

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Jaklová

Role malých RNA v transgenerační stresové paměti rostlin

The role of small RNAs in transgenerational plant stress memory

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Hana Marková

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 02.05.2023

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych velmi poděkovala vedoucí mé práce Mgr. Haně Markové za veškeré připomínky a rady, bez kterých bych se neobešla a za velkou trpělivost po celou dobu mého zpracování této bakalářské práce.

Abstrakt

Rostliny jsou neustále ovlivňovány různými abiotickými i biotickými stresy, které vyvolávají celou řadu reakcí. Výsledkem může být zvýšená tolerance rostlin vůči různým stresovým faktorům jako je napadení herbivory nebo nedostatek vody. Tato odolnost může být mimo jiné i epigenetickými mechanismy přenesena i na další generace. Na tvorbě mezigenerační i vícegenerační stresové paměti se mohou hojně podílet malé RNA sloužící jako signální molekuly rychlé odpovědi rostliny na stres. MiRNA jsou převážně regulátory genové exprese, prostřednictvím svých inhibičních a degradačních aktivit řídí transkripci genů a translaci velkého množství proteinů. SiRNA by se mohly účastnit přenosu transkripční paměti prostřednictvím mechanismu RNA řízené DNA methylace (RdDM). Methylace DNA a histonové modifikace společně slouží jako chromatinové značky, jež je možné epigeneticky přenést do dalších generací. Na základě toho pak rostliny odvozené od stresu vystavených rodičovských rostlin vykazují velké změny v genové expresi oproti rostlinám s nestresovanými rodiči. Tyto změny pak přetrvávají po různě dlouhou dobu v závislosti na tom, zda je opět genová exprese indukována stresovým faktorem či nikoli. Zájem o pochopení mechanismů transgenerační stresové paměti v poslední době značně vzrostl a tyto znalosti mohou již brzy umožnit jejich potenciální aplikaci na šlechtění rostlin odolných vůči environmentálním stresům.

Klíčová slova: malé RNA miRNA, siRNA, rostliny, stres, paměť, transgenerační, methylace DNA

Abstract

Plants are constantly affected by various abiotic and biotic stresses, which cause a whole range of reactions. The result can be increased plant resistance to various stress factors such as herbivory attack or lack of water. Additionally, this resistance can also be passed on to subsequent generations through epigenetic mechanisms. Small RNAs serving as signaling molecules of the plant's rapid response to stress can play a large part in the formation of intergenerational and multigenerational stress memory. MiRNAs are mainly regulators of gene expression, through their inhibitory and degradative activities they control the transcription of genes and the translation of a large number of proteins. SiRNAs could participate in the transfer of transcriptional memory through the mechanism of RNA-directed DNA methylation (RdDM). DNA methylation and histone modifications together act as chromatin marks that can be epigenetically transferred to subsequent generations. Based on this, plants derived from stressed parent plants show large changes in gene expression compared to plants with non-stressed parents. These changes then persist for varying lengths of time, depending on whether gene expression is again induced by the stress factor or not. Interest in understanding the mechanisms of transgenerational stress memory has recently grown considerably, and this knowledge may soon allow for potential application in the breeding of plants resistant to environmental stresses.

Key words: small RNAs, miRNA, siRNA, plant, stress, memory, transgeneration, methylation DNA

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	Abscisic acid	Kyselina abscisová
AGO	Argonaute	protein Argonaut
APX2	Ascorbate peroxidase 2	Askorbát peroxidáza 2
ARF	Auxin response factor	Auxin responzivní faktor
bp	Base pair	Párů bází
BRI1	Brassino steroid insensitive 1	Protein necitlivý na brassinosteroid 1
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyklický adenosinmonofosfát
CLV	Clavata protein	Protein Clavata
CMT3	Chromomethylase 3	Chromomethyláza 3
CNI1	Carbon/ nitrogen insensitive 1	Protein necitlivý na uhlík/ dusík 1
CREB	cAMP response element-binding protein	cAMP responzivní element vázající protein
DCL	Dicer-like	Diceru podobný protein
DDM1	Deficient in DNA Methylation 1	Protein deficientní při methylaci DNA 1
DME	Demeter	Protein Demeter
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DRM1	Domains rearranged methyltransferase 1	Domény přeskupující methyltransferáza 1
DRM2	Domains rearranged methyltransferase 2	Domény přeskupující methyltransferáza 2
dsRNA	Double-stranded RNA	Dvouřetězcová RNA
F1	Filial 1	První generace
FAD	Flavin adenine dinukleotid	Flavin adenin dinukleotid
FAMA	Fluorescence-assisted mismatch analysis	Transkripční faktor FAMA
FKBP13	FK506-binding protein 13	Protein vázající FK506 13
H3K9	Histone 3 lysine 9	Histon 3 lysin 9
hc-siRNA	Heterochromatic siRNA	Heterochromatická siRNA
HEN1	Hua enhancer 1	Protein Hua zesilovač 1
HMA	Heavy-metal-associated	Protein asociovaný s těžkými kovy
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins	Heterogenní jaderné ribonukleoproteiny
HSA32	Heat-stress-associated 32	Související s tepelným stresem 32
HSFA2	Heat shock transcription factor A2	Transkripční faktor tepelného šoku A2
HST1	Hasty 1	Protein Hasty 1
HTT5	Heat induced TAS1 target 5	Tepelně indukovaný cíl TAS1 5
HYL1	Hyponastic leaves 1	Protein HYL 1
IR	Inverted repeat	Invertovaná repetice
JOX1	Jasmonate induced oxygenases 1	Jasmonátem indukovaná oxygenáza 1
LRR	Leucine-rich repeat	Repetice bohaté na leucin
LTR	Long terminal repeats	Dlouhé terminální repetice
MAPK	Mitogen-activated protein kinases	Mitogenem aktivované proteinkinázy
MET1	Methyltransferase 1	Methyltransferáza 1
miRNA	MicroRNA	mikroRNA
MMS	Methylmethanesulfonate	Methylmethansulfonát
MOM1	Morpheus molecule 1	Morpheus molekula 1
mRNA	Messenger RNA	Mediátorová RNA
MYB20	MYB domain protein 20	Doménový protein MYB 20
MYB75	MYB domain protein 75	Doménový protein MYB 75
nat-siRNA	Natural cis-antisense transcript siRNA	Přírodní cis-antisense transkript siRNA
NCRF	Non-coding RNA fragment	Nekódující fragment RNA
ncRNA	Non-coding RNA	Nekódující RNA
nd-sRNA	Non dicer sRNA	sRNA nezávislá na Dicer proteinech

NRT2.1	Nitrate transporter 2.1	Transportér dusičnanů 2.1
nt	Nucleotid	Nukleotid
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns	Molekulární vzory asociované s patogeny
POLIV	RNA polymerase IV	RNA polymeráza IV
POLV	RNA polymerase V	RNA polymeráza V
PPR	Pentatricopeptide repeat	Pentatrikopeptidové repetice
PR1	Pathogenesis-related protein	Protein související s patogenezí
pre-miRNA	Precursor-miRNA	Prekurzor-miRNA
pri-miRNA	Primary miRNA	Primární miRNA
pst	Pseudomonas syringae pv tomato	Pseudomonas syringae pv rajče
PTGS	Post-transcriptional gene silencing	Post-transkripční genové umlčování
PVX	Potato virus X	X virus bramboru
ra-siRNA	Repeat-associated siRNA	siRNA související s repeticí
RCD1	Radical induced cell death 1	Radikály indukovaná buněčná smrt 1
RDDM	RNA-directed DNA methylation	RNA řízená methylace DNA
RDR	RNA-dependent RNA polymerase	RNA-dependentní RNA polymeráza
RE	Repeat elements	Repetitivní elementy
REF6	Relative of early flowering 6	Regulátor časného kvetení 6
RING	Really interesting new gene	Doména zinkového prstu RING
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA-indukovaný umlčovací komplex
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
RNÁZA III	RNA polymerase III	RNA polymeráza III
ROS	Reactive oxygen species	Reaktivní formy kyslíku
RRF	Ribosomal RNA fragment	Fragment ribozomální RNA
rRNA	Ribosomal RNA	Ribozomální RNA
SAR	Systemic acquired resistance	Systémově získaná rezistence
SE	Serrate	Protein Serrate
SGIP1	Src homology 3-domain growth factor receptor-bound 2-like endophilin interacting protein 1	Se src homologický 3-doménový růstový faktor navázaný na receptor 2 podobný endofilin interagujícímu proteinu 1
SGS3	Suppressor of gene silencing 3	Supresor umlčování genů 3
SI	Stomatal index	Stomatální index
siRNA	Small interfering RNA	Malá interferující RNA
snRF	Small nucleolar RNA fragment	Malý fragment jadéřkové RNA
snRF	Small nuclear RNA fragment	Malý fragment jaderné RNA
SOD	Superoxiddismutase	Superoxiddismutáza
SPCH	Speechless	Trankripční faktor Speechless
SPL	Squamosa promoter binding protein-like	Protein podobný proteinu vážící promotor squamosy
sRNA	Small RNA	Malá RNA
SRO1	Similar to RCD-ONE1	Podobný proteinu RCD-ONE1
ssRNA	Single-stranded RNA	Jednovláknová RNA
TAS	Trans acting siRNA protein	Trans působící siRNA protein
ta-siRNA	Trans-acting siRNA	Trans-působící siRNA
TE	Transposable elements	Transponovatelné prvky
TMV	Tobacco mosaic virus	Virus tabákové mozaiky
tRF	tRNA-derived fragment	Fragment odvozený od tRNA
tRNA	Trasfer RNA	Trasferová RNA

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Malé RNA.....	2
2.1	miRNA.....	2
2.2	siRNA.....	4
2.2.1	ta-siRNA	4
2.2.2	nat-siRNA	5
2.3	tRNA fragmenty	5
2.4	RNA řízená DNA methylace	5
3	Stresová paměť rostlin	7
4	Abiotické stresové faktory	9
4.1	Sucho	9
4.2	Teplo.....	13
4.3	Salinita	19
4.4	Nutriční stres	21
4.5	UV záření.....	22
5	Biotické stresy	23
5.1	Napadení patogeny.....	23
5.2	Napadení herbivory.....	25
6	Kombinace stresorů.....	27
7	Závěr.....	30
8	Použitá literatura.....	32

1 Úvod

Rostliny jako přisedlé organismy bez možnosti pohybu nemohou uniknout stresu, a proto si musejí vyvinout strategie, jak se se stresem lépe vyrovnat. V několika předchozích desetiletích došlo ke změnám klimatu a vznik stresových podmínek pro rostliny je čím dál častější (Shahzad a kol., 2021). Aby se rostliny vyrovnaly s abiotickým i biotickým stresem, mohou vyvolat různé adaptivní změny v růstu, vývoji a biologických funkcích, jako jsou morfologické úpravy, fyziologické změny, epigenetické modifikace a akumulace ochranných metabolitů a prospěšných proteinů. Bylo zjištěno, že v řadě případů jsou rostliny schopny si tyto adaptační změny v reakci na specifický stres uložit do paměti a při opětovném působení stresoru reagovat rychleji a efektivněji, případně si vyvinout jistou odolnost. Lämke a Bäurle (2017) definovali tři různé typy stresové paměti: somatickou stresovou paměť, mitoticky dědičnou, která přetrvává pouze po dobu života rostliny; mezigenerační stresovou paměť, která je pozorovatelná pouze v první generaci bezstresového potomstva a transgenerační paměť, která je meioticky dědičná a pozorovatelná po více než dvou generacích potomků, které nebyly vystaveny působení stresového faktoru (Lämke a Bäurle, 2017). Zděděná stresová paměť je spjata s různými molekulárními mechanismy a vyznačuje se navýšením celkové genové exprese v rostlině i následných generacích. Jeden z prvních výzkumů na toto téma ukázal, že vystavení rostlin UV záření a flagellinu vykazuje zvýšení hladin homologních rekombinací, které bylo přeneseno, a i na několik dalších generací rostlin již stresovým podmínkám nevystavených (Molinier a kol., 2006).

Abiotické stresy, jako je sucho, vysoká salinita či změny teplot, indukují změnu v expresi tisíců genů na transkripční i posttranskripční úrovni. Mezi zkoumané mechanismy transgeneračního přenosu epigenetické informace patří hormonální signalizace, změny v modulaci chromatinu (histonové modifikace, DNA methylace) a aktivity malých RNA (sRNA). Právě sRNA by mohly hrát velkou úlohu v epigenetické regulaci genů odpovídajících na stres a v přenosu chromatinových značek do potomstva stresovaných rostlin. MiRNA mají zejména regulační aktivity. Jejich sekvence jsou homologní k sekvencím regulovaných genů, čímž znemožňují transkripci nebo indukují degradaci příslušné mRNA. V případě vystavení stresoru je exprese větší části miRNA inhibována a dochází k nárůstu exprese jejich cílových genů. SiRNA se více než na regulaci exprese podílí na epigenetické paměti rostlin prostřednictvím RNA řízené DNA methylace (RdDM). Methylace DNA vede k potlačení transkripce genů a chromatinové značky mohou být přeneseny na potomstvo a zajistit tak lepší toleranci vůči stresu.

Malé RNA v transgenerační paměti rostlin mají velký potenciál a mohou být využity v zemědělském průmyslu k vytvoření geneticky modifikovaných rostlin odolnějších vůči suchu, vysokým teplotám a dalším negativním podmínkám. Cílem této práce je detailně prozkoumat potenciální role malých RNA v genové regulaci a rostlinné toleranci abiotického i biotického stresu se zaměřením na transgenerační stresovou paměť a shrnout poznatky ze studií tímto tématem se zabývajících.

2 Malé RNA

Malé RNA fungují jako epigenetické regulátory s důležitými funkcemi při růstu rostlin, reprodukčním vývoji a reakcích na abiotický i biotický stres. Ve srovnání s ostatními epigenetickými mechanismy, jako je modifikace chromatinu či methylace DNA, mohou sRNA rychle reagovat na různé environmentální a stresové podněty a působit jako mobilní signální molekuly k regulaci úrovně exprese jejich cílových genů (Shukla a kol., 2008). Malé RNA je možno rozdělit na dvě hlavní skupiny, a to mikro RNA (miRNA) a krátké interferující RNA (siRNA). Dle svého původu a působení je možné siRNA dále dělit na trans-působící malé interferující RNA (ta-siRNA), přirozené antisense siRNA (nat-siRNA), siRNA asociované s repetitivy (ra-siRNA) aj. (Spurná a kol., 2018).

Malé RNA rostlinám umožňují přesně regulovat expresi genů souvisejících se stresem prostřednictvím transkripčního i post-transkripčního umlčování genů (Baulcombe, 2004). Původní práce Lee a kol. (1993) ukazuje, jak gen *lin-4* reguluje vývoj u háďátek (*Caenorhabditis elegans* (Maupas)) nikoli kódováním proteinu, ale produkcí sRNA. sRNA jsou tvořeny sekvenčně homologně s cílovými mRNA transkripty v dokonalém nebo nedokonalém Watson-Crickově párování bází, což vede buď k degradaci mRNA transkriptu (běžnější u rostlin) nebo k inhibici translace (častější u živočichů) (Dorokhov a kol., 2006).

Protože téma malých RNA je příliš obsáhlé na to, aby se vešlo do jedné kapitoly a vystačilo by na samostatnou práci, podrobnější informace je možné dohledat v následujících přehle doových článcích – Chakraborty a kol., 2022; Chow a Mosher, 2023; Salim a kol., 2022; Tang a kol., 2022.

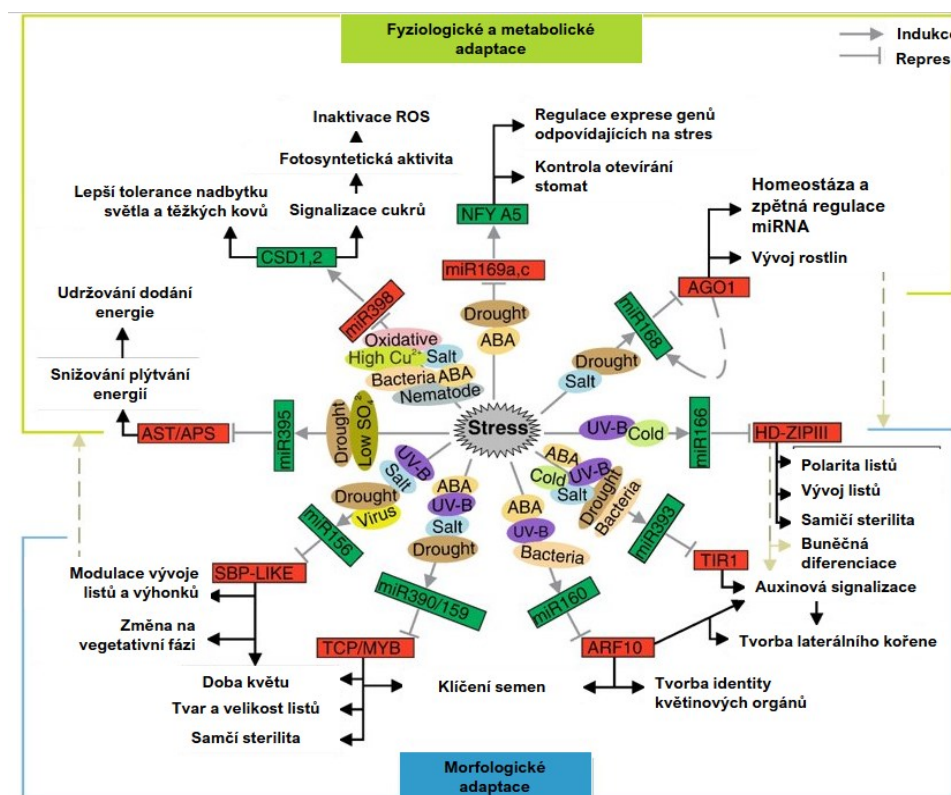
2.1 miRNA

Nejvíce prozkoumány z malých RNA jsou 21-24 nukleotidů dlouhé miRNA. Nejprve vzniká v jádře primární miRNA (pri-miRNA) transkribovaná RNA polymerázou II nebo III (Lee a kol., 2002). Pri-miRNA je dále zpracována, pomocí Dicer-like proteinů (DCL), především DCL1, asociovanými s proteiny HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) a SERRATE (SE), na duplex miRNA-miRNA* s tzv. stem-loop, což je prekurzor miRNA (pre-miRNA) (Bélanger a kol., 2023; Kurihara a kol., 2006). Ten je následně odštěpen od duplexu endoribonukleázou RNázy III a duplex je poté methylován na 3' konci pomocí HUA ENHANCER 1 (HEN1) a přenesen do cytoplazmy pomocí HASTY (HST1), exportinového proteinu (Yang a kol., 2006). Tam se spojuje s proteinem Argonaut (AGO) a společně vytvoří RNA indukovaný umlčovací komplex (RISC) (Baumberger a Baulcombe, 2005) (Obr. 2). Tento komplex už se pak podílí na samotné regulaci exprese dalších genů (Kurihara a Watanabe, 2004).

MiRNA působí na posttranskripční úrovni a jejich regulace spočívá v inhibici translace nebo degradaci cílové mRNA. Vazebná místa jsou pro miRNA komplementární sekvence na genech nebo 5' netranslatované oblasti nebo 3' netranslatované oblasti. Hlavními cíli miRNA jsou geny pro transkripční

faktory (Jones-Rhoades a Bartel, 2004). Některé miRNA jsou exprimovány velmi málo, mají na starosti regulaci růstu a vývoje rostlin. Jiné, regulující specifičtější dráhy, vznikají ve velkém množství a většinou inhibují expresi svých cílových genů (Glazov a kol., 2008). Bylo již potvrzeno, že genová exprese je za optimálních podmínek regulována směrem k podpoře růstu a vývoje rostlin (Vaucheret a kol., 2004; Mallory a kol., 2005). V souvislosti se stresem se růst a vývoj zastavuje či zpomaluje a dochází k mobilizaci procesů k adaptaci na stres. MiRNA, jejichž hladiny jsou stresem navýšeny, inhibují expresi genů, které mají pro rostlinu vypořádávající se se stresem negativní důsledky, a naopak miRNA vlivem stresu ubývající umožní zvýšenou tvorbu proteinů s pozitivními účinky na stresované rostliny i jejich potomky (Bazzini a kol., 2007; Li a kol., 2008).

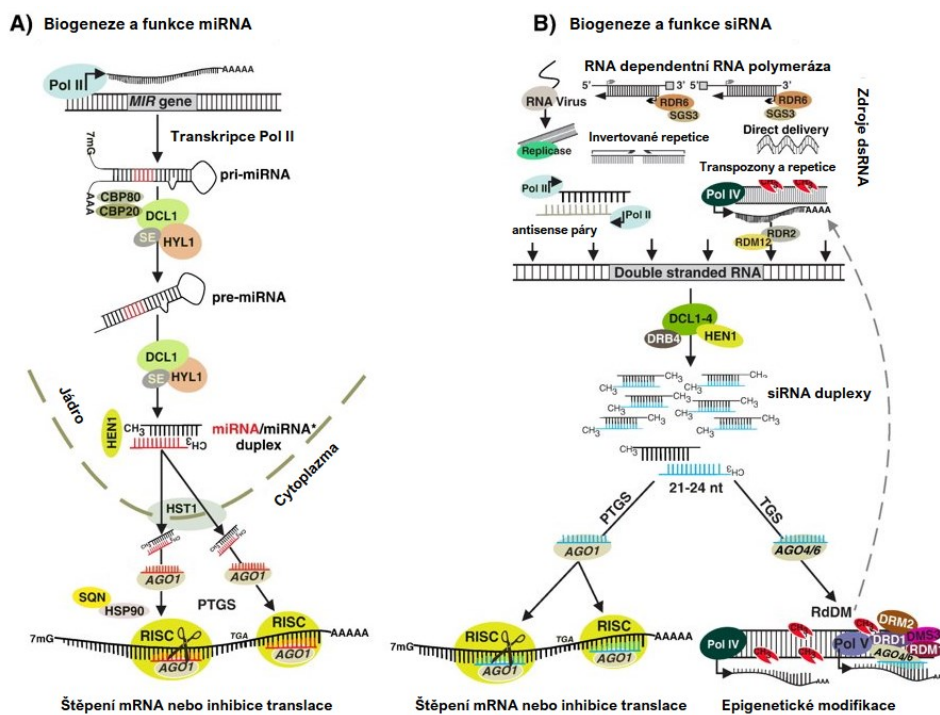
Mnoho různých výzkumů ukázalo, že působení miRNA je velmi široké a celá řada různých miRNA se podílí na regulaci esenciálních vývojových a metabolických drahách rostlin, včetně změny vývojové fáze (Aukerman a Sakai, 2003) či transdukce signálu (Zhu a kol., 2020) a také se účastní odpovědi rostlin na různé formy abiotických i biotických stresů, jako je např. vysoká salinita (Çakır a kol., 2021), stresové reakce z chladu a dehydratace (Aslam a kol., 2020), či houbová infekce (Zhu a kol., 2022). Ve většině případů miRNA nefungují samostatně, ale jejich regulační aktivity se mnohokrát překrývají a samotná regulace funguje na základě změn v expresích miRNA a jejich cílových genů, což je schematicky znázorněno na obr. 1.



Obr. 1. Regulační síť miRNA odpovídajících na stres u huseníčku: zeleně miRNA, jejichž hladiny se zvyšovaly, červeně miRNA se sníženou expresí. (Převzato a upraveno z Kraiwesh a kol., 2012)

2.2 siRNA

siRNA jsou 21-24 nukleotidové RNA (Hamilton a Baulcombe, 1999; Zamore a kol., 2000), které jsou zpracovány z dvouvláknové RNA (dsRNA) získané např. transkripcí z invertovaných repetic nebo působením RNA-dependentních RNA polymeráz (RDR), které převádějí jednovláknovou RNA (ssRNA) na dsRNA za pomoci proteinů RDR6 a supresoru genového umlčování 3 (SGS3) (Dalmay a kol., 2000; Mourrain a kol., 2000). Zpracování dsRNA provádějí enzymy RNázy III podobné Dicer proteinům a specifické DCL proteiny (Xie a kol., 2004). Velikost siRNA pak závisí na účastnícím se enzymu. (Lee a kol., 2004). Dále jsou, podobně jako miRNA, asociovány s proteiny AGO1, se kterým vytváří RISC (Obr. 2). Jejich regulační funkce následně vedou k degradaci mRNA nebo inhibici exprese na posttranskripční úrovni nebo řízení methylace DNA na transkripční úrovni. Také bylo zjištěno, že se siRNA podílí na regulaci exprese genů u rostlin vystavených abiotickým stresorům (Sunkar a Zhu, 2004), jako jsou změny teplot, salinita a sucho (Yao a kol., 2010).



Obr. 2. Biogeneze miRNA (A) a siRNA (B) (Převzato a upraveno z Kraiwesh a kol., 2012)

2.2.1 ta-siRNA

Jednou z důležitých podskupin siRNA jsou ta-siRNA, které jsou generovány pomocí miRNA a DCL1, jež zpracovávají transkripty genu *TAS*, což vede k produkci primárních transkriptů nazývaných pri-ta-siRNA (Allen a kol., 2005). Tyto primární transkripty jsou dále konvertovány proteiny RDR6 a SGS3 za vzniku dsRNA (Peragine a kol., 2004). DsRNA je pak zpracována proteinem DCL4 a vznikají 21nt dlouhé ta-siRNA (Vazquez a kol., 2004).

U huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) byly identifikovány čtyři rodiny genů *TAS*, přičemž

transkripty *TAS1* a *TAS2* rozpoznává miR173, *TAS3* rozpoznává miR390 a na *TAS4* cílí miR828 (Allen a kol., 2005). Změny v hladinách miRNA tak mají vliv i na expresi ta-siRNA (a také nat-siRNA). Prokázání tohoto vlivu bylo zkoumáno ve studii s huseníčkem, kde zvýšené exprese miR173 a miR390 způsobily nárůst hladin transkriptů všech genů TAS (Moldovan a kol., 2010). Ta-siRNA odvozené od genu *TAS1* se účastní reakcí na stres po zvýšení teploty, který inhibuje jejich expresi (Zhong a kol., 2013), čímž je umožněna transkripce genů pro proteiny tepelného šoku jako jsou např. *HEAT-INDUCED TAS1 TARGET1* a *TARGET2 (HTT1 a HTT2)* (Li a kol., 2014).

2.2.2 nat-siRNA

Nat-siRNA je další třída siRNA a je odvozena od přirozených cis-antisense transkriptových párů genů *SRO5* a *P5CDH* a prokázala důležitou roli v osmoregulaci a zvládnání oxidačního stresu při solném stresu u huseníčku rolního. Při vysoké salinitě je navýšena produkce 24nt siRNA (s pomocí proteinu DCL2), která je homologní k mRNA *SRO5*, tato siRNA následně cílí na mRNA *P5CDH* a indukuje její degradaci (Borsani a kol., 2005). Z kousků transkriptů je pak za pomoci proteinu DCL1 umožněna další degradace, která vede k produkci 21nt nat-siRNA (Lu a kol., 2008). Úbytek transkriptů *P5CDH* vede k akumulaci prolinu, což má pozitivní vliv na schopnost rostliny tolerovat nadbytek soli (Borsani a kol., 2005).

2.3 tRNA fragmenty

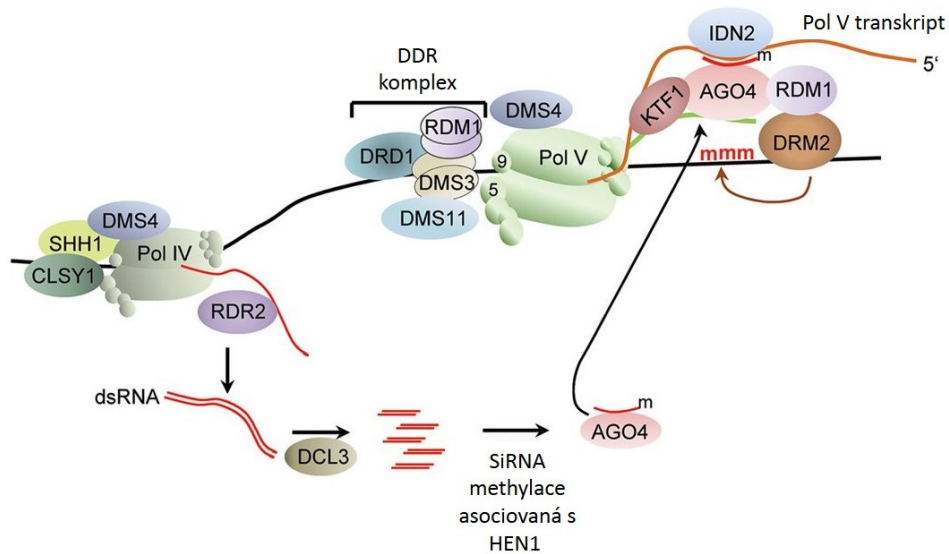
Fragmenty RNA odvozené od tRNA (tRF) jsou také třídou siRNA reagujících na stres, které mohou fungovat při transkripční, post-transkripční a translační regulaci (Alves a kol., 2017). Jejich velikost je 15-35bp, mohou či nemusí být asociovány s Dicer proteiny a jsou odvozeny z 5' nebo 3' konce tRNA. Podrobnější informace lze najít v přehledu Kumar a kol. (2016). Vznikají různé typy tRF specifické pro určitou aminokyselinu a dle své specifity jsou exprimovány při různých stresových podnětech (Thompson a kol., 2008). Např. tRF specifický pro byl indukován pod solným stresem a tRF specifický pro arginin byl vysoce zvýšený stresem z nedostatku vody (Loss-Morais a kol., 2013).

2.4 RNA řízená DNA methylace

Se siRNA je spjatý další epigenetický mechanismus, a to methylace DNA (Mathieu a Bender, 2004). Společně s histonovými modifikacemi jsou tyto dva mechanismy, fungující narozdíl od předchozích na transkripční úrovni, nejpravděpodobnějšími důvody udržení a přenosu stresové paměti do dalších generací (Molinier a kol., 2006; Chinnusamy a Zhu, 2009). Různými metodami bylo zjištěno, že během generativní fáze migruje větší množství siRNA do zárodečných buněk či embrya, což by mohlo být možné vysvětlení, jak se methylace přenáší na potomstvo (Slotkin a kol., 2009).

Samotná methylace DNA nemusí být zděděna sama o sobě, ale může být přenesena na potomstvo působením siRNA v mechanismu zvaném RdDM (Mathieu a Bender, 2004, Matzke a Birchler, 2005).

RdDM je indukována siRNA prostřednictvím dvou RNA polymeráz, RNA POLYMERÁZY IV (Pol IV) a RNA POLYMERÁZY V (Pol V), které řídí akumulaci siRNA regulujících DNA metylaci (Obr. 3) (El-Shami a kol., 2007).



Obr. 3. Model RNA dependentní methylace DNA: Pol IV se podílí na produkci siRNA, které následně v kooperaci s AGO4 regulují de novo metylaci DNA závislou na Pol V (Převzato a upraveno z Eun a kol., 2012)

Hlavní methyltransferázou udržující metylaci v CG místech je METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) (Aufsatz a kol., 2004). Rostliny také methylují non-CG místa. Methylace na CNG (kde N = libovolná báze) a CNN místech (kde N = A, T nebo C) se provádí rostlinně specifickými methyltransferázami CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) a DOMAIN REARRANGED METHYLTRANSFERASE 1a a 2 (DRM1 a DRM2) (Cao a kol., 2003). DRM1 a DRM2 jsou nutné pro veškerou de novo metylaci DNA a jsou řízeny siRNA (Onodera a kol., 2005). CMT udržuje metylaci v CNG a CNN místech (Jackson a kol., 2002).

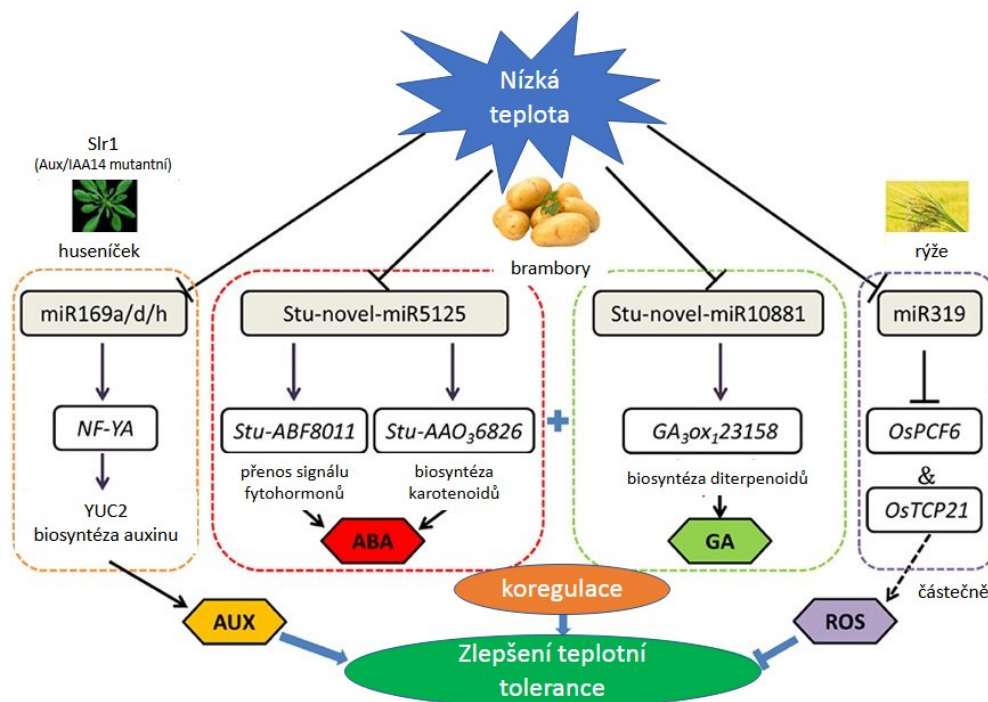
Methylace DNA je velmi úzce spjatá s regulací transponovatelných elementů (TE) a RdDM je hlavním kontrolním mechanismem umlčování TE v rostlinách. V souvislosti s reakcí na stres je nejvíce probádaný retrotranspozon citlivý na tepelnou změnu, ONSEN (Hayashi a kol., 2020).

3 Stresová paměť rostlin

Stresová paměť rostlin může být popsána jako jev, jehož prostřednictvím se uchovává informace o minulém stresovém podnětu a jeho výsledkem je upravená reakce na opakující se stres nebo trvalá reakce po aktivačním stresovém podnětu. Stresovou paměť lze rozdělit na dva hlavní typy, a to somatickou a transgenerační.

V této práci se zabývám pouze transkripční paměť rostlin, existují však i další způsoby uchování paměti u rostlin, jako je např. akumulace nízkomolekulárních látek. Transkripční paměť je po nějakou dobu trvající rozdílná odpověď v genové expresi po vnějším podnětu. Změnou genové exprese se rozumí buď aktivace nebo represe transkripce genu, která zůstává po působení stresu trvalá nebo postupně odezní a znovu nastává po opětovném působení stresoru. Transkripční paměť souvisí s tzv. paměťovými geny. Jsou to geny, které rostlina může "trénovat" v odpovědi na nějaký stres. Trénovanost genů se pak projeví v mnohem rychlejší transkripci během působení stresu (Ding a kol., 2012). Jejich regulace se účastní spousta malých RNA, ovlivňují transkripci a dochází tak k hormonální i metabolické kontrole (Yue a kol., 2022) (Obr. 4). Tyto geny vykazují jisté podobnosti v některých regulačních vzorcích, a to i v odlišných třídách rostlin. Během porovnání jednoděložné rostliny kukuřice (*Zea mays* L.) a dvouděložné rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) vyšlo najevo, že obě rostliny mají při vícenásobném stresu podobné vzorce odpovědi a vzniku transkripční paměti je dosaženo analogickými způsoby. Ne všechny paměťové geny však fungují na obdobných principech. Mnoho jich je druhově specifických. Navíc se ukázalo, že odpověď na stres není stejná u stresu, který rostlina zažila jen jednou a u stresu, jež zažívá již po několikáté. Čím násobnější stres je, tím komplexnější je modifikace v transkripci genů. Zapojuje se více drah či kaskád, více signálních molekul, včetně sRNA, a dochází k více reakcím. V tomto porovnání je počet genů kukuřice zapojených do obecné odpovědi na stres mnohem menší než u huseníčku. Ale navýšení exprese je častější než snížení exprese, kdežto u huseníčku je to opačně. Důležité je, že výsledkem jsou geny schopné znovu reagovat na stres, prostřednictvím transkripční paměti (Ding a kol., 2014).

Somatická stresová paměť je stresová paměť v rámci jednoho jedince, který byl opakovaně vystaven stresu. Má se za to, že somatická stresová paměť může být zprostředkována podmínkami, ve kterých semeno roste a podněty vnesenými do semene nebo embrya mateřskou rostlinou. Naproti tomu transgenerační paměť má pravděpodobně epigenetický základ, který zahrnuje metylace DNA, modifikace histonů a chromatinu a působení malých RNA (Jaskiewicz a kol., 2011).



Obř. 4. Několik miRNA zapojených do nízkoteplotního stresu primárně transdukci fytohormonového signálu a mechanismem vychytávání ROS v rostlinách (Převzato a upraveno ze Zhang a kol., 2022a)

Transgenerační stresovou paměť lze rozdělit na mezigenerační a vícegenerační. Adaptace na působení stresoru, které sahají od jedné stresované generace organismů po alespoň první bezstresovou generaci potomků se nazývají termínem mezigenerační paměť. Do tohoto typu paměti se řadí i potomstvo, jež se vyvíjelo na mateřské rostlině (Rendina a kol., 2016). Pokud je paměť zjiřitelná i po alespoň dvou bezstresových generacích nazývá se vícegenerační.

Dlouhodobou transgenerační paměť regulovanou epigenetickými mechanismy se zabývali Johnsen a kol. (2005) ve studii na smrku ztepilém (*Picea abies* L.). Autoři vyslovili hypotézu, že teplota během mateřské reprodukce ovlivňuje adaptační vlastnosti u potomků smrku ztepilého. Semena vyprodukovaná za chladnějších období vykazovala ovlivnění teplotou a vývoj nových rostlinek byl opožděný. Avšak poté, co vyklíčily, ukázala se během dalších měsíců u potomstva vznikajícího v chladném reprodukčním prostředí větší životaschopnost než u potomků ze semen produkovaných v teplém prostředí. Byla pozorována snížená úroveň transkripce genů, které mohou regulovat vývoj pupenů, chladovou aklimatizaci a embryogenezi u potomků s paměť zvýšených embryonálních teplot. Produkce semen v chladném prostředí naopak napomohla nasazování pupenů a celkové chladové adaptaci. Mateřské prostředí tedy může ovlivnit potomstvo až na několik let (Johnsen a kol., 2005).

Udržování vzorů methylace je nezbytné pro epigenetickou regulaci transkripce u rostlin. V pokusu s rostlinou huseníčku mutantní pro udržení methylace v několika po sobě jdoucích generacích bylo zjiřeno, že v každé generaci rostlina methylaci obnovuje za pomoci alternativních epigenetických mechanismů. Tyto mechanismy, které zahrnují RdDM, inhibici exprese DNA demethyláz

a přeměrování methylace histonu 3 (H3K9), však působily náhodně a nekoordinovaně. V důsledku toho se v průběhu několika generací rostlin v nepřítomnosti methylací postupně vytvářely nové epigenetické vzorce. Tyto výsledky ukázaly, že methylace je důležitou součástí epigenetické paměti a zajišťuje stabilní transgenerační dědičnost u rostlin (Mathieu a kol., 2007).

Autoři Iwasaki a Paszkowski (2014) si kladli otázku, zda je transgeneračnímu přenosu možno zabránit. Domnívali se, že dědičnost způsobují mechanismy remodelující chromatin, a proto pokusné rostliny huseníčku mutantní pro dva regulátory chromatinu Deficient in DNA Methylation 1 a Morpheus molecule 1 (DDM1 a MOM1) vystavili vysokým teplotám. U rostlin mutantních buď pro DDM1 nebo MOM1 byla vlivem stresu navýšena exprese a snížena methylace, ale ta nebyla přenesena na potomstvo. U dvojitého mutantu pro DDM1 i MOM1 se genová exprese také zvýšila a zároveň bylo navýšení vlivem nízké methylace detekováno i u potomků. Byla tak potvrzena role DDM1 a MOM1 v dědičnosti transgenerační paměti i to, že jejich inhibicí lze zabránit přenosu transgenerační paměti na potomstvo (Iwasaki a Paszkowski., 2014).

4 Abiotické stresové faktory

4.1 Sucho

Nedostatek vody znamená značné komplikace pro růst a vývoj rostlin. Autoři studie Wijewardana a kol. (2019) zjistili, že tento typ stresoru například negativně ovlivňuje ve velikost semen, obsah živin – jako je vláknina či bílkoviny, a klíčivost semen sóji luštinaté (*Glycine max* L.), která je pro svá semena pěstována. Během nedostatku vody rostliny neukládají příliš mnoho živin do semen, což může být pozitivně regulováno pomocí sRNA. Ačkoliv se ve studii zaměřené na toto téma neprokázal příznivý vliv stresu na kvalitu semen potomků stresovaných rodičů, jejich potomci měli ve srovnání s potomky nestresovaných rodičů nižší obsah chlorofylu a vyšší obsah flavonoidů, což je typický ochranný mechanismus proti abiotickým stresorům (Wijewardana a kol., 2019).

Rostliny se přizpůsobují suchu také z hlediska své morfologie, například dochází k indukci dlouhivého růstu kořenů do hloubky a díky této adaptaci může rostlina znovu získat přístup k živinám a vodě a obnovit tvorbu biomasy (Nosalewicz a kol., 2016). Pokud byla suchem stresována prarodičovská a rodičovská rostlina, potomci vykazovali nejlepší výsledky tolerance k suchu. Následné generace byly stále odolnější suchu i poté, co jedna z nich prožila období blahobytu (Herman a kol., 2012). V jiné studii autoři Liu a kol. (2021c) analyzovali dvě generace rostlin pšenice tvrdé (*Triticum durum* Desf.) vystavené suchu. Potomstvo stresovaných rostlin vykazovalo ve všech sledovaných parametrech (obsah chlorofylu, hospodaření s vodou, jakost zrna) lepší výsledky než potomstvo rostlin nestresovaných (Liu a kol., 2021c).

Nedostatek vody způsobuje omezení fotosyntetických procesů, což může vést k narušení energetické bilance rostlin a možnému nedostatku živin. Hlavními důsledky jsou snížení obsahu chlorofylu v listech, oxidační poškození fotosyntetického aparátu a inhibice asimilace oxidu uhličitého (Abid a kol., 2016). Bylo však dokázáno, že minimálně jedno vystavení rostlin stresu z nedostatku vody napomáhá lepšímu hospodaření s vodou a vzhledově se projevuje větší produkcí biomasy a růstem kořenů hluboko do půdy (Lou a kol., 2018).

Li a kol. (2011) ve své práci detailněji věnovali mechanismu působení miRNA a dokázali, že stresem indukované adaptace na sucho za pomoci sRNA jsou reálné, a to ve svém výzkumu týkajícím se topolu (*Populus euphratica* Oliv.). Tento druh je odolný i vůči silnému suchu či zasolení půdy (Gries a kol., 2003), proto byl právě on podroben sekvenování miRNA, za účelem zjištění variability a množství přítomných miRNA. Tato analýza ukázala, že celkové množství miRNA v rostlinách vystavených suchu se snížilo. Neznamená to ale, že by v rostlinách došlo ke snížení hladin všech miRNA. Změnou způsobenou suchem se snížil počet hojně exprimovaných miRNA, byla snížena jejich transkripce, díky čemuž mohla rostlina odpovědět na sucho. V souvislosti s tím se též zvýšil počet rRNA, což koreluje se zvýšením translace specifických proteinů. Většina ostatních miRNA byla naopak exprimována více, došlo k potlačení hlavních metabolických drah a projevíly se dráhy vedlejší, jejichž produkty se účastní odpovědi na stres (Li a kol., 2011).

Tím, že by změny v hladinách miRNA mohly být předávány do dalších generací u pšenice tvrdé, se více zabývala práce Liu a kol. (2021c). Naměřené hodnoty u potomstva ukázaly, že hladiny miRNA regulujících některé geny (např. pro biosyntézu karotenoidů a metabolismus porfyrinu a chlorofylu) se snížily a těmito geny kódované proteiny byly u F1 (filial 1) generace exprimovány více. Pomocí metod sekvenování mRNA a transkriptomu ve sledovaných odrůdách autoři našli stovky párů miRNA-mRNA, tedy miRNA, jež v rostlině působí v antagonistických regulačních vzorcích vůči svým homologním mRNA (tj. významně snížená exprese miRNA odpovídající významně zvýšené expresi mRNA nebo významně zvýšená exprese miRNA odpovídající významně snížené expresi mRNA). Potomstvo stresovaných rodičů vykazovalo 4x větší množství miRNA-mRNA párů s významně rozdílnou expresí než potomstvo nestresovaných rodičů.

Tyto změny v expresi velkého množství miRNA vedly k proměně celého transkriptomu sledovaných rostlin, které se vyrovnávaly s působením stresu. Autoři porovnávali nejvíce aktivní biologické dráhy u potomků rostlin pěstovaných za působení stresu a za normálních podmínek. U F1 generace odvozené od nestresovaných rodičů byly nejvíce exprimovány čtyři biologické dráhy – biosyntéza aminoacyl-tRNA, anténní proteiny fotosyntézy, endocytóza a metabolismus glyoxylátu a dikarboxylátu. V zrnu bylo nejvíce exprimované geny, jejichž produkty se účastní zpracování proteinu v endoplazmatickém retikulu. U potomstva stresovaných rodičů došlo k největšímu navýšení exprese genů (snížením

exprese celé řady miRNA) pro metabolismus glyoxylátu a dikarboxylátu, fixaci uhlíku a interakci rostlina-patogen, zatímco v zrna byl navýšen transport všech RNA (Liu a kol., 2021c). Tyto dráhy mají vyšší aktivitu při odpovědi na sucho a vedou k větší efektivitě fotosyntézy a využití vody, čímž se u potomstva suchem stresovaných rodičů vyvine tolerance vůči nedostatku vody (Lou a kol., 2018).

Příkladem působení antagonistických miRNA-mRNA zaznamenaných u potomků stresovaných rostlin a podílejících se na těchto významných drahách může být dráha ko04075, jež se účastní přenosu signálu rostlinného hormonu a mezi její miRNA cílové geny patří geny, jako je auxinový reakční faktor, proteinová fosfatáza 2C, proteiny domény TIFY a amidosyntetáza kyseliny jasmonové. Významná je i dráha ko00710, jejíž členové regulují fixaci uhlíku a cílí miRNA jsou geny jako malátdehydrogenáza, fruktóza-bisfosfátaldoláza a ribulózabisfosfátkarboxyláza. Obě tyto dráhy asociované s miRNA tedy regulují prostřednictvím snížení hladin příslušných miRNA celou řadu důležitých genů, tyto geny jsou najednou mnohem více exprimována a jimi kódované bílkoviny se mohou začít hromadit, což by mohlo mít za důsledek pozorovanou zvýšenou odolnost potomků vůči suchu.

Autoři této studie rovněž vystavili suchu potomky stresovaných i nestresovaných rodičů. Pouze stresovaná F1 generace odvozená od stresovaných rodičů vykazovala snížení exprese miRNA jako ata-miR167b-3p, bdi-miR394 a osa-miR398a_L + 1R-1. Zajímavé je, že v jejich vyvíjejících se zrnech bylo pozorováno naopak navýšení exprese dvou z výše uvedených miRNA, a to ata-miR167b-3p a osa-miR398a_L + 1R-1. Mezi geny nejvíce exprimované u stresovaných potomků stresovaných rodičů patřila cytidylát kináza (regulace snížením hladiny ata-miR167b-3p), protein F-boxu (regulace ata-miR528-5p), poly[ADP-ribóza] polymeráza SRO1 (similar to RCD-ONE1) (regulace ata-miR528-5p) a gen histonu H4 (regulace tae-miR398_L + 1R-1). Největší rozdíly v expresi měly ttu-miR160 a tae-miR408_L-1 (regulující gen enoyl-CoA hydratázy), které byly u potomků stresovaných rodičů exprimovány málo a u potomků nestresovaných rodičů naopak hodně.

Autoři také například zaznamenali změny v hladině bdi-miR394, což je jedna z malých RNA, která reguluje gen pro glutathionreduktázu a působí v listech pšenice. Její hladiny se vlivem sucha u potomků významně navýšily, a tím i činnost askorbát-glutathionového cyklu, jež zajišťuje vychytávání reaktivních forem kyslíku (ROS).

Další miRNA jejíž hladina byla u rodičů i jejich potomků při stresu snížena byla ata-miR167b-3p, která reguluje expresi genu pro adenylát kinázu (Liu a kol., 2021c). Tento enzym se podílí na hospodaření s energií v chloroplastech prostřednictvím kontroly rovnováhy ADP a ATP (Igamberdiev a Kleczkowski, 2011). Obdobným způsobem funguje i snížení hladiny tae-miR408_L-1, čímž se navýší exprese proteinů biosyntézy klastru železa a síry. Pár osa-miR827 a rodina transportérů podobných EamA opět zvyšuje hladiny svých cílových genů, jejichž produkty se podílí na transportu auxinu a aminokyselin.

Přítomnost či nepřítomnost všech již uvedených miRNA tedy u potomků stresovaných rostlin vedla

ke zlepšení hospodaření s vodou a zvýšila efektivitu fotosyntézy (např. se zvýšil obsah chlorofylu a snížila průduchová vodivost listů, díky čemuž se snižuje asimilace CO₂). Důsledkem je, že zrna vyprodukovaná potomky stresovaných rodičů navíc obsahovala více bílkovin a fenolů oproti zrnům od potomků, jejichž rodiče suchem netrpěli (Liu a kol., 2021c). To podporuje hypotézu, že aktivace specifických drah pomocí miRNA vede k tomu, že do zrn je ukládáno více bílkovin a dalších živin (Tabassum a kol., 2017).

Kromě dědičných změn v hladinách miRNA byly v případě stresu suchem sledovány i změny v methylovanosti DNA, které mohou souviset s působením siRNA. Působení siRNA na methylovanost konkrétních genů zkoumali Tricker a kol. (2013). U potomstva huseničky rolního zjišťovali stabilitu methylovanosti DNA na genech *speechless (SPCH)* a *FAMA*, jež se účastní vývoje stomat. Po vystavení rodičů suchu došlo k akumulaci siRNA a nárůstu methylovanosti DNA v oblasti genů *SPCH* a *FAMA*, čímž došlo ke snížení jejich exprese a ke snížení tzv. stomatálního indexu (SI, počet stomatálních buněk). U první generace potomstva pěstovaného bez vlivu stresu byla methylovanost *SPCH* i *FAMA* zachována. U *SPCH* se zachovala ve větší míře, u *FAMA* byla podobnost menší.

Ve chvíli, kdy byla první generace vystavena stejnému stresu jako rodiče, množství siRNA se náhle snížilo a methylovanost DNA byla odstraněna. Ve druhé generaci, kdy přímí rodiče nebyli vystaveni stresu, se methylovanost nepřenese a SI se vrátil k původnímu stavu (Tricker a kol., 2013), což by souhlasilo s dřívější hypotézou, že přenos jistého fenotypu do následných generací vlivem stresu není jistý (Boyko a kol., 2010).

Ve studii s rdesnem červicem (*Polygonum persicaria* L.) potomci stresovaných rostlin opět prokázali zvýšený růst kořenů, zvětšení listové plochy a též nárůst objemu biomasy oproti potomkům dobře zalévaných rostlin, obdobně jako v předchozích studiích. Autoři této studie pozorovali změnu methylovanosti související s nárůstem obsahu bílkovin a škrobů v semenech a vyslovili hypotézu, že změny v methylovanosti DNA byly zděděny od stresovaných rodičů s pomocí malých RNA. Pro kontrolu byla indukována demethylovanost DNA, jež odstranila veškeré účinky zděděných adaptací a demethylované rostliny nevykazovaly žádné výkyvy v genové expresi, čímž byla prokázána role methylovanosti DNA v epigenetické dědičnosti rostlin (Herman a Sultan, 2016).

V jiné studii autoři Preite a kol. (2018) sledovali přenos methylovanosti DNA a možnou roli sRNA v tomto mechanismu. Tento experiment byl proveden na několika generacích rostlin pampelišky lékařské (*Taraxacum officinale* Wig.) opakovaně vystavených suchu. V první generaci se ukázala pouze menší tolerance. Ve druhé generaci stresovaných rostlin pocházejících od stresovaných rodičů už však byla odolnost suchu prokazatelnější a byly měřitelné také změny v produkci sRNA. Došlo ke zvýšení produkce sRNA a ke zvýšení methylovanosti. Dokonce i po jedné generaci nevystavené stresu zůstala methylovanost zachována (Morgado a kol., 2017).

Různými metodami bylo zjištěno, že během generativní fáze migruje větší množství sRNA do zárodečných buněk či embrya, což by mohlo být možné vysvětlení, jak se methylace přenáší na potomstvo (Slotkin a kol., 2009). Při zkoumání vlivu sucha na metylaci DNA u ječmene (*Hordeum vulgare* L.), se ukázalo, že období, kdy rostlina tvoří semena je nejvhodnější pro asociaci sRNA a methylace. Vysoce výkonným sekvenováním RNA byla mimo jiné odhalena přítomnost malých heterochromatických RNA (hc-siRNA), jež jsou obecně pro odpověď rostlin na sucho typické. Byly pozorovány jen ty hc-siRNA, které vykazovaly přítomnost u rostlin stresovaných a nebyly přítomny u rostlin stresu nevystavených. Největší nárůst byl pozorován u hc-siRNA homologní ke genu pro cytokinin-oxidázy 2.1 (HvCKX2.1). Právě v promotorové oblasti tohoto genu byla zjištěna vyšší methylace DNA, což vedlo ke snížení exprese genu *HvCKX2.1* a naopak zvýšení koncentrací jeho substrátu – cytokininů. Nárůst cytokininů byl nejvíce znatelný během klíčení zrn, již vyklíčené sazeničky ječmene pocházející od stresovaných rostlin klíčily rychleji. Tento proces může být vysvětlen tak, že všechny sledované hc-siRNA během sucha migrovaly ve zvýšené míře do zrn ječmene a nesly s sebou informaci o methylaci DNA v některých genech účastnících odpovědi rostliny na sucho, což přineslo výhodu i potomstvu stresovaných rostlin, ačkoliv zrna byla již v době stresu vytvořena (Surdonja a kol., 2017). Zajímavé ovšem je, že ve výše uvedené studii na pampelišce docházelo k přenosu methylace i poté, co byl stres aplikován během vegetativní fáze (Morgado a kol., 2017).

4.2 Teplo

Velmi častým typem stresu, se kterým se rostliny setkávají, je tepelný stres, způsobující inhibici růstu a navýšení ROS v organismu rostlin, jež narušují buněčnou homeostázu. Následkem toho dochází ke změnám genové exprese mimo jiné i snížením či zvýšením hladin sRNA, jež ve většině případů přispívají ke zvýšení genové exprese a tvorbě proteinů tepelného šoku (HSP) (Kushawaha a kol., 2021). Například ve studiích topolu plstnatého (*Populus tomentosa* Carr.) a břízy (*Betula luminifera* (H.J.P. Winkl)) autoři jejich sekvenováním prokázali roli miRNA, jež snížením svých transkriptů navýšily expresii genů, jejichž kódované proteiny pozitivně působily na transport látek, antioxidaci, udržení buněčné stěny a minimalizaci oslabení růstu a vývoje rostlin (Chen a kol., 2012, Pan a kol., 2017).

Expresi některých miRNA však může být působením stresu i zvýšena. Tepelný stres například indukuje expresi miR156, která negativně reguluje transkripční faktory *SPL*. Tyto transkripční faktory regulují vývojové přechody a omezují diferenciaci orgánů. MiR156 zároveň pozitivně reguluje expresi dalších proteinů s pozitivními účinky (většinou proteiny tepelného šoku, např. APX2, HSA32, HSFA2) na stresovou odpověď a tato podpora exprese zůstává dlouhodobá. (Stief a kol., 2014).

MiRNA původně pocházejí z ncRNA, jejichž produkce také mohou být ovlivněny vystavením rostliny stresu. Nekódující RNA fragmenty (ncRF) mohou být mj. odvozeny od tRF (Byeon a kol., 2017). TRF

figurují v odezvě na stres ze sucha (Loss-Morais et al., 2013) či tepelný stres u rostlin pšenice (*Triticum aestivum* L.), kde různé typy sRNA prokazatelně poskytly potomstvu stresovaných rostlin zvýšenou termotoleranci (Wang et al., 2016). Rozdílná exprese ncRF byla analyzována v potomstvu rostlin vystavených vysoké teplotě a kontrolních rostlin brukve řepáku (*Brassica rapa* L.). Rostliny, jež byly analyzovány, nebyly vystaveny žádnému stresu, a proto jakýkoli rozdíl pozorovaný v této práci byl způsoben vystavením teploty u rodičovské generace. Sledovány byly hladiny různých ncRNA v listech potomstva nestresovaných a stresovaných rostlin a výsledkem bylo nalezení rozdílné exprese a zpracování tRNA fragmentů (tRF) a malých jadérekových RNA fragmentů (snoRF), ale nikoliv rRNA fragmentů (rRF) a malých jaderných RNA fragmentů (snRF). Autoři u potomstva tepelně stresovaných rostlin zaznamenali významně vyšší hladiny tRNA a nižší hladiny rRNA, snoRNA a miRNA. Porovnání distribuce tRF v stresované rodičovské generaci a jejich potomstvu ukázalo malý rozdíl v těchto dvou skupinách, což naznačovalo, že tento vzor byl pravděpodobně zděděn.

Nejvýraznějším rozdílem mezi potomstvem tepelně stresovaných a kontrolních rostlin byla změna v abundanci tRF a snoRF. U potomstva tepelně stresovaných rostlin bylo pozorováno významné snížení procenta tRF alaninu, tRF argininu a tRF tyrosinu a významné zvýšení tRF aspartátu. Co se týče snoRF, některé typy byly v potomstvu tepelně stresovaných rostlin sníženy. V potomstvu tepelně stresovaných rostlin byl také významně vyšší počet některých tRF cílených na proteiny řídící metabolismus brassinosteroidů, hladiny snoRF účastnících se regulace těchto proteinů byly nespecificky zvýšeny i sníženy. Na základě těchto výsledků se autoři domnívali, že zdědění rozdílné exprese tRF a snoRF zacílených na gen zapojený do metabolismu brassinosteroidů umožňuje, aby potomstvo tepelně stresovaných rostlin bylo lépe připraveno reagovat na stres (Byeon a kol., 2019).

Studiem příspěvku sRNA k transgenerační dědičnosti vyvolané tepelným šokem u brukve řepáku se zabývali Bilichak a kol. (2015). Rodičovské rostliny byly pěstovány při vysokých teplotách a jejich analyzovaní potomci již stresu vystaveni nebyli. Celkově byly pozorovány změny v akumulaci sRNA v rostlinách brukve ošetřených tepelným šokem s téměř rovnoměrným zastoupením počtu genů se zvýšenou i sníženou expresí. Nejvýraznější změny byly překvapivě zjištěny v rostlinných pletivech, které nebyly přímo vystaveny stresu, jako je pyl a endosperm. Menší změny byly zaznamenány v listech, meristému květenství, oplodněných vajíčkách a embryu. Žádná ze sledovaných sRNA nereagovala na tepelný stres v neoplozených vajíčkách. Nejvyšší nárůst genové exprese byl pozorován v endospermu. To může být vysvětleno demethylací genomu a snížením exprese genů souvisejících s inhibicí exprese (Hsieh a kol., 2009).

Většina genů indukovaných stresem ve všech tkáních byla zařazena do kategorie „genů odpovědi na stres“. Potomstvo stresovaných rostlin mělo detekovatelný pokles sRNA ovlivňujících expresi genů a transpozonů, což bylo v souladu s celkovým nárůstem regulace genové exprese pozorované

u potomstva stresovaných ve srovnání s kontrolními rostlinami. Zatímco geny zapojené do reakce na stres byly převládajícími domnělými cíli v pylu a listech potomstva, v endospermu byly nejvíce navýšeny sRNA řídící genovou expresi zapojené do procesu metabolismu RNA a transportu. Autoři si také všimli zvýšení hladin tRF zapojených do regulace brassinosteroidových proteinů u potomků stresovaných rostlin podobně jako ve studii Bye on a kol. (2019).

Protože k největším změnám genové exprese došlo v endospermu, byly právě tam sledovány páry miRNA/mRNA. Velice zajímavý byl objev změny genové exprese u tepelně stresovaných rodičů i u jejich potomků v případě rodiny miRNA miR168, jež regulují protein AGO1, který je esenciální pro metabolismus miRNA (Vaucheret a kol., 2004). Zatímco u listů, neoplozených a oplozených vajíček bylo pozorováno nevýznamné snížení genové exprese AGO1, velké zvýšení bylo detekováno v meristému květenství a pylu. Exprese AGO1 byla celkově podobná v potomstvu stresovaných a nestresovaných rostlin, i když bylo detekováno velké zvýšení hladin miR168 u potomků tepelně ošetřených rostlin (Bilichak a kol., 2015). Jedním z možných vysvětlení by mohlo být, že promotory AGO1 i miR168 jsou aktivovány za podmínek abiotického stresu, což by naznačovalo, že zvýšení hladiny miR168 je nezbytné pro udržení stabilní hladiny transkriptu AGO1 během stresové reakce (Li a kol., 2012). Je tedy možné, že exprese některých genů souvisejících se stresem musí být doprovázena i zvýšením hladin regulujících miRNA.

Rozdíly v expresi různých párů miRNA/mRNA sledovali autoři Liu a kol. (2021b) ve své studii s pšeníc tvrdou, kde použili semena již dříve suchem stresovaných rostlin, a vzrostlé semenáčky vystavili vysokým teplotám. Dále analyzovali potomstvo těchto semenáčků pěstované již bez stresu. V rámci stejného typu analyzované tkáně byl počet významných párů miRNA-mRNA vyšší ve skupinách od stresovaných rodičů ve srovnání s těmi od kontrolních rodičů.

Vybrané páry miRNA-mRNA měly společný rys – vzájemně působily antagonisticky, tedy významně snížená exprese miRNA odpovídala významně zvýšené expresi mRNA a naopak. Příkladem může být pár protein F-boxu a miR528, kdy hladina miR528 byla snížena a gen proteinu F-boxu vykazoval nejvyšší expresi ve skupinách potomstva od kontrolních rodičů ze všech sledovaných miRNA-mRNA párů (Liu a kol., 2021b). Proteiny F-boxu mají významnou roli v adaptaci rostlin na různé abiotické stresy, jelikož regulují expresi dalších proteinů souvisejících s odpovědí na stres a pomáhajících rostlině vypořádat se s oxidačním poškozením (Zhou a kol., 2015). Podobnou funkci má i gen pro katalázu-1 regulovanou miR5054 či pro Cu/Zn superoxidodismutázu (SOD) regulovanou miR398 (Jagadeeswaran a kol., 2009), které se účastní vylučování ROS (Liu a kol., 2021b).

Zajímavé je, že v jiné studii byly hladiny miR398 vlivem tepelného stresu navýšeny, čímž došlo k nižší expresi genů pro SOD a akumulaci ROS. Na základě toho se ještě více zvýšila exprese proteinů tepelného šoku a rostlina se se stresem velmi dobře vyrovnala (Guan a kol., 2013). K vyrovnání vlivu

stresu přispěly, po navýšení genové exprese snížením hladin příslušných miRNA, i páry ATPáza přenášející fosfolipidy (regulace miR837), faktor odezvy auxinu 17 (regulace miR408) a *FKBP13* (regulace miR160). Celkově tedy nižší exprese miRNA ve skupinách potomků od stresovaných rodičů umožnila vyšší expresi jejich cílových genů, jež mají pozitivní funkce při adaptaci rostlin na stres (Liu a kol., 2021b).

Zvýšením teploty na 22-30 °C došlo ke snížení hladiny exprese proteinů SGS3, což oslabilo tvorbu stabilních dsRNA esenciálních pro biogenezi siRNA. Na tvorbě dsRNA se podílí také dráhy posttranskripčního umlčení genů (PTGS), jež mohou být inhibovány zvyšující se teplotou (Depicker a Montagu, 1997; Szitty a kol., 2003).

Ve studii Zhong a kol. (2013) byly vybrány rostliny huseníčku rolního, konkrétně trpasličí mutanta s nedostatkem proteinu BRI1, zodpovědného za objemový růst. Tyto mutanty byly množené po 20 generací za účelem zjištění vlivu teploty na fenotyp. Trpasličí rostliny se při pěstování za teploty 15 °C nijak nezměnily, jejich vzhled byl stále udržován aktivním PTGS. Při pěstování při 30 °C však tyto rostliny přestaly být trpasličí, ale naopak vypadaly jako přírodní fenotyp, jelikož došlo ke snížení genu *SGS3* a inhibici PTGS a změně v morfologii rostlin. Rostliny byly pěstovány po několik generací za teplot v rozmezí 22-30 °C pro každou skupinu udržovaných konstantně. Na základě toho byla pozorována korelace mezi vzrůstající teplotou a procentem rostlin vypadajících jako standardní fenotyp, což je důsledek inhibice kroku vedoucího k tvorbě dsRNA a následně siRNA v rostlinách, čímž byla umožněna tvorba proteinu BRI1. Dalším poznatkem bylo, že teplem indukovaná epigenetická paměť byla udržována alespoň tři generace s rychle klesající silou. Pozdější generace bez stresu měly opět mutantní vzhled. Autoři také potvrdili svou hypotézu, že inhibice PTGS je specificky indukována pouze tepelným stresem a po vystavení rostlin stresu ze soli či sucha skutečně mutanty svůj vzhled neměnily. Experimentálně bylo ještě ověřeno, že nadměrná exprese genu *SGS3* aktivovala teplem spouštěnou inhibici biogeneze siRNA (Zhong a kol., 2013).

Jakým způsobem se děje přenos tohoto mechanismu na potomstvo se dále zabývali Liu a kol. (2019). Zjistili, že tepelným stresem indukovaný transkripční faktor HSFA2 aktivuje demethylázu REF6, která ho zpětnovazebně reprimuje. Spolu vytváří zpětnovazebnou smyčku a aktivují E3 ubikvitin ligázu SGS3 asociovanou s interaktivním proteinem 1 (SGIP1). Degradace SGS3 zprostředkovaná SGIP1 vede k inhibici biosyntézy trans-působící siRNA (ta-siRNA). Důsledkem působení smyčky REF6-HSFA2 a inhibice ta-siRNA je deaktivace TAS1 TARGET 5 (HTT5), který je kofaktorem proteinů tepelného šoku a který je cílem ta-siRNA a vyvolaný teplem řídí časně kvetení, ale také oslabuje imunitu (Liu a kol., 2019). Obecněji lze říct, že ta-siRNA jsou zvýšenou teplotou inhibovány, zatímco geny tepelného stresu, na které jsou ta-siRNA zaměřeny, jsou v důsledku inhibice ta-siRNA indukovány (Li a kol., 2014).

Studie Liu a kol. (2019) byla provedena na rostlinách huseníčku, vystavených tepelnému stresu

a posléze sledována doba kvetení, která zůstávala zrychlená ještě ve třetí generaci rostlin již nevystavených stresu. Inhibiči ta-siRNA došlo k nárůstu exprese genů zodpovědných za kvetení. V první generaci potomstva rostlin vystavených vyšší teplotě byla nejvíce snížena exprese dvou ta-siRNA, siR255 a siR1511. V dalších generacích jejich hladiny opět pomalu vzrůstaly. Dále bylo experimentálně ověřeno, že teplem indukovaná exprese proteinu SGIP1, jehož funkcí je degradace SGS3, která vede k inhibici ta-siRNA. Teplem aktivovaná exprese proteinu SGIP1 byla následně zděděna v potomstvu.

Analogicky i teplem indukovaná navýšená exprese HTT5 byla přenesena do potomstva. Důsledkem pak bylo snížení hladin ta-siRNA a zvýšená exprese cílových genů, např. AUXIN RESPONSE FACTOR 4 (*ARF4*) a MYB DOMAIN PROTEIN 75 (*MYB75*), které se velkým podílem účastní signalizace v rostlinné odpovědi na tepelný stres. Již bylo řečeno, že časně kvetení je kompenzováno sníženou imunitou. Autoři po nákaze rostlin bakterií *Pseudomonas syringae* (van Hall) pozorovali zvýšenou citlivost rostlin na patogen, čímž hypotézu potvrdili (Liu a kol., 2019).

Autoři studie zabývající se PTGS Zhong a kol. (2013) také pozorovali, že zvýšení teploty o 22–30 °C změnilo stav methylace DNA u rostlin huseníčku, nenalezli však korelaci mezi pozorovanými změnami methylace DNA cílových genů a inhibicí PTGS vyvolaným teplotou nebo jeho následnou transgenerační dědičností (Zhong a kol., 2013).

Methylaci DNA a její souvislosti se změnou teploty se zabývali Zhang a kol. (2022b). Jako pokusný materiál použili rostliny jahodníku obecného (*Fragaria vesca* L.) a během tří asexuálních generací pozorovali změny v methylaci a transkripci za teplot 18 °C a 28°C. Při 28 °C docházelo k negativním změnám v transkripci různých genů, zejména souvisejících s metabolismem giberelinu a dobou květu. V okolí těchto genů se methylace zvyšovala.

Podobná změna se vyskytla i u repetitivních elementů (RE) a genů v jejich blízkosti. Jedním takovým genem je i *SAWADEE*, který se aktivně účastní methylace DNA řízené RNA. Obecný pozorovaný účinek blízkosti RE byla snížená hladina transkriptu tohoto genu. Stejně tak následkem zvýšení teploty methylace DNA korelovala s genovou expresí. Pomalejší nástup kvetení byl detekovatelný i po třech asexuálních generacích, což naznačuje, že účinky na dobu kvetení se mohou při opakovaném stresu akumulovat po několika generacích (Zhang a kol., (2022b).

Otázkou, zda teplota má vliv na methylaci rostlin během stresu, se dále zabývali Yadav a kol. (2022). Během 25ti generací huseníčku rolního byl pozorován zvýšený nárůst *de novo* methylace (mechanismus RdDM), kdežto původní methylace byla spíše snížena. Mechanismus RdDM tak byl označen za teplem ovlivnitelný. Ve prospěch hypotézy, že DNA methylace může být v době stresu řízena siRNA, mluví to, že autoři pozorovali nárůst epimutací, způsobených vysokou methylací, v oblastech řídících biosyntézu a metabolismus DNA a RNA (včetně sRNA) a oblastech s geny odpovídajícími na biotické a abiotické stresy (Yadav a kol., 2022).

Je známo, že RdDM je hlavním regulátorem umlčování transponovatelných elementů (TE) v rostlinách. V případě *ONSEN*, což je retrotranspozon specifický tím, že je možné jeho aktivitu indukovat teplem, však methylace není dostatečná k jeho inhibici a za zvýšených teplot využívá reakce rostlin na stres a spouští transkripci (Cavrak a kol., 2014). Roli RdDM v souvislosti s *ONSEN* zkoumali na huseníčku Ito a kol. (2011). Autoři zjišťovali, jakým způsobem se projeví narušení biogeneze siRNA na teplem indukovanou akumulaci *ONSEN*u v rostlinách. Byly použity mutantní rostliny s inhibovanou biogenezí siRNA a pozorována velká frekvence nárůstu inzercí *ONSEN* v potomstvu tepelně stresovaných mutantních rostlin. Bezprostředně po vystavení stresu došlo k nárůstu *ONSEN* transkriptů, další tři dny byly stále detekovány ve zvýšené míře. Dále po vystavení stresu se transkripty *ONSEN* postupně rozkládaly a zkracovaly, až po 20-30ti dnech nebyly vůbec detekovány. V další generaci však proces začal znovu a *ONSEN* byl opět aktivní.

Co se týče porovnání hladin siRNA specifických pro *ONSEN* v mutantách a rostlinách divokého typu, tak u rostlin divokého typu se ihned po vystavení tepelnému stresu akumulovaly v oblastech LTR *ONSEN* 24nt siRNA, kdežto v mutantních rostlinách se vyskytovaly v malé míře, a nikoliv v blízkosti *ONSEN*. Až v několika dnech po vystavení stresu se začaly i u mutantních rostlin zvyšovat hladiny siRNA. SiRNA se však hromadily i v kontrolních rostlinách, a tak tyto výsledky ukázaly, že regulace zprostředkovaná siRNA je zodpovědná za omezení hladin transkriptů *ONSEN* po tepelném stresu, ale neúčastní se obnovy stavu během období zotavení rostlin.

Dosud byla přijata teorie, že vložení nových inzercí *ONSEN* do dceřiných rostlin je kontrolováno siRNA během gametofytické fáze (Mosher a kol., 2009). V této studii však bylo, díky 16ti generačnímu sledování vzorů nových inzercí, lišících se u každé dceřiné rostliny, prokázáno, že transpozice musely nastat ještě před gametogenezí. Retrotranspozice však nebyla pozorována u potomstva rostlin přírodního fenotypu vystavených stresu nebo u nestresovaných mutantních kontrol, což ukazuje na klíčovou roli dráhy siRNA při omezování retrotranspozice spouštěné stresem prostředí. Z hlediska stresové paměti bylo zajímavé zjištění, že *ONSEN* indukují v blízkých genech citlivost na teplo ve formě snížení či zvýšení genové transkripce, čímž pro rostlinu vzniká možnost pro zapojení dalších genů do odpovědi na stres (Ito a kol., 2011).

Na tuto studii navázali Matsunaga a kol. (2012) a tentokrát rostliny huseníčku podrobili vícenásobnému tepelnému stresu. Použili rostliny standardního fenotypu a mutantní rostliny s částečně inhibovanou biosyntézou siRNA, podrobili je tepelnému šoku a poté i jejich potomky a několik dalších generací. Vždy pouze u rostlin s narušenou biosyntézou siRNA došlo v každé generaci k inzerci, amplifikaci a aktivaci nových *ONSEN*. Hladina transkriptů *ONSEN* byla vyšší s opakujícím se stresem. Recipročním křížením mutantních rostlin autoři došli k závěru, že transpozice *ONSEN* byla odvozena od obou rodičů, protože k inzercím docházelo, ať už byla stresována samčí či samičí rostlina.

Další zajímavý poznatek pocházející již z předchozí studie je, že rostliny mutantní pro protein dcl3, patří do rodiny DCL, jež se, svou produkcí malých RNA, podílí na regulaci TE, i přes tuto mutaci nevykazovaly žádnou aktivitu *ONSEN*. Existují totiž proteiny schopné nahradit funkci dcl proteinů. Autoři se pokusili prokázat, že dcl proteiny jsou postradatelné při kontrole transgenerační transpozice u huseníčku. Použili kombinace rostlin s deficitem tří různých dcl proteinů, vystavili je tepelnému stresu a u jejich šesti potomků sledovali *ONSEN* transpozice. Až na trojitěho mutantu nebyly transpozice nikde detekovány, a tak byla teorie potvrzena (Matsunaga a kol., (2012).

4.3 Salinita

Zvýšená salinita způsobuje narušení osmotické rovnováhy a dochází ke změnám hladiny esenciálních iontů, jako jsou sodné a draselné, což má za následek poruchy v transportu a příjmu živin a minerálních látek, a negativní změny ve vodním potenciálu. Akumulace sodíku může mít ničivé následky, rostliny jsou však schopné ho aktivně vylučovat na povrch a odolávat tak stresu zasolením (Davenport a kol., 2005).

Destabilizace iontové rovnováhy rostliny vede k tomu, že pomaleji klíčí, kvete i roste. Vysoká salinita také způsobuje nadměrnou produkci ROS, zejména peroxidu vodíku. Vysoké hladiny ROS jsou účinně odstraňovány působením antioxidantních enzymů, jako jsou kataláza či superoxiddismutáza, jejichž zvýšená exprese je indukována snížením hladin sRNA (např. miR398) (Menezes-Benavente a kol., 2004; Sunkar a kol., 2006). U rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) stres zasolením indukuje aktivitu miR156, jež účinně působí jen při velmi silné salinitě a následkem je snižování příjmu sodných iontů v buňkách (Arshad a kol., 2017). Cílem miR156 jsou *SPL* geny (*Squamosa Promoter Binding Protein-Like*), což jsou transkripční faktory, které při solném stresu působí na rostlinu negativně, zejména co se týče snižování růstu listů i kořenů. Činnost miR156 je však exprese *SPL* genů snížena, což umožňuje vyšší růst biomasy i za stresových podmínek. Je tedy dokázáno, že se zvyšující se expresí miR156 se zlepšuje schopnost rostliny udržet růst i přes vysokou slanost prostředí, která by růst jinak inhibovala (Aung a kol., 2015).

Podobných výsledků dosáhli i Wang a kol. (2013) u rostlin bavlníku (*Gossypium* L.). Exprese různých miRNA se zvýšila s narůstající salinitou a míra exprese cílů jednotlivých miRNA byla až na výjimky snížena. Je však třeba zdůraznit, že exprese cílových genů byla při nízké koncentraci soli vyšší a až při vysoké salinitě teprve klesla, což poukazuje na to, že je třeba vysoké míry zasolení k tomu, aby byla u rostlin detekována výraznější stresová odpověď (Wang a kol., 2013).

Role siRNA v RdDM byla zkoumána v rostlinách huseníčku reagujících na stres zasolením, a to měřením úrovně exprese AtMYB74, proteinu patřícího do rodiny transkripčních faktorů MYB. AtMYB74 je normálně vysoce methylován pomocí RdDM a nízce exprimován. Stres zasolením však indukuje jeho expresi tím, že dojde ke snížení množství siRNA řídících methylaci, ta částečně zaniká a AtMYB74 je ve

zvýšené míře exprimován a spouští další dráhy v odpovědi na stres (Xu a kol., 2015).

Existuje tedy celá řada případů, kdy se sRNA účastní odpovědi rostlin na stres zasolením, ale z hlediska transgenerační paměti existuje pouze jediná studie Wibowo a kol. (2016). Při vysoké salinitě byly pěstovány rostliny huseníčku a následně byli jejich potomci v pěti generacích po první dvě generace pěstováni beze stresu, ve třetí generaci byli znovu pěstováni ve vysoce slaném prostředí. Potomstvo stresu vystavených rodičů vykazovalo příznivé adaptační změny a změny v methylaci DNA. Aby mohla být dokázána role RdDM ve zvýšení tolerance, byly navíc vypěstovány rostliny mutantní pro RdDM či v odstraňování methylace DNA. Tyto rostliny byly vystaveny vysoké salinitě a u jejich potomstva nebyla pozorována žádná adaptace a nikde nebyla detekována zvýšená methylace, což by naznačovalo, že transgenerační přenos závisí na RdDM nebo alespoň methylaci DNA. Dále bylo pozorováno, že přenosu stresové paměti se účastní převážně samičí linie, na samčí methylaci DNA chyběla (Wibowo a kol., 2016). To by mohlo být způsobeno aktivitou genu pro DNA glykosylázu DEMETER (DME), která odstraňuje epigenetické značky v samčích gametách a také inhibuje aktivitu TE. SiRNA produkované ve vegetativních jádrech mohou inhibovat transpozony ve spermatických buňkách v kooperaci s DME (Schoft a kol., 2011). Dědičnost adaptací tak v tomto případě byla nerovnoměrně rozložena mezi samičí a samčí linii.

Ve studii Wibowo a kol. (2016) byla také sledována exprese genu *CARBON/NITROGEN INSENSITIVE 1 (CNI1)*, který kóduje membránovou ubikvitin ligázu typu RING. V případě potomků stresovaných rostlin byla methylace tohoto genu snížena a byl u nich více exprimován. Opačná byla situace u potomstva nestresovaných rostlin a u potomků stresovaných rostlin znovu vystavených osmotickému stresu. Podobná situace byla pozorována ještě u několika dalších genů, včetně *MYB DOMAIN PROTEIN 20 (MYB20)*, který kóduje transkripční faktor zapojený do signalizace kyseliny abscisové (ABA) a podílí se na toleranci vůči stresu.

Vysoké salinitě byly vystaveny i mutantní rostliny s narušenou methylací a další dvě generace jejich potomků. U těchto potomků pak nebyla zjištěna žádná stresová reakce a *CNI1* byl normálně exprimován. Methylace *CNI1* však je neobvykle vzdálená od lokusu genu. Pro ověření působení methylace na dálku byly mezi methylovanou sekvencí a gen vloženy inzerce, a následně po vystavení takto upravených rostlin stresu se ukázalo, že je gen regulován, jako by methylace na příslušném místě nebyla. Při úplném odstranění methylované sekvence byla genová exprese opět zvýšena. A posléze, zavedením invertované repetice, která přímo řídila methylaci pomocí RdDM, se ukázalo, že i při osmotickém stresu a za přítomnosti methylace, se genová exprese *CNI1* již nesnížila (Wibowo a kol., 2016).

4.4 Nutriční stres

Nutriční stres může na rostliny působit podobně jako stres osmotický. Nedostává-li se rostlině například fosforu či dusíku, mění v důsledku stresu svou morfologii, např. zmenšením listové plochy či prodloužením kořenů. V různých studiích byly objeveny miRNA úzce související s nedostatkem dusíku. Např. v bramborách (*Solanum tuberosum* L.) byly studovány miR397 a miR398 regulující genové exprese různých přenašečů, proteinů rodiny F-boxů a proteinů se zinkovým prstem (Tiwari a kol., 2020). V pšenici to byla TaMIR444, přispívající ke zlepšení antioxidační enzymatické aktivity při nedostatku dusíku (Guo a kol., 2016). Kromě dusíku může být rostlina vystavena i nedostatku draslíku. V pšenici vystavené tomuto stresu byla objevena miR408, která měla hlavní roli při vyrovnávání se rostliny se stresem (Zhao a kol., 2020).

Transgenerační účinky stresu z nedostatku živin byly zkoumány u apomiktických pampelišek obecných. Pampelišky byly vystaveny nutričnímu stresu a potomstvo rostlin stresovaných živinami vykazovalo zvýšenou reakci na poměr kořene a výhonku, když bylo vystaveno stresu z živin, ve srovnání s potomky kontrolních rostlin, kde nebyl pozorován žádný rozdíl v poměru kořene a výhonků. Tato zvýšená reakce kořene a výhonků byla doprovázena udržením vyšších hladin tkáňového fosforu při nutričním stresu. Rodičovský nutriční stres způsobil také redukci délky listů potomstva. Veškeré procesy byly doprovázeny snížením methylace DNA a autoři se domnívali, že by mohla být ovlivňována malými RNA (Verhoeven a Gurp, 2012).

Analýza methylace DNA byla prováděna i na rostlinách rýže seté (*Oryza sativa* L.). Po vystavení stresu z působení nadměrného množství těžkých kovů (Cd, Cr, Cu a Hg) byl u analyzovaných rostlin inhibován vývoj výhonků a kořenů a indukovány transgenerační změny v jejich DNA methylačním vzoru na specifických lokusech. Potomstvo stresovaných rostlin vykazovalo zvýšenou toleranci ke stejnému stresu, který zažívali rodiče, a zároveň u nich byla pozorována snížená methylace DNA na specifických genech. U rostlin byla měřena hladina malých RNA a sledována souvislost se změnou exprese devíti genů. U rodičů došlo ke zvýšení exprese pěti genů a ke snížení exprese zbylých čtyř genů. Tento expresní vzor se s malými odchylkami zachoval i u první a druhé generace potomků, kteří již stresu nebyli vystaveni (Ou a kol., 2012).

V další studii s rýží se autoři zaměřili na specifické geny odpovědi na stres z působení těžkých kovů a ověřili, že u genů pozitivně působících na stres (zejména rodina proteinů HMA, které regulují příjem a transport těžkých kovů, případně jejich vyloučení) byla jejich exprese významně zvýšena. Sledovali stav methylace na několika genech (geny pro TE *Tos17* a *Osr42*, dále pro hox geny, geny DNA-vazebných proteinů, elongačních faktorů a transportérů těžkých kovů) s významným nárůstem exprese. Po tři generace byla zachována míra exprese těchto genů nebo se ještě zvýšila, a tak autoři vyslovili hypotézu, že methylace DNA a siRNA mohou hrát roli v této transgenerační stresové paměti

(Cong a kol., 2019), nicméně je potřeba více důkazů pro ověření této hypotézy.

Nedostatek dusíku byl v souvislosti se stresovou pamětí zkoumán u rostlin pšenice tvrdé, kdy byly rodičovské rostliny vystaveny tepelnému stresu a následně jejich potomstvo stresu z nedostatku dusíku. Poté bylo pozorováno velké množství miRNA, z nichž některé vykazovaly důležitou roli v odpovědi na tento stres. Potomci stresovaných rodičů, kteří byli stejně jako jejich rodiče vystaveni nedostatku dusíku, vykazovali nejvyšší počet miRNA s velkou změnou v expresi. U rostlin odvozených od stresovaných rodičů byl počet miRNA se sníženou expresí vždy vyšší než počet miRNA se zvýšenou expresí. Vzhledem k účinkům miRNA na inhibici exprese genů, tento výsledek naznačuje, že miRNA reagující na nedostatek dusíku se více podílely na podpoře exprese svých cílových genů než na potlačování genové exprese.

Analýza genové exprese byla provedena na šesti miRNA regulujících expresi genů účastnících se odpovědi na stres z nedostatku dusíku – miR160, miR164, miR169, miR393, miR398 a miR827 (Liu a kol., 2021a). Hlavní sledovanou genovou rodinou, jež je zapojena do signální dráhy mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) mrna, byly geny pro repetitivní receptory proteinových kináz rodiny proteinových kináz bohaté na leucin, jejichž hladiny reguluje miR169 (Hanemian a kol., 2016). MiR169 měla nejvíce sníženou expresi u stresovaných potomků stresovaných rostlin, avšak vykazoval snížení i u stresovaných potomků nestresovaných rodičů (Liu a kol., 2021a). Exprese jeho cílových genů naopak vykazovala extrémně zvýšenou genovou expresi, což potvrdila i jiná studie s pšenicí tvrdou (Curci a kol., 2017). Tyto exprimované geny se pak dále podílejí na signalizaci spojené s odpovědí na stres. Významně snížená byla i exprese miR164, která reguluje exprese desítek genů, mezi něž patří také dva vysoce afinitní nitrátové transportní geny *NRT2.1* (Du a kol., 2022), jejichž exprese se při nedostatku dusíku zvyšuje (Zuluaga a kol., 2018). Nižší expresi vykazovala i miR393, která reguluje hladinu exprese pro *pentatrikoptidový proteinový gen obsahující repetici (PPR)* (Liu a kol., 2021a). Většina proteinů PPR je umístěna v mitochondriích a chloroplastech a univerzálně fungují při regulaci exprese organelárních genů prostřednictvím sekvenčně specifického rozpoznávání sekvencí RNA a účasti v procesech, jako je sestřih RNA, editace RNA a translace RNA (Wong a kol., 2014). Všechny sledované nadměrně exprimované geny se účastnily optimalizace transportu dusíku, zvýšení efektivity fotosyntézy a podpory vývoje chloroplastů, díky čemuž se rostliny i jejich potomci dokázali lépe vyrovnat se stresem z nedostatku dusíku (Liu a kol., 2021a).

4.5 UV záření

Již bylo dokázáno, že ultrafialové záření mění rostlinný genom např. indukci mutací v somatické tkáni rostlin a v somatické tkáni jejich potomstva. Po čtyři generace byly pozorovány zvýšené hladiny homologních rekombinací u potomků rostlin huseníčku vystavených UV záření za využití bakteriálního

elicitoru flagelinu. Autoři usoudili, že základ pro popsaný transgenerační efekt musí být epigenetický a nikoliv genetický, protože k pozorovaným změnám v intenzitě homologních rekombinací docházelo v celé populaci, zatímco mutace na úrovni DNA by postihla jen velmi málo rostlin. Pokusili se tedy analyzovat hladiny exprese genů, ale žádné významné změny nezaznamenali. Autoři i přesto uváděli, že možnou roli miRNA v transgenerační stresové paměti nelze zcela vyloučit, protože transkripční změny nemusely být detekovány (Molinier a kol., 2006).

Vystavení rostlin huseníčku různým stresům včetně UV záření se zabývali také Boyko a kol. (2010). Podobně jako ve výše popsané práci zaznamenali zvýšení frekvence homologních rekombinací, vyšší toleranci rostlin i jejich potomků vůči různým stresům a celkové zvýšení methylace po celém genomu. Aby však byly tyto změny udržovány, bylo nutné i následující generace vystavit stejnému stresovému faktoru. Analýzou genové exprese bylo zjištěno, že exprese většiny genů byla snížena. Toto snížení exprese se týkalo genů zapojených do abiotických a patogenních stresových reakcí a signalizace. Naopak geny zapojené do transkripce a geny zapojené do opravy DNA byly exprimovány více. Veškeré změny v genové expresi souvisely zároveň se změnami v míře asymetrické methylace, což autoři považovali za aktivitu siRNA. Protože biogeneze siRNA je z velké části závislá na Dicer proteinech, byly vytvořeny rostliny mutantní pro *dcl2*, *dcl3* a také *dcl4*. Po vystavení rostlin stresu z UV záření a tepla byla analyzována methylace u potomků těchto rostlin a detekován velký nárůst, stejně tak u potomků *dcl4* mutant vystavených pouze UV záření. Na rozdíl od toho potomstvo stresovaných rostlin *dcl2* a *dcl3* nevykazovalo významné změny v methylaci. Tyto výsledky ukazují, že *dcl2* a *dcl3* jsou důležité pro vznik transgeneračních změn v metylaci DNA u potomstva UV zářením stresovaných rostlin (Boyko a kol., 2010).

5 Biotické stresy

5.1 Napadení patogeny

V případě napadení patogeny jsou rostliny připraveny okamžitě aktivovat imunitní obranu a spouští stresovou odpověď, jejímž výsledkem může být systémově získaná rezistence (SAR) (Kohler a kol., 2002). Stresová odpověď může být aktivována pomocí molekulárních vzorů asociovaných s patogeny (PAMP) mezi něž patří i bakteriální flagellin. U huseníčku peptid odvozený od flagellinu indukoval expresi miRNA, které inhibovaly expresi mRNA pro auxinové receptory *ARF* a potlačily tak auxinovou signalizaci. Potlačení auxinové signalizace, prostřednictvím nadměrné exprese zejména miR393, zvýšilo rezistenci rostlin vůči bakterii *Pseudomonas syringae* (van Hall) (Navarro a kol., 2006). Transgenerační účinek peptidu odvozeného z flagellinu byl zkoumán i v souvislosti s invertovanými repeticemi (IR). Z IR je pomocí Dicer proteinů syntetizována dsRNA a z té siRNA, která dále může být transportována na

dlouhé vzdálenosti a zprostředkovávat RdDM. Analýzou *IR71* a *IR2039* v rostlinách huseníčku bylo ověřeno, že po vystavení virové infekci a peptidu odvozeného od flagellinu došlo ke změně produkce siRNA, jež následně ovlivňovaly RdDM (Dunoyer a kol., 2010).

V experimentu s rostlinami tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) infikovanými virem tabákové mozaiky (TMV) byla prokázána zvýšená frekvence homologních rekombinací u dvou následných generací. U obou generací byl detekován nárůst methylace a mimo jiné i nárůst hladiny genu *RNA GENE1 SOUVISEJÍCÍHO S PATOGENESOU (PR1)*, který patří mezi geny pomáhající rostlině se vypořádat s patogeny a u něhož byla vyšší exprese očekávána (Kathiria a kol., 2010). V souladu s těmito výsledky je i studie, kde Luna a kol. (2011) ukázali, že odolnost vůči chorobám lze přenést na další generaci, pokud jsou rodičovské rostliny vystaveny infekci. Přenos byl podle nich uskutečněn pomocí epigenetických mechanismů a výsledkem je SAR. Zajímavostí je, že první systematická studie tohoto jevu u tabáku odhalila, že SAR přetrvává nejméně 20 dní (Ross, 1961). Šest rostlin huseníčku bylo očkováno zvyšujícími se dávkami bakteriálního patogenu *P. syringae pv rajče DC3000* (Young, Dye & Wilkie) (*Pst DC3000*), a u dalších šesti rostlin bylo očkování pouze simulováno. Potomci infikovaných rostlin dokázali vyvinout rezistenci a zvýšenou odolnost oproti potomkům rostlin neinfikovaných. I druhá generace si dokázala zachovat rezistenci a autoři tedy učinili závěr, že v tomto případě transgenerační rezistence přetrvává po dobu jedné generace bez stresu (Luna a kol., 2011).

Tento závěr však neplatí vždy. Ve chvíli, kdy byly rostliny huseníčku očkovány pouze jednou *Pst DC3000* u první generace potomstva sice byla pozorována zvýšená rezistence proti další infekci, ale u druhé generace rezistence zmizela. Na základě toho bylo vyvozeno, že intenzita stresu souvisejícího s onemocněním je úměrná trvanlivosti transgenerační rezistence u potomstva (Slaughter a kol., 2012). Infekce *Pst DC3000* aktivuje obranu vyvolanou zvýšením hladiny kyseliny salicylové, ale potlačuje rezistenci, již vyvolává kyselina jasmonová proti nekrotrofní houbě *Alternaria brassicicola* (Wiltshire). Oba tyto typy reakcí by mohly být závislé na regulaci pomocí miRNA a siRNA, které již dříve umožnily snížením svých transkriptů rostlinám huseníčku lépe se vyrovnat s patogenem *P. Syringae* (van Hall) prostřednictvím PAMP (Li a kol., 2011). Také již bylo potvrzeno, že *Pst DC3000* spouští akumulaci 27 siRNA v huseníčku (Zhang a kol., 2011). Avšak siRNA vyvolávající transgenerační SAR a siRNA umožňující rezistenci vůči houbám či býložravcům by se měly lišit od automatické imunitní obrany indukované kyselinou salicylovou (působí proti patogenům) a jasmonovou (působí hlavně proti herbivorům). Pozorování, že transgenerační SAR je spojena s potlačením rezistence indukované zvýšenou koncentrací kyseliny jasmonové tedy naznačuje, že tyto siRNA by na sebe mohly působit antagonisticky. Posunutí rovnováhy mezi obranou závislou na kyselině salicylové a jasmonové u potomstva infikovaných rostlin tedy není způsobeno změnami v hladinách hormonů, ale spíše siRNA regulacemi následných reakčních drah. Tyto regulace spočívají v RdDM. Vzhledem k tomu, že infekce

PstDC3000 indukovala snížení methylace DNA, výsledky naznačily, že transgenerační SAR by mohla být přenášena skrze sníženou metylaci genů, jež řídí primární aktivaci drah závislých na kyselině salicylové v následujících generacích (Luna a kol., 2011).

5.2 Napadení herbivory

Kromě patogenů se rostliny setkávají i s herbivory, kteří mechanicky poškozují rostlinná pletiva. Existují důkazy, že siRNA ovlivňují odpovědi rostlin na mechanické poškození a umožňují i transgenerační přenos. Hypotéza, že po napadení herbivory se může jistá odolnost přenést i na potomky byla zkoumána v experimentu s ředkví ohnicí (*Raphanus raphanistrum* L.). Rostliny po napadení housenkami běláška řepového (*Pieris rapae* L.) produkovaly menší semena, ale jejich potomci v další generaci, která opět byla vystavena poškození housenkami, produkovali větší semena ve srovnání se stejně ošetřenými potomky odvozenými od rodičovských rostlin, které nebyly tomuto stresoru vystaveny. V návazných experimentech bylo zjištěno, že rostliny ředkve po napadení housenkami zvýšily počet trichomů či koncentrace indolových glukosinolátů (Agrawal, 1999; Agrawal a kol., 2001). U rostlin kejklíčky skvrnitě (*Mimulus guttatus* (Fisch. ex DC.)) bylo pozorováno zvýšení hustoty trichomů v reakci na simulované poškození býložravci. Zvýšená hustota se vyskytla i v potomstvu, i přestože poškození nezažilo. Během měření expresí genů, které by s tím mohly mít něco společného, byl identifikován protein MYB MIXTA-like 8 (MML8) jako možný negativní regulátor vývoje trichomů. Také bylo zjištěno, že poškození rodičovských listů indukuje snížení genové exprese *MML 8* v potomstvu, což je spojeno s epigeneticky zděděnou zvýšenou hustotou trichomů. U rodičů bylo pozorováno snížení methylace DNA v oblasti genu pro *MML8*, což by mohlo být způsobeno modifikací histonů či regulací siRNA. Ani jedno se však nepodařilo v této studii potvrdit (Scoville a kol., 2011).

Na tuto studii později navázala další práce Akkerman a kol. (2016), která se zaměřila na zkoumání rozdílů mezi mateřskou a otcovskou odpovědí na simulované poškození hmyzem rostlin kejklíčky. Během pěti generací potomstva napadených rostlin bylo vypořádáno, že jak z mateřské, tak otcovské strany došlo k podobnému zvýšení hustoty trichomů. Avšak poté, co bylo ke klíčovému semenům přidáno celogenomové demetylační činidlo 5-azacytidin, potomstvo mateřské linie žádné zvýšení hustoty trichomů nevykazovalo. Naproti tomu u otcovské linie zůstal transgenerační účinek zachován i po aplikaci 5-azacytidinu. Autoři zkoumali možnou epigenetickou podstatu tohoto jevu a pozorovali, že v době vývoje pylu byla navýšena exprese miRNA specifických pro mikrosporofyty (Akkerman a kol., 2016). Bylo prokázáno, že tyto miRNA mohou migrovat do buněk spermií, kde by mohly způsobovat inhibici exprese TE a zároveň i *de novo* methylace DNA ve vyvíjejícím se embryu a přispět tak k transgenerační dědičnosti (Grant-Downton a kol., 2009).

Konkrétní siRNA účastníci se stresové odpovědi byly analyzovány sekvenováním tkáně poraněných listů

z rostlin kejkličky a dále z jejího potomstva a potomstva rostlin nepoškozených a to 1 hodinu a 72 hodin po poškození, přičemž více odlišně exprimovaných miRNA bylo nalezeno v intervalu 72 hodin po poranění. Většina sRNA s nalezenou výrazně odlišnou expresí u poškozených rostlin oproti těm nepoškozeným vykazovala zvýšení exprese. Mezi nejvíce exprimované sRNA, účastníci se odpovědi na stres, patřily miRNA169, miRNA167, miRNA133, miRNA399, miRNA157, miRNA156 a miRNA164. Například zvýšená exprese miR169 umožňuje lepší rezistenci vůči bakteriím díky regulaci proteinů Clavata 1 a 2 (Clv1 a 2) patřícími do rodiny repetitivních bohatých na leucin (LRR) (Hanemian a kol., 2016). Jiné miRNA se zvýšenou expresí reprimovaly geny blokující exprese (např. *JOX1* inaktivující kyselinu jasmonovou) kalmodulinu nebo kyseliny jasmonové, jejichž koncentrace se tímto navýšily a ukázala se důležitost vápníkové signalizace při odpovědi rostliny na mechanické poranění. Méně exprimovaná byla miRNA166, která reguluje metabolickou dráhu kyseliny abscisové, čímž došlo ke zvýšení koncentrace kyseliny abscisové. Další miRNA u rodičovské generace vykazovaly zvýšení genové exprese, u potomků naopak snížení. Jejich cílovými proteiny jsou FAD (Flavin adenine dinukleotid), které se účastní stresových reakcí rostlin a sekundárního metabolismu.

Také byly sledovány specifické sRNA neodvozené od dicer proteinů (nd-sRNA). Nd-sRNA jejichž exprese byla snížena regulovaly většinou proteiny reagující na tepelný stres. Nd-sRNA se zvýšenou expresí regulovaly proteiny vázající chlorofyl (Colicchio a kol., 2020). Příkladem takového proteinu může být Ycf2, který v interakci s proteiny tepelného šoku a vápníkové signalizace pomáhá chloroplastům zprostředkovat stresové reakce (Kikuchi a kol., 2018).

V blízkosti lokusů genů pro siRNA se změnou expresí v reakci na poranění byla pozorována také zvýšená methylace blízkých genů, a to jak u rodičovských, tak u dceřiných rostlin prostřednictvím mechanismu RdDM. Opačná byla situace v případě lokusů nd-sRNA, kde byla methylace sousedních genů snížena. S tím souvisí i zjištění, že geny regulované siRNA měly u potomstva zvýšenou expresi, kdežto geny podléhající regulaci nd-sRNA vykazovaly snížení genové exprese (Colicchio a kol., 2020).

Studie autorů Rasmanna a kol. (2012) prokázala, že regulace siRNA má i další role v transgenerační rezistenci vůči herbivorům, a to u rostlin huseníčku a rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Tyto rostliny po napadení housenkou *Helicoverpa zea* (Boddie) produkovaly potomstvo odolnější vůči poškození. Poté, co byly rostliny huseníčku a rajčete vystaveny napadení housenkou, aplikaci methyljasmonátu a mechanickému poškození zároveň, byla spouštěna obrana signalizací kyseliny jasmonové. Zvýšené koncentrace kyseliny jasmonové byly zjištěny i u potomků těchto rostlin. Housenky dokázaly potomkům napadených rostlin způsobit jen přibližně 50% poškození, a tato zvýšená odolnost přetrvávala po dvě generace. Jako kontrola sloužily dvě mutantní linie huseníčku s částečně inhibovanou biogenezí siRNA (mutantní pro dcl proteiny a mutantní pro jadernou RNA polymerázu d2a a d2b), kteří nedokázali produkovat potomstvo s transgenerační rezistencí vůči poškození herbivory.

U těchto mutantních rostlin byly snižené koncentrace kyseliny jasmonové indukující obranné reakce a také koncentrace glukosinolátů odrazujících herbivory. Tím bylo dokázáno, alespoň v případě huseničku, že transgenerační rezistence proti herbivorům zahrnuje aktivaci obranných reakcí souvisejících s kyselinou jasmonovou a vyžaduje biogenezi siRNA. U huseničku bylo dále zkoumáno, zda je rezistence vůči poškození herbivory dlouhodobě předávána z generace na generaci a bylo zjištěno, že ve třetí generaci bez vystavení stresu už rezistence nepřetrvávala (Rasman a kol., 2012).

6 Kombinace stresorů

Rostliny se během svého života nesetkávají jen s jedním stresorem. Epigenetické mechanismy a malé RNA umožňují důsledky jednoho stresoru využít k odolnosti vůči jinému. Například stres ze sucha v rostlinách indukuje přesun některých živin (bílkoviny, fenolické látky, tuky) do semen za pomoci miRNA, jež snížením svých inhibičních aktivit zvyšují translaci. Ze semen pak vyrostou rostliny s transkripční pamětí, které jsou schopné lépe reagovat na stres ze soli. Fenolické látky mohou působit jako antioxidanty a pomáhají při vychytávání ROS (Weidner a kol., 2009). Díky tomu je pak rostlina schopná lépe hospodařit s vodou a zděděná paměť na sucho pozitivně působí i co se týče živin jako prolin a glycinbetain, jež volně uložené v listech dceřiných rostlin umožňují lépe řídit akumulaci sodných iontů, které pak nevytlačují ionty draselné (Tabassum a kol., 2017).

Podstatné zvýšení syntézy makroživin indukuje i kombinace nedostatku vody a vysoké teploty. Oběma těmto stresorům zároveň byly vystaveny rostliny pšenice tvrdé a u jejich potomků byl sledován vliv stresu rodičů. Byly použity dvě odrůdy pšenice, z nichž jedna byla již dříve vyšlechtěna jako odolnější vůči suchu, druhá byla na sucho citlivá. Sledováním vitality a klíčivosti u potomků pak autoři zjistili, že potomstvo odrůdy odolné i citlivé klíčilo rychleji a se sníženou vitalitou než potomstvo kontrolních rostlin nevystavených stresu, ale nejrychlejší klíčení měli potomci odolné odrůdy. Následné generace obou stresovaných odrůd také vykazovaly větší růst kořenů, s vyšším nárůstem u odolné odrůdy. Rychlejší růst potomků stresovaných rostlin je důsledkem působení stresu, kdy dochází k akumulaci živin.

Analýzou mRNA, regulovaných miRNA s největšími změnami v expresi u potomků stresu vystavených rodičů, bylo zjištěno, že nejvíce se zvýšila transkripce genů pro metabolismus bílkovin, sacharózy a škrobů. Dále také genů pro tvorbu signalizačních molekul a proteinů modifikujících chromatin. Například byla významně snížena exprese u *tae-miR1847-5p* (Liu a kol., 2020), která reguluje několik proteinů CREB, ty váží další proteiny a pak fungují jako transkripční koaktivátor, který může aktivovat signální dráhy závislé na cAMP, čímž dochází k modulaci genové exprese (Gehring, 2010). Mimo jiné se působením cAMP spouští i iniciace acetylace histonů a tím remodelace chromatinu, čímž může vznikat dědičnost stresové paměti (Lämke a Bäurle, 2017).

Další příklad regulace snížením hladin miRNA zahrnoval MAPK (Liu a kol., 2020). Kaskády MAPK jsou univerzálním mechanismem přenosu signálu, který hraje různé role v propojení intra – a extracelulárního přechodu u eukaryot (Raghuram a kol., 2014). MiRNA, jako je *ttu-miR160*, *hvu-miR444b* a *tae-miR1847-5p*, vykazovaly všechny sníženou expresi, a tak zvýšená exprese *MAPK* u potomků stresovaných rodičů přispěla ke zvýšené aktivaci Ca^{2+} signálních drah pro usnadnění adaptace na stres. *Ttu-miR160* také reguluje geny pro heterogenníjaderné ribonukleoproteiny (hnRNP) a geny kódující sestřihový faktor bohatý na serin/arginin (Liu a kol., 2020). Tyto proteiny regulují aktivitu spliceosomů, jež řídí mechanismus alternativního sestřihu pre-mRNA (Ling a kol., 2016). Snížením exprese *ttu-miR160* a dalších miRNA regulujících expresi genů pro proteiny podobné *hnRNP*, jako *tae-miR9772*, *ata-miR396c-5p* a *miR396c*, je umožněn nárůst hladin těchto proteinů a zlepšení koordinace sestřihu nových mRNA (Liu a kol., 2020).

Kombinace abiotického a biotického stresu byla ukázána ve studii s rostlinami tabáku (*Nicotiana benthamiana* (Domin)), jež byly infikovány bramborovým virem (PVX) a posléze bylo zjišťováno, zda prodělaná virová infekce umožní i potomkům lepší odpověď na další stres – stres zasolením a osmotický stres. Potomci rostlin infikovaných PVX za zvýšené salinity rychleji klíčili a produkovali více biomasy oproti potomkům rostlin, kde byla infekce jen simulována. Další potomci původně infikovaných rodičů si, i přes jednu generaci bez stresu, i v dalších generacích zachovali zvýšenou rezistenci vůči stresu zasolením. Výsledky sekvenování miRNA v potomcích rostlin infikovaných ukázaly, že množství miRNA regulujících translaci stresových proteinů a enzymů podílejících se na reakci na infekci stoupl. Nejdůležitější výrazně exprimované proteiny, jež byly zjištěny, jsou všechny chaperonové proteiny, podílející se na balení nově translatovaných proteinů, univerzální stresový protein A, glutathionperoxidáza 1 a protein důležitý pro pozdní embryogenezi. Vesměs tedy proteiny bojující se stresem či virovým zásahem.

Během zjišťování role malých RNA na této transgenerační paměti se ukázalo, že rostliny mutantní pro *dcl3*, gen kódující protein podílející se na tvorbě siRNA a na RdDM, vykazují ještě vyšší počet aktivovaných miRNA než rostliny jen infikované. Mutantní *dcl3* rostliny tedy ještě podpořily pozitivní vliv virového stresu na stres zasolením. Tolerance vůči vysoké salinitě u potomstva ošetřeného bez přítomnosti patogenu byla malá, u rostlin, jejichž rodiče byli očkováni se tolerance zlepšila a u rostlin se zděděnou rezistencí vůči stresorům a zároveň mutantních pro *dcl3* se tolerance ještě významně zvýšila a byla celkově nejlepší (Hernández-Walias a kol., 2022).

Boyko a kol. (2010) ve své studii zkoumali, jak různé stresy ovlivní rostliny huseníčku a jejich potomstvo. Po vystavení rostlin vůči stresu, včetně soli, UV záření, chladu, horka a nadbytku vody v různých kombinacích, bylo prokázáno zvýšení počtu homologních rekombinací, methylovaných míst v genomu a vyšší tolerance vůči stresorům u potomstva stresovaných rostlin. Aby však byly tyto změny

udržovány, bylo nutné i následující generace vystavit některému stresovému faktoru. Vystavení působení soli, nadbytku vody, tepla, chladu a UV stresu vedlo ke zvýšení počtu homologních rekombinací a DNA methylací, a to jak u rodičovských, tak u dceřiných rostlin. Pouze v případě vystavení suchu se počet rekombinací i methylovaných míst snížil. Část rostlin z první generace byla vystavena už jen působení soli a sucha a u druhé generace byla pozorována methylace na podobné úrovni jako v generaci první. Potomstvo rostlin, které již nebyly vystaveny dalšímu stresu, vykazovalo ubývání methylovaných míst.

Nejvýraznější nárůst methylace byl pozorován při vystavení rostlin vysoké salinitě. Poté co byl aplikován 5-azacytidin, který iniciuje demethylaci, nedošlo k žádnému projevu tolerance vůči stresu zasolením. Podobné výsledky byly pozorovány, když byly rostliny po aplikaci 5-azacytidinu vystaveny methylmethansulfonátu (MMS), který by měl methylaci iniciovat.

Veškeré změny v methylaci autoři přisoudili mechanismu RdDM kvůli nesymetričnosti methylací. Dicer proteiny jsou v tomto mechanismu důležité, a tak další analýzy probíhaly na rostlinách mutantních pro různé DCL proteiny. Dvojitý mutant *dcl2 dcl3* vykazoval snížení počtu rekombinací v reakci na UV záření. Trojitý mutant *dcl2 dcl3 dcl4* vykazoval snížení počtu rekombinací v reakci na UV záření a chlad. Je zajímavé, že mutant *dcl3* vykazoval také snížení počtu rekombinací v reakci na UV záření a chlad, zatímco mutant *dcl2* nikoliv. Vystavení MMS prokázalo větší toleranci vůči stresu u potomků mutant *dcl2*, menší toleranci u potomků mutant *dcl3* a žádný rozdíl v toleranci u potomků mutant *dcl4* ve srovnání s potomky rostlin standardního fenotypu. Výstupem tedy bylo, že adaptace na stres koreluje se změnami v methylaci genomu a potenciálně závisí na RdDM vyžadujících DCL2 a DCL3 (Boyko a kol., 2010).

7 Závěr

V posledních několika letech, kdy světovou populaci stále více dohání rychlé klimatické změny a zejména sucho se stává závažným problémem, je potřeba nacházet nové způsoby získání vitálních rostlin, odolných např. vůči nedostatku vody a produkujících kvalitní semena. Výsledkem působení stresorů v součinnosti s malými RNA na rostliny je vyšší efektivita fotosyntézy, zlepšení hospodaření s vodou či akumulace bílkovin a škrobů v semenech. Z hlediska morfologie se rostliny stresorům přizpůsobují např. dlouhivým růstem kořenů, zvětšením plochy listů nebo hustším porostem trichomů. Rostliny tedy mohou přizpůsobit svůj fenotyp a metabolismus vnějšímu škodlivému podnětu a lépe reagovat na další, tuto vlastnost jsou schopny předat i svým potomkům díky epigenetické dědičnosti. Výzkumy zabývající se transgeneračními účinky epigenetických modifikací jsou v současné době na vzestupu. Proto byly výrazně rozšířeny vědomosti týkající se působení malých RNA v rostlinné paměti, ale také vyvstalo mnoho nových otázek. Malé RNA regulují genovou expresi prostřednictvím snižování a zvyšování svých hladin a tím umožňují aktivaci či inhibici exprese daného genu. Sekvenováním transkriptomu mnoha hospodářsky významných rostlin byly sestaveny vzorce regulací miRNA a pozorovány tzv. antagonistické páry miRNA/mRNA, kdy významně snížená exprese miRNA odpovídala významně zvýšené expresi mRNA nebo významně zvýšená exprese miRNA odpovídala významně snížené expresi mRNA. Většina analyzovaných miRNA měla snížené hladiny, a tak byl často pozorován velký nárůst genové exprese proteinů odpovědi na stres po vystavení rostlin stresu. Tento nárůst však někdy přetrvával ve stejné míře i v dalších generacích, jindy byl potřeba nový stresující stimul pro následné generace, jelikož transkripční paměť v příznivých podmínkách postupně vymizela. Navýšení exprese vlivem stresu se však netýkalo zdaleka všech genů. Zvýšení hladin transkriptů vykazovaly geny kódující proteiny prospěšné pro rostlinu v době stresu, jako např. geny vylučující chlorofyly a flavonoidy, proteiny pro transport nutrientů či obranné reakce. Snížena naopak byla exprese genů pro proteiny přechodu do další vývojové fáze, růstu a diferenciaci pletiv či tvorby květů. Také ne vždy platilo, že zvýšená exprese miRNA znamená snížení exprese cílového genu. MiRNA totiž může zvýšením svých hladin inhibovat gen, jehož transkripty jsou supresory pro jiný gen, u něhož je za působení miRNA aktivována transkripce.

Narozdíl od miRNA siRNA většinou vykazovaly po působení stresového faktoru navýšení hladin, což je pravděpodobně způsobeno jejich funkcí v řízení methylace DNA, jež je po vystavení stresu také navyšována. V posledních několika letech bylo v rámci sekvenování rostlinných genomů objeveno velké množství nových miRNA i siRNA, jejichž přesné funkce v epigenetických regulačních sítích ještě nejsou zcela prozkoumány. I role methylace DNA zatím není úplně známa, navíc bylo pozorováno, že methylace genu může mít vliv i na další blízké geny, jejichž transkripce může být také umlčena. RdDM je hlavním regulačním mechanismem TE, ty jsou obvykle umlčeny methylací, mohou však být

indukovány stresem. *ONSEN* je indukován teplem a v jedné studii bylo pozorováno, že ovlivnil míru transkripce blízkých genů, ale pouze v reakci na zvýšenou teplotu. Také byl pozorován možný vliv pohlaví na přenos transgenerační paměti. Zdá se, že u samčí linie nebyla DNA methylace přenesena na potomstvo, nejspíše působením siRNA a rostlinné demethylázy DME. Málo poznáný je vliv mateřského prostředí na raný růst potomstva, kde dosud není jasné, zda stresovaná rostlina s již vytvořenými semeny, kam migrují v době stresu zásoby živin, bude mít rychleji klíčící potomstvo než rostlina vystavená stresu během vegetativní fáze.

Většina studií se však do nedávné doby zaměřovala na somatickou stresovou paměť. Znalost transgeneračního vlivu stresu v souvislosti se změnami hladin sRNA (zejména siRNA, které jsou sledovány méně často než miRNA) ještě není tolik prozkoumána a mohla by přinést zásadní informace pro zlepšení výnosu a kvality plodin. Velmi zajímavé je také studium, zda adaptační dopad jednoho stresu na stres jiný a působící na další generaci rostlin, bude mít příznivý vliv. Rostliny jsou často vystaveny více stresorům najednou, takže výzkum zaměřený na kombinace stresových faktorů by mohl ukázat nový způsob šlechtitelské strategie.

Každopádně současné znalosti poskytují základ pro vývoj a výběr odolných druhů, které mohou zmírnit nebo se přizpůsobit negativním dopadům stresu. V budoucnu může lepší pochopení mechanismů odezvy na stresový faktor a následného přenosu na potomstvo umožnit, že další generace rostlin budou vykazovat adaptační reakce závislé na stresu jejich rodičů nebo odolnost vůči dalšímu stresovému faktoru pod transgeneračními účinky rodičovského stresu.

8 Použitá literatura

- Abid, M., Tian, Z., Ata-Ul-Karim, S. T., Liu, Y., Cui, Y., Zahoor, R., Jiang, D., Dai, T. (2016). Improved tolerance to post-anthesis drought stress by pre-drought priming at vegetative stages in drought-tolerant and – sensitive wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 218–227.
- Agrawal, A. A. (1999). Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. In *Ecology*, 80(5), 1713-1723.
- Agrawal, A. A. (2001). Transgenerational Consequences of Plant Responses to Herbivory: An Adaptive Maternal Effect? In *Mutikainen and Delph*, 157, 555-569.
- Akkerman, K. C., Sattarin, A., Kelly, J. K., Scoville, A. G. (2016). Transgenerational plasticity is sex-dependent and persistent in yellow monkeyflower (*Mimulus guttatus*). *Environmental Epigenetics*, 2(2), 1-8.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., Carrington, J. C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121(2), 207–221.
- Alptekin, B., Akpınar, B. A., Budak, H. (2017). A comprehensive prescription for plant miRNA identification. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2058.
- Alves, C. S., Vicentini, R., Duarte, G. T., Pinoti, V. F., Vincentz, M., Nogueira, F. T. S. (2017). Genome-wide identification and characterization of tRNA-derived RNA fragments in land plants. *Plant Molecular Biology*, 93, 35–48.
- Arshad, M., Gruber, M. Y., Wall, K., Hannoufa, A. (2017). An insight into microRNA156 role in salinity stress responses of alfalfa. *Frontiers in Plant Science*, 8, 356.
- Aslam, M., Sugita, K., Qin, Y., Rahman, A. (2020). Aux/iaa14 regulates microRNA-mediated cold stress response in arabidopsis roots. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–25.
- Aufsatz, W., Mette, M. F., Matzke, A. J. M., Matzke, M. (2004). The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Molecular Biology*, 54, 793–804.
- 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(11), 2730–2741.
- Aung, B., Gruber, M. Y., Amyot, L., Omari, K., Bertrand, A., Hannoufa, A. (2015). MicroRNA156 as a promising tool for alfalfa improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), 779–790.
- Bartel, D. P. (2004). Review MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431, 356-363.
- Baumberger, N., Baulcombe, D. C. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *PNAS*, 102 (33), 28-33.
- Bazzini, A. A., Hopp, H. E., Beachy, R. N., Asurmendi, S., Danforth, D. (2007). Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *PNAS*, 104(29), 157-162.
- Bélanger, S., Zhan, J., Meyers, B. C. (2023). Phylogenetic analyses of AGO/DCL/RDR proteins in green plants refine the evolution of small RNA pathways. *Plant Physiol*, 4, kiad141.
- Bilichak, A., Ilnytskyy, Y., Woycicki, R., Kepeshchuk, N., Fogen, D., Kovalchuk, I. (2015). The elucidation of stress memory inheritance in Brassica rapa plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(JAN), 1–20.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R., Zhu, J. K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*, 123(7), 1279–1291.
- Boyko, A., Blevins, T., Yao, Y., Golubov, A., Bilichak, A., Ilnytskyy, Y., Hollander, J., Meins, F., Kovalchuk, I. (2010). Transgenerational adaptation of Arabidopsis to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins. *PLoS ONE*, 5(3), e9514.
- Byeon, B., Bilichak, A., Kovalchuk, I. (2017). Computational characterization of ncRNA fragments in various tissues of the Brassica rapa plant. *Non-Coding RNA*, 3(2), 17.
- Byeon, B., Bilichak, A., Kovalchuk, I. (2019). Transgenerational Response to Heat Stress in the Form of Differential Expression of Noncoding RNA Fragments in Brassica rapa Plants. *The Plant Genome*, 12(1), 180022.
- Çakır, Ö., Arıkan, B., Karpuz, B., Turgut-Kara, N. (2021). Expression analysis of miRNAs and their targets related to salt stress in Solanum lycopersicum H-2274. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 35(1), 283–290.

- Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M. F., Huang, M. S., Matzke, M., Jacobsen, S. E. (2003). Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology*, 13(24), 2212–2217.
- Cavrak, V. V., Lettner, N., Jamge, S., Kosarewicz, A., Bayer, L. M., Mittelsten Scheid, O. (2014). How a Retrotransposon Exploits the Plant's Heat Stress Response for Its Activation. *PLoS Genetics*, 10(1), e1004115.
- Colicchio, J., Kelly, J., Hileman, L. (2020). Mimulus srnas are wound responsive and associated with transgenerationally plastic genes but rarely both. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–23.
- Cong, W., Miao, Y., Xu, L., Zhang, Y., Yuan, C., Wang, J., Zhuang, T., Lin, X., Jiang, L., Wang, N., Ma, J., Sanguinet, K. A., Liu, B., Rustgi, S., Ou, X. (2019). Transgenerational memory of gene expression changes induced by heavy metal stress in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology*, 19(1), 282.
- Curci, P. L., Aiese Cigliano, R., Zuluaga, D. L., Janni, M., Sanseverino, W., Sonnante, G. (2017). Transcriptomic response of durum wheat to nitrogen starvation. *Scientific Reports*, 7(1), 1176.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-Dependent RNA Polymerase Gene in Arabidopsis Is Required for Posttranscriptional Gene Silencing Mediated by a Transgene but Not by a Virus. *Cell*, 101, 543–553.
- Davenport, R., James, R. A., Zakrisson-Plogander, A., Tester, M., Munns, R. (2005). Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiology*, 137(3), 807–818.
- Depicker, A., Van Montagu, M. (1997). Post-transcriptional gene silencing in plants. *Cell Biology*, 9, 973–382.
- Ding, Y., Fromm, M., Avramova, Z. (2012). Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in Arabidopsis. *Nature Communications*, 3, 740.
- Ding, Y., Virilouvet, L., Liu, N., Riethoven, J. J., Fromm, M., Avramova, Z. (2014). Dehydration stress memory genes of *Zea mays*; comparison with Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*, 14(1), 141.
- Dorokhov, Y. L., Frolova, O. Y., Skurat, E. V., Ivanov, P. A., Gasanova, T. V., Sheveleva, A. A., Ravin, N. V., Mäkinen, K. M., Klimyuk, V. I., Skryabin, K. G., Gleba, Y. Y., Atabekov, J. G. (2006). A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: The enhancer of RNA silencing. *FEBS Letters*, 580(16), 3872–3878.
- Du, R. J., Wu, Z. X., Yu, Z. X., Li, P. F., Mu, J. Y., Zhou, J., Li, J. N., Du, H. (2022). Genome-Wide Characterization of High-Affinity Nitrate Transporter 2 (NRT2) Gene Family in Brassica napus. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4965.
- Dunoyer, P., Brosnan, C. A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C., Voinnet, O. (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO Journal*, 29(10), 1699–1712.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M. A., Jacobsen, S. E., Cooke, R., Lagrange, T. (2007). Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes and Development*, 21(20), 2539–2544.
- Eun, C., Lorkovic, Z. J., Sasaki, T., Naumann, U., Matzke, A. J. M., Matzke, M. (2012). Use of forward genetic screens to identify genes required for RNA-directed DNA methylation in arabidopsis thaliana. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, 195–204.
- Gehring, C. (2010). Open Access REVIEW Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling-past and present. In *Gehring Cell Communication and Signaling*, 8, 15.
- Glazov, E. A., McWilliam, S., Barris, W. C., Dalrymple, B. P. (2008). Origin, evolution, and biological role of miRNA cluster in DLK-DIO3 genomic region in placental mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 25(5), 939–948.
- González, A. P. R., Chrtek, J., Dobrev, P. I., Dumalasová, V., Fehrer, J., Mráz, P., Latzel, V. (2016). Stress-induced memory alters growth of clonal offspring of white clover (*Trifolium repens*). *American Journal of Botany*, 103(9), 1567–1574.
- Grant-Downton, R., Hafidh, S., Twell, D., Dickinson, H. G. (2009). Small RNA pathways are present and functional in the angiosperm male gametophyte. *Molecular Plant*, 2(3), 500–512.
- Gries, D., Zeng, F., Foetzki, A., Arndt, S. K., Bruelheide, H., Thomas, F. M., Zhang, X., Runge, M. (2003). Growth and water relations of *Tamarix ramosissima* and *Populus euphratica* on Taklamakan desert dunes in relation to depth to a permanent water table. *Plant, Cell and Environment*, 26(5), 725–736.
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y., Zhu, J. (2013). Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that

- is critical for thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Journal*, 74(5), 840–851.
- Hamilton, A. J., Baulcombe, D. C. (1999). *COOL*: A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science*, 286(5441), 950–952.
- Hanemian, M., Barlet, X., Sorin, C., Yadeta, K. A., Keller, H., Favery, B., Simon, R., Thomma, B. P. H. J., Hartmann, C., Crespi, M., Marco, Y., Tremousaygue, D., Deslandes, L. (2016). Arabidopsis *clavata1* and *clavata2* receptors contribute to *Ralstonia solanacearum* pathogenicity through a mir169-dependent pathway. *New Phytologist*, 211(2), 502–515.
- Hayashi, Y., Takehira, K., Nozawa, K., Suzuki, T., Masuta, Y., Kato, A., Ito, H. (2020). Onsen shows different transposition activities in RDDM pathway Mutants. *Genes and Genetic Systems*, 95(4), 183–190.
- Herman, J. J., Sultan, S. E. (2016). DNA methylation mediates genetic variation for adaptive transgenerational plasticity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1838).
- Herman, J. J., Sultan, S. E., Horgan-Kobelski, T., Riggs, C. (2012). Adaptive transgenerational plasticity in an annual plant: Grandparental and parental drought stress enhance performance of seedlings in dry soil. *Integrative and Comparative Biology*, 52(1), 77–88.
- Hernández-Walias, F. J., García, M., Moreno, M., Giannoukos, I., González, N., Sanz-García, E., Necira, K., Canto, T., Tenllado, F. (2022). Transgenerational Tolerance to Salt and Osmotic Stresses Induced by Plant Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12497.
- Hsieh, T. F., Ibarra, C. A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R. L., Zilberman, D. (2009). Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. *Science*, 324(5933), 1451–1454.
- Chakraborty, T., Payne, H., Mosher, R. A. (2022). Expansion and contraction of small RNA and methylation machinery throughout plant evolution. In *Current Opinion in Plant Biology*, 69, 102260.
- Chen, L., Ren, Y., Zhang, Y., Xu, J., Sun, F., Zhang, Z., Wang, Y. (2012). Genome-wide identification and expression analysis of heat-responsive and novel microRNAs in *Populus tomentosa*. *Gene*, 504(2), 160–165.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. In *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 133–139.
- Choi, J., Lyons, D. B., Zilberman, D. (2021). Histone H1 prevents non-cg methylation-mediated small RNA biogenesis in Arabidopsis heterochromatin. *ELife*, 0, e72676.
- Chow, H. T., Mosher, R. A. (2023). Small RNA-mediated DNA methylation during plant reproduction. *The Plant Cell*, 0, koad010.
- Igamberdiev, A. U., Kleczkowski, L. A. (2011). Optimization of CO₂ fixation in photosynthetic cells via thermodynamic buffering. *BioSystems*, 103(2), 224–229.
- Ito, H., Gaubert, H., Bucher, E., Mirouze, M., Vaillant, I., Paszkowski, J. (2011). An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature*, 472(7341), 115–120.
- Iwasaki, M., Paszkowski, J. (2014). Identification of genes preventing transgenerational transmission of stress-induced epigenetic states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), 8547–8552.
- Jackson, J. P., Lindroth, A. M., Cao, X., Jacobsen, S. E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 416, 556–560.
- Jaskiewicz, M., Conrath, U., Peterhällsel, C. (2011). Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Reports*, 12(1), 50–55.
- Johnsen, Ø., Dæhlen, O. G., Østreg, G., Skrøppa, T. (2005). Daylength and temperature during seed production interactively affect adaptive performance of *Picea abies* progenies. *New Phytologist*, 168(3), 589–596.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. (2004). Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets, Including a Stress-Induced miRNA. *Molecular Cell*, 14, 787–799.
- Kathiria, P., Sidler, C., Golubov, A., Kalischuk, M., Kawchuk, L. M., Kovalchuk, I. (2010). Tobacco mosaic virus infection results in an increase in recombination frequency and resistance to viral, bacterial, and fungal pathogens in the progeny of infected tobacco plants. *Plant Physiology*, 153(4), 1859–1870.
- Khraiweh, B., Zhu, J. K., Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137–148.
- Kikuchi, S., Asakura, Y., Imai, M., Nakahira, Y., Kotani, Y., Hashiguchi, Y., Nakai, Y., Takafuji, K., Bédard, J., Hirabayashi-Ishioka, Y., Mori, H., Shiina, T., Nakai, M. (2018). A Ycf2-FtsHi heteromeric AAA-ATPase complex is required for chloroplast protein import. *Plant Cell*, 30(11), 2677–2703.

- Kohler, A., Schwindling, S., Conrath, U. (2002). Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 128(3), 1046–1056.
- Kumar, P., Kuscu, C., Dutta, A. (2016). Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs). In *Trends in Biochemical Sciences*, 41(8), 679–689.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., Watanabe, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*, 12(2), 206–212.
- Kurihara, Y., Watanabe, Y. (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *PNAS*, 101(34), 53–58.
- Kushawaha, A. K., Khan, A., Sopory, S. K., Sanan-Mishra, N. (2021). Priming by high temperature stress induces microRNA regulated heat shock modules indicating their involvement in thermoprimering response in rice. *Life*, 11(4), 291.
- Lämke, J., Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. In *Genome Biology*, 18(1), 124.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambrost, V. (1993). The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. *Cell*, 75, 843–854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J., Kim, S., Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17), 4663–4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060.
- Li, B., Qin, Y., Duan, H., Yin, W., Xia, X. (2011). Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in Populus euphratica. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3765–3779.
- Li, S., Liu, J., Liu, Z., Li, X., Wu, F., He, Y. (2014). HEAT-INDUCED TAS1 TARGET1 mediates thermotolerance via heat stress transcription factor A1a-directed pathways in Arabidopsis. *Plant Cell*, 26(4), 1764–1780.
- Li, W., Cui, X., Meng, Z., Huang, X., Xie, Q., Wu, H., Jin, H., Zhang, D., Liang, W. (2012). Transcriptional regulation of Arabidopsis MIR168a and ARGONAUTE1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiology*, 158(3), 1279–1292.
- Li, W. X., Oono, Y., Zhu, J., He, X. J., Wu, J. M., Iida, K., Lu, X. Y., Cui, X., Jin, H., Zhu, J. K. (2008). The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*, 20(8), 2238–2251.
- Li, Y., Wang, W., Zhou, J. M. (2011). Role of small RNAs in the interaction between Arabidopsis and Pseudomonas syringae. In *Frontiers in Biology*, 6(6), 462–467.
- Ling, Y., Alshareef, S., Butt, H., Lozano-Juste, J., Li, L., Galal, A. A., Moustafa, A., Momin, A. A., Tashkandi, M., Richardson, D. N., Fujii, H., Arold, S., Rodriguez, P. L., Duque, P., Mahfouz, M. M. (2017). Pre-mRNA splicing repression triggers abiotic stress signaling in plants. *Plant Journal*, 89(2), 291–309.
- Liu, H., Able, A. J., Able, J. A. (2020). Transgenerational effects of water-deficit and heat stress on germination and seedling vigour—new insights from durum wheat microRNAs. *Plants*, 9(2), 189.
- Liu, H., Able, A. J., Able, J. A. (2021a). Nitrogen starvation-responsive microRNAs are affected by transgenerational stress in durum wheat seedlings. *Plants*, 10(5), 826.
- Liu, H., Able, A. J., Able, J. A. (2021b). Small RNA, transcriptome and degradome analysis of the transgenerational heat stress response network in durum wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5532.
- Liu, H., Able, A. J., Able, J. A. (2021c). Small RNAs and their targets are associated with the transgenerational effects of water-deficit stress in durum wheat. *Scientific Reports*, 11(1), 3613.
- Liu, J., Feng, L., Gu, X., Deng, X., Qiu, Q., Li, Q., Zhang, Y., Wang, M., Deng, Y., Wang, E., He, Y., Bäurle, I., Li, J., Cao, X., He, Z. (2019). An H3K27me3 demethylase-HSFA2 regulatory loop orchestrates transgenerational thermomemory in Arabidopsis. *Cell Research*, 29(5), 379–390.
- Loss-Morais, G., Waterhouse, P. M., Margis, R. (2013). Description of plant tRNA-derived RNA fragments (tRFs) associated with argonaute and identification of their putative targets. In *Biology Direct*, 8(1), 6.
- Lou, L., Li, X., Chen, J., Li, Y., Tang, Y., Lv, J. (2018). Photosynthetic and ascorbate-glutathione metabolism in the flag leaves as compared to spikes under drought stress of winter wheat (Triticum aestivum L.). *PLoS ONE*, 13(3), e0194625.
- Lu, C., Jeong, D.-H., Kulkarni, K., Pillay, M., Nobuta, K., German, R., Thatcher, S. R., Maher, C., Zhang, L., Ware, D.,

- Liu, B., Cao, X., Meyers, B. C., Green, P. J. (2008). Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). *PNAS*, 105(12), 51-56.
- Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V., Ton, J. (2012). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, 158(2), 844–853.
- 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. *Plant Cell*, 17(5), 1360–1375.
- Mathieu, O., Bender, J. (2004). RNA-directed DNA methylation. *Journal of Cell Science*, 117(21), 4881–4888.
- Mathieu, O., Reinders, J., Čaikovski, M., Smathajitt, C., Paszkowski, J. (2007). Transgenerational Stability of the Arabidopsis Epigenome Is Coordinated by CG Methylation. *Cell*, 130(5), 851–862.
- Matsunaga, W., Kobayashi, A., Kato, A., Ito, H. (2012). The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of ONSEN, a copia-like retrotransposon in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 53(5), 824–833.
- Matzke, M. A., Birchler, J. A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. In *Nature Reviews Genetics*, 6(1), 24–35.
- Menezes-Benavente, L., Kernodle, S. P., Margis-Pinheiro, M., Scandalios, J. G. (2004). Salt-induced antioxidant metabolism defenses in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Redox Report*, 9(1), 29–36.
- Moldovan, D., Spriggs, A., Yang, J., Pogson, B. J., Dennis, E. S., Wilson, I. W. (2010). Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 165–177.
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C., Hohn, B. (2006). Transgeneration memory of stress in plants. *Nature*, 442(7106), 1046–1049.
- Morgado, L., Preite, V., Oplaat, C., Anava, S., De Carvalho, J. F., Rechavi, O., Johannes, F., Verhoeven, K. J. F. (2017). Small RNAs reflect grandparental environments in apomictic dandelion. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 2035–2040.
- Mosher, R. A., Melnyk, C. W., Kelly, K. A., Dunn, R. M., Studholme, D. J., Baulcombe, D. C. (2009). Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis. *Nature*, 460(7252), 283–286.
- Mourrain, P., Bé, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.-B., Jouette, D., Lacombe, A.-M., Nikic, S., Picault, N., Ré, K., Sanial, M., Vo, T.-A., Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 Genes Are Required for Posttranscriptional Gene Silencing and Natural Virus Resistance. *Cell*, 101, 533-542.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J. D. G. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436–439.
- Nosalewicz, A., Siecinska, J., Smiech, M., Nosalewicz, M., Wiacek, D., Pecio, A., Wach, D. (2016). Transgenerational effects of temporal drought stress on spring barley morphology and functioning. *Environmental and Experimental Botany*, 131, 120-127.
- Onodera, Y., Haag, J. R., Ream, T., Nunes, P. C., Pontes, O., Pikaard, C. S. (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation – dependent heterochromatin formation. *Cell*, 120(5), 613–622.
- Ou, X., Zhang, Y., Xu, C., Lin, X., Zang, Q., Zhuang, T., Jiang, L., von Wettstein, D., Liu, B. (2012). Transgenerational Inheritance of Modified DNA Methylation Patterns and Enhanced Tolerance Induced by Heavy Metal Stress in Rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS ONE*, 7(9), e41143.
- Pan, Y., Niu, M., Liang, J., Lin, E., Tong, Z., Zhang, J. (2017). Identification of heat-responsive miRNAs to reveal the miRNA-mediated regulatory network of heat stress response in *Betula luminifera*. *Trees – Structure and Function*, 31(5), 1635–1652.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L., Poethig, R. S. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes and Development*, 18(19), 2368–2379.
- Preite, V., Oplaat, C., Biere, A., Kirschner, J., van der Putten, W. H., Verhoeven, K. J. F. (2018). Increased transgenerational epigenetic variation, but not predictable epigenetic variants, after environmental exposure in two apomictic dandelion lineages. *Ecology and Evolution*, 8(5), 3047–3059.
- Raghuram, B., Sheikh, A. H., Sinha, A. K. (2014). Regulation of MAP kinase signaling cascade by microRNAs in *Oryza sativa*. *Plant Signaling and Behavior*, 9(10), 1–5.
- Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C. L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J. Y., Agrawal, A. A., Felton, G. W., Jander, G.

- (2012). Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiology*, 158(2), 854–863.
- Ross, A. F. (1961). Systemic Acquired Resistance Induced by Localized Virus Infections in Plants'. In *VIROLOGY*, 14, 340-358.
- Salim, U., Kumar, A., Kulshreshtha, R., Vivekanandan, P. (2022). Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 13(1), e1680.
- Schoft, V. K., Chumak, N., Choi, Y., Hannon, M., Garcia-Aguilar, M., Machlicova, A., Slusarz, L., Mosiolek, M., Park, J. S., Park, G. T., Fischer, R. L., Tamaru, H. (2011). Function of the DEMETER DNA glycosylase in the *Arabidopsis thaliana* male gametophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 8042–8047.
- Scoville, A. G., Barnett, L. L., Bodbyl-Roels, S., Kelly, J. K., Hileman, L. C. (2011). Differential regulation of a MYB transcription factor is correlated with transgenerational epigenetic inheritance of trichome density in *Mimulus guttatus*. *New Phytologist*, 191(1), 251–263.
- Shahzad, A., Ullah, S., Afzal, & Dar, A., Fahad Sardar, M., Mehmood, T., Tufail, M. A., Shakoora, A., Haris, M. (2021). Nexus on climate change: agriculture and possible solution to cope future climate change stresses. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 211–232.
- Shukla, L. I., Chinnusamy, V., Sunkar, R. (2008). The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. In *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(11), 743–748.
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., Mauch-Mani, B. (2012). Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiology*, 158(2), 835–843.
- Slotkin, R. K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdžić, M., Becker, J. D., Feijó, J. A., Martienssen, R. A. (2009). Epigenetic Reprogramming and Small RNA Silencing of Transposable Elements in Pollen. *Cell*, 136(3), 461–472.
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B. D., Scheible, W. R., Bäurle, I. (2014). *Arabidopsis* miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *Plant Cell*, 26(4), 1792–1807.
- Spurná, K., Viktorová, J. Ruml, T. (2018). Přehled malých nekódujících RNA. *Chem. listy*, 112, 811-818.
- Sunkar, R., Kapoor, A., Zhu, J. K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18(8), 2051–2065.
- Sunkar, R., Zhu, J. K. (2004). Novel and stress regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* w inside box sign. *Plant Cell*, 16(8), 2001–2019.
- Surdonja, K., Eggert, K., Hajirezaei, M. R., Harshavardhan, V. T., Seiler, C., von Wirén, N., Sreenivasulu, N., Kuhlmann, M. (2017). Increase of dna methylation at the hvckx2.1 promoter by terminal drought stress in barley. *Epigenomes*, 1(2), 9.
- Szittya, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, Á., Lakatos, L., Bánfalvi, Z., Burgyán, J. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO journal*, 22(3), 633-640.
- Tabassum, T., Farooq, M., Ahmad, R., Zohaib, A., Wahid, A. (2017). Seed priming and transgenerational drought memory improves tolerance against salt stress in bread wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 362–369.
- Tang, Y., Yan, X., Gu, C., Yuan, X. (2022). Biogenesis, Trafficking, and Function of Small RNAs in Plants. In *Frontiers in Plant Science*, 13, 825477.
- Thompson, D. M., Lu, C., Green, P. J., Parker, R. (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA*, 14(10), 2095–2103.
- Tiwari, J. K., Buckseth, T., Zinta, R., Saraswati, A., Singh, R. K., Rawat, S., Chakrabarti, S. K. (2020). Genome-wide identification and characterization of microRNAs by small RNA sequencing for low nitrogen stress in potato. *PLoS ONE*, 15(5).
- Tricker, P. J., López, C. M. R., Gibbings, G., Hadley, P., Wilkinson, M. J. (2013). Transgenerational, dynamic methylation of stomata genes in response to low relative humidity. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 6674–6689.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., Bartel, D. P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes and Development*, 18(10),

1187–1197.

- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A. C., Hilbert, J.-L., Bartel, D. P., Crété, P. (2004). Endogenous trans-Acting siRNAs Regulate the Accumulation of Arabidopsis miRNAs. *Molecular Cell*, 16), 69-79.
- Verhoeven, K. J. F., van Gorp, T. P. (2012). Transgenerational effects of stress exposure on offspring phenotypes in apomictic dandelion. *PLoS ONE*, 7(6), e38605.
- Wang, M., Wang, Q., Zhang, B. (2013). Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 530(1), 26–32.
- Wang, X., Xin, C., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., Cao, W., Jiang, D. (2016). Heat priming induces trans-generational tolerance to high temperature stress in wheat. *Frontiers in Plant Science*, 7, 501.
- Weidner, S., Karolak, M., Karamac, M., Kosinska, A., Amarowicz, R. (2009). Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) under drought stress followed by recovery. *Polish Botanical Society*, 78 (2), 97-103.
- Wibowo, A., Becker, C., Marconi, G., Durr, J., Price, J., Hagmann, J., Papareddy, J., Putra, H., Kageyama, J., Becker, J., Weigel, D., Gutierrez-Marcos, J. (2016). Hyperosmotic stress memory in *Arabidopsis* is mediated by distinct epigenetically labile sites in the genome and is restricted in the male germline by DNA glycosylase activity. *Life*, 5, e13546.
- Wijewardana, C., Raja Reddy, K., Jason Krutz, L., Gao, W., Bellaloui, N. (2019). Drought stress has transgenerational effects on soybean seed germination and seedling vigor. *PLoS ONE*, 14(9).
- Wong, J., Gao, L., Yang, Y., Zhai, J., Arikiti, S., Yu, Y., Duan, S., Chan, V., Xiong, Q., Yan, J., Li, S., Liu, R., Wang, Y., Tang, G., Meyers, B. C., Chen, X., Ma, W. (2014). Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection. *Plant Journal*, 79(6), 928–940.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2(5), E104.
- Xu, R., Wang, Y., Zheng, H., Lu, W., Wu, C., Huang, J., Yan, K., Yang, G., Zheng, C. (2015). Salt-induced transcription factor MYB74 is regulated by the RNA-directed DNA methylation pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 5997–6008.
- Yadav, N. S., Titov, V., Ayemere, I., Byeon, B., Ilnytsky, Y., Kovalchuk, I. (2022). Multigenerational Exposure to Heat Stress Induces Phenotypic Resilience, and Genetic and Epigenetic Variations in *Arabidopsis thaliana* Offspring. *Frontiers in Plant Science*, 13, 728167.
- Yang, Z., Ebright, Y. W., Yu, B., Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 667–675.
- Yao, Y., Ni, Z., Peng, H., Sun, F., Xin, M., Sunkar, R., Zhu, J. K., Sun, Q. (2010). Non-coding small RNAs responsive to abiotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional and Integrative Genomics*, 10(2), 187–190.
- Yue, H., Zhang, H., Su, N., Sun, X., Zhao, Q., Weining, S., Nie, X., Yue, W. (2022). Integrate Small RNA and Degradome Sequencing to Reveal Drought Memory Response in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5917.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell*, 101, 25-33.
- Zhang, F., Yang, J., Zhang, N., Wu, J., Si, H. (2022a). Roles of microRNAs in abiotic stress response and characteristics regulation of plant. *Front. Plant Sci.*, 13, 919243.
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Chellappan, P., Chen, Z., Zhou, X., Zhang, X., Fromuth, N., Coutino, G., Coffey, M., Jin, H. (2011). Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Molecular Biology*, 75(1), 93–105.
- Zhang, Y., Fan, G., Toivainen, T., Tengs, T., Yakovlev, I., Krokene, P., Hytönen, T., Fossdal, C. G., Grini, P. E. (2022b). Temperature-induced methylome changes during asexual reproduction trigger transcriptomic and phenotypic changes in *Fragaria vesca*. *bioRxiv*, číslo doi: 10.1101/2022.10.09.511489.
- Zhao, Y., Xu, K., Liu, G., Li, S., Zhao, S., Liu, X., Yang, X., Xiao, K. (2020). Global identification and characterization of miRNA family members responsive to potassium deprivation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Scientific Reports*, 10(1), 15812.
- Zhong, S. H., Liu, J. Z., Jin, H., Lin, L., Li, Q., Chen, Y., Yuan, Y. X., Wang, Z. Y., Huang, H., Qi, Y. J., Chen, X. Y., Vaucheret, H., Chory, J., Li, J., He, Z. H. (2013). Warm temperatures induce transgenerational epigenetic

- release of RNA silencing by inhibiting siRNA biogenesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9171–9176.
- Zhou, S. M., Kong, X. Z., Kang, H. H., Sun, X. D., Wang, W. (2015). The involvement of wheat F-box protein gene TaFBA1 in the oxidative stress tolerance of plants. *PLoS ONE*, 10(4), e0122117.
- Zhu, C., Liu, J.-H., Zhao, J.-H., Liu, T., Chen, Y.-Y., Wang, C.-H., Zhang, Z.-H., Guo, H.-S., Duan, C.-G., Pamela Ronald, M. C. (2023). A fungal effector suppresses the nuclear export of AGO1-miRNA complex to promote infection in plants. *PNAS*, 119(12), e2114583119.
- Zhu, C., Zhang, S., Zhou, C., Chen, L., Zaripov, T., Zhan, D., Weng, J., Lin, Y., Lai, Z., Guo, Y. (2020). Integrated transcriptome, microRNA, and phytochemical analyses reveal roles of phytohormone signal transduction and ABC transporters in flavor formation of oolong tea (*Camellia sinensis*) during solar withering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(45), 12749–12767.
- Zuluaga, D. L., Liuzzi, V., Curci, P. L., Sonnante, G. (2018). MicroRNAs in durum wheat seedlings under chronic and short-term nitrogen stress. *Functional and Integrative Genomics*, 18(6), 645–657.