

## «مقاله پژوهشی»

## شناسایی و ارزیابی ژن‌های حفاظت‌شده *NAC* مورد هدف miR164 در گیاه *Aeluropus littoralis* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

سمیرا محمدی<sup>۱\*</sup>، قربانعلی نعمت‌زاده<sup>۲</sup>، حمید نجفی زرنی<sup>۲</sup>، سیدحمیدرضا هاشمی‌پتروودی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۲. استاد و دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۳. استادیار، گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۸)

## Identification and evaluation of conserved miR164-targeted *Aeluropus littoralis* *NAC* genes in response to abiotic stress

Samira Mohammadi<sup>1\*</sup>, Ghorbanali Nematzadeh<sup>2</sup>, Hamid Najafi Zarrini<sup>2</sup>, Seyyed Hamidreza Hashemi-petrooudi<sup>3</sup>

1. Ph.D. Candidate of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

2. Professor and Associate Professor, Department of Biotechnology and Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

(Received: Apr. 18, 2021 - Accepted: Sep. 19, 2021)

### Abstract

MicroRNAs are a large class of small and non-coding RNAs that regulate gene expression by binding target mRNA, which leads to cleavage or translational inhibition. Plant miR164 family is highly conserved and is involved in the responses of plants to biotic stresses through the regulation of their target *NAC* genes. In the present study, 68 putative *NAC* domain-encoding genes (*NACs*) were identified in *Aeluropus littoralis*, a halophyte plant of family *Poaceae*. Among the *AINAC* genes identified, 4 were predicted putative targets for regulation by miR164. The high conservation of miR164 recognition sites in *AINAC* genes indicates the essential role of target sites in the normal function of these genes as transcription factors. Expression profile of *AINACIL1* candidate gene in response to salt and drought stresses and ABA phytohormone in leaf, stem and root tissues was analyzed by RT-qPCR. The results showed that *AINACIL1* gene down-regulated in all tissues at 6 hours after applying stresses. Among the treatments, 600 mM NaCl treatment reduced *AINACIL1* expression in leaf, stem and root tissues to about -217, -26 and -9 folds, respectively. Therefore, the *AINACIL1* which is ortholog of known *Oryza* miR164-targeted *NAC* gene *OMTN6*, may play negative regulatory role in response to salt, drought and ABA treatments. These results indicated that function of some *NAC* proteins might be conserved among species. Collectively, these findings provided a useful resource for further analysis of the interactions between *NAC* genes and their intricate regulation by miR164 in response to abiotic stresses.

**Keywords:** Abiotic stress, miR164, *NAC* Transcription Factors, post-transcriptional regulation, stress-responses.

### چکیده

MicroRNAها گروه بزرگی از RNAهای کوچک و غیرکدکننده هستند که با برش mRNA مورد هدف و یا مهار ترجمه، بیان این ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. خانواده miR164 گیاهی بسیار حفاظت‌شده بوده و از طریق تنظیم ژن‌های *NAC* مورد هدف خود، در پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی نقش دارند. در مطالعه حاضر، ۶۸ ژن بالقوه کدکننده دمین *NAC* در *Aeluropus littoralis* به‌عنوان یک گیاه هالوفیت از خانواده *Poaceae* شناسایی شد. در میان ژن‌های *AINAC* شناسایی شده، ۴ ژن به‌عنوان هدف miR164 پیش‌بینی شدند. حفظ‌شدگی بالای جایگاه‌های تشخیص miR164 در ژن‌های *AINAC* حاکی از نقش ضروری جایگاه‌های هدف در کارکرد طبیعی این ژن‌ها به‌عنوان عوامل رونویسی می‌باشد. الگوی بیان ژن انتخابی *AINACIL1* در پاسخ به تنش‌های شوری و خشکی و فیتوهورمون ABA در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه با استفاده از RT-qPCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن *AINACIL1* در زمان ۶ ساعت بعد از اعمال تنش در تمامی بافت‌ها کاهش بیان نشان می‌دهد. در بین تیمارها، تیمار سدیم‌کلرید ۶۰۰ میلی‌مولار بیان *AINACIL1* را در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه به ترتیب حدود -۲۱۷، -۲۶ و -۹ برابر کاهش داد. بنابراین، *AINACIL1* به‌عنوان ارتولوگ ژن *OMTN6* (ژن *NAC* هدف miR164 در برنج) می‌تواند نقش تنظیم‌کننده منفی در پاسخ به تیمارهای شوری، خشکی و ABA ایفا نماید. این نتایج نشان داد که کارکرد برخی از پروتئین‌های *NAC* می‌تواند در بین گونه‌ها حفاظت‌شده باشد. در مجموع، این یافته‌ها منبع مفیدی برای تجزیه و تحلیل بیشتر میان‌کنش‌های بین ژن‌های *NAC* و خانواده miR164 در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی فراهم آورده است.

**واژه‌های کلیدی:** پاسخ به تنش، تنش‌های غیرزیستی، تنظیم پس از رونویسی، فاکتورهای رونویسی *NAC*. miR164

فاکتورهای رونویسی NAC را هدف قرار می‌دهند. فاکتورهای رونویسی NAC (NAM<sup>۱</sup>، ATAF1-2<sup>۲</sup> و CUC2<sup>۳</sup>) یکی از بزرگترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی مختص گیاهان بوده که به‌عنوان مؤلفه‌های مهم در فرآیند پیچیده پیام‌دهی در طول نمو گیاهان و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند (Hernández and Sanan-Mishra, 2017). پروتئین‌های خانواده ژنی NAC، شامل یک دمین NAC بسیار حفاظت‌شده در انتهای آمینی و یک ناحیه تنظیم رونویسی بسیار متغیر در انتهای کربوکسیلی هستند. دمین انتهای آمینی متشکل از حدود ۱۵۰ تا ۱۶۰ اسید آمینه با پنج زبردمین A-E بوده که برای اتصال این فاکتورها به DNA ضروری می‌باشند (Olsen et al., 2005)، در حالی که دمین انتهای کربوکسیلی، برای خاصیت فعال‌سازی از راه دور<sup>۴</sup> یا بازدارندگی این پروتئین‌ها ضروری می‌باشد (Stender et al., 2015).

تجزیه و تحلیل کارکردی فاکتورهای رونویسی NAC مورد هدف miR164 حاکی از نقش این فاکتورهای رونویسی در مکانیسم‌های متنوعی از رشد، پاسخ به هورمون و تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی در چندین گونه گیاهی می‌باشد (Pandey et al., 2014; Akdogan et al., 2016; Hernández and Sanan-Mishra, 2017). مطالعات نشان داده است که بیان برخی از فاکتورهای رونویسی NAC توسط miR164 در سطح پس از رونویسی به‌طور منفی تنظیم می‌شوند تا در نمو و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی مشارکت نمایند (Baker et al., 2005; Jeong et al., 2005).

## مقدمه

گیاهان، مکانیسم‌های متفاوتی را جهت تنظیم بیان ژن در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی به‌کار می‌گیرند. مسیرهای تنظیمی miRNA نقش مهمی در کنترل بیان انواع ژن‌های تنظیم‌شده تحت تنش، برعهده دارند (Hernández and Sanan-Mishra, 2017). مولکول‌های microRNA (miRNA) RNAهای غیرکدکننده کوچکی (۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتیدی) هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها پس از رونویسی نقش دارند (Mallory et al., 2004). miRNAها، توالی‌های mRNA مکمل خود را شناسایی و با برش mRNA مورد هدف و یا مهار ترجمه، بیان این ژن‌ها را تنظیم می‌کنند (Lan et al., 2012). مطالعات نشان داده‌اند که miRNAها و ژن‌های مورد هدف آنها، در فرآیندهای نموی مختلف در گیاهان از جمله گلدهی، مورفولوژی برگ، بذر و ریشه، پاسخ‌های هورمونی و همچنین پاسخ به تنش‌های مختلف مانند خشکی، شوری، دمای بالا، تنش ناشی از آبسزیک اسید (ABA)، پرتوتابی اشعه UV-B، تنش اکسیداتیو و حتی تنش مکانیکی دخیل می‌باشند (Fang et al., 2014; Lakhwani et al., 2020). در بین این ژن‌ها، بسیاری از فاکتورهای رونویسی از جمله NAC، MYB و WRKY با تنظیم توسط miRNAها، بیان ژن‌های پایین‌دست را افزایش می‌دهند یا سرکوب می‌کنند (Hu et al., 2018).

خانواده miR164 به‌عنوان یک miRNA بسیار حفاظت‌شده در بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت شده و یکی از اولین miRNAهای کلون‌شده از گیاه آرابیدوپسیس می‌باشد (Rhoades et al., 2002). خانواده miR164، ژن‌های حفاظت‌شده‌ای متعلق به

1. No apical meristem
2. Arabidopsis transcription activation factor
3. Cup-shape cotyledon
4. Transactivation

miR164 امری مهم خواهد بود. بنابراین، هدف از این مطالعه، شناسایی ژن‌های *AINAC* بالقوه مورد هدف miR164 و تجزیه و تحلیل بیان ژن انتخابی *AINAC1L1* به‌عنوان ارتولوگ ژن *OMTN6* (Os08t0200600) برنج که تحت تنش خشکی به‌طور منفی تنظیم می‌شود (Fang *et al.*, 2014)، تحت تیمارهای خشکی و شوری و همچنین فیتوهورمون ABA با استفاده از RT-qPCR می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### شناسایی ژن‌های NAC در گیاه *Aeluropus littoralis*

جهت شناسایی ژن‌های NAC بالقوه در ژنوم *A. littoralis* ابتدا توالی‌های پروتئینی NAC در گیاهان مدل برنج و آراییدوپسیس، به‌ترتیب از پایگاه‌های اطلاعاتی RGAP و TAIR دریافت شده و سپس به‌عنوان توالی مورد نظر (Query) در توالی ژنوم گیاه *A. littoralis*، برای جستجوهای Local tBLASTn با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999) استفاده شدند. پس از حذف پروتئین‌های ناقص و تکراری، حضور دمین (NAM) NAC، با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی InterProScan (Jones *et al.*, 2014)، Pfam (Finn *et al.*, 2015) و SMART (Letunic *et al.*, 2014) تأیید شد.

تجزیه و تحلیل توالی خانواده miR164 و پیش‌بینی ژن‌های *AINAC* مورد هدف miR164 توالی‌های بالغ<sup>۲</sup> خانواده miR164 گیاهی از سایت miRbase (http://mirbase.org/) (Kozomara *et al.*, 2019) به‌دست آمده و توسط نرم‌افزار

(al., 2011). در آراییدوپسیس، miR164، پنج mRNA کدکننده دمین NAC به‌نام‌های NAC1، CUC1، CUC2، At5g07680 و At5g61430 را مورد هدف قرار می‌دهد (Mallory *et al.*, 2004). ژن *NAC1* نقش حیاتی در انتقال سیگنال‌های اکسین بر عهده دارد که موجب نمو ریشه جانبی می‌شود. مشخص شده است که *AtNAC1* به‌عنوان واسطه‌ای در مسیر پیام‌دهی اکسین عمل نموده و ژن‌های کدکننده مولکول‌های درگیر در نمو ریشه جانبی را فعال می‌کند (Xie *et al.*, 2000). علاوه بر این، بیش‌بیین ژن *ZmNAC1* ذرت در گیاه آراییدوپسیس، منجر به افزایش تعداد ریشه‌های جانبی آراییدوپسیس تراریخت در مقایسه با نوع وحشی شد (Li *et al.*, 2012). در حالی که در بررسی دیگری، گیاهان آراییدوپسیس بیش‌بیین شده با ژن *TaNAC29* گندم، افزایش تحمل به شوری و خشکی را نشان دادند (Huang *et al.*, 2015).

*Aeluropus littoralis* یک گیاه شورزیست متعلق به خانواده *Poaceae* می‌باشد. این گیاه علاوه بر تحمل سطوح بالای شوری تا بیش از ۶۰۰ میلی‌مولار، به‌عنوان گیاهی متحمل به خشکی و گرما نیز محسوب می‌شود (Hashemi-petroudi *et al.*, 2019; Hashemi-Petroudi *et al.*, 2020). گیاهان شورزیست با توجه به ساختار ژنتیکی متمایز خود، پتانسیل بالایی جهت بقا و تکمیل چرخه زندگی خود در زیستگاه‌های با شوری بالا دارند (Yuan *et al.*, 2019). بنابراین، شناسایی miRNAها و ژن‌های حفاظت‌شده مورد هدف آنها برای درک جنبه‌های تنظیمی رشد و نمو این گیاهان و پاسخ به تنش‌ها، ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به نقش‌های متعدد فاکتورهای رونویسی NAC در تحمل به تنش‌های محیطی، درک مکانیسم‌های مولکولی پروتئین‌های NAC و تنظیم پیچیده آنها توسط

1. *Oryza* miR164-targeted NAC  
2. Mature

نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نوری  $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$  صورت پذیرفت. اعمال تنش روی کلون‌های دو ماهه با اندازه یکنواخت بدین صورت انجام شد. برای تنش شوری، گیاهان با کلرید سدیم ۲۵۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار تیمار شدند. به منظور تنش خشکی، گیاهان با PEG 6000 ۲۰ درصد تیمار شدند. تیمار ABA نیز با اسپری هورمون ABA ۱۰۰ میکرومولار روی برگ‌ها انجام شد. سپس نمونه برداری از بافت‌های برگ، ساقه و ریشه (۳ تکرار بیولوژیکی)، در سری زمانی صفر (شاهد)، ۳ و ۶ ساعت بعد از اعمال تنش انجام شد و نمونه‌ها برای انجام مراحل بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کل از نمونه‌ها با استفاده از کیت تریزول شرکت ریراژن (Therzol, Riragene) انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA به ترتیب با روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد صورت گرفت. جهت حذف DNA ژنومی، از تیمار DNase I شرکت ترمو فیشر آمریکا (Thermo Fisher Scientific) استفاده شد. سنتز cDNA به وسیله کیت شرکت ترمو فیشر آمریکا مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، انجام و به نسبت ۵ برابر رقیق گردیدند. طراحی آغازگر اختصاصی ژن *AINAC1L.1* با استفاده از نرم‌افزار AlleleID انجام شد (جدول ۱). هر واکنش RT-qPCR در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر از The Maxima SYBR Green/ROX RT-qPCR Master Mix شرکت ترمو فیشر آمریکا، ۲ میکرولیتر cDNA رقیق شده، ۰/۳ میکرولیتر آغازگر و ۳/۴ میکرولیتر آب عاری از RNase، با استفاده از چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۰

CLUSTALX هم‌ردیف شدند. سپس جهت بررسی وجود miR164 در گونه *A. littoralis* جستجو با استفاده از BLASTN با تنظیمات پیش‌فرض در برابر ژنوم آن، انجام شد. به منظور پیش‌بینی ژن‌های NAC مورد هدف miR164 از تشابه مکمل معکوس بین miRNA و رونوشت هدف استفاده شد. ژن‌های هدف بالقوه برای miR164 با استفاده از نرم‌افزار psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/>) (Dai et al., 2018) با پارامترهای پیش‌فرض پیش‌بینی شد.

#### تجزیه و تحلیل حفظ‌شدگی جایگاه‌های مورد هدف miR164 ژن‌های AINAC

آنالیزهای هم‌ردیفی چندگانه با استفاده از توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های AINAC برای تعیین موقعیت دمین NAC و جایگاه اتصال miR164 با استفاده از ابزار ClustalO (Sievers and Higgins, 2021) انجام شد.

پیش‌بینی شبکه‌های متقابل پروتئین‌های AINAC میان‌کنش‌های عملکردی و فیزیکی پروتئین‌های NAC آلوروپوس همراه با ارتولوگ‌های آرآبیدوپسیس با استفاده از پایگاه اطلاعاتی STRING (<http://string-db.org/>) (Szkarczyk et al., 2019) با شاخص حداقل امتیاز متقابل ۰/۴ ترسیم شد.

#### بررسی بیان ژن انتخابی AINAC32 با استفاده از RT-qPCR

در این بررسی از نمونه‌های کلون *A. littoralis* استفاده شد. کشت نمونه‌های کلون‌شده تحت کشت هیدروپونیک در محلول غذایی هوگلند با شرایط دمایی  $25 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد تحت دوره

(Bio-Rad) محاسبه و ژن *UBQ* به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد (جدول ۱). میزان بیان نسبی ژن مورد مطالعه نیز با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد.

دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه در ۴۰ چرخه بوده و ۳ کنترل منفی (NTC) نیز در نظر گرفته شد. آنالیز منحنی ذوب نمونه‌ها و سیکل آستانه با نرم‌افزار CFX

جدول ۱. ژن‌های مورد استفاده در RT-qPCR و اطلاعات مربوط به آغازگرها

نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر (5'→3')	طول قطعه تکثیری (جفت باز)
<i>AINACIL1</i>	Alg4287	F: CCAAGGCAATCATCTGAAGAC R: GTGGCAGTTCGGCTACT	122
<i>UBQ</i>	EE594598	F: CTTGGTCTGCTGTTGTCTTG R: CACGGTTCACCTATCCATCAC	200

هستند. به‌عنوان مثال در سویا، ۱۱ عضو از خانواده miR164 وجود دارد که هر کدام توسط جایگاه‌های ژنی مختلف کد شده و فاکتورهای NAC را مورد هدف قرار می‌دهند، در حالی که در آرابیدوپسیس تنها سه عضو از miR164 درگیر می‌باشد (Fang et al., 2014). اگرچه پیش‌بینی شده است که اعضای هر خانواده miRNA، مجموعه مشابهی از رونوشت‌های NAC را مورد هدف قرار می‌دهند، اما آنها به‌دلیل تنوع در الگوهای بیانی miRNAها و ژن‌های NAC مورد هدف آنها در زمان و مکان خاص، می‌توانند کارکردهای تنظیمی متفاوتی داشته باشند (Baker et al., 2005; Fang et al., 2014). به‌طور مثال، بیش‌بیان ژن *miR319a* برنج در گیاه *Agrostis stolonifera* با کاهش بیان ژن‌های مورد هدف آن از جمله *AsNAC60*، تحمل به تنش‌های شوری و خشکی را در گیاهان تراریخته بهبود می‌بخشد (Zhou et al., 2013). در مطالعه حاضر نیز ژن *AINACIL1* به‌عنوان هدف miR164، نقش تنظیم‌کننده منفی در برابر تیمارهای شوری، خشکی و ABA نشان داد. لیستی از miRNAهایی که فاکتورهای رونویسی NAC را مورد هدف قرار می‌دهند و کارکردهای تنظیمی بالقوه آنها در جدول ۲ خلاصه شده است.

## نتایج و بحث

### شناسایی ژن‌های NAC در گیاه *A. littoralis*

آنالیز همولوژی بر مبنای پروتئین‌های NAC آرابیدوپسیس و برنج، منجر به شناسایی ۶۸ ژن NAC در ژنوم *A. littoralis* شد. با بررسی این پروتئین‌ها در پایگاه‌های InterProScan، Pfam و SMART، دمین اختصاصی NAM (PF02365) یا NAC (PF01849) مشاهده شد. در نهایت، ژن‌های شناسایی شده بر مبنای همولوژی با ژن‌های NAC آرابیدوپسیس نام‌گذاری شدند.

### تنظیم فاکتورهای رونویسی NAC توسط miRNAها

RNAهای تنظیمی کوچک، فاکتورهای رونویسی NAC را از طریق ماشین خاموشی پس از رونویسی تنظیم می‌کنند. اولین miRNA پیش‌بینی‌شده miR164 در آرابیدوپسیس است که زیرمجموعه‌ای از ژن‌های خانواده ژنی NAC را مورد هدف قرار می‌دهد (Rhoades et al., 2002; Guo et al., 2005). تحقیقات در مورد فاکتورهای رونویسی NAC مورد هدف miR164 با تأکید بر ژن‌های NAC مرتبط با نمو و تنظیم‌شده تحت تنش‌های غیرزیستی، نشان داده است که این فاکتورهای رونویسی با وجود تعداد اعضای خانواده متفاوت، در گونه‌های مختلف، حفاظت‌شده

version 22.1, <http://www.mirbase.org>, last )  
تعداد (accessed October 2018) بازبایی شدند. تعداد  
اعضای خانواده miR164 از یک (مانند ta-miR164  
از *Triticum aestivum*) تا ۱۱ (مانند gma-  
miR164a-k از *Glycine max*) در گونه‌های مختلف  
گیاهی متغیر است.

تجزیه و تحلیل توالی خانواده miR164 و  
پیش‌بینی ژن‌های AINAC مورد هدف miR164  
جهت شناسایی miR164 و ژن‌های هدف آن در  
گیاه *A. littoralis*، ابتدا توالی تمام miR164های  
شناخته‌شده در گیاهان مورد تجزیه و تحلیل قرار  
گرفت. در مجموع، ۱۶۵ عضو از خانواده miR164  
متعلق به ۴۲ گونه گیاهی در پایگاه miRBase

جدول ۲. لیست miRNAها و فاکتورهای رونویسی NAC مورد هدف و همچنین عملکردهای بیولوژیکی احتمالی آنها

miRNA family	Species	NAC target	Function	Reference
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CUC1 and CUC2; NAC1; NAC2; NAC4	نمو ریشه، نمو گل، جداسازی لپه، پیری، شروع تخمک‌زایی، مرگ سلولی ناشی از عامل بیماری‌زا، مقاومت به خشکی	(Mallory <i>et al.</i> , 2004; Baker <i>et al.</i> , 2005; Guo <i>et al.</i> , 2005; Kim <i>et al.</i> , 2009; Fang <i>et al.</i> , 2014; Gonçalves <i>et al.</i> , 2015; Lee <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Phyllostachys edulis</i>	CUC1 and CUC2	تأخیر گلدهی	(Ge <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Solanum lycopersicum</i>	NAC1	دفاع میزبان در برابر ToLCNDV، <i>Phytophthora</i> ، <i>Botrytis cinerea</i> ، <i>infestans</i>	(Naqvi <i>et al.</i> , 2010; Jin and Wu, 2015; Luan <i>et al.</i> , 2015)
miR164	<i>Zea mays</i>	NAC1	نمو ریشه جانبی	(Li <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Triticum aestivum</i>	NAC1	مشارکت در مقاومت در برابر <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> (Pst)	(Fang <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Phyllostachys edulis</i>	NAC1	تنش‌های خشکی و شوری	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Oryza sativa</i>	NAC-domain protein	تنش خشکی	(Fang <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Populus trichocarpa</i>	NAC-domain protein	تنش ناشی از آسیب‌های مکانیکی	(Lu <i>et al.</i> , 2005; Wilkins <i>et al.</i> , 2009; Cohen <i>et al.</i> , 2010; Li <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Citrus sinensis</i>	NAC-domain protein	تنش بور	(Lu <i>et al.</i> , 2015)
miR159	<i>Citrus sinensis</i>	NAC-domain protein	تنش بور	(Lu <i>et al.</i> , 2015)
miR166	<i>Populus trichocarpa</i>	NAC-domain protein	تبادل سیگنال (Cross-talk) بین تنش‌های زیستی و غیرزیستی	(Zhao <i>et al.</i> , 2012)
miR319	<i>Agrostis tolouifera</i>	AsNAC60	تنش‌های خشکی و شوری	(Zhou <i>et al.</i> , 2013)
miR477	<i>Populus trichocarpa</i>	NAC-domain protein	تنش ناشی از آسیب‌های مکانیکی	(Lu <i>et al.</i> , 2005)
miR1514	<i>Phaseolus vulgaris</i>	NAC-domain protein	تنش خشکی	(Sosa-Valencia <i>et al.</i> , 2017a; Sosa-Valencia <i>et al.</i> , 2017b)
miR3946	<i>Citrus sinensis</i>	NAC-domain protein	تنش بور	(Lu <i>et al.</i> , 2015)
miR6164	<i>Lycium barbarum</i>	NAC-domain protein	رسیدگی میوه و تجمع رنگدانه	(Zeng <i>et al.</i> , 2015)

کاملاً مشابه می‌باشند. در میان ۱۶۵ عضو، ۸۷  
عضو توالی بالغ یکسانی دارند. توالی  
5'-UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA-3' به‌عنوان

اعضای مختلف در گونه‌های گیاهی یکسان توسط  
مکان‌های ژنی مختلف کد می‌شوند که در آنها  
پیش‌سازها متفاوت بوده، اما توالی‌های بالغ، یکسان یا

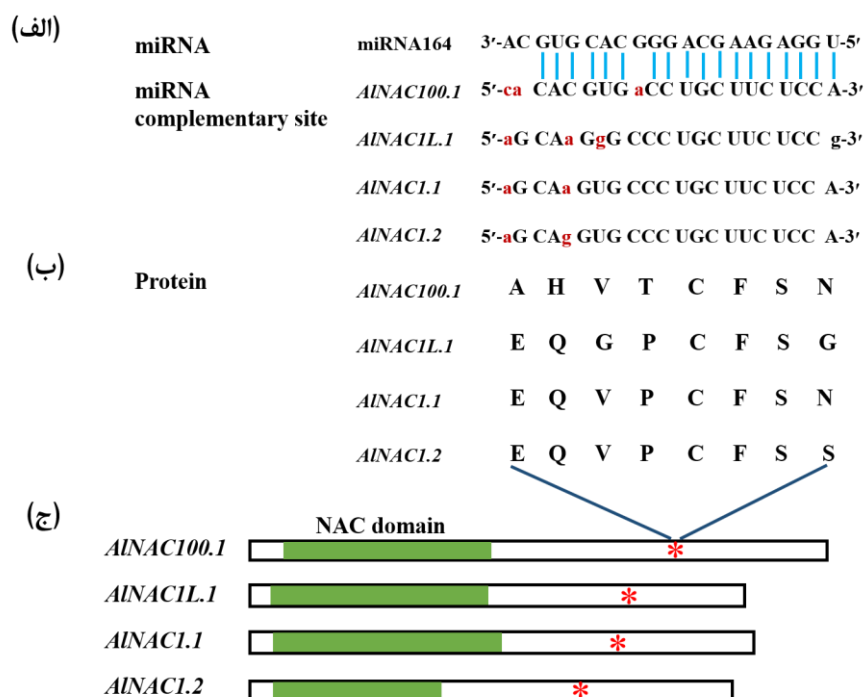
توجهی را نشان می‌دهند (شکل ۲). با این حال، توالی‌های آمینواسیدی مربوط به جایگاه اتصال miR164، که در انتهای کربوکسیلی واقع شده‌اند، بسیار حفاظت‌شده می‌باشند (شکل ۲). حفاظت‌شدگی جایگاه‌های هدف در ژن‌های *AINAC* حاکی از این امر است که جایگاه‌های هدف می‌توانند در کارکرد این ژن‌ها به‌عنوان عوامل رونویسی نقش مهمی داشته باشند. تحقیقات نشان داده است که حذف جایگاه‌های هدف، فعال‌سازی از راه دور OMTN‌ها را در مخمر، لغو یا مختل می‌نماید. این امر حاکی از نقش مهم جایگاه‌های هدف برای حفظ کارکردهای طبیعی پروتئین‌های OMTN می‌باشد. درک بیشتر کارکرد زیست‌شناختی جایگاه‌های هدف، اهمیت حفاظت‌شدگی بالای جایگاه‌های هدف را در طول تکامل نشان می‌دهد (Fang *et al.*, 2014).

توالی بالغ استاندارد miR164، در نظر گرفته می‌شود. جهت ارزیابی نقش miR164 در تنظیم بیان ژن‌های *AINAC*، ابتدا پیش‌بینی ژن‌های هدف بالقوه miR164 در میان ۶۸ ژن *AINAC* مد نظر قرار گرفت.

پیش‌بینی ژن‌های هدف در شناسایی ارتباط عملکردی miRNA‌های بالقوه مربوطه بسیار مهم است (Nair *et al.*, 2020). نتایج نشان داد که miR164 می‌تواند چهار ژن *AINAC1.1* (Alg5607)، *AINAC1.2* (Alg8384)، *AINAC100.1* (Alg4287) و *AINACIL.1* (Alg719) را هدف قرار دهد. ژن‌های *AINAC* پیش‌بینی شده دارای یک جایگاه مکمل miR164 با ۲ یا ۳ باز ناچور<sup>۱</sup> با miR164 بودند (شکل ۱-الف). این نتایج نشان می‌دهد که جایگاه‌های مورد هدف miR164 در ژن‌های *AINAC* بسیار حفاظت‌شده می‌باشند. در شکل ۱-ب توالی‌های پروتئینی کدشده توسط mRNA ژن‌های مورد هدف miR164 نمایش داده شده است. جایگاه‌های مکمل miR164 در آخرین اگزون mRNAها و پایین‌دست دمین حفاظت‌شده NAC قرار دارند (شکل ۱-ج). در مطالعه Fang و همکاران (۲۰۱۴) مشخص شد که جایگاه‌های هدف miR164 در ژن‌های NAC ژرم‌پلاسم برنج، بسیار حفاظت‌شده می‌باشند (Fang *et al.*, 2014).

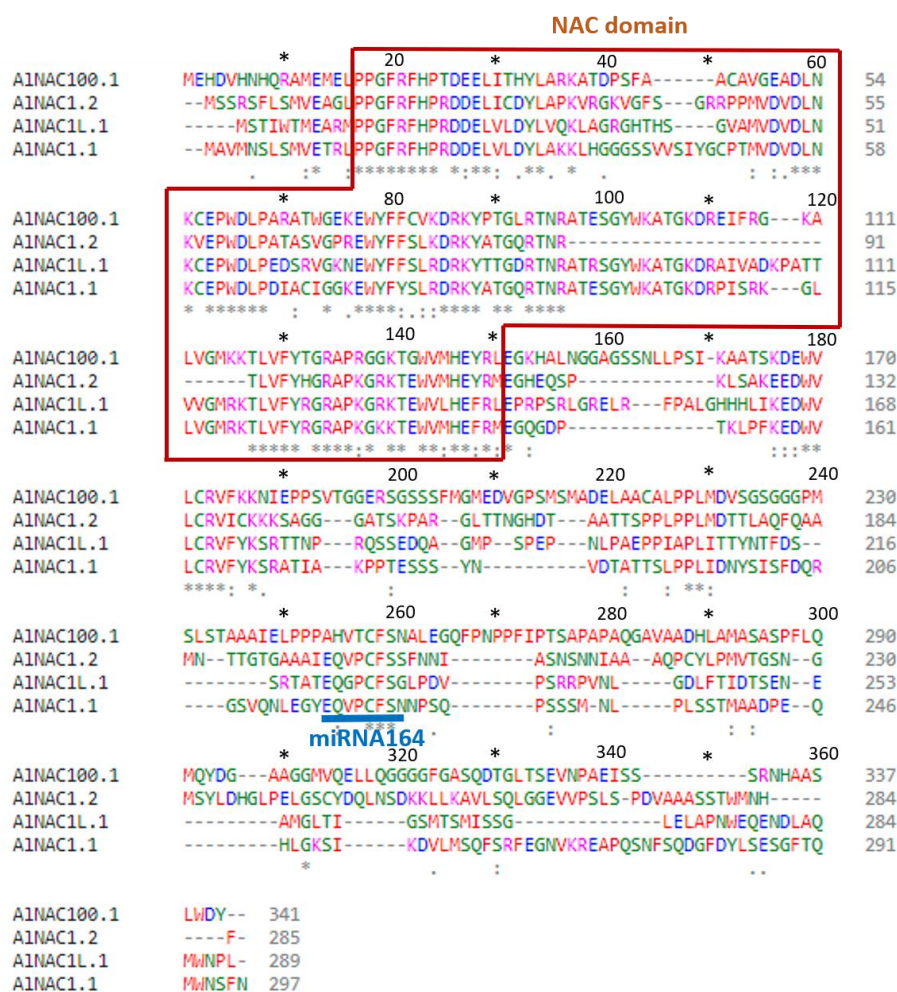
### تجزیه و تحلیل حفاظت‌شدگی جایگاه‌های مورد هدف miR164 ژن‌های *AINAC*

مقایسه توالی‌های پروتئینی ژن‌های *AINAC* مورد هدف miR164 نشان داد که دمین‌های NAC انتهای آمینی پروتئین‌ها بسیار حفاظت‌شده می‌باشند، در حالی که توالی‌های انتهای کربوکسیلی تنوع قابل



شکل ۱. جایگاه‌های مکمل miR164 در ژن‌های *AINAC* (الف) جفت‌شدگی‌های پیش‌بینی شده بین miR164 و جایگاه‌های مکمل miR164 روی mRNA ژن‌های *AINAC* نشان داده شده است. (ب) توالی‌های پروتئینی کدشده توسط mRNA ژن‌های مورد هدف miR164 نمایش داده شده است. (ج) ORF جایگاه‌های مورد هدف miR164 با مستطیل به تصویر کشیده شده است، که موقعیت هر دمین حفاظت‌شده NAC با جعبه سبز و جایگاه مکمل miR164 با ستاره قرمز مشخص شده است.





شکل ۲. هم‌ردیفی چندگانه توالی ژن‌های AINAC مورد هدف miR164. دمین‌های NAC ژن‌های هدف با یک نمودار بلوکی و مناطق اتصال miR164 با یک خط آبی نشان داده است.

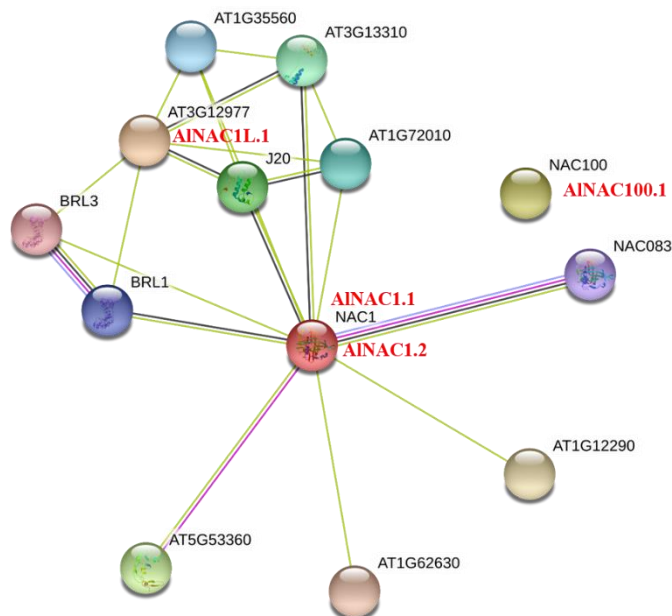
تشکیل ریشه جانبی و سیگنال‌دهی اکسین نقش دارد (Olsen *et al.*, 2005). NAC1 یک پروتئین اصلی در این شبکه تعاملی است. همچنین AINAC1.2 و AINAC1.1 ارتباط نزدیکی با NAC083 دارد که یک سرکوب‌کننده رونویسی است و بیان ژن‌های دخیل در تشکیل آوند چوبی را به‌طور منفی تنظیم می‌کند (Yamaguchi *et al.*, 2010). علاوه بر این، AINAC1L.1 همولوژی بالایی با AT3G12977 دارد که رشد سلول آندوسپرم را در طول جوانه‌زنی تنظیم می‌کند (Sánchez-Montesino *et al.*, 2019).

پیش‌بینی شبکه‌های متقابل پروتئین‌های AINAC یک شبکه متقابل پروتئین-پروتئین می‌تواند اطلاعات قابل‌توجهی در مورد عملکرد بالقوه پروتئین‌ها فراهم آورد و تا حد زیادی در درک آبخار سیگنال‌دهی پروتئین‌ها کمک نماید. جهت شناسایی بیشتر عملکرد بالقوه ژن‌های AINAC مورد هدف miR164، میان‌کنش‌های چهار پروتئین AINAC مورد نظر با استفاده از ابزارهای آنالین STRNG بر اساس پروتئین‌های همولوگ آرآیدوپسیس پیش‌بینی شد (شکل ۳). پروتئین‌های AINAC1.2 و AINAC1.1 همولوژی بالایی با پروتئین NAC1 آرآیدوپسیس نشان دادند که در

پروتئین‌ها نشان نداد (شکل ۳).

AINAC100.1 به عنوان همولوگ NAC100

آرابیدوپسیس در شبکه قرار نگرفته و تعاملی با بقیه



شکل ۳. شبکه‌های متقابل AINAC های مورد هدف miR164 بر اساس همولوژی با پروتئین‌های آرابیدوپسیس. پروتئین‌های همولوگ در آلورپوس و آرابیدوپسیس به ترتیب با رنگ‌های قرمز و سیاه نشان داده شده‌اند.

افزایش بیان ۲/۵۷ برابری در بافت برگ، و کاهش بیان ۱/۹۹- و ۵/۴۱- برابری به ترتیب در بافت‌های ساقه و ریشه مشاهده شد، اما ۶ ساعت بعد از اعمال تنش، این مقادیر به ترتیب به ۳/۴۷-، ۵/۴۱- و ۵/۵۹- کاهش پیدا نمود (شکل ۴ - ب). با این حال، بکارگیری سدیم کلرید در سطح ۶۰۰ میلی‌مولار منجر به کاهش بیان ۵۵/۰۸-، ۱۵/۸۹- و ۵/۵۴- برابری این ژن به ترتیب در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه، ۳ ساعت بعد از اعمال تنش شد، اما ۶ ساعت بعد از اعمال تنش، کاهش بیان شدیدتری به ترتیب با مقادیر ۲۱۷/۲۷-، ۲۵/۸۱- و ۹/۴۹- برابری مشاهده شد (شکل ۴ - ج). سطح رونوشت AINAC1.1 ۳ ساعت بعد از اعمال تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)، کاهش بیان ۲/۰۸- و ۲/۷۷- برابری نسبت به شاهد به ترتیب در بافت‌های برگ و ریشه نشان داد اما بیان ۱/۶۴ برابری در بافت ساقه مشاهده شد. با این حال، ۶ ساعت

بررسی بیان ژن انتخابی AINAC1.1 مورد هدف

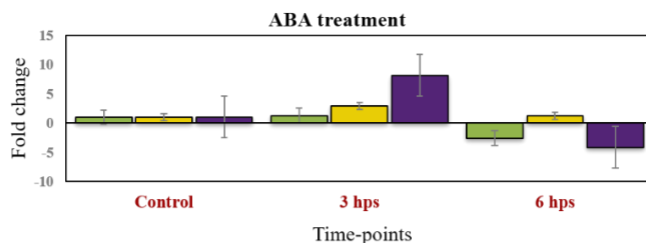
miR164 در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

جهت دستیابی به اطلاعات بیشتر در زمینه ژن‌های مورد هدف miR164 در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، ژن AINAC1.1 به عنوان ژن انتخابی تحت تیمارهای خشکی و شوری و همچنین فیتوهورمون ABA با استفاده از RT-qPCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن AINAC1.1 ۳ ساعت بعد از اعمال تیمار ABA در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه، به ترتیب افزایش بیان ۱/۲۸، ۸/۱۱ و ۲/۸۹ برابری نسبت به شاهد نشان داد. در حالی که ۶ ساعت بعد از اعمال تیمار، بیان این ژن در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه به ترتیب به ۲/۵۷- و ۴/۱۷- و ۱/۱۸- تنزل پیدا نمود (شکل ۴ - الف). ۳ ساعت بعد از تنش شوری ناشی از اعمال سدیم کلرید در سطح ۲۵۰ میلی‌مولار،

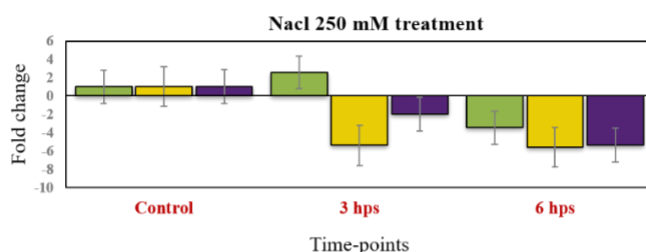
دمای ذوب مشخص بوده، که تأییدی بر اختصاصی بودن آغازگرها می‌باشد (شکل ۴-۵).

بعد از اعمال تنش، کاهش بیان ۲/۴۸، -۵/۶۶ و ۲/۳۳- به ترتیب در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه مشاهده شد (شکل ۴-د). نتایج آنالیز منحنی ذوب آغازگرهای *AINACIL.1* حاکی از وجود یک پیک با

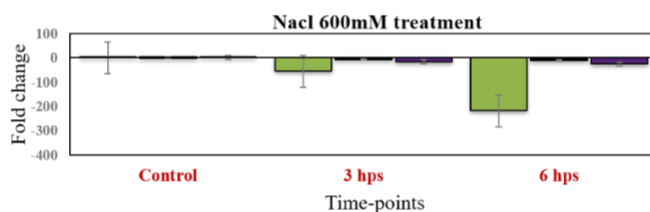
(الف)



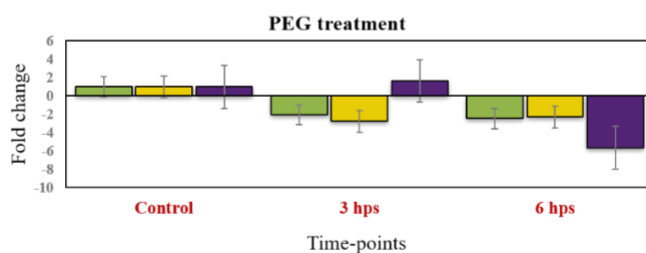
(ب)



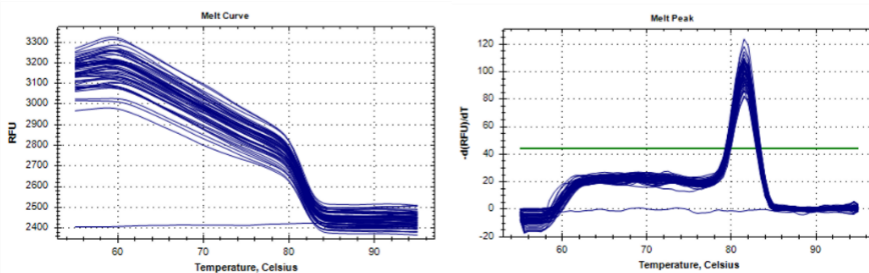
(ج)



(د)



(ه)



شکل ۴. آنالیز بیان ژن *AINACIL.1* تحت تنش‌های غیرزیستی. (الف) الگوی بیان ژن *AINACIL.1* تحت تیمارهای ABA ۱۰۰ میکرومولار،

سدیم کلرید ۲۵۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار، و PEG (6000) ۲۰ درصد ب) منحنی ذوب (Melt curve) ژن *AINACIL.1* در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه.

miR164 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی تحمل به خشکی باشد (Fang *et al.*, 2014). بیش‌بیان *ZmNAC1* (یک ژن *NAC* مورد هدف miR164 از ذرت) در آراییدوپسیس منجر به افزایش تعداد ریشه‌های جانبی شد. مطالعات بیشتر نشان داده است که miR164 بیان *ZmNAC1* را به‌طور منفی تنظیم می‌کند (Li *et al.*, 2012). تنظیم ژن *NAC1* توسط miR164، سیگنال‌های اکسین مرتبط با نمو ریشه جانبی را در گیاهان چای تحت تنش خشکی تنظیم منفی نمود (Guo *et al.*, 2017).

در مطالعه دیگری، یک ژن *NAC1* مرتبط با تنش (*SNAC1*) از *Phyllostachys edulis* خصوصیات شد. بیان اکتویپیک آن در آراییدوپسیس نشان داد که *PeSNAC1* همراه با *ped-miR164b* از طریق تنظیم نمو ریشه در تنظیم تحمل به تنش‌های شوری و خشکی مشارکت می‌نمایند (Wang *et al.*, 2016). ژن‌های *TaNAC21* و *TaNAC22* مورد هدف *tae-miR164* به‌طور منفی مقاومت گندم را در برابر *Puccinia striiformis* تنظیم کردند (Feng *et al.*, 2014). سطوح بالای بیان miR164، موجب کاهش بیان ژن‌های *NAC1*، *NAC21* و *NAC22* و در نتیجه باعث تأخیر در پیری برگ گیاه آراییدوپسیس شد (Guo *et al.*, 2004). ژن‌های *NAC* مورد هدف *peu-miR164* نقش‌های مهمی در نمو و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی در *Populus euphratica* ایفا می‌نمایند. بیش‌بیان *PeNAC070* به‌عنوان یک ژن *NAC* مورد هدف miR164 موجب افزایش تعداد ریشه‌های جانبی و کاهش تحمل به تنش‌های خشکی و شوری در گیاهان آراییدوپسیس تراریخته شد. این نتایج نشان داد که

همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد ژن *AINACIL.1* دارای اختلاف بیان در بافت‌های مختلف می‌باشد، به‌طوری که تحت تیمار سدیم کلرید ۶۰۰ میلی‌مولار کاهش بیان ۲۷/۲۱۷- برابری در بافت برگ ۶ ساعت بعد از اعمال تیمار مشاهده شد که در مقایسه با ساقه (۲۵/۸۱-) و ریشه (۹/۴۹-) میزان کاهش بیان بسیار بالاتری است. اختلاف بیان یک ژن در بافت‌های مختلف، می‌تواند به دلیل وجود عملکردهای مولکولی متفاوت و نیز مکانیسم‌های تنظیمی مختلف در کنترل فعالیت این ژن در بافت‌های مختلف باشد (Hashemi-petroudi and Mohammadi, 2020; Hashemi-petroudi and Mohammadi, 2021; Wang). همکاران (۲۰۱۳) عنوان نموده‌اند که الگوی بیان متفاوت miRNAها و ژن‌های مورد هدف آنها در بافت‌های برگ و ریشه، نشان‌دهنده کارکردهای متفاوت آنها در رشد و نمو پنبه می‌باشد (Wang *et al.*, 2013). در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن *AINACIL.1* در زمان ۶ ساعت بعد از اعمال تنش‌های غیرزیستی در تمامی بافت‌ها کاهش بیان نشان می‌دهد. بنابراین نتایج این مطالعه با سایر مطالعات مبنی بر نقش تنظیم‌کننده منفی برخی از پروتئین‌های *NAC* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی همخوانی دارد. به‌عنوان مثال، برخی از ژن‌های *NAC* در گیاه *Brachypodium distachyon* مانند ژن‌های *BdNAC054* و *BdNAC092* که مورد هدف miR164 هستند، تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی کاهش بیان نشان دادند (You *et al.*, 2015). در برنج، گیاهان بیش‌بیان شده با ژن‌های *NAC* مورد هدف miR164 (OMTN2, 3, 4, 6) افزایش حساسیت به تنش خشکی نشان دادند که می‌تواند بیانگر نقش ژن‌های حفاظت‌شده *NAC* مورد هدف

فراهم آورده است.

### سپاسگزاری

از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان جهت حمایت‌های مالی و فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### REFERENCES

- Akdogan G, Tufekci ED, Uranbey S, Unver T (2016) miRNA-based drought regulation in wheat. *Funct. Integr. Genomics*. 16(3): 221-233.
- Baker CC, Sieber P, Wellmer F, Meyerowitz EM (2005) The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in Arabidopsis. *Curr. Biol*. 15(4): 303-315.
- Cohen D, Bogeat-Triboulot M-B, Tisserant E, Balzergue S, Martin-Magniette M-L, Lelandais G, Ningre N, Renou J-P, Tamby J-P, Le Thiec D (2010) Comparative transcriptomics of drought responses in Populus: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics*. 11(1): 630.
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res*. 46(W1): W49-W54.
- Fang Y, Xie K, Xiong L (2014) Conserved miR164-targeted NAC genes negatively regulate drought resistance in rice. *J. Exp. Bot*. 65(8): 2119-2135.
- Feng H, Duan X, Zhang Q, Li X, Wang B, Huang L, Wang X, Kang Z (2014) The target gene of tae-miR164, a novel NAC transcription factor from the NAM subfamily, negatively regulates resistance of wheat to stripe rust. *Mol. Plant Pathol*. 15(3): 284-296.
- Finn RD, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A (2015) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res*. 44: 279-285.
- Ge W, Zhang Y, Cheng Z, Hou D, Li X, Gao J (2017) Main regulatory pathways, key genes and micro RNAs involved in flower formation and development of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Plant Biotechnol. J*. 15(1): 82-96.
- Gonçalves B, Hasson A, Belcram K, Cortizo M, Morin H, Nikovics K, Vialette-Guiraud A, Takeda S, Aida M, Laufs P (2015) A conserved role for CUP-SHAPED COTYLEDON genes during ovule development. *Plant J*. 83(4): 732-742.
- Guo HS, Xie Q, Fei JF, Chua NH (2005) MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *Plant Cell*. 17(5): 1376-1386.
- Guo Y, Cai Z, Gan S (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant, Cell Environ*. 27(5): 521-549.
- Guo Y, Zhao S, Zhu C, Chang X, Yue C, Wang Z, Lin Y, Lai Z (2017) Identification of drought-responsive miRNAs and physiological characterization of tea plant (*Camellia sinensis* L.) under drought stress. *BMC Plant Biol*. 17(1): 1-20.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows
- PeNAC070* به عنوان تنظیم‌کننده منفی مقاومت به خشکی و شوری در *P. euphratica* عمل می‌کند (Lu *et al.*, 2017). در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که کارکرد برخی پروتئین‌های NAC می‌تواند در بین گونه‌ها حفاظت‌شده باشد. این یافته‌ها اطلاعات ارزشمندی برای تجزیه و تحلیل بیشتر میان‌کنش‌های بین ژن‌های NAC و خانواده miR164 در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

- 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95-98.
- Hashemi-Petroudi S, Mohammadi S (2021) Identification, classification and expression analysis of DREB transcription factor gene family in *Aeluropus littoralis* under salinity stress. J. Plant Res. 34(1): 224-235.
- Hashemi-Petroudi SH, Mohammadi S (2020) Identification of the *ERF* gene family in *Aeluropus littoralis* halophyte plant and analysis of their expression pattern in response to salt stress. Crop Biotechnol. 9(29): 53-66.
- Hashemi-Petroudi SH, Nematzadeh G, Mohammadi S, Kuhlmann M (2019) Analysis of Expression Pattern of Genome and Analysis of *HSP90* Gene Family in *Aeluropus littoralis* under Salinity Stress. J. Crop Breed. 11(31): 134-143.
- Hashemi-Petroudi SH, Nematzadeh G, Mohammadi S, Kuhlmann M (2020) Expression pattern analysis of heat shock transcription factors (*HSFs*) gene family in *Aeluropus littoralis* under salinity stress. Env. Stresses Crop Sci. 13(2): 571-581.
- Hernández Y, Sanan-Mishra N (2017) miRNA mediated regulation of NAC transcription factors in plant development and environment stress response. Plant Gene. 11: 190-198.
- Hu G, Lei Y, Wang L, Liu J, Tang Y, Zhang Z, Chen A, Peng Q, Yang Z, Wu J (2018) The ghr-miR164 and GhNAC100 module participates in cotton plant defence against *Verticillium dahliae*. bioRxiv. 440826.
- Huang Q, Wang Y, Li B, Chang J, Chen M, Li K, Yang G, He G (2015) TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis. BMC Plant Biol. 15(1): 1-15.
- Jeong D-H, Park S, Zhai J, Gurazada SGR, De Paoli E, Meyers BC, Green PJ (2011) Massive analysis of rice small RNAs: mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage. Plant Cell. 23(12): 4185-4207.
- Jin W, Wu F (2015) Characterization of miRNAs associated with *Botrytis cinerea* infection of tomato leaves. BMC Plant Biol. 15(1): 1.
- Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, Mcanulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics. 30(9): 1236-1240.
- Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, Choi SH, Hwang D, Nam HG (2009) Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. Science. 323(5917): 1053-1057.
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. Nucleic Acids Res. 47(D1): D155-D162.
- Lakhwani D, Pandey A, Sharma D, Asif MH, Trivedi PK (2020) Novel microRNAs regulating ripening-associated processes in banana fruit. Plant Growth Regul. 90(2): 223-235.
- Lan Y, Su N, Shen Y, Zhang R, Wu F, Cheng Z, Wang J, Zhang X, Guo X, Lei C (2012) Identification of novel MiRNAs and MiRNA expression profiling during grain development in indica rice. BMC Genomics. 13(1):1-10.
- Lee MH, Jeon HS, Kim HG, Park OK (2017) An Arabidopsis NAC transcription factor NAC4 promotes pathogen-induced cell death under negative regulation by microRNA164. New Phytol. 214(1): 343-360.
- Letunic I, Doerks T, Bork P (2014) SMART: recent updates, new developments and status in 2015. Nucleic Acids Res. 43(D1):D257-D260.
- Li B, Qin Y, Duan H, Yin W, Xia X (2011) Genome-wide characterization

- of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*. J. Exp. Bot. 62(11): 3765-3779.
- Li J, Guo G, Guo W, Guo G, Tong D, Ni Z, Sun Q, Yao Y (2012) miRNA164-directed cleavage of *ZmNAC1* confers lateral root development in maize (*Zea mays* L.). BMC Plant Biol. 12(1): 220.
- Lu S, Sun Y-H, Shi R, Clark C, Li L, Chiang VL (2005) Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from Arabidopsis. Plant Cell. 17(8): 2186-2203.
- Lu X, Dun H, Lian C, Zhang X, Yin W, Xia X (2017) The role of *peu-miR164* and its target *PeNAC* genes in response to abiotic stress in *Populus euphratica*. Plant Physiol. Biochem. 115: 418-438.
- Lu Y-B, Qi Y-P, Yang L-T, Guo P, Li Y, Chen L-S (2015) Boron-deficiency-responsive microRNAs and their targets in *Citrus sinensis* leaves. BMC Plant Biol. 15(1): 271.
- Luan Y, Cui J, Zhai J, Li J, Han L, Meng J (2015) High-throughput sequencing reveals differential expression of miRNAs in tomato inoculated with *Phytophthora infestans*. Planta. 241(6): 1405-1416.
- Mallory AC, Reinhart BJ, Jones-Rhoades MW, Tang G, Zamore PD, Barton MK, Bartel DP (2004) MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. EMBO J. 23(16): 3356-3364.
- Nair MM, Krishna T, Alagu M (2020) Bioinformatics insights into microRNA mediated gene regulation in *Triticum aestivum* during multiple fungal diseases. Plant Gene. 21: 100219.
- Naqvi AR, Haq QM, Mukherjee SK (2010) MicroRNA profiling of tomato leaf curl new delhi virus (tolcndv) infected tomato leaves indicates that deregulation of *mir159/319* and *mir172* might be linked with leaf curl disease. Virol. J. 7(1): 281.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. Trends Plant Sci. 10(2): 79-87.
- Pandey R, Joshi G, Bhardwaj AR, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S (2014) A comprehensive genome-wide study on tissue-specific and abiotic stress-specific miRNAs in *Triticum aestivum*. PLoS One. 9(4): e95800.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. Cell. 110(4): 513-520.
- Sánchez-Montesino R, Bouza-Morcillo L, Marquez J, Ghita M, Duran-Nebreda S, Gómez L, Holdsworth MJ, Bassel G, Oñate-Sánchez L (2019) A regulatory module controlling GA-mediated endosperm cell expansion is critical for seed germination in Arabidopsis. Mol. plant. 12(1): 71-85.
- Sievers F, Higgins DG (2021) The clustal omega multiple alignment package. (ed) Multiple Sequence Alignment, Springer, pp 3-16.
- Sosa-Valencia G, Palomar M, Covarrubias AA, Reyes JL (2017a) The legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought. J. Exp. Bot. 68(8): 2013-2026.
- Sosa-Valencia G, Romero-Pérez PS, Palomar VM, Covarrubias AA, Reyes JL (2017b) Insights into the function of the phasiRNA-triggering miR1514 in response to stress in legumes. Plant Signal. Behav. 12(3): e1284724.
- Stender EG, O'shea C, Skriver K (2015) Subgroup-specific intrinsic disorder profiles of arabidopsis NAC transcription factors: Identification of functional hotspots. Plant Signal. Behav. 10(6): e1010967.

- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P (2019) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47(D1): D607-D613.
- Wang L, Zhao H, Chen D, Li L, Sun H, Lou Y, Gao Z (2016) Characterization and primary functional analysis of a bamboo NAC gene targeted by miR164b. *Plant Cell Rep.* 35(6): 1371-1383.
- 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.
- Wilkins O, Waldron L, Nahal H, Provart NJ, Campbell MM (2009) Genotype and time of day shape the *Populus* drought response. *Plant J.* 60(4): 703-715.
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua N-H (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* 14(23): 3024-3036.
- Yamaguchi M, Ohtani M, Mitsuda N, Kubo M, Ohme-Takagi M, Fukuda H, Demura T (2010) VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in Arabidopsis. *Plant Cell.* 22(4): 1249-1263.
- You J, Zhang L, Song B, Qi X, Chan Z (2015) Systematic analysis and identification of stress-responsive genes of the NAC gene family in *Brachypodium distachyon*. *PloS one.* 10(3): e0122027.
- Yuan F, Xu Y, Leng B, Wang B (2019) Beneficial effects of salt on halophyte growth: Morphology, cells, and genes. *Open life sci.* 14(1): 191-200.
- Zeng S, Liu Y, Pan L, Hayward A, Wang Y (2015) Identification and characterization of miRNAs in ripening fruit of *Lycium barbarum* L. using high-throughput sequencing. *Front. Plant Sci.* 6: 778.
- Zhao J-P, Jiang X-L, Zhang B-Y, Su X-H (2012) Involvement of microRNA-mediated gene expression regulation in the pathological development of stem canker disease in *Populus trichocarpa*. *PLoS One.* 7(9): e44968.
- Zhou M, Li D, Li Z, Hu Q, Yang C, Zhu L, Luo H (2013) Constitutive expression of a *miR319* gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant Physiol.* 161(3): 1375-1391.