych dowodów na jego ekspresję *in vivo* (Galperin, 2001; Ijag i in., 2019). Przeprowadzona analiza dla sekwencji kodującej miPEP444b wykazała podobieństwo (100% identyczności sekwencji aminokwasowej) do niescharakteryzowanego białka w jęczmieniu zwyczajnym (Matsumoto i in., 2011). Nie stwierdzono natomiast podobieństwa sekwencji aminokwasowych PEP444a oraz miPEP444b do sekwencji aminokwasowych białek innych organizmów. Z kolei w przypadku PEP444c zaobserwowano podobieństwo (100% identyczności sekwencji aminokwasowej) do niescharakteryzowanego białka w jęczmieniu zwyczajnym. Dzięki uprzejmości prof. UAM Jana Brezovskiego i przeprowadzonej przez niego analizie bioinformatycznej wykazano również, że sekwencja kodująca PEP444c wykazuje podobieństwo do niescharakteryzowanego białka sorgo. Dane otrzymane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej sugerują, że zidentyfikowane peptydy kodowane przez geny *MIR444* nie są konserwowane ewolucyjnie. Obserwacje te są zgodne z danymi literaturowymi, zgodnie z którymi jedynie trzy zidentyfikowane do tej pory peptydy kodowane przez geny *MIR* (miPEP156a; miPEP164a i miPEP165a) są konserwowane ewolucyjnie u *Brassicaceae* (Laressergues i in., 2015; Morozov i in., 2019; Laressergues i in., 2022). Ponadto badania przeprowadzone nad stopniem konserwowania ewolucyjnego miPEPów u dwóch spokrewnionych ze sobą gatunków, *Arabidopsis lyrata* i *Arabidopsis thaliana*, sugerują, że mimo zbliżonej liczby zidentyfikowanych ORFów w pri-miRNA, sekwencje miPEPów nie są zachowane (Laressergues i in., 2022). W świetle dostępnej literatury można przypuszczać, że zidentyfikowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej ORFy mogą kodować peptydy ulegające translacji w rzeczywistości i mogące mieć wpływ na wydajność biogenezy mikroRNA z rodziny *MIR444*.

6.2. Asocjacja pri-miRNA444 z rybosomami

Zgodnie z postawioną w przez nas hipotezą, pri-miRNA444 są eksportowane z jądra do cytoplazmy, gdzie mogą ulegać translacji jak mRNA. W celu weryfikacji tego założenia przeprowadzono eksperyment profilowania polisomów z wykorzystaniem 2-tygodniowych roślin jęczmienia zwyczajnego uprawianego w warunkach kontrolnych i pod wpływem stresu nadmiaru azotu. **W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej po raz pierwszy wykazano wiązanie pri-miRNA444 z rybosomami w roślinach jednoliściennych, w tym przypadku w jęczmieniu zwyczajnym.** Interesującym wynikiem jest asocjacja sekwencji kodujących analizowane peptydy w poszczególnych organach lub pod wpływem czynnika stresowego. Wykazano, że sekwencja kodująca PEP444a wiąże się w sposób specyficzny z rybosomami w pędach w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem stresu nadmiaru azotu. W przypadku sekwencji kodującej miPEP444b potwierdzono wiązanie głównie w korzeniach zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w stresie nadmiaru azotu oraz w pędach jedynie w warunkach kontrolnych. Natomiast sekwencja kodująca PEP444c wiązała się z rybosomami głównie w pędach w obu badanych warunkach uprawy oraz w niewielkim stopniu w korzeniach, w warunkach kontrolnych i pod wpływem stresu azotowego. Badania przeprowadzone nad *Arabidopsis* wykazały, że niektóre transkrypty *MIR* zawierające w swojej sekwencji ORFy (pri-miR156a, pri-miR159a, pri-miR160a, pri-miR165a, pri-miR166b, pri-miR167a, pri-miR171a, pri-miR172a, pri-miR319b) również mogą być związane z rybosomami (Laouressgues i in., 2022). Wciąż brakuje jednak informacji na temat związania pri-miRNA z rybosomami u innych roślin.

W celu sprawdzenia czy analizowane peptydy kodowane przez geny *MIR444* w jęczmieniu mogą ulegać translacji, przeprowadzono najpierw ich nadekspresję w bakteriach *E. coli*. Wykorzystano w tym celu specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko fragmentom analizowanych peptydów. Wykazano, że wszystkie trzy peptydy ulegają ekspresji w systemie bakteryjnym. Ten wynik silnie sugerował, że peptydy te mogą ulegać translacji również w jęczmieniu, w układzie homologicznym. W następnym etapie badań postanowiono zatem sprawdzić czy zidentyfikowane przez nas peptydy ulegają ekspresji w roślinach jęczmienia zwyczajnego typu dzikiego (WT). Rzeczywiście, zidentyfikowano PEP444a w 2-tygodniowych pędach roślin uprawianych w warunkach stresu nadmiaru azotu. Wynik ten częściowo koreluje z danymi otrzymanymi z eksperymentu profilowania polisomów, gdzie wykazano wiązanie się

sekwencji kodującej PEP444a w pędach w warunkach kontrolnych i pod wpływem stresu azotowego. Brakuje jednak danych, żeby wyjaśnić brak PEP444a w pędach w warunkach przeprowadzonego stresu. Ze względu na małe rozmiary peptydów kodowanych przez geny *MIR* można przypuszczać, że mogłyby one być transportowane na duże odległości w odpowiedzi na niezidentyfikowane jeszcze sygnały (Yadav i in., 2021). Pozostaje to jednak niezgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Ormancey i in., 2020, które wykazały, że analizowany miPEP165a w *Arabidopsis* nie jest transportowany z korzeni do pędów. Z kolei PEP444c został zidentyfikowany głównie w pędach 2-tygodniowych roślin jęczmienia w warunkach kontrolnych. Słabszy sygnał zarejestrowano w pędach w warunkach stresu nadmiaru azotu oraz w korzeniach zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w stresie nadmiaru azotu. Obserwacje te odpowiadają danym otrzymanym z profilowania polisomów. Wykazano wiązanie sekwencji kodującej PEP444c głównie w pędach w obu testowanych warunkach uprawy i w nieznacznym stopniu w korzeniach. W celu detekcji miPEP444b w jęczmieniu zwyczajnymi zastosowano inny protokół (Metody, podrozdział 4.3) niż w przypadku PEP444a oraz PEP444c ze względu na małą masę cząsteczkową wynoszącą 5,6 kDa (dr Jean-Philippe Combier, konsultacja). Mimo tego z wykorzystaniem techniki Western blot nie zaobserwowano specyficznego sygnału odpowiadającemu miPEP444b, a w konsekwencji nie potwierdzono obecności analizowanego peptydu w jęczmieniu. Niezbędne jest zatem przeprowadzenie dalszych eksperymentów w celu ustalenia lokalizacji miPEP444b oraz warunków ekspresji.

6.3. Wykorzystanie technologii CRISPR/Cas9 do edycji genów *MIR444*

W celu odpowiedzi na pytanie jaka jest funkcja i biologiczna rola peptydów kodowanych przez geny *MIR444* w jęczmieniu postanowiono wyprowadzić linie transgeniczne jęczmienia, niosące mutacje w sekwencjach kodujących PEP444a, miPEP444b oraz PEP444c. Wykorzystano technologię CRISPR/Cas9 i zaprojektowano po dwa RNA naprowadzające na każdy analizowany przez nas peptyd (Hoffie i in., 2021; Hisano i in., 2022; Hoffie i in., 2022). Nie otrzymano roślin transgenicznych z mutacją w obrębie sekwencji kodującej PEP444a. Obserwacja ta sugeruje, że zmiany wprowadzone w rejonie *MIR444a* mają efekt letalny. Wcześniejsze badania przeprowadzone w Zakładzie Ekspresji Genów wykazały, że na nici DNA przeciwległej

do nici zawierającej *MIR444a* znajduje się gen *MADS57* kodujący czynnik transkrypcyjny z rodziny MADS-box. Region szóstego egzonu *MIR444a*, na który zaprojektowano dwa RNA naprowadzające w celu edycji sekwencji kodującej PEP444a, na przeciwległej nici odpowiada sekwencji drugiego intronu genu *MADS57*. Zatem sekwencja ta nie wchodzi w skład sekwencji kodującej (CDS, ang. *coding sequence*) czynnik transkrypcyjny *MADS57*. Uzyskane wyniki nie pozwalają na wyjaśnienie czy prawdopodobny efekt letalny może być wywołany mutacjami wprowadzonymi w rejonie sekwencji kodującej PEP444a czy w obrębie genu *MADS57*.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej otrzymano linie transgeniczne jęczmienia z mutacjami w obrębie sekwencji kodujących miPEP444b i/lub PEP444c. Ze względu na brak potwierdzenia obecności miPEP444b w roślinach jęczmienia z wykorzystaniem specyficznego przeciwciała i techniki Western blot, do dalszych analiz wyselekcjonowano linie transgeniczne z mutacjami jedynie w obrębie sekwencji kodującej PEP444c (*pep444c-332.10*; *pep444c-336.4*; *pep444c-336.6*). W roślinach linii *pep444c-332.10* zarejestrowano insercję 1 pary zasad i delecję 9 par zasad, co przełożyło się na wystąpienie przedwczesnego kodonu stop w sekwencji aminokwasowej PEP444c. Powstały w ten sposób *pep444c* ma długość 139 aa w porównaniu do 168 aa PEP444c w roślinach typu WT. Natomiast w roślinach linii *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6* wprowadzone mutacje wywołały zmianę 28 aa, nie zaobserwowano zmiany długości całego peptydu. Przeprowadzona przez nas analiza wykazała zmniejszoną powierzchnię korzeni u roślin wszystkich trzech analizowanych linii transgenicznych *pep444c* w porównaniu do WT. Zaobserwowano również zmniejszoną powierzchnię pędów u roślin *pep444c-332.10* oraz *pep444c-336.4*. Wykazano, że na nici DNA przeciwległej do nici zawierającej *MIR444c* zlokalizowany jest gen *MADS27*, który koduje czynnik transkrypcyjny *MADS27* (Smoczyńska i in., 2022). Czynnik ten wpływa na architekturę korzeni jęczmienia zwyczajnego (Smoczyńska i in., 2022). Przeprowadzona w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej analiza poziomu ekspresji mRNA *MADS27* nie wykazała jednak istotnych statystycznie zmian pomiędzy WT a *pep444c-332.10*, *pep444c-336.4* oraz *pep444c-336.6*. Konieczne jest zatem przeprowadzenie dalszych eksperymentów w celu wyjaśnienia w jaki sposób wprowadzone przez nas mutacje w rejonie sekwencji kodującej PEP444c wpływają na strukturę korzeni i pędów jęczmienia zwyczajnego. U roślin z analizowanych linii transgenicznych nie zarejestrowano również istotnych zmian w procesie fotosyntezy co może wskazywać na brak udziału peptydu kodowanego przez *MIR444c* w przemianach energii świetlnej.

Dosyć nieoczekiwanym wynikiem okazały się jednak analizy wyniku Western blot. Obecność peptydu kodowanego przez *MIR444c* odnotowano we wszystkich trzech liniach *pep444c*. Spodziewano się, że mutacje wprowadzone z wykorzystaniem CRISPR/Cas9 uniemożliwią powstanie funkcjonalnego peptydu, co z kolei uniemożliwi identyfikację z wykorzystaniem przeciwciała. Należy uwzględnić jednak, że w celu produkcji przeciwciała peptydowego skierowanego przeciwko fragmentowi PEP444c wykorzystano jedynie 13-aminokwasowy region znajdujący się na karboksylowym końcu peptydu. Przeprowadzona przez nas analiza wykazała, że region ten mapuje się do sekwencji aminokwasowych peptydów z wyprowadzonych linii transgenicznych. W konsekwencji, ocena ilości analizowanego peptydu u roślin transgenicznych jest niemożliwa z użyciem tego konkretnego przeciwciała (F2DAQ5). Do przyszłych analiz należałoby rozważyć wykorzystanie przeciwciała monoklonalnego lub wyprowadzenie roślin transgenicznych typu knock-out. W roślinach z wyprowadzonych linii transgenicznych zaobserwowano jednak istotny statystycznie spadek poziomu pri-miRNA444c, co sugeruje wpływ wprowadzonych w rejonie sekwencji kodującej PEP444c mutacji na akumulację pri-miRNA444c. Wynik ten skłonił nas do przeanalizowania poziomu dojrzałego mikroRNA444c.

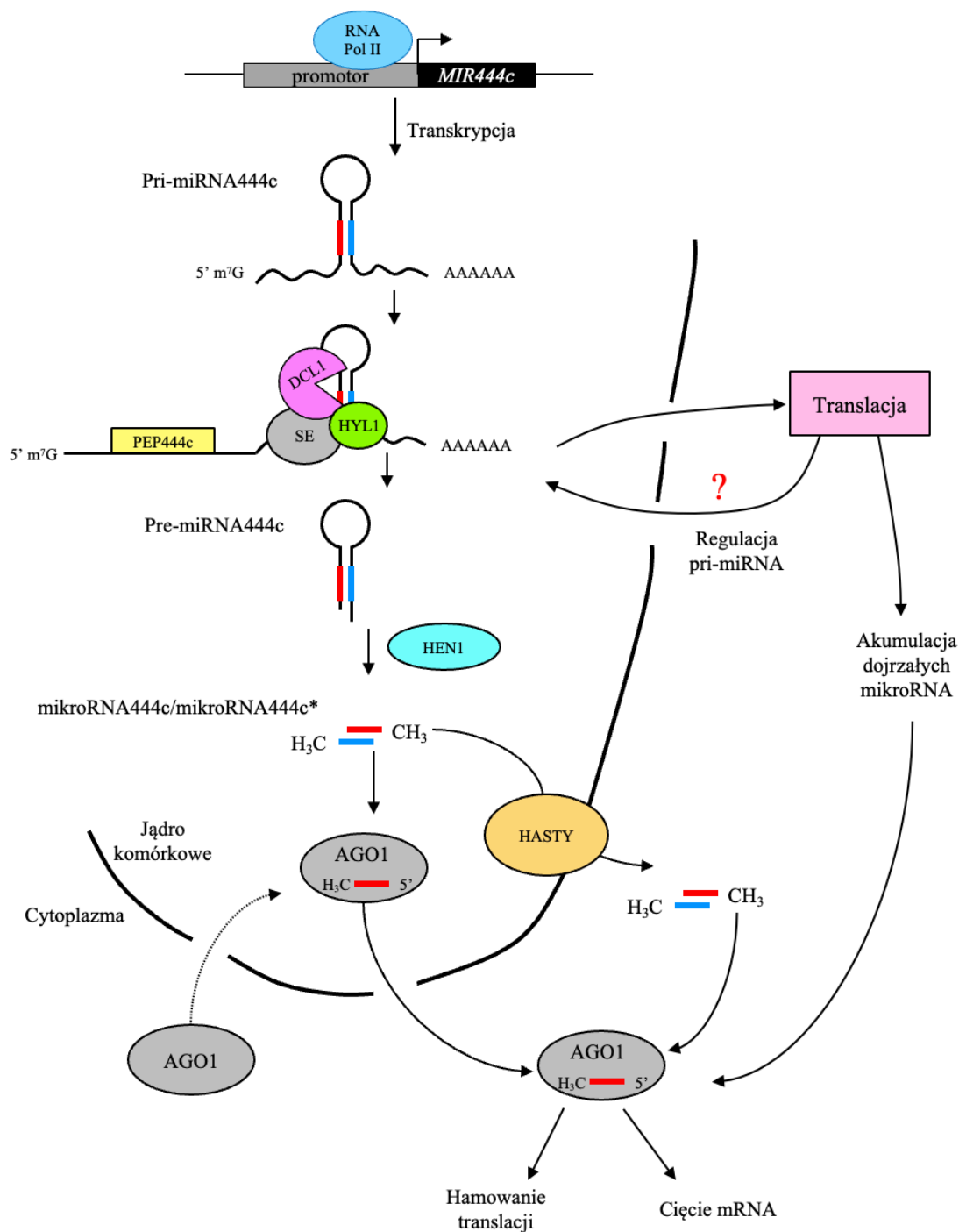
6.4. Znaczenie PEP444c w biogenezie mikroRNA444c

Dotychczasowe doniesienia literaturowe jasno wskazują, że peptydy kodowane przez geny *MIR* stymulują biogenezę odpowiadających im mikroRNA (Lauressergues i in., 2015; Couzigou i Combier, 2016; Chen i in., 2020, Sharma i in., 2020; Zhang i in., 2020). Z uzyskanych przez nas danych z eksperymentu głębokiego sekwencjonowania małych RNA wynika, że **poziom mikroRNA444c jest 5-krotnie obniżony w korzeniach roślin *pep444c-332.10***. Wynik ten sugeruje, że PEP444c ma istotny wpływ na akumulację mikroRNA444c.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazały również wzrost poziomu sześciu mikroRNA (bdi-miR444b; osa-miR827; bdi-miR166b-5p; hvu-miR5048a; bdi-miR156h-5p oraz ata-miR169j-3p) w korzeniach roślin *pep444c-332.10*. Odnotowano również wzrost poziomu jednego mikroRNA (bdi-miR156f-3p) oraz obniżenie poziomu jednego mikroRNA (ath-miR8175) w pędach *pep444c-332.10*. W przypadku osa-miR827, dane literaturowe wskazują, że cząsteczka ta reguluje poziom ekspresji genów *NLA* (*NITROGEN LIMITATION ADAPTATION*) oraz *PHT5* (*PHOSPHATE*

TRANSPORTER 5), zaangażowanych w regulację szlaków sygnałowych P_i u *Arabidopsis* i ryżu (Hsieh i in., 2009; Lin i in., 2010; Lin i in., 2018). Częsteczki bdi-miR156h-5p oraz bdi-miR156f-3p (ich poziom jest podwyższony u roślin *pep444c-332.10* odpowiednio w korzeniach i pędach) są z kolei homologami bardzo dobrze scharakteryzowanego mikroRNA156 u *Arabidopsis*. Dane literaturowe wskazują, że mikroRNA156 reguluje poziom ekspresji genów z rodziny *SPL* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE*), biorących udział we wzroście i rozwoju roślin (Yamasaki i in., 2004; Xing i in., 2010). Ponadto, mikroRNA156 oraz SPL3 pełnią istotną rolę w odpowiedzi na stres niedoboru P_i u *Arabidopsis* (Lei i in., 2016). Zahamowanie ekspresji mikroRNA156 u *Arabidopsis* prowadzi do osłabienia odpowiedzi na niedobór P_i (Lei i in., 2016). Interesującą obserwacją jest również to, że poziom mikroRNA444c spada w roślinach *pep444c-332.10* w przeciwieństwie do osa-miR827, bdi-miR156h-5p oraz bdi-miR156f-3p, zaangażowanych w regulację szlaków sygnałowych P_i . Doniesienia literaturowe wskazują natomiast na istotną rolę mikroRNA444c w odpowiedzi na P_i oraz NO_3^- u ryżu (Yan i in., 2014). Uzyskane przez nas wyniki mogą świadczyć o powiązaniu procesów regulacji szlaków sygnałowych NO_3^- , P_i , co pozostaje w zgodzie z innymi danymi literaturowymi (Wang i in., 2021).

Wyniki niniejszej pracy wskazują na zupełnie nową rolę pri-miRNA444 w jęczmieniu zwyczajnym. Zidentyfikowany przez nas PEP444c kodowany przez gen *MIR444c* w istotny sposób wpływa na akumulację mikroRNA444c w korzeniach jęczmienia. Nieznany jest jednak mechanizm kierowania pri-miRNA na drogę translacji oraz w jaki sposób PEP444c wpływa na biogenezę mikroRNA444c. Ze względu na rolę mikroRNA444c we wzroście i rozwoju roślin jak i na udział w ścieżkach sygnałowych NO_3^- , P_i , kluczowe jest przeprowadzenie dalszych eksperymentów w celu pogłębienia wiedzy w tej dziedzinie. Na podstawie wyników niniejszej rozprawy doktorskiej oraz dostępnych danych literaturowych można więc zaproponować model przedstawiający możliwy udział PEP444c kodowanego przez gen *MIR444c* w biogenezie mikroRNA (Ryc. 43).



Ryc. 43. Model przedstawiający udział peptydu kodowanego przez gen *MIR444c* w biogenezie mikroRNA444c. Pri-miRNA zawiera otwartą ramkę odczytu (ORF, PEP444c), która ulega translacji w cytoplazmie. Powstały w ten sposób peptyd kodowany przez gen *MIR444c* stymuluje biogenezę mikroRNA444c. Szczegóły tego mechanizmu nie są znane: być może PEP444c jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie może stymulować transkrypcję a tym samym biogenezę mikroRNA444c.

7. Wnioski

1. Geny *MIR444* w jęczmieniu charakteryzują się złożoną strukturą egzonowo-intronową.
2. Promotory genów *MIR444* zawierają liczne elementy regulatorowe związane z odpowiedzią na azot, światło, stres wysokiej temperatury i na miedź.
3. Pierwotne transkrypty genów *MIR444* zawierają otwarte ramki odczytu (ORFs) i wiążą się z rybosomami.
4. Gen *MIR444a* koduje PEP444a, zlokalizowany w pędach jęczmienia w warunkach stresu nadmiaru azotu.
5. Gen *MIR444c* koduje PEP444c, zidentyfikowany głównie w pędach i korzeniach jęczmienia zarówno w warunkach kontrolnych, jak i pod wpływem stresu nadmiaru azotu, ale głównie w pędach w warunkach kontrolnych.
6. Mutacje wprowadzone w rejonie sekwencji kodującej PEP444a mają efekt letalny.
7. Mutacje wprowadzone w obrębie sekwencji kodującej PEP444c wprowadzają przedwczesny kodon stop.
8. Linie transgeniczne *pep444c-332.10* ze zmienioną sekwencją aminokwasową PEP444c wykazują obniżony poziom mikroRNA444c w korzeniach.

Aneks sekwencji nukleotydowych pri-miRNA444

Poniżej przedstawiono sekwencje nukleotydowe zidentyfikowanych pri-miRNA444. Sekwencje egzonów, w przeciwieństwie do intronów, zaznaczono kolorami. Pogrubioną czcionką zaznaczono sekwencje mikroRNA* i mikroRNA.

Pri-miRNA444a

(A)

```
ATCAGCGCTCGCTCGCACGCACCAACCCAACCCAACCCAACCCTACCCTACTCCGTTCCG
CGCCCGGTTGGTGGCTGGAGCCCGCGGAGGACTCGAGAATATCTGATGCTTATGGTCTG
TCGCTTGGCCAGATACGCATGTGGCGGCACCAAGCATGAGGCAACAACTGCAGTACTTGG
TGGGGAAGGCACAAGTAGGACACCAACATTACCTGCAAGCAAGACGCAAAATTAATAGA
ACATCACCATACTTGTGGCTTTCTTGCAAGTCGTGCAGTTGCTGCCTCAAGCTTGCTGC
CTCCCTTTGCCAAAGCTATCAGAAAAAACATAAAGTTGTGTTGTGTTAGTTTCCCTAA
ACTGTAACACATGTTTTACAAATTGATCTAGAAATGATTGGCTCACTGTTAATTTAAAC
CAATAATTACTCGATAACTGCATATGCACATGTTATGGAAGTAAGGCGGTAGAATACTT
ATGTTTTCATCTACTGGCAGGTAGCAACACGTATAGGTATATCACTCTGATTTGAATTA
AGGTCCAAACATTCAGAAGTCTTACTTTGCTGGCACATCCCATCGGTGAAATTACATA
TAGTTTTATGTACAGAGTACTCTCAGGGTTTGGATTCAAATATTTTGGTGA AACAGAA
TTACTGCTGTAATAATTTTAGAAATATTATGCATACAGGATTTTTGGCAATCACGAGAC
AGGACATCATGTGATGTGATGTGATGGTGC GGCTGCACACCTATAAGCCTTCACCTTGC
CCTTACCCTCTATTCTAACCATTTAAGTAATCCGAAGTACTGTTCAAGCCTTACTGTACAT
CAACATGGCCTCATCAAGTATTTGCATGATTCCTTTGGAAGAAAGACAACATAACTTTC
ATTTTAAGTCACTTCCCTCAGTCTTAGGCAGCTACTCCCTCCGATCCATATTACTTGT
CGCAGTTTAGTACAACTTCTTGGAAAGCTGGCGCAGCAGGTATACAGTCACCTTGCCTCG
CTGGGAAAAATAGGGAGGTAAGATACTTCAACAGAATCTGAGGTTCAGTATGTGTTGTG
CGCTAATTTTGGTGTCTTGTGCTACAGTATCTTCAGAGTAGCAGGGTGTAGCAGAAC
AGTGGAGCTCTTAAACAGGAGCTGCTGCGTCAAATGCTATGTATGTCCCAGGCTTGCAG
ATCTGCTTAAAGTCAAATATCTCATGTTTGGGCTCTGCTTCAGTCCTCACATTTTGC
AGTTCTACTCTTTGACTCGTCTAAATCAGCTATTGTGTCGTGATATCACTTCACAGGGT
CCCAACTTTGACTTTATTTTCGAACAAGAGGTGGGGTGGTGGCTGTTTCGTTGATGCCGA
GCCGCTGAAGTTTGGCTTCAGGAGGAAGGGTGAACGGAGTGTTCTTCTGGTTATTCCA
GTTACATGTACATGCCAAGTACCAGCTACCAAGGGGCATGTCTTCAGTCTTGAGTAAC
AAGCATGTTATTCCAAGCTGCCTGGCACTTTTGTACTAATAGAAATTCATTTATTTT
GTGTCCACTACACCAGCATGGTGCATTTAGAAAGGAAAATATTGAGAAGCTGCCTAACT
TAGGGTATGTCCAATAGTCTTATCTCAACCGTATGTAAGGATTGTTAGTTAGGAAAGAA
CAAGAAAGGAGAGCTATAGTTGTATGGAGCTGATGGTATTTTTGCTCTCGTCTCGTGTT
GCTGTAACTTGTACTCCCTTTGTAAAGAAATACAAAAGCGTTTGGATCAGTAATTTAG
ATCATGATCTAAATGCTCTTATATTTCTTCACGGAAGGAATATCT
```

(B)

```
ATCAGCGCTCGCTCGCACGCACCAACCCAACCCAACCCAACCCTACCCTACTCCGTTCCG
CGCCCGGTTGGTGGCTGGAGCCCGCGGAGGACTCGAGATACGCATGTGGCGGCACCAAG
CATGAGGCAACAACTGCAGTACTTGTGGGGAAGGCACAAGTAGGACACCAACATTACCT
GCGAGCAAGACGCAAAATTAATAGAACATCACCATACTTGTGGCTTTCTTGCAAGTCGT
GCAGTTGCTGCCTCAAGCTTGCTGCCTCCCTTTGCCAAAGCTATCAGAAAAAACATAA
AGTTGTGTTGTGTTAGTTTCCCTAAACTGTAACACATGTTTTACAAATTGATCTAGAAA
TGATTGGCTCACTGTTAATTTAAACCAATAATACTCGATAACTGCATATGCACATGTT
```

ATGGAAGTAAGGCGGTAGAATACTTATGTTTTTCATCTACTGGCAGGTAGCAACACGTAT
AGGTATATCACTCTGATTTGAATTAAGGTCCAAACATTCAGAAGTCTTACTTTGCTGG
CACATCCCATCGGTGAAATTACATATAGGTTTATGTACAGAGTACTCTCAGGGTTTGGGA
TTCAAATATTTTGGTGAAAACAGAATTACTGCTGTAATAATTTTAGAAATATTATGCAT
ACAGGATTTTTGGCAATCACGAGACAGGACATCATGTGATGTGATGTGATGGTGCGGCT
GCACACCTATAAGCCTTCACCTTGCCCTTACCCTCTATTCTAACCATTTAAGTAATCCG
AACTAGTTCAAGCCTTACTGTACATCAACATGGCCTCATCAAGTATTTGCATGATTCCCT
TTGGAAGAAAGACAACATAACTTTTCATTTTAAAGTCACTTCCCCTCAGTCTTAGGCAGCT
ACTCCCTCCGATCCATATTACTTGTTCGCAGTTTAGTACAACCTTCTTGGAAGCTGGCGCA
GCAGGTATACAGTACCTTGCCCTCGCTGGGAAAAATAGGGAGGTAAGATACTTCAACAG
AATCTGAGGTTTCAAGTATGTGTTGTGCGCTAATTTTGGTTGTCCTTGTGCTACAGTATCT
TCAGAGTAGCAGGGTGTAGCAGAACAGTGGAGCTCTTAAACAGGAGCTGCTGCGTCAAA
TGCTATGGTCCCAACTTTGACTTTATTTTTCGAACAAGAGGTGGGGTGGTGGCTGTTTCGT
TGATGCCGAGCCGCTGAAGTTTGGCTTCAGGAGGAAGGGTGCAACGGAGTGTCTTCTG
GTTATTCCAGTTACATGTACATGCCCAAGTACCAGCTACCAAGGGGCATGTCTTCAGTC
TTGAGTAACAAGCATGTTATTCCAAAGCTGCCTGGCACTTTTGTACTAATAGAAATTC
TTTATTTTTGTGTCCACTACACCAGCATGGTGCAATTTAGAAGGAAAAATATTGAGAAGC
TGCCTAACCTTAGGGTATGTCCAATAGTCTTATCTCAACCGTATGTAAGGATTGTTAGTT
AGGAAAGAACAAGAAAGGAGAGCTATAGTTGTATGGAGCTGATGGTATTTTTGCTCTCG
TCTCGTGTGTCTGTAACCTTGTACTCCCTTTGTAAAGAAATACAAAAGCGTTTGGATCA
GTAATTTAGATCATGATCTAAATGCTCTTATATTTCTTCACGGAAGGAATATCT

(C)

ATCAGCGCTCGCTCGCACGCACCAACCCAACCCAACCCAACCCTACCCTACTCCGTTCG
CGCCCGGTGGTGGCTGGAGCCCGCGGAGGACTCGAGATACGCATGTGGCGGCACCAAG
CATGAGGCAACAACCTGCAGTACTTGTGGGGAAGGCACAAGTAGGACACCAACATTACCT
GCAAGCAAGACGCAAAATTAATAGAACATCACCATACTTGTGGCTTTCTTGCAAGTCGT
GCAGTTGCTGCCTCAAGCTTGCTGCCTCCCTTTGCCAAAGCTATCAGAAAAAACATAA
AGTTGTGTTGTGTTAGTTTCCCTAAACTGTAACACATGTTTTACAAATTGATCTAGAAA
TGATTGGCTCACTGTTAATTTAAACCAATAAATTACTCGATAACTGCATATGCACATGTT
ATGGAAGTAAGGCGGTAGAATACTTATGTTTTTCATCTACTGGCAGGTAGCAACACGTAT
AGGTATATCACTCTGATTTGAATTAAGGTCCAAACATTCAGAAGTCTTACTTTGCTGG
CACATCCCATCGGTGAAATTACATATAGGTTTATGTACAGAGTACTCTCAGGGTTTGGGA
TTCAAATATTTTGGTGAAAACAGAATTACTGCTGTAATAATTTTAGAAATATTATGCAT
ACAGGATTTTTGGCAATCACGAGACAGGACATCATGTGATGTGATGTGATGGTGCGGCT
GCACACCTATAAGCCTTCACCTTGCCCTTACCCTCTATTCTAACCATTTAAGTAATCCG
AACTAGTTCAAGCCTTACTGTACATCAACATGGCCTCATCAAGTATTTGCATGATTCCCT
TTGGAAGAAAGACAACATAACTTTTCATTTTAAAGTCACTTCCCCTCAGTCTTAGGCAGCT
ACTCCCTCCGATCCATATTACTTGTTCGCAGTTTAGTACAACCTTCTTGGAAGCTGGCGCA
GCAGGTATACAGTACCTTGCCCTCGCTGGGAAAAATAGGGAGTATCTTCAGAGTAGCAG
GGTGTAGCAGAACAGTGGAGCTCTTAAACAGGAGCTGCTGCGTCAAAATGCTATGGTCCC
AACTTTGACTTTATTTTTCGAACAAGAGGTGGGGTGGTGGCTGTTTCGTTGATGCCGAGCC
GCTGAAGTTTGGCTTCAGGAGGAAGGGTGCAACGGAGTGTCTTCTGTTATTCCAGTT
ACATGTACATGCCCAAGTACCAGCTACCAAGGGGCATGTCTTCAGTCTTGAGTAACAAG
CATGTTATTCCAAAGCTGCCTGGCACTTTTGTACTAATAGAAATTCATTTATTTTTGTG
TCCACTACACCAGCATGGTGCAATTTAGAAGGAAAAATATTGAGAAGCTGCCTAACTTAG
GGTATGTCCAATAGTCTTATCTCAACCGTATGTAAGGATTGTTAGTTAGGAAAGAACA
GAAAGGAGAGCTATAGTTGTATGGAGCTGATGGTATTTTTGCTCTCGTCTCGTGTGTC
TGTAACCTTGTACTCCCTTTGTAAAGAAATACAAAAGCGTTTGGATCAGTAATTTAGATC
ATGATCTAAATGCTCTTATATTTCTTCACGGAAGGAATATCT

(D)

ATCAGCGCTCGCTCGCACGCACCAACCCAACCCAACCCAACCCCTACCCTACTCCGTTCCG
CGCCCGGTTGGTGGCTGGAGCCCGCGGAGGACTCGAGAATATCTGATGCTTATGGTCTG
TCGCTTGGCCAGATACACATGTGGCGGCACCA**AGCATGAGGCAACA**ACTGCAGTACTTG
TGGGGAAGGCACAAGTAGGACACCAACATTACCTGCAAGCAAGACGCAA**AATTA**ATAGA
ACATCACCATACTTGTGGCTTTCTTGCAAGT**CGTGCAGTTGCTGCCTCAAGCTT**GCTGC
CTCCCTTTGCCAAAGCTATCAGAAAAAACATAAA**GTTGTGTTGTGTTAGTTT**CCCTAA
ACTGTAACACATGTTTTACAAATTGATCTAGAAATGATTGGCTCACTGTTAATTTAAAC
CAATAATTACTCGATAACTGCATATGCACATGTTATGGAAGTAAGGCGGTAGAATACTT
ATGTTTTTCATCTACTGGCAGGTAGCAACACGTATAGGTATATCACTCTGATTTGAATTA
AGGTCCAAACATTCAGA**ACTGCTTACTTTGCTGGCACATCCCATCGGTGAAATTACATA**
TAGGTTTATGTACAGAGTACTCTCAGGGTTTGGATTCAAATATTTTGGTGA**AAACAGAA**
TTACTGCTGTAATAATTTTAGAAATATTATGCATACAGGATTTTTGGCAATCAGGAGAC
AGGACATCATGTGATGTGATGTGATGGTGC**GGCTGCACACCTATAAGCCTTCACCTTGC**
CCTTACCCTCTATTCTAACCATTTAAGTAATCCGA**ACTAGTTCAAGCCTTACTGTACAT**
CAACATGGCCTCATCAAGTATTTGCATGATTCCTTTGGAAGAAAGACAACATAACTTTC
ATTTTAAGTCACTTCCCTCAG**TCTTAGGCAGCTACTCCCTCCGATCCATATTACTTGT**
CGCAGTTTAGTACA**ACTTCTTGGAAGCTGGCGCAGCAGGTATACAGTCACCTTGCCTCG**
CTGGGAAAAATAGGGAG**TATCTTCAGAGTAGCAGGGTGTAGCAGAACAGTGGAGCTCTT**
AAACAGGAGCTGCTGCGTCAAATGCTATGGTCCCAACTTTGACTTTATTTTCGAACAAG
AGGTGGGGTGGTGGCTGTT**CGTTGATGCCGAGCCGCTGAAGTTTGGCTTCAGGAGGAAG**
GGTGCAACGGAGTGT**TCTTCTGTTATTCCAGTTACATGTACATGCCAAGTACCAGCT**
ACCAAGGGGCATGTCTT**CAGTCTTGAGTAACAAGCATGTTATTCCAAAGCTGCCTGGCA**
CTTTTGTACTAATAGAAATTCATTTATTTTGTGTCCACTACACCAGCATGGT**GCAATT**
TAGAAGGAAAATATTGAGAAGCTGCCTAACTTAGGGTATGTCCAATAGTCTTATCTCAA
CCGTATGTAAGGATTGTTAGTTAGGAAAGAACAAGAAAGGAGAGCTATAGTTGTATGGA
GCTGATGGTATT

(E)

ATCAGCGCTCGCTCGCACGCACCAACCCAACCCAACCCAACCCCTACCCTACTCCGTTCCG
CGCCCGGTTGGTGGCTGGAGCCCGCGGAGGACTCGAGATACGCATGTGGCGGCACCA**AG**
CATGAGGCAACAACTGCAGTACTTGTGGGGAAGGCACAAGTAGGACACCAACATTACCT
GCGAGCAAGACGCAA**AATTA**ATAGAACATCACCATACTTGTGGCTTTCTTGCAAGT**CGT**
GCAGTTGCTGCCTCAAGCTTGCTGCCTCCCTTTGCCAAAGCTATCAGAAAAAACATAA
ATCTTAGGCAGCTACTCCCTCCGATCCATATTACTTGT**CGCAGTTTAGTACA**ACTTCTT
GGAAGCTGGCGCAGCAGGTATACAGTCACCTTGCCTCGCTGGGAAAAATAGGGAG**TATC**
TTCAGAGTAGCAGGGTGTAGCAGAACAGTGGAGCTCTTAAACAGGAGCTGCTGCGTCAA
ATGCTATGGTCCCAACTTTGACTTTATTTTCGAACAAGAGGTGGGGTGGTGGCTGTT**CG**
TTGATGCCGAGCCGCTGAAGTTTGGCTTCAGGAGGAAGGGTGCACCGGAGTGT**TCTTCT**
GGTTATTCCAGTTACATGTACATGCCAAGTACCAGCTACCAAGGGGCATGTCTT**CAGT**
CTTGAGTAACAAGCATGTTATTCCAAAGCTGCCTGGCACTTTTGTACTAATAGAAATTC
ATTTATTTTGTGTCCACTACACCAGCATGGT**GCAATTTAGAAGGAAAATATTGAGAAG**
CTGCCTAACTTAGGGTATGTCCAATAGTCTTATCTCAACCGTATGTAAGGATTGTTAGT
TAGGAAAGAACAAGAAAGGAGAGCTATAGTTGTATGGAGCTGATGGTATTTTTGCTCTC
GTCTCGTGTGTCTGTA**ACTTGTACTCCCTTTGTA**AAGAAATACAAAAGCGTTTGGATC
AGTAATTTAGATCATGATCTAAATGCTCTTATATTTCTT**CACGGAAGGAATATCT**

(F)

ATCAGCGCTCGCTCGCACGCACCAACCCAACCCAACCCAACCCTACCCTACTCCGTTCCG
CGCCCGGTTGGTGGCTGGAGCCCGCGGAGGACTCGAGGATTTTTGGCAATCACGAGACA
GGACATCATGTGATGTGATGTGATGGTGCGGCTGCACACCTATAAGCCTTCACCTTGCC
CTTACCCTCTATTCTAACCATTTAAGTAATCCGAAGTAGTTCAAGCCTTACTGTACATC
AACATGGCCTCATCAAGTATTTGCATGATTCCTTTTGAAGAAAGACAACATAACTTTCA
TTTTAAGTCACTTCCCCTCAGTCTTAGGCAGCTACTCCCTCCGATCCATATTACTTGTC
GCAGTTTAGTACAACCTTCTTGAAGCTGGCGCAGCAGGTATACAGTCACCTTGCCTCGC
TGGGAAAAATAGGGAGTATCTTCAGAGTAGCAGGGTGTAGCAGAACAGTGGAGCTCTTA
AACAGGAGCTGCTGCGTCAAATGCTATGGTCCCAACTTTGACTTTATTTTCGAACAAGA
GGTGGGGTGGTGGCTGTTTCGTTGATGCCGAGCCGCTGAAGTTTGGCTTCAGGAGGAAGG
GTGCAACGGAGTGTTCTTCTGGTTATTCAGTTACATGTACATGCCCAAGTACCAGCTA
CCAAGGGGCATGTCTTCAGTCTTGAGTAACAAGCATGTTATTCCAAAGCTGCCTGGCAC
TTTTGTACTAATAGAAATTCATTTATTTTTGTGTCCACTACACCAGCATGGTGCAATTT
AGAAGGAAAATATTGAGAAGCTGCCTAACTTAGGGTATGTCCAATAGTCTTATCTCAAC
CGTATGTAAGGATTGTTAGTTAGGAAAGAACAAGAAAGGAGAGCTATAGTTGTATGGAG
CTGATGGTATTTTTGCTCTCGTCTCGTGTGTCTGTAAGTGTACTCCCTTTGTAAAGA
AATACAAAAGCGTTTGGATCAGTAATTTAGATCATGATCTAAATGCTCTTATATTTCTT
CACGGAAGGAATATCT

(G)

ATCAGCGCTCGCTCGCACGCACCAACCCAACCCAACCCAACCCTACCCTACCCCGTTCG
CGCCCGGTTGGTGGCTGGAGCCCGCGGAGGACTCGAGTTTAGTACAACCTTCTTGAAGC
TGGCGCAGCAGGTATACAGTCACCTTGCCTCGCTGGGAAAAATAGGGAGTATCTTCAGA
GTAGCAGGGTGTAGCAGAACAGTGGAGCTCTTAAACAGGAGCTGCTGCGTCAAATGCTA
TGGTCCCAACTTTGACTTTATTTTCGAACAAGAGGTGGGGTGGTGGCTGTTTCGTTGATG
CCGAGCCGCTGAAGTTTGGCTTCAGGAGGAAGGGTGCAACGGAGTGTTCTTCTGGTTAT
TCCAGTTACATGTACATGCCCAAGTACCAGCTACCAAGGGGCATGTCTTCAGTCTTGAG
TAACAAGCATGTTATTCCAAAGCTGCCTGGCACTTTTGTACTAATAGAAATTCATTTAT
TTTTGTGTCCACTACACCAGCATGGTGCAATTTAGAAGGAAAATATTGAGAAGCTGCCT
AACTTAGGGTATGTCCAATAGTCTTATCTCAACCGTATGTAAGGATTGTTAGTTAGGAA
AGAACAAGAAAGGAGAGCTATAGTTGTATGGAGCTGATGGTATT

(H)

ATCAGCGCTCGCTCGCACGCACCAACCCAACCCAACCCAACCCTACCCTACTCCGTTCCG
CGCCCGGTTGGTGGCTGGAGCCCGCGGAGGACTCGAGGGTCCCAACTTTGACTTTATTT
TCGAACAAGAGGTGGGGTGGTGGCTGTTTCGTTGATGCCGAGCCGCTGAAGTTTGGCTTC
AGGAGGAAGGGTGCAACGGAGTGTTCTTCTGGTTATTCAGTTACATGTACATGCCCAA
GTACCAGCTACCAAGGGGCATGTCTTCAGTCTTGAGTAACAAGCATGTTATTCCAAAGC
TGCTTGGCACTTTTGTACTAATAGAAATTCATTTATTTTTGTGTCCACTACACCAGCAT
GGTGCAATTTAGAAGGAAAATATTGAGAAGCTGCCTAACTTAGGGTATGTCCAATAGTC
TTATCTCAACCGTATGTAAGGATTGTTAGTTAGGAAAGAACAAGAAAGGAGAGCTATAG
TTGTATGGAGCTGATGGTATTTTTGCTCTCGTCTCGTGTGTCTGTAAGTGTACTCCC
TTTGTAAGAAAATACAAAAGCGTTTGGATCAGTAATTTAGATCATGATCTAAATGCTCT
TATATTTCTTCACGGAAGGAATATCT

Pri-miRNA444b

(A)

CTCCGACTTTTCTTTCCCTCGCCGAAAAACCAGCTCCAGGCTCCAGCAGTAGCCAGTAG
GCAACTTCCAATTTTCATTATACTATTGCTCCCGCTAGGGTTCCAGCCTCCTCCATGGAG
TCCTCGTCCGCTCGTAGATCCTTCACCAGCCGCCTTTTAGTTTTAGGTCCGCCTCTCCT
CCCGCAGCCGGGAGTGCTTGGTCTTGGGCGCGCCTGGCCGCCTGCATGCGCCGAGGGTT
TGAGTTATTGCATGTGGTGGCACCAAG**GCATGAGGCAACA**ACTGCATTACTTTCAAGGAA
GTTACAA**AATCTATGGGTCTTCATAATCGTGACTTTCTTGCAAGTTGTGCAGTTGCTGT**
CTCAAGCTTGCTGACTCCGTCTGCCAGACCGCAATGTGAAATAGGAAATTTAGTCAGTT
TTAGCGAATGAATGATCATAACGAATAAGTTTTGAGGAGACATTCGACTCTAAACTATTCA
CTCTTGTAATACTGGAAACATGGACCCATGGAGCATTCTTCACCGCGTCACCCCTCC
ACACCTTAAAAAGAACTCATTGAAGGCTAGTCCAGCCTCCCTGAAACTTACATTCACA
GACATTCTCAACTGAGATGAAGCCACAGATCTTTGTATGTTGTATGTGGACGAAGAACA
AACAGATTAACCTTGTTCACGTCCCTCCTCATGTACACTTGTAGTTCTATTCTAGGAT
TTCAACTCTGCACTCCATCTGCATCCTGAATATTCAGAGTCTCAAATTTGCACAACCTCT
CGATTTGATTAGTGAACAAGTCAATAAGATAGATTTTTGGTCGAGGATAGGTTGAATA
GGTCTGTACTTGCTTAATGATGCTATTCTTTGACTTTTGAGTATGGATGACACGCTGT
GTCAGTCTTTGATCAAAATGAGAAGATGCGTGATTGA

(B)

CTCCGACTTTTCTTTCCCTCGCCGAAAAACCAGCTCCAGGCTCCAGCAGTAGCCAGTAG
GCAACTTCCAATTTTCATTATACTATTGCTCCCGCTAGGGTTCCAGCCTCCTCCATGGAG
TCCTCGTCCGCTCGTAGATCCTTCACCAGCCGCCTTTTAGTTTTAGGTCCGCCTCTCCT
CCCGCAGCCGGGAGTGCTTGGTCTTGGGCGCGCCTGGCCGCCTGCATGCGCCGAGGGTT
TGAGTTATTGCATGTGGTGGCACCAAG**GCATGAGGCAACA**ACTGCATTACTTTCAAGGAA
GTTACAA**AATCTATGGGTCTTCATAATCGTGACTTTCTTGCAAGTTGTGCAGTTGCTGT**
CTCAAGCTTGCTGACTCCGTCTGCCAGACCGCAATGTGAAATAGGAAATTTAGTCAGGA
GATTTTGTAGGATGTTCCCTCCAATCGCTGAATCTGGAGCTAATGTGTACCCAGGTAAT
ACTGAAACATGGACCCATGGAGCATTCTTCACCGCGTCACCCCTCCACACCTTAAAA
AGAACTCATTGAAGGCTAGTCCAGCCTCCCTGAAACTTACATTCACAGACATTCTCAG
CTGAGATGAAGCCACAGATCTTTGTATGTTGTATGTGGACGAAGAACAACAGATTAAC
TCTTGTTACAGTCCCTCCTCATGTACACTTGTAGTTCTATTCTAGGATTTCAACTCTGC
ACTCCATCTGCATCCTGAATATTCAGGGTCTCAAATTTGCACAACCTCTCGATTTGATTC
GGTAAACAAGTCAATAAGATAGATTTTTGGTCGAGGATAGGTTGAATAGGTCTGTACTT
GCTTAATGATGCTATTCTTTGACTTTTGAGTATGGATGACACGCTGTGTGCTGCTTTG
ATCAAAATGAGAAGATGCGTGATTGA

(C)

CTCCGACTTTTCTTTCCCTCGCCGAAAAACCAGCTCCAGGCTCCAGCAGTAGCCAGTAG
GCAACTTCCAATTTTCATTATACTATTGCTCCCGCTAGGGTTCCAGCCTCCTTCATGGAG
TCCTCGTCCGCTCGTAGATCCTTCACCAGCCGCCTTTTAGTTTTAGGTCCGCCTCTCCT
CCCGCAGCCGGGAGTGCTTGGTCTTGGGCGCGCCTGGCCGCCTGCATGCGCCGAGGGTT
TGAGTTATTGCATGTGGTGGCACCAAG**GCATGAGGCAACA**ACTGCATTACTTTCAAGGAA
GTTACAA**AATCTATGGGTCTTCATAATCGTGACTTTCTTGCAAGTTGTGCAGTTGCTGT**
CTCAAGCTTGCTGACTCCGTCTGCCAGACCGCAATGTGAAATAGGAAATTTAGTCAGGT
TCTTTCTTTGACCAGCAAATCGTTTTTTCGGATGCATTAAGAAGTGTAAATACTGGA
AACATGGACCCATGGAGCATTCTTCACCGCGTCACCCCTCCACACCTTAAAAAGAACT
CATTGAAGGCTAGTCCAGCCTCCCTGAAACTTACATTCACAGACATTCTCAACTGAGA

TGAAGCCACAGATCTTTGTATGTTGTATGTGGACGAAGAACAACAGATTAACCTCTTGT
TCACGTCCCTCCTCATGTACACTTGTAGTTCTATTCTAGGATTTCAACTCTGCACTCCA
TCTGCATCCTGAATATTCAGAGTCTCAAATTTGCACAACCTCTCGATTTGATTCAGTGAA
CAAGTCAATAAGATAGATTTTTGGTCGAGGATAGGTTGAATAGGTCTGTACTTGCTTAA
TGATGCTATTCTTTTGACTTTTGAGTATGGATGACACGCTGTGTCAGTCTTTGATCAA
ATGAGAAGATGCGTGATTGA

(D)

CTCCGACTTTTCTTTCCCTCGCCGAAAAACCAGCTCCAGGCTCCAGCAGTAGCCAGTAG
GCAACTTCCAATTTTCATTATACTATTGCTCCCGCTAGGGTTCCAGCCTCCTTCATGGAG
TCCTCGTCCGCTCGTAGATCCTTCACCAGCCGCCTTTTAGTTTTAGGTCCGCCTCTCCT
CCCGCAGCCGGGAGTGCTTGGTCTTGGGCGCGCCTGGCCGCCTGCATGCGCCGAGGGTT
TGAGTTATTGCATGTGGTGGCACCAAG**GCATGAGGCAACA**ACTGCATTACTTTCAAGGAA
GTTACAA**AATCTATGGGTCTTCATAATCGTGACTTTCTTGCAAGTTGTGCAGTTGCTGT**
CTCAAGCTTGCTGACTCCGTCTGCCAGACCGCAATGTGAAATAGGAAATTTAGTCAGGT
AAATACTGGAAACATGGACCCATGGAGCATTTCCTCACC CGCTCACCCCTCCACACCTT
AAAAAGAACTCATTGGAAGGCTAGTCCAGCCTCCCTGAAACTTACATTCACAGACATTC
TCAACTGAGATGAAGCCACAGATCTTTGTATGTTGTATGTGGACGAAGAACAACAGAT
TAACCTTGTTCACGTCCCTCCTCATGTACACTTGTAGTTCTATTCTAGGATTTCAACT
CTGCACTCCATCTGCATCCTGAATATTCAGAGTCTCAAATTTGCACAACCTCTCGATTTG
ATTCAGTGAACAAGTCAATAAGATAGATTTTTGGTCGAGGATAGGTTGAATAGGTCTGT
ACTTGCTTAATGATGCTATTCTTTTGACTTTTGAGTATGGATGACACGCTGTGTCAGTC
TTTGATCAAATGAGAAGATGCGTGATTGA

(E)

CTCCGACTTTTCTTTCCCTCGCCGAAAAACCAGCTCCAGGCTCCAGCAGTAGCCAGTAG
GCAACTTCCAATTTTCATTATACTATTGCTCCCGCTAGGGTTCCAGCCTCCTTCATGGAG
TCCTCGTCCGCTCGTAGATCCTTCACCAGCCGCCTTTTAGTTTTAGGTCCGCCTCTCCT
CCCGCAGCCGGGAGTGCTTGGTCTTGGGCGCGCCTGGCCGCCTGCATGCGCCGAGGGTT
TGAG**G**TAAATACTGGAAACATGGACCCATGGAGCATTTCCTCACC CGCTCACCCCTCCA
CACCTTAAAAAGAACTCATTGGAAGGCTAGTCCAGCCTCCCTGAAACTTACATTCACAG
ACATTCTCAACTGAGATGAAGCCACAGATCTTTGTATGTTGTATGTGGACGAAGAACA
ACAGATTAACCTTGTTCACGTCCCTCCTCATGTACACTTGTAGTTCTATTCTAGGATT
TCAACTCTGCACTCCATCTGCATCCTGAATATTCAGAGTCTCAAATTTGCACAACCTCTC
GATTTGATTCAGTGAACAAGTCAATAAGATAGATTTTTGGTCGAGGATAGGTTGAATAG
GTCTGTACTTGCTTAATGATGCTATTCTTTTGACTTTTGAGTATGGATGACACGCTGTG
TCAGTCTTTGATCAAATGAGAAGATGCGTGATTGA

Pri-miRNA444c

(A)

GACACCCCGCAGAGCGCAGCCGGCGTCGCCTCCCAATGGCTGCCCCCGATCGGCAGTGG
CGGAGGTGCACCTGTCCGGGTGCGCGAAGCACCGCCACTGGAAAATGGCGCCCGGGCG
ACGTGGCCGGGCGAGGCACCGCTCGTCCGCCGCATATTCTACTCCCCACAAAAGGGCCC
AAACCCCACTTGCTCGCCCTCCGACCGAACCCGCCTCCACCTCCGCCCTACAAGAG
CACCACCGCCCCCGTCGCTTGCTCCCGCATCAATCGATCCGACCAAATCCAGCTCAA
TCCCTCGCCGCCTCGCCGTGCGCCGGCTGGTGCCCGCTGGCCCGCTCGTTCCTCTCGG
TTTCGGATCGGAGAGATCGATTTCCATGGCCCTGCCTTGTACAGTGGCTAGCTGCCGCT
TGCTGTCGCATCTGTGCAGCTGGTGCATGTTCCCCCTCCCAAATCGTAGTCGCCAATG
GCTCACAATTTGCCCATATCATTGCTCAGCCACCGCTCCCGTATCATCTGATGGCTTGC
TTTGGCCTTGATTGATTTTGGCGTCTACCCCGTCTAGGTTCTGCAAGTGGAGGCGGCAA
GCTAGAGACAGCAACTGCATAATTTGCAAGAAAATCGTTTTTCGGGCCATAACCGATGATT
TTCTTGCAAGTTGTGCAGTTGTTGCTCAAGCTTGCTGCCCTCCCTTGGCCAGAACTATG
GAATTCGAACCTACAATGAGCTCGGGAGCCAAAATGCCTCACTCGATTCACTTTATGGA
GGGAGTAAAACCTTTCAGAACATGGGCGCAGGAGGTTAGGATTCTGATAAGAGCTGTACGCACA
GAGCTCTTTCAAATGGTTTCTACAGGAGCATTCCCTACCACATTTGTTGTTTCTTCTTGGGCCAACATT
TGCATGGTCTTGCGACCTATAATCATTGAGGTTATTCTGTAAGTGCAGAATTTAGCAAAGTATTTGAGCC
TTCTTGTAGAAGGGACGACGACCTATCTTAAGTGGGAAAATACACTTGTGTTGGTTGATACTATTCTAGT
TGAGCTTTGATGTTTAGTTCTGTAGCTGTTCTGATGGGCCATTTGAATGTAAAACAAACGGCGCTGCAGA
CAGCGCAATCTTAGGTTACCTCAAATAAGCTTCAAGAGTCGAGTAAATTGCAGTTCAGCTTGATGCTCA
CGAACTGTAAGGCCATTTTGGTCAGCTTGATTAGTGTATATCTGTACAGGATTCTAATC

(B)

GACACCCCGCAGAGCGCAGCCGGCGTCGCCTCCCAATGGCTGCCCCCGATCGGCAGTGG
CGGAGGTGCACCTGTCCGGGTGCGCGAAGCACCGCCACTGGAAAATGGCGCCCGGGCG
ACGTGGCCGGGCGAGGCACCGCTCGTCCGCCGCATATTCTACTCCCCACAAAAGGGCCC
AAACCCCACTTGCTCGCCCTCCGACCGAACCCGCCTCCACCTCCGCCCTACAAGAG
CACCACCGCCCCCGTCGCTTGCTCCCGCATCAATCGATCCGACCAAATCCAGCTCAA
TCCCTCGCCGCCTCGCCGTGCGCCGGCTGGTGCCCGCTGGCCCGCTCGTTCCTCTCGG
TTTCGGATCGGAGAGATCGATTTCCATGGCCCTGCCTTGTACAGTGGCTAGCTGCCGCT
TGCTGTCGCATCTGTGCAGCTGGTGCATGTTCCCCCTCCCAAATCGTAGTCGCCAATG
GCTCACAATTTGCCCATATCATTGCTCAGCCACCGCTCCCGTATCATCTGATGGCTTGC
TTTGGCCTTGATTGATTTTGGCGTCTACCCCGTCTAGGCTTGCTGCCTCCCTTTGCCAG
AACTATGGAATTCGAACCTACAATGAGCTCGGGAGCCAAAATGCCTCACTCGATTCACT
TTATGGAGGGAGTAAAACCTTTCAGAACATGGGCGCAGGTACATGTTTCTTAGCTCCAT
TATTCCTTCTGAGCTGTCCTGTTGGTCTTACATTTTCAATTTTTTGTCTGA_gGTTCAAAGG
AGGTTAGGATTCTGATAAGAGCTGTACGCACAAGAGCTCTTTCAAATGGTTTCTTACA
GGAGCATTCTACCACATTTGTTGTTTCTTCTTGGGCCAACATTTGCATGGTCTTGCGA
CCTATAATCATTGAGGTTATTCTGTAAGTGCAGAATTTAGCAAAGTATTTGAGCCTTCT
TGTAGAAGGGACGACGACCTATCTTAAGTGGGAAAATACACTTGTGTTGGTTGATACTA
TTCTAGTTGAGCTTTGATGTTTAGTTCTGTAGCTGTTCTGATGGGCCATTTGAATGTAA
AACAAACGGCGCTGCAGACAGCGCAATCTTAGGTTACCTCAAATAAGCTTCAAGAGTC
GAGTAAATTGCAGTTCAGCTTGATGCTCACGAACTGTAAGGCCATTTTGGTCAGCTTGG
ATTCAGTTAGTAGTGTATATCTGTACAGGATTCTAATC

(C)

GACACCCCGCAGAGCGCAGCCGGCGTCGCCTCCCAATGGCTGCCCCCGATCGGCAGTGG
CGGAGGTGCACCTGTCCGGGTGCGCGAAGCACCGCCACTGGAAAATGGCGCCCGGGCG

ACGTGGCCGGGCGAGGCACCGCTCGTCCGCCGCATATTCTACTCCCCACAAAAGGGCCC
AAACCCCACTTGCTCGCCCTCCGACCGAACCCGCCTCCACCTTCGGCCCTACAAGAG
CACCACCGCCCCGTCGCTTGCTCCCGCATCAATCGATCCGACCAAATCCAGCTCAA
TCCCTCGCCGCCTCGCCGTGCGCCGGCTGGTGCCCGCTGGCCCGCCTCGTTCCTCTCGG
TTTCGGATCGGAGAGATCGATTTCCATGGCCCTGCCTTGTACAGTGGCTAGCTGCCGCT
TGCTGTGCGCATCTGTGCAGCTGGTGCATGTTCCCCCTCCCAAATCGTAGTCGCCAATG
GCTCACAAATTTGCCCATATCATTGCTCAGCCACCGCTCCCGTATCATCTGATGGCTTGC
TTTGGCCTTGATTGATTTTGGCGTCTACCCCGTCTAGGGTTTTTCGGGCCATACCGATGA
TTTTCTTGCAAGTTGTGCAGTTGTTGTCTCAAGCTTGCTGCCTCCCTTTGCCAGAATA
TGGAAATTCGAACTTACAATGAGCTCGGGAGCCAAAATGCCTCACTCGATTCACTTTATG
GAGGGAGTAAAACTTTCAGAACATGGGCGCAGGAGGTTAGGATTCTGATAAGAGCTGTA
CGCACAAGAGCTCTTTCAAATGGTTTCCTACAGGAGCATTCTACCACATTTGTTGTT
TCTTCTTGGGCCAACATTTGCATGGTCTTGCGACCTATAATCATTGAGGTTATTCTGTA
ACTGCAGAATTTAGCAAAGTATTTGAGCCTTCTTGTAGAAGGGACGACGACCTATCTTA
AGTGGGAAAATACACTTGTGTTGGTTGATACTATTCTAGTTGAGCTTTGATGTTTAGTT
CTGTAGCTGTTCTGATGGGCCATTTGAATGTAAAACAAACGGCGCTGCAGACAGCGCAA
TCTTAGGTTACCTCAAATAAGCTTCAAGAGTCGAGTAAATTGCAGTTCAGCTTGATGC
TCACGAACTGTAAGGCCATTTTGGTCAGCTTGATTGATTAGTAGTGTATATCTGT
CACGAGTTCTAATC

(D)

ATCAATCGATCCGACCAAATCCAGCTCAAATCCCTCGCCGCCTCGCCGTGCGCCGGCT
GGTGCCCGCTGGCCCGCCTCGTTCCTCTCGGTTTCGGATCGGAGAGATCGATTTCCATG
GCCCTGCCTTGTACAGTGGCTAGCTGCCGCTTGCTGTGCGCATCTGTGCAGCTGGTGCAT
GTTCCCCCTCCCAAATCGTAGTCGCCAATGGCTCACAAATTTGCCCATATCATTGCTCA
GCCACCGCTCCCGTATCATCTGATGGCTTGCTTTGGCCTTGATTGATTTTGGCGTCTAC
CCCGTCTAGGGTTTCAAGCTCAAGCTCCTCCGGGTCGGCGTTTCAGATGAGCTCGGGAG
CCAAAATGCCTCACTCGATTCACTTTATGGAGGGAGTAAAACTTTCAGAACATGGGCGC
AGGAGGTTAGGATTCTGATAAGAGCTGTACGCACAAGAGCTCCTTCAAATGGTTTCCT
ACAGGAGCATTCTACCACATTTGTTGTTTCTTCTTGGGCCAACATTTGCATGGTCTTG
CGACCTATAATCATTGAGGTTATTCTGTAAGTGCAGAAATTAACAAAGTATTTGAGCCT
TCTTGTAGAAGGGACGACGACCTATCTTAAGTGGGAAAATACACTTGTGTTGGTTGATA
CTACTCTAGTTGAGCTTTGATGTTTAGTTCTGTAGCTGTTCTGATGGGCCATTTGAATG
TAAAACAAACGGCGCTGCAGACAGCGCAATCTTAGGTTACCTCAAATAAGCTTCAAGA
GTCAGAGTAAATTGCAGTTCAGCTTGATGCTCATGAACTGTAAGGCCATTTTGGTCAGC
TTGATTGATTAGTAGTGTATATCTGTACGAGTTCTAATC

(E)

ATCAATCGATCCGACCAAATCCAGCTCAAATCCCTCGCCGCCTCGCCGTGCGCCGGCT
GGTGCCCGCTGGCCCGCCTCGTTCCTCTCGGTTTCGGATCGGAGAGATCGATTTCCATG
GCCCTGCCTTGTACAGTGGCTAGCTGCCGCTTGCTGTGCGCATCTGTGCAGCTGGTGCAT
GTTCCCCCTCCCAAATCGTAGTCGCCAATGGCTCACAAATTTGCCCATATCATTGCTCA
GCCACCGCTCCCGTATCATCTGATGGCTTGCTTTGGCCTTGATTGATTTTGGCGTCTAC
CCCGTCTAGGGTTTCAAGCTCAAGCTCCTCCGGGTCGGCGTTTCAGATGAGCTCGGGAG
CCAAAATGCCTCACTCGATTCACTTTATGGAGGGAGTAAAACTTTCAGAACATGGGCGC
AGGTACATGTTTCTTAGCTCCATTATTCTTCTGAGCTGTCCTGTTGGTCTTACATTT
CATTTTTTGTCTGAGGTTCAAAGGAGGTTAGGATTCTGATAAGAGCTGTACGCACAAGA
GCTCTTTCAAATGGTTTCCTACAGGAGCATTCTACCACATTTGTTGTTTCTTCTTGG
GCCAACATTTGCATGGTCTTGCGACCTATAATCATTGAGGTTATTCTGTAAGTGCAGAA
TTTAGCAAAGTATTTGAGCCTC

8. Literatura

1. Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*. 2003 Jan;15(1):63-78. doi: 10.1105/tpc.006130.
2. Aerts N, de Bruijn S, van Mourik H, Angenent GC, van Dijk ADJ. Comparative analysis of binding patterns of MADS-domain proteins in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*. 2018 Jun 25;18(1):131. doi: 10.1186/s12870-018-1348-8.
3. Ahmadi F, Akmar Abdullah SN, Kadkhodaei S, Ijab SM, Hamzah L, Aziz MA, Rahman ZA, Rabiah Syed Alwee SS. Functional characterization of the gene promoter for an *Elaeis guineensis* phosphate starvation-inducible, high affinity phosphate transporter in both homologous and heterologous model systems. *Plant Physiol Biochem*. 2018 Jun; 127:320-335. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.04.004.
4. Arora R, Agarwal P, Ray S, Singh AK, Singh VP, Tyagi AK, Kapoor S. MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics*. 2007 Jul 18; 8:242. doi: 10.1186/1471-2164-8-242.
5. Bai H, Euring D, Volmer K, Janz D, Polle A. The nitrate transporter (NRT) gene family in poplar. *PLoS One*. 2013 Aug 19;8(8): e72126. doi: 10.1371/journal.pone.0072126.
6. Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol*. 1994 Mar;24(5):701-13. doi: 10.1007/BF00029852.
7. Barciszewska-Pacak M, Milanowska K, Knop K, Bielewicz D, Nuc P, Plewka P, Pacak AM, Vazquez F, Karlowski W, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. *Arabidopsis* microRNA expression regulation in a wide range of abiotic stress responses. *Front Plant Sci*. 2015 Jun 4;6:410. doi: 10.3389/fpls.2015.00410.

8. Bari R, Datt Pant B, Stitt M, Scheible WR. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* 2006 Jul;141(3):988-99. doi: 10.1104/pp.106.079707.
9. Bate N, Twell D. Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol.* 1998 Jul;37(5):859-69. doi: 10.1023/a:1006095023050.
10. Baumberger N, Baulcombe DC. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 16;102(33):11928-33. doi: 10.1073/pnas.0505461102.
11. Belity T, Horowitz M, Hoffman JR, Epstein Y, Bruchim Y, Todder D, Cohen H. Heat-Stress Preconditioning Attenuates Behavioral Responses to Psychological Stress: The Role of HSP-70 in Modulating Stress Responses. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 8;23(8):4129. doi: 10.3390/ijms23084129.
12. Bielewicz D, Kalak M, Kalyna M, Windels D, Barta A, Vazquez F, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A. Introns of plant pri-miRNAs enhance miRNA biogenesis. *EMBO Rep.* 2013 Jul;14(7):622-8. doi: 10.1038/embor.2013.62.
13. Bologna NG, Iselin R, Abriata LA, Sarazin A, Pumplin N, Jay F, Grentzinger T, Dal Peraro M, Voinnet O. Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Mol Cell.* 2018 Feb 15;69(4):709-719.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.007.
14. Buchel AS, Brederode FT, Bol JF, Linthorst HJ. Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Mol Biol.* 1999 Jun;40(3):387-96. doi: 10.1023/a:1006144505121.
15. Buhtz A, Pieritz J, Springer F, Kehr J. Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biol.* 2010 Apr 13;10:64. doi: 10.1186/1471-2229-10-64.
16. Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J.* 2008 Mar;53(5):739-49. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03368.x.
17. Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN. Cell signalling by

- microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*. 2010 May 20;465(7296):316-21. doi: 10.1038/nature08977.
18. Chen K, Song M, Guo Y, Liu L, Xue H, Dai H, Zhang Z. MdMYB46 could enhance salt and osmotic stress tolerance in apple by directly activating stress-responsive signals. *Plant Biotechnol J*. 2019 Dec;17(12):2341-2355. doi: 10.1111/pbi.13151.
 19. Chen QJ, Deng BH, Gao J, Zhao ZY, Chen ZL, Song SR, Wang L, Zhao LP, Xu WP, Zhang CX, Ma C, Wang SP. A miRNA-Encoded Small Peptide, vvi-miPEP171d1, Regulates Adventitious Root Formation. *Plant Physiol*. 2020 Jun;183(2):656-670. doi: 10.1104/pp.20.00197.
 20. Chen X, Rechavi O. Plant and animal small RNA communications between cells and organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022 Mar;23(3):185-203. doi: 10.1038/s41580-021-00425-y.
 21. Cheng H, Hao M, Wang W, Mei D, Tong C, Wang H, Liu J, Fu L, Hu Q. Genomic identification, characterization and differential expression analysis of SBP-box gene family in *Brassica napus*. *BMC Plant Biol*. 2016 Sep 8;16(1):196. doi: 10.1186/s12870-016-0852-y.
 22. Combier JP, Andre O. Novel method for promoting nodulation in plants, in: U.S. Patent Application, 2018, 15/559,846.
 23. Combier JP, Laures-sergues D, Becard G, Use of micropeptides for promoting plant growth, U.S. Patent 10 (2020) 563,214.
 24. Couzigou JM, Combier JP. Plant microRNAs: key regulators of root architecture and biotic interactions. *New Phytol*. 2016 Oct;212(1):22-35. doi: 10.1111/nph.14058.
 25. Deb A, Kundu S. Deciphering Cis-Regulatory Element Mediated Combinatorial Regulation in Rice under Blast Infected Condition. *PLoS One*. 2015 Sep 1;10(9):e0137295. doi: 10.1371/journal.pone.0137295.
 26. Deng Z, Wu H, Li D, Li L, Wang Z, Yuan W, Xing Y, Li C, Liang D. Root-to-Shoot Long-Distance Mobile miRNAs Identified from *Nicotiana* Rootstocks. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 26;22(23):12821. doi: 10.3390/ijms222312821.
 27. Devers EA, Branscheid A, May P, Krajinski F. Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular

- mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 2011 Aug;156(4):1990-2010. doi: 10.1104/pp.111.172627.
28. Eamens AL, Smith NA, Curtin SJ, Wang MB, Waterhouse PM. The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA.* 2009 Dec;15(12):2219-35. doi: 10.1261/rna.1646909.
 29. Engstrom EM, Andersen CM, Gumulak-Smith J, Hu J, Orlova E, Sozzani R, Bowman JL. *Arabidopsis* homologs of the petunia hairy meristem gene are required for maintenance of shoot and root indeterminacy. *Plant Physiol.* 2011 Feb;155(2):735-50. doi: 10.1104/pp.110.168757.
 30. Filleur S, Daniel-Vedele F. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta.* 1999 Jan;207(3):461-9. doi: 10.1007/s004250050505.
 31. Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell.* 2002;14 Suppl (Suppl):S15-45. doi: 10.1105/tpc.010441.
 32. Galperin MY. Conserved 'hypothetical' proteins: new hints and new puzzles. *Comp Funct Genomics.* 2001;2(1):14-8. doi: 10.1002/cfg.66.
 33. Garfinkel M and Nester EW. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *Journal of Bacteriology* 1980; 144, 732-743.
 34. Gołda S, Kucharzewska P, Cisowski J, Florczyk U, Zagórska A, Jaźwa A, Łoboda A, Józkowicz A, Dulak J. Regulacja ekspresji genów w wektorach plazmidowych: system zależny od doksycykliny i regulowany przez niedotlenienie. *Biotechnol.*, 2007; 3: 82-97
 35. Gowik U, Burscheidt J, Akyildiz M, Schlue U, Koczor M, Streubel M, Westhoff P. cis-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Plant Cell.* 2004 May;16(5):1077-90. doi: 10.1105/tpc.019729.
 36. Grabowska A, Smoczyńska A, Bielewicz D, Pacak A, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. Barley microRNAs as metabolic sensors for soil nitrogen availability. *Plant Sci.* 2020 Oct; 299:110608. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110608.

37. Guo C, Spinelli M, Liu M, Li QQ, Liang C. A Genome-wide Study of "Non-3UTR" Polyadenylation Sites in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep*. 2016 Jun 15;6:28060. doi: 10.1038/srep28060.
38. Guo S, Xu Y, Liu H, Mao Z, Zhang C, Ma Y, Zhang Q, Meng Z, Chong K. The interaction between OsMADS57 and OsTB1 modulates rice tillering via DWARF14. *Nat Commun*. 2013;4:1566. doi: 10.1038/ncomms2542.
39. Hisano H, Hoffie RE, Abe F, Munemori H, Matsuura T, Endo M, Mikami M, Nakamura S, Kumlehn J, Sato K. Regulation of germination by targeted mutagenesis of grain dormancy genes in barley. *Plant Biotechnol J*. 2022 Jan;20(1):37-46. doi: 10.1111/pbi.13692.
40. Heuermann D, Hahn H, Von Wiren N. Seed yield and nitrogen efficiency in oilseed rape after ammonium nitrate or urea fertilization. *Front Plant Sci*. (2021); (11): 608785.
41. Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*. 1999 Jan 1;27(1):297-300. doi: 10.1093/nar/27.1.297.
42. Hoffie RE, Otto I, Hisano H, Kumlehn J. Site-Directed Mutagenesis in Barley Using RNA-Guided Cas Endonucleases During Microspore-Derived Generation of Doubled Haploids. *Methods Mol Biol*. 2021;2287:199-214. doi: 10.1007/978-1-0716-1315-3_9.
43. Hoffie RE, Perovic D, Habekuß A, Ordon F, Kumlehn J. Novel resistance to the Bymovirus BaMMV established by targeted mutagenesis of the PDIL5-1 susceptibility gene in barley. *Plant Biotechnol J*. 2022 Oct 11. doi: 10.1111/pbi.13948.
44. Hiraguri A, Itoh R, Kondo N, Nomura Y, Aizawa D, Murai Y, Koiwa H, Seki M, Shinozaki K, Fukuhara T. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 2005 Jan;57(2):173-88. doi: 10.1007/s11103-004-6853-5.
45. Hsieh LC, Lin SI, Shih AC, Chen JW, Lin WY, Tseng CY, Li WH, Chiou TJ. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol*. 2009 Dec;151(4):2120-32. doi: 10.1104/pp.109.147280.

46. Hudson ME, Quail PH. Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol.* 2003 Dec;133(4):1605-16. doi: 10.1104/pp.103.030437.
47. Hwang SH, Lee IA, Yie SW, Hwang DJ. Identification of an OsPR10a promoter region responsive to salicylic acid. *Planta.* 2008 Apr;227(5):1141-50. doi: 10.1007/s00425-007-0687-8.
48. Hwang YS, Karrer EE, Thomas BR, Chen L, Rodriguez RL. Three cis-elements required for rice alpha-amylase Amy3D expression during sugar starvation. *Plant Mol Biol.* 1998 Feb;36(3):331-41. doi: 10.1023/a:1005956104636.
49. Ijaq J, Malik G, Kumar A, Das PS, Meena N, Bethi N, Sundararajan VS, Suravajhala P. A model to predict the function of hypothetical proteins through a nine-point classification scoring schema. *BMC Bioinformatics.* 2019 Jan 8;20(1):14. doi: 10.1186/s12859-018-2554-y.
50. Jiao X, Wang H, Yan J, Kong X, Liu Y, Chu J, Chen X, Fang R, Yan Y. Promotion of BR Biosynthesis by miR444 Is Required for Ammonium-Triggered Inhibition of Root Growth. *Plant Physiol.* 2020 Mar;182(3):1454-1466. doi: 10.1104/pp.19.00190.
51. Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell.* 2004 Jun 18;14(6):787-99. doi: 10.1016/j.molcel.2004.05.027.
52. Joshi CP. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucleic Acids Res.* 1987 Dec 10;15(23):9627-40. doi: 10.1093/nar/15.23.9627.
53. Julkowska M. Small But Powerful: MicroRNA-Derived Peptides Promote Grape Adventitious Root Formation. *Plant Physiol.* 2020 Jun;183(2):429-430. doi: 10.1104/pp.20.00515.
54. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 2019 Jul 19;20(4):1160-1166. doi: 10.1093/bib/bbx108.
55. Kaur A, Pati PK, Pati AM, Nagpal AK. In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and

- Oryza sativa*. PLoS One. 2017 Sep 14;12(9): e0184523. doi: 10.1371/journal.pone.0184523.
56. Kim SY, Chung HJ, Thomas TL. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J*. 1997 Jun;11(6):1237-51. doi: 10.1046/j.1365-313x.1997.11061237.x.
 57. Kim YJ, Zheng B, Yu Y, Won SY, Mo B, Chen X. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*. 2011 Mar 2;30(5):814-22. doi: 10.1038/emboj.2011.3.
 58. Kmiecik M, Simpson CG, Lewandowska D, Brown JW, Jarmolowski A. Cloning and characterization of two subunits of *Arabidopsis thaliana* nuclear cap-binding complex. *Gene*. 2002 Jan 23;283(1-2):171-83. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00859-9.
 59. Knop K, Stepień A, Barciszewska-Pacak M, Taube M, Bielewicz D, Michalak M, Borst JW, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. Active 5' splice sites regulate the biogenesis efficiency of *Arabidopsis* microRNAs derived from intron-containing genes. *Nucleic Acids Res*. 2017 Mar 17;45(5):2757-2775. doi: 10.1093/nar/gkw895.
 60. Kruszka K, Pacak A, Swida-Barteczka A, Stefaniak AK, Kaja E, Sierocka I, Karłowski W, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. Developmentally regulated expression and complex processing of barley pri-microRNAs. *BMC Genomics*. 2013 Jan 16;14:34. doi: 10.1186/1471-2164-14-34.
 61. Kuijter HNJ, Shirley NJ, Khor SF, Shi J, Schwerdt J, Zhang D, Li G, Burton RA. Transcript Profiling of MIKCC MADS-Box Genes Reveals Conserved and Novel Roles in Barley Inflorescence Development. *Front Plant Sci*. 2021 Sep 1;12:705286. doi: 10.3389/fpls.2021.705286.
 62. Kumlehn J, Pietralla J, Hensel G, Pacher M, Puchta H. The CRISPR/Cas revolution continues: From efficient gene editing for crop breeding to plant synthetic biology. *J Integr Plant Biol*. 2018 Dec;60(12):1127-1153. doi: 10.1111/jipb.12734.
 63. Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*. 2006 Feb;12(2):206-12. doi: 10.1261/rna.2146906.

64. Kurihara Y, Watanabe Y. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 24;101(34):12753-8. doi: 10.1073/pnas.0403115101.
65. Laubinger S, Sachsenberg T, Zeller G, Busch W, Lohmann JU, Ratsch G, Weigel D. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 24;105(25):8795-800. doi: 10.1073/pnas.0802493105.
66. Laressergues D, Couzigou JM, Clemente HS, Martinez Y, Dunand C, Bécard G, Combier JP. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature*. 2015 Apr 2;520(7545):90-3. doi: 10.1038/nature14346.
67. Laressergues D, Ormancey M, Guillotin B, San Clemente H, Camborde L, Duboé C, Tourneur S, Charpentier P, Barozet A, Jauneau A, Le Ru A, Thuleau P, Gervais V, Plaza S, Combier JP. Characterization of plant microRNA-encoded peptides (miPEPs) reveals molecular mechanisms from the translation to activity and specificity. *Cell Rep*. 2022 Feb 8;38(6):110339. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110339.
68. Lee S, Kim J, Son JS, Nam J, Jeong DH, Lee K, Jang S, Yoo J, Lee J, Lee DY, Kang HG, An G. Systematic reverse genetic screening of T-DNA tagged genes in rice for functional genomic analyses: MADS-box genes as a test case. *Plant Cell Physiol*. 2003 Dec;44(12):1403-11. doi: 10.1093/pcp/pcg156.
69. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.
70. Lei KJ, Lin YM, Ren J, Bai L, Miao YC, An GY, Song CP. Modulation of the Phosphate-Deficient Responses by MicroRNA156 and its Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 2016 Jan;57(1):192-203. doi: 10.1093/pcp/pcv197.
71. Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive Fd, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J*. 1999 Jun;18(5):509-19. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00480.x.
72. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol*. 2005 Aug 23;15(16):1501-7. doi: 10.1016/j.cub.2005.07.029.

73. Li J, Yuan J, Li M. Characterization of putative cis-regulatory elements in genes preferentially expressed in Arabidopsis male meiocytes. *Biomed Res Int*. 2014;2014:708364. doi: 10.1155/2014/708364.
74. Li LH, Guo N, Wu ZY, Zhao JM, Sun JT, Wang XT, Xing H. P1BS, a conserved motif involved in tolerance to phosphate starvation in soybean. *Genet Mol Res*. 2015 Aug 14;14(3):9384-94. doi: 10.4238/2015.August.14.2.
75. Li R, Liu C, Zhao R, Wang L, Chen L, Yu W, Zhang S, Sheng J, Shen L. CRISPR/Cas9-Mediated SINPR1 mutagenesis reduces tomato plant drought tolerance. *BMC Plant Biol*. 2019 Jan 22;19(1):38. doi: 10.1186/s12870-018-1627-4.
76. Li S, Liu L, Zhuang X, Yu Y, Liu X, Cui X, Ji L, Pan Z, Cao X, Mo B, Zhang F, Raikhel N, Jiang L, Chen X. MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell*. 2013 Apr 25;153(3):562-74. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.005.
77. Li YF, Zheng Y, Addo-Quaye C, Zhang L, Saini A, Jagadeeswaran G, Axtell MJ, Zhang W, Sunkar R. Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. *Plant J*. 2010 Jun 1;62(5):742-59. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04187.x.
78. Liang MH, Lu Y, Chen HH, Jiang JG. The salt-regulated element in the promoter of lycopene β -cyclase gene confers a salt regulatory pattern in carotenogenesis of *Dunaliella bardawil*. *Environ Microbiol*. 2017 Mar;19(3):982-989. doi: 10.1111/1462-2920.13539.
79. Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC, Chiou TJ. Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol*. 2008 Jun;147(2):732-46. doi: 10.1104/pp.108.116269.
80. Lin SI, Santi C, Jobet E, Lacut E, El Kholti N, Karlowski WM, Verdeil JL, Breitler JC, Périn C, Ko SS, Guiderdoni E, Chiou TJ, Echeverria M. Complex regulation of two target genes encoding SPX-MFS proteins by rice miR827 in response to phosphate starvation. *Plant Cell Physiol*. 2010 Dec;51(12):2119-31. doi: 10.1093/pcp/pcq170.
81. Lin WY, Lin YY, Chiang SF, Syu C, Hsieh LC, Chiou TJ. Evolution of microRNA827 targeting in the plant kingdom. *New Phytol*. 2018 Mar;217(4):1712-1725. doi: 10.1111/nph.14938.

82. Lips SH, Leidi EO, Silberbush M, Soares MIM, Lewis OEM. Physiological aspects of ammonium and nitrate fertilization. *Journal of Plant Nutrition*. (1990); (13):1271-1289. doi:10.1080/01904169009364151.
83. Liu H, Dong S, Gu F, Liu W, Yang G, Huang M, Xiao W, Liu Y, Guo T, Wang H, Chen Z, Wang J. NBS-LRR Protein Pik-H4 Interacts with OsBIHD1 to Balance Rice Blast Resistance and Growth by Coordinating Ethylene-Brassinosteroid Pathway. *Front Plant Sci*. 2017 Feb 6; 8:127. doi: 10.3389/fpls.2017.00127.
84. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*. 2002 Sep 20;297(5589):2053-6. doi: 10.1126/science.1076311.
85. Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt DD, Martin C, Clarke J. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep*. 2006 Oct;7(10):1052-8. doi: 10.1038/sj.embor.7400806.
86. Lu C, Jeong DH, Kulkarni K, Pillay M, Nobuta K, German R, Thatcher SR, Maher C, Zhang L, Ware D, Liu B, Cao X, Meyers BC, Green PJ. Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 25;105(12):4951-6. doi: 10.1073/pnas.0708743105.
87. Luo Q, Li Y, Gu H. et al. The promoter of soybean photoreceptor GmPLP1 gene enhances gene expression under plant growth regulator and light stresses. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 114, 109–119 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0310-6>
88. Lv S, Pan L, Wang G. Commentary: Primary Transcripts of microRNAs Encode Regulatory Peptides. *Front Plant Sci*. 2016 Sep 22; 7:1436. doi: 10.3389/fpls.2016.01436.
89. Makarevitch I, Thompson A, Muehlbauer GJ, Springer NM. Brd1 gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase. *PLoS One*. 2012;7(1): e30798. doi: 10.1371/journal.pone.0030798.
90. Mallory AC, Reinhart BJ, Jones-Rhoades MW, Tang G, Zamore PD, Barton MK, Bartel DP. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J*. 2004 Aug 18;23(16):3356-64. doi: 10.1038/sj.emboj.7600340.

91. Marco A. Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nat Protoc.* 2007;2(10):2632-9. doi: 10.1038/nprot.2007.400.
92. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal* 2011, 17.
93. Matsumoto T, Tanaka T, Sakai H, Amano N, Kanamori H, Kurita K, Kikuta A, Kamiya K, Yamamoto M, Ikawa H, Fujii N, Hori K, Itoh T, Sato K. Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant Physiol.* 2011 May;156(1):20-8. doi: 10.1104/pp.110.171579.
94. Megraw M, Baev V, Rusinov V, Jensen ST, Kalantidis K, Hatzigeorgiou AG. MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. *RNA.* 2006 Sep;12(9):1612-9. doi: 10.1261/rna.130506.
95. Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 2005 Jun;138(2):1083-96. doi: 10.1104/pp.104.058032.
96. Mustroph A, Juntawong P, Bailey-Serres J. Isolation of plant polysomal mRNA by differential centrifugation and ribosome immunopurification methods. *Methods Mol Biol.* 2009;553:109-26. doi: 10.1007/978-1-60327-563-7_6.
97. Morozov SY, Ryazantsev DY, Erokhina TN. Bioinformatics Analysis of the Novel Conserved Micropeptides Encoded by the Plants of Family Brassicaceae. *Journal of Bioinformatics and Systems Biology* 2 (2019): 066-077.
98. Nag A, King S, Jack T. miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 29;106(52):22534-9. doi: 10.1073/pnas.0908718106.
99. Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P. The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2006 Nov;18(11):2929-45. doi: 10.1105/tpc.106.045617.
100. Ormancey M, Le Ru A, Duboé C, Jin H, Thuleau P, Plaza S, Combiér JP. Internalization of miPEP165a into *Arabidopsis* Roots Depends on Both Passive Diffusion and Endocytosis-Associated Processes. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 25;21(7):2266. doi: 10.3390/ijms21072266.

101. Pandey A, Misra P, Bhambhani S, Bhatia C, Trivedi PK. Expression of Arabidopsis MYB transcription factor, AtMYB111, in tobacco requires light to modulate flavonol content. *Sci Rep.* 2014 May 21; 4:5018. doi: 10.1038/srep05018.
102. Pant BD, Musialak-Lange M, Nuc P, May P, Buhtz A, Kehr J, Walther D, Scheible WR. Identification of nutrient-responsive Arabidopsis and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol.* 2009 Jul;150(3):1541-55. doi: 10.1104/pp.109.139139.
103. Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 8;102(10):3691-6. doi: 10.1073/pnas.0405570102.
104. Patikoglou GA, Kim JL, Sun L, Yang SH, Kodadek T, Burley SK. TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev.* 1999 Dec 15;13(24):3217-30. doi: 10.1101/gad.13.24.3217.
105. Peng T, Lv Q, Zhang J, Li J, Du Y, Zhao Q. Differential expression of the microRNAs in superior and inferior spikelets in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot.* 2011 Oct;62(14):4943-54. doi: 10.1093/jxb/err205.
106. Piechulla B, Merforth N, Rudolph B. Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol.* 1998 Nov 1;38(4):655-62. doi: 10.1023/a:1006094015513.
107. Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant J.* 2001 Nov;28(4):455-64. doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.01166.x.
108. Punda I. Barley malt beer: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2009.
http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/tci/docs/AH3_BarleyMaltBeer.pdf.
Accessed 2009
109. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 2002 Jul 1;16(13):1616-26. doi: 10.1101/gad.1004402.

110. Reis RS, Hart-Smith G, Eamens AL, Wilkins MR, Waterhouse PM. Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins. *Nat Plants*. 2015 Feb 9; 1:14027. doi: 10.1038/nplants.2014.27.
111. Ren G, Chen X, Yu B. Uridylation of miRNAs by hen1 suppressor1 in *Arabidopsis*. *Curr Biol*. 2012 Apr 24;22(8):695-700. doi: 10.1016/j.cub.2012.02.052.
112. Rieping M, Schöffl F. Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhanced expression of chimaeric heat shock genes in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet*. 1992 Jan;231(2):226-32. doi: 10.1007/BF00279795.
113. Rodrigues JAS, Exploring the Potential of Newly-Identified miRNA-Encoded Peptides to Improve the Production of Bioactive Secondary Metabolites in Grape Cells, 2019 (Rozprawa doktorska).
114. Rogers HJ, Bate N, Combe J, Sullivan J, Sweetman J, Swan C, Lonsdale DM, Twell D. Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant Mol Biol*. 2001 Mar;45(5):577-85. doi: 10.1023/a:1010695226241.
115. Rogers K, Chen X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*. 2013 Jul;25(7):2383-99. doi: 10.1105/tpc.113.113159.
116. Sakai H, Aoyama T, Oka A. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J*. 2000 Dec;24(6):703-11. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00909.x.
117. Schilling S, Kennedy A, Pan S, Jermiin LS, Melzer R. Genome-wide analysis of MIKC-type MADS-box genes in wheat: pervasive duplications, functional conservation and putative neofunctionalization. *New Phytol*. 2020 Jan;225(1):511-529. doi: 10.1111/nph.16122.
118. Schilling S, Pan S, Kennedy A, Melzer R. MADS-box genes and crop domestication: the jack of all traits. *J Exp Bot*. 2018 Mar 24;69(7):1447-1469. doi: 10.1093/jxb/erx479.
119. Schwab R, Speth C, Laubinger S, Voinnet O. Enhanced microRNA accumulation through stemloop-adjacent introns. *EMBO Rep*. 2013 Jul;14(7):615-21. doi: 10.1038/embor.2013.58.
120. Segal P, Kruszka K, Szewc Ł, Szweykowska-Kulińska Z, Pacak A. Identification of transcription factors that bind to the 5'-UTR of the barley PHO2

- gene. *Plant Mol Biol*. 2020 Jan;102(1-2):73-88. doi: 10.1007/s11103-019-00932-9.
121. Sharma A, Badola PK, Bhatia C, Sharma D, Trivedi PK. Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in *Arabidopsis*. *Nat Plants*. 2020 Oct;6(10):1262-1274. doi: 10.1038/s41477-020-00769-x.
122. Sharma D, Tiwari M, Pandey A, Bhatia C, Sharma A, Trivedi PK. MicroRNA858 Is a Potential Regulator of Phenylpropanoid Pathway and Plant Development. *Plant Physiol*. 2016 Jun;171(2):944-59. doi: 10.1104/pp.15.01831.
123. Shin YK, Bhandari SR, Lee JG. Monitoring of Salinity, Temperature, and Drought Stress in Grafted Watermelon Seedlings Using Chlorophyll Fluorescence. *Front Plant Sci*. 2021 Dec 22;12:786309. doi: 10.3389/fpls.2021.786309.
124. Silva KK, Dunwell JM, Wickramasuriya AM. Weighted Gene Correlation Network Analysis (WGCNA) of *Arabidopsis* Somatic Embryogenesis (SE) and Identification of Key Gene Modules to Uncover SE-Associated Hub Genes. *Int J Genomics*. 2022 Jul 4; 2022:7471063. doi: 10.1155/2022/7471063.
125. Smoczyńska A, Pacak A, Grabowska A, Bielewicz D, Zadworny M, Singh K, Dolata J, Bajczyk M, Nuc P, Keszy J, Wozniak M, Ratajczak I, Harwood W, Karlowski WM, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. Excess nitrogen responsive HvMADS27 transcription factor controls barley root architecture by regulating abscisic acid level. *Front Plant Sci*. 2022 Sep 12;13:950796. doi: 10.3389/fpls.2022.950796.
126. Stothard P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*. 2000 Jun;28(6):1102, 1104. doi: 10.2144/00286ir01.
127. Stracke R, Favory JJ, Gruber H, Bartelniewoehner L, Bartels S, Binkert M, Funk M, Weisshaar B, Ulm R. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Environ*. 2010 Jan;33(1):88-103. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02061.x.
128. Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Borén M, Ahlandsberg S, Jansson C. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in

- barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell*. 2003 Sep;15(9):2076-92. doi: 10.1105/tpc.014597.
129. Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*. 2005 May;17(5):1397-411. doi: 10.1105/tpc.105.031682.
130. Sunkar R, Jagadeeswaran G. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biol*. 2008 Apr 16; 8:37. doi: 10.1186/1471-2229-8-37.
131. Swarts DC, Makarova K, Wang Y, Nakanishi K, Ketting RF, Koonin EV, Patel DJ, van der Oost J. The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2014 Sep;21(9):743-53. doi: 10.1038/nsmb.2879.
132. Szarzyńska B, Sobkowiak L, Pant BD, Balazadeh S, Scheible WR, Mueller-Roeber B, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. Gene structures and processing of *Arabidopsis thaliana* HYL1-dependent pri-miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2009 May;37(9):3083-93. doi: 10.1093/nar/gkp189.
133. Terzaghi WB, Cashmore AR. Light-regulated transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1995; 46:445–74. doi: 10.1146/annurev.pp.46.060195.002305.
134. Tiwari V, Chaturvedi AK, Mishra A, Jha B. Introgression of the SbASR-1 gene cloned from a halophyte *Salicornia brachiata* enhances salinity and drought endurance in transgenic groundnut (*arachis hypogaea*) and acts as a transcription factor [corrected]. *PLoS One*. 2015 Jul 9;10(7):e0131567. doi: 10.1371/journal.pone.0131567.
135. Tiwari V, Patel MK, Chaturvedi AK, Mishra A, Jha B. Functional Characterization of the Tau Class Glutathione-S-Transferases Gene (SbGSTU) Promoter of *Salicornia brachiata* under Salinity and Osmotic Stress. *PLoS One*. 2016 Feb 17;11(2): e0148494. doi: 10.1371/journal.pone.0148494.
136. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*. 2007 Oct 12;3:12. doi: 10.1186/1746-4811-3-12.
137. Vaucheret H, Vazquez F, Crété P, Bartel DP. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev*. 2004 May 15;18(10):1187-97. doi: 10.1101/gad.1201404.

138. Villain P, Mache R, Zhou DX. The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *J Biol Chem.* 1996 Dec 20;271(51):32593-8. doi: 10.1074/jbc.271.51.32593.
139. Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):669-87. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.046.
140. Wang C, Li M, Zhao Y, Liang N, Li H, Li P, Yang L, Xu M, Bian X, Wang M, Wu S, Niu X, Wang M, Li X, Sang Y, Dong W, Wang E, Gallagher KL, Wu S. SHORT-ROOT paralogs mediate feedforward regulation of D-type cyclin to promote nodule formation in soybean. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022 Jan 18;119(3): e2108641119. doi: 10.1073/pnas.2108641119.
141. Wang H, Jiao X, Kong X, Hamera S, Wu Y, Chen X, Fang R, Yan Y. A Signaling Cascade from miR444 to RDR1 in Rice Antiviral RNA Silencing Pathway. *Plant Physiol.* 2016 Apr;170(4):2365-77. doi: 10.1104/pp.15.01283.
142. Wang L, Mai YX, Zhang YC, Luo Q, Yang HQ. MicroRNA171c-targeted SCL6-II, SCL6-III, and SCL6-IV genes regulate shoot branching in Arabidopsis. *Mol Plant.* 2010 Sep;3(5):794-806. doi: 10.1093/mp/ssq042.
143. Wang Y, Chen YF, Wu WH. Potassium and phosphorus transport and signaling in plants. *J Integr Plant Biol.* 2021 Jan;63(1):34-52. doi: 10.1111/jipb.13053.
144. Wang Y, Li K, Chen L, Zou Y, Liu H, Tian Y, Li D, Wang R, Zhao F, Ferguson BJ, Gresshoff PM, Li X. MicroRNA167-Directed Regulation of the Auxin Response Factors GmARF8a and GmARF8b Is Required for Soybean Nodulation and Lateral Root Development. *Plant Physiol.* 2015 Jul;168(3):984-99. doi: 10.1104/pp.15.00265.
145. Wang Y, Wang L, Zou Y, Chen L, Cai Z, Zhang S, Zhao F, Tian Y, Jiang Q, Ferguson BJ, Gresshoff PM, Li X. Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate ENOD40 expression and regulate nodule initiation. *Plant Cell.* 2014 Dec;26(12):4782-801. doi: 10.1105/tpc.114.131607.
146. Wang Y, Wang Y, Song Z, Zhang H. Repression of MYBL2 by Both microRNA858a and HY5 Leads to the Activation of Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis. *Mol Plant.* 2016 Oct 10;9(10):1395-1405. doi: 10.1016/j.molp.2016.07.003.

147. Wingett SW and Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res* 2018, 7, 1338.
148. Wong DCJ, Lopez Gutierrez R, Gambetta GA, Castellarin SD. Genome-wide analysis of cis-regulatory element structure and discovery of motif-driven gene co-expression networks in grapevine. *DNA Res.* 2017 Jun 1;24(3):311-326. doi: 10.1093/dnares/dsw061.
149. Wu L, Zhang Q, Zhou H, Ni F, Wu X, Qi Y. Rice MicroRNA effector complexes and targets. *Plant Cell.* 2009 Nov;21(11):3421-35. doi: 10.1105/tpc.109.070938.
150. Wu X, Liu M, Downie B, Liang C, Ji G, Li QQ, Hunt AG. Genome-wide landscape of polyadenylation in Arabidopsis provides evidence for extensive alternative polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jul 26;108(30):12533-8. doi: 10.1073/pnas.1019732108.
151. Xi H, Yu Y, Fu Y, Foley J, Halees A, Weng Z. Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. *Genome Res.* 2007 Jun;17(6):798-806. doi: 10.1101/gr.5754707.
152. Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol.* 2005 Aug;138(4):2145-54. doi: 10.1104/pp.105.062943.
153. Xing S, Salinas M, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P. miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2010 Dec;22(12):3935-50. doi: 10.1105/tpc.110.079343.
154. Yadav A, Sanyal I, Rai SP, Lata C. An overview on miRNA-encoded peptides in plant biology research. *Genomics.* 2021 Jul;113(4):2385-2391. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.05.013.
155. Yadav VK, Yadav VK, Pant P, Singh SP, Maurya R, Sable A, Sawant SV. GhMYB1 regulates SCW stage-specific expression of the GhGDSL promoter in the fibres of *Gossypium hirsutum* L. *Plant Biotechnol J.* 2017 Sep;15(9):1163-1174. doi: 10.1111/pbi.12706.
156. Yamamoto YY, Ichida H, Matsui M, Obokata J, Sakurai T, Satou M, Seki M, Shinozaki K, Abe T. Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics.* 2007 Mar 8; 8:67. doi: 10.1186/1471-2164-8-67.

157. Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T. SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2009 Jan;21(1):347-61. doi: 10.1105/tpc.108.060137.
158. Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of Arabidopsis SBP-family transcription factors. *J Mol Biol*. 2004 Mar 12;337(1):49-63. doi: 10.1016/j.jmb.2004.01.015.
159. Yan K, Liu P, Wu CA, Yang GD, Xu R, Guo QH, Huang JG, Zheng CC. Stress-induced alternative splicing provides a mechanism for the regulation of microRNA processing in Arabidopsis thaliana. *Mol Cell*. 2012 Nov 30;48(4):521-31. doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.032.
160. Yan Y, Wang H, Hamera S, Chen X, Fang R. miR444a has multiple functions in the rice nitrate-signaling pathway. *Plant J*. 2014 Apr;78(1):44-55. doi: 10.1111/tpj.12446.
161. Yanagisawa S, Schmidt RJ. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J*. 1999 Jan;17(2):209-14. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00363.x.
162. Yang SW, Chen HY, Yang J, Machida S, Chua NH, Yuan YA. Structure of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing. *Structure*. 2010 May 12;18(5):594-605. doi: 10.1016/j.str.2010.02.006.
163. Yang T, Poovaiah BW. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):45049-58. doi: 10.1074/jbc.M207941200.
164. Yang X, Ren W, Zhao Q, Zhang P, Wu F, He Y. Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Res*. 2014 Oct 29;42(19):12224-36. doi: 10.1093/nar/gku907.
165. Yang X, Yang YN, Xue LJ, Zou MJ, Liu JY, Chen F, Xue HW. Rice ABI5-Like1 regulates abscisic acid and auxin responses by affecting the expression of ABRE-containing genes. *Plant Physiol*. 2011 Jul;156(3):1397-409. doi: 10.1104/pp.111.173427.

166. Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 30;34(2):667-75. doi: 10.1093/nar/gkj474.
167. Yao B, Cao J, Zhao C, Rengel Z. Influence of ammonium and nitrate supply on growth, nitrate reductase activity and N-use efficiency in a natural hybrid pine and its parents. *Journal of Plant Ecology.* (2011); (4): 275-282.
168. Yazaki J, Shimatani Z, Hashimoto A, Nagata Y, Fujii F, Kojima K, Suzuki K, Taya T, Tonouchi M, Nelson C, Nakagawa A, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Kikuchi S. Transcriptional profiling of genes responsive to abscisic acid and gibberellin in rice: phenotyping and comparative analysis between rice and Arabidopsis. *Physiol Genomics.* 2004 Apr 13;17(2):87-100. doi: 10.1152/physiolgenomics.00201.2003.
169. Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell.* 2004 Aug;16(8):1979-2000. doi: 10.1105/tpc.104.023614.
170. Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science.* 2005 Feb 11;307(5711):932-5. doi: 10.1126/science.1107130.
171. Yu D, Chen C, Chen Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell.* 2001 Jul;13(7):1527-40. doi: 10.1105/tpc.010115.
172. Zarka DG, Vogel JT, Cook D, Thomashow MF. Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol.* 2003 Oct;133(2):910-8. doi: 10.1104/pp.103.027169.
173. Zhang H, Forde BG. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):407-9. doi: 10.1126/science.279.5349.407.
174. Zhang H, Xia R, Meyers BC, Walbot V. Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Curr Opin Plant Biol.* 2015 Oct; 27:84-90. doi: 10.1016/j.pbi.2015.06.011.
175. Zhang L, Qin LN, Zeng ZR, Wu CZ, Gong YY, Liu LH, Cao FQ. Molecular identification of a root apical cell-specific and stress-responsive

- enhancer from an Arabidopsis enhancer trap line. *Plant Methods*. 2019 Jan 31; 15:8. doi: 10.1186/s13007-019-0393-0.
176. Zhang L, Xiang Y, Chen S, Shi M, Jiang X, He Z, Gao S. Mechanisms of MicroRNA Biogenesis and Stability Control in Plants. *Front Plant Sci*. 2022 Mar 8; 13:844149. doi: 10.3389/fpls.2022.844149.
177. Zhang QL, Su LY, Zhang ST, Xu XP, Chen XH, Li X, Jiang MQ, Huang SQ, Chen YK, Zhang ZH, Lai ZX, Lin YL. Analyses of microRNA166 gene structure, expression, and function during the early stage of somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Plant Physiol Biochem*. 2020 Feb; 147:205-214. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.12.014.
178. Zhang ZL, Xie Z, Zou X, Casaretto J, Ho TH, Shen QJ. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiol*. 2004 Apr;134(4):1500-13. doi: 10.1104/pp.103.034967.
179. Zhou GK, Kubo M, Zhong R, Demura T, Ye ZH. Overexpression of miR165 affects apical meristem formation, organ polarity establishment and vascular development in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 2007 Mar;48(3):391-404. doi: 10.1093/pcp/pcm008.
180. Zhou Y, Liu X, Engstrom EM, Nimchuk ZL, Pruneda-Paz JL, Tarr PT, Yan A, Kay SA, Meyerowitz EM. Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature*. 2015 Jan 15;517(7534):377-80. doi: 10.1038/nature13853.