Crop Biotech.
Autumn and Winter (2013) 5: 105-115

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۱۱۵- ۱۰۵)

بررسی تغییر بیان microRNAهای تنظیم کننده فاکتورهای رونویسی SPL برنج در پاسخ به تنش خشکی

احسان محسنی‌فرد[۱]*، محمد فارسی[۲]، قاسم حسینی‌سالکده[۳]، امین میرشمسی کاخکی[۲] و مریم شهبازی[۴]

۱، دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ۲، استاد و استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ۳، دانشیار بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
۴، استادیار بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۹- تاریخ تصویب:۱۳۹۲/۱۲/۲۳)

Differential Expression of Rice miRNAs Involved in Regulation of SPL Transcription Factors in Response to Drought Stress

E. MOHSENI FARD[1]*, M. FARSI[2], GH. HOSSEINI SALEKDEH[3], A. MIRSHAMSI KAKHKI[2] AND M. SHAHBAZI[4]

1, Ph.D. Student, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. 2, Professor and Assistant Professor, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. 3, Associate Professor, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran, 4, Assistant Professor, Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
(Received: Dec. 19, 2013 –Accepted: Mar. 14, 2014)

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) play important roles in numerous processes in plants including development, tissue proliferation, differentiation, hormone signaling and responses to biotic and abiotic stresses. SPL, the plant-specific transcription factors, are regulated by miRNAs and play important roles in several processes including tissue development, response to biotic and abiotic stress and induction of several other transcription factors and membrane proteins. In this study we selected miRNAs that regulate SPL transcription factors expression in rice. Later, the differential expression of these miRNAs are evaluated using qRT-PCR and Stem-loop primers. Results of shoot differential expression under drought stress showed that miR529 was down-regulated but conversely, miR535 was up-regulated. However, significant differential expression of miR156 was not observed in our study. Likewise, root differential expression under drought condition showed up-regulation of miR535, but miR529 and miR156 did not show any significant differential expression. Although all of these miRNAs are involved in regulating the expression of the same genes, but their diverse differential expressions highlight the complexity of gene-regulatory networks in various environmental conditions. Based on results of this study, it can be suggested that compared to miR535, miR156 and miR529 play more important roles in regulating the development and flowering process via controlling SPL transcription factors whereas, miR535, miR529 and relatively lesser miR156 are responsible for SPL transcription factor regulation under stress.

Keywords: Rice, Drought stress, miRNA, qRT-PCR

چکیده

میکرو RNAها (miRNA) در بسیاری از فرایندهای مرتبط با تکثیر، رشد و نمو و پاسخ گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده نقش دارند. فاکتورهای رونویسی SPL که توسط miRNAها کنترل می‌شوند، اختصاصی گیاهان بوده و در بسیاری از فرایندهای مرتبط با نمو بافت، پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده و تحریک و فعال‌سازی سایر فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های غشایی نقش دارند. در این تحقیق miRNAهای کنترل‌کننده تنظیم بیان فاکتورهای رونویسی SPL در برنج مشخص شدند. سپس تغییر بیان این miRNAها با استفاده از روش qRT-PCR و آغازگرهای Stem-Loop مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که در اندام‌هوایی در شرایط خشکی نسبت به نرمال، بیان miR529 کاهش و بیان miR535 افزایش یافته است؛ اما تغیر بیان معنی‌داری برای miR156 مشاهده نشد. در ریشه نیز miR535 افزایش بیان نشان داد؛ اما، miR529 و miR156 تغییر بیان معنی‌داری را در ریشه نشان ندادند. با وجود اینکه هر سه این miRNAها در کنترل ژن‌های یکسانی نقش دارند، واکنش متفاوت آن‌ها در مواجهه با تنش خشکی نشان‌دهنده گستردگی شبکه‌های تنظیمی گیاه در برابر تغییر شرایط محیطی است. با توجه به نتایج می‌توان این گونه بیان کرد که miR156 و miR529 نسبت به miR535 نقش مهم‌تری را در تنظیم فرایندهای نموی و گلدهی با کنترل فاکتورهای رونویسی SPL دارند؛ در صورتی‌که miR535 و miR529 و به نسبت کمتر miR156 مسئول تنظیم بیان فاکتورهای رونویسی SPL در برابر تنش می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: برنج، تنش خشکی، miRNA، qRT-PCR

* نویسنده مسئول: احسان محسنی‌فرد
E-mail: ehsanmohsenifard@stu.um.ac.ir

مقدمه

miRNAها مولکول‌های RNA کوچک تک‌رشته‌ای غیر کدکننده و تنظیمی هستند که طولی بین ۱۹ تا ۲۴ داشته و نقش مهمی را در تنظیم بیان‌ژن در یوکاریوت‌ها از طریق تجزیه mRNA یا ممانعت از ترجمه آن ایفا می‌کنند (Baulcombe, 2004). miRNAها مانند ژن‌های کدکننده پروتئین توسط RNA پلی‌مراز II[1] رونوشت‌برداری می‌شوند (Lee *et al*., 2004). رونوشت RNA تک‌رشته‌ای در ابتدا ساختار ساقه-حلقه‌ای را شکل می‌دهد که پس از دو مرحله برش در ناحیه ساقه توسط آنزیم DCL1[2]، تولید مولکول دورشته‌ای کوچکی با انتهای ´۳ آزاد می‌کند که با عنوان miRNA/miRNA* شناخته می‌شود (Flynt and Lai, 2008). سپس این مولکول کوچک دورشته‌ای درون مجموعه‌ای از پروتئین‌ها با عنوان مجموعه خاموشی القاءشونده توسط RNA (RISC)[3]، وارد شده و رشته اصلی که miRNA است و از این مرحله miRNA بالغ[4] نامیده می‌شود درون پروتئینی به نام آرگونات[5] که عضو اصلی این مجموعه است قرار می‌گیرد و رشته مقابل حذف می‌شود (Vaucheret, 2008). مجموعه خاموشی در این لحظه قابلیت شناسایی ژن هدف را داشته و براساس مکمل‌بودن بازها میان miRNA و ژن هدف به آن متصل شده و عمل تجزیه mRNA یا ممانعت از ترجمه انجام می‌شود (Bartel, 2005).

فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA هستند که تنظیم بیان‌ژن را در سطح رونوشت‌برداری mRNA تنظیم می‌کنند. یکی از فاکتورهای رونویسی اختصاصی گیاهان SPL[6]ها می‌باشند که حاوی دومین حفاظت شده SBP بوده و در بسیاری از فرایندها مانند نمو بافت، پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده و تحریک و فعال‌سازی سایر فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های غشایی نقش دارند (Liu Chen *et al*., 2010; *et al*., 2008; Wang *et al*., 2009). بسیاری از فاکتورهای رونویسی گیاهان از جمله فاکتورهای رونویسی SPL توسط miRNAها کنترل می‌شوند (Jones-Rhoades, 2011). miRNAها نقش مهمی را در رشد، نمو و پاسخ به محرک‌های محیطی زنده و غیرزنده ایفا می‌کنند (Ehya *et al*., 2013; Khraiwesh *et al*., 2012). تلاش‌های بسیاری در طی سال‌ها منجر به شناسایی هزاران ژن شده که در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند و امروزه مشخص شده که برخی از این ژن‌ها توسط miRNAها کنترل می‌شوند (Jung *et al*., 2009). ژن‌های هدف شناسایی‌شده شامل ژن‌های دخیل در بسیاری از فرایندهای نموی گیاه نظیر تکثیر سلولی، نمو برگ و گل، گلدهی و همچنین پاسخ گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شوند (Jung *et al*., Archak and Nagaraju, 2007; 2009; Phillips *et al*., 2007; Sunkar *et al*., 2007). در مطالعه‌ای که توسط Zhu *et al*., (۲۰۰۸) بر روی برنج به منظور بررسی بیان miRNAها در طی نمو بذر در دو مرحله ۵-۱ و ۱۰-۶ روز بعد از گرده‌افشانی انجام شد، دو miRNA در مرحله ۵-۱ و چهار miRNA در مرحله ۱۰-۶ افزایش بیان نشان دادند (Zhu *et al*., 2008). همچنین تعداد ۲۹ miRNA جدید در بررسی miRNAهای دخیل در طی جوانه‌زنی بذر برنج شناسایی شدند که در اکثر موارد افزایش بیان اینها با کاهش بیان ژن‌های هدف‌شان همراه بود (Xue *et al*., 2009). miRNAهای گیاهچه‌های برنج در دو شرایط نرمال و تیمار با H_2O_2 مورد بررسی قرار گرفتند و هفت miRNA در شرایط تیمار H_2O_2 تغییر بیان نشان دادند. با بررسی ژن‌های هدف این miRNAها مشخص شد که این ژن‌ها در پاسخ‌های سلولی و فرایندهای متابولیکی شامل تنظیم رونوشت‌برداری، انتقال مواد غذایی، تکثیر سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش دارند (Li *et al*., 2011). در بررسی که بر روی گندم به منظور شناسایی miRNAهای دخیل در پاسخ به تنش گرما انجام شد، یک miRNA افزایش بیان و هشت miRNA کاهش بیان نشان دادند (Xin *et al*., 2010). با توجه به گزارش‌های موجود بیان miRNAها نه تنها در شرایط مختلف بلکه در گیاهان مختلف نیز متفاوت است (Kantar *et al*., 2011; Kong *et al*., 2010; Li *et al*., 2008; Lu *et al*., 2011; Trindade *et al*., 2010; Wang *et al*., 2011; Zhao *et al*., 2007a)؛ بنابراین لزوم بررسی تغییر بیان miRNAها برای هر گیاه در شرایط مختلف به‌صورت جداگانه ضروری است. تنش خشکی یکی از مهمترین عوامل کاهنده عملکرد می‌باشد و کشور ایران از جمله کشورهایی است که قسمت عظیمی از وسعت آن از لحاظ وضعیت آب و هوایی، خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌شود (Ganjeali *et al*., 2011). امروزه تلاش‌های بسیاری به‌منظور شناسایی و استفاده از miRNAها در تنظیم بیان‌ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی انجام شده است (Sunkar *et al*., 2007). با توسعه تکنیک-های نوین توالی‌یابی، miRNAهای زیادی در برنج شناسایی شده‌اند (Sunkar *et al*., 2008). با این وجود تاکنون همه miRNAهای مؤثر در کنترل ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش، مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. یکی از مهمترین راه‌های شناسایی

1. RNA polymerase II
2. Dicer-Like 1
3. RNA Induced Silencing Complex
4. Mature miRNA
5. Argonaute
6. Squamosa Promoter binding protein–Like

ژن‌های هدف miRNAها استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک براساس مکمل‌بودن miRNAها و مکان اتصال آن‌ها در ژن‌های هدف می‌باشد. miRNAهای گیاهان برخلاف جانوری معمولاً درجه مکمل‌بودن بالایی را با ژن‌های هدف خود نشان می‌دهند و به همین دلیل، شناسایی ژن‌های هدف در گیاهان نسبت به جانوران از دقت و صحت بالاتری برخوردار است (Jones-Rhoades and Bartel, 2004). miR156، miR529 و miR535 تنظیم ۱۲ ژن کدکننده فاکتورهای رونویسی SPL را در بافت‌های مختلف گیاه برنج به عهده دارند و پس از شناسایی و اتصال به mRNA ژن‌های SPL به‌عنوان هدف، موجب برش، تجزیه و در نهایت کاهش سطح mRNA این ژن‌ها می‌شوند (Jeong *et al*., 2011). در این مطالعه به منظور بررسی تشابه یا تفاوت در بیان miRNAهای کنترل کننده یک گروه خاص از فاکتورهای رونویسی در پاسخ به تنش، تغییر بیان miR156، miR529 و miR535 که در تنظیم ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی SPL نقش دارند، با مقایسه شرایط نرمال و تنش خشکی اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار

در این مطالعه از ژنوتیپ IR64، تهیه شده از مؤسسه بین‌المللی برنج[1] استفاده شد. بذور برنج پس از ضدعفونی سطحی به‌مدت ۳ روز در دمای ۳۰°C روی کاغذ صافی مرطوب درون پتری‌دیش جوانه‌دار شده و سپس به محیط کشت هیدروپونیک حاوی محلول یوشیدا منتقل شدند (Yoshida *et al*., 1971). محلول غذایی هر هفته تعویض شده و pH محلول روزانه اندازه‌گیری و در محدوده ۵/۵–۵ تنظیم شد. شرایط نوری به‌صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۷°C اعمال شد. پس از دو هفته گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی دو قسمت خاک رس و یک قسمت ماسه منتقل شدند و به‌مدت دو هفته همه گلدان‌ها به‌صورت کامل آبیاری شدند. سپس در تیمار خشکی آبیاری به‌مدت دو هفته متوقف شد و در این زمان در تیمار شاهد آبیاری به‌صورت عادی انجام گردید. بعد از دو هفته نمونه‌گیری از اندام‌هوایی و ریشه تیمار شاهد و تنش انجام و نمونه‌ها برای نگهداری بلافاصله به دمای ۸۰°C– منتقل شدند.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

توالی miRNAهای بالغ برنج و سایر گیاهان از پایگاه اطلاعاتی miRBase (http://www.mirbase.org/) گرفته شد. پایگاه آنلاین شناسایی ژن‌های هدف miRNAها (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget) به‌منظور شناسایی ژن‌های هدف بالقوه برای miRNAهای بالغ برنج استفاده شد و سپس ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای miRNAها از نظر اونتولوژی[2] مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین وجود و عدم وجود miRNAهای مورد بررسی در سایر گیاهان بررسی شد. در ادامه توالی نسخه کامل mRNA مربوط به ژن‌های SPL از پایگاه اطلاعاتی ژنوم برنج گرفته شد و نواحی کدکننده پروتئین و نواحی غیرترجمه شونده (UTR[3]) در دو سمت ناحیه کدکننده مشخص شدند. توالی پروتئین‌های SPL از پایگاه اطلاعاتی UniProt گرفته شد و دومین SBP موجود در هر پروتئین با استفاده از پایگاه PROSITE شناسایی و ناحیه متناظر کدکننده آن در توالی mRNA مشخص شد.

واکنش Real-time PCR کمی[4] و بررسی بیان miRNAها

برای انجام qRT-PCR، نمونه‌های هر تیمار در ازت مایع کوبیده شده و حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از آن به‌منظور استخراج RNA با استفاده از ترایزول[5] (Invitrogen, CA, USA) مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت، استخراج گردید. به‌منظور حذف هر گونه باقی‌مانده DNA نمونه‌های RNA استخراج‌شده با آنزیم دی‌اکسی ریبونوکلئاز I[6] (Invitrogen, CA, USA) مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت تیمار شدند. بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ ND-1000 (Nanodrop technologies, W ilmington, DE, USA) انجام شد. آغازگرهای اختصاصی Stem-Loop به‌منظور تولید cDNA و آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر در qRT-PCR برای هر miRNA مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط Chen *et al*., (۲۰۰۵) و Varkonyi *et al*., (۲۰۰۷) طراحی گردید (جدول۱) (Varkonyi-Gasic *et* Chen *et al*., 2005; 2007). فرایند سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای Stem-Loop با استفاده از کیت SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) مطابق با دستورالعمل ارائه شده انجام شد (Varkonyi-Gasic *et al*., 2007). واکنش qRT-PCR با استفاده از iQ SYBR

1. International Rice Research Institute (IRRI)

2. Ontology
3. Untranslated Region
4. Quantitative Reverse Transcriptase PCR (qRT-PCR)
5. Trizol
6. DeoxyribonucleaseI

Green Supermix (Bio-Rad) و دستگاه Bio-Rad System (MyiQ ™ Single-Color) (سه تکرار برای هر تیمار و سه تکرار تکنیکال برای هر تکرار) انجام شد. واکنش qRT-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در هر واکنش ۵۰ نانوگرم از cDNA و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت اختصاصی هر ژن استفاده شد. داده‌های حاصل از qRT-PCR با استفاده از روش $۲^{-\Delta\Delta ct}$ تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱- لیست آغازگرهای مورد استفاده برای miRNAهای مورد بررسی

miRNA	Stem-loop RT PCR primer	Forward primer	Reverses primer
miR156	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTGCT 3'	5' GCAGTGACAGAAGAGAGTG 3'	5'GTGCAGGGTCCGAGGT 3'
MiR529	5'GGTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAGCTG 3'	5' GGACCAGAAGAGAGAGAGTA 3'	5'GTGCAGGGTCCGAGGT 3'
miR535	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCGTGC 3'	5' GCAGTGACAACGAGAGAGA 3'	5'GTGCAGGGTCCGAGGT 3'
18s rRNA		5´CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA3´	5´ACACTTCACCGGACCATTCAA3´

همچنین از 18S rRNA به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد (Jain *et al*., 2006). میزان تغییر بیان miRNAها در شرایط خشکی نسبت به شاهد در سطح معنی‌داری ۵٪ و حداقل دو برابر افزایش یا کاهش بررسی شد.

نتایج و بحث

بررسی miRNAهای کنترل‌کننده ژن‌های فاکتور رونویسی SPL

با توجه به اینکه دائماً miRNAهای جدیدی برای هر گونه گیاهی شناسایی می‌شوند و هر کدام از این miRNAها می‌تواند ژن‌های هدف خاص خود را داشته باشند، در ابتدا به‌منظور بررسی وجود miRNA دیگری (غیر از miRNAهای معرفی شده قبلی) در گیاه برنج که بتواند ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی SPL را در این گیاه به‌عنوان ژن هدف شناسایی کند، تمامی miRNAهای بالغ برنج از آخرین نسخه پایگاه اطلاعاتی miRBase گرفته شد و ژن‌های هدف بالقوه آن‌ها با استفاده از پایگاه psRNATarget شناسایی شدند. با وجود بررسی تمام miRNAهای شناسایی شده در گیاه برنج، تنها miRNAهای شناخته‌شده قبلی شامل miR156، miR529 و miR535 در تنظیم بیان ژن‌های فاکتور رونویسی SPL نقش خود را ایفا می‌کنند و هیچ miRNAهای دیگری قابلیت شناسایی این ژن‌ها را به‌عنوان هدف ندارد. miR156 یکی از حفاظت‌شده‌ترین miRNAهای گیاهی می‌باشد و تاکنون در ۳۹ گونه گیاهی شناسایی شده است. این miRNA در کنترل برخی از ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی به‌نام SPLها نقش دارد و در برخی مطالعات مرتبط با تنش‌های محیطی تغییر بیان آن گزارش شده است (Li *et al*., Ding *et al*., 2009; 2011; Liu *et al*., 2008; Xie *et al*., 2006). miR529 و miR535 نیز در کنترل برخی از اعضای ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی SPL با miR156 همکاری دارند (Jeong *et al*., 2011). miR529 علاوه بر برنج در ۷ گیاه تک‌لپه و دولپه دیگر نیز شناسایی شده و miRNA535 تاکنون در ۶ گیاه دو لپه شناسایی شده ولی تنها تک لپه‌ای که miRNA535 در آن مشاهد شده برنج می‌باشد (جدول ۲).

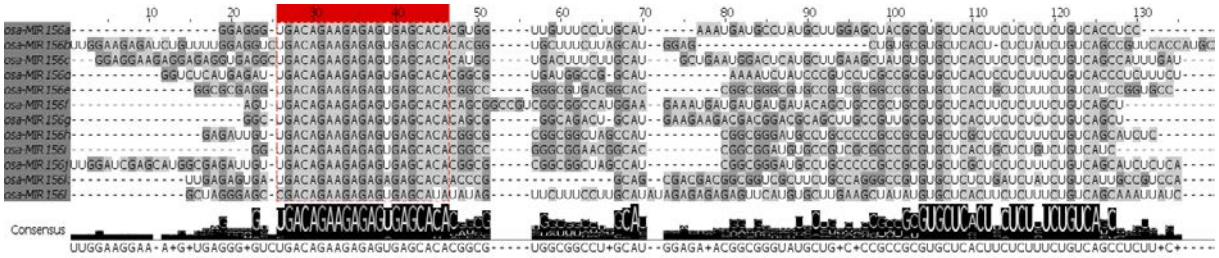
بررسی تغییر بیان miRNAها در پاسخ به تنش خشکی

در یک گیاه ممکن است چندین نسخه پارالوگ برای یک ژن miRNA وجود داشته باشد که تحت عنوان اعضای مختلف یک خانواده معرفی می‌شوند (Jones-Rhoades, 2011). ناحیه تشکیل دهنده miRNA بالغ معمولاً در همه اعضاء حفاظت‌شده است و بنابراین همه اعضای یک خانواده‌ها، علی‌رغم تنوع در قسمت عمده توالی خود، قابلیت تولید miRNAهای بالغ یکسان یا بسیار شبیه را دارا می‌باشند که ژن‌های هدف یکسانی را نیز به‌عنوان هدف شناسایی می‌کنند (Jones-Rhoades, 2011). با توجه به یکسانی و شباهت بسیار بالای توالی miRNA بالغ در همه اعضای خانواده miR156 و miR529 ، آغازگرهای طراحی‌شده امکان تکثیر miRNA بالغ تولیدشده توسط همه این اعضاء را دارا می‌باشد (شکل ۱).

بیان miRNA در شرایط مختلف توسط سه روش عمده

جدول ۲- بررسی حضور miR156، miR529 و miR535 در گونه‌های گیاهی

	monocotyledons							eudicotyledons																													
	Oryza sativa	Brachypodium distachyon	Zea mays	Sorghum bicolor	Saccharum ssp.	Triticum aestivum	Hordeum vulgare	Aquilegia caerulea	Bruguiera cylindrica	Festuca arundinacea	Bruguiera gymnorhiza	Malus domestica	Citrus sinensis	Ricinus communis	Theobroma cacao	Vitis vinifera	Arabidopsis lyrata	Arabidopsis thaliana	Arachis hypogaea	Brassica napus	Saccharum officinarum	Salvia sclarea	Solanum lycopersicum	Vigna unguiculata	Citrus trifoliata	Cucumis melo	Cynara cardunculus	Digitalis purpurea	Glycine max	Gossypium hirsutum	Helianthus annuus	Helianthus argophyllus	Helianthus ciliaris	Helianthus paradoxus	Helianthus tuberosus	Hevea brasiliensis	Medicago truncatula	Nicotiana tabacum	Populus trichocarpa
miR156	12	4	12	9	1	1	1	2	1	2	1	31	1	8	7	9	8	10	3	7	1	1	3	2	1	10	3	2	28	4	3	2	2	1	1	1	10	10	12
miR529	2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
miR535	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

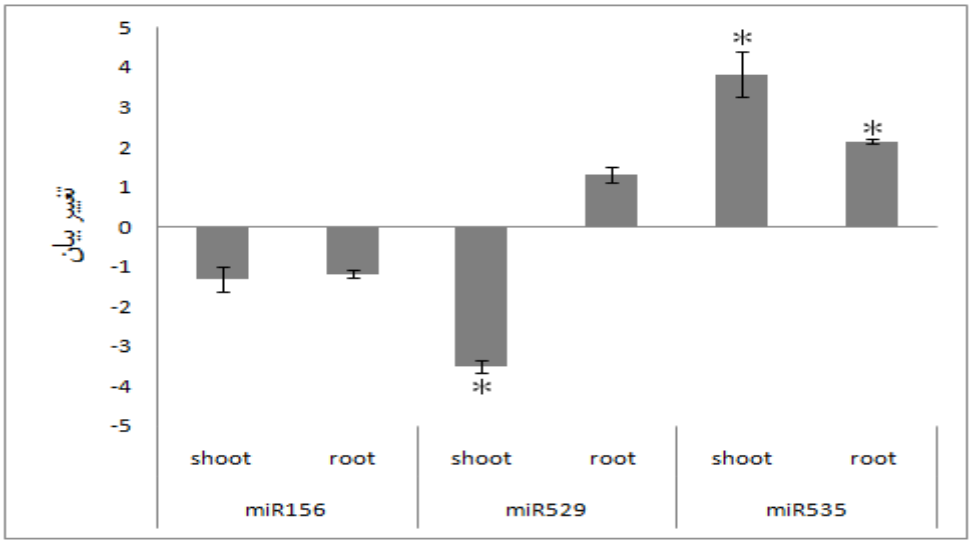


شکل ۱- هم‌ردیفی اعضای خانواده miR156 در برنج؛ ناحیه کدکننده miRNA بالغ با نوار تیره در بالای تصویر مشخص شده است.

(Microarray، qReal-Time PCR و Hightroughtput Sequencing) معمولاً بدون نیاز به ارزیابی بررسی بیان‌ژن هدف انجام می‌گیرد (Barrera-; Ehya *et al*., 2013; Huang Figueroa *et al*., 2012 *et al*., 2013; Hwang *et al*., 2011b; Jian *et al*., 2010; Li *et al*., 2009; Liu *et al*., 2008; Lv *et al*., 2010; Peng *et al*., 2011; Xu *et al*., 2010; Zhao *et al*., 2007b). همچنین صحت پیش‌بینی و تائید عملی ژن‌های فاکتورهای رونویسی SPL به‌عنوان ژن هدف miR156، miR529 و miR535 توسط Jeong و همکاران با استفاده از روش 5´ RNA ligase–mediated (RLM) RACE- گزارش شده و مشخص شده که این miRNAها از طریق برش و در نهایت تجزیه mRNA ژن‌های فاکتورهای رونویسی SPL، در کنترل این فاکتورهای رونویسی در برنج نقش دارند (Jeong *et al*., 2011) و بنابراین افزایش بیان miRNA موجب کاهش mRNA ژن هدف و کاهش بیان miRNA- که کاهش فرایند برش و تجزیه mRNA را در پی‌دارد- موجب افزایش mRNA ژن هدف می‌گردد.

با بررسی تغییر بیان miRNAها در شرایط خشکی نسبت به نرمال مشاهده شد که بیان miR529 در اندام‌هوایی کاهش یافته است ولی در ریشه تغییر بیان معنی‌داری را نشان نداد. بیان miR535 هم در اندام‌هوایی و هم در ریشه افزایش یافت اما تغییر بیان معنی‌داری برای miR156 در هیچ‌کدام از بافت‌های مورد بررسی مشاهده نشد (شکل ۲).

miR156 در برابر تنش اکسیداتیو نیز در برنج تغییر بیان معنی‌داری را نشان نداده بود (Li *et al*., 2011). همچنین در آرابیدوپسیس نیز در حضور مانیتول ۲۰۰ میلی‌مولار تغییر بیانی در miR156 مشاهده نشد، در صورتی که تنش شوری موجب افزایش بیان یک و نیم برابری miR156 شده بود (Liu *et al*., 2008). در سیب‌زمینی miR156 در برابر تنش کوتاه مدت ۱۵ درصد پلی‌اتیلن گلایکول در زمان‌های ۱و ۳ ساعت بعد از تنش کاهش بیان ولی ۶ ساعت بعد از آن افزایش بیان نشان داد (Hwang *et al*., 2011a). همچنین، miR156 در برابر تنش شوری در ذرت کاهش بیان اندکی نشان داده است (Ding *et al*., 2009). miR156 و miR529 در دوره



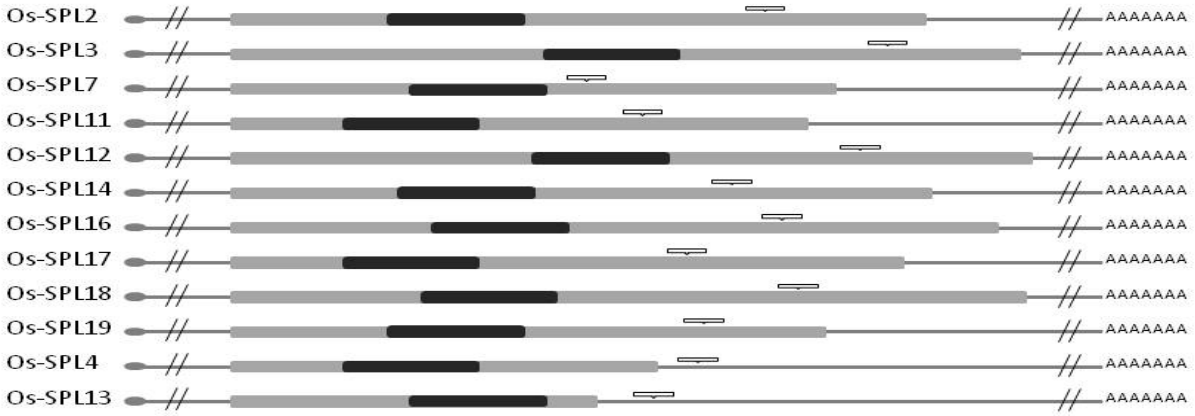
شکل ۲- تغییر بیان miRNAها در پاسخ به تنش خشکی

زایشی برنج درحالی‌که تا ۵ روز بعد از قطع آبیاری کاهش بیانی نشان نداده بودند، در روز ششم کاهش بیان نشان دادند. (Zhou *et al*., 2010). در مطالعه‌ای که بر روی برنج در مواجهه با تنش سرما انجام شد، miRNA535افزایش بیان تدریجی نشان داد (Lv *et al*., 2010). همچنین در مطالعه صورت گرفته بر روی برنج در شرایط نرمال نیز miR156، miR529 وmiR535 در ریشه، برگ و خوشه الگوی بیانی متفاوتی را نشان دادند. با وجود داشتن ژن‌های هدف مشابه برای miR156، miR529 و miR535، پاسخ متفاوت این miRNAها در مواجه با تنش‌ها و تنش خشکی اعمال شده در این تحقیق نشان از نحوه تنظیم متفاوت این miRNAها در برابر تنش و پیچیدگی شبکه‌های تنظیمی بیان‌ژن‌ها و همچنین کنترل افزایش یا کاهش بیان SPLهای مختلف از طریق این miRNAها در پاسخ به تنش خشکی می‌باشد.

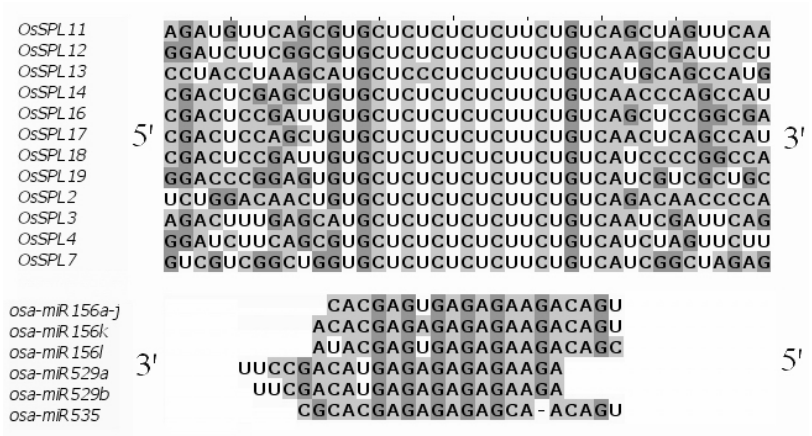
خصوصیات ژن‌های هدف miRNA های مورد بررسی

ژن‌های SPL به‌عنوان مهمترین ژن‌های کنترل‌شونده توسط miR156، miR529 وmiR535 معرفی شده‌اند (Wu *et al*., 2009; Xie *et al*., 2006; Sun, 2012). ژن‌های SPL از فاکتورهای رونویسی اختصاصی گیاهان هستند که در بسیاری از فرایندها مانند نمو بافت، پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده و تحریک و فعال‌سازی سایر فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های غشایی نقش دارند (Liu *et al*., Wang *et al*., 2009;2008). ویژگی ژن‌های SPL داشتن دومین SBP می‌باشد. این دومین یک دومین متصل‌شونده به DNA است که بسیار حفاظت‌شده می‌باشد و طول تقریبی معادل ۷۹ اسیدآمینه داشته و شامل یک موتیف انگشت روی با دو محل اتصال مجزا می‌باشد. این دومین قابلیت اتصال به توالی پالیندرومی GATC را دارد (Guo *et al*., 2008). مکان شناسایی‌شده به‌عنوان هدف بر روی توالی mRNA این ژن‌ها (به‌جز SPL4 و SPL13 که در ناحیه 3´UTR قرار دارد) در ناحیه کدکننده پروتئین و خارج از ناحیه کدکننده دومین SBP قرار دارد (شکل ۳ و ۴). وجود سایت شناسایی miR156، miR529 وmiR535 در اکثر ژن‌های SPL و حفاظت شدگی بالا در توالی نواحی اتصال نشان از نقش اساسی miRNAها در کنترل سطح mRNA این فاکتورهای رونویسی داشته و اهمیت تنظیم بیان‌ژن در سطح پس از رونوشت‌برداری در این ژن‌ها را نشان می‌دهد.

در گزارش Wang و همکاران (۲۰۰۹)، ۱۱۲ ژن آرابیدوپسیس که بیان آن‌ها با بیان فاکتورهای رونویسی SPL در پاسخ به طیف متنوعی از تغییرات و دوره‌های نموی همبستگی بالایی را نشان دادند، شناسایی گردید و بیان شد که فاکتورهای رونویسی SPL در نمو بافت‌های گیاهی، پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده و فعال‌سازی سایر فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های غشایی نقش دارند. همچنین مشخص شد که تعدادی از ژن‌های وابسته به فاکتورهای رونویسی SPL در پاسخ به تنش شوری، اکسیداتیو ،سرما و خشکی نقش دارند (Wang *et al*., 2009). همچنین در مطالعه انجام‌شده بر روی سیب مشخص شد که فاکتورهای رونویسی SPL تحت تأثیر اسیدسالیسیلیک، اسیدآبسیزیک و جیبرلین تغییر بیان معنی‌داری را نشان داده و عنوان شد که فاکتورهای رونویسی SPL در پاسخ به دامنه وسیعی از انتقال پیام هورمون‌های گیاهی، در مواجهه با تنش یا نمو گیاه درگیر هستند (Li *et al*., 2013). افزایش بیان miR156 در آرابیدوپسیس موجب افزایش دوره رویشی و تأخیر در گلدهی می‌شود؛ که این عمل



شکل ۳- توالی mRNA ژن‌های SPL در ناحیه کدکننده با رنگ خاکستری روشن و نواحی UTR با رنگ خاکستری روشن و نوار باریک نمایش داده شده‌اند. قسمتی از mRNA که کدکننده دومین SBP می‌باشد با رنگ سیاه و همچنین مکان هدف miRNAها بر روی این توالی با فلش مشخص شده است.



شکل ۴- هم‌ردیفی مکان هدف miR156، miR529 و miR535 بر روی mRNA ژن‌های SPL

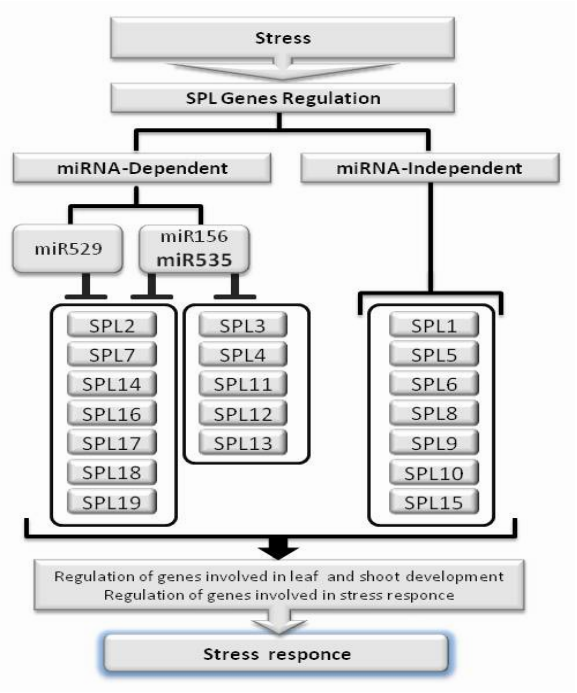
به‌واسطه کنترل فاکتورهای رونویسی SPL انجام می‌شود (Wu and Poethig, 2006). برخی از این ژن‌ها در مریستم انتهایی و گلدهی نقش خود را ایفا می‌کنند و نقش مثبتی در روند فاز زایشی دارند (Chen *et al*., 2010). در مطالعه انجام‌شده بر روی آرابیدوپسیس، مشخص شد که برخی از این ژن‌ها بیان پایدار داشته و برخی تنها در شرایط خاص بیان می‌شوند (Xie *et al*., 2006). miR156، miR529 وmiR535 در بافت‌های مختلف، دامنه عمل متفاوتی را نشان می‌دهند. مشخص شده که عمده کنترل ژن SPL3 در برگ و خوشه توسط miR156، عمده کنترل ژن SPL14 در برگ توسط miR156 وmiR529 و در نهایت عمده کنترل ژن SPL14 در خوشه توسط miR529 انجام می‌شود (Jeong *et al*., 2011). در آرابیدوپسیسSPL7 در تنظیم بیان بسیاری از ژن‌های دخیل در پاسخ به کمبود مس نقش داشته و موجب افزایش بیان این ژن‌ها در پاسخ به کمبود مس می‌شود. نکته مورد توجه افزایش بیان miR397، miR408 و miR857 توسط SPL7 می‌باشد که نشان‌دهنده نقش این فاکتور رونویسی علاوه بر کنترل ژن‌های کدکننده پروتئین در کنترل ژن‌های miRNA می‌باشد (Yamasaki *et al*., 2009). بنابراین وجود سایت شناسایی miR156، miR529 وmiR535 در mRNA اغلب فاکتورهای رونویسی SPL که در کنترل بسیاری از فرایندهای گیاه به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم نقش دارند، نشان‌دهنده نقش اساسی این miRNAها در کنترل سطح mRNA این فاکتورهای رونویسی و نهایت در تنظیم مراحل مختلف رشدی و پاسخ گیاه به شرایط مختلف محیطی می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

miRNAها به‌عنوان یکی از اجزای مهم شبکه‌های تنظیمی در گیاه عمل کرده و نقش خود را از طریق کنترل ژن‌های درگیر در این مسیرها ایفا می‌کنند (Sun, 2012).

مهمترین ژن‌های هدف شناسایی شده برای miRNAها فاکتورهای رونویسی می‌باشند، که خود در واکنش گیاه به تغییر شرایط رشدی و محیطی نقش کلیدی دارند (Jones-Rhoades, 2011). بسیاری از ژن‌های آرابیدوپسیس تحت تأثیر فاکتورهای رونویسی SPL بوده و تعدادی از این ژن‌ها در پاسخ به تنش شوری، اکسیداتیو، سرما و خشکی نقش دارند (Wang *et al*., 2009). همچنین فاکتورهای رونویسی SPL تحت تأثیر هورمون‌های گیاهی بوده و در پاسخ به دامنه وسیعی از انتقال پیام هورمون‌های گیاهی، در نمو گیاه یا مواجهه با تنش دخیل هستند (Li *et al*., 2013). miR156، miR529 وmiR535 با کنترل برخی از فاکتورهای رونویسی SPL، نقش خود را در مراحل مختلف رشدی و شرایط مختلف محیطی ایفا می‌کنند (Jeong *et al*., 2011).

تنظیم دقیق بیان فاکتورهای رونویسی SPL توسط miRNAها می‌تواند نقش مهمی را در تنظیم ژن‌های مرتبط با این فاکتورهای رونویسی داشته باشد. با وجود داشتن ژن‌های هدف مشابه برای miR156، miR529 و miR535، پاسخ متفاوت این miRNAها به تنش خشکی نشان از موازنه بیانی میان این miRNAها و همچنین کنترل افزایش یا کاهش بیان SPLهای مختلف از طریق miRNAها در پاسخ به تنش خشکی می‌باشد. با توجه به اینکه نقش عمده در نظر گرفته شده برای miR529 کنترل فرایندهای مرتبط با انتقال فاز گیاه از رویشی به زایشی می‌باشد، عدم تغییر بیان این miRNA در ریشه قابل توجیه است. بسیاری از miRNAها در فرایندهای خاصی نقش داشته و عموماً در زمان خاص، بافت خاص و یا در پاسخ به تغییر شرایط، بیان می‌شوند و یا تغییر بیان نشان می‌دهند (Axtell and Bowman, 2008). همچنین با توجه به عدم‌تغییر بیان معنی‌دارmiR156 هم در ریشه و هم در برگ و تغییر بیان miR535 در هردو بافت، شاید بتوان نقش اصلی کنترل برخی فاکتورهای رونویسی SPL را در شرایط خشکی به miR535 نسبت داد. اثر کنترلی متفاوتی برای miRNA156 بر روی ژن‌های مختلف SPL گزارش شده و SPL12 و SPL7 به میزان مختلفی در بافت خوشه و برگ تحت تأثیر miR156 قرار می‌گیرند (Xie *et al*., 2006). این نوع کنترل متفاوت در مورد سایر miRNAها نیز گزارش است (Xie *et al*., 2006). با توجه به مطالعات قبلی صورت‌گرفته بر روی miR156 و miR529و با مشاهده پاسخ miR156 و miR529 در برابر تنش خشکی اعمال شده در این مطالعه می‌توان این گونه بیان کرد که miR156 و miR529 نسبت به miR535 نقش مهم‌تری را در تنظیم فرایندهای نموی و گلدهی با کنترل فاکتورهای رونویسی SPL بازی می‌کنند، در صورتی‌که miR535، miR529 و به نسبت کمتر miR156 مسئول تنظیم بیان فاکتورهای رونویسیSPL در برابر تنش می‌باشند. همچنین برخلافmiR156 که در اکثر گونه‌های گیاهی مورد بررسی شناسایی‌شده، miR535 و miR529 به‌جز در برنج در تعداد معدودی از گیاهان شناسایی شده‌اند و تنها در گیاهانی شناسایی شده‌اند که miR156 نیز در آن‌ها دیده می‌شود. بنابراین می‌توان مکانیسم کنترل بیان فاکتورهای رونویسیSPL توسط miR535 و miR529 را نشانه گسترش شبکه تنظیمی ژن در این گیاهان دانست. با توجه به نقش گسترده فاکتورهای رونویسی SPL در فرایندهای مختلف گیاهی مانند نمو برگ، نمو ساقه، گلدهی و باروری، تنظیم بیان آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها به‌صورت مستقل یا وابسته به miRNAها، نقش مهمی را در پاسخ گیاه به این تنش‌ها بازی می‌کند (شکل ۵).



شکل ۵- نحوه تنظیم فاکتورهای رونویسی SPL در پاسخ به تنش خشکی

در نهایت بیان متفاوت و مستقل miRNAهایی که در کنترل ژن‌های هدف مشابه نقش دارند، می‌تواند باعث افزایش پویایی و انعطاف‌پذیری شبکه تنظیمی ژن‌ها شده و آزادی عمل بیشتری را در نحوه پاسخ مناسب به تغییر شرایط موجب شود.

در این مطالعه برای اولین بار به بررسی هم‌زمان miRNA156، miRNA529 و miRNA535 کنترل‌کننده فاکتورهای رونویسی SPL برنج در مواجهه با تنش خشکی در اندام‌هوایی و ریشه پرداخته شد. هرچند از ۱۹ ژن فاکتور

رونویسی SPL برنج، ۱۲ ژن توسط miRNAها کنترل می‌شوند، ولی چگونگی کنترل سایر فاکتورهای رونویسی SPL که مستقل از miRNAها تنظیم می‌شوند، در پاسخ به تنش خشکی نیازمند بررسی می‌باشد (شکل ۵). از آنجا که امروزه استفاده از miRNAها به‌منظور دست‌ورزی بیان ژن‌های موردنظر با استفاده از روش‌های مختلف فراهم می‌باشد، این مطالعه می‌تواند آغازی بر امکان دست‌ورزی بیان فاکتورهای رونویسی SPL به‌وسیله miRNA در جهت افزایش مقاومت به تنش خشکی در برنج باشد. با وجود بررسی بیان این miRNAها در پاسخ به تنش خشکی مطالعات تکمیلی در رابطه با سایر تنش‌ها مانند شوری، سرما و تنش حرارتی که می‌توانند دید وسیع‌تری را نسبت به نقش این miRNAها در کنترل و تنظیم فاکتورهای رونویسی SPL موجب شوند، توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد که امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم کرده‌اند سپاسگزاری می‌نمایند.

REFERENCES

Archak S, Nagaraju J (2007) Computational Prediction of Rice (*Oryza sativa*) miRNA Targets. Genomics Proteomics Bioinformatics 5: 196-206.

Axtell MJ, Bowman JL (2008) Evolution of plant microRNAs and their targets. Trends Plant Sci. 13: 343-349.

Barrera–Figueroa BE, Gao L, Wu Z, Zhou X, Zhu J, Jin H, Liu R, Zhu JK (2012) High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress-regulated microRNAs in the inflorescences of rice. BMC Plant Biology 12: 132.

Bartel DP (2005) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116: 281-297.

Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. Nature. 431: 356-363.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. Nucleic Acids Res. 33: 179-182.

Chen X, Zhang Z, Liu D, Zhang K, Li A, Mao L (2010) SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like Transcription Factors: Star Players for Plant Growth and Development. J. Integr. Plant Biol. 52: 946-951.

Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z, Zheng Y (2009) Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. Ann. Bot. 103: 29-38.

Ehya F, Monavarfeshani A, Fard EM, Farsad LK, Nekouei MK, Mardi M, Salekdeh GH (2013) Phytoplasma-Responsive microRNAs Modulate Hormonal, Nutritional, and Stress Signalling Pathways in Mexican Lime Trees. PLOS ONE 8: e66372.

Flynt AS, Lai EC (2008) Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. Nat. Rev. Genet. 90: 842-831.

Ganjeali A, Porsa H, Bagheri A (2011) Assessment of Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasms for drought tolerance. Agr. Water Manage. 98: 1477-1484.

Guo AY, Zhu Q-H, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J (2008) Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. Gene, 418: 1-8.

Huang D, Koh C, Feurtado JA, Tsang EW, Cutler AJ (2013) MicroRNAs and their putative targets in *Brassica napus* seed maturation. BMC Genomics, 14: 140.

Hwang E-W ,Shin S-J, Kwon H-B (2011a) Identification of microRNAs and their putative targets that respond to drought stress in *Solanum tuberosum*. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 54: 317-324.

Hwang EW, Shin S-J, Park SC, Jeong MJ, Kwon HB (2011b) Identification of miR172 family members and their putative targets responding to drought stress in *Solanum tuberosum*. Genes and Genomics 33: 105-110.

Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochem. Biophys. Res. Commun.

345: 646-651.

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: 4185-4207.

Jian X, Zhang L, Li G, Zhang L, Wang X, Cao X, Fang X, Chen F (2010) Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. Genomics, 95: 47-55.

Jones–Rhoades MW (2011) Conservation and divergence in plant microRNAs. Plant Mol. Biol. 1-14.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Mol. Cell, 14: 787-799.

Jung JH, Seo PJ, Park CM (2009) MicroRNA biogenesis and function in higher plants. Plant Biotechnol. Rep. 3: 111-126.

Kantar M, Lucas SJ, Budak H (2011) miRNA expression patterns of Triticum dicoccoides in response to shock drought stress. Planta. 233: 471-484.

Khraiwesh B, Zhu J-K, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. Biochim. Biophys. Acta, 1819: 137-148.

Kong YM, Elling AA, Chen B, Deng XW (2010) Differential expression of microRNAs in maize inbred and hybrid lines during salt and drought stress. Am J Plant Sci. 1: 69-76.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J. 23: 4051-4060.

Li D, Zheng Y, Wan L, Zhu X, Wang Z (2009) Differentially expressed microRNAs during solid endosperm development in coconut (*Cocos nucifera* L.). Scientia Horticulturae 122: 666-669.

Li J, Hou H, Li X, Xiang J, Yin X, Gao H, Zheng Y, Bassett CL, Wang X (2013) Genome-wide identification and analysis of the SBP-box family genes in apple (*Malus× domestica* Borkh.). Plant Physiol. Biochem. 70: 100-114.

Li T, Li H, Zhang YX, Liu JY (2011) Identification and analysis of seven H2O2-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). Nucleic Acids Res. 39: 2821-2833.

Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK (2008) The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. Plant Cell 20: 2238-2251.

Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. RNA 14: 836-843.

Lu W, Li J, Liu F, Gu J, Guo C, Xu L, Zhang H, Xiao K (2011) Expression pattern of wheat miRNAs under salinity stress and prediction of salt-inducible miRNAs targets. Front. Agric. China, 5: 413-422.

Lv DK, Bai X, Li Y, Ding XD, Ge Y, Cai H, Ji W, Wu N, Zhu YM (2010) Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. Gene, 459: 39-47.

Peng T, Lv Q, Zhang J, Li J, Du Y, Zhao Q (2011) Differential expression of the microRNAs in superior and inferior spikelets in rice (*Oryza sativa*). J. Experimental Botany 62: 4943-4954.

Phillips JR, Dalmay T, Bartels D (2007) The role of small RNAs in abiotic stress. FEBS lett. 581: 3592-3597.

Sun G (2012) MicroRNAs and their diverse functions in plants. Plant Mol. Biol. 80: 17-36.

Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. Trends Plant Sci. 12: 301-309.

Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, Zhang W, Zhu J-K (2008) Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. BMC Plant Biol. 8: 25.

Trindade I, Capitão C, Dalmay T, Fevereiro MP, Dos Santos DM (2010) miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. Planta. 231: 705-716.

Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly

sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant methods 3: 12.

Vaucheret H (2008) Plant Argonautes. Trends Plant Sci. 13: 350-358.

Wang T, Chen L, Zhao M, Tian Q, Zhang WH (2011) Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. BMC Genomics 12: 367.

Wang Y, Hu Z, Yang Y, Chen X, Chen G (2009) Function annotation of an SBP-box gene in *Arabidopsis* based on analysis of co-expression networks and promoters. Int. J. Mol. Sci. 10: 116-132.

Wu G, Poethig RS (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. Development 133: 3539-3547.

Wu L, Zhang Q, Zhou H, Ni F, Wu X, Qi Y (2009) Rice MicroRNA effector complexes and targets. Plant Cell, 21: 3421-3435.

Xie K, Wu C, Xiong L (2006) Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. Plant Physiol. 142: 280-293.

Xin M, Wang Y, Yao Y, Xie C, Peng H, Ni Z, Sun Q (2010) Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC Plant Biol. 10: 123.

Xu C, Yang RF, Li WC, Fu FL (2010) Identification of 21 microRNAs in maize and their differential expression under drought stress. African J. Biotech. 9: 4741-4753. doi:10.5897/ AJB10.497.

Xue LJ, Zhang JJ, Xue HW (2009) Characterization and expression profiles of miRNAs in rice seeds. Nucleic Acids Res. 37: 916-930.

Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T (2009) SQUAMOSA promoter binding protein–like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. Plant Cell 21: 347-361.

Yoshida S, Forno DA, Cock J (1971) Laboratory manual for physiological studies of rice. Int. Rice Res. Inst.

Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y (2007a) Identification of drought-induced microRNAs in rice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 354: 585-590.

Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H ,Lin H, Ruan K, Jin Y (2007b) Identification of drought-induced microRNAs in rice. Biochemical and Biophysical Research Communications 354: 585-590.

Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, Luo L (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. J. Exp. Bot. 61: 4157-4168.

Zhu Q-H, Spriggs A, Matthew L, Fan L, Kennedy G, Gubler F, Helliwell C (2008) A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. Genome Res. 18: 1456-1465.