

PAULINA GLAZIŃSKA, JAKUB BRACHA, EMILIA WILMOWICZ, JAN KOPCEWICZ

*Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Gagarina 9, 87-100 Toruń
E-mail: pnowa@umk.pl
emwil@umk.pl
kopcew@biol.uni.torun.pl*

UDZIAŁ MIKRO RNA W ROZWOJU GENERATYWNYM ROŚLIN*

WSTĘP

Przez wiele lat RNA było uważane jedynie za cząsteczkę przejściową między DNA a białkami lub pełniącą funkcjonalną rolę podczas procesów splicingu i translacji. Jednak już w 1961 r. Francois Jacob i Jacques Monod wysnuili bardzo śmiałą wówczas hipotezę, iż cząsteczki RNA mogą brać udział w regulacji ekspresji genów. Według tej hipotezy kodowane przez geny regulatorowe cząsteczki RNA mogłyby łączyć się na zasadzie komplementarności z docelowymi sekwencjami DNA i wpływać na proces transkrypcji lub na procesy post-transkrypcyjne łącząc się z mRNA. Przypuszczenia te zostały jednak szybko zapomniane po tym jak dowiedziono, iż to kompleksy białkowe biorą udział w kontroli niemalże wszystkich etapów ekspresji genów (BONNET i współaut. 2006). Dopiero wyniki badań ostatnich lat wykazały obecność w genomie roślin i zwierząt niezliczonej ilości niekodujących białka, małych sRNA (ang. small RNA, sRNA). W większości są to 20–27 nukleotydowe odcinki RNA,

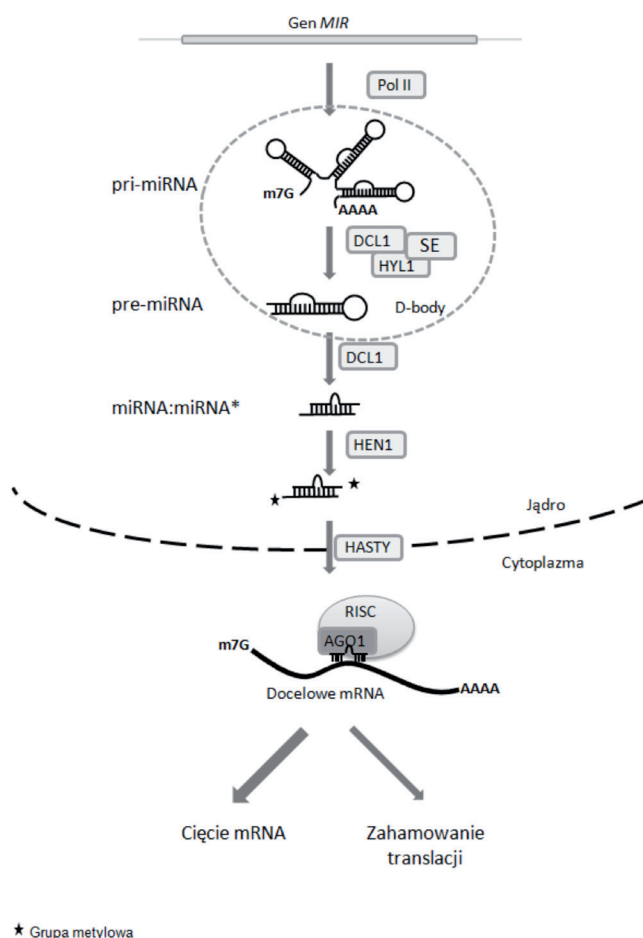
które poprzez hamowanie translacji lub degradowanie mRNA są zaangażowane w ogromną ilość biologicznych procesów takich jak np. stabilizacja genomu, regulacja rozwoju czy odpowiedź adaptacyjna wywołana biotycznym i abiotycznym stresem (ZHANG i współaut. 2007, CHUCK i współaut. 2009). Jednym z rodzajów sRNA są kodowane endogennie cząsteczki mikro-RNA. MiRNA (ang. microRNA) są to 20–25 nukleotydowe odcinki RNA, regulujące ekspresję genów posiadających fragment sekwencji komplementarny do nich, nie oddziałując przy tym na geny, z których zostały transkrybowane. Wstępny model, który został stworzony w oparciu o badania nad organizmem *C. elegans*, a w szczególności regulacją genów *lin-4* i *let-7* przez miRNA, zakładał iż regulatorowe miRNA indukują represję translacji. Późniejsze badania ujawniły, iż cząsteczki miRNA kierują również degradacją docelowego mRNA (REINHART i współaut. 2002).

BIOGENEZA ROŚLINNYCH MIKRO RNA

Proces biogenezy miRNA jest wieloetapowy i wymaga obecności kilku kompleksów enzymatycznych. Większość roślinnych miRNA powstaje z własnych jednostek transkryp-

cyjnych, a geny *MIR* ulegają transkrypcji przy udziale polimerazy II RNA. W wyniku tego procesu powstaje pierwotny transkrypt pri-miRNA, o długości od setek do tysięcy nukle-

*Publikacja finansowana z grantu MNiSW N303 321637



Ryc. 1. Schemat biogenezy i działania miRNA u roślin.

Roślinne pri-miRNA transkrybowane przez pol II ulega dojrzewaniu na terenie ciał jądrowych D-body. Powstały dupleks miRNA długości 21–24 pz jest metylowany i transportowany do cytoplazmy, gdzie pojedyncza nica jest włączana do kompleksu białkowego RISC i pośredniczy w cięciu bądź zahamowaniu translacji mRNA genu docelowego (wg VOINNET 2009, zmodyfikowana).

otydów (LEE i współaut. 2004, DU i ZAMORE 2005). Pri-miRNA może zawierać introny, być poliadenylowany i posiadać na końcu 5' czapkę. Następnie, przy udziale kompleksu zawierającego białko DCL1 (DICER-LIKE) i HYL1 (HYPOPLASTIC LEAVES 1) oraz białko SE (SERATE), generowana jest cząsteczka pre-miRNA, która zbudowana jest z kilkudziesięciu nukleotydów i tworzy drugorzędową strukturę pętli z ogonem, określaną jako spinka do włosów, gdzie sekwencja dojrzałego miRNA zawarta jest w jednym z ramion ogona (DU i ZAMORE 2005, JONES-RHOADES i współaut. 2006, VOINNET 2009). Proces ten odbywa się na terenie ciał jądrowych opisywanych jako D-bodies (FANG i SPECTOR 2007). Kolejne cięcie prowadzi do powstania duplexu miRNA:miRNA* o długo-

ści 21–24 nt. z 2-nukleotydowymi, wystającymi końcami 3', które zostają zmetylowane przez niskocząsteczkową metylotransferazę HEN1 (HUA ENHANCER 1) (CHEN 2005, DU i ZAMORE 2005, TKACZUK i współaut. 2006). Zmetylowany dupleks zostaje przetransportowany przy udziale białka nukleocytoplazmatycznego HST (HASTY) z jądra do cytoplazmy (CHEN 2005, DU i ZAMORE 2005, JONES-RHOADES i współaut. 2006). W cytoplazmie jedna z nici ulega degradacji (miRNA*), natomiast druga (dojrzałe miRNA) wchodzi w skład białkowego kompleksu RISC (ang. RNA-induced silencing complex), który wiąże się do mRNA docelowego genu (Ryc. 1.) (CHEN 2005, DU i ZAMORE 2005, VOINNET 2009).

MOLEKULARNY MECHANIZM REGULACJI EKSPRESJI GENÓW PRZEZ MIKRO RNA

Powstanie kompleksu RISC jest punktem wyjścia do regulacji aktywności genów docelowych. RISC jest rybonukleoproteinowym kompleksem o wielkości ok. 500 kDa, w

skład którego wchodzi dojrzałe miRNA, białko z rodziny AGO (ARGONAUTE) oraz szereg innych białek, takich jak białko VIG (ang. VASA INTRONIC GENE) wiążące RNA, Fragi-

le-X, egzonukleaza Tudor-SN oraz różne helikazy (VOINNET 2009). Z badań wynika, iż kluczowym elementem RISC są białka z rodziny ARGONAUTE. Białka te, wielkości około 150 kDa, posiadają dwie charakterystyczne, zachowywane ewolucyjnie, domeny PAZ i PIWI. PAZ jest domeną wiążącą nić miRNA od strony 3', natomiast C-końcowa domena PIWI jest odpowiedzialna za przyłączenie miRNA od strony 5'. Oddziaływanie między cząsteczkami od strony tej domeny jest bardzo stabilne, ponadto budowa domeny PIWI jest podobna do struktury enzymu RNazy H i zawiera domenę DDH (Arg-Arg-His). W tej właściwości białek AGO upatruje się prawidłowe działanie kompleksu RISC. Dzięki stabilizacji i enzymatycznej aktywności domeny PIWI, mRNA genu docelowego jest cięte w charakterystycznym miejscu, między 10 a 11 nt. związanego miRNA (DU i ZAMORE 2005, BAUMBERGER i BAULCOMBE 2005, RONEMUS i współaut. 2006). Powstałe w wyniku przecięcia dwa fragmenty mRNA ulegają degradacji przez egzonukleazy komórkowe (KIDNER i MARTIENSSEN 2005). Ce-

chę charakterystyczną procesu wyciszania genów u roślin jest to, iż docelowa cząsteczka mRNA posiada jedno, zazwyczaj bardzo konserwatywne ewolucyjnie, miejsce komplementarne do pojedynczego miRNA w regionie kodującym (RHOADES i współaut. 2002, BARTEL 2004). Do związania miRNA i uruchomienia procesu wyciszania niezbędna jest jedynie częściowa komplementarność sekwencji, komplementarne nukleotydy tworzą zaledwie 6–10 nt. nieprzerwane duplekisy, niekomplementarne nukleotydy zazwyczaj występują w części 3' cząsteczki miRNA. Wykazano, że wiązanie od strony 5' miRNA decyduje o efektywności cięcia docelowego mRNA (VAUCHERET 2006). Przypuszcza się, iż gdy sekwencja miRNA w pełni lub prawie w pełni odpowiada fragmentowi docelowej cząsteczki mRNA, podstawowym mechanizmem regulacji genów zależnym od miRNA jest cięcie mRNA, gdy komplementarność jest niewystarczająca (ok. 4 niesparowane nukleotydy) miRNA powoduje zahamowanie translacji (ZHANG i współaut. 2007, VOINNET 2009).

FUNKCJA miRNA

Cząsteczki miRNA odgrywają ważną rolę w regulacji wielu procesów wzrostowo-rozwojowych u roślin. Wpływają na właściwe różnicowanie się organów, są niezbędne dla prawidłowego rozwoju prawie wszystkich

rodzajów tkanek, odpowiadają za transdukcję sygnałów oraz odpowiedź rośliny na działanie stresu środowiskowego. Mutacje prowadzące do utraty funkcji genów odpowiedzialnych za proces biogenezy mikro RNA prowa-

Tabela 1. Zestawienie dotychczas opisanych miRNA zaangażowanych w rozwój generatywny *Arabidopsis thaliana* oraz ich geny docelowe (AUKERMAN i SAKAI 2003, ACHARD i współaut. 2004, LAUFS i współaut. 2004, KIDNER i MARTIENSSEN 2005, MILLAR i GUBLER 2005, WU i POETHIG 2006).

miRNA	Funkcja	Geny docelowe
159	Regulacja czasu kwitnienia i rozwój pręcików	Czynniki transkrypcyjne <i>GAMYB</i>
172	Regulacja czasu kwitnienia i tworzenia kwiatu	Czynniki transkrypcyjne <i>APETALA2 (AP2)</i> oraz podobne do <i>AP2</i> : <i>TARGET OF EAT1 (TOE1)</i> , <i>TOE2</i> , <i>SHNARCHZAPFEN (SNZ)</i> , <i>SCHLAFMUTZE (SMZ)</i>
156	Regulacja czasu kwitnienia	Czynniki transkrypcyjne z rodziny <i>SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE)</i>
164	Regulacja separacji organów kwiatowych i ich liczby	Czynniki transkrypcyjne <i>CUC (CUP-SHAPED COTYLEDON)</i>
167	Regulacja rozwoju pręcikowia i słupkowia	<i>AUXIN RESPONSE FACTOR 6 (ARF6)</i> , <i>ARF8</i>

dążą do wielu nieprawidłowości w rozwoju. Najczęściej spotykanymi efektami u roślin są: zahamowanie rozwoju we wczesnych fazach embrionalnych, zmiany kształtu i morfologii organów oraz sterylność. Częsteczki miRNA zaangażowane są także w kontrolę przejścia

z wegetatywnej do generatywnej fazy rozwoju oraz prawidłowe wykształcenie się kwiatów i nasion (Tabela 1) (ZHANG i współaut. 2007, CHUCK i współaut. 2009, WOLLMANN i WEIGEL 2010).

ROZWÓJ GENERATYWNY ROŚLIN

Przejście z wegetatywnej do generatywnej fazy rozwoju odbywa się w kilku następujących po sobie etapach. W pierwszej kolejności, w odpowiedzi na sygnały zarówno środowiskowe jak i endogenne, roślina zostaje zaindukowana do kwitnienia. Proces ten kontrolowany jest przez dużą grupę genów czasu kwitnienia tworzących kilka szlaków indukcji kwitnienia, z których najlepiej scharakteryzowanymi są: szlak giberelinowy, autonomiczny, wernalizacyjny, fotoperiodyczny oraz zależny od jakości światła (QUESADA i współaut. 2005, IMAIZUMI i KAY 2006). Następnie, sygnały pochodzące z różnych szlaków są integrowane i prowadzą do aktywacji małej grupy genów tożsamości merystemu (merystem wegetatywny przekształca się w merystem generatywny) (PARCY 2005). Trzeci etap dotyczy aktywacji genów tożsamości organów kwiatowych w odrębnych miejscach przekształca-

jącego się wierzchołka wzrostu. Ostatecznie, geny tożsamości organów kwiatowych aktywują geny znajdujące się pod ich kontrolą, które różnicują komórki i tkanki tworzące organy kwiatowe: działki kielicha, płatki korony, pręciki i słupki (JACK 2004). Ten niezmiernie ważny i skomplikowany proces wymaga szeregu mechanizmów kontrolujących, angażujących nie tylko zmiany aktywności genów na poziomie transkrypcji, ale również na poziomie potranskrypcyjnym i potranslacyjnym. Geny związane z tym procesem kodują, poza czynnikami transkrypcyjnym, również białka zaangażowane w remodelowanie chromatyny, dojrzewanie mRNA, a także mikro RNA (QUESADA i współaut. 2005). Dotychczas udział mikro RNA opisano w dwóch szlakach, fotoperiodycznym i giberelinowym, a także w regulacji rozwoju kwiatu (GOCAL i współaut. 2001, JUNG i współaut. 2007).

MIR172 – REGULATOR EKSPRESJI GENÓW *AP2* I PODOBNYCH DO *AP2*

Liczne badania ostatnich lat wykazały, że miR172 jest zaangażowany w regulację rozwoju generatywnego różnych gatunków roślin zarówno na poziomie indukcji kwitnienia, jak i tworzenia kwiatu. MiR172 został włączony do szlaku fotoperiodycznej indukcji kwitnienia i powiązany z funkcjonowaniem modelu ABCE tworzenia kwiatu (CHEN 2004).

Genom *A. thaliana* posiada 5 genów kodujących miR172 (miR172a-1, -a-2, -b, -c i -d). Wykazują one komplementarność do mRNA genu tożsamości merystemu kwiatowego *AP2* (*APETALA2*) i rodziny genów podobnych do *AP2*. mRNA genu *AP2* koduje białko należące do roślinnych czynników transkrypcyjnych z rodziny *APETALA2* i zawiera dwie domeny AP (AUKERMAN i SAKAI 2003). 21-nukleotydowy miR172 ma zdolność tworzenia dupleksów z sekwencją bliską końca 3' kodującego regionu *AP2* (CHEN 2004). Do grupy

genów podobnych do *AP2* zidentyfikowanych u rzodkiewnika, posiadających miejsce wiązania miR172, należą *TOE1* (*TARGET OF EAT1*), *TOE2*, *TOE3*, *SMZ* (*SCHLAUFMUTZE*) i *SNZ* (*SCHNARCHZAPFEN*) (AUKERMAN i SAKAI 2003).

Nadekspresja genu *MIR172* powoduje powstanie fenotypu właściwego dla mutantu *ap2*, charakteryzującego się brakiem płatków korony, przekształcaniem działek kielicha w słupki oraz, co nie jest typowe dla mutacji w genie *AP2*, wczesnym zakwitaniem (CHEN 2004).

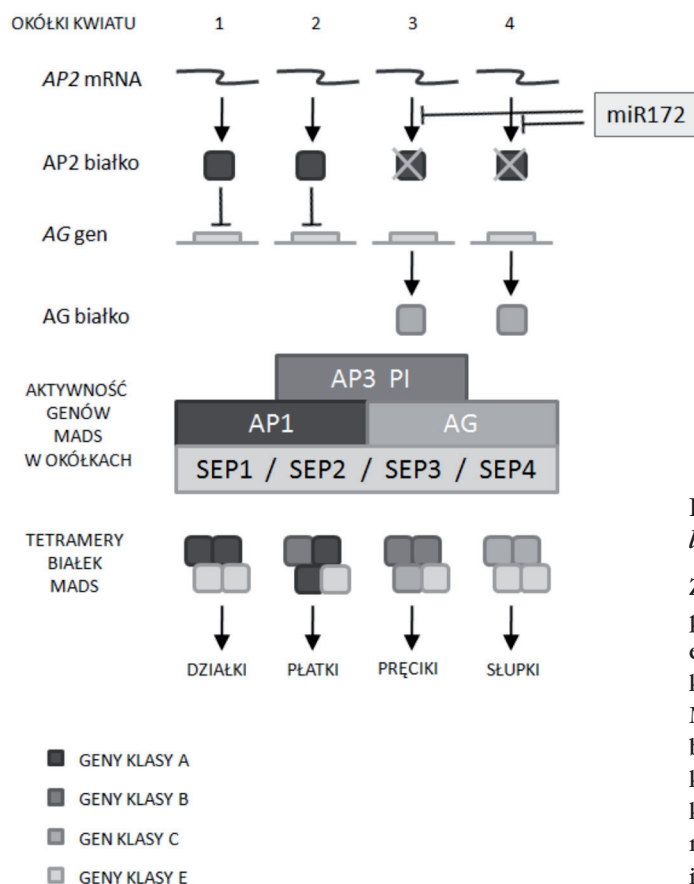
Fenotypowe zmiany w budowie kwiatu u roślin z nadekspresją *MIR172* są związane z regulowaną poprzez miR172 ekspresją genu *AP2*. Należy on do genów tożsamości organów kwiatowych, których ekspresja, opisywana modelem ABCE u *A. thaliana*, powoduje formowanie określonych organów kwiatowych w obrębie merystemu ge-

neratywnego. Model ABCE rozwoju kwiatu przewiduje, że rozwój czterech okółków kwiatu jest kontrolowany przez cztery typy genów homeotycznych A, B, C i E. Każdy z okółków określany jest aktywnością jednego lub dwóch genów homeotycznych. Gen klasy A warunkuje powstawanie działek, geny klasy A i B płatków, B i C pręcików, a gen klasy C słupka. Mutacja w obrębie któregoś z tych genów powoduje powstanie kwiatów, w których okółki są przemieszczone. Klasa A genów określa tożsamość działek kielicha i płatków korony oraz hamuje aktywność genów klasy C w okółku 1 i 2. U *Arabidopsis* zidentyfikowano dwa geny klasy A: *AP1* oraz *AP2*. Geny klasy B, do których należą: *AP3* oraz *PI* (*PISTILLATA*), są wymagane do różnicowania płatków korony w okółku 2 i pręcików w okółku 3. Gen klasy C – *AG* (*AGAMOUS*), jest niezbędny do różnicowania pręcików i słupków. Ważną funkcją białka *AG* jest także hamowanie aktywności genów klasy A w okółku 3 i 4. Równie ważna dla prawidłowego rozwoju organów kwiatowych jest klasa E. Do tej grupy genów tożsamości organów kwiatowych należą, odpowiedzialne za aktywację genów klasy B i C, geny z rodziny *SEP* (*SEPALATA*) (JACK 2004). Wszystkie białka modelu ABCE, oprócz *AP2*, to czynniki transkrypcyjne zawierające domenę MADS. Wszystkie poznane do tej pory białka MADS wiążą się do DNA jako homo- lub heterologiczne kompleksy. Białka MADS, biorące udział w określaniu tożsamości poszczególnych organów kwiatowych działają jako tetramery. Opierając się na tej zdolności białek MADS model powstawania organów kwiatowych ABCE zakłada, że działki kielicha są określane poprzez aktywność tetrameru zbudowanego z białek *AP1/AP1/SEP4/SEP4*, płatki korony przez połączoną aktywność białek *AP3/PI/SEP/AP1*, pręciki poprzez aktywność białek *AP3/PI/SEP/AG*, słupki natomiast poprzez *AG/AG/SEP/SEP* (JACK 2004). Wzajemna represja pomiędzy genami klasy A i C jest jedną z podstawowych zasad funkcjonowania modelu ABCE. Aktywność białka *AP2* (klasa A) wymagana jest do hamowania aktywności *AG* (klasa C) w okółku pierwszym i drugim (CHEN 2004). Okazało się, że mRNA *AP2* wykrywano we wszystkich okółkach kwiatowych, lecz białko zlokalizowane jest tylko w okółku pierwszym i drugim (SCHMID i współaut. 2003). Szczegółowe badania wykazały, że ekspresja genu *AP2* regulowana jest przez miR172 (JACK 2004). Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genu *AP2* związana

jest z zahamowaniem translacji poprzez działanie miR172 w okółku trzecim i czwartym. Wiązanie się miR172 do docelowej sekwencji w mRNA *AP2* prowadzi do zahamowania translacji i w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia ilości białka *AP2*. Dzięki temu możliwe staje się prawidłowe różnicowanie organów kwiatowych, gdyż wyeliminowanie *AP2* umożliwia działanie genu klasy C: *AGAMOUS*, niezbędnego do wytworzenia pręcików i słupków (Ryc. 2) (CHEN 2004).

Drugą cechą fenotypową roślin z nadekspresją *MIR172*, a mianowicie wcześniejsze zakwitanie, jest związane z regulacją aktywności innych genów docelowych dla miR172 niż *AP2*, a mianowicie *TOE1*, 2; *SMZ* i *SNZ*. Geny te są represorami kwitnienia u *A. thaliana*. Nadekspresja 35S:*TOE1* opóźnia kwitnienie, natomiast podwójne mutanty *toe1toe2* kwitną znacznie wcześniej. Podobne efekty powoduje nadekspresja genów *SMZ* i *SNZ* (CHEN 2004). miR172 i jego gen docelowy *TOE1* od niedawna włączany jest do szlaku indukcji kwitnienia zależnego od fotoperiodu. Szlak fotoperiodyczny kwitnienia uruchamiany jest u roślin w warunkach odpowiedniego dla gatunku fotoperiodu (np. dla *A. thaliana* w warunkach dnia długiego ang. LD). Światło bezpośrednio lub pośrednio, poprzez zegar okołodobowy oraz białko GI (*GIGANTEA*), aktywuje ekspresję genu *CO* (*CONSTANS*), który jest pozytywnym regulatorem genów integratorów (wiążących działanie kilku szlaków indukcji kwitnienia), a mianowicie *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) i *SOC1* (*SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CO1*) (PARCY 2005, IMAIZUMI i KAY 2006). U *A. thaliana* białko FT, którego ekspresja zachodzi w komórkach towarzyszących floemu liści, jest transportowane do wierzchołka wzrostu (HAYAMA i COUPLAND 2004, JAEGER i WIGGE 2007, WOJCIECHOWSKI i współaut. 2007), gdzie w kompleksie z białkiem FD powoduje aktywację genów tożsamości merystemu kwiatowego, m.in. *AP1* i *CAL* (*CAULIFLOWER*) (IMAIZUMI i KAY 2006).

Badania aktywności miR172 oraz jego genu docelowego *TOE1* wykazały, że jest on związany z fotoperiodyczną indukcją kwitnienia u *A. thaliana* poprzez regulację ekspresji genu *FT*, a ilość miR172 kontrolowana jest przez białko GI. Co ciekawe akumulacja miR172 nie jest uzależniona od aktywności genu *CO*. Ponadto zbadano poziom dojrzałego miR172 oraz transkryptu genu *MIR172a* u mutantów *gi-2* (mutacja



Ryc. 2. Model ABCE rozwoju kwiatu *A. thaliana* z uwzględnieniem udziału miR172.

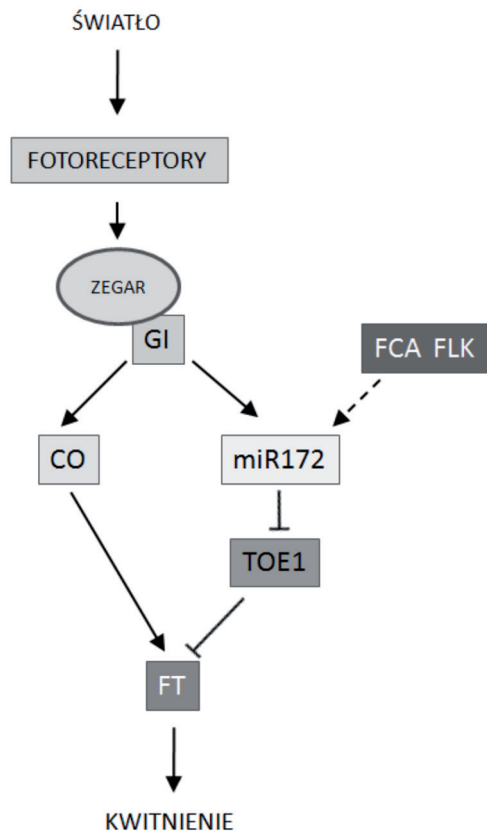
Zahamowanie translacji na matrycy mRNA *AP2* przy udziale miR172 w okółkach 3 i 4 aktywuje ekspresję genu *AG* w tych okółkach. W konsekwencji możliwa jest właściwa ekspresja genów MADS modelu ABCE i powstanie tetramerów białek MADS stanowiących kompleksy transkrypcyjne odpowiedzialne za aktywację genów kontrolujących tworzenie poszczególnych elementów kwiatu (CHEN 2004, JACK 2004, CHUCK i współaut. 2009).

w genie *GIGANTEA*). Okazało się, że ilość miR172 wzrasta po przeniesieniu roślin z warunków SD (ang. short day) do LD, jednakże wzrost ten jest nieznaczny w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Natomiast ilość transkryptu *MIR172a* była wyższa u mutantów *gi-2* w warunkach SD, niż u roślin typu dzikiego. Dodatkowo malała po przeniesieniu roślin do indukcyjnego fotoperiodu (LD). Wyniki te stanowią podstawę twierdzenia, że białko GI reguluje ilość miR172 na etapie dojrzewania mikro RNA, a nie transkrypcji. Ponadto okazało się, że mutacja w dwóch genach szlaku autonomicznego, a mianowicie *FCA* (*FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN FCA ALPHA*) i *FLK* (*FLOWERING LOCUS KH DOMAIN*), powoduje zmniejszenie akumulacji miR172, co sugeruje powiązanie tego mikro RNA ze szlakiem autonomicznym. Ten sam zespół badawczy wykazał, że nadekspresja *TOE1* powoduje obniżenie ilości mRNA *FT*, *AP1* i *Lfy*, jednak nie zmienia akumulacji transkryptów genów *CO* i *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*). Ponadto autorzy wykazali, że miR172 reguluje ilość mRNA *TOE1*.

Wskazuje to na istnienie dwóch szlaków zakwitania związanych z długością dnia regulowanych przez *GI*. W pierwszym uczestniczy gen *CO*, natomiast drugi związany jest z aktywnością miR172 (Ryc. 3) (JUNG i współaut. 2007).

Miejsca komplementarne do miR172 zidentyfikowano również w transkryptach genów z rodziny *AP2* występujących u innych gatunków roślin. Do grupy tej zaliczamy, opisany u kukurydzy, gen *IDS1* (*INDETERMINATE SPIKELET1*) determinujący ilość kwiatów w kwiatostanie (CHUCK i współaut. 1998). Kolejny gen z rodziny *AP2*, występujący u *Zea mays*, także regulowany przez miR172, a mianowicie *GL15* (*GLOSSY15*), odgrywa istotną funkcję w utrzymaniu fazy młodocianej (LAUTER i współaut. 2005). U tytoniu miR172 reguluje czas kwitnienia roślin oraz powodując cięcie docelowych mRNA (*AP2* i innych z tej rodziny genów) w zewnętrznych okółkach kwiatu, wpływa na zmianę lokalizacji tkankowej aktywności genów *DEF* i *GLO* należących do klasy B u tytoniu (MŁOTSHWA i współaut. 2006).

MIR156 W POTRANSKRYPCYJNEJ REGULACJI GENÓW *SPL*



Ryc. 3. Schemat niezależnego od białka CO udziału miR172 w fotoperiodycznym szlaku kwitnienia *A. thaliana*.

Aktywność miR172 oraz jego genu docelowego *TOE1* jest związana z fotoperiodyczną indukcją kwitnienia *A. thaliana* poprzez regulację ekspresji *FT*, a ekspresja miR172 kontrolowana jest przez gen *GI*. Akumulacja miR172 nie jest uzależniona od *CO*, co wskazuje na istnienie unikalnego szlaku w fotoperiodycznej indukcji kwitnienia. Dodatkowo mutacja w dwóch genach szlaku autonomicznego, a mianowicie *FCA* i *FLK* powoduje zmniejszenie akumulacji miR172 co sugeruje powiązanie tego miRNA ze szlakiem autonomicznym (wg JUNG i wsp. 2007, zmodyfikowana).

MiR156 jest drugim, obok miR172, mikro RNA wiążanym z fotoperiodyczną indukcją

kwitnienia *A. thaliana* (SCHMID i wsp. 2003).

Podczas kwitnienia wzrasta ekspresja grupy genów *SPL* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE*), w szczególności *SPL3*, *SPL4* i *SPL5*. Aktywność tych genów regulowana jest przez *CO* i *FT*, co wskazuje na ich udział w regulacji czasu zakwitania poprzez szlak fotoperiodyczny (SCHMID i wsp. 2003, YAMAGUCHI i wsp. 2009). Analizy komputerowe sekwencji mRNA *SPL3*, 4 i 5 wykazały istnienie w regionie 3' UTR miejsca komplementarnego do miR156, co umożliwiałoby specyficzną regulację ekspresji tych genów przez miRNA podczas rozwoju rośliny (SCHWAB i wsp. 2005, WU i POETHIG 2006). To teoretyczne założenie potwierdziły badania, które wykazały, że nadekspresja *MIR156* powoduje opóźnienie kwitnienia i obniżenie ekspresji genów *SPL* kodujących transkrypty zawierające miejsce wiązania miR156 (SCHWAB i wsp. 2005).

Geny *SPL3*, *SPL4* i *SPL5* wykazują synergistyczną funkcję w regulacji indukcji kwitnienia u *Arabidopsis*. Szczegółowe badania wykazały, że białko *SPL3* rozpoznaje zachowywaną ewolucyjnie sekwencję w regionie promotorowym genu tożsamości merystemu *AP1* u *Arabidopsis*. Podobnie, jak w przypadku genu *AP1*, konstytutywna ekspresja *SPL3* przejawia się wczesnym kwitnieniem roślin (YAMAGUCHI i wsp. 2009). Nadekspresja *MIR156*, hamując aktywność *SPL3*, prowadzi do szybkiego rozwoju liści rozetowych, zmniejszenia dominacji wierzchołkowej i opóźnienia kwitnienia. Ponadto transgeniczne rośliny z ekspresją *SPL3* oraz ze zmienionym miejscem docelowym dla miR156 (*35S:mSPL3*) lub brakiem 3' UTR (*35S:SPL3L1*), a co za tym idzie, zaburzoną regulacją ekspresji genu *SPL3* przez miRNA, zakwitają wcześniej i mają zmienioną liczbę liści. Wyniki te potwierdzają, iż *SPL3* promuje zmianę fazy rozwojowej z wegetatywnej w generatywną, a jego ekspresja podlega transkrypcyjnej regulacji przez miR156 (WU i POETHIG 2006).

MIR159 – REGULATOR EKSPRESJI GENÓW ODPOWIEDZI NA GIBERELINY *GAMYB*

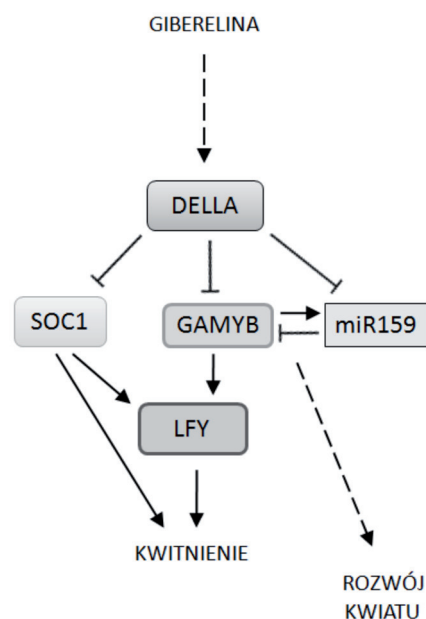
U *Arabidopsis* miR159 kodowany jest przez *MIR159a*, *MIR159b*, *MIR159c* (AUKERMAN i SAKAI 2003). MiR159 wpływając

na ekspresję swych genów docelowych m.in. *MYB33* (*MYB DOMAIN PROTEIN 33*) i *MYB65* u *A. thaliana* włącza się do funk-

cjonowania szlaku giberelinowego indukcji kwitnienia. Ponad to, reguluje również prawidłowy rozwój kwiatu (ACHARD i współaut. 2004, MILLAR i GUBLER 2005).

Szlak giberelinowy aktywuje geny odpowiedzialne za formowanie kwiatów na drodze bezpośredniej, poprzez aktywację genu *LFY* (gen tożsamość merystemu kwiatowego), lub pośrednio, poprzez pozytywną regulację genu *SOC1* (QUESADA i współaut. 2005). Szlak sygnałowania giberelin funkcjonuje jako system derepresji oparty głównie na silnie konserwatywnych białkach z rodziny DELLA, będących transkrypcyjnymi represorami odpowiedzi na gibereliny (FLEET i SUN 2005). Jednym z elementów szlaku sygnałowego związanego z działaniem giberelin, poniżej białek DELLA, są białka GAMYB, będące czynnikami transkrypcyjnymi promującymi aktywność genów docelowych odpowiedzi na gibereliny. Aplikacja GA powodowała zwiększenie ekspresji *MYB33* w wierzchołku wzrostu *A. thaliana* oraz następujący po niej wzrost transkrypcji genu *LFY*. Dokładna analiza struktury *LFY* wykazała, że w promotorze tego genu występuje element odpowiedzi na gibereliny GARE (ang. GA-response elements), który wraz z motywem DBD białka GAMYB tworzy kompleks odpowiedzi giberelinowej GARC (ang. GA-responsive complex) (GOCAL i współaut. 2001). Białka GAMYB posiadają charakterystyczną domenę DBD (ang. DNA binding domain) wiążącą DNA, która powstaje z fragmentów R2 i R3 (charakterystyczna domena MYB), jak również trzy kasety o silnie zachowywanych sekwencjach, nazywanych odpowiednio BOX1, BOX2 i BOX3. U *A. thaliana* poznano do tej pory około 100 genów *MYB*. Ekspresja trzech z nich, *MYB33*, *65* i *101*, jest promowana przez gibereliny (GOCAL i współaut. 2001). Region komplementarny do miR159 jest zlokalizowany około 100 nukleotydów powyżej sekwencji kodującej BOX2 (ACHARD i współaut. 2004).

Zwiększona ekspresja *MIR159* powoduje zmniejszenie poziomu transkryptów *MYB33*, a co za tym idzie, wykrywanego białka MYB33. Dodatkowo ekspresja *MIR159* nie wpływa na poziom transkryptów *mMYB33* charakteryzujących się uszkodzeniem miejsca wiązania miR159 bez zmiany sekwencji aminokwasowej i aktywności kodowanego białka (MILLAR i GUBLER 2005). Wyniki te wskazują, że miR159 reguluje poziom transkryptów kodujących białka z rodziny GAMYB poprzez bezpośrednie kierowanie ich rozpadem.



Ryc. 4. Schemat szlaku giberelinowego z uwzględnieniem udziału miR159.

Związanie fitohormonu gibereliny (GA) powoduje degradację białek DELLA i w konsekwencji aktywację genów odpowiedzi na gibereliny *SOC1* i *GAMYB*. Akumulacja mRNA *GAMYB* jest regulowana dodatkowo przez miR159. Białka SOC1 i GAMYB poprzez indukcję ekspresji genu *LFY* wpływają na zmianę tożsamości merystemu z wegetatywnego na generatywny (ACHARD i współaut. 2004, MILLAR i GUBLER 2005).

Rośliny z nadekspresją genu *MIR159* posiadają kilka charakterystycznych cech fenotypowych. Po pierwsze, uprawiane w warunkach dnia krótkiego późno zakwitają. Obserwowany rezultat związany jest prawdopodobnie ze spadkiem poziomu transkryptu genu *MYB33* oraz jego genu docelowego – *LFY*. Oznacza to, że w szlak kwitnienia zależny od GA zaangażowane są cząsteczki miR159, które regulują ilość transkryptów genów *GAMYB* (Ryc. 4.). Po drugie, transgeniczna nadprodukcja miR159, prowadząca do wzmożonej degradacji transkryptów *GAMYB*, jest przyczyną formowania nieprawidłowych, sterylnych pręcików. Podwyższony poziom miR159 powoduje zwiększenie rozmiaru pylnika, jego ciemnienie oraz bezpłodność (ACHARD i współaut. 2004). Podobne efekty obserwowano u podwójnych mutantów *myb33myb65* (QUESADA i współaut. 2005). Postuluje się, że miR159 jest czynnikiem ograniczającym ekspresję *MYB33* do tkanek pręcików w czasie rozwoju kwiatu.

W celu dokładniejszego zbadania tego zjawiska utworzono rośliny transgeniczne *mMYB33:GUS*. W roślinach tych ekspresja genu *mMYB33* rozszerza się także na inne tkanki. Rośliny *mMYB33:GUS* charakteryzują się zaokrąglonymi liśćmi, skróconymi płatkami korony, nieprawidłowo rozwiniętymi liścieniami, zmniejszonym wzrostem, zredukowa-

ną dominacją wierzchołkową i zmniejszoną płodnością. Powyższe cechy fenotypowe świadczą o zaangażowaniu miR159 w regulację rozwoju roślin zarówno na etapie zmiany fazy wzrostu z wegetatywnego na reprodukcyjny, ale także podczas rozwoju generatywnego (PALATNIK i współaut. 2003, MILLAR i GUBLER 2005).

UDZIAŁ MIR164 W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW *CUC*

MiR164, poprzez regulację powstawania granic między organami, zaangażowany jest w regulację rozwoju roślin zarówno w fazie wegetatywnej, jak i generatywnej (CHUCK i O'CONNOR 2010). Jednakże w związku z jego zaangażowaniem w powstawanie prawidłowej struktury kwiatu został zamieszczony w niniejszej pracy przeglądowej.

Sekwencja miR164 występującego u *A. thaliana* w trzech izoformach (miR164a, b, c) jest komplementarna do mRNA rodziny genów kodujących czynniki transkrypcyjne zawierające domenę NAC, do których należą między innymi *CUC1* (*CUP-SHAPED CO-TYLEDON 1*) oraz *CUC2* (CHUCK i współaut. 2009). W genomie rzodkiewnika zidentyfikowano pięć genów z rodziny NAC posiadających komplementarne miejsca do miR164. Należą do nich: *NAC1* (NAM/ATAF/CUC), *CUC1*, *CUC2*, *At5g07680* i *At5g61430*. Geny *CUC1* i *CUC2* ulegają ekspresji w komórkach tworzących obszary graniczne wokół primordiów, gdzie prawdopodobnie hamują wzrost komórek. Podczas gdy pojedyncze mutacje któregośkolwiek z genów *CUC*, nie wywierają znaczących efektów na kształtowanie granic, u podwójnego mutantu *cuc1cuc2* widoczne są zaburzenia w tworzeniu granic, co za tym idzie powstają częściowo zrośnięte organy (m. in. liścienie, działki kielicha i pręciki). Podobne efekty obserwuje się u roślin z nadekspresją *MIR164* (LAUFS i współaut. 2004, MALLORY i współaut. 2004).

Wykazano, że podczas wczesnego stadium rozwoju granic, na przykład, działek kielicha, proliferacja komórek nie jest hamowa-

na i dlatego nie ma ścisłego ograniczenia w ukierunkowaniu podziałów komórkowych. Następnie degradacja transkryptów *CUC1* i *CUC2* zależna od miR164 ogranicza rozrost obszaru granicznego pomiędzy działkami, co umożliwia ich poprawny rozwój. Zaburzenia w regulacji ekspresji *CUC1* i *CUC2* kontrolowanej poprzez miR164, u roślin z podwyższoną ekspresją *MIR164* lub ekspresją genu *mCUC1* „odpornego” na miR164, prawdopodobnie rozregulowuje geny, których ekspresja zależy pośrednio lub bezpośrednio od właściwej ekspresji *CUC1* lub *CUC2*. Na przykład, czynniki transkrypcyjne *CUC1* lub *CUC2* są wymagane do ekspresji genu *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*), który koduje klasę I białek podobnych do KNOTTED funkcjonujących w regionach merystematycznych oraz między primordiami. Ich celem jest utrzymanie komórek w nieodróżnionym stanie i powstrzymanie proliferacji. W następstwie utraty ekspresji *STM* powstają m.in. częściowo zrośnięte liścienie i organy kwiatowe, przypominając defekty występujące w roślinach z nadekspresją *MIR164*. Sugeruje się, że miR164 może hamować ekspresję *CUC1* i *CUC2* po podziale w jednej z potomnych komórek i w ten sposób indukować odmienną tożsamość komórki. Alternatywnie, może on indukować cięcie mRNA *CUC1* i *CUC2* w najbardziej zewnętrznych komórkach granicznych w odpowiedzi na powiększanie granicy. W obydwu przypadkach, graniczne komórki tracą własną tożsamość i przyjmują tożsamość merystemu lub primordium (LAUFS i współaut. 2004, MALLORY i współaut. 2004, CHUCK i O'CONNOR 2010).

UDZIAŁ MIR167 W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW *ARF6* I *ARF8*

miR167 u *A. thaliana* kodowany jest przez cztery geny (*MIR167a*, *-b*, *-c*, *-d*) i jest komplementarny do mRNA genów kodujących czynniki odpowiedzi na auksyny *ARF6* (*AUXIN RESPONSE FACTOR6*) i *ARF8* za-

angażowane w regulację rozwoju pręcików i słupków (NAGPAL i współaut. 2005, WU i współaut. 2006).

Czynniki transkrypcyjne, należące do rodziny białek odpowiedzi na auksyny ARF, wiążą

się do elementów odpowiedzi na auksyny AuxRE (5' TGTCTC 3'), obecnych w promotorach licznych genów regulowanych przez ten fitohormon (HAGEN i GUILFOYLE 2002, WU i współaut. 2006). Białka ARF6 i ARF8 zawierają kilka charakterystycznych domen: domenę DBD (B3) odpowiedzialną za wiązanie się białka do DNA, domenę Aux/IAA, utworzoną przez motywy III i IV, umożliwiającą dimeryzację oraz region bogaty w aminokwas glutaminę, dzięki której mogą aktywować ekspresję genów odpowiedzi na auksyny. Mutacje w genach kodujących te białka zmniejszają odpowiedź wywołaną przez auksyny i powodują występowanie różnorodnych anomalii rozwojowych. Auksyny regulują aktywność białek ARF poprzez obniżanie ilości białek Aux/IAA (GRAY i ESTELLE 2000, HAGEN i GUILFOYLE 2002).

Badania przeprowadzone na *A. thaliana* wykazały, że czynniki transkrypcyjne ARF6 i ARF8 są zaangażowane w wydłużanie nitki pręcików, pęknięcie pylników, dojrzewanie słupków oraz otwieranie pąków kwiatowych (NAGPAL i współaut. 2005). Utrata funkcji *ARF6* czy *ARF8* u pojedynczych mutantów powoduje spowolnienie wydłużania nitki pręcikowej oraz opóźnienie uwalniania pyłku w stosunku do roślin typu dzikiego. W konsekwencji zbyt duża odległość pylników od znamienia słupka uniemożliwia samozapylenie. Utrata funkcji obydwu genów u podwójnych mutantów *arf6arf8* prowadzi do męskiej i żeńskiej bezpłodności. Podwójne mutanty genów nie są zdolne do otwarcia kwiatu i produkcji nasion (NAGPAL i współaut. 2005). WU i współaut. (2006), stosując metodę *in situ* hybrydyzacji wykazali, że mRNA *ARF6* występuje w środkowej części słupka tworzącej drogę dla kielkującego pyłku. Występuje też w łożysku i primordiach zalążków. Niewielka ilość transkryptu *ARF6* obecna jest również w wiązkach przewodzących działek i płatków. *ARF8* wykazuje podobny wzorzec ekspresji tkankowej. Ponadto silną akumulację mRNA *ARF8* obserwowano w brodawkach znamienia słupka. Tak więc, żeńska sterility podwójnych mutantów *arf6arf8* związana jest prawdopodobnie z upośledzoną zdolnością słupka mutantów do promocji kielkowania pyłku (WU i współaut. 2006).

Informacji na temat wpływu miR167 na rozwój roślin poprzez regulację ekspresji genów *ARF6* i *8* dostarczyły prace RU i współaut. (2006) oraz WU i współaut. (2006). Obie grupy badawcze poddały analizie rośliny *A. thaliana* z nadekspresją *MIR167*. Rośliny *35S:MIR167a* charakteryzowały się skróconymi liśćmi, skróconymi kwiatostanami oraz zahamowanym rozwojem kwiatu. Wszystkie te cechy były również obecne u podwójnych mutantów genów docelowych miR167 – *arf6arf8* (WU i współaut. 2006). Rośliny *35S:MIR167b* wykazywały obniżony poziom transkryptu genu *ARF8*. Wskazuje to na indukowane przez miR167 cięcie mRNA genu *ARF8*, a zahamowanie translacji na matrycy mRNA *ARF6*. Fenotypowo rośliny *35S:MIR167b* wykazywały niższy wzrost oraz sterility. Kwiaty posiadały krótsze działki i płatki, a także brodawki znamienia oraz niepekające pylniki. Szczegółowa analiza wykazała, że komórki tych organów wykazują zaburzenia wzrostu i są krótsze w porównaniu z komórkami roślin typu dzikiego (RU i współaut. 2006). Badania z wykorzystaniem konstruktów *MIR167a* i *GUS* wykazały, że miR167 obecny jest w zalążkach oraz tkankach przewodzących pylników i płatków (WU i współaut. 2006). Znaczenie cząsteczek miR167 podczas rozwoju kwiatu potwierdziły badania prowadzone na mutantach *mARF6* oraz *mARF8*. U mutantów tych zmienne zostały miejsca docelowe dla miR167, co uniemożliwiało łączenie zasad pomiędzy miR167 a jego docelowym transkryptem. Brak regulacji ekspresji genów *ARF6* i *ARF8* przez miR167 doprowadził do wyższego poziomu ekspresji tych genów w odniesieniu do roślin typu dzikiego, a także do rozszerzenia obszaru ich ekspresji, czego konsekwencją było zatrzymanie rozwoju osłonek zalążka oraz brak uwalniania pyłku przez pylniki. W przeciwieństwie do przedstawionych zmian morfologicznych, kwiaty roślin z nadekspresją genu *ARF6* lub *ARF8* były płodne. Wyniki te sugerują, że miR167, utrzymując odpowiedni poziom transkryptów *ARF6* i *ARF8*, umożliwia prawidłowy rozwój pręcików i słupków (WU i współaut. 2006).

PODSUMOWANIE

miRNA odgrywa istotną rolę w regulacji rozwoju wszystkich organizmów i stanowi nową kategorię regulatorów ekspresji genów zarówno u roślin jak i zwierząt. Ro-

ślinne miRNA biorą udział m.in. w kontroli różnicowania organów, morfologii liścia, odpowiedzialne są również za polarność i rozwój tkanki przewodzącej, a także tożsamość

organów kwiatowych. Ponadto kontrolują własną biogenezę oraz biorą udział w przejściu rośliny z fazy rozwoju wegetatywnego w fazę różnicowania generatywnego. Przy użyciu bioinformatycznych procedur obliczeniowych oraz metod eksperymentalnych do 2009 r. zidentyfikowano u roślin 1763 cząsteczki miRNA biorących udział w regulacji różnych procesów rozwojowych (UNVER

2009). Jednak wiedza na temat funkcji tych niskocząsteczkowych regulatorów RNA jest nadal fragmentaryczna. Wciąż mało wiadomo o możliwych interakcjach w szlakach transdukcji sygnałów prowadzących do prawidłowego rozwoju rośliny, w których uczestniczą miRNA modelujące ekspresję docelowych genów.

UDZIAŁ MIKRO RNA W ROZWOJU GENERATYWNYM ROŚLIN

Streszczenie

Precyzyjna kontrola czasu zakwitania oraz rozwoju organów generatywnych jest niezbędna do sukcesu reprodukcyjnego roślin. Ostatnie lata wykazały, że jednym z czynników regulujących rozwój generatywny roślin są mikro RNA (miRNA). Mikro RNA to grupa cząsteczek długości około 21 nt o funkcjach regulatorowych. Zaangażowane są w proces wyciszania genów docelowych, polegający na inaktywacji ich ekspresji, u roślin zazwyczaj na poziomie transkrypcyjnym. W niniejszej pracy opisano udział pięciu miRNA: miR156, 159, 164, 167, i 172 w regulacji rozwoju generatywnego roślin. MiR156

poprzez promowanie degradacji transkryptów z rodziny *SPL* wpływa na przejście do generatywnej fazy rozwoju. MiR159 jest regulowanym przez gibereliny modulatorem aktywności białek GAMYB. MiR164 poprzez kontrolę obecności w poszczególnych komórkach mRNA genów *CUC1* i *CUC2* określa granice między elementami kwiatu. MiR167 i jego geny docelowe *ARF6* oraz *ARF8* związane są z rozwojem kwiatu. MiR172 jest komplementarny do mRNA genów z rodziny *APETALA2* wpływających zarówno na proces indukcji kwitnienia jak i prawidłowe tworzenie kwiatu.

THE INVOLVEMENT OF MICRO RNA IN GENERATIVE DEVELOPMENT OF PLANTS

Summary

Precise control of flowering time and generative organs development is essential for successful plants reproduction. Recent years showed that microRNA is one of the factors involved in regulation of generative development in plants. MicroRNA are 21 bp length regulatory molecules. They are involved in target genes silencing by inactivating their expression, mostly on transcriptional level in plants. The present article describes involvement of five miRNAs: miR156, 159, 164, 167 and 172 in generative development of plants. miR156 affects transition

from vegetative to reproduction phase of development, by *SPL* transcripts degradation. miR159 works as a modulator of GAMYB protein activity. miR164 controls the presence of mRNA *CUC1* and 2 genes in individual cells, hence defines the borders between flower elements. miR167 and its target genes *ARF6* and *ARF8* are involved in flower development. miR172 is complementary to the mRNA of genes from the *APETALA2* family and affects on flower induction and development.

LITERATURA

- ACHARD P., HERR A., BAULCOMBE D. C., HERBERD N. P., 2004. *Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA*. Development 131, 3357–3365.
- AUKERMAN M. J., SAKAI H., 2003. *Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-Like target genes*. Plant Cell 15, 27–2741.
- BARTEL D. P., 2004. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function*. Cell 116, 281–297.
- BAUMBERGER N., BAULCOMBE D. C., 2005. *Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 11928–11933.
- BONNET E., VAN DE PEER Y., ROUZÉ P., 2006. *The small RNA world of plants*. New Phytol. 171, 451–68.
- CHEN X., 2004. *A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development*. Science 303, 2022–2025.
- CHEN X., 2005. *microRNA biogenesis and function in plants*. FEBS Letters 579, 5923–5931.
- CHUCK G., O'CONNOR D., 2010. *Small RNAs going the distance during plant development*. Curr. Opin. Plant Biol. 13, 40–45.
- CHUCK G., MEELEY R. B., HAKE S., 1998. *The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet1*. Genes Dev. 12, 1145–1154.
- CHUCK G., CANDELA H., HAKE S., 2009. *Big impacts by small RNAs in plant development*. Curr. Opin. Plant Biol. 12, 81–86.
- DU T., ZAMORE P., 2005. *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. Development 132, 4645–4652.
- FANG Y., SPECTOR D. L., 2007. *Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants*. Curr. Biol. 17, 818–823.

- FLEET C. M., SUN T. P., 2005. *A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis*. Curr. Opin. Plant Biol. 8, 77–85.
- GOCAL G. F. W., SHELDON C. C., GUBLER F., MORITZ T., BAGNALL D. J., MACMILLAN C. P., LI S. F., PARISH R. W., DENNIS E. S., WEIGEL D., KING R. W., 2001. *GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in Arabidopsis*. Plant Physiol. 127, 1682–1693.
- GRAY W., ESTELLE M., 2000. *Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response*. Trends Biochem. Sci. 25, 133–138.
- HAGEN G., GUILFOYLE T., 2002. *Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors*. Plant Mol. Biol. 49, 373–385.
- HAYAMA R., COUPLAND G., 2004. *The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of Arabidopsis and Rice*. Plant Physiol. 135, 677–684.
- IMAIZUMI T., KAY S. A., 2006. *Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence*. Trends Plant Sci. 11, 5–8.
- JACK T., 2004. *Molecular and genetic mechanisms of floral control*. Plant Cell 16, 1–17.
- JAEGER K. E., WIGGE P. A., 2007. *FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis*. Curr. Biol. 17, 10–14.
- JONES-RHOADES M., BARTEL D., BARTEL B., 2006. *MicroRNAs and their regulatory roles in plants*. Annu. Rev. Plant Biol. 57, 19–53.
- JUNG J., EO Y., SEO P., REYES J. L., YUN J., CHUA N., PARK C. M., 2007. *The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis*. Plant Cell 9, 2736–2748.
- KIDNER C. A., MARTIENSSSEN R. A., 2005. *The developmental role of microRNA in plants*. Curr. Biol. 8, 38–44.
- LAUFS P., PEAUCELLE A., MORIN H., TRAAS J., 2004. *MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems*. Development 131, 4311–4322.
- LAUTER N., KAMPANI A., CARLSON S., GOEBEL M., MOOSE S. P., 2005. *microRNA172 down-regulates glosy15 to promote vegetative phase change in maize*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 9412–9417.
- LEE Y., KIM M., HAN J., YEOM K., LEE S., BAEK S., KIM V., 2004. *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J. 23, 4051–4060.
- MALLORY A. C., DUGAS D. V., BARTEL D. P., BARTEL B., 2004. *MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs*. Curr. Biol. 14, 1035–1046.
- MILLAR A. A., GUBLER F., 2005. *The Arabidopsis GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development*. Plant Cell 17, 705–721.
- MLOTSHWA S., YANG Z., KIM Y., CHEN X., 2006. *Floral patterning defects induced by Arabidopsis APE-TALA2 and microRNA172 expression in Nicotiana benthamiana*. Plant Mol. Biol. 61, 781–793.
- NAGPAL P., ELLIS C. H., WEBER H., PLOENSE S., BARKAWI L., GUILFOYLE T., HAGEN G., ALONSO J., COHEN J., FARMER E., ECKER J., REED J., 2005. *Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation*. Development 132, 4107–4118.
- PALATNIK J. F., ALLEN E., WU X., SCHOMMER C., SCHWAB R., CARRINGTON J. C., WEIGEL D., 2003. *Control of leaf morphogenesis by miRNAs*. Nature 425, 257–263.
- PARCY F., 2005. *Flowering: a time for integration*. Int. J. Dev. Biol. 49, 585–593.
- QUESADA V., DEAN C., SIMPSON G. A., 2005. *Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering*. Dev. Biol. 49, 773–780.
- REINHART B., WEINSTEIN E., RHOADES M., BARTEL B., BARTEL D., 2002. *MicroRNA in plants*. Genes Dev. 16, 1616–1626.
- RHOADES M., REINHART B., LIM L., BURGE C., BARTEL B., BARTEL D., 2002. *Prediction of plant microRNA targets*. Cell 110, 513–520.
- RONEMUS M., VAUGHN M. W., MARTIENSSSEN A., 2006. *MicroRNA-Targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by Agronaute, Dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in Arabidopsis*. Plant Cell 18, 1559–1574.
- RU P., XU L., MA H., HUANG H., 2006. *Plant fertility defects induced by the enhanced expression of microRNA167*. Cell Res. 16, 457–465.
- SCHMID M., UHLENHAUT N. H., GODARD F., DEMAR M., BRESSMAN R., WEIGEL D., LOHMAN J. U., 2003. *Dissection of floral induction pathways using global expression analysis*. Development 1, 6001–6012.
- SCHWAB R., PALATNIK J., RIESTER M., SCHOMMER C., SCHMIDT M., WEIGEL D., 2005. *Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome*. Dev. Cell 8, 517–527.
- TKACZUK K., OBARSKA A., BUJNICKI J., 2006. *Molecular phylogenetics and comparative modeling of HEN1, a methyltransferase involved in plant microRNA biogenesis*. BMC Evol. Biol. 6, 1471–2148.
- UNVER T., NAMUTH-COVERT D. M., BUDAK H., 2009. *Review of current methodological approaches for characterizing microRNAs in plants*. Int. J. Plant Genomics 2009, ID 262463.
- VAUCHERET H., 2006. *Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations*. Genes Dev. 20, 759–771.
- VOINNET O., 2009. *Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs*. Cell 136, 669–687.
- WOJCIECHOWSKI W., KĘSY J., KOPCEWICZ J., 2007. *Florigen – legenda czy rzeczywistość?* Post. Biol. Kom. 34, 31–49.
- WOLLMANN H., WEIGEL D., 2010. *Small RNAs in flower development*. Eur. J. Cell Biol. 89, 250–257.
- WU G., POETHIG R. S., 2006. *Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3*. Development 133, 3539–3547.
- WU M. F., TIAN Q., REED J., 2006. *Arabidopsis microRNA controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction*. Development 133, 4211–4218.
- YAMAGUCHI A., WU M. F., YANG L., WU G., POETHIG R. S., WAGNER D., 2009. *The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1*. Dev. Cell. 2, 268–278.
- ZHANG B., WANG Q., PAN X., 2007. *MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants*. J. Cell Physiol. 210, 279–289.