



microRNAs COM A REGULADORS
MOLECULARS IMPLICATS EN EL
SILENCIAMENT DE GENS POST-
TRANSCRIPCIONAL EN EL SISTEMA
RADICULAR *d'Arabidopsis thaliana*



Elisenda Feixes i Prats
Tutor: Ludovic Bassié
Grau en Biotecnologia
Universitat de Lleida
Lleida, setembre de 2017

ÍNDEX

ABREVIACIONS.....	ii
RESUM.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓ	1
OBJECTIUS	3
Objectiu general	3
Objectius específics	3
METODOLOGIA EMPRADA EN LA REVISIÓ	3
RESULTATS DE LA RECERCA BIBLIOGRÀFICA	4
CONTINGUT DE LA REVISIÓ	6
1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
2. sRNAs i <i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i>	7
2.1 Biogènesi dels microRNAs.....	8
2.2 Mecanisme d'acció dels miRNAs	10
3. Sistema radicular de les plantes.....	12
3.1 Arquitectura del sistema radicular de l' <i>Arabidopsis</i>	13
4. miRNAs i regulació del sistema radicular d' <i>Arabidopsis</i>	16
4.1 miRNAs involucrats en la formació de les arrels	16
4.2 miRNAs durant la formació de les arrels laterals i adventícies	17
4.3 miRNAs en la resposta al dèficit de N.....	20
DISCUSSIÓ	23
BIBLIOGRAFIA.....	24

ABREVIACIONS

AGO	ARGONAUTE
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
ARs	Arrels adventícies
DCL1	DICER LIKE 1
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dsRNA	<i>double-stranded</i> RNA
HEN1	<i>HUA ENHANCER 1</i>
hpRNAs	RNAs <i>hairpin</i> o amb est
HST	HASTY
HYP1	HYPONASTIC LEAVES 1
LRs	Arrels laterals
miRNA	microRNA
mRNA	RNA missatger
ncRNA	noncoding RNA
nt	Nucleòtid
pri-miRNA	miRNA primari
PTGS	Silenciament de gens Post-transcripcional
RISC	RNA – <i>Induced Silencing Complex</i>
RNA pol II	RNA polimerasa II
RNA	Àcid ribonucleic
RSA	Arquitectura del Sistema Radicular
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
sRNA	smallRNA
TF	Factor de transcripció

RESUM

Com afronten les plantes sèssils irregularitats en la disponibilitat de nutrients del sòl? L'absorció de minerals essencials del sòl influeix en el seu creixement i desenvolupament. Tanmateix, la majoria dels ambients no proporcionen nutrients suficients; la distribució de nutrients en el sòl pot ser desigual i pot canviar temporalment d'acord amb factors ambientals. Al llarg de l'evolució, les plantes han desenvolupat sofisticats sistemes per fer front a la variabilitat espacial i temporal en les concentracions de nutrients del sòl per tal de mantenir-ne l'homeòstasi en els seus teixits. Entre aquests, es troben mecanismes per modular l'arquitectura del sistema radicular en resposta a la disponibilitat de nutrients. De fet, l'especificació i el desenvolupament de les arrels són processos altament complexos, que requereixen de xarxes reguladores de gens, involucrades en les regulacions hormonals i la identitat cel·lular. Entre els diferents elements moleculars que regeixen el desenvolupament de les arrels, els microRNAs (miRNAs) són actors clau per a la ràpida regulació de l'expressió gènica.

Els miRNAs representen una gran família de RNAs no codificants que controlen l'expressió gènica a través de l'escissió del mRNA diana. Els gens miRNA de les plantes (*MIRs*) són transcrits per la RNA polimerasa II, produint transcrits primaris (pri-miRNAs) que formen una estructura de forqueta. Els pri-miRNAs es processen en el nucli de la cèl·lula per l'enzim DICER-LIKE1 (DLC1), juntament amb les proteïnes HYPONASTIC LEAVES (HYL1) i SERRATE (ES), que tallen el dúplex miRNA/miRNA* de l'estructura de forqueta. El dúplex després s'exporta al citoplasma i es carrega en el component ARGONAUTE (AGO) del *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC). La complementarietat entre miRNA/mRNA dirigeix el complex RISC per reconèixer i reprimir transcripcions específiques a través de l'activitat endonucleasa de l'AGO.

La planta model *Arabidopsis thaliana* ha tingut un paper important en el descobriment de la diversitat i els mecanismes d'acció dels microRNAs de plantes. Això no és només perquè l'*Arabidopsis* és una planta petita que pot créixer fàcilment en grans quantitats *in vitro*, sinó també perquè és un gran objecte per als enfocaments transgènics, té grans col·leccions de mutants i moltes variacions genotípiques seqüenciades hi estan disponibles.

RESUMEN

¿Cómo afrontan las plantas sésiles irregularidades en la disponibilidad de nutrientes en el suelo? La absorción de minerales esenciales del suelo influye en su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, la mayoría de los ambientes no proporcionan nutrientes suficientes; la distribución de nutrientes en el suelo puede ser desigual y puede cambiar temporalmente de acuerdo con factores ambientales. A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado sofisticados sistemas para hacer frente a la variabilidad espacial y temporal en las concentraciones de nutrientes del suelo con el fin de mantener la homeostasis de estos en sus tejidos. Entre estos, se encuentran mecanismos para modular la arquitectura del sistema radicular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. De hecho, la especificación y el desarrollo de las raíces son procesos altamente complejos que requieren de redes reguladoras de genes, involucradas en las regulaciones hormonales y la identidad celular. Entre los diferentes elementos moleculares que rigen el desarrollo de las raíces, los microRNAs (miRNAs) son actores clave para la rápida regulación de la expresión génica.

Los miRNAs representan una gran familia de RNAs no codificantes que controlan la expresión génica a través de la escisión de un mRNA diana. Los genes miRNA de las plantas (*MIRs*) son transcritos por la RNA polimerasa II, produciendo transcritos primarios (pri-miRNAs) que forman una estructura en horquilla. Los pri-miRNAs se procesan en el núcleo de la célula por la enzima DICER-LIKE1 (DLC1), junto con las proteínas HYPONASTIC LEAVES (HYL1) y SERRATE (SE), que cortan el dúplex miRNA/miRNA* de la estructura de horquilla. El dúplex luego se exporta al citoplasma y se carga en el componente ARGONAUTE (AGO) del *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC). La complementariedad entre miARN /mRNA dirige el complejo RISC para reconocer y reprimir transcripciones específicas a través de la actividad endonucleasa de AGO.

La planta modelo *Arabidopsis thaliana* ha desempeñado un papel importante en el descubrimiento de la diversidad y los mecanismos de acción de microRNAs de plantas. Esto no es solo porque *Arabidopsis* es una planta pequeña que puede crecer fácilmente en grandes cantidades *in vitro*, sino también porque es un gran objeto para los enfoques transgénicos, tiene grandes colecciones de mutantes y muchas variaciones genotípicas secuenciadas están disponibles.

ABSTRACT

How do sessile plants cope with irregularities in soil nutrient availability? The uptake of essential minerals from the soil influences plant growth and development. However, most environments do not provide sufficient nutrients; rather nutrient distribution in the soil can be uneven and change temporally according to environmental factors. In the long evolutionary history, plants have evolved sophisticated systems for coping with spatial and temporal variability in soil nutrient concentrations in order to maintain mineral nutrient homeostasis in their tissues. Among these are mechanisms for modulating root system architecture in response to nutrient availability. Indeed, root specification and development are highly complex processes requiring gene regulatory networks involved in hormonal regulations and cell identity. Among the different molecular partners governing root development, microRNAs (miRNAs) are key players for the fast regulation of gene expression.

miRNAs represent a large family of noncoding RNAs that control gene expression through the target of mRNA transcripts for cleavage. Plant miRNA genes (*MIRs*) are transcribed by RNA polymerase II, producing primary transcripts (pri-miRNAs) that form a hairpin structure. pri-miRNAs are processed in the cell nucleus by the DICER-LIKE1 (DLC1) enzyme, together with HYPONASTIC LEAVES (HYL1) and SERRATE (SE) proteins that cut out the miRNA/miRNA* duplex from the hairpin structure. The duplex then is exported to the cytoplasm and loaded into the ARGONAUTE (AGO) component of the RNA-Induced Silencing Complex (RISC). miRNA/target complementarity directs RISC to recognize and repress specific transcripts through AGO endonuclease activity.

The model plant *Arabidopsis thaliana* has played an important role in revealing plant microRNA diversity and uncovering their mechanisms of action. This is not only because *Arabidopsis* is a small plant that can easily grow in large numbers *in vitro*, but is also a great object for transgenic approaches, it has large mutant collections, and many sequenced genotypic variations are available.

INTRODUCCIÓ

Durant la segona meitat del segle passat, es va produir un fort augment de la producció d'aliments, fet que va permetre una disminució significativa de l'escassetat d'aliments a tot el món, tot i que la població mundial es va duplicar durant aquell temps (Godfray et al. 2010). Tanmateix, en el proper mig segle, aconseguir una expansió similar de la producció d'aliments per a satisfer les necessitats de l'augment de la població humana és bastant desafiant degut a la reducció del terreny cultivable per la urbanització massiva, l'escassetat d'aigua de rec, el canvi climàtic global, canvis en la dieta humana i, un increment significatiu en la proporció d'aliments que s'usen per a alimentar animals i bestiar o per a produir biocarburants (Rothstein 2007). Alguns dels enfocaments rentables per a augmentar la producció de cultius inclouen l'ús de varietats d'alt rendiment, com els cultius genèticament modificats, que siguin resistents a sequeres, aiguats, canvis bruscos de temperatura, sòls pobres en minerals, etc. Per tant, és urgent desenvolupar varietats de cultiu amb major productivitat.

La naturalesa sèssil de les plantes ha fet que al llarg de l'evolució hagin desenvolupat una capacitat d'adaptació al medi impressionat, per a fer front a diverses i canviants condicions ambientals. Per a créixer i desenvolupar-se amb normalitat, les plantes han d'obtenir suficients nutrients del sòl a través de les seves arrels. (Marschner & Marschner 2011). Les plantes requereixen de macronutrients, micronutrients, vitamines i altres elements per al seu creixement (Nath & Tuteja 2016). Quantitativament, el nutrient més important de les plantes és el nitrogen (N), perquè forma part dels aminoàcids, àcids nucleics, la clorofil·la i, moltes altres macromolècules (Bellegarde et al. 2017). No obstant, no sempre hi ha N suficient al sòl per a satisfer els requeriments de les plantes, ja que els nivells de N es veuen afectats per molts factors com l'erosió del sòl, la lixiviació de les aigües pluvials i el consum microbià (Liang et al. 2012). El N és el principal factor ambiental que limita la productivitat dels cultius a nivell mundial (Liu et al. 2017).

Les plantes ja han evolucionat diverses maneres de conservar i mobilitzar el N intern i augmentar-ne l'adquisició d'extern. Per adaptar-se a les condicions on el N és troba limitat, les plantes han de detectar-ne canvis en les concentracions tant internes com externes (Xuan et al. 2017). Les respostes adaptatives que garanteixen l'homeòstasi de nutrients i les respostes a l'estrès estan recolzades per canvis en l'arquitectura del sistema radicular (RSA), a través de xarxes de regulació de gens implicades en la

regulació hormonal i la identitat cel·lular. Entre els diferents agents moleculars que controlen el desenvolupament de l'arrel, els microRNAs (miRNAs) són actors clau per a la ràpida regulació de l'expressió gènica (Nguyen et al. 2015).

Els miRNAs són RNAs petits no codificants per a proteïnes que provenen dels gens *MIR*. Els gens *MIR* quan són transcrits pateixen una sèrie de modificacions fins a donar lloc al miRNA madur (Cho et al. 2017), que participa en el silenciament de gens post-transcripcional, procés que regula el desenvolupament de la planta, reprimint l'expressió de gens a nivell post-transcripcional en la planta. Els miRNAs formen part del complex RISC (RNA – Induced Silencing Complex) junt amb l'enzim Argonata. Aquests miRNAs actuen unint-se a un RNA diana complementari i guiant a RISC, perquè degradi el mRNA diana i així inhibir la traducció (Stauffer & Maizel 2014).

La investigació amb *Arabidopsis* ha permès identificar un gran nombre de miRNAs que participen en la modificació de l'arquitectura del sistema radicular de les plantes i sobretot, ha demostrat la participació dels miRNAs en la regulació de l'absorció, assimilació i mobilització del N. També ha permès esbrinar de quines maneres les plantes responen al dèficit de N i com els miRNAs contribueixen a la seva adaptació (Nguyen et al. 2015).

OBJECTIUS

Objectiu general

Estudiar les xarxes reguladores de gens controlades pels miRNAs implicades en el sistema radicular d'*Arabidopsis thaliana*.

Objectius específics

- Explicar de manera concisa què són els miRNAs, com es sintetitzen i quines funcions realitzen
- Explicar els mecanismes moleculars que regulen el sistema radicular de l'*Arabidopsis*
- Estudiar la implicació dels miRNAs en la modificació de l'arquitectura del sistema radicular en dèficit de nitrogen

METODOLOGIA EMPRADA EN LA REVISIÓ

Per a realitzar aquest treball s'han consultat les bases de dades bibliogràfiques següents: **Web of Science**, recull les referències de les principals publicacions científiques de qualsevol disciplina, **Scopus**, és una base de dades propietat de l'empresa Elsevier que conté revistes publicades per milers d'editors internacionals, **Google Scholar**, motor de Google per a literatura científica-acadèmica, **Dialnet**, un portal bibliogràfic creat per la Universidad de La Rioja que té com a objectiu donar major visibilitat a la literatura científica hispana i portuguesa, **PubMed**, un motor de cerca gratuït del NCBI per a accedir al MEDLINE, una base de dades bibliogràfiques d'articles de recerca biomèdica i de ciències de la vida, **JSTOR**, un sistema d'arxius de revistes científiques creat per la Universitat de Princeton com a solució a la manca d'espai a les biblioteques degut a l'augment creixent de publicacions acadèmiques, i **miRBase**, la base de dades de les seqüències i anotacions dels microRNAs publicats.

Les paraules clau que s'han utilitzat per a buscar bibliografia han estat: sRNA, miRNA, *Arabidopsis thaliana*, *Post-Transcriptional Gene Silencing*, *plant miRNA*, *Root System Architecture*, *root miRNA*, *nutrient homeòstasis*, *N regulation*, *N uptake*...

RESULTATS DE LA RECERCA BIBLIOGRÀFICA

En aquest apartat es mostren en gràfics, per a fer-ho més visual, els resultats de la recerca bibliogràfica. En total s'han citat 111 documents, entre articles científics i llibres de literatura científica. La primera figura correspon a un gràfic on s'hi troba representada tota la bibliografia del treball, classificada per anys de publicació. S'observa que hi ha literatura anterior a l'any 2000, tot i que sigui poca. A partir de l'any 2005 és quan augmenta més significativament el número de publicacions.

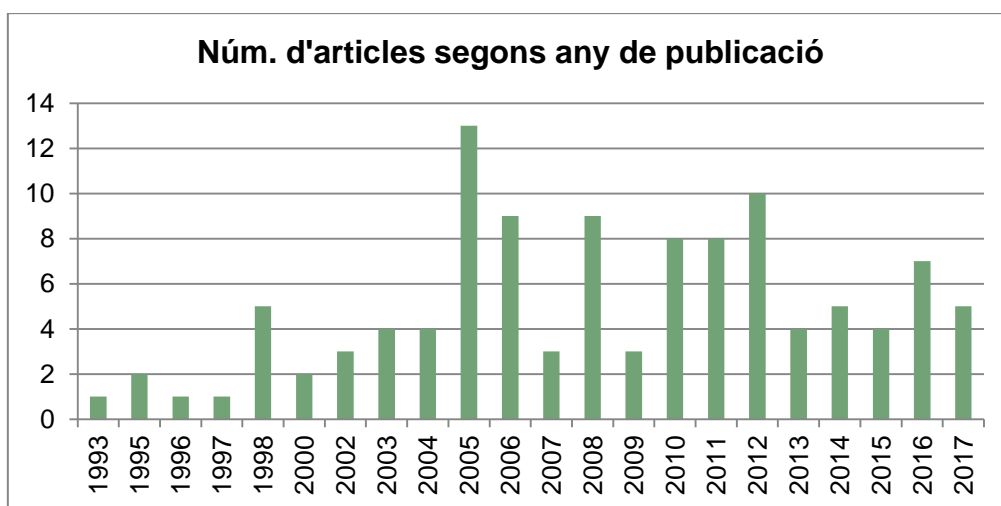


Figura 1. Gràfic on s'hi troben representats tots els articles citats en el treball i classificats segons l'any en què van ser publicats.

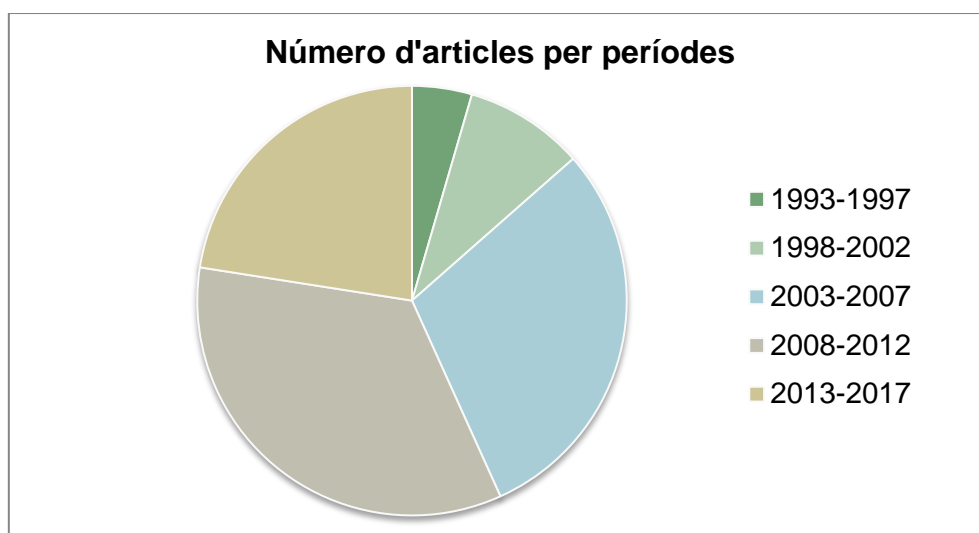


Figura 2. Gràfic on estan representats els articles citats, agrupats per períodes de 5 anys.

En aquest segon gràfic els articles estan representats per períodes de 5 anys. Del primer i el segon períodes hi ha poca bibliografia i correspon a articles que descriuen la morfologia i fisiologia de *l'Arabidopsis thaliana*, ja que va ser en aquella època quan es va començar a caracteritzar. A partir del tercer període i cap a endavant, la bibliografia augmenta considerablement i ja parla del descobriment i funció dels sRNAs, miRNAs i els seus mecanismes de regulació. És entre el tercer i quart períodes quan hi va haver l'auge de descobriment massiu dels sRNAs, ja que en els últims anys no hi ha gaire literatura nova, sinó que la majoria d'articles són revisions del que s'ha descobert i demostrat fins ara.

CONTINGUT DE LA REVISIÓ

1. *Arabidopsis thaliana*

L'*Arabidopsis thaliana* és una planta model herbàcia de la família *Brassicaceae*, nativa d'Europa, Àsia i Nord Amèrica, caracteritzada per la seva mida petita, posseir un cicle anual i, arribar a mesurar entre 10 – 30 centímetres d'alçada. Les seves fulles estan cobertes per tricomes, les flors són molt petites i de color blanc i, el seu fruit és una síliqua de dos centímetres de llarg que conté les llavors, de 0,5 mil·límetres, les quals es dispersen a través del vent (Meinke et al. 1998).

L'*Arabidopsis* és una de les espècies més utilitzades en els laboratoris de biologia de plantes, gràcies al seu cicle de vida ràpid (sis setmanes), la gran quantitat de llavors que produeix, el poc espai que requereix per a créixer i la facilitat de cultivar-la en hivernacles o càmeres de cultiu. A més a més, el seu genoma conté 125 megabases, dintre de les quals existeixen uns 25.500 gens repartits en cinc cromosomes (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Gràcies a aquestes característiques, s'han pogut desenvolupar procediments de mutagènesi i de transformació de plantes i, així obtenir grans col·leccions de mutants amb diversos fenotips i mapes cromosòmics de gens mutants i marcadors moleculars (Martínez-Zapater & Salinas 1998). Així mateix, el seu estudi ha permès identificar els receptors d'hormones en les plantes (Bleecker & Schaller 1996), els mecanismes del fototropisme (Huala et al. 1997) i els ritmes circadianis (Guo et al. 1998), conèixer millor el procés de floració (Koornneef et al. 1998) i els mecanismes moleculars implicats en les respostes de les plantes davant diversos tipus d'estress, tant biòtic (patògens) com abiòtic (fred, sequera, salinitat, dèficit de nutrients), entre altres descobriments. Generalment, les investigacions amb aquesta planta serveixen per a realitzar diverses proves experimentals, ja que és una planta model.

2. sRNAs i *Post-Transcriptional Gene Silencing*

Durant un llarg període de temps, el DNA i les proteïnes van ser considerats els components més importants de la maquinària cel·lular, mentre que l'RNA va ser considerat un mer intermediari que feia de pont entre el DNA i les proteïnes (Vaucheret 2006). Tanmateix, avui en dia se sap que l'expressió gènica eucariota implica diversos esdeveniments post-transcripcionals que comparteixen com a substrat comú el mRNA. L'expressió de gens que codifiquen per proteïnes segueix un conjunt de processos complexos, regulats de forma coordinada, que inclouen la síntesi del pre-mRNA, el *capping*, la poliadenilació, l'*splicing* i altres modificacions post-transcripcionals, com ara el transport del mRNA a través dels porus nuclears, la traducció del mRNA i, finalment, la degradació d'aquest (Moore 2005). Durant tots aquests processos de maduració, el mRNA és transportat entre complexos dinàmics de proteïnes, que a través de la seva acció influeixen en el seu destí (Glisovic et al. 2008). El descobriment recent en eucariotes de centenars de proteïnes i d'un número creixent de RNAs grans i petits no codificants amb rols reguladors específics ha canviat la nostra forma de veure l'expressió gènica (Vaucheret 2006). Uns d'aquests reguladors que participen en processos transcripcionals són els RNAs petits o, en anglès, *small RNAs* i abreviats com a sRNAs.

Els *small RNAs* van ser identificats per Fire et al. (1998) com a RNAs petits de cadena doble, en anglès *small double-stranded RNAs* (dsRNAs) al *Caenorhabditis elegans* on hi actuaven com a reguladors que inhibien la traducció en un procés anomenat RNA d'interferència (RNAi) o silenciament d'RNA (Fire et al. 1998). Més tard i, gràcies als avenços en les tècniques de seqüenciació, s'han anat identificant gens que codifiquen per a sRNAs (Stricklin et al. 2005). Els sRNAs són una classe de RNAs de cadena doble, no codificants per a proteïnes (ncRNA), de mida curta i que actuen com a repressors de l'expressió gènica d'animals, plantes i molts fongs (Finnegan & Matzke 2003). Pel que fa a la seva llargada no hi ha una mida consens, però la majoria d'investigadors consideren seqüències d'entre 20-30 nucleòtids (nt). Ara bé, el terme sRNA és més aviat un nom incorrecte. Això es deu al fet que tots els tipus coneguts de ncRNAs es reconeixen com a RNAs petits. A més, els RNAs bacterians petits també es designen amb el mateix terme. Així doncs, l'única característica que distingeix els sRNAs eucariotes de la resta d'RNAs coneguts del genoma és la seva mida petita i la tendència a unir-se amb les proteïnes de la família Argonauta (AGO) (Kim et al. 2009). El silenciament post-transcripcional de gens (PTGS) on estan involucrats els sRNAs té un gran impacte en el desenvolupament de la planta, el sistema de defensa, la

resposta a estrès, la reproducció, la diferenciació cel·lular (Rodríguez et al. 2016), la reprogramació del genoma, etc. contribuint a la plasticitat fenotípica de les plantes (Stauffer & Maizel 2014).

En l'actualitat, es reconeix que aquestes vies de regulació van evolucionar com un mecanisme de defensa cel·lular contra virus d'RNA i elements transposables i, posteriorment es van adaptar per a regular l'expressió de gens endògens. Això és coherent amb el fet que la majoria dels tipus d'RNA petits tenen un paper en les respostes de defensa, així com en la regulació epigenètica (Axtell 2013).

Els RNAs petits de plantes es poden classificar en dos grans grups depenent del seu origen i de la seva biogènesi (Axtell 2013). Els sRNAs generats a partir de precursors d'RNA de cadena doble se'ls anomena *small interfering RNAs* (siRNAs), que es poden dividir en diverses subclasses, com els *trans-acting* siRNAs (ta-siRNAs). Els sRNAs que provenen de precursors endògens de cadena simple amb una part de la seqüència formant un *loop*, s'anomenen microRNAs (miRNAs). D'entre ells, aquest treball es centra en els miRNAs pel fet que són essencials per a la viabilitat de la planta, ja que més del 50% de les dianes dels miRNA són factors de transcripció i proteïnes implicades en el desenvolupament i la diferenciació cel·lular (Jones-Rhoades et al. 2006; Mallory & Vaucheret 2006). Curiosament, els miRNAs també poden activar la producció de siRNAs secundaris com els ta-siRNAs, dels quals se'n parla més endavant. I, per retroalimentació negativa també regulen els gens requerits per a la seva biogènesi, com ara *DCL1* o *AGO1* i els gens diana implicats en l'adaptació a varis tipus d'estrès (Xie et al. 2003).

2.1 Biogènesi dels microRNAs

Els miRNAs de plantes, de 20-24 nt, provenen de precursors *hairpin* (hpRNAs) de cadena simple (*hairpin* ssRNAs) que oscil·len entre 64-300 nt. Els gens que codifiquen per miRNAs de plantes s'anomenen gens *MIR*, són endògens, és a dir, propis de la cèl·lula (Zhang et al. 2015). Els gens *MIR* de plantes es troben, de tant en tant, agrupats un al costat de l'altre en el genoma, suggerint la transcripció de múltiples miRNAs a partir d'una sola transcripció, però aquesta disposició policistrònica dels gens *MIR* es presenta amb menys freqüència en les plantes que en els animals (Bartel 2004). A partir d'aquests gens *MIR* i gràcies a l'RNA polimerasa II (RNA pol II) es genera un miRNA primari (pri-miRNA) de cadena simple i poliadenilat que es plega i

forma una estructura de forqueta (Guleria et al. 2011). El pri-miRNA és processat dins del nucli per l'enzim DICER-LIKE 1 (DCL1) (una ribonucleasa III, reconeix dsRNAs i els talla) amb l'ajuda de la proteïna HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), també anomenada DRB1 (DOUBLE-STRANDED RNA BINDING PROTEIN1) i la proteïna SERRATE (SE) (Stepien et al. 2017; Lobbes et al. 2006). HYL1 i SE formen un complex amb el DCL1, ajudant-lo a processar de manera més eficient el pri-miRNA i formar el pre-miRNA (Stepien et al. 2017; Yang et al. 2006). El DCL1 talla la molècula i queda el *loop* de l'estructura de forqueta més petit, donant lloc al precursor del microRNA anomenat pre-miRNA (Borges & Martienssen 2015). Un estudi recent realitzat per Cho et al. (2017) afirma que el gen *HYL1-INTERACTING GIY-YIH-LIKE ENDONUCLEASE (HIGLE)* codifica per una proteïna que conté un domini GIY-YIG, que generalment es troba en les endonucleases *homing*. Però, a diferència d'altres endonucleases GIY-YIG, el centre catalític de la HIGLE té activitat DNasa i RNasa, que a l'interactuar amb HYL1 i SE ajuda a processar els precursors dels miRNAs *in vitro*.

A partir del pre-miRNA l'enzim DCL1 amb HYL1 i SE talla un segon cop, ara per a produir un miRNA dúplex madur. El miRNA dúplex madur està format per dues cadenes, miRNA/miRNA*¹ que tenen 2 nt solts a l'extrem 3' (Papp et al. 2003). A continuació el dúplex miRNA/miRNA* és metilat per la metiltransferasa HUA ENHANCER 1 (HEN1) (Horwich et al. 2007). L'addició d'un grup metil al 2'-OH del residu de sucre del nucleòtid 3' terminal evita la uridilació (addició d'una cua de poli-U als miRNAs no metilats que disminueix la seva estabilitat) per part de la nucleotidil transferasa HEN1 SUPPRESSOR 1 (HESO1) (Ren et al. 2012; Y. Zhao et al. 2012); la uridilació és un senyal de degradació per a l'enzim SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE 1 (SDN1) (Ramachandran & Chen 2008). Després de la metilació el dúplex es transporta al citoplasma a través de la proteïna HASTY (HST), que es troba a la membrana nuclear (Tang 2005; Li et al. 2005; Yu et al. 2005). Un cop al citoplasma el dúplex miRNA/miRNA* es dissocia i s'incorpora el miRNA al complex RISC (RNA-Induced Silencing Complex), mentre que el miRNA* és degradat (Mao et al. 2009; Carmell et al. 2002). (Figura 3)

¹ L'asterisc (*) indica que és la seqüència del dúplex formada a partir de l'estructura de forqueta del pri-miRNA i la que serà degradada en sortir al citoplasma.

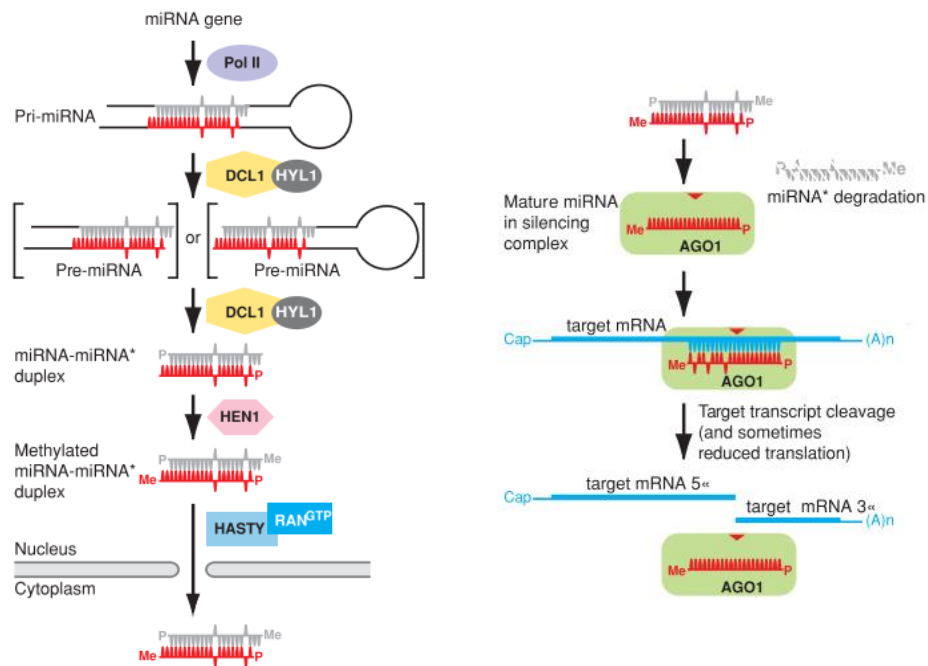


Figura 3. Biogènesi dels microRNAs (esquerra) i procés d'escissió de l'RNA diana dirigit pel microRNA, que es troba dins els complex RISC (dreta) (Jones-Rhoades et al. 2006).

2.2 Mecanisme d'acció dels miRNAs

El complex RISC està format per l'enzim AGO (una nucleasa) i el miRNA. La cadena d'RNA carregada al RISC és la que reconeix el mRNA diana i la que guia l'AGO. El miRNA i el mRNA hibriden per complementarietat de bases, això guia a l'AGO per a tallar enllaços fosfodièster (Bologna & Voinnet 2014). Els fragments tallats són alliberats i degradats, deixant lliure el RISC per a reconèixer i tallar un altre transcrit (Ramachandran & Chen 2008; Souret et al. 2004) (Figura 3). La majoria dels miRNA de plantes tenen elevada complementarietat amb el mRNA diana (menys de 4 errors de *missmatch*) i per això, regulen l'expressió gènica via l'escissió del mRNA, en el procés anomenat *Post-Transcriptional Gene Silencing* (PTGS) (Jones-Rhoades et al. 2006).

En l'*Arabidopsis* existeixen 10 tipus d'enzim AGO, tres dels quals estan molt ben estudiats i caracteritzats. L'AGO1 està associada a la via dels miRNA i dels siRNA pel silenciament de transgens i de gens de virus (Vaucheret 2008), l'AGO4 està involucrada en la degradació d'alguns transposons i transgens (Jones-Rhoades et al. 2006) i l'AGO7 és característica durant el període de transició entre la fase juvenil i la

fase adulta de la planta (Baumberger & Baulcombe 2005) i també és necessària per a la biogènesi d'alguns ta-siRNA (Peragine et al. 2004; Brodersen & Voinnet 2006).

La primera evidència que els sRNAs participaven en el desenvolupament vegetal va sorgir en descobrir mutants implicats en la seva biogènesi o en la seva funció. De fet, diversos gens implicats en la funció dels miRNAs, incloent *DCL1*, *AGO1*, *HEN1* i *HYL1*, entre d'altres, es van identificar per primera vegada a partir de les conseqüències que provocaven en el desenvolupament de les plantes, les seves mutacions, fins i tot abans que es descobrís que tenien un paper clau per a la biogènesi i la funció dels sRNAs (Jones-Rhoades et al. 2006). Amb el temps, s'han anat estudiant els sRNAs, els gens que participen en la seva síntesi i regulació, els mutants, i s'ha pogut anar classificant-los i esbrinant les seves funcions i les xarxes reguladores on estan implicats (Mallory & Vaucheret 2006; Willmann & Poethig 2007; Chen 2005).

3. Sistema radicular de les plantes

Les plantes, com a organismes sèssils que són, estan genèticament predisposades a adaptar-se contínuament, ja sigui pel que fa al seu metabolisme cel·lular com en el seu desenvolupament, a canvis en el medi ambient. Aquesta plasticitat, aconseguida modulant contínuament el repertori de gens que s'expressen, és la clau de la seva supervivència en diversos ecosistemes, ja que permet a les arrels modificar la seva estructura positivament. El sistema d'arrels de la planta és el que s'encarrega de captar l'aigua i els nutrients del sòl, de l'ancoratge i el suport mecànic (Stauffer & Maizel 2014). Moltes plantes també usen les arrels per a funcions d'emmagatzematge i algunes serveixen com a font d'aliment pels humans i molts animals. A més a més, les arrels són la principal interfase de contacte entre la planta i els diversos factors biòtics i abiòtics en el medi ambient del terra, en detectar i respondre a senyals ambientals (Smith & De Smet 2012).

El sistema radicular consisteix en una arrel primària que sorgeix de l'embrió, òrgans laterals (arrels laterals, arrels adventícies i arrels de la corona) que s'estan formant constantment durant la vida de la planta i els pèls radiculars (Hochholdinger & Zimmermann 2008). La fitohormona auxina juga un rol essencial en el creixement de les arrels, ja que canvis en els seus nivells endògens afecten de manera severa al seu desenvolupament (Lavenus et al. 2013). Per exemple, un increment dels nivells d'auxina induirà el creixement d'arrels laterals, mentre que l'arrel primària mostrarà un creixement restringit, donant lloc a un sistema radicular molt ramificat, però superficial (Boerjan et al. 1995). En contrast amb això, la pèrdua de la resposta de l'auxina o la seva acumulació reduirà dramàticament la ramificació de les arrels i provocarà un desenvolupament deficient del brot (Benková et al. 2003). A més a més, les arrels poden formar estructures simbiòtiques amb microorganismes del sòl, com les micorrizes (Parniske 2008), ajudant les plantes a millorar l'absorció d'aigua i nutrients.

Malgrat la importància de les arrels per al desenvolupament de la planta, es coneix molt poc sobre els mètodes que regulen l'arquitectura del sistema radicular (RSA), que és la disposició espacial de les arrels i que varia segons els senyals externs que detecta la planta. A macro escala l'RSA descriu l'organització de les arrels primàries i les arrels laterals, i a micro escala descriu els pèls radiculars, que incrementen l'àrea d'absorció d'aigua i nutrients i les arrels adventícies (Smith & De Smet 2012). En conclusió, el sistema radicular resulta de la coordinació entre els factors ambientals externs i les vies de senyalització endògenes.

3.1 Arquitectura del sistema radicular de l'*Arabidopsis*

En l'*Arabidopsis* el sistema radicular s'inicia amb l'aparició de l'arrel primària formada a partir de teixit meristemàtic embrionari, que successivament es va ramificant i va establint el sistema radicular secundari.

L'arrel primària és una estructura radial simètrica, on els diferents tipus tissulars estan organitzats en cilindres concèntrics (epidermis, còrtex, endodermis i pericicle) al voltant d'un nucli central on es troba el sistema vascular (xilema: protoxilema i metaxilema i floema). El nínxol de cèl·lules mare es troba prop de la punta de l'arrel, per això les cèl·lules joves es troben a la punta i les cèl·lules més velles, més lluny (Couzigou & Combier 2016) (Figura 4)

El creixement de l'arrel ocorre en la punta o àpex de l'arrel, que consta de tres parts: la còfia o caliptra, el centre quiescent i la regió subapical. La caliptra és una mena de tapa que cobreix i protegeix la punta de l'arrel, formada per cèl·lules del meristema apical que, primer, es diferencien en cèl·lules de la columel·la, després migren cap a fora de la caliptra i finalment es desprenen, contribuint així a llimar el sòl i permetre que l'arrel s'hi vagi obrint camí. La caliptra desapareix a mesura que avança el creixement, però es renova constantment (Cutler et al. 2008). A sobre de la caliptra es troba el centre quiescent, un grup de cèl·lules inactives que es coordinen amb les cèl·lules mare veïnes per establir un balanç entre proliferació i diferenciació al meristema. La divisió cel·lular ocorre en les cèl·lules que rodegen el centre quiescent (Kuriakose & Silvester 2016). Finalment, a sobre del centre quiescent es troba la regió subapical dividida en tres zones. La primera és la zona meristemàtica o meristema radicular on es duu a terme la divisió cel·lular, seguida d'una zona de transició, que actua de tampó entre la zona meristemàtica i la zona d'elongació. En aquesta segona zona els processos de divisió cel·lular i expansió són molt lents (Rudall 2007). La tercera és la zona d'elongació, on s'inhibeixen la divisió de les cèl·lules provinents del meristema apical, però es promou la seva diferenciació començant per l'inici de l'elongació cel·lular que fa augmentar de mida les cèl·lules. Per últim, la zona de diferenciació, on les cèl·lules alenteixen la seva elongació fins a arribar a la seva longitud i maduració final (Verbelen et al. 2006). Els límits d'aquestes zones són flexibles i estan regulats per interaccions antagonistes entre diferents fitohormones, que regulen l'expressió de factors de transcripció clau (Kuriakose & Silvester 2016).

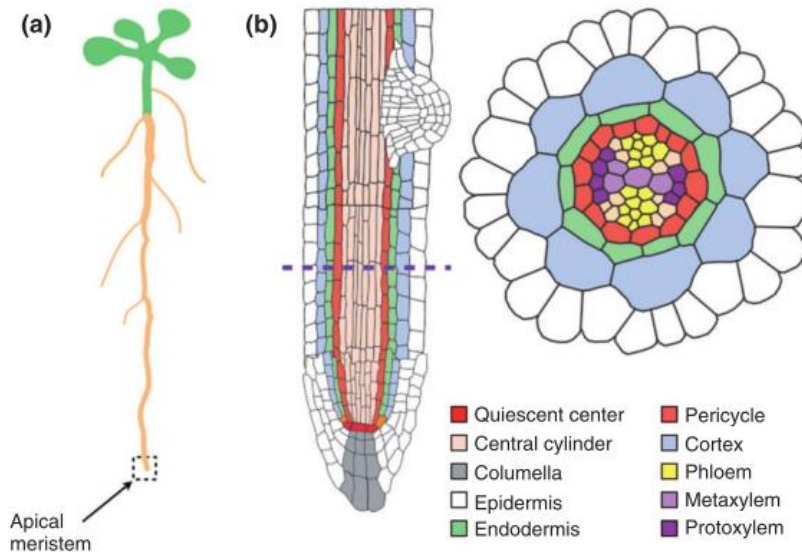


Figura 4. Organització cel·lular longitudinal i radial de l'arrel d'*Arabidopsis thaliana*. a) Organització longitudinal del sistema radicular de l'*Arabidopsis*. b) Tall longitudinal (esquerra) i tall transversal (dreta) de l'arrel. La línia discontinua de la secció longitudinal indica la posició de la secció transversal. Els diferents teixits segueixen un codi de color indicat (Stauffer & Maizel 2014).

Les arrels laterals sorgeixen a partir de les cèl·lules del pericicle de l'arrel primària, per a formar un nou meristema (Figura 4). El pericicle és un teixit adjacent al sistema vascular que també pot presentar àpexs amb caliptra d'on sortiran noves arrels. Les noves arrels han de créixer a través del teixit endodèrmic i del còrtex fins a sortir a l'exterior. Com que el pericicle envolta el sistema vascular de l'arrel, la continuïtat vascular entre la nova arrel lateral i l'arrel primària es pot establir fàcilment. La funció de les arrels laterals és augmentar la superfície d'absorció de l'arrel i l'exploració del sòl (Dolan et al. 1993). Els factors com la llum, la temperatura i la disponibilitat de nutrients poden impactar la divisió, elongació i diferenciació cel·lular i d'aquesta forma regular el creixement, actuant com a senyals que operen mitjançant rutes de transducció específiques, o bé, a través de la seva interacció amb reguladors del creixement (Malamy & Benfey 1997).

Les arrels adventícies mostren les mateixes funcions que les arrels laterals i també es desenvolupen post embrionícament, però a diferència de les arrels laterals ho fan a partir de teixits aëris, com brots, tiges o fulles (Hochholdinger et al. 2004) i, en el cas de l'*Arabidopsis* a partir de l'hipocòtil o en el punt de connexió entre l'arrel i l'hipocòtil (Atkinson et al. 2014). A més, no només apareixen com una resposta adaptativa a diversos tipus d'estrès, tals com ferides o inundacions, sinó que també són un

component clau limitant de la propagació vegetativa. Ambdós tipus d'arrels comparteixen elements clau de les xarxes reguladores genètiques i hormonals, però estan subjectes a diferents mecanismes reguladors (Bellini et al. 2014).

4. miRNAs i regulació del sistema radicular d'*Arabidopsis*

El sistema radicular de l'*Arabidopsis* s'inicia a l'embrió i ja des d'aquest punt és necessària la maquinària del miRNA. Un atlas d'alta resolució de l'expressió dels miRNAs va revelar que el 64% dels miRNAs coneguts d'*Arabidopsis* s'expressen en les arrels (Breakfield et al. 2012).

4.1 miRNAs involucrats en la formació de les arrels

La formació de les arrels comença en l'especificació d'una única cèl·lula extra embrionària suspensora anomenada hipòfisi, que genera el meristema de l'arrel (Weigel & Jürgens 2002). Els embrions mutants en el gen *SERRATE* que controla el desenvolupament de les fulles, l'activitat meristemàtica, la inflorescència i la transició de fase embrionària a fase adulta, entre d'altres, i mutants per l'enzim DCL1 paren el seu desenvolupament molt aviat i pateixen una divisió incompleta de les cèl·lules de la hipòfisi, que els acabarà causant la mort. En els mutants *dcl1*, els factors de transcripció SQUAMOSA PROMOTER-LIKE 10 (SPL10) i SPL11, que normalment estan regulats pel **miR156**², no ho estan, fent-los responsables dels defectes de formació dels patrons cel·lulars, la letalitat de l'embrió i la no formació d'arrels (Nordine & Bartel 2010). Entre els defectes de l'embrió que s'han observat en mutants pel gen se es troba una divisió cel·lular aberrant a la hipòfisi, una malformació del centre quiescent i el desenvolupament de les arrels es veu afectat, conduint a la seva mort (Lobbes et al. 2006). A nivell molecular es veu una acumulació dels **miR165/166** que regulen els factors de transcripció (TF) PHABULOSA (PHB) i PHAVOLUTA (PHV) implicats en la polaritat de les fulles, la formació del meristema apical dels brots i del sistema vascular (Grigg et al. 2005; Grigg et al. 2009).

Estudis recents demostren que alguns miRNA tenen un paper clau en la regulació de l'arquitectura de l'arrel a través de la modificació post-transcripcional dels gens de la via de senyalització de l'hormona auxina (Wang et al. 2005; Curaba et al. 2014; Jin et al. 2013). El **miR160** regula les proteïnes ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) que actuen com a TF (Li et al. 2016). Les seves tres dianes en l'*Arabidopsis*, són els factors de resposta a auxina ARF10, ARF16 i ARF17 que controlen el creixement de

² Als miRNAs quan es descobreixen, se'ls assignen identificadors numèrics seqüencials (Griffiths-Jones et al. 2006).

l'arrel primària i el gravitropisme (Figura 5). Una sobreexpressió del miR160 o una pèrdua de funció simultània (doble mutació) dels gens *ARF10* i *ARF16* resulta en una disminució en el creixement de les arrels, arrels agravitròpiques (no responen a la gravetat) que presenten divisió cel·lular incontrolada i una formació defectiva de la caliptra, la regió responsable de la detecció de la gravetat (Wang et al. 2005; Mallory et al. 2005). A més a més, l'expressió d'una versió mutant resistent a l'escissió per miRNA del gen *ARF17* condueix a la reducció de la longitud de l'arrel primària, confirmant el paper del miR160 en el creixement de l'arrel primària (Wang et al. 2005).

El teixit vascular de l'arrel de l'*Arabidopsis* està format per un eix central, l'estela, el xilema i el floema. A més dels seus rols durant l'embriogènesi els **miR165/166** també ocupen un paper central en la regulació del desenvolupament de l'arrel, en particular de la correcta diferenciació del sistema vascular (Carlsbecker et al. 2010; Miyashima et al. 2011). El SHORTROOT (SHR) és un TF mòbil que migra des de l'estela (la part central de l'arrel que conté el teixit vascular), el seu lloc de producció, a l'endodermis on interactua amb el TF SCARECROW (SCR) i junts activen la transcripció del *MIR165a*³ i *MIR166b*, els precursors del miR165/166⁴. Al seu torn, el miR165/166 madur difon des de l'endodermis cap a l'estela, formant un gradient d'activitat del miR165/166, on l'activitat és més alta a l'endodermis i més baixa a l'estela (Carlsbecker et al. 2010). De manera que el PHB estarà més reprimat a l'endodermis i més expressat a l'estela. Aquest gradient regula el nivell de transcrits de *PHB*, la diana del miR165/166 i determina el destí del xilema segons un sistema dependent de dosi.

4.2 miRNAs durant la formació de les arrels laterals i adventícies

En l'*Arabidopsis* les arrels laterals (LRs) s'originen en les cèl·lules del pericicle de l'arrel primària, quan aquestes comencen a experimentar divisions cel·lulars fins a formar un primordi (Atkinson et al. 2014; Bellini et al. 2014). Són varis els factors que contribueixen a la regulació de la formació de les LRs, des dels esdeveniments de preiniciació fins a l'activació del meristema (Overvoorde et al. 2010; Petricka et al. 2012). Entre ells, l'hormona auxina hi té un paper central (Lavenus et al. 2013).

³ Els *loci* que donen lloc a miRNAs idèntics o similars tenen assignats el mateix número amb sufixos alfabètics seqüencials.

⁴ Són gens *MIRNA* que codifiquen seqüències de miRNA madures similars i que, per motius històrics se'ls han estat assignats identificadors diferents. (Per exemple les famílies miR156/157, miR165/166 i miR170/171) (Meyers et al. 2008).

Segons la “hipòtesi de flexió” els primordis de les arrels laterals s’inicien per una acumulació local d’auxina provinent del meristema de l’arrel (Kircher & Schopfer 2016).

El **miR160** és un dels miRNAs que controla la producció de les arrels laterals, i regula els ARF10, ARF16 i ARF17, ja vistos en l’apartat anterior. Així doncs, aquests tres ARFs a part d’estar involucrats en la regulació del creixement de l’arrel primària, també ho estan en el creixement de les LTs. Alguns al·lels dels gens *ARF16* i *ARF17* que són resistents a la degradació per miRNA mostren una ramificació de l’arrel reduïda, mentre que una doble mutació en els gens *ARF10* i *ARF16* i la sobreexpressió del miR160 mostren un efecte contrari (Wang et al. 2005), és a dir, ramificació excessiva. Per tant, la repressió dels transcrits dels gens *ARF16* i *ARF17* pel miR160 exerceix un paper essencial en el desenvolupament de les LRs en l’*Arabidopsis* (Liu et al. 2007).

Uns altres membres de la família dels ARFs que estan involucrats en la regulació de les arrels laterals són els gens *ARF2*, *ARF3* i *ARF4*. Els seus transcrits són la diana dels *trans-acting short interfering RNAs* (ta-siRNAs) (Allen et al. 2005; Williams et al. 2005). Els ta-siRNAs deriven dels gens *TAS*, que són processats per la via dels miRNAs, és a dir, el ta-siRNA precursor és tallat per l’AGO1 o AGO7 guiada per un miRNA. Els ta-siRNAs resultants madurs, a la vegada, actuaran en els seus gens diana (Garcia et al. 2006; Hunter et al. 2006). Durant l’inici de la formació de l’arrel, l’auxina indueix l’expressió del **miR390** en les cèl·lules del pericicle i tallarà l’RNA precursor del *TAS3* i produirà ta-siRNAs. Els ta-siRNAs resultant del *TAS3* reprimiran l’expressió dels *ARF2*, *ARF3* i *ARF4* en el primordi de l’arrel lateral, permetent que creixi correctament (Marin et al. 2010; Yoon et al. 2010). En resum el miR390, ta-siRNA, *ARF2/3/4* i l’auxina formen una complexa xarxa auto-regulada per controlar quantitativament el desenvolupament d’arrels laterals en l’*Arabidopsis* (Marin et al. 2010). (Figura 5)

Un altre factor de transcripció important que regula la formació d’arrels laterals a través de la via de senyalització de l’auxina és el NAC1. Aquest es troba a les cèl·lules del pericicle durant el desenvolupament de les arrels laterals on controla l’expressió del gen que respon a l’auxina *AIR3* (Xie et al. 2000). L’abundància del mRNA del *NAC1* en l’*Arabidopsis* està controlada pel **miR164** (Guo et al. 2005; Li et al. 2012) (Figura 5). Els estudis fets per Guo et al. (2005) van revelar un bucle autoregulat entre l’auxina, el miR164 i el NAC1 en la formació de LTs, on l’auxina indueix el miR164, que reprimeix l’expressió del NAC1 i, per tant, limita la senyalització de l’auxina i actua regulant negativament la producció d’arrels laterals (Li et al. 2012).

Un altre micro RNA involucrat en aquest procés és el **miR393**, els seus gens més expressats són el *MIR393a* i el *MIR393b*. Aquest miRNA regula de manera post-transcripcional els mRNAs dels receptors de la *F-box* d'auxina, *TIR1* (*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE PROTEIN 1*), *AFB1* (*AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN 1*), *AFB2* i *AFB3*. Les funcions biològiques del complex miR393-*TIR1/AFBs* en la resposta a auxina i el desenvolupament de la planta, encara no s'entenen completament (Chen et al. 2011), però sí que es sap que la interacció entre miR393 (induït per NO_3^-) i l'*AFB3* regulen el RSA com a resposta al NO_3^- a través de la via senyalitzadora d'auxina (Vidal et al. 2010), el miR393 respon tant a senyals externs com interns de N (Vidal et al. 2015). També s'ha comprovat que la sobreexpressió del miR393 provoca la disminució de la densitat d'arrels laterals (Wójcik & Gaj 2016), però la sobreexpressió d'una forma resistent al miR393 del gen *TIR1* resulta en un augment significatiu del número d'arrels laterals (Chen et al. 2011) (Figura 5).

En l'*Arabidopsis*, les arrels adventícies es formen post-embriònicament i depenen d'un equilibri subtil, però fonamental entre l'auxina, les proteïnes ARF i els miRNAs que controlen la seva abundància (Bellini et al. 2014). Els principals participants que intervenen en la senyalització de l'auxina durant el creixement de les arrels adventícies (ARs) són els factors activadors, codificats pels gens *ARF6* i *ARF8*, controlats pel **miR167** i el factor repressor codificat pel gen *ARF17*, regulat pel **miR160** (Gutierrez et al. 2012). És la balança entre reguladors positius i negatius el que defineix el número d'arrels adventícies. Gutierrez et al. (2012) han demostrat que aquests gens es regulen l'expressió entre ells modulant l'homeòstasi del miR160 i miR167. Per retroalimentació positiva el TF ARF6 regula el miR160 i el miR167, mentre que l'ARF8 i l'ARF17 regulen els miR167 i miR160 per retroalimentació negativa (Figura 5).

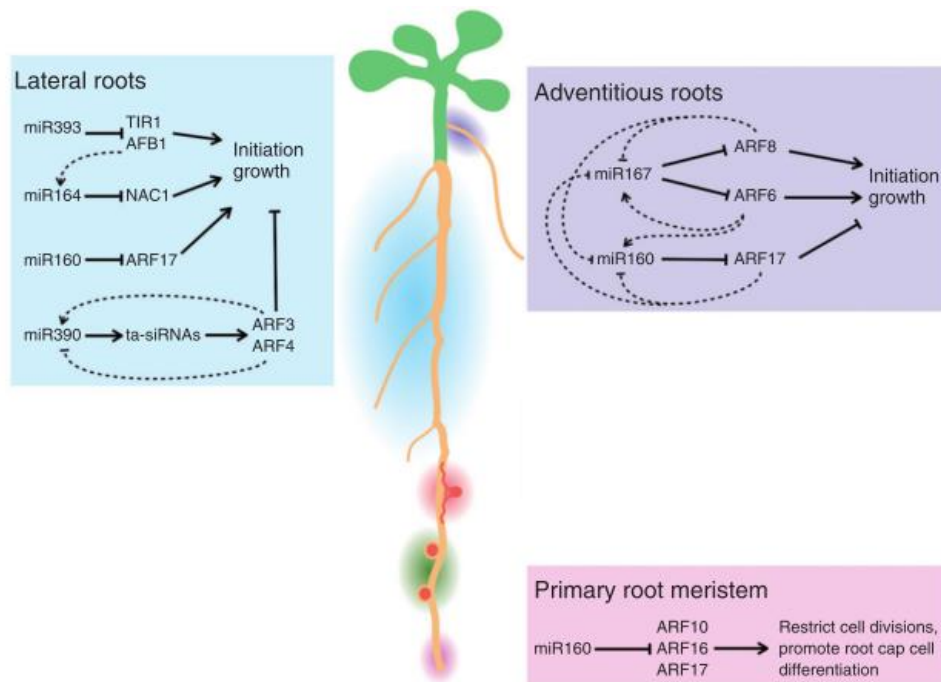


Figura 5. Resum de la regulació post-transcripcional del creixement de les arrels mediada per sRNAs. Cada requadre de color correspon a un tipus d'estructura diferent de l'arrel i conté els sRNAs implicats, les seves dianes i els processos que controlen. Les línies discontinües indiquen interaccions per retroalimentació (Stauffer & Maizel 2014).

4.3 miRNAs en la resposta al dèficit de N

El nitrogen (N) és un dels macronutrients més importants, essencial per al creixement i desenvolupament de les plantes. És necessari per a la síntesi de proteïnes, àcids nucleics, clorofil·la i fitohormones (Nguyen et al. 2015). Principalment les plantes absorbeixen el N en forma de nitrat (NO_3^-), amoni (NH_4^+) o urea del sòl, tot i que el nitrat és la forma preferida per la majoria de plantes cultivables (Crawford & Forde 2002). En la literatura s'han descrit dues fases principals de l'absorció i ús del N durant el cicle de vida de les plantes. La primera fase, durant l'etapa vegetativa, és quan el N s'absorbeix, s'emmagatzema i s'assimila en aminoàcids o altres compostos nitrogenats. La segona fase és la mobilització del N assimilat durant la senescència, als òrgans reproductius per a donar suport a les llavors en desenvolupament (Kant et al. 2011).

L'absorció del N del sòl en l'*Arabidopsis* es duu a terme a través de les arrels. Hi ha dos tipus de sistemes d'absorció ben caracteritzats en les plantes, el Sistema de Transport d'Alta Afinitat (HATS) i el Sistema de Transport de Baixa Afinitat (LATS), que

funcionen en concentracions de N extern baixes i en concentracions altes, respectivament (Kraiser et al. 2011). Estudis sobre el mecanisme molecular de l'absorció del N i la seva translocació han revelat la implicació de quatre famílies de transportadors de nitrats que participen en l'absorció del NO_3^- en l'*Arabidopsis*. Són el transportador de nitrat 1/pèptid (NPD), el transportador de nitrat 2 (NRT2), el canal de clor (CLC) i els homòlegs associats al canal d'anions lents (SLAC/SLAH) (Krapp 2014). Mentre el NO_3^- entra a les cèl·lules mitjançant els transportadors de nitrat, l' NH_4^+ s'absorbeix de fonts externes gràcies als transportadors d'amoni (AMT). En entrar a les cèl·lules vegetals el NO_3^- es converteix a nitrit (NO_2^-), després en NH_4^+ i, finalment en aminoàcids a través de l'acció de varis enzims (nitrat reductasa, nitrit reductasa, glutamina sintasa i glutamat sintasa) (Crawford & Forde 2002).

Estudis recents han demostrat els papers reguladors dels miRNAs, en la regulació del creixement i desenvolupament de les arrels sota condicions de dèficit de N (Khan et al. 2011; Liang et al. 2012; M. Zhao et al. 2012; Wang et al. 2013). El **miR167**, que té com a diana els dos factors de transcripció ARF6 i ARF8, que regulen el creixement de les arrels adventícies, es troba poc expressat en dèficit de N. Per tant, si el miR167 no inhibeix els factors de transcripció d'auxina, en aquest cas el TF ARF8, aquest últim podrà actuar. En dèficit de N es necessita induir l'expressió de l'*ARF8* al pericicle i a les cèl·lules de la caliptra de les arrels laterals per a induir el creixement de les arrels adventícies (Gifford et al. 2008; Liang et al. 2012). El miR167 també ataca el gen *IAA-ALA RESISTANT3 (IAR3)*, la proteïna del qual hidrolitza l'auxina inactiva i la transforma en bioactiva per al desenvolupament de les arrels durant estrès osmòtic elevat (Kinoshita et al. 2012).

De manera contrària, en dèficit de N el **miR160** és induït i els *ARF16* i *ARF17* són reprimits. En l'*Arabidopsis*, l'*ARF16* modula la formació de la caliptra i el TF *ARF17* regula els gens que responen a l'auxina. Estudis han mostrat que en aquestes condicions, la sobreexpressió del miR160 promou el creixement de les arrels laterals (Liang et al. 2012). Estudis addicionals han demostrat que la modulació del sistema radicular en dèficit de N està coordinada per un complex regulador de tres miRNAs: miR160, miR167 i miR171 (Liang et al. 2012; Mallory et al. 2005; Wang et al. 2005). En manca de N, el creixement de les arrels s'incrementa per l'augment de l'expressió del miR160 i el miR171 i l'expressió reduïda del miR167.

Un altre microRNA que també canvia la seva expressió en condicions limitants de N és el **miR164**. La reducció de la seva expressió amb l'augment simultani de l'expressió del gen *NAC1* produeix més arrels laterals (Guo et al. 2005).

El **miR169a** és l'únic miRNA descobert fins ara que regula l'expressió dels transportadors de N sota condicions on el N és limitant. En l'*Arabidopsis*, la família⁵ del miR169 consta de 14 membres, entre els quals el miR169a és el principal contribuent al total del nivell d'expressió dels miR169 (Nath & Tuteja 2016). El miR169 té com a diana el gen *NFY* (*NUCLEAR FACTOR Y*), que codifica per un TF amb tres subunitats, A, B i C, algunes de les quals s'uneixen a les regions promotores i regulen l'expressió dels transportadors de nitrat *AtNRT2.1* i *AtNRT1.1* (Bellegarde et al. 2017). En deficiència de N, el miR169 es troba molt poc expressat, mentre que alguns dels seus gens diana, els *NFYA2*, *NFYA3*, *NFYA5* i *NFYA8* es troben altament induïts en les arrels i la tija (Liang et al. 2012). Un experiment que es va realitzar amb plantes transgèniques que tenien sobreexpressat el miR169a va donar com a resultat plantes hipersensibles a la manca de N, que acumulaven molt menys N i se'ls esgrogueïen les fulles, en comparació al les plantes control *wild type*. La hipersensibilitat de les plantes on s'havia sobreexpressat el miR169a es va associar a la baixa transcripció dels gens dels transportadors de N, *AtNRT2.1* i *AtNRT1.1*, confirmant així el rol regulador del miR169 en l'absorció i remobilització del N (Zhao et al. 2011). En general, el miR169 sembla que juga un paper important en l'adaptació de l'*Arabidopsis* a les fluctuacions de N del sòl.

⁵ La presència freqüent dins un genoma de *loci* de *MIRNA* paràlegs que produeixen miRNAs madurs idèntics o gairebé idèntics ha permès agrupar aquests miRNAs en famílies (Meyers et al. 2008).

DISCUSSIÓ

Gràcies a la recerca intensiva dels últims anys, s'ha avançat de forma ràpida i significativa a l'hora de descobrir la biogènesi dels miRNAs, predir els seus objectius, les seves funcions biològiques i els seus mecanismes moleculars, la qual cosa millora enormement la nostra comprensió sobre l'elaborada xarxa reguladora generada al llarg de tota l'evolució de les plantes. No obstant, la complexitat del sistema regulador dels miRNAs a les plantes és, aparentment, molt superior a les que es troben en altres organismes. Això pot ser atribuïble en part, a la natura sèssil de les plantes terrestres les quals estan constantment exposades a ambients canviants i forçades a evolucionar nous mecanismes per fer front a l'estrès biòtic i abiòtic.

Fins l'actualitat s'han realitzat avenços notables en la identificació i la comprensió de les rutes de silenciament dirigides pels miRNAs en les plantes. Tanmateix, la majoria dels miRNAs no estan ben estudiats i se'n desconeix la seva funcionalitat o el seu gen diana. Això passa especialment amb els que són poc abundants, però que també exerceixen un paper clau en el desenvolupament de la planta.

Pel que fa al sistema radicular de les plantes, s'han fet passos impressionants que han revelat la base genètica, genòmica i cel·lular de la ramificació de les arrels en plantes model, com és l'*Arabidopsis*. Malgrat la identificació de senyals, components reguladors i mecanismes que controlen l'inici de la morfogènesi i l'aparició de noves arrels laterals i adventícies, encara queda molt progrés per a fer. Així com també, tot i la importància del nitrogen per al creixement de la planta i del seu sistema radicular, les xarxes de detecció i transducció de senyals, que controlen les respostes de les plantes a la deficiència de N encara no estan ben caracteritzades i només una petita porció dels miRNAs i els seus gens diana s'han caracteritzat completament i s'han validat experimentalment. Encara queden doncs, molts estudis per a fer per entendre i conèixer bé el funcionament dels miRNAs en el sistema radicular de les plantes i els factors que participen en la regulació de l'homeòstasi del nitrogen.

En definitiva, entendre la biogènesi i els mecanismes de regulació dels miRNAs per a modificar l'arquitectura de les arrels, és un gran potencial per a la manipulació i explotació de les característiques de les arrels, ja que en un futur els miRNAs podrien arribar a ser tendència com una nova eina de millora genètica vegetal, tant per a millorar l'adaptació de les plantes a canvis en el medi ambient i, per tant, augmentar el seu rendiment, com per a optimitzar l'ús dels terrenys agrícoles.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, E. et al., 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121(2), p.207-221.
- Atkinson, J.A. et al., 2014. Branching out in roots: uncovering form, function, and regulation. *Plant physiology*, 166(2), p.538-550.
- Axtell, M.J., 2013. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), p.137-159.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), p.281-297.
- Baumberger, N. & Baulcombe, D.C., 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(33), p.11928-11933.
- Bellegarde, F., Gojon, A. & Martin, A., 2017. Signals and players in the transcriptional regulation of root responses by local and systemic N signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), p.2553-2565.
- Bellini, C., Pacurar, D.I. & Perrone, I., 2014. Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), p.639-666.
- Benková, E. et al., 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115(5), p.591-602.
- Bleecker, A.B. & Schaller, G.E., 1996. The Mechanism of Ethylene Perception. *Plant Physiology*, 111(1), p.653-660.
- Boerjan, W. et al., 1995. Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *The Plant cell*, 7(9), p.1405-1419.
- Bologna, N.G. & Voinnet, O., 2014. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual review of plant biology*, 65(February), p.473-503.
- Borges, F. & Martienssen, R.A., 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12), p.727-741.
- Breakfield, N.W. et al., 2012. High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in *Arabidopsis*. *Genome Research*, 22(1), p.163-176.
- Brodersen, P. & Voinnet, O., 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, 22(5), p.268-280.
- Carlsbecker, A. et al., 2010. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 465(7296), p.316-321.
- Carmell, M.A. et al., 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & development*, 16(21), p.2733-42.
- Chen, X., 2005. microRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters*, 579(26), p.5923-5931.
- Chen, Z.-H. et al., 2011. Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 77(6), p.619-629.

- Cho, S.K. et al., 2017. HIGLE is a bifunctional homing endonuclease that directly interacts with HYL1 and SERRATE in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 591(10), p.1383-1393.
- Couzigou, J.-M. & Combier, J.-P., 2016. Plant microRNAs: Key regulators of root architecture and biotic interactions. *The New Phytologist*, 212(1), p.22-35.
- Crawford, N.M. & Forde, B.G., 2002. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The Arabidopsis book*, 1, p.e0011.
- Curaba, J., Singh, M.B. & Bhalla, P.L., 2014. miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *Journal of Experimental Botany*, 65(6), p.1425-1438.
- Cutler, D.F., Botha, T. & Stevenson, D.W., 2008. *Plant Anatomy. An applied approach* 1a ed., Oxford: Blackwell Publishing.
- Dolan, L. et al., 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119(1), p.71-84.
- Finnegan, E.J. & Matzke, M.A., 2003. The small RNA world. *Journal of Cell Science*, 116(23), p.4689-4693.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), p.806-811.
- Garcia, D. et al., 2006. Specification of Leaf Polarity in *Arabidopsis* via the trans-Acting siRNA Pathway. *Current Biology*, 16(9), p.933-938.
- Gifford, M.L. et al., 2008. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2), p.803-808.
- Glisovic, T. et al., 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS letters*, 582(14), p.1977-1986.
- Godfray, H.C.J. et al., 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), p.812-818.
- Griffiths-Jones, S. et al., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_1), p.D140-D144.
- Grigg, S.P. et al., 2009. Repression of Apical Homeobox Genes Is Required for Embryonic Root Development in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 19(17), p.1485-1490.
- Grigg, S.P. et al., 2005. SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in *Arabidopsis*. *Nature*, 437(7061), p.1022-1026.
- Guleria, P. et al., 2011. Plant Small RNAs: Biogenesis, Mode of Action and Their Roles in Abiotic Stresses. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 9(6), p.183-199.
- Guo, H. et al., 1998. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5355), p.1360-3.
- Guo, H.-S. et al., 2005. MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for *Arabidopsis* Lateral Root Development. *The Plant Cell*, 17(5), p.1376-1386.
- Gutierrez, L. et al., 2012. Auxin Controls *Arabidopsis* Adventitious Root Initiation by Regulating Jasmonic Acid Homeostasis. *The Plant Cell*, 24(6), p.2515-2527.
- Hochholdinger, F. et al., 2004. From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends in Plant Science*, 9(1), p.42-48.

- Hochholdinger, F. & Zimmermann, R., 2008. Conserved and diverse mechanisms in root development. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(1), p.70-74.
- Horwich, M.D. et al., 2007. The Drosophila RNA Methyltransferase, DmHen1, Modifies Germline piRNAs and Single-Stranded siRNAs in RISC. *Current Biology*, 17(14), p.1265-1272.
- Huala, E. et al., 1997. Arabidopsis NPH1: A Protein Kinase with a Putative Redox-Sensing Domain. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5346), p.2120-2123.
- Hunter, C. et al., 2006. Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis. *Development*, 133(15), p.2973-2981.
- Jin, D. et al., 2013. MicroRNAs and Their Cross-Talks in Plant Development. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(4), p.161-170.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. & Bartel, B., 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), p.19-53.
- Kant, S., Bi, Y.-M. & Rothstein, S.J., 2011. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), p.1499-1509.
- Khan, G.A. et al., 2011. MicroRNAs as regulators of root development and architecture. *Plant Molecular Biology*, 77(1-2), p.47-58.
- Kim, V.N., Han, J. & Siomi, M.C., 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), p.126-139.
- Kinoshita, N. et al., 2012. IAA-Ala Resistant3, an evolutionarily conserved target of miR167, mediates Arabidopsis root architecture changes during high osmotic stress. *The Plant cell*, 24(9), p.3590-3602.
- Kircher, S. & Schopfer, P., 2016. Priming and positioning of lateral roots in Arabidopsis. An approach for an integrating concept. *Journal of experimental botany*, 67(5), p.1411-1420.
- Koornneef, M. et al., 1998. Genetic control of flowering time in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), p.345-370.
- Kraiser, T. et al., 2011. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), p.1455-1466.
- Kuriakose, S. V. & Silvester, N., 2016. Genetic and molecular mechanisms of post-embryonic root radial patterning. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21(4), p.457-476.
- Lavenus, J. et al., 2013. Lateral root development in Arabidopsis: Fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science*, 18(8), p.1360-1385.
- Li, J. et al., 2005. Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Current Biology*, 15(16), p.1501-1507.
- Li, J. et al., 2012. miRNA164-directed cleavage of ZmNAC1 confers lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biology*, 12(1), p.220.
- Li, S.-B. et al., 2016. A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in plant science*, 7, p.47.
- Liang, G., He, H. & Yu, D., 2012. Identification of Nitrogen Starvation-Responsive MicroRNAs in Arabidopsis thaliana S. Pfeffer, ed. *PLoS ONE*, 7(11), p.e48951.
- Liu, P.-P. et al., 2007. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal*,

52(1), p.133-146.

- Liu, W. et al., 2017. Nitrogen Limitation Adaptation (NLA) is involved in source-to-sink remobilization of nitrate by mediating the degradation of NRT1.7 in Arabidopsis. *New Phytologist*, 214(2), p.734-744.
- Lobbes, D. et al., 2006. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO reports*, 7(10), p.1052-1058.
- Malamy, J.E. & Benfey, P.N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development*, 124(1), p.33-44.
- Mallory, A.C., Bartel, D.P. & Bartel, B., 2005. MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *The Plant cell*, 17(5), p.1360-75.
- Mallory, A.C. & Vaucheret, H., 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics*, 38(6s), p.S31-S36.
- Mao, Y., Xue, X. & Chen, X., 2009. Are small RNAs a big help to plants? *Science in China Series C: Life Sciences*, 52(3), p.212-223.
- Marin, E. et al., 2010. miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and Their AUXIN RESPONSE FACTOR Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. *The Plant Cell*, 22(4), p.1104-1117.
- Marschner, H. & Marschner, P., 2011. *Marschner's mineral nutrition of higher plants* 3rd ed., Academic Press.
- Martínez-Zapater, J.M. & Salinas, J., 1998. *Arabidopsis protocols. Methods in Molecular Biology. Volume 82*, Humana Press.
- Meinke, D.W. et al., 1998. Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science.*, 282(5389), p.662-679.
- Meyers, B.C. et al., 2008. Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell Online*, 20(12), p.3186-3190.
- Miyashima, S. et al., 2011. Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the Arabidopsis root. *Development*, 138(11), p.2303-2313.
- Moore, M.J., 2005. From Birth to Death: The Complex Lives of Eukaryotic mRNAs. *Science*, 309(5740), p.1514-1518.
- Nath, M. & Tuteja, N., 2016. NPKS uptake, sensing, and signaling and miRNAs in plant nutrient stress. *Protoplasma*, 253(3), p.767-786.
- Nguyen, G.N. et al., 2015. Role of microRNAs involved in plant response to nitrogen and phosphorous limiting conditions. *Frontiers in Plant Science*, 6(August), p.1-15.
- Nodine, M.D. & Bartel, D.P., 2010. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & development*, 24(23), p.2678-2692.
- Overvoorde, P., Fukaki, H. & Beeckman, T., 2010. Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), p.a001537.
- Papp, I. et al., 2003. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant physiology*, 132(3), p.1382-90.
- Parniske, M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), p.763-775.

- Peragine, A. et al., 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development*, 18(19), p.2368-2379.
- Petricka, J.J., Winter, C.M. & Benfey, P.N., 2012. Control of Arabidopsis Root Development. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), p.563-590.
- Ramachandran, V. & Chen, X., 2008. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5895), p.1490-2.
- Ren, G., Chen, X. & Yu, B., 2012. Uridylation of miRNAs by hen1 suppressor1 in Arabidopsis. *Current biology : CB*, 22(8), p.695-700.
- Rodriguez, R.E., Schommer, C. & Palatnik, J.F., 2016. Control of cell proliferation by microRNAs in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 34, p.68-76.
- Rothstein, S.J., 2007. Returning to our roots: making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. *The Plant cell*, 19(9), p.2695-9.
- Rudall, P.J., 2007. *Anatomy of Flowering Plants: An Introduction to Structure and Development* 3a ed., New York: Cambridge University Press.
- Smith, S. & De Smet, I., 2012. Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1595), p.1441-1452.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P. & Green, P.J., 2004. AtXRN4 Degrades mRNA in Arabidopsis and Its Substrates Include Selected miRNA Targets. *Molecular Cell*, 15(2), p.173-183.
- Stauffer, E. & Maizel, A., 2014. Post-transcriptional regulation in root development. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 5(5), p.679-696.
- Stepien, A. et al., 2017. Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(3), p.e1403.
- Stricklin, S.L., Griffiths-Jones, S. & Eddy, S.R., 2005. C. elegans noncoding RNA genes. *WormBook*.
- Tang, G., 2005. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(2), p.106-114.
- The Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, 408(December), p.796-815.
- Vaucheret, H., 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, 13(7), p.350-358.
- Vaucheret, H., 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations. *Genes and Development*, 20(7), p.759-771.
- Verbelen, J.-P. et al., 2006. The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signaling & Behavior*, 1(6), p.296-304.
- Vidal, E.A. et al., 2010. Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), p.4477-4482.
- Vidal, E.A. et al., 2015. Transcriptional networks in the nitrate response of Arabidopsis thaliana. *Current Opinion in Plant Biology*, 27(August), p.125-132.
- Wang, J.-W. et al., 2005. Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(8), p.2204-2216.

- Wang, Y. et al., 2013. Elucidation of miRNAs-Mediated Responses to Low Nitrogen Stress by Deep Sequencing of Two Soybean Genotypes M.-J. Virolle, ed. *PLoS ONE*, 8(7), p.e67423.
- Weigel, D. & Jürgens, G., 2002. Stem cells that make stems. *Nature*, 415(6873), p.751-754.
- Williams, L. et al., 2005. A database analysis method identifies an endogenous transacting short-interfering RNA that targets the Arabidopsis ARF2, ARF3, and ARF4 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), p.9703-9708.
- Willmann, M.R. & Poethig, R.S., 2007. Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), p.503-511.
- Wójcik, A.M. & Gaj, M.D., 2016. miR393 contributes to the embryogenic transition induced in vitro in Arabidopsis via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment. *Planta*, 244(1), p.231-243.
- Xie, Q. et al., 2000. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & development*, 14(23), p.3024-36.
- Xie, Z., Kasschau, K.D. & Carrington, J.C., 2003. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Current biology : CB*, 13(9), p.784-789.
- Xuan, W., Beeckman, T. & Xu, G., 2017. Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, p.57-65.
- Yang, L. et al., 2006. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 47(6), p.841-850.
- Yoon, E.K. et al., 2010. Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in Arabidopsis lateral root development. *Nucleic Acids Research*, 38(4), p.1382-1391.
- Yu, B. et al., 2005. Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. *Science*, 307(5711), p.932-935.
- Zhang, S., Liu, Y. & Yu, B., 2015. New insights into pri-miRNA processing and accumulation in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(5), p.533-545.
- Zhao, M. et al., 2012. Cloning and Characterization of Maize miRNAs Involved in Responses to Nitrogen Deficiency S. Pfeffer, ed. *PLoS ONE*, 7(1), p.e29669.
- Zhao, M. et al., 2011. Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in Arabidopsis. *New Phytologist*, 190(4), p.906-915.
- Zhao, Y. et al., 2012. The Arabidopsis nucleotidyl transferase HESO1 uridylates unmethylated small RNAs to trigger their degradation. *Current biology : CB*, 22(8), p.689-694.