

Los microRNAs de plantas: biogénesis y aplicaciones biotecnológicas

Plant microRNAs: biogenesis and biotechnological applications

Sehom Rivera-Gutiérrez¹ y Noé Valentín Durán-Figueroa^{1,*}.

¹Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Ciudad de México. Avenida Acueducto, La laguna Ticomán, Gustavo A. Madero, CP. 07340.

*Email: nduranf@ipn.mx

RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son cadenas de RNA no codificante de 20-26 nucleótidos de tamaño que regulan procesos fisiológicos vitales en los seres vivos. En las plantas, su mecanismo de acción es reprimir la expresión genética de un RNA mensajero blanco por inhibición de la traducción o por inducción de su degradación; tales genes blancos, pueden ser factores de transcripción que están implicados en multitud de procesos celulares y de respuesta biótica y abiótica. Se ha demostrado que los miRNAs están involucrados en la defensa de las plantas contra patógenos, actuando directamente contra genes que el patógeno utiliza para invadir. También, se han asociado a los miRNAs en la respuesta de las plantas contra factores abióticos como el calor, la alta incidencia de rayos UV, el frío, la sequía, entre otros. Por ejemplo, los miRNAs regulan genes asociados con el cierre de estomas de las hojas y así evitar transpiración, esta regulación modulada por miRNAs contribuye en la resistencia a sequía. También, los miRNAs pueden regular la generación de moléculas paliativas como la maltosa, lo que contribuye a la resistencia a bajas temperaturas. Por lo anterior, los miRNAs han llamado la atención para encontrar diversas aplicaciones biotecnológicas relacionadas en la mejora genética dirigida a cultivos de interés agronómico. Esta breve revisión explora la biogénesis, los mecanismos de acción de los miRNAs de plantas y algunas las aplicaciones biotecnológicas.

Palabras clave: miRNAs, biogénesis, inmunidad de plantas, factores bióticos y abióticos, agrobiotecnología.

INTRODUCCIÓN

Los microRNAs (miRNA o miR) tienen un rol clave en el desarrollo de plantas y animales y pertenecen a un grupo de RNA no codificante relativamente nuevo en ser identificados. Fueron por primera vez descritos en el año 1993 por el grupo del Dr. Victor Ambros de la Universidad de Harvard mientras se estudiaba el desarrollo en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el primer miRNA fue nombrado lin-4 (Lee et al., 1993). Hoy se sabe que los miRNAs están

ABSTRACT

MicroRNAs are non-coding RNA of 20-26 nucleotides in size that regulate major physiological processes eucaryotic organisms. In plants, its mechanism of action is to repress the genetic expression of a target messenger RNA by inhibition of translation or by induction of its degradation; such target genes are transcription factors that are involved in a multitude of cellular processes and biotic and abiotic response. It has been shown that miRNAs are involved in the defense of plants against pathogens, acting directly against genes that the pathogen uses to invade. Also, miRNAs have been associated with the response of plants against abiotic factors such as heat, high incidence of UV rays, cold, and drought, among others. For example, miRNAs regulate genes associated with the closure of leaf stomata and thus avoid transpiration, this regulation modulated by miRNAs contributes to resistance to drought. Also, miRNAs can regulate the generation of palliative molecules such as maltose, which contributes to resistance at low temperatures. In the last decade, miRNAs have attracted to find various biotechnological applications related to genetic improvement directed to crops of agronomic interest. This brief review explores the biogenesis, the mechanisms of action of plant miRNAs, and some biotechnological applications.

Keywords: miRNAs, biogenesis, plant immunity, biotic and abiotic factors, agrobiotechnology.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNA or miR) play a key role in the development of plants and animals and belong to a relatively new group of non-coding RNAs to be identified. They were first described in 1993 by the group of Dr. Victor Ambros from Harvard University while studying development in the nematode *Caenorhabditis elegans*, the first miRNA was named lin-4 (Lee et al., 1993). Today it is known that miRNAs are involved in practically

implicados prácticamente en todos los procesos bioquímicos y fisiológicos de los seres vivos y actúan en coordinación con otras moléculas formando una red que regula y modula dichos procesos. En general, los miRNAs reprimen la expresión genética por dos mecanismos principales: corte de un RNA mensajero blanco o inhibiendo la traducción. Por su diversidad de funciones, los miRNAs son considerados como los reguladores maestros de los procesos biológicos ya que están involucrados tanto en proceso de desarrollo como en la respuesta a estímulos bióticos y abióticos que afectan a los seres vivos. Se ha calculado que, al menos en plantas, la regulación de la expresión genética mediada por miRNAs se remonta a 400 millones de años (You et al., 2017), lo que remarca lo conservados que son evolutivamente y lo importantes que son para la adecuada regulación de genes. Es gracias a su naturaleza reguladora y de modulación de la expresión genética que, la biotecnología molecular de plantas ha enfocado el estudio en los miRNAs para mejorar genéticamente cultivos de interés como maíz, trigo y arroz, su aplicación biotecnológica ha sido evaluada en la obtención de plantas resistentes a bacterias y virus e incluso se ha buscado incrementar los rendimientos para lograr la seguridad alimentaria que requerirán unos 9.8 billones de habitantes en el año 2050 (Naciones Unidas, 2022). Por tal razón, en esta breve revisión se explora la formación o biogénesis de los miRNAs y como sus mecanismos de acción son los que realmente han permitido aplicar la ingeniería genética de plantas para la mejora de cultivos de interés agronómicos particularmente en la resistencia a estrés biótico y abiótico.

Biogénesis y mecanismo de acción de los microRNAs

Los miRNAs tienen entre 20 y 26 nucleótidos de longitud y regulan a RNAs mensajeros (mRNAs) blanco mediante su apareamiento por complementariedad de bases (Chen, 2021). Preferentemente, si el apareamiento entre el miRNA y el mRNA blanco es parcial, se evitará que el mRNA sea traducido a proteína, pero si el apareamiento entre el miRNA y el mRNA es total, como generalmente ocurre en plantas, el mRNA será escindido por una proteína llamada Argonauta (AGO), que forma parte de un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Los miRNAs de plantas son formados en el núcleo, pero su acción ocurre en la mayoría de los casos en el citoplasma, lugar subcelular donde el complejo RISC guía el silenciamiento de su mRNA objetivo (ver figura 1). Una vez que el complejo RISC se encuentra con el objetivo, el miRNA, que no se separa del complejo RISC, se aparea al mensajero, y la proteína AGO entra en acción rompiendo al mRNA. Por este mecanismo, los miRNAs regulan los niveles de RNAs mensajeros dentro de la célula, modulando así los distintos procesos que la planta requiere para sobrevivir (Dexheimer y Cochella, 2020; Wang

all the biochemical and physiological processes of living beings and act in coordination with other molecules, forming a network that regulates and modulates said processes. In general, miRNAs repress gene expression by two main mechanisms: cutting a target messenger RNA or inhibiting translation. Due to their diversity of functions, miRNAs are considered the master regulators of biological processes since they are involved both in the development process and in the response to biotic and abiotic stimuli that affect living beings. It has been calculated that, at least in plants, the regulation of gene expression mediated by miRNAs dates back 400 million years (You et al., 2017), which highlights how evolutionarily conserved they are and how important they are for the proper gene regulation. It is thanks to its regulatory and modulating nature of genetic expression that molecular biotechnology of plants has focused the study on miRNAs to genetically improve crops of interest such as corn, wheat and rice; its biotechnological application has been evaluated in obtaining plants resistant to bacteria and viruses and have even sought to increase yields to achieve food security that some 9.8 billion inhabitants will require in the year 2050 (United Nations, 2022). For this reason, in this brief review the formation or biogenesis of miRNAs is explored and how their mechanisms of action are what have really allowed the application of genetic engineering of plants for the improvement of crops of agronomic interest, particularly in resistance to biotic stress. and abiotic.

Biogenesis and mechanism of action of microRNAs

miRNAs are between 20 and 26 nucleotides in length and regulate target messenger RNAs (mRNAs) through complementary base pairing (Chen, 2021). Preferably, if the pairing between the miRNA and the target mRNA is partial, the mRNA will be prevented from being translated into protein, but if the pairing between the miRNA and the mRNA is complete, as is generally the case in plants, the mRNA will be cleaved by a protein called Argonaute (AGO), which is part of an RNA-induced silencing complex (RISC). Plant miRNAs are formed in the nucleus, but their action occurs in most cases in the cytoplasm, a subcellular place where the RISC complex guides the silencing of its target mRNA (see figure 1). Once the RISC complex meets the target, the miRNA, which is not separated from the RISC complex, pairs up with the messenger, and the AGO protein kicks in to cleave the mRNA. By this mechanism, miRNAs regulate the levels of messenger RNAs within the cell, thus modulating the different processes that the plant requires to survive (Dexheimer and Cochella, 2020; Wang et al., 2018). The biogenesis of miRNAs in plants takes place inside the cell nucleus (see figure 2). MIR genes, which code for a

et al., 2018).

La biogénesis de los miRNAs en plantas se lleva a cabo dentro del núcleo de la célula (ver figura 2). Los genes MIR, que codifican para un miRNA, son transcritos por la RNA polimerasa II (RNA Pol II). La hebra naciente de RNA que puede medir entre 49 a 900 nt, sufre auto-plegamiento para formar una estructura del tipo tallo-asa, esta estructura se conoce como miRNA primario (pri-miRNA) y al ser transcrita por la RNA Pol II extremo 5' se protege con modificación de una Guanina (5'Cap) y extremo 3' se poliadenila. Entonces, el pri-miRNA es procesado por un complejo enzimático compuesto principalmente por la proteína Dicer-like (DCL), HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL-1), SERRATE (SE) y RH27 (DEAD-BOX RNA HELICASE 27). Este complejo enzimático elimina los extremos 3'y 5' para dejar una nueva estructura tallo-asa llamado precursor miRNA (pre-miRNA). Posteriormente, ese mismo complejo hace un corte para generar un dúplex de RNA, el cual, es metilado en ambos extremos 3' por la enzima HUA ENHANCER 1 (HEN 1). La metilación será la señal para que otra enzima, la proteína HASTY, reconozca al dúplex y lo exporte al citoplasma (Hou et al., 2021; Zhang et al., 2022b). Además de este complejo enzimático encargado de madurar al miRNA, existe otra proteína, la proteína TREX-2, que estuvo presente en todo el proceso de maduración, desde que el miRNA fue transcrito por Pol II, hasta que fue expulsado a citoplasma. Gracias a que esta proteína se unió a Pol II, se pudo llevar a cabo de manera simultánea la transcripción del gen MIR, la maduración del miRNA y la exportación del dúplex, toda vez que TREX-2 también interactúa con las carioferinas para facilitar la exportación de miRNA hacia el citoplasma donde éste tendrá finalmente una función (Zhang et al., 2020).

miRNA, are transcribed by RNA polymerase II (RNA Pol II). The nascent RNA strand, which can measure between 49 to 900 nt, undergoes self-folding to form a stem-loop type structure, this structure is known as primary miRNA (pri-miRNA) and when transcribed by the RNA Pol II end 5' is protected with modification of a Guanine (5'Cap) and 3' end is poly-adenylated. The pri-miRNA is then processed by an enzymatic complex composed mainly of the Dicer-like (DCL) protein, HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL-1), SERRATE (SE) and RH27 (DEAD-BOX RNA HELICASE 27). This enzyme complex removes the 3' and 5' ends to leave a new stem-loop structure called the miRNA precursor (pre-miRNA). Subsequently, that same complex makes a cut to generate an RNA duplex, which is methylated at both 3' ends by the enzyme HUA ENHANCER 1 (HEN 1). The methylation will be the signal for another enzyme, the HASTY protein, to recognize the duplex and export it to the cytoplasm (Hou et al., 2021; Zhang et al., 2022b). In addition to this enzymatic complex responsible for miRNA maturation, there is another protein, the TREX-2 protein, which was present throughout the maturation process, from the time the miRNA was transcribed by Pol II until it was expelled into the cytoplasm. Thanks to the fact that this protein bound to Pol II, the transcription of the MIR gene, the maturation of the miRNA and the export of the duplex could be carried out simultaneously, since TREX-2 also interacts with caryopherins to facilitate export. of miRNA towards the cytoplasm where it will finally have a function (Zhang et al., 2020).

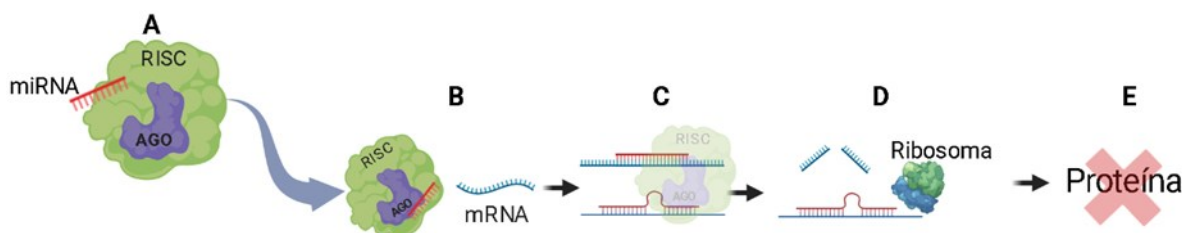


Figura 1. Mecanismo de acción de los miRNAs. A) el miRNA maduro procedente del núcleo celular es cargado dentro del complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA), B) el miRNA dirige RISC hasta localizar un mRNA con quien aparearse, C) el miRNA se aparea por complementariedad de bases a un mRNA objetivo, el acoplamiento puede ser de manera parcial o total, D) si el apareamiento miRNA:mRNA es total, la proteína Argonauta (AGO) que forma parte del complejo RISC, escindiría al mRNA, pero si el apareamiento es parcial, no la escindiría, pero el ribosoma no podrá llevar a cabo la traducción, E) al interrumpirse la traducción del mRNA no habrá producción de proteína.

Figure 1. Mechanism of action of miRNAs. A) mature miRNA from the cell nucleus is loaded into the RISC complex (RNA-induced silencing complex), B) miRNA directs RISC to locate an mRNA with which to pair, C) miRNA pairs by complementary base pairing to a Target mRNA, the coupling can be partial or total, D) if the miRNA:mRNA pairing is complete, the Argonaute protein (AGO) that is part of the RISC complex will cleave the mRNA, but if the pairing is partial, it will not will cleave, but the ribosome will not be able to carry out the translation, E) when the translation of the mRNA is interrupted, there will be no protein production.

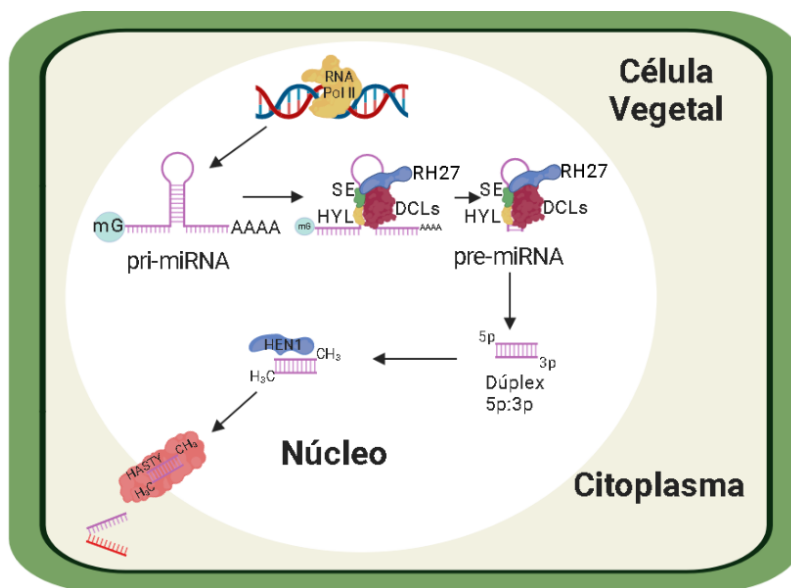


Figura 2. Biogénesis de miRNAs en plantas. La biogénesis inicia cuando la enzima RNA Pol II (amarillo) transcribe un gen MIR para generar un stem-loop llamado miRNA primario (pri-miRNA) el cual está metilguanilado en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3'. El pri-miRNA es reconocido por un microprocesador compuesto principalmente por las proteínas SERRATE (SE), RH27 (DEAD-BOX RNA HELICASE 27), Dicer-like (DCLs) e HYPONASTIC LEAVES (HYL), que en un primer paso escinden ambos extremos del stem-loop para dar origen a un miRNA precursor (pre-miRNA), y en un segundo paso escinden el loop para rendir un dúplex de RNA (dúplex 5p:3p). Posteriormente la enzima HUA-ENHANCER 1 (HEN1) metila los extremos 3' del dúplex, lo que es una señal para que la proteína HASTY exporte el dúplex de RNA al citoplasma donde el miRNA cumplirá con su función regulatoria.

Figure 2. Biogenesis of miRNAs in plants. Biogenesis begins when the enzyme RNA Pol II (yellow) transcribes a MIR gene to generate a stem-loop called primary miRNA (pri-miRNA) which is methylguanilated at the 5' end and polyadenylated at the 3' end. The pri-miRNA is recognized by a microprocessor composed mainly of the proteins SERRATE (SE), RH27 (DEAD-BOX RNA HELICASE 27), Dicer-like (DCLs) and HYPONASTIC LEAVES (HYL), which in a first step cleave both ends stem-loop to give rise to a precursor miRNA (pre-miRNA), and in a second step they cleave the loop to yield an RNA duplex (5p:3p duplex). Subsequently, the enzyme HUA-ENHANCER 1 (HEN1) methylates the 3' ends of the duplex, which is a signal for the HASTY protein to export the RNA duplex to the cytoplasm where the miRNA will fulfill its regulatory function.

Los miRNAs en la inmunidad de las plantas contra factores bióticos

Ante la invasión de patógenos, las plantas responden de distintas maneras en distintos niveles. La interacción planta-patógeno desencadena una verdadera batalla en la que resultará triunfador el organismo más preparado y con una batería armamentística más especializada. Mientras que el patógeno intenta apoderarse de los tejidos vegetales derribando las defensas de la planta para sustraer los nutrientes, la planta hace frente con distintas barreras y moléculas con las que cuenta. Las primeras barreras con la que un patógeno se encuentra al invadir una planta son sin duda los polímeros estructurales como la celulosa, callosa, hemicelulosa y lignina. En segundo frente de batalla que los patógenos deben enfrentar están los metabolitos secundarios como la melatonina, fitoalexinas, flavonoides, polifenol oxidasa y las hormonas vegetales como las auxinas, ácido salicílico, ácido jasmónico o el etileno que están involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas (Kaur et al., 2022; Waheed et al., 2021). Y, en tercer lugar, los patógenos deben enfrentarse a moléculas elicitoras más especializadas como los miRNAs, que silencian los mecanismos de ataque

miRNAs in plant immunity against biotic factors

Before the invasion of pathogens, plants respond in different ways at different levels. The plant-pathogen interaction unleashes a real battle in which the most prepared organism and with a more specialized weapons battery will win. While the pathogen tries to take over the plant tissues, breaking down the plant's defenses to steal nutrients, the plant faces different barriers and molecules that it has. The first barriers that a pathogen encounters when invading a plant are undoubtedly structural polymers such as cellulose, callous, hemicellulose and lignin. In the second battlefield that pathogens must face are secondary metabolites such as melatonin, phytoalexins, flavonoids, polyphenol oxidase, and plant hormones such as auxins, salicylic acid, jasmonic acid, or ethylene, which are involved in the defense mechanisms of pathogens. plants (Kaur et al., 2022; Waheed et al., 2021). And third, pathogens must deal with more specialized elicitor molecules such as miRNAs, which silence pathogen attack mechanisms. These and other molecules trigger immunity cascades that allow plant cells to defend themselves against phytopathogens. Thus, plants can trigger two types of

de los patógenos. Estas y otras moléculas desencadenan cascadas de inmunidad que permiten a las células vegetales defenderse contra los fitopatógenos. Así, las plantas pueden desencadenar dos tipos de inmunidad, la inmunidad desencadenada por efectores (ETI) y la inmunidad desencadenada por el patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), que activan la emisión de moléculas como los miRNAs que, a su vez, serán responsables de generar otras moléculas de defensa como los phased siRNAs (Yang et al., 2021; Zhu et al., 2013; Navarro et al., 2008). Los phased siRNAs actuarán endógenamente en el hospedero haciendo e interviniendo en el sistema de defensa de la planta (Axtell et al., 2006), mientras que los miRNAs también actuarán dentro del hospedero, pero, además, serán capaces de viajar hasta el patógeno, introducirse en él, e interrumpir rutas de producción de metabolitos esenciales para la subsistencia del patógeno (Wang y Dean, 2019; Zhang et al., 2016). Por ejemplo, el miR167a de garbanzo (*Cicer arietinum*) puede atacar transcritos de la timidilato sintetasa en *Fusarium oxysporum*, lo que repercutirá en segunda instancia en la formación de desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP), lo cual impedirá la reparación y síntesis del DNA. En algodón, miR2948 puede atacar los transcritos de las pectato liasas, evitando así que el hongo *Verticillium dahliae* degrade la pared celular del algodón (*Gossypium hirsutum*) (Mathur et al., 2020). En ese mismo sistema, el algodón puede enviar los miR159 y miR166 al patógeno, el primero se dirige al transcrito que codifica para la proteína isotricodermina C-15 hidrolasa (HiC-15), que es la proteína responsable de procesar la isotricodemimina que dará lugar a tricotecenos micotóxicos para el arroz, y el segundo miRNA, el miR166, al transcrito que codifica para la proteína calpaína, una cisteína proteasa dependiente de Ca^{+2} (Clp-1) involucrada en el estrés alcalino del hongo (hasta la fecha no se sabe cómo es que se reduce la patogenicidad del hongo) (Mathur et al., 2020; Gualtieri et al., 2020).

En el caso de los de insectos que atacan a las plantas, el daño que ocasionan no solo es mecánico, sino que posterior a ello, los tejidos dañados son más susceptibles a invasión por microorganismos patógenos como en el caso de las distintas variedades de tomate (*Solanum*), las cuales pueden adquirir más de 200 enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y nematodos (Cardoso et al., 2018). Las plantas cuentan con diversos mecanismos altamente especializados que involucran la acción de miRNAs, los cuales le permiten protegerse de estos insectos; por ejemplo, el miR159c de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se dirige al transcrito que codifica para la proteína BJHSP1 encontrada en la hemolinfa (sustancia similar a la sabia de las plantas o la sangre de los mamíferos) del lepidóptero *Plutella xylostella*, la carencia de la proteína de la hemolinfa provoca la muerte del lepidóptero (Zhang et al., 2019). En el caso del cultivo de arroz, uno de los insectos más voraces es la chicharrita parda (*Nilaparvata lugens*), que ataca a las plantas en todas las etapas del desarrollo, ya que, tanto las ninfas como los adultos se

immunity, effector-triggered immunity (ETI) and pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity, which activate the emission of molecules such as miRNAs that, in turn, will be responsible for generating other defense molecules such as phased siRNAs (Yang et al., 2021; Zhu et al., 2013; Navarro et al., 2008). The phased siRNAs will act endogenously in the host, making and intervening in the defense system of the plant (Axtell et al., 2006), while the miRNAs will also act within the host, but, in addition, they will be able to travel to the pathogen, enter it, and interrupt production routes of essential metabolites for the subsistence of the pathogen (Wang and Dean, 2019; Zhang et al., 2016). For example, miR167a from chickpea (*Cicer arietinum*) can attack transcripts of thymidylate synthetase in *Fusarium oxysporum*, which will affect in a second instance the formation of deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP), which will prevent DNA synthesis and repair. In cotton, miR2948 can attack the transcripts of pectate lyases, thus preventing the fungus *Verticillium dahliae* from degrading the cell wall of cotton (*Gossypium hirsutum*) (Mathur et al., 2020). In this same system, cotton can send miR159 and miR166 to the pathogen, the first one targets the transcript that codes for the protein isotrichodermin C-15 hydrolase (HiC-15), which is the protein responsible for processing the isotrichodemimine that will give rise to to mycotoxic trichothecenes for rice, and the second miRNA, miR166, to the transcript that codes for the protein calpain, a Ca^{+2} -dependent cysteine protease (Clp-1) involved in alkaline stress in the fungus (to date no evidence has been found). knows how the pathogenicity of the fungus is reduced) (Mathur et al., 2020; Gualtieri et al., 2020). In the case of insects that attack plants, the damage they cause is not only mechanical, but after that, the damaged tissues are more susceptible to invasion by pathogenic microorganisms, as in the case of the different tomato varieties (*Solanum*), which can acquire more than 200 diseases caused by viruses, bacteria, fungi and nematodes (Cardoso et al., 2018). Plants have various highly specialized mechanisms that involve the action of miRNAs, which allow them to protect themselves from these insects; for example, miR159c from the model plant *Arabidopsis thaliana* targets the transcript encoding the BJHSP1 protein found in the hemolymph (a sage-like substance of plants or mammalian blood) of the lepidopteran *Plutella xylostella*, the lack of the hemolymph protein causes the death of the lepidoptera (Zhang et al., 2019). In the case of rice cultivation, one of the most voracious insects is the brown leafhopper (*Nilaparvata lugens*), which attacks plants at all stages of development, since both nymphs and adults feed on the base of rice. the tillers, causing yellow spots that later turn brown, evidence of desiccation of the tissues. In the event of an infestation by this hemiptera, the use of pesticides is the first option, but their excessive use has made the insect increasingly resistant, which is why they have turned to an alternative solution, using miR156 silencing. which acts as a master regulator of the genes for the biosynthesis of jasmonic acid, a phytohormone involved in the defense against this type of

se alimentan de la base de los macollos, ocasionando manchas amarillas que más tarde se tornan marrón, evidencia de la desecación de los tejidos. En caso de una infestación por este hemíptero, el uso de pesticidas es la primera opción, pero su uso excesivo ha provocado que el insecto sea cada vez más resistente, por lo que se ha volteado a ver una solución alterna, utilizando el silenciamiento del miR156 que actúa como regulador maestro de los genes de la biosíntesis de ácido jasmónico, una fitohormona involucrada en la defensa contra este tipo de insectos. El silenciamiento de miR156 dio como resultado plantas más resistentes a la chicharrita parda (Han et al., 2022; Ge et al., 2018).

Los miRNAs en respuesta a factores abióticos

Uno de los efectos del calentamiento global puede verse en el incremento de sequías de la última década, las plantas al ser organismos sésiles usan mecanismos genéticos y moleculares para adaptarse a las nuevas condiciones, algunos de estos mecanismos de respuesta a estrés abiótico están asociados a los miRNAs. Cuando una célula vegetal está en condiciones de estrés ambiental como la sequía, todos sus organelos celulares incluidas las mitocondrias, retículo endoplásmico, cloroplastos, apoplastos, peroxisomas, membranas y paredes celulares, incrementan su tasa de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), indicativo del alto nivel de estrés por el que están pasando (Kaur et al., 2022). Las ROS también se producen por otros tipos de factores abióticos tales como la salinidad del suelo, la radiación UV-B y la privación de nutrientes (Pyo et al., 2020). Para mitigar los efectos de este tipo de factores, las plantas pueden responder con miRNAs. Por ejemplo, en garbanzo, la sobreexpresión del miR408 reduce los niveles de transcritos de plastocianina, la cual está involucrada con los elementos sensibles a sequía, por lo tanto, las plantas son tolerantes a estrés por sequía (Patil et al., 2021). Efectos similares fueron obtenidos al sobreexpresar el miR169 en tomate, al obtener plantas con reducida apertura de estomas, lo que disminuye la tasa de transpiración de agua (Zhang et al., 2011).

Un factor clave que influyen en el rendimiento y biomasa de los cultivos es la variación de temperatura. Por ejemplo, las temperaturas muy bajas o elevadas pueden devastar todo el cultivo generando pérdidas millonarias. En el caso de las temperaturas bajas se ha visto que los niveles de expresión de miRNAs en los distintos tejidos de las plantas es diferente; por ejemplo, en la hoja del maíz a 4°C, los miR160 y miR319 disminuyen significativamente en la zona madura, mientras que en los meristemos y las zonas de elongación, el miR408a y el miR528 está sobre-expresado (Zhang et al., 2022a). En el arroz, la sobreexpresión de Osa-miR528 provoca un incremento de la expresión de genes MYB que controlan el metabolismo del almidón; su sobreexpresión aumenta los niveles de maltosa, lo que mejora la tolerancia al frío (Huo et al., 2022; Bhat et al., 2022). Para el caso de temperaturas elevadas, que tienen los mismos efectos negativos en los cultivos comerciales, también se tiene registrado la expresión diferencial de los miRNAs; por ejemplo, en arroz los

insect

miRNAs in response to abiotic factors

One of the effects of global warming can be seen in the increase in drought in the last decade, plants being sessile organisms use genetic and molecular mechanisms to adapt to new conditions, some of these response mechanisms to abiotic stress are associated with miRNAs. When a plant cell is under conditions of environmental stress such as drought, all its cell organelles, including mitochondria, endoplasmic reticulum, chloroplasts, apoplasts, peroxisomes, cell membranes, and cell walls, increase their rate of production of reactive oxygen species (ROS), indicative of the high level of stress they are going through (Kaur et al., 2022). ROS are also produced by other types of abiotic factors such as soil salinity, UV-B radiation, and nutrient deprivation (Pyo et al., 2020). To mitigate the effects of these types of factors, plants can respond with miRNAs. For example, in chickpea, miR408 overexpression reduces the levels of plastocyanin transcripts, which is involved with drought-sensitive elements, therefore, plants are tolerant to drought stress (Patil et al., 2021). Similar effects were obtained by overexpressing miR169 in tomato, by obtaining plants with reduced stomatal opening, which decreases the rate of water transpiration (Zhang et al., 2011). A key factor influencing crop yield and biomass is temperature variation. For example, very low or high temperatures can devastate the entire crop, generating millions in losses. In the case of low temperatures, it has been seen that the expression levels of miRNAs in the different tissues of the plants are different; For example, in the maize leaf at 4°C, miR160 and miR319 are significantly decreased in the mature zone, while in the meristems and elongation zones, miR408a and miR528 are overexpressed (Zhang et al., 2022a). In rice, the overexpression of Osa-miR528 causes an increase in the expression of MYB genes that control starch metabolism; its overexpression increases maltose levels, which improves cold tolerance (Huo et al., 2022; Bhat et al., 2022). In the case of high temperatures, which have the same negative effects on commercial crops, the differential expression of miRNAs has also been recorded; for example, in rice the Osa-miR531b and Osa-miR5149 decrease their expression while Osa-miR397a, Osa-miR397b, Osa-miR398b are over-expressed (Kushawaha et al., 2021). In the case of alfalfa, another crop of very important agronomic interest for livestock, the overexpression of miR156 causes an increase in the content of proline and antioxidants. These plants that overexpress miR156 are resistant to high temperatures of 40 degrees Celsius. (Arshad et al., 2020). On the other hand, the excessive use of chemical fertilizers gradually salinizes agricultural soils. Two of the most used formulas to give presentation and shelf life to fruits are Calcium Chloride (CaCl₂) and Potassium Chloride (KCl). However, poor formulations leave large residual amounts that can affect new crops, especially if the growing area goes through long dry seasons. The chlorine contained in these molecules is an essential element for the proper growth and development of

Osa-miR531b y el Osa-miR5149 disminuyen su expresión mientras que Osa-miR397a, Osa-miR397b, Osa-miR398b están sobre-expresados (Kushawaha et al., 2021). En el caso de la alfalfa, otro cultivo de interés agronómico muy importante para la ganadería, la sobreexpresión de miR156 provoca un incremento en el contenido de prolina y antioxidantes, estas plantas que sobre-expresan el miR156 son resistentes a altas temperatura de 40 grados Celsius (Arshad et al., 2020).

Por otro lado, el uso excesivo de fertilizantes químicos poco a poco saliniza los suelos agrícolas. Dos de las fórmulas más utilizadas para darle presentación y vida de anaquel a los frutos son el Cloruro de Calcio (CaCl_2) y el Cloruro de Potasio (KCl). Sin embargo, las malas formulaciones dejan grandes cantidades residuales que pueden afectar nuevos cultivos, máxime si la zona de cultivo pasa por largas temporadas de sequía. El cloro contenido en estas moléculas es un elemento esencial para el buen crecimiento y desarrollo de las plantas, pero cuando los niveles de dicho nutriente sobrepasan los límites, las plantas comienzan a presentar clorosis en las hojas, lo que dificulta la correcta acumulación de fotosintatos. En respuesta a los niveles de cloro, el maíz modifica el patrón de expresión de miRNAs como el miR156, miR164, miR166, miR168, miR171 y miR319 (Kong et al., 2010), el incremento de expresión de estos miRNA indica es la razón de la resistencia a condiciones de salinidad. En especies de alcachofa, *Helianthus tuberosus*, se demostró que el miR390 también se expresa en respuesta en condiciones de estrés salino de NaCl pero es inhibido por concentraciones superiores a 300 mM. En el caso de arroz, la sobre expresión de miR1841 alivia el estrés por salinidad y en el caso de *Arabidopsis*, la sobre expresión de miR408 da como resultado plantas tolerantes a la salinidad (Islam et al., 2022).

Los miRNAs en la formación de órganos vegetales

Para que un cultivo de interés agronómico incremente su producción, es necesario recurrir a cuadros nutricionales perfectamente balanceados y aplicados en el momento indicado de desarrollo de la planta. Pero, además, es necesario que la planta incremente su capacidad de asimilación de dichos nutrientes. Para tal fin, la nueva biotecnología trabaja en el incremento de las raíces de las plantas, con lo que, en combinación con un buen cuadro nutricional y las prácticas culturales, se logrará una mejor asimilación de nutrientes, incrementando así, los rendimientos. Por ejemplo, *Robinia pseudoacacia* L. es una planta cuyo proceso de cultivo se basa en la propagación por esquejes, pero es una especie con una elevada dificultad para el enraizamiento. Por tal motivo, se realizó un estudio para evaluar los miRNAs que se expresan durante la formación de raíces adventicias, encontrándose que, en las etapas iniciales del desarrollo de la raíz, aumentan los niveles de miR6171 y miR3267 y posteriormente disminuyen, mientras que los niveles de miR162a-5p se mantienen durante toda la etapa de inducción de la raíz (Uddin et al., 2022). Estos miRNAs

plants, but when the levels of said nutrient exceed the limits, the plants begin to present chlorosis in the leaves, which hinders the correct accumulation of photosynthates. In response to chlorine levels, maize modifies the expression pattern of miRNAs such as miR156, miR164, miR166, miR168, miR171 and miR319 (Kong et al., 2010), the increased expression of these miRNAs indicates that this is the reason resistance to salinity conditions. In artichoke species, *Helianthus tuberosus*, it was shown that miR390 is also expressed in response to NaCl stress conditions but is inhibited by concentrations higher than 300 mM. In the case of rice, the overexpression of miR1841 alleviates salinity stress and in the case of *Arabidopsis*, the overexpression of miR408 results in salinity-tolerant plants (Islam et al., 2022).

miRNAs in plant organ formation

To increase the production of crops, it is necessary to resort to nutritional tables that are perfectly balanced and applied at the indicated moment of plant development. But, in addition, it is necessary for the plant to increase its capacity to assimilate these nutrients. To this end, the new biotechnology works to increase plant roots, which, in combination with a good nutritional picture and cultural practices, will achieve better nutrient assimilation, thus increasing yields. For example, *Robinia pseudoacacia* L. is a plant whose cultivation process is based on propagation by cuttings, but it is a species with high rooting difficulties. For this reason, a study was carried out to evaluate the miRNAs that are expressed during the formation of adventitious roots, finding that, in the initial stages of root development, the levels of miR6171 and miR3267 increase and later decrease, while the levels of miR162a-5p are maintained throughout the root induction stage (Uddin et al., 2022). These miRNAs could be used for root induction in crops of substantially more important commercial interest. Another example is tomato miR171, which is involved in shoot branching, leaf morphogenesis, and pollen development (Millar, 2020).

Plant miRNAs and cross-kingdom gene regulation

The use of plants to obtain food products is not new but using plant miRNAs to increase their commercial or nutritional value is a new and controversial issue. It has been proposed that miRNAs contained in vegetables ingested in the diet can enter the circulatory system and subsequently regulate metabolic processes in humans. A large-scale study conducted in blood samples identified at least 35 miRNAs that are also present in the plant diet, including miR6478, miR166, and miR159 (Chen et al., 2021). Which suggests a clear crossing of kingdoms. Evidence of this crossing of kingdoms between miRNAs is that miR162 from *Brassica campestris* (cabbage or cabbage) may be involved in the creation of castes in bees (*Apis mellifera*); that is, the bees "eat" the miR162 from the cabbage and already in their system, the miR162 every time it is directed towards the genes that code for the TOR (Target of Rapamycin) proteins, which play an important role in the creation of castes, in

podrían ser utilizados para la inducción de raíces en cultivos de interés comercial sustancialmente más importantes. Otro ejemplo es el miR171 de tomate, que está involucrado en ramificación de brotes, morfogénesis de hoja y desarrollo del polen (Millar, 2020).

Los miRNAs vegetales y la regulación genética entre reinos

El uso de plantas para la obtención de productos alimenticios no es novedad, pero el utilizar los miRNAs de las plantas para incrementar su valor comercial o nutricional es un tema novedoso y controversial. Se ha propuesto que los miRNAs contenidos en los vegetales ingeridos en la dieta, pueden ingresar a sistema circulatorio y posteriormente regular procesos metabólicos en el humano. Un estudio a gran escala realizado en muestras sanguíneas identificó al menos 35 miRNAs que también están presentes la dieta vegetal, entre ellos miR6478, miR166 y miR159 (Chen et al., 2021). Lo que sugiere un claro cruce de reinos. Evidencia de este cruce de reinos entre los miRNAs, es que el miR162 de *Brassica campestris* (repollo o col) puede estar involucrado en la creación de castas en las abejas (*Apis mellifera*); es decir, las abejas “comen” el miR162 procedente del repollo y ya en su sistema, el miR162 toda vez que se dirige hacia los genes que codifican para las proteínas TOR (Target of Rapamycin), las cuales juegan un papel importante en la creación de castas, en particular, en la creación de abejas reina (Zhu et al., 2017). Aunque faltan estudios más profundos, la hipótesis es que los miRNAs de presentes en los alimentos, una vez que están en torrente sanguíneo, pueden regular genes humanos. Esto, abre una enorme puerta para primero, demostrar que efectivamente los miRNAs de plantas pueden regular genes animales y segundo, si se demuestra esta posibilidad, entonces generar plantas que tengan miRNAs específicos que regulen genes humanos causantes de enfermedades.

CONCLUSIÓN

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA que, aunque están codificadas dentro del genoma, no codifican para una proteína, pero tienen una función que es regular prácticamente todos los procesos fisiológicos de los seres vivos. Su uso en la agricultura es una tecnología emergente que está tomando importancia por las posibilidades que abre en la generación de cultivos mejorado. Aunque mayor investigación se requiere, es claro que la sobreexpresión o la eliminación de la expresión de ciertos miRNAs mediante el uso de herramientas de ingeniería genética como la tecnología de edición genómica, puede ayudar en la generación de plantas resistentes a estrés biótico o abiótico.

AGRADECIMIENTOS

Beca CONACyT de doctorado para SRG. Al Instituto Politécnico Nacional por el proyecto SIP20221934 para NVDF. Proyecto CONACyT-Salud A3-S-47077 para NVDF.

particular, in the creation of queen bees (Zhu et al., 2017). Although more in-depth studies are lacking, the hypothesis is that miRNAs present in food, once they are in the bloodstream, can regulate human genes. This opens a huge door to firstly demonstrate that plant miRNAs can indeed regulate animal genes and secondly, if this possibility is demonstrated, then to generate plants that have specific miRNAs that regulate human disease-causing genes.

CONCLUSION

miRNAs are small RNA molecules that, although they are coded within the genome, do not code for a protein, but have a function that is to regulate practically all the physiological processes. Its use in agriculture is an emerging technology that is gaining importance due to the possibilities it opens in the generation of improved crops. Although further research is required, the overexpression or elimination of certain miRNAs by using genetic engineering tools such as genomic editing technology, can help in the generation of plants resistant to biotic or abiotic stress.

ACKNOWLEDGE

CONACyT doctoral scholarship for SRG. To Instituto Politécnico Nacional for the project SIP20221934 for NVDF. Project CONACyT-Salud A3-S-47077 for NVDF.

Referencias

- Arshad, M., Puri, A., Simkovich, A.J., Renaud, J., Gruber, M.Y., Marsolais, F. and Hannoufa, A., 2020. Label-free quantitative proteomic analysis of alfalfa in response to microRNA156 under high temperature. *BMC Genomics* 21: 758
- Axtell, MJ, Jan, C, Rajagopalen, R. and Bartel, D.P., 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* 127: 565-577.
- Bhat K.A., Mahajan R., Pakhtoon M.M., Urwat U., Bashir Z., Shah A.A., Agrawal A., Bhat B., Sofi P.A., Masi A. and Zargar S.M., 2022. Low temperature stress tolerance: an insight into the Omics approaches for legume crops. *Frontiers in Plant Science* 13:888710
- Cardoso, T.C. dS., Alves, T.C., Caneschi, C.M., Santana, D.dR.G., Fernandes-Brum, C.N., Reis, G.L.D., Daude, M.M., Cherubino, R.T.H., Díaz, G.M.M., Lima, A.A., Augusto, G.L.A., de Sousa, G.M., Elizandro, G.P., Rodrigues, dA.L., Chalfun-Júnior, A., Maluf, W.R. and de Souza, G.M., 2018. New insights into tomato microRNAs. *Scientific Reports* 8: 16069
- Chen, X., Liu, L., Chu, Q., Sun, S., Wu, Y., Tong, Z., Fang, W., Timko, M.P. and Fan, L., 2021. Large-scale identification of extracellular plant miRNAs in mammalian implicates their dietary intake. *PlosOne* 16(9): e0257878
- Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, 2022. Naciones Unidas. <https://www.un.org/en/desa/world-population-projected-reach-98-billion-2050-and-112-billion-2100>
- Dexheimer, P.J. and Cochella, L., 2020. MicroRNAs: from mechanism to organism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:409
- Ge, Y., Han, J., Zhou, G., Xu, Y., Ding, Y., Shi, M., Guo, C. and Wu, G., 2018. Silencing of miR156 confers enhanced resistance to brown planthopper in rice. *Planta*
- Gualtieri, C., Leonetti, P. and Macovei, A., 2020. Plant miRNA cross-kingdom transfer targeting parasitic and mutualistic organisms as a tool to advance modern agriculture. *Frontiers in Plant Science* 11: 930.
- Han, W.Y., Wang, J.X., Zhang, F.B., Liu, Y.X., Wu, H. and Wang, X.W., 2022. Small RNA and degradome sequencing reveal important microRNA function in *Nicotiana tabacum* response to *Bemisia tabaci*. *Genes* 13(2): 361
- Hou, X.L., Chen, W.Q., Hou, Y., Gong, H.Q., Sun, J., Wang, Z., Zhao, H., Cao, X., Song, X.F. and Liu, C.M. 2021. DEAD-BOX RNA HELICASE 27 regulates microRNA biogenesis, zygote division, and stem cell homeostasis. *The plant cell* 33:66-84.
- Huo, C., Zhang, B. and Wang, R., 2022. Research progress on plant noncoding RNAs in response to low-temperature stress. *Plant Signaling & Behavior* 17(1): e2004035
- Islam, W., Waheed, S., Naveed, H. and Zeng, F., 2022. MicroRNAs mediated plant responses to salt stress. *Cells* 11(18): 2806
- Kaur, S., Samota, M.K., Choudhary, M., Choudhary, M., Pandey, A.K., Sharma, A. and Thakur, J., 2022. How do plants defend themselves against pathogens-biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 28(2): 485-504
- Kong, Y.M., Elling, A.A., Chen, B. and Deng, X.W., 2010. Differential expression of microRNAs in maize inbred and hybrid lines during salt and drought stress. *American Journal of Plant Sciences* 1:69-76
- Kushawaha, A.K., Khan, A., Sopory, S.K. and Sanan-Mishra, N., 2021. Priming by high temperature stress induces microRNA regulated heat shock modules indicating their involvement in thermopriming response in rice. *Life* 11(4): 291
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- Mathur, M., Nair, A. and Kadoo, N., 2020. Plant-pathogen interactions: microRNA-mediated trans-kingdom gene regulation in fungi and their host plants. *Genomics* 112: 3021-3035.
- Millar, A.A., 2020. The function of miRNAs in plants. *Plants* 9(2): 198
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., Yang, H.S. and Voinnet, O. 2008. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 312:964-967.
- Patil, S., Joshi, S., Jamia, M., Zhuo, X., Taherzadeh, M.J., Suprasanna, P. and Kumar, V., 2021. MicroRNA-mediated bioengineering for climate-resilience in crops. *Bioengineered* 12(2): 10430-10456
- Pyo, Y., Kim, G.M., Choi, S.K., Song, C.Y., Yang, S.W. and Jung, I.L., 2020. Strontium stress disrupts miRNA biogenesis by reducing HYL1 protein levels in Arabidopsis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 204: 111056
- Stenseth, N.C., Andersson, L. and Hoekstra, H.E., 2022. Gregor Johann Mendel and the development of modern evolutionary biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 119(30): e2201327119
- Uddin, S., Munir, M.Z., Gull, S., Khan, A.H., Khan, A., Khan, D., Khan, M.A., Wu, Y., Sun, Y. and Li, Y., 2022. Transcriptome profiling reveals role of microRNAs and their targeted genes during adventitious root formation in dark-pretreated micro-shoot cutting of tetraploid *Robinia pseudoacacia* L. *Genes* 13(3): 441

- Waheed, S., Anwar, M., Saleem, M.A., Wu J., Tayyab, M. and Hu, Z., 2021. The critical role of small RNAs in regulating plant innate immunity. *Biomolecules* 11(2): 184
- Wang, J., Mei, J. and Ren, G., 2018. Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis and degradation. *Frontiers in Plant Science* 10:360
- Wang, M. and Dean, R.A., 2019. Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Molecular Plant pathology* 21: 589-601
- Wong-Bajracharya, J., Singan, V.R., Monti, R., Plett, K.L., Ng, V., Grigoriev, I.V., Martin, F.M., Anderson, I.C. and Plett, J.M., 2022. The ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* encodes a microRNA involved in cross-kingdom gene silencing during symbiosis. *PNAS* 119(3): e2103527119.
- Yang, L., Mu, X., Liu, C., Cai, J., Shi, K., Zhu, W. and Yang, Q., 2015. Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahlia* infection. *Journal of integrative plant biology* 57(12):1078-1088.
- Yang, X., Zhang, L., Yang, Y., Schmid, M. and Wang, Y., 2021. miRNA mediated regulation and interaction between plants and pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 2913
- You C., Cui J., Wang H., Qi X., Kuo L.Y., Ma H., Gao L., Mo B. & Chen X. 2017. Conservation and divergence of small RNA pathway and microRNAs in land plants. *Genome biology* 18:158.
- Yu, Y., Jia, T and Chen, X., 2017. The “how” and “where” of plant microRNAs. *New Phytol* 216(4): 1002-1017
- Zhai, J., Jeong, D.H., Paoli, E.D., Park, S., Rosen, B.D., Li, Y., González, A.J., Yan, Z., Kitto, S.L., Grusak, M.A., Jackson, S.A., Stacey, G., Cook, D.R., Green, P.J., Sherrier, D.J. and Meyers, B.C., 2011. microRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes & development* 25: 2540-2553.
- Zhang, B., You, C., Zhang, Y., Zeng, L., Hu, J., Zhao, M. and Chen, X. 2020. Linking key steps of microRNA biogenesis by TREX-2 and the nuclear pore complex in *Arabidopsis*. *Nature plants* 6(8): 957-969.
- Zhang, F., Yang, j., Zhang, N., Wu, J. and Si, H., 2022a. Roles of microRNAs in abiotic stress response and characteristics regulation of plant. *Frontiers on Plant Science* 13: 919243
- Zhang, L., Xiang, Y., Chen, S., Shi, M., Jiang, X., He, Z. and Gao, S., 2022b. Mechanisms of microRNA biogenesis and stability control in plants. *Frontiers in Plant Science* 13:844149
- Zhang, L.L., Jing, X.D., Chen, W., Wang, Y., Lin, J.H., Zheng, L., Dong, Y.H., Zhou, L., Li F.F., Yang, F.Y., Peng, L., Vasseur, L., He, W.Y. and You, M.S., 2019. Host plant-derived miRNAs potentially modulate the development of a cosmopolitan insect pest, *Plutella sylostella*. *Biomolecules* 9:602
- Zhang, T., Zhao, T.L., Zhao, J.H., Wang, S., Jin, Y., Chen, Z.Q., Fang, Y.Y., Hua, C.L., Ding, S.W. and Guo, H.S., 2016. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants* 2: 1-6.
- Zhang, X., Zuo, Z., Gong, P., Zhang, J., Ziaf, K., Li, H., Xiao, F. and Ye, Z., 2011. Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnology Letters* 33: 403-409
- Zhu, K., Liu, M., Fu, Z., Zhou, Z., Kong, Y., Liang, H., Lin, Z., Luo, J., Zheng, H., Wan, P., Zhang, J., Zen, K., Chen, J., Hu, F., Zhang, C-Y., Ren, J. and Chen, X., 2017. Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *Plos Genetics* 13(8): e1006946.
- Zhu, Q.H., Fan, L., Liu, Y., Xu, H., Llewellyn, D. and Wilson, I., 2013. miR482 regulation of NBS-LRR defense genes during fungal pathogen infection in cotton. *Plos one* 8(12): e84390