

Vloga malih RNK pri odzivu rastlin na okužbo s patogenimi organizmi

Urban KUNEJ^{1,2} in Ester STAJIČ¹

Received August 25, 2022; accepted November 29, 2022.
Delo je prispelo 25. avgusta 2022, sprejeto 29. novembra 2022

The role of small RNA molecules in plant response to pathogen infection

Abstract: Plants have evolved diverse and complex mechanisms to regulate gene expression. Recently, a new mechanism called RNA interference (RNAi) has been discovered. At the core of RNAi are small non-coding RNAs (sRNAs), 21-24 nucleotides in length, that prevent the translation of transcripts into proteins by binding to complementary sites in transcripts. Because sRNAs are determined by origin, precursor structural properties, and sequence characteristics, they are classified into several classes like microRNAs (miRNAs) and secondary small interfering RNAs (siRNAs), which include tasiRNAs and phasiRNAs. They play important roles in regulating gene expression in a wide range of biological processes and in plant responses to biotic or abiotic stresses. Despite the numerous conserved sRNAs among plant species and the characterization of their function, there is still no comprehensive understanding of their role in plant defense responses against phytopathogens. This review summarizes the current understanding of *Verticillium* wilt pathogenesis, plant defense mechanisms against phytopathogens, and the biogenesis and roles of miRNAs, tasiRNAs, and phasiRNAs in plant defense responses against fungal pathogens. Further studies on plant sRNAs and their expression in response to various phytopathogens are needed to clearly define their roles. New sequencing approaches, bioinformatic analysis, and prediction of the role of miRNA targets during infection may allow us to develop new forms of plant protection in non-model organisms.

Key words: biotic stress; microRNA; *Verticillium nonalfalfae*; small RNAs

Vloga malih RNK pri odzivu rastlin na okužbo s patogenimi organizmi

Izvleček: Rastline imajo razvite raznolike in kompleksne mehanizme za regulacijo izražanja genov. Nedavno je bil odkrit nov mehanizem, imenovan RNK interferenca (RNKi). Osrednjo vlogo v RNKi imajo male nekodirajoče RNK (sRNK) dolge od 21-24 nukleotidov, ki z vezavo na komplementarna mesta v transkriptih preprečijo njihovo prevajanje v proteine. Ker sRNK definira izvor, strukturne lastnosti prekursorjev ter sekvenčne lastnosti, jih delimo v več različnih razredov: mikroRNK (miRNK) ter sekundarne male interferenčne RNK (siRNK), med katere prištevamo tasiRNK in phasiRNK imajo pomembno vlogo v regulaciji izražanja genov v številnih bioloških procesih ter odzivu rastlin na biotske ali abiotske dejavnike stresa. Kljub številnim ohranjenim sRNK med rastlinskimi vrstami ter karakterizaciji njihovega delovanja, do danes še ni celovitega razumevanja njihove vloge v obrambnem odzivu rastlin pred fitopatogeni. Ta pregled povzema trenutno razumevanje patogeneze verticilijske uvelosti, obrambnega mehanizma rastlin pred fitopatogeni in biogeneze ter vloge miRNK, tasiRNK ter phasiRNK v obrambnem odzivu rastlin pred glivnimi patogeni. Nadaljnje raziskave rastlinskih sRNK in njihovo izražanje v odzivu rastlin na različne fitopatogene organizme so potrebne za jasno določitev njihove vloge. Novi pristopi sekvenciranja ter bioinformacijske analize in napovedovanja vloge miRNK tarč v času okužb nam lahko pri nemodelnih organizmih omogočijo razvoj novih načinov varstva rastlin.

Ključne besede: biotski stres; mikroRNK; *Verticillium nonalfalfae*; male RNK

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

² Korespondenčni avtor, e-naslov: urban.kunej@bf.uni-lj.si

1 UVOD

Male RNK (sRNA; angl. small RNA) so nekodirajoče RNK, ki jih glede na sekvenčne in funkcijske lastnosti delimo v male interferenčne RNK (siRNK), sekundarne male interferenčne RNK (sekundarne sRNK) in mikroRNK (miRNK). Za male RNK je znano, da so vpletene v številne biološke in fiziološke procese rastlin, prav tako pa imajo pomembno vlogo v odzivu rastlin na dejavnike abiotičnega stresa in tudi v odzivu na biotski stres, ki ga povzročajo različni patogeni organizmi. V zadnjem času se vse več študij ukvarja z vlogo miRNK v procesih odziva rastlin na glivne patogene in potencialnih aplikacijah miRNK za boj proti glivnim boleznim (Gupta in sod., 2014).

Patogeni mikroorganizmi rastlin so, skupaj z rastlinojedimi živalmi in pleveli, odgovorni za kar 20 do 40 % izgube svetovne pridelave gospodarsko pomembnih kmetijskih rastlin (Savary in sod., 2012). K velikemu deležu izgube pridelka prispevajo različna glivna obolenja, še posebej pa tista, ki jih povzročajo talni fitopatogeni, kot sta glivi *Verticillium nonalfalfae* Inderbitzin et al. in *Verticillium dahliae* Kleb. (Neve, 1991).

V Sloveniji gliva *V. nonalfalfae* povzroča veliko izgubo v izplenu storžkov ženskih rastlin hmelja (*Humulus lupulus* L.), ki se uporabljajo v pivovarski industriji. Izguba pridelka je še posebej izrazita od leta 1997, ko smo v Sloveniji prvič zaznali pojav agresivnejšega, letalnega patotipa glive, ki se v hmeljiščih sporadično pojavlja še danes. Letalna oblika te bolezni je prav tako prisotna v Angliji, Nemčiji in na Češkem. Bolezen verticilijske uvelosti je bila sprva uvrščena na seznam karantenskih bolezni, danes pa sodi med glivne bolezni razreda II/A2, kar pomeni, da so potrebna dodatna prizadevanja za spremljanje in preprečevanje te bolezni, kar prinaša tudi večje stroške pridelave hmelja (Radišek in sod., 2004; IHGC, 2019).

Hmelj se goji predvsem za uporabo v pivovarstvu, saj storžki ženskih rastlin vsebujejo snovi, ki pivu zagotavljajo značilen okus in aromo, hkrati pa delujejo kot stabilizatorji in konzervansi. V zadnjih letih se hmelj uporablja tudi v farmacevtske namene, saj študije kažejo številne pozitivne učinke na zdravje (Steenackers in sod., 2015; Hrnčič in sod., 2019). Programi zlahtnjenja hmelja so osredotočeni predvsem na povečanje donosa, kakovosti ter sestavo in vsebnost sekundarnih metabolitov v storžkih, medtem ko so študije odpornosti hmelja proti verticilijski uvelosti manj obširne. Trenutno ni na voljo učinkovite metode oziroma fitofarmaceutskega sredstva, ki bi širjenje bolezni uspešno omejila. Molekularna patogeneza je premalo poznana zaradi tega je razumevanje bioloških procesov, ki so vključeni v občutljivost oziroma toleranco rastlin ob okužbi z glivo, izrednega pomena.

2 PATOGENEZA VERTICILIJSKE UVELOSTI

Simptomi bolezni verticilijske uvelosti, ki jo povzroča gliva *V. nonalfalfae*, se razlikujejo glede na patogenost seva. Ob okužbi rastlin z blagim patotipom lahko opazimo neznatne simptome uvelosti rastlin, medtem ko okužba z letalnim patotipom vodi v pojav simptomov, kot so kloroze, nekroze, odebelitev stebela in odmiranje tkiva, kar v končni fazi patogeneze vodi v propad rastline oziroma propad celotnega nasada (Neve, 1991; Radišek in sod., 2006).

Ob zaznavi koreninskih eksudatov gostitelja, gliva preide iz dormantne v parazitsko fazo in prične s kolonizacijo korenin. Hife glive prodrejo preko rizoderma ali eksoderma v primarno skorjo korenine. Endoderm, kot zadnja plast primarne skorje predstavlja prvo bariero pred vstopom glive v ksilem, saj so njegove celične stene trakasto okrepljene s plastjo lignina in tvorijo tako imenovan Kasparijev trak. Prav tako se lahko v endodermalnem tkivu nalaga suberin, ki dodatno otežuje prodiranje glivnih hif proti prevajalnemu sistemu. Ob vstopu hif v prevajalno tkivo, gliva začne tvoriti konidiospore, katere se nato s ksilemskim sokom sistematično razširijo iz koreninskega v stebelno tkivo (Yadeta & Thomma, 2013). Rastline v tej fazi sprožijo procese za tvorbo različnih fizičnih barrier v prevajalnem sistemu, s katerimi poskušajo ustaviti prenos konidiospor. Eden takšnih procesov so tiloze, v katerem prihaja do vraščanja mehurjastih izrastkov celic parenhimov v traheide in traheje in nastajanja til, ki preprečijo pretok ksilemskega soka in s tem konidiospor (Talboys, 1958a). Slednji proces je bil opažen predvsem pri občutljivih sortah, medtem ko je bil proces nalaganja suberina v endodermalni plasti bolj intenziven pri odpornih sortah hmelja (Talboys, 1958a; Cregeen in sod., 2015). Ko konidiospore naletijo na fizične bariere, pričnejo tvoriti hife, s katerimi lahko zaobidejo bariere in vstopijo v sosednje žile, preko katerih se dalje s ksilemskim sokom prenašajo kot konidiospore (Chen in sod., 2004). Tekom kolonizacije gliva izloča različne hidrolitične encime, ki razgradijo komponente rastlinskih celičnih sten, kar ji omogoča lažji prehod med žilami prevajalnega sistema (Talboys, 1958b). Prav tako pa ji v zadnji fazi patogeneze encimi omogočajo prehod iz prevajalnega tkiva v preostala tkiva ter s tem popolno kolonizacijo gostitelja, pri čemer pri občutljivih sortah prihaja do pojava izrazitih simptomov kot so kloroze in nekroze listov in odmiranje tkiva (Talboys, 1958a).

3 OBRAMBNI MEHANIZEM RASTLIN

Ksilem si lahko torej predstavljamo kot bojišče, na

katerem gliva napada in poskuša zaobiti bariere, ki jih ustvarja gostitelj, ta pa prav tako z različnimi obrambnimi mehanizmi poskuša zaustaviti nadaljnjo kolonizacijo glive. Odziv hmelja na okužbo z glivo sledi modelu interakcij med rastlinami in patogeni, ki ga predstavlja večplastni imunski sistem rastlin (Jones & Dangl, 2006).

Prvi nivo obrambnega odziva tega modela se navezuje na receptorje rastlin za prepoznavo molekularnih vzorcev (angl. pattern recognition receptors - PRRs), ki se nahajajo na površini celičnih membran in prepoznajo s patogeni povezane molekularne vzorce (angl. pathogen associated molecular patterns - PAMPs). PAMP direktno z vezavo na PRR-je ali posredno z vezavo na druge molekule, ki so v interakciji s PRR-ji, stimulirajo bazalni imunski odziv rastline, ki vključuje tako fizično kot kemično obrambo pred patogeni. Patogeni lahko zaobidejo bazalni imunski odziv in sprostijo t.i. efektorje v apoplast ali citoplazmo rastlinskih celic. Efektorji so raznolika skupina sekretornih proteinov, ki jih patogeni prenesejo v gostiteljeve celice, kjer povzročajo motnje v signalizaciji, ter s tem onemogočajo prepoznavo proteinov, s katerimi patogen napada gostitelja, prav tako pa lahko patogena obvarujejo pred obrambnimi molekulami gostitelja (Jones & Dangl, 2006). Njihovo prisotnost v citoplazmi zaznajo receptorji, imenovani odpornostni proteini oziroma z rezistenco povezani proteini, ki jih kodirajo *R* geni (angl. resistance (*R*) proteins). Slednji obsegajo raznolike znotrajcelične receptorje, katerim je skupna predvsem domena za vezavo nukleotidov (angl. nucleotide-binding domain - NB) ter domena bogata s ponovitvami levcina (angl. leucine-rich repeat domain - LRR), ki je odgovorna za prepoznavo efektorskih proteinov (Padmanabhan in sod., 2009). Imunski odziv rastlin, sprožen z odpornostnimi proteini v citoplazmi, je drugi nivo obrambe pred patogeni in predstavlja močnejšo obliko odziva, ki zagotavlja z efektorji sproženo odpornost (angl. effector-triggered immunity - ETI) (Jones & Dangl, 2006; Thomma in sod., 2011).

Ko rastline preko zgoraj opisanega mehanizma zaznajo patogena v ksilemu, se sprožijo obsežne metabolne spremembe v celicah parenhima, ki se nahajajo v neposredni bližini okuženega prevodnega sistema in povzročijo akumulacijo različnih proteinov ter sekundarnih metabolitov v rastlinskem ksilemu ali tvorjenje til. Znano je, da lahko številne molekule in spojine, ki se tvorijo v času patogeneze, prispevajo k obrambi rastlin in popolnoma zavrejo ali upočasnijo razrast in širjenje glive v rastlini (Gayoso in sod., 2010). Nekatere spojine, ki se po okužbi nakopičijo v ksilemskem soku, spremenijo morfologijo ksilemskega tkiva in s tem zavrejo vertikalno in lateralno širjenje patogena po rastlini, medtem ko druge nakopičene spojine delujejo protimikrobno in tako tudi

eliminirajo povzročitelja bolezni (Yadeta & Thomma, 2013).

Pomembno vlogo pri regulaciji izražanja genov ob okužbi, ki se odvija pred ali med prepisom DNK v mRNK, imajo transkripcijski faktorji in sekvenčni motivi ali regulatorne regije, ki se nahajajo pred začetkom gena. Nekateri izzovejo začetek transkripcije, drugi pa delujejo kot njeni aktivatorji ali represorji. Nov način regulacije genske ekspresije je bil potrjen z odkritjem sRNK, ki delujejo na post-transkripcijskem nivoju in vplivajo na stabilnost transkriptov (mRNK). Slednje je bilo pri prokariotih opisano v devetdesetih letih prejšnjega stoletja, njena funkcija, tako v homeostatskih procesih, kot v procesih odziva na različne biotske in abiotske dejavnike, pa je bila pri evkariontih potrjena šele desetletje kasneje (Wagner & Simons, 1994). Danes vse procese regulacije izražanja genov z sRNK uvrščamo v mehanizem interference RNK (RNKi), ki jo vodita obe glavni skupini sRNK, mikroRNK in siRNK (Saurabh in sod., 2014).

4 BIOGENEZA miRNK, tasiRNK IN phasiRNK TER Z NJIMI VODENA INTERFERENCA RNK

miRNK so nekodirajoče RNK molekule, ki so v svoji zreli oziroma aktivni obliki dolge 20-24 nukleotidov (nt). Geni miRNK (*MIR*) so v rastlinskih genomih kodirani večinoma v med-genskih regijah, redki pa so locirani tudi v intronskih regijah protein kodirajočih genov. *MIR* geni spadajo v razred II genov, kar pomeni, da so samostojne transkripcijske enote, ki se v primarne transkripte (pri-miRNK) prepisujejo s pomočjo RNK polimeraze II (Lee in sod., 2004). Pri-miRNK so podobno kot protein-kodirajoči geni stabilizirani z 7-metilguanozinsko kapo na 5' koncu in poli(A) repom na 3' koncu ter zviti v obliko lasnične zanke, ki meri do 1000 nukleotidov. Proces zorenja rastlinske pri-miRNK do končne zrele in aktivne oblike miRNK v celoti poteka v celičnem jedru, kjer ga usmerja več-proteinski kompleks v dvo-stopenskem procesu. Slednjega sestavlja encim RNaza III Dicer-ju podobni protein (DCL1), ki je odgovoren za razrez pri-miRNK v krajše, prav tako v lasnico zvite prekurzorske miRNK (pre-miRNK) ter spremljajoča proteina HYL1 (angl. HYPONASTIC LEAVES 1) in SE (angl. SERRATE). V drugem koraku procesiranja strukturne in sekvenčne lastnosti pre-miRNK lasnice proteinu DCL1 narekujejo mesta za endonukleolitično cepljenje stebila lasnice pre-miRNK iz katerega nastane dvoverižni dupleks sestavljen iz zrele miRNK ter njene komplementarne miRNK*. Za nastali dupleks je značilen 3'-štrleči konec z dvema nukleotidoma. Za večjo stabilnost oziroma preprečitev razgradnje dupleksa, ga metiltransferaza

HEN1 (angl. HUA ENHANCER 1) na 3' štrlečem koncu metilira (Song in sod., 2010). V naslednjem koraku se nato metilirani dupleks s pomočjo proteina HST1 (angl. HASTY) prenese v citoplazmo (Yang in sod., 2006; Ren in sod., 2014), kjer se naloži v kompleks RISC (z RNK inducirani kompleks utišanja genov, angl. RNA-induced silencing complex), ki je sestavljen iz različnih proteinov. Med njimi protein Argonavt (AGO) razcepi komplementarno verigo dupleksa in jo usmeri v pot razgradnje v eksosome, zrelega oblika miRNK, vezana v kompleks RISC, pa le-tega vodi na njej komplementarno mesto v tarčnem transkriptu. Ob vezavi na tarčno mesto protein AGO, ki predstavlja glavno katalitično komponento, izvede cepitev tarčnega transkripta (Khraiwesh in sod., 2012). Družina proteinov Argonavtov ima torej osrednjo vlogo v procesih utišanja RNK, pri čemer vsak protein kaže preferenčno vezavo določenih miRNK in s tem delno narekuje vlogo miRNK v določenih procesih; npr. procesih rasti, razvoja, obrambnih odzivih, z malimi RNK vodeni metilaciji DNK in podobno (Henderson in sod., 2006).

Za razliko od interakcij med miRNK in tarčo pri živalih, kjer je dopuščeno neujemanje, je za interakcije pri rastlinah značilno skoraj popolno ujemanje. Prepoznavna vezavnega mesta temelji na ohranjenosti nukleotidnega zaporedja tarče in miRNK, kar omogoča, da lahko eno tarčo regulira več miRNK ter obratno, torej ena miRNK regulira več tarč s podobno ohranjenim mestom vezave (Axtell & Meyers, 2018). Na podlagi ohranjenosti nukleotidnega zaporedja in posledično podobnosti njihove vloge pri različnih rastlinskih vrstah, lahko miRNK uvrščamo v družine. Po drugi strani pa v številnih študijah opisujejo tudi vrstno-specifično ali tkivno-specifično pojavljanje miRNK, tako v fizioloških procesih, kot tudi obrambnih odzivih na abiotske in biotske dejavnike stresa (Dezulian in sod., 2005).

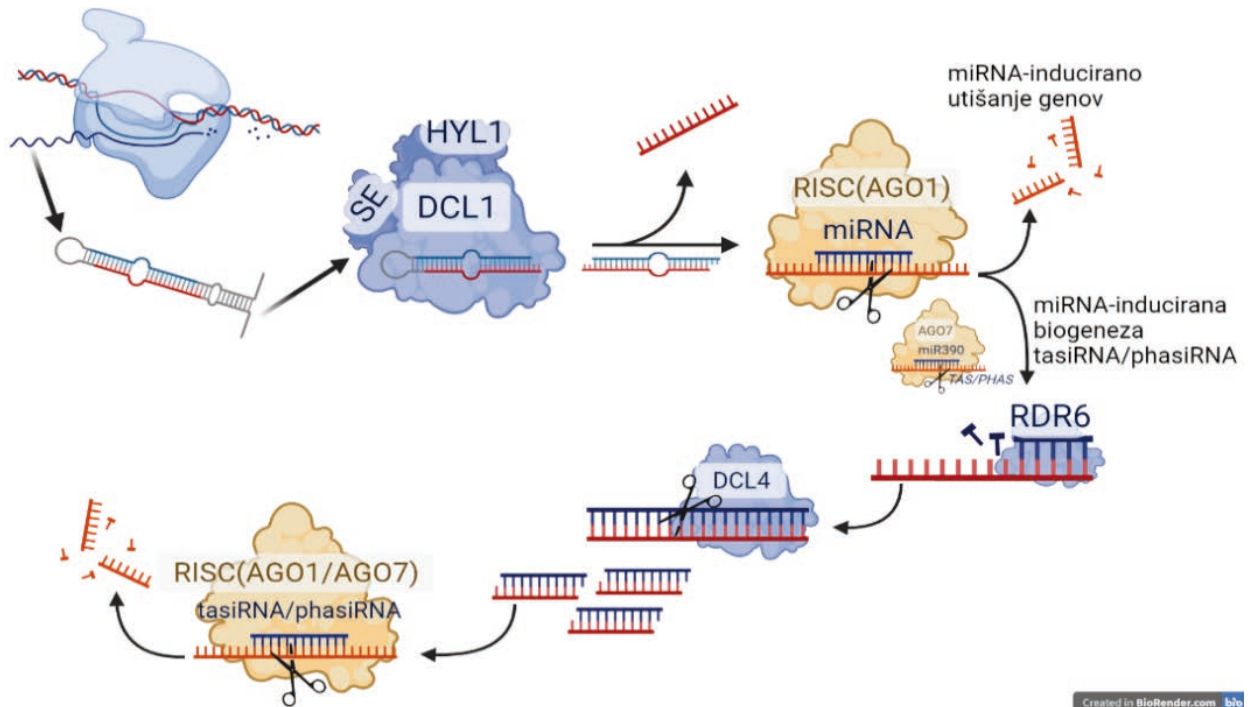
V zadnjih letih je prišlo do izrednega napredka pri razumevanju malih RNK pri rastlinah. Karakterizacija genov, ki kodirajo komponente poti RNKi, kot sta proteina DCL in AGO ter od RNK-odvisna RNK polimeraza (RDR), je potrdila obstoj več različnih poti utišanja, ki jih vodijo sRNK. siRNK so druga skupina sRNK, za katero je značilno, da nastajajo iz popolnoma ujemajoče prekursorske dvoverižne RNK (dsRNK). Te pa izvirajo s prepisom protismiselne verige ali pa z obratnim prepisom z miRNK razrezanega transkripta s pomočjo RDR. Slednje uvrščamo med sekundarne siRNK, saj njihov nastanek povzroči delovanje specifičnih miRNK. Sekundarne siRNK delimo glede na njihov izvor oziroma biogenezo in delovanje na fazne siRNK (angl. phased siRNA; phasiRNA) in trans-delujoče male interferenčne RNK (tasiRNK). phasiRNK nastajajo iz RNK, ki se prepisejo iz *PHAS* lokusov (lahko so kodirajoči ali ne kodirajoči), njihovo biogenezo pa sprožijo specifične miRNK, ki raz-

režejo transkripte *PHAS* lokusov. Po razrezu transkripta se le-ta obratno prepíše s pomočjo RDR6, DCL4 pa nato nastalo dvoverižno RNK razreže na 21-24 nukleotidov dolge fragmente, s čimer nastajajo popolnoma ujemajoči se dsRNK dupleksi (Fei in sod., 2013). Enako kot pri delovanju miRNK, se ena od verig inkorporira v AGO proteine, ki phasiRNK usmerjajo na transkripte *PHAS* lokusov iz katerih izhajajo, torej delujejo v *cis* načinu (Axtell & Meyers, 2018). V eksperimentalnih in bioinformacijskih študijah ugotavljajo, da phasiRNK nastajajo iz genov, ki kodirajo proteine vpletene v imunski odziv (z rezistenco povezani geni), transkripcijske faktorje iz družine MYB ter proteine, vpletene v signalizacijo z avksinom (angl. transporter inhibitor response/auxin F-box gene - TIR/AFB) (Yu in sod., 2019). Za razliko od phasiRNK, trans-delujoče siRNK izhajajo izključno iz ne-kodirajočih lokusov *TAS* (angl. trans-acting siRNA) in kot njihovo ime nakazuje, delujejo v trans načinu, kar pomeni, da utišajo transkripte iz katerih same ne izhajajo. miRNK, ki sprožijo cepitev *TAS* lokusov, so večinoma vezane v AGO7 ali AGO2. Najbolj natančno je karakterizirana biogeneza tasiRNK, ki izhajajo iz lokusa *TAS3*. Te imajo pomembno funkcijo v regulaciji izražanja dejavnikov odziva na avksin (angl. auxin response factors; ARF). Njihovo biogenezo povzroči miR390 vezana v AGO7 (Montgomery in sod., 2008). Po cepitvi z miR390-AGO7 se 3'-konec razrezanega *TAS* transkripta obratno prepíše s pomočjo RDR6, s čimer nastane popolnoma ujemajoča dsRNK, ki jo nadalje protein DCL4 zaporedno razreže v 21 nt dolge fragmente, s čimer nastajajo tasiRNK, ki dodatno ojačajo utišanje z RNKi (Cuperus in sod., 2010) (Slika 1).

5 miRNK V OBRAMBEM ODZIVU RASTLIN PRED GLIVNIMI PATOGENI REGULIRAJO HORMONSKO SIGNALIZACIJO

Ena izmed prvih opisanih družin miRNK, ki sodeluje pri odzivu na biotski stres, je bila miR393. Navarro in sod. (2006) so dokazali, da peptid, ki izvira iz flagelina, povzroči izražanje rastlinske miRNK, ki negativno uravnava transkripte za receptorje avksina TIR1 (angl. transport inhibitor response1), AFB2 in AFB3 (angl. auxin-signalling F-Box corepressor). Utišanje signalizacije z avksinom vodi v omejevanje rasti bakterije *Pseudomonas syringae* Van Hall, 1904 pri navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), kar nakazuje, da je avksin odgovoren za dovzetnost na bolezen, pri čemer z miRNK-posredovano utišanje signalizacije avksina vodi v odpornost (Navarro in sod., 2006).

Hormonska signalizacija modulira odziv rastlin na biotski stres ter posredno ali neposredno narekuje kompromis med primarno rastjo in odzivnimi mehanizmi



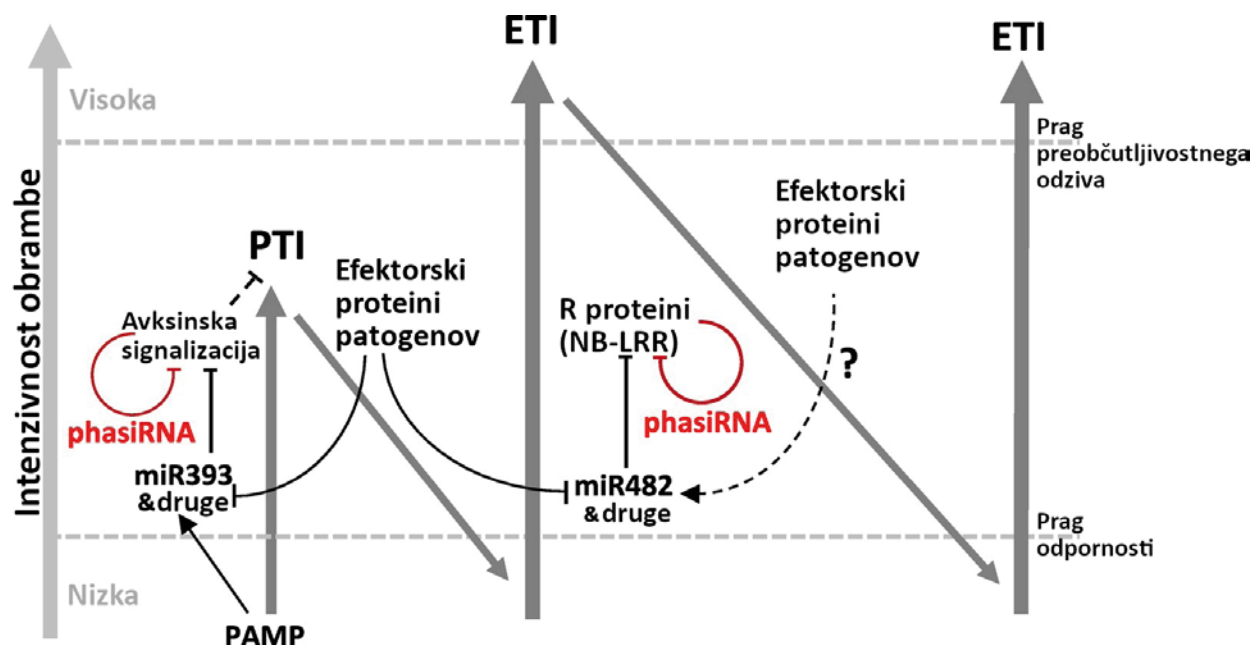
Slika 1: Shematski prikaz biogeneze miRNK, tasiRNK in phasiRNK. Po prepisu *MIR* genov v primarne miRNK, se le-ta zvi-je v delno komplementarno obliko lasnice, ki se v večih korakih z Dicer-ju podobnimi proteini procesira do nastanka deloma ujemajočega dupleksa. Ena od verig slednjega se inkorporira v AGO1 protein, ki predstavlja glavno katalitično komponento RISC kompleksa. miRNK vodi celoten kompleks na njej komplementarno mesto v tarčnem transkriptu ter s pomočjo AGO1 proteina izvede razrez (miRNK-inducirano utišanje genov). V primeru izražanja specifičnih miRNK (npr. miR390), se lahko te inkorporirajo v druge AGO proteine (npr. AGO7) ter povzročijo razrez nekodirajočih *TAS* transkriptov ali kodirajočih *PHAS* transkriptov (miRNK-inducirana biogeneza sekundarnih malih interferenčnih RNK – tasiRNK ali phasiRNK). Za te transkripte je značilno, da se obratno prepisejo s pomočjo RDR v dsRNK. Tako nastalo dsRNK DCL4 razreže v popolnoma ujemajoče se duplekse, katerih ena od verig se inkorporira v AGO protein in dodatno ojača signal utišanja genov, ki je značilen za siRNK

Figure 1: Schematic representation of the biogenesis of miRNAs, tasiRNAs, and phasiRNAs. After transcription of *MIR* genes into primary miRNAs, the latter is coiled into a partially complementary hairpin form that is processed in several steps by Dicer-like proteins to form a partially matched duplex. One of the strands of the resulting duplex is incorporated into the AGO1 protein, which is the major catalytic component of the RISC complex. The miRNA guides the entire complex to its complementary site in the target transcript and, with the help of the AGO1 protein, performs the cut (miRNA-induced gene silencing). When specific miRNAs are expressed (e.g. miR390), they can be incorporated into other AGO proteins (e.g. AGO7) and induce cleavage of non-coding *TAS* transcripts or coding *PHAS* transcripts (miRNA-induced biogenesis of secondary small interfering RNAs - tasiRNAs or phasiRNAs). These transcripts are characterized by their reverse transcription by RDR into dsRNAs. The resulting dsRNA is cut by DCL4 into perfectly matched duplexes, one strand of which is incorporated into the protein AGO, further amplifying the gene silencing signal characteristic of siRNA

med patogenezo glivnih obolenj (Bari & Jones, 2009). Signalizacija posredovana z avksinom temelji na prisotnosti ali odsotnosti avksina v jedru celice. Ob odsotnosti avksina so proteini Aux/IAA (avksin/indolocetna kislina, angl. auxin/indole acetic acid) vezani na ARF, s čimer jih inaktivirajo. Ob zaznavi avksina se tvori kompleks proteina TIR1 ter spremljajočih proteinov AFB1, AFB2 in AFB3, ki povzročijo ubikvitinacijo proteinov Aux/IAA, s čimer se slednji sprostijo iz dejavnikov ARF, kar vodi v aktivacijo (lahko pa tudi represijo – odvisno od vloge družine ARF proteinov) transkripcije na avksin odzivnih genov (Quint & Gray, 2006). Prav tako pa avksinska

signalizacija utiša delovanje signalizacije posredovane s salicilno kislino. To nakazuje, da lahko povečano izražanje miR393 ter s tem utišanje avksinske signalizacije vodi v kopičenje salicilne kisline, ki dodatno zagotavlja večjo odpornost na fitopatogene (Wang in sod., 2007) (Slika 2).

Prav tako v študijah opisujejo regulacijo avksinske signalizacije z drugimi miRNK, ki delujejo na transkripte različnih genov vpletenih v signalizacijo. Pri navadnem repnjakovcu miR160 nadzoruje nastanek koreninske čepice z uravnavanjem izražanja genov *ARF10* in *ARF16*. Zaradi spremembe v izražanju *ARF16*, ki jo povzroči miR160, se je pri rastlinah zmanjšala vitalnost ter število



Slika 2: Model „zig-zag-zig“ rastlinskega imunskega sistema. Izvirni model Jones and Dangl (2006) opisuje stopničast – več nivojski, evolucijski model obrambe rastlin pred patogeni, ki opisuje kvantitativno naravo in molekularno evolucijo odpornosti proti boleznim pri rastlinah. Z odkritjem regulatorne vloge malih RNK v obrambnem odzivu rastlin so številne mikroRNK in fazne sekundarne male interferenčne RNK (phasiRNK) v „zig-zag-zig“ modelu rastlinskega imunskega sistema dobile svoje mesto, bodisi na nivoju PTI ali ETI. V različici tega modela molekularni vzorci, povezani s patogeni (PAMP), povzročijo izražanje miRNK, ki prek hormonske signalizacije sodelujejo v imunosti sproženi s PAMP (angl. PAMP triggered immunity - PTI). Na primer, tretiranje s flagelinom poveča izražanje miR393, ki regulira izražanje genov, vključenih v avksinsko signalizacijo (*TIR1*, *AFB2* in *AFB3*). Utišanje signalizacije avksina v času okužbe posledično izboljša gostiteljevo PTI. Prav tako pa miR393 sproži biogenezo phasiRNK, ki okrepijo aktivnost te miRNK, saj prav tako delujejo na gene, vključene v pot signalizacije avksina. Efektorski proteini patogenov lahko zavirajo delovanje rastlinskih miRNK, kar poveča občutljivost rastlin na okužbo. Pri tem lahko rastline aktivirajo drugi nivo obrambe v katerem sodeluje miR482. Slednja je negativni regulator rastlinskih genov za odpornost (*R* genov) in se ji ob zaznavi efektorjev zmanjša izražanje, kar poveča odpornost sproženo z efektorji (angl. effector triggered immunity - ETI). Nekatere miRNK lahko sprožijo biogenezo phasiRNK, ki izhajajo iz *R* genov, te phasiRNK pa lahko delujejo sinergistično s miRNK bodisi v *cis* ali *trans* načinu in dodatno zmanjšujejo nivo transkriptov *R* genov. Nekateri efektorji lahko spodbudijo stabilnost oziroma izražanje miRNK z delovanjem na RNKi komponente, vključene v biogenezo miRNK. Mehanizmi tega modela še niso popolnoma razjasnjeni in so v sliki označeni z vprašajem. Na primer, ali lahko efektorji aktivirajo izražanje miRNK vključenih v ETI in s tem oslabijo imunski odziv gostitelja (povzeto po Fei in sod. (2013), Copyright © 2016 The American Phytopathological Society DOI: 10.1094/MPMI-09-15-0212-FI)

Figure 2: A “zig-zag-zig” model of the plant immune system. The original model proposed by Jones and Dangl (2006) describes a stepwise, multi-level, evolutionary model of plant defense against pathogens that describes the quantitative nature and molecular evolution of disease resistance in plants. With the discovery of the regulatory role of small RNAs in plant defense responses, a number of microRNAs and secondary sRNAs, namely phased small interfering RNAs (phasiRNAs), have found their place in the ‘zig-zag-zig’ model of the plant immune system, either at the PTI or the ETI level. In a version of this model, pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) induce the expression of miRNAs that participate in PAMP-triggered immunity (PTI) via hormonal signalling. For example, flagellin treatment increases the expression of miR393, which regulates the expression of genes involved in auxin signalling (*TIR1*, *AFB2* and *AFB3*). Consequently, suppression of auxin signalling during infection enhances host PTI. In addition, miR393 triggers the biogenesis of phasiRNAs that enhance the activity of this miRNA, as they also act on genes involved in the auxin signalling pathway. Pathogen effector proteins can inhibit the activity of plant miRNAs, increasing the susceptibility of plants to infection. In this context, plants may activate a second level of defense involving miR482. The latter is a negative regulator of plant resistance genes (*R* genes) and its expression is reduced when effectors are detected, increasing effector triggered immunity (ETI). Some miRNAs can trigger the biogenesis of *R* gene-derived phasiRNAs, and these phasiRNAs can act synergistically with miRNAs in either *cis* or *trans* mode to further reduce the level of *R* gene transcripts. Some effectors may promote miRNA stability or expression by acting on RNAi components involved in miRNA biogenesis. The mechanisms of this model are not yet fully understood and are indicated by a question mark in the figure. For example, whether effectors can activate the expression of miRNAs involved in ETIs and thereby attenuate the host immune response (reproduced from Fei et al. (2013), Copyright © 2016 The American Phytopathological Society DOI: 10.1094/MPMI-09-15-0212-FI)

stranskih korenin (Wang in sod., 2005). Prav tako pa so nepravilno rast koreninskega tkiva opazili pri mutantih navadnega repnjakovca, ki so izražali različico *ARF17*, na katero miR160 ni imela vpliva. Rastline, ki so izražale različico *ARF17*, odporno na miRNK, so imele povečane ravni transkriptov *ARF17* in spremenjeno kopičenje mRNK GH3-podobnih proteinov (YDK1/GH3.2, GH3.3, GH3.5 in DFL1/GH3.6), katerih izražanje inducira avksin in so odgovorni za konjugacijo avksina. Spremembe v izražanju teh genov so povezane z drastičnimi razvojnimi okvarami, vključno z anomalijami simetrije embrijev in rastočih listov, okvarami oblike listov, prezgodnjim razvojem socvetja, spremenjeno filotaksijo, zmanjšano velikostjo cvetnih listov, nenormalnimi stebli, sterilnostjo in okvarami rasti korenin (Mallory in sod., 2005). V naši nedavni študiji smo v koreninskih vzorcih odporne sorte hmelja, ki je bila inokulirana z letalnim patotipom glive *V. nonalfalfae*, opazili povečano izražanje hlu-miR160b. V analizi napovedovanja tarč, smo tarčno mesto te miRNK določili v transkriptih genov *ARF10* in *ARF18* (Kunej in sod., 2021). Za slednjega je znano, da zavira signalizacijo z avksinom, kar vodi v podaljševanje hipokotilov pri rastlinah, ki rastejo v senčnih razmerah (Jia in sod., 2020). Povečano izražanje miR160 ter uravnavanje transkriptov ARF je bilo dokazano tudi med patogenezo boleznih stebelnega raka pri topolu vrste *Populus trichocarpa* Torr. & A.Gray ex. Hook. (Zhao in sod., 2012) in pri krompirju, pri katerem je bilo izražanje *StARF10* utišano. Slednji se veže na promotorje gena *DFL1/GH3.6*, ki posreduje v navzkrižni povezavi poti signalizacije s salicilno kislino in avksinom ter je tako s tem vpleten v lokalno obrambo in sistemsko pridobljeno odpornost proti krompirjevi plesni (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) (Natarajan in sod., 2018). Prav tako pa so v študiji na rižu dokazali, da lahko prekomerna ekspresija miR160a ali miR398b poveča odpornost riža na glivo *Magnaporthe oryzae* (Li in sod., 2014).

Nasprotno pa so v študijah na jajčevcu (Yang in sod., 2013) ter oljni ogrščici (Shen in sod., 2014) opazili, da okužba z glivama *V. dahliae* oziroma *V. longisporum* povzroči zmanjšano izražanje miR160. Slednje nakazuje, da je izražanje te miRNK potencialno vrstno- ali sortno-specifično oziroma povezano z občutljivostjo ali odpornostjo rastlin na glivne patogene. Večina odpornih sort kaže povečano izražanje miR160, medtem ko v občutljivih opazimo zmanjšano ali nespremenjeno izražanje tako miRNK, kot njihovih tarč (Yang in sod., 2013; Li in sod., 2014; Shen in sod., 2014).

Tako kot miR393 in miR160, imajo tudi miR167 vlogo v regulaciji avksinske signalizacije. Za slednje so pri navadnem repnjakovcu dokazali, da regulirajo izražanje *ARF6* in *ARF8* (Jones-Rhoades & Bartel, 2004). Pri rižu, okuženem z glivo *M. oryzae*, je občutljiva sorta

kazala manjše izražanje miR167a/b/c, odporna sorta pa znatno povečano, kar nakazuje, da so te miRNK potencialni pozitivni regulatorji odpornosti riža proti omenjeni glivi (Li in sod., 2014).

Dodaten nivo regulacije oziroma vzdrževanja homeostaze avksina zagotavljajo tudi miR164, ki regulirajo izražanje transkripcijskih faktorjev z domenami značilnimi za družino NAC. Med njimi NAC1 pozitivno uravnava razvoj stranskih korenin preko signalizacije z avksinom, pri čemer miR164, ki jo inducira avksin, nadzoruje raven transkriptov *NAC1* (Guo in sod., 2005). Regulacijo te miRNK so opazili pri bombažu in rižu kot odziv na okužbo z glivama *V. dahliae* in *M. oryzae* (Li in sod., 2014; Hu in sod., 2020). To lahko nakazuje na rast in razvoj novih stranskih korenin v času okužbe, saj rastlina z mašenjem prevajalnega tkiva (tvorbo til) poskuša omejiti širjenje glive po rastlini (Talboys, 1958a).

Nadaljnja karakterizacija interakcije miR164-NAC100 pri bombažu je pokazala, da povečano izražanje miR164 v odzivu na okužbo z *V. dahliae* vodi v neposredno cepitev transkriptov *NAC100*. Prav tako pa so dokazali, da izražanje miR164 in tudi izbitje *NAC100* pozitivno prispeva k odpornosti na glivo, saj je slednji represor gena *GhPR3* (s patogenezo povezan gen 3; angl. pathogenesis related gene 3). Slednje nakazuje, da interakcija miR164-NAC100 igra pomembno vlogo v obrambo rastlin prek RNKi (Hu in sod., 2020).

Povečano izražanje miR164 so opazili tudi pri odpornih sortah riža, okuženih z glivo *M. oryzae*, pri čemer so opazili, da ta cepi transkripte gena »s salicilno kislino inducirani protein 19« (angl. *Salicylic acid-induced protein 19* – LOC_Os12g41680). To dodatno nakazuje na vlogo te miRNK v hormonski signalizaciji in potencialni odpornosti na glivne patogene (Li in sod., 2019).

Prav tako pa obstajajo še druge miRNK, ki so odzivne na okužbo z glivnimi patogeni in katerih tarče niso vpletene v hormonsko signalizacijo, ampak lahko posredno vplivajo na odpornost rastlin na okužbo. Študije kažejo, da je povečana odpornost rastlin povezana s povečanim izražanjem miRNK, ki so vpletene v rast in razvoj tkiv (Guo in sod., 2005; Mallory in sod., 2005; Wang in sod., 2005; Singh in sod., 2014). Po drugi strani pa v študijah opisujejo različno izražanje miRNK, ki so posredno ali neposredno vpletene v regulacijo obrambnih mehanizmov in imunost (Yi & Richards, 2007; Gupta in sod., 2012; Zhao in sod., 2012; Wong in sod., 2014). Pri miRNK, ki so vpletene v obrambne mehanizme, lahko opazimo različno izražanje, ki je odvisno od patosistema. Medtem ko miRNK, ki so neposredno vpletene v imunost, t.j. regulirajo izražanje s patogenezo povezanih genov ali genov za odpornost proti patogenom, kažejo znižano izražanje.

6 miRNK SO VPLETENE V OBRAMBNE MEHANIZME

V mehanizme odpornosti vključujemo tudi nastanjanje strukturnih barier, sintezo sekundarnih metabolitov in protimikrobnih encimov in proteinov. Rastline lahko širjenje patogenov omejijo s tvorbo fizičnih barier v prevajalnem tkivu ter nalaganjem lignina v endodermne plasti. Slednje procese so v odzivu na glivo *V. nonalfalfae* opazili pri občutljivi sorti hmelja, medtem ko so pri odporni opazili intenzivno nalaganje suberina (Talboys, 1958a; Cregeen in sod., 2015). Omenjeni procesi so zelo dobro uravnani na različnih ravneh, pri čemer imajo miRNK pomembno vlogo v njihovi post-transkripcijski regulaciji. Na primer za miRNK iz družin miR397, miR398 in miR408 je znano, da so v času patogenezne glivnih obolenj preko uravnavanja bakrove superoksidne dismutaze, lakaz in plantacianinov vpletene v regulacijo bakra, ki ima biocidno aktivnost (Abdel-Ghany & Pilon, 2008). Še posebej pomembni sta slednji dve skupini, lakaze in plantacianini, ki so tarče miR408. Ti so ključni encimi v biosintezi lignina, saj katalizirajo zadnji korak polimerizacije monolignolov (Huang in sod., 2016). Pri občutljivi in odporni sorti pšenice so v odzivu na okužbo z glivo *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* patotip 62G29-1 ugotovili zmanjšano izražanje miR408 in miR1138, kar se je odražalo v povečanem izražanju tarč in povečani biosintezi kaloze in lignina v času preobčutljivostnega odziva na mestu okužbe (Gupta in sod., 2012). Karakterizacija interakcije ghr-miR397 in njene tarče *GhLAC4* je pri bombažu v času okužbe z glivo *V. dahliae* pokazala njegovo pomembno vlogo v odpornosti. Po okužbi z glivo *V. dahliae* so raziskovalci ugotovili večjo vsebnost lignina pri rastlinah z izbito miR397 v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, medtem ko je prekomerno izražanje miR397 in izbitje gena *GhLAC4* zmanjšalo vsebnost lignina, pri čemer so rastline kazale večjo občutljivost na okužbo z glivo. To nakazuje na pomembno vlogo biosinteze in nalaganja lignina v času okužbe (Wei in sod., 2021).

Nekatere tarče teh miRNK so negativni regulatorji mehanizmov odpornosti, kar pomeni, da lahko povečano izražanje miRNK prispeva k manjšemu izražanju tarč in s tem povečani odpornosti rastlin. Na primer, miR166 in miR165 delujeta tarčno na transkripte genov iz družine HD-ZIP III (angl. Class III homeodomain-leucine zipper). Povečano izražanje miR166 so opazili v apikalnem meristemu korenin pri navadnem repnjakovcu ter opazili večjo aktivnost apikalnega meristema in rast korenin, hkrati pa tudi razvoj sekundarne celične stene in prevajalnega tkiva (Singh in sod., 2014). Progar in sod. (2017) so primerjali transkriptomska profila odporne in občutljive sorte hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfalfae* in opazili 2,3-krat manjše izražanje genov družine HD-

ZIP III v okuženih rastlinah odporne sorte hmelja Wye Target šesti dan po inokulaciji, česar pa niso opazili pri občutljivi sorti Celeia. Slednje nakazuje, da so v proces regulacije genov družine HD-ZIP III v času okužbe potencialno vpletene miR165 in miR166, kar bi lahko botrovalo k opaženi večji odpornosti sorte Wye Target. miR166 je še posebej zanimiva, saj spada v kategorijo miRKA, ki se lahko prenaša med kraljestvi. (Zhang in sod. (2016) so dokazali, da rastline bombaža v odzivu na okužbo z glivo *V. dahliae* povečajo izražanje miR166 in miR159 ter ju prenesejo v hife glive. Prav tako so tudi dokazali, da delujeta tarčno na transkripte glivnih genov *Clp-1* (od Ca²⁺odvisna cisteinska proteaza) in *HiC-15* (izotrihodermin C-15 hidroksilaza), ki sta odgovorna za virulenco glive.

7 miRNK REGULIRAJO IZRAŽANJE GENOV Z REZISTENCO POVEZANIH PROTEINOV

V primeru, da patogeni preidejo prvi nivo obrambe, t.j. PTI in začnejo sproščati efektorske proteine v celice, se aktivira izražanje znotrajceličnih receptorjev, ki jih kodirajo *R* geni. Ti prepoznavajo efektorske proteine in sprožijo ETI (Jones & Dangl, 2006; Thomma in sod., 2011). Glavna skupina *R* proteinov je sestavljena iz NB domene za vezavo nukleotidov in LRR domene bogate s ponovitvami levcina. Kodirajo jih NB-LRR *R*-geni. NB domena preferenčno veže ATP/ADP ali GTP/GDP, domena LRR pa je pogosto vključena v interakcije med proteini (protein-protein) in vezavo ligandov. NB-LRR *R*-gene lahko nadalje, glede na vrsto N-terminalne domene, delimo na receptorje z N-terminalno domeno podobno toll interlevkinu-1 (TIR-NB-LRR) in receptorje z domeno v obliki vijačnice (CC-NB-LRR) (Knepper & Day, 2010).

Tako kot v prejšnjih poglavjih opisane miRNK, ki so odzivne na s patogeni-povezanimi molekularnimi vzorci v prvem nivoju odziva rastlin na patogene (PTI) ter imajo vlogo obrambnih mehanizmov, obstajajo miRNK, ki neposredno ali posredno – z aktivacijo biogeneze sekundarnih siRNK - regulirajo izražanje *R* genov in so odgovorne za uravnavanje prirojene imunosti (Fei in sod., 2013).

Leta 2007 sta Yi in Richards prva poročala o morebitnih učinkih post-transkripcijskega utišanja pri blaženju prekomernega izražanja *R* genov iz kompleksnega lokusa pri navadnem repnjakovcu. Lokus RPP5 (angl. recognition of *Peronospora parasitica* 5) pri navadnem repnjakovcu vsebuje sedem genov iz TIR-NB-LRR družine *R* genov. Dva gena na tem lokusu, imenovana RPP4 in SNC1, zagotavljata odpornost proti bakteriji *P.*

syringae in oomiceti *Hyaloperonospora parasitica* (Pers.) Constant., V študiji sta potrdila, da endogene male RNK, ki nastanejo s prepisom protismiselne verige transkriptov *SNC1*, zavirajo izražanje ostalih genov tega lokusa. Pri mutantih z okvarjenimi komponentami RNKi, kot sta *dcl4* in *ago1*, se je povečalo kopičenje *SNC1* (Yi & Richards, 2007). V nadaljnjih študijah pa so odkrili tudi ostale specifične miRNK, ki posredno, preko indukcije biogeneze sekundarnih sRNK (phasiRNK), regulirajo izražanje NB-LRR genov ter eksperimentalno potrdili in natančneje karakterizirali celotno RNKi pot (Shivaprasad in sod., 2012).

Pri paradižniku so opisali 15 lokusov iz katerih izhajajo phasiRNK, od katerih jih 6 kodira NB-LRR proteine. Avtorji so ugotovili, da miR482 vezana v AGO1 povzroči cepitev mRNK LRR1, proteina tipa CC-NR-LRR, ki se nato obratno prepíše s pomočjo RDR6. Tako nastalo dsRNKA nato DCL4 od začetka mesta cepitve, ki ga določa vezavno mesto miR482, v fazah razreže v 21 nt dolge phasiRNK. Ob okužbi paradižnika z bakterijo *P. syringae* so opazili zmanjšano izražanje miR482 ter sočasno indukcijo *R* genov, kar potencialno ščiti rastline pred napadom patogena (Shivaprasad in sod., 2012). Povečano izražanje miR482 so opazili tudi v interakciji med bombažem in glivo *V. dahliae*, kar je verjetno vodilo do de-represije *R* genov po okužbi ter s tem specifičnega imunskega odziva - ETI na glivno okužbo (Zhu in sod., 2013). Podobno so zmanjšano izražanje te miRNK opazili tudi pri soji, okuženi z oomiceto *Phytophthora sojae* Kaufm. & Gerd. (Wong in sod., 2014). Dodatno so avtorji opisali še dve miRNK; miR2109, ki se veže na motiv TIR1 v mRNK *TIR-NB-LRR* in miR1507, ki deluje na motiv kinaza-2 v mRNK CC-NB-LRR. Za slednji miRNK so ugotovili, da kažeta povečano izražanje pri soji okuženi z *P. sojae*, ne pa pri soji inokulirani z neaktivno obliko seva. To kaže na njuno vlogo uravnavanja ETI odziva, saj lahko dodatno zmanjšanje izražanje teh miRNK vodi v hitro povečanje vsebnosti NB-LRR proteinov ter s tem še bolj intenzivnega odziva na okužbo (Wong in sod., 2014). Na podlagi teh analiz lahko domnevamo, da je regulacija NB-LRR, ki jo posredujejo male RNK, ključna za imunske odzive rastlin.

8 ZAKLJUČEK

Razumevanje delovanja malih RNK je odvisno od identifikacije tarčnih genov ter njihove vloge. Identifikacija siRNK in miRNK ter njihovih tarč postavlja temelje, ki so potrebni za boljšo karakterizacijo kompleksnega omrežja regulatornih interakcij, ki nadzorujejo rast in razvoj ter druge fiziološke procese rastlin in so prav tako vključeni v odziv rastlin na biotske in abiotske dejavni-

ke stresa. Kljub temu, da so bile miRNK odkrite pred približno tremi desetletji, nam je razvoj tehnologije sekvenciranja zelo kratkih RNK omogočil hitro odkritje in postavitve modela delovanja poti RNK interference, ki jo vodijo male interferenčne RNK. Z dobro identifikacijo delovanja nekaterih sRNK pa se vzpostavljajo metode, ki kažejo velik potencial za izboljšave nekaterih lastnosti rastlin. Predvsem pa je poudarek na razvoju strategij za izboljšanje lastnosti rastlin, ki pripomorejo k večji odpornosti agronomsko pomembnih rastlin, ki nam zagotavljajo prehransko varnost.

9 REFERENCE

- Abdel-Ghany, S. E., and Pilon, M. (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15932-15945. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M801406200>
- Axtell, M. J., and Meyers, B. C. (2018). Revisiting criteria for plant microRNA annotation in the era of big data. *Plant Cell*, 30(2), 272-284. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00851>
- Bari, R., and Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473-488. doi: <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Chen, P., Lee, B., and Robb, J. (2004). Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64(6), 283-291. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2004.10.002>
- Cregeen, S., Radišek, S., Mandelc, S., Turk, B., Štajner, N., Jakše, J., and Javornik, B. (2015). Different gene expressions of resistant and susceptible hop cultivars in response to infection with a highly aggressive strain of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(3), 689-704. doi: <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0767-4>
- Cuperus, J. T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R. T., Takeda, A., . . . Carrington, J. C. (2010). Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(8), 997-1003. doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1866>
- Dezulian, T., Palatnik, J. F., Huson, D., and Weigel, D. (2005). Conservation and divergence of microRNA families in plants. *Genome Biology*, 6(P13). doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-11-p13>
- Fei, Q. L., Xia, R., and Meyers, B. C. (2013). Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell*, 25(7), 2400-2415. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114652>
- Gayoso, C., Pomar, F., Novo-Uzal, E., Merino, F., and de Illar-duya, O. M. (2010). The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *BMC Plant Biology*, 10. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-232>
- Guo, H. S., Xie, Q., Fei, J. F., and Chua, N. H. (2005). MicroRNA

- directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *Plant Cell*, 17(5), 1376-1386. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.030841>
- Gupta, O. P., Permar, V., Koundal, V., Singh, U. D., and Praveen, S. (2012). MicroRNA regulated defense responses in *Triticum aestivum* L. during *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* infection. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 817-824. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0803-5>
- Gupta, O. P., Sharma, P., Gupta, R. K., and Sharma, I. (2014). Current status on role of miRNAs during plant-fungus interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 85, 1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2013.10.002>
- Henderson, I. R., Zhang, X. Y., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C., Green, P. J., and Jacobsen, S. E. (2006). Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature Genetics*, 38(6), 721-725. doi: <https://doi.org/10.1038/ng1804>
- Hrnčić, M. K., Spaninger, E., Košir, I. J., Knez, Z., and Bren, U. (2019). Hop compounds: extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. *Nutrients*, 11(2), 275. doi: <https://doi.org/10.3390/nu11020257>
- Hu, G., Lei, Y., Liu, J. F., Hao, M. Y., Zhang, Z. N., Tang, Y., . . . Wu, J. H. (2020). The ghr-miR164 and GhNAC100 modulate cotton plant resistance against *Verticillium dahlia*. *Plant Science*, 293. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110438>
- Huang, J. H., Qi, Y. P., Wen, S. X., Guo, P., Chen, X. M., and Chen, L. S. (2016). Illumina microRNA profiles reveal the involvement of miR397a in Citrus adaptation to long-term boron toxicity via modulating secondary cell-wall biosynthesis. *Scientific Reports*, 6. doi: <https://doi.org/10.1038/srep22900>
- IHGC. (2019). International Hop Growers' Convention: economic commission - summary reports. Retrieved 22.11.2019, 2019, from http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2019%20APR%20IHGC%20EC%20Report_final.pdf
- Jia, Y. B., Kong, X. P., Hu, K. Q., Cao, M. Q., Liu, J. J., Ma, C. L., . . . Ding, Z. J. (2020). PIFs coordinate shade avoidance by inhibiting auxin repressor ARF18 and metabolic regulator QQS. *New Phytologist*, 228(2), 609-621. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.16732>
- Jones-Rhoades, M. W., and Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14(6), 787-799. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.027>
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. doi: <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Khraiweh, B., Zhu, J. K., and Zhu, J. H. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137-148. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbarm.2011.05.001>
- Knepper, C., and Day, B. (2010). From perception to activation: The molecular-genetic and biochemical landscape of disease resistance signaling in plants. *The Arabidopsis Book*, 8(e0124), 1-17. doi: <https://doi.org/10.1199/tab.0124>
- Kunej, U., Jakše, J., Radišek, S., and Štajner, N. (2021). Identification and characterization of *Verticillium nonalfalfae*-responsive microRNAs in the roots of resistant and susceptible hop cultivars. *Plants-Basel*, 10(9). doi: <https://doi.org/10.3390/plants10091883>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J. J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23(20), 4051-4060. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Li, Y., Jeyakumar, J. M. J., Feng, Q., Zhao, Z. X., Fan, J., Khaskheli, M. I., and Wang, W. M. (2019). The roles of rice microRNAs in rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Phytopathology Research*, 1(1). doi: <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0040-8>
- Li, Y., Lu, Y. G., Shi, Y., Wu, L., Xu, Y. J., Huang, F., . . . Wang, W. M. (2014). Multiple rice microRNAs are involved in immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Physiology*, 164(2), 1077-1092. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.113.230052>
- Mallory, A. C., Bartel, D. P., and Bartel, B. (2005). MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*, 17(5), 1360-1375. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031716>
- Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D. W., Hansen, J. E., Alexander, A. L., . . . Carrington, J. C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, 133(1), 128-141. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.033>
- Natarajan, B., Kalsi, H. S., Godbole, P., Malankar, N., Thiagarayaselvam, A., Siddappa, S., . . . Banerjee, A. K. (2018). MiRNA160 is associated with local defense and systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* infection in potato. *Journal of Experimental Botany*, 69(8), 2023-2036. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/ery025>
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., . . . Jones, J. D. G. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436-439. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1126088>
- Neve, R. A. (1991). *Hops*. Dordrecht, Netherlands: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-3106-3>
- Padmanabhan, M., Cournoyer, P., and Dinesh-Kumar, S. P. (2009). The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cellular Microbiology*, 11(2), 191-198. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01260.x>
- Progar, V., Jakše, J., Štajner, N., Radišek, S., Javornik, B., and Berne, S. (2017). Comparative transcriptional analysis of hop responses to infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Cell Reports*, 36(10), 1599-1613. doi: <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2177-1>
- Quint, M., and Gray, W. M. (2006). Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(5), 448-453. doi: [10.1016/j.pbi.2006.07.006](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.006)
- Radišek, S., Jakše, J., and Javornik, B. (2004). Development

- of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Disease*, 88(10), 1115-1122. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.10.1115>
- Radišek, S., Jakše, J., and Javornik, B. (2006). Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology*, 116(4), 301-314. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9061-0>
- Ren, G. D., Xie, M., Zhang, S. X., Vinovskis, C., Chen, X. M., and Yu, B. (2014). Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylyates 5' RNA fragments generated by AGO1 cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(17), 6365-6370. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1405083111>
- Saurabh, S., Vidyarthi, A. S., and Prasad, D. (2014). RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*, 239(3), 543-564. doi: <https://doi.org/10.1007/s00425-013-2019-5>
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J. N., and Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4(4), 519-537. doi: <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>
- Shen, D., Suhrkamp, I., Wang, Y., Liu, S. Y., Menkhaus, J., Verreet, J. A., . . . Cai, D. G. (2014). Identification and characterization of microRNAs in oilseed rape (*Brassica napus*) responsive to infection with the pathogenic fungus *Verticillium longisporum* using *Brassica AA* (*Brassica rapa*) and *CC* (*Brassica oleracea*) as reference genomes. *New Phytologist*, 204(3), 577-594. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.12934>
- Shivaprasad, P. V., Chen, H. M., Patel, K., Bond, D. M., Santos, B. A. C. M., and Baulcombe, D. C. (2012). A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell*, 24(3), 859-874. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.111.095380>
- Singh, A., Singh, S., Panigrahi, K. C. S., Reski, R., and Sarkar, A. K. (2014). Balanced activity of microRNA166/165 and its target transcripts from the class III homeodomain-leucine zipper family regulates root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 33(6), 945-953. doi: <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1573-z>
- Song, L., Axtell, M. J., and Fedoroff, N. V. (2010). RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 20(1), 37-41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.076>
- Steenackers, B., De Cooman, L., and De Vos, D. (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chemistry*, 172, 742-756. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>
- Talboys, P. W. (1958a). Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Transaction of the British Mycological Society*, 41, 249-260. doi: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(58\)80037-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(58)80037-6)
- Talboys, P. W. (1958b). Degradation of cellulose by *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 41(2), 242-248. doi: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(58\)80036-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(58)80036-4)
- Thomma, B. P. H. J., Nurnberger, T., and Joosten, M. H. A. J. (2011). Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*, 23(1), 4-15. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082602>
- Wagner, E. G. H., and Simons, R. W. (1994). Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annual Review of Microbiology*, 48, 713-742. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.003433>
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., and Dong, X. N. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*, 17(20), 1784-1790. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.09.025>
- Wang, J. W., Wang, L. J., Mao, Y. B., Cai, W. J., Xue, H. W., and Chen, X. Y. (2005). Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17(8), 2204-2216. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033076>
- Wei, T. P., Tang, Y., Jia, P., Zeng, Y. M., Wang, B. T., Wu, P., . . . Wu, J. H. (2021). A cotton lignin biosynthesis gene, *GhLAC4*, fine-tuned by ghr-miR397 modulates plant resistance against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Science*, 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.743795>
- Wong, J., Gao, L., Yang, Y., Zhai, J. X., Arikait, S., Yu, Y., . . . Ma, W. B. (2014). Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection. *Plant Journal*, 79(6), 928-940. doi: <https://doi.org/10.1111/tpj.12590>
- Yadeta, K., and Thomma, B. P. H. J. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097>
- Yang, L., Jue, D. W., Li, W., Zhang, R. J., Chen, M., and Yang, Q. (2013). Identification of MiRNA from eggplant (*Solanum melongena* L.) by small RNA deep sequencing and their response to *Verticillium dahliae* Infection. *Plos One*, 8(8). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072840>
- Yang, Z. Y., Ebright, Y. W., Yu, B., and Chen, X. M. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 667-675. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkj474>
- Yi, H., and Richards, E. J. (2007). A cluster of disease resistance genes in *Arabidopsis* is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. *Plant Cell*, 19(9), 2929-2939. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051821>
- Yu, L., Guo, R. K., Jiang, Y. Q., Ye, X. H., Yang, Z. H., Meng, Y. J., and Shao, C. G. (2019). Identification of novel phasiRNAs loci on long non-coding RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genomics*, 111(6), 1668-1675. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.11.017>
- Zhang, T., Zhao, Y. L., Zhao, J. H., Wang, S., Jin, Y., Chen, Z. Q., . . . Guo, H. S. (2016). Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants*, 2(10). doi: <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.153>
- Zhao, J. P., Jiang, X. L., Zhang, B. Y., and Su, X. H. (2012). Involvement of microRNA-mediated gene expression regulation in the pathological development of stem canker dis-

ease in *Populus trichocarpa*. *Plos One*, 7(9). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044968>
Zhu, Q. H., Fan, L. J., Liu, Y., Xu, H., Llewellyn, D., and Wilson, I. (2013). miR482 regulation of NBS-LRR defense genes

during fungal pathogen infection in cotton. *Plos One*, 8(12). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084390>