



Bitki MikroRNA'ları: Biyogenez, Köken ve Evrimi

Dilek KOPTEKİN¹

Lale Yıldız AKTAŞ^{1*}

¹ Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 35100 Bornova-İzmir, Türkiye

*Sorumlu Yazar:

E-posta: lale.yildiz@ege.edu.tr

Geliş Tarihi: 01 Aralık 2013

Kabul Tarihi: 31 Aralık 2013

Özet

MikroRNA (miRNA)'lar ökaryotik hücrelerde bulunan, endojen, kodlama yapmayan kısa RNA'lardır. Hemen hemen tüm bitkilerde tanımlanmış olan işlevsel miRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olup, mRNA yıkımını yönlendirerek veya translasyonu baskılayarak; bitki büyümesi, gelişmesi ve strese verilen cevaplarda önemli rol oynar. Bitki genomunda yer alan miRNA'ların kökeni ve evrimi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yeni nesil sekanslama gibi yüksek verimli (high-throughput) araçların kullanılmaya başlamasıyla son on yılda tanımlanan miRNA'ların sayısı ve evrimsel değişimleriyle ilgili bilgilerimiz önemli derecede artış göstermiştir. Atasal transkripsiyon faktörlerini düzenleyen miRNA'ların bitki familyaları arasında korunduğunu ortaya koyan çalışmalar, miRNA'ların ortak bir kökeni olduğuna işaret etmektedir. Korunmuş miRNA'ların aksine herhangi bir bitki türünde ifade edilen, filogenetik olarak kısıtlı bir dağılım gösteren ve evrimsel olarak daha genç olduğu düşünülen, çok sayıda korunmamış miRNA da bulunmaktadır. Bitkilerde korunmuş miRNA'ların, belli bir türe ya da soya özgü korunmamış miRNA'lardan sayıca çok daha fazla olduğu ve tıpkı korunmuş miRNA'lar gibi bu genç miRNA'ların da çok sayıda biyolojik sürecin düzenlenmesinde yer aldığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Bu derleme, evrimsel bir bakış açısıyla bitki miRNA'larının korunumu ve farklılaşmasını özetlemeyi amaçlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bitki, mikroRNA, evrim, köken, post transkripsiyonel düzenleme

Plant MicroRNAs: Biogenesis, Origin and Evolution

Abstract

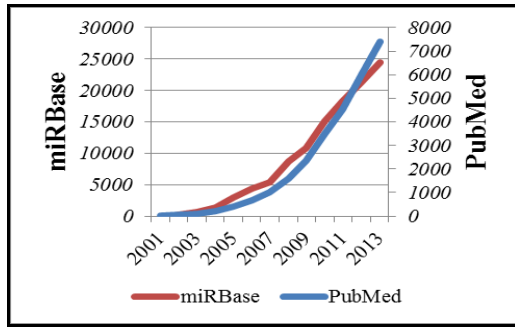
MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous, non-coding, short RNAs found in eukaryotic cells. Mature miRNA is an around 22 nucleotides (nt) long and they are identified in nearly all plants where they play important roles in growth, development and stress responses by guiding mRNA cleavage or by repressing translation. However, only limited studies are existent about origin and evolution of miRNAs in plant genomes. In recent years, high throughput discovery tools such as next-generation sequencing significantly increased the number of known miRNAs and their evolutionary changes in different organisms. To date, many data demonstrate that subsets of miRNA families, which regulate ancestral transcription factors, are conserved between plant families, indicating their very ancient origin. In contrast, multiple non-conserved miRNAs expressed by any given plant species have a limited phylogenetic distribution, suggesting they are evolutionary young miRNAs. Several studies have shown that plants non-conserved miRNAs already largely outnumber their conserved counterparts and plants use highly conserved as well as young, lineage specific miRNAs to regulate numerous biological processes. The aim of this review is to summarize the conservation and divergence in plant miRNAs in evolutionary perspectives.

Keywords: Plant, microRNA, evolution, origin, post transcriptional regulation

GİRİŞ

1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'da "lin-4" isimli küçük, protein kodlamayan RNA'nın lin-14 geninin 3' translasyonu olmayan bölgesine (3'UTR) bağlanarak, gen ifadesini düzenlediği keşfedilmiştir [1,2]. İlk miRNA olarak bilinen lin-4'ün keşfinden yedi yıl sonra, 2000 yılında yine *C.elegans*'ta bulunan let-7'nin [3], sineklerden insanlara kadar birçok türde korunmuş olduğunun bulunmasıyla [4] bu küçük RNA'lara verilen önem artmış ve 2001 yılından itibaren küçük ve protein kodlamayan bu transkriptler "mikroRNA" olarak adlandırılmaya başlanmıştır [5].

İlk bitki miRNA'ları ise ancak 2002 yılında keşfedilmiştir [6]. Bugüne kadar bitkilerden hayvanlara, birçok ökaryotik canlıda binlerce miRNA keşfedilmiş ve çevrimiçi miRNA veri bankaları oluşturulmuştur [7]. 2001 yılından beri miRNA'larla ilgili yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Kamuya açık miRNA veritabanı olan miRBase'in (Sürüm 20, Haziran 2013) verilerine göre; toplamda 206 türe ait 24521 öncül miRNA ve 30424 işlevsel miRNA keşfedilmiş, veritabanına yüklenmiştir. Bunlardan 6100 öncül miRNA ve 7300 işlevsel miRNA 71 bitki türünde tanımlanmış olan miRNA'lardır (Şekil 1) (<http://www.mirbase.org/>).



Şekil 1. mikroRNA ile ilgili yapılan yayınların yıllara göre dağılımı (mavi) (Pubmed.com'dan Aralık-2013'te alınan verilerle oluşturulmuştur). miRBase veri bankasına yüklenmiş miRNA sayılarının yıllara göre dağılımı (kırmızı) (miRBase.org).

miRNA'lar bitki ve hayvanlardaki gen ifadesinin önemli genetik düzenleyicileri olarak tanımlanmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, bitki miRNA'larının doku farklılaşmasının ve gelişiminin kontrolünde, sinyal iletiminde, abiyotik (su kıtlığı, kuraklık, tuzluluk vb.) ve biyotik (patojenler) stres gibi çevresel etmenlere verilen cevaplarda rol oynadığını gösteren birçok kanıt ortaya koymuştur [8, 9, 10].

Bitki miRNA'ları transkripsiyonel/transyonel baskılamaya sürecinde gen ifadesini düzenleme işlevini [11, 12]; fitohormonlarla etkileşim [13, 14, 15, 16], miRNA'ların biyogenezini kontrol etme [17] ya da ta-siRNA'ların (trans-acting small interfering RNAs) biyogenezini kapsayan [18] çeşitli yollar izleyerek gerçekleştirebilir [19].

Hayvan miRNA'larının çoğu, intron veya kodlama mesajlarının translasyonu gerçekleşmeyen bölgelerinden ya da primer transkriptler içeren rastgele öncüllerden türevlenirken [20, 21], bitki miRNA'larının çoğunluğunu kodlayan lokuslar; protein kodlamayan, bağımsız transkripsiyon ünitelerinden oluşturulurlar [22, 23].

Bitki miRNA'larının biyogenezine ilişkin pek çok ayrıntı *Arabidopsis thaliana* modelinde belirlenmiştir. Genomik DNA'dan sentezlenen primer miRNA (pri-miRNA) transkriptleri, RNA polimeraz II enzimi tarafından üretilir [24] ve protein kodlayan transkriptlerde olduğu gibi 5'-ucuna 7-metilguanozin şapkası [24], 3'-ucuna ise poliyadenilat kuyruğu (Poli-A dizileri) [25, 26, 27] eklenir [28, 29].

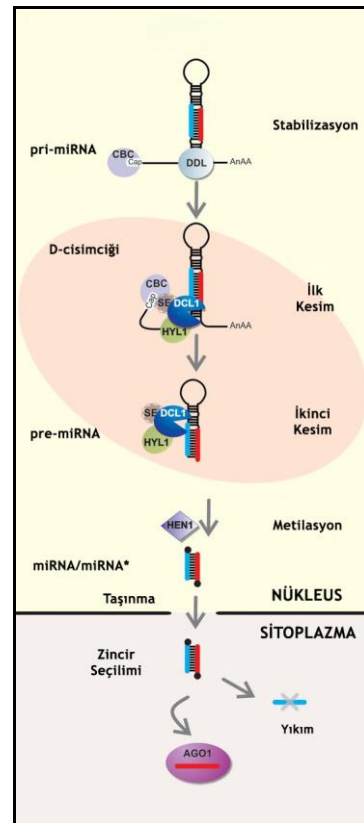
Protein kodlayan transkriptlerden farklı olarak pri-miRNA'lar tam olmayan eşleşme bölgelerine sahiptir. Bu nedenle sap ilmi (stem-loop) ya da saç tokası (hairpin) yapısı olarak adlandırılan kendi üzerine geri katlanmalar oluşturabilirler [30]. Pri-miRNA'ların saç tokası içeren bu ikincil yapıları, 70 ile yüzlerce baz aralığında olabilen heterojen bir uzunluğa sahip olabilmektedir [28, 31]

Arabidopsis'te bulunan dört Dicer-like enzimden, Dicer-like 1 (DCL1) bitki miRNA biyogenez sürecinin ana bileşenidir [28, 31]. Bu proteinler, yalnız çift zincirli RNA (dsRNA)'lara bağlanacak şekilde özelleştiklerinden mRNA gibi tek zincirli RNA'ları işlemezler [32, 33]. Ribonükleaz (RNase) tip III olan DCL1, pri-miRNA ikincil yapısını keserek, öncül miRNA'yı (pre-miRNA) oluşturur. Pre-miRNA'lar, nükleusun Dicing-cisimciği (D-bodies) denen bölgesinde [34] DCL1 tarafından tekrar kesilerek, 21-22 nükleotid uzunluğunda miRNA/miRNA* duplesi oluştururlar [6, 23, 25, 30]. Bitki pri-miRNA'larının büyük kısmı tek bir miRNA/miRNA* duplesi oluşturmasına rağmen, miR159 ve miR319 gibi bazı lokuslar aynı saç tokası yapısından çoklu duplesler oluşturabilmektedir [28, 35].

Pre-miRNA üretim sürecinde DCL1 dışında diğer proteinlerin de destekleyici rol oynadıkları bildirilmiştir.

Bunlardan, DAWDLE (DDL) pri-miRNA'nın DCL1 kesimine kadar stabil kalmasını sağlayan, DCL1 ile etkileşen bir proteindir [36]. Diğer yardımcı proteinler; dsRNA bağlama proteini HYPOASTICLEAVES1 (HYL1) [37], C₂H₂ çinko parmak protein SERRATE (SE) [38] ve şapka bağlama kompleksi (ABH1/ CBP80 ve CBP20) [39, 40] proteinleridir [33]. HYL1 ve SE proteinlerinin fonksiyonunun DCL1 tarafından yürütülen kesme işleminin etkisini ve duyarlılığını arttırmak olduğu belirlenmiştir [23, 41].

Oluşan miRNA/miRNA* duplesindeki her bir miRNA zinciri, HUA ENHANCER1 (HEN1) tarafından 3' ucundan metillenerek parçalanmaktan korunur [42]. Bu işlemde sonra miRNA/miRNA* duplesi, importin-β sınıfı bir nükleositoloplazmik taşıyıcı olan HASTY(HST) aracılığıyla, nükleustan sitoplazmaya taşınır (Şekil 2) [8, 28, 29, 43].



Şekil 2. Bitkilerde miRNA biyogenezinde önemli adımların özeti [23].

Sitoplazmaya taşınan miRNA/miRNA* duplesinin bir zinciri (miRNA*) yıkılırken, işlevsel olan diğer miRNA zinciri, RNA-uyarımlı susturma kompleksinin (RNA-induced silencing complex - RISC) bir bileşeni olan Argonaut (AGO) proteiniyle birleşir. RISC kompleksinde, miRNA ile tam ya da tama en yakın eşleşme gösteren hedef mRNA'lar algılanır [44]. miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanması ise mRNA'nın yıkılmasına veya translasyonunun baskılanmasına neden olur [45, 46].

Bitki miRNA'ları ve hedeflerinin evrimi için önerilen mekanizma, hayvan miRNA'ları ve hedeflerinin evrimi için önerilen mekanizmadan farklıdır [22, 47, 48]. Hayvanlarda miRNA, genellikle hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesiyle eksik eşleşme gösterir. Hayvan miRNA'larının yalnız "seed bölgesi" adı verilen 6-8 bazlık bağlama bölgesi tam eşleşme sergiler [49, 50, 51]. miRNA ile hedef mRNA arasındaki bu zayıf eşleşme genellikle translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır [20]. Bunun aksine bitki miRNA'ları, genellikle,

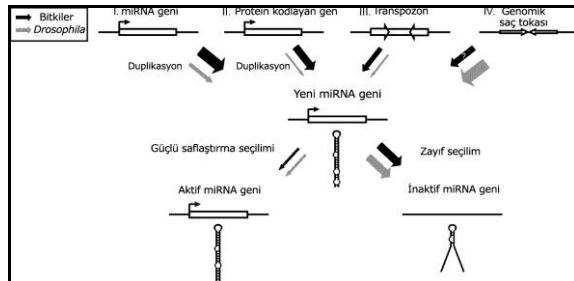
pek çok mRNA'da yalnız bir tane miRNA eşleşme bölgesi içeren kodlama bölgesini doğrudan hedefler. Tam ya da tama yakın olan bu eşleşme genel olarak hedef mRNA'nın parçalanmasıyla, nadiren de translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır (Şekil 3) [20, 48, 51, 52, 53].

miRNA/hedef eşleşme örüntüsü	Görünme sıklığı	Hedef baskılama mekanizması
	Bitkilerde yaygın, hayvanlarda nadir	mRNA birikiminde susturmaya bağlı (ya da susturmadan bağımsız) indirgenme ve/veya translasyonel baskılama
	Bitkilerde birkaç örneği mevcutken, hayvanlarda bunun yerine "seed" eşleşmesi görülür.	Aktif AGO-miRNA kompleksinde rekabet ve ayırma
	Hayvanlarda yaygın, bitkilerde örneği yok	mRNA birikiminde susturmadan bağımsız indirgenmeye tabii edilen translasyonel baskılama

Şekil 3. Hayvan ve bitkilerde, işlevsel mikroRNA / hedef eşleşme örüntüleri [53].

Bitki miRNA Genlerinin Evrimsel Kökeni

miRNA genlerinin evrimsel kökenine ilişkin birçok farklı mekanizma önerilmiştir. Bunlardan ilki yeni miRNA oluşumunun, protein kodlayan genin duplike olması ve ardından insersiyona uğraması sonucu gerçekleştiğini ileri süren duplikasyon hipotezidir (Şekil 4-II) [22, 31, 54, 55, 56]. Protein kodlayan genden kökenlenen insersiyona uğramış miRNA'nın, o genin transkriptiyle eşleşebilme olasılığının yüksek oluşu göz önüne alındığında, önerilen bu mekanizma miRNA'ların kökenini açıklamaya bakımından oldukça cazip görünmektedir (Şekil 5-A) [56].



Şekil 4. Bitkilerde (siyah oklar) miRNA genlerinin evrimsel kökenini gösteren olası mekanizmaların, *Drosophila* türleriyle (gri oklar) karşılaştırmalı olarak gösterilmesi. Okların kalınlığı önerilen mekanizmaların gözlenme sıklığını belirtmektedir [56].

Nitekim Allen ve arkadaşları (2004) *Arabidopsis thaliana*'da miR161 ve miR168 genlerinin inversiyona uğramış duplikasyonlardan oluştuğunu rapor etmişlerdir [22]. Daha sonraki çalışmalarda da inversiyona uğramış duplikasyonlardan kökenlenmiş birçok miRNA geni tanımlanmış [31, 54] ve yeni miRNA'ların duplikasyon ve inversiyonla oluştuğu ortak yargısı ifade edilmiştir [57].

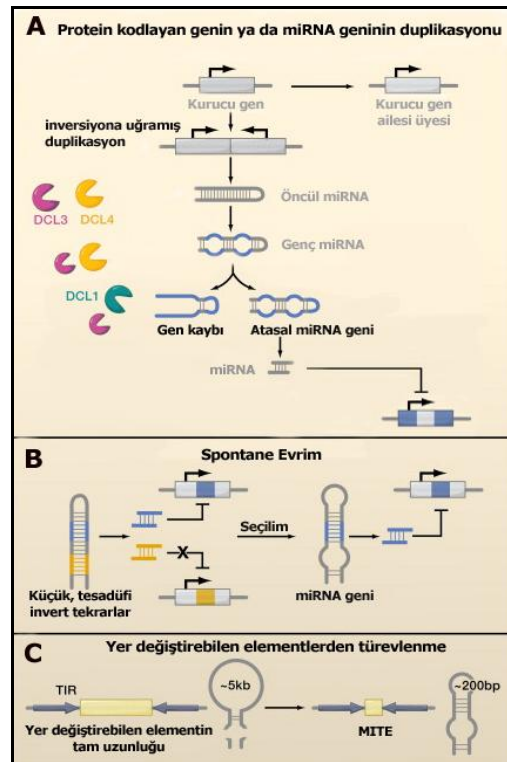
miRNA'ların kökenine ilişkin bir diğer mekanizmada ise, önceden var olan miRNA genlerinin ardıl mutasyonlar geçirmesi ile yeni miRNA'ların oluşabileceği ileri sürülmektedir (Şekil 4-I). Bitkilerde her bir miRNA gen ailesinin birçok miRNA geninden oluştuğu düşünüldüğünde [58], bu mekanizmanın bitkilerde miRNA'ların kökenini açıklamaya yönelik önemli bir mekanizma olduğu görülmektedir (Şekil 5-A) [56].

Ayrıca, bazı miRNA genlerinin kökeninin, insan genomunun neredeyse yarısını, bitki genomlarının ise yüzde sekseninden fazlasını oluşturan transpozonlar (TE) olabileceğini gösteren kanıtlar mevcuttur (Şekil 4-III, Şekil 5-C) [56, 59, 60]. Özellikle, DNA-tip transpozonların spesifik bir sınıfı olan minyatür invert tekrarlı yer değiştirebilen elementler (miniature inverted repeat transposable elements, MITEs), DCL proteinleri için substrat haline gelerek miRNA genleri oluşturma potansiyeline sahiptir. *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa*'da MITE'lerden ve diğer yer değiştirebilen elementlerden meydana gelmiş miRNA genlerinin belirlenmesiyle desteklenmiştir [59].

Oryza sativa ve *Sorghum bicolor*'da bulunan çoklu miRNA gen ailesinin bir transpozon olan *Stowaway* ile ilişkili olduğu bilinmektedir. *Stowaway* elementlerinden oluşan 25 miR-437 saç tokası yapısının, 22 tanesinin *Sorghum bicolor* genomunda ve diğer üçünün de başka bitki türlerinde kodlandığı bulunmuştur. *Oryza sativa* türüne özgü olan miR-441, -809, -812, -814, -818, -819 ve -1,862 gen ailelerinin de oluşmasında *Stowaway* transpozonlarının katkısı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [60]. Legümenlerde, *Medicago truncatula*'ya özgü 81 miR saç tokası yapısından, 13 miR ailesinin MuDR elementleriyle uyumu da bu ailelerin kökenlerinin MuDR transpozonlarıyla ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır [60].

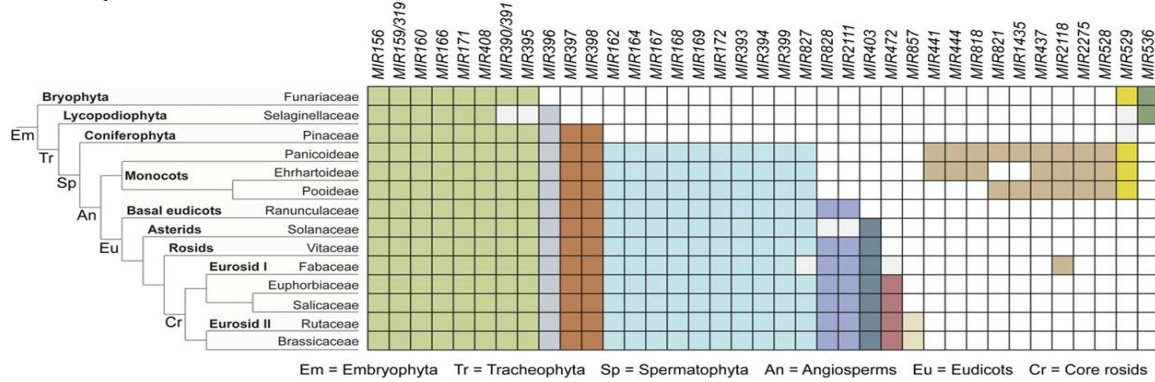
miRNA'ların kökeni ile ilgili son zamanlarda *Drosophila* türleriyle yapılan bir çalışmada, hayvanlarda genç miRNA'larının genomda rastgele saç tokası yapılarından türediği belirlenmiş [61] fakat aynı araştırmacılar tarafından bu mekanizmanın bitkilerde yeni miRNA genlerinin oluşmasında başlıca kaynak olmaktan uzak görüldüğü bildirilmiştir (Şekil 4-IV) [56].

Bitki türleri arasında çok uzun zaman önce kökenlendiği düşünülen, son derece korunmuş miRNA genlerinin atasal kökenine ulaşmanın biriken mutasyonlar nedeniyle oldukça güç olduğu da bildirilmiştir [57].



Şekil 5. Bitki miRNA'larının evrimi [46].

Korunmuş miRNA'lar



Şekil 6. miRBase (Sürüm 16, Ağustos 2010) verilerine göre oluşturulmuş tablo, bitki aileleri (satırlar) arasında korunmuş miRNA genlerini (sütunlar) göstermektedir. Türe ya da familyaya özgü miRNA genleri tabloya dahil edilmemiştir. Gri ile renklendirilmiş kutulardaki bitki familyalarının söz konusu miRNA gen ailelerini kaybetmiş olabileceği belirtilmiştir. Farklı renklerle vurgulanmış miRNA gen aileri ise tanımlandıkları taksonomik hattı göstermektedir [62].

Bitkiler aleminde evrimsel olarak korunmuş birçok miRNA gen ailesinin var olduğu ve bunlardan bazılarının evrimsel olarak birbirinden oldukça uzak olan karayosunları ve çiçekli bitkiler arasında da korunduğu belirlenmiştir [53, 62].

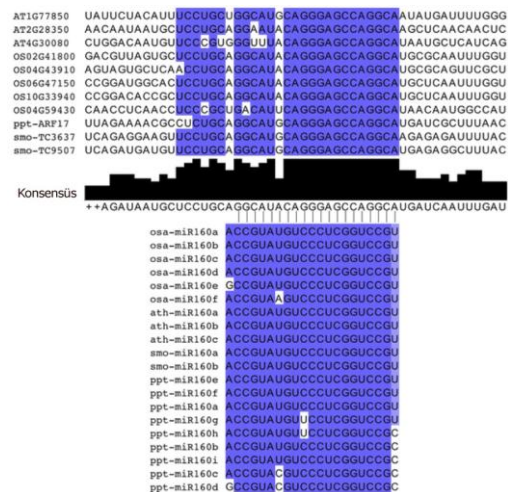
Cuperus ve arkadaşları (2011) tarafından, yüksek verimli sekanslama yaklaşımıyla elde edilmiş birçok veri seti birleştirilerek, kara bitkilerinin ortak atasında tanımlanmış 8 miRNA gen ailesi (miR156/miR157, miR159/ miR319, miR160, miR166, miR171, miR408, miR390/ miR391 ve miR395) tanımlanmıştır. Ayrıca monokotil ve dikotil bitkiler arasında en çok korunmuş 21 miRNA gen ailesi de (miR156/157, miR159/319, miR170/171, miR396, miR166, miR160, miR167, miR172, miR169, miR164, miR398, miR399, miR408, miR162, miR168, miR395, miR390, miR397, miR394, miR393, miR482) miRBase'de tanımlanmıştır (Şekil 6) [62, 63].

miRNA'ların sadece çok hücreli bitkilere özgü olmadıkları, tek hücreli bir yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*'de miRNA'ların tanımlanmasıyla anlaşılmıştır [64, 65]. Diğer taraftan bugüne kadar yapılan çalışmalarda, *Chlamydomonas*'da bulunan miRNA'lar ile karayosunları ya da vasküler bitkiler arasında korunmuş miRNA genine rastlanmamıştır [55, 56, 62, 66, 67]. Bitkilerin yeşil alglerden evrildiği düşünüldüğünde, yeşil alglerle karasal bitkiler arasında ortak miRNA'nın olmayışı, korunmuş miRNA fonksiyonlarının çok hücreliliğe geçiş ve karasal yaşama uyumu önemli olabileceğini düşündürmektedir [67].

Bitki miRNA'larının bilinen en erken evrimsel kökenine dair kanıtlar, bitki miRNA'larının birer üyesi olan miR166/miR165 gen ailesinin çiğeroğulları ve boynuz otlarından, açık tohumlu bitkilere kadar değişen farklı taksonlar boyunca korunmuş olduğunu gösteren kanıtlarla ortaya konmuştur. Nitekim miR166'nın, kara bitkilerinin ortak atasına kadar korunmuş olması olasıdır [68]. Bilinen en eski korunmuş miRNA aileleri, bitkilerde miR166/miR165 ve hayvanlarda let-7'nin bitki ve hayvan gelişim sürecinde farklılaşma ve simetrisinin oluşturulmasında önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir [69]. Temel biyolojik işlevleri düzenleyen bu miRNA'ların büyük bir olasılıkla ortak bir atada ortaya çıkmış ve daha sonra yeniden düzenlenmiş olma olasılığı yüksektir [47, 69]. Bitki ve hayvanlarda birçok korunmuş miRNA bulunmasına karşı bu iki alem arasında ortak miRNA'larla ilgili ikna edici bir kanıt bulunamamıştır. Bitki ve hayvanlarda miRNA yapısı ve mekanizması birbirinden oldukça farklı olsa da, biyogenez sürecinde aynı ya da homolog anahtar proteinlerin var olması; kökensel

RNA interferans (RNAi) mekanizmasında bitki ve hayvan miRNA yollarının bağımsız olarak evrimleşmiş olabileceğini düşündürmektedir [8, 69, 70, 71, 72]. Alternatif bir hipotez ise, bu iki grubun her birine ait miRNA yollarının ortak atada var olan miRNA benzeri bir yoldan tüvelendiğini ileri sürmektedir [72].

Aslında, miR854 ve miR855 genlerinin hem bitkilerde hem de hayvanlarda tanımlandığını belirten bir çalışma Arteaga-Vázquez ve arkadaşları tarafından (2006) yayınlanmıştır. Fakat daha sonra, sekans verilerinin detaylı analizi *Arabidopsis thaliana*'da miR854 ve miR855 olarak tanımlanan [73] bu lokusların, tipik olarak siRNA (small interfering RNAs) örüntüsü olduğunu, gerçek miRNA olmadıklarını ortaya koymuştur [31, 54, 71]. Bununla beraber, yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada insan ve fare gibi memelilerin doku ve serumlarında eksojen pirinç miRNA'sı miR168a belirlenmiş, bunun insan ve fare karaciğerinde düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör adaptor protein 1 (LDLRAP1) mRNA'sına bağlanarak LDLRAP1 ifadesini baskıladığı ve sonuç olarak fare plazmasından LDL çıkışının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir [74].



Şekil 7. miR160 dizisi ve hedef bölgeleri farklı bitki türleri arasında filogenetik olarak korunmuştur. *A. thaliana*, *O. sativa*, *P. patens*, ve *S. moellendorffii*'deki ARF mRNA fragmentlerinin miR160 ile eşleşme gösterdiği fragmentler yukarıda belirtilmiştir. Mavi ile işaretlenmiş bazlar, dizinin %75'den fazlasını sunmaktadır. Aşağı bölümde ise, aynı türde ifade olan miR160 dizileri gösterilmektedir [72].

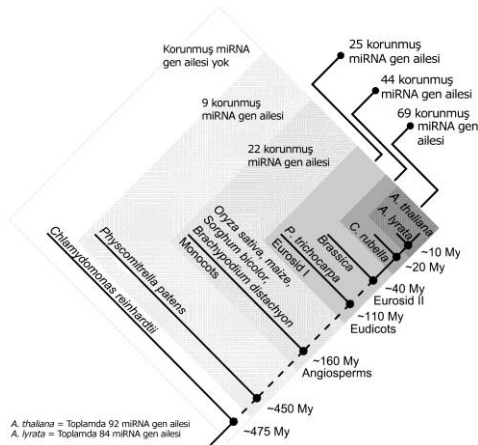
Bitki türleri arasında miRNA'lar ve bunların hedef dizilerdeki bağlanma bölgeleri, filogenetik dağılımda yüksek oranda benzer örüntü göstermektedirler ve farklı türlerde korunmuş miRNA'ların çoğunluğu her bir türde homolog genleri düzenlemektedir [8, 54, 68, 75, 76]. Çoğu bitki türünde miRNA'lar ve onların hedef genlerinin evrimsel olarak korunmuş olması, miRNA'lar ile hedef genlerin birlikte evrilmiş olması gerektiğini ve miRNA/hedef eşleşmesinin bitkisel evrim sürecinde uzun dönemler kararlı olduklarını düşündürmektedir [53, 58, 72]. Örneğin *Arabidopsis*'te oksin yanıt faktörü (ARF) genlerini düzenlediği bilinen miR160'm, tanımlandığı her türde hedef ARF dizilerinin de korunduğunu ortaya koyan güçlü kanıtlar mevcuttur (Şekil 7) [72, 77, 78].

Türe ya da Soya Özgü miRNA'lar

Birçok miRNA gen ailesi farklı bitki türleri arasında yüksek oranda korunmuşken, yakın zamanda evrilmiş miRNA genlerinden kökenlenen bazıları ise sadece birbirine yakın türlere ya da tek bir türe özgü olabilmektedir [22, 62]. Türe özgü miRNA'ların, genel olarak daha düşük seviyelerde ifade olmaları geleneksel metotlarla belirlenmelerini zorlaştırmaktadır. Yeni nesil sekanslama teknolojilerinin sağladığı hızlı ve yüksek verimli yaklaşım; türe özgü veya düşük miktarda bulunan miRNA'ların keşfedilmesini olanaklı kılmıştır. Yüksek verimli sekanslama teknolojilerinin model organizma olan *Arabidopsis*'te ilk kullanımından sonra [31, 54]; pirinç [79, 80, 81], kavak [82], asma [83], *Medicago truncatula* [84, 85], *Taxus chinensis* [86] ve daha birçok türde bilinen, türe özgü miRNA'ların sayısında önemli artış olmuştur [53].

Karayosunu *Physcomitrella patens* [87] ve kibrit otu *Selaginella moellendorffii*'de [75] de soya özgü miRNA'ların belirlenmesi, evrimsel olarak korunmamış miRNA'ların varlığının kara bitkilerinin çeşitlenmesi açısından evrensel bir özellik olduğuna işaret etmektedir [31, 46, 48].

Korunmamış miRNA'ların tek bir türe ya da soya özgü oluşu veya daha fazla sayıda miRNA'nın ise yalnız bir kaç yakın türde belirlenmesi, miRNA'ların oluşum ve yok olma oranlarının yüksek olduğuna işaret etmektedir. Korunmuş miRNA'lara göre türe ya da soya özgü miRNA'ların pek çok farklı özelliği vardır: Bu miRNA'ların ya hedefleri yoktur ya da hedeflerini henüz bilinmeyen kriterlerle tanımaktadırlar. Ayrıca, çoklu paraloglar yerine düşük miktarda bulunan tek kopya genler tarafından şifrelenen saç tokası öncüllerinden işlevsel miRNA'ları oluşturma süreçleri de daha heterojendir [53, 55, 88].



Şekil 8. *Arabidopsis*'de korunmuş miRNA gen aileleri ile diğer bitkiler arasındaki ilişki [55].

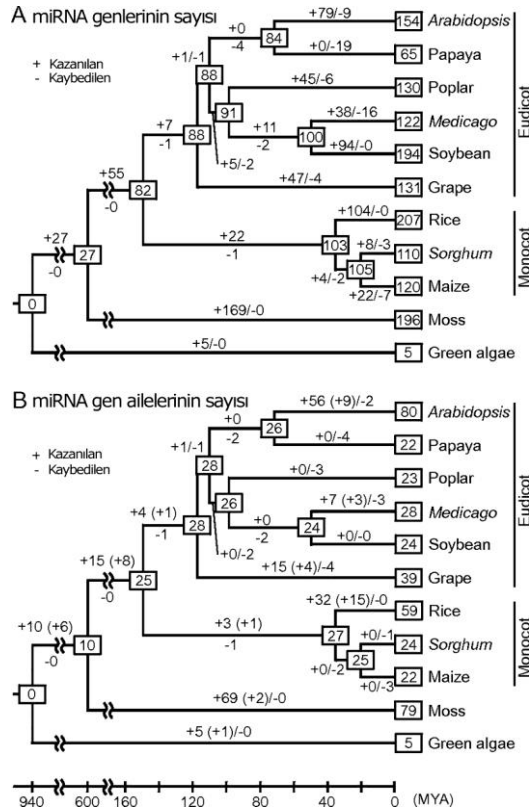
Bunun yanı sıra, korunmuş ve türe özgü genlerin ifade düzeyleriyle ilgili olarak yapılan genellemede; miR395 [26] gibi bazı korunmuş miRNA'ların optimum büyüme koşullarında düşük düzeyde ifade olabilmemesi miR161 gibi daha az korunmuş bazı miRNA'ların [31, 54] ise nispeten daha yüksek düzeyde ifade edilmesi gibi istisnaların olduğu da not edilmelidir [55, 72, 88].

Yaklaşık 10 milyon yıl önce ortak bir atadan türleşmiş olan *Arabidopsis thaliana* ve *Arabidopsis lyrata*'daki miRNA genlerini karşılaştıran, yakın zamanda yayınlanmış bir çalışma, iki türde tanımlanmış miRNA genlerinin en az %13'ünün her bir tür için özgün olduğunu göstermiştir (Şekil 8). Genç miRNA genlerinin sıklıkla oluşma – yok olma devriminde, fonksiyonları ile ilişkili olmaksızın evrimsel olarak kısa ömürlü oldukları ortaya konulmuş ve *Arabidopsis* soy hattında miRNA devriminin bir milyon yıl için 1,2 ile 3,3 miRNA geni arasında olduğu ileri sürülmüştür [55].

Kazanılan ve Kaybedilen miRNA genleri ve gen aileleri

Tıpkı protein kodlayan genler gibi miRNA genleri de; yer değiştirme, insersiyon, delesyon, rekombinasyon ve doğal seçim gibi evrimsel süreçlere tabiidir [89]. Bir kez oluşan miRNA'ların kaderi, hücrede üstlendikleri/üstlenecekleri işlevlere bağlıdır. Dolayısıyla, transkripsiyon faktörleri [47], F-box proteinleri [26] gibi düzenleyici proteinleri ve miRNA biyogenezinde gerekli proteinleri düzenleyen miRNA'ların [17, 90, 91] evrimsel olarak korunmuş olması beklenen bir durumdur [8, 89]. Bu miRNA'lar düzenledikleri hedef ile bitkinin uyum gücünü arttırabildiklerinden doğal seçim boyunca korunmuşlardır. Genç miRNA'ların birçoğu ise ya düzenleme yapabileceği hedef geni bulamadıkları ya da bitkinin adaptasyonunda işlevsel olamadıklarından evrimsel süreçte hızla elenmiştir. Öyle ki, genç miRNA'ların yalnız küçük bir kısmı doğal seçim açısından avantajlı bir işlev kazanabilmiş ve korunabilmiştir [72, 89].

Nozawa ve arkadaşları (2012) biyoinformatik teknikler kullanılarak 11 bitki türünde miRNA'ların evrimsel değişimini inceledikleri çalışmalarında, ~1400 TE benzeri olmayan ve ~300 TE benzeri miRNA geni tanımlamışlardır. TE benzeri olmayan bu miRNA genlerinin nasıl evrildiklerine dair bir örüntü oluşturabilmek için, parsimoni metodu kullanarak atasal türlerdeki minimum sayıdaki miRNA genleri ile bitki evrimi boyunca kazanılmış ya da kaybedilmiş miRNA genlerinin sayısını belirlemişlerdir (Şekil 9) [56]. Daha önce birkaç çalışmada belirtilmiş olduğu gibi [55, 66, 71] bu çalışmada da, yeşil algler ve kara bitkileri arasında homolog miRNA'lar tanımlanamamıştır (Şekil 9-A). Bu sonuç, yeşil algler ve kara bitkileri ayrılmadan önce ortak miRNA genlerinin bulunmadığı anlamına gelmez, çünkü var olan atasal miRNA genlerinin bitki evrimi sırasında kaybolmuş olması olasılığı da ileri sürülmüştür [56]. Yeşil algler ve kara bitkilerinin ayrılmasından sonra, kara bitkilerinde miRNA genlerinin sayısının hızla arttığı ve örneğin çiçekli bitkilerin atasında 82 miRNA geni kazanıldığı hesaplanmıştır. Aynı periyotta genlerin sayısı kadar olmasa da gen ailelerinin de sayısı artmıştır. Bu sonuç, ayırım sürecinde kazanılan miRNA'ların çoğunun, miRNA genlerinin duplikasyonu ile kazanılmış olabileceğine işaret etmektedir. Bu periyottan sonra genlerin sayısındaki evrimsel değişim, her bir soy çizgisinde farklı oranlarda gerçekleşmiştir. Örneğin pirinç; çiçekli bitkilerin evrim sürecinde 127 gen kazanmış ve 1 gen kaybetmişken, papaya aynı süreçte sadece 8 gen kazanabilmiş ve 25 gen kaybetmiştir (Şekil 9-A). Aynı durum gen ailelerinde de gözlenmiştir (Şekil 9-B) [56].



Şekil 9. Atasal türlerdeki(A) miRNA genleri ve (B) gen ailelerinin ve bitki evrimi boyunca kazanılmış ya da kaybedilmiş miRNA genleri ile gen ailelerinin sayısı. Karelerin içindeki sayılar, atasal ya da bugün hala var olan türlerdeki miRNA genleri veya gen ailelerinin sayısını belirtmektedir. Dalların üzerindeki sayılar, kazanılmış (+) ve kaybedilmiş (-) miRNA genleri ve gen ailelerinin sayısını belirtmektedir. Parantez içinde belirtilmiş (+) sayılar ise protein kodlayan genlerden oluşmuş olma potansiyeli taşıyan kazanılmış miRNA gen ailelerinin sayısını belirtmektedir [56].

SONUÇ

miRNA'ların keşfi ve biyolojik işlevlerinin geçerliliğinin kanıtlanması, biyolojik bilimlerde devrim etkisi yaratmıştır. Bilim camiasının; gen ifadesi, gen düzenleme ve RNA işlevselliği konusunda ilgisini yeniden canlandırarak, geleneksel bakış açılarını tekrar değerlendirmeye yöneltmiştir. Ayrıca, moleküler biyolojinin mihenk taşlarından olan "santral dogma hipotezi"ni zora sokarak, "çöp (junk) DNA hipotezi"nin aksini belirtmiştir. Çöp DNA'nın, DNA'nın büyük bir kısmını oluşturduğu, evrimsel fosiller olarak genomda zamanla biriktiği ve biyolojik bir amacı olmadığı düşünülürken, miRNA gibi küçük RNA'ların keşfedilmesiyle bunların işlevsel olabildiğini gösterilmiştir.

miRNA'ların kökeni ve evrimine ilişkin çalışmalar, son beş-on yıl içerisinde yapılmaya başlanmıştır. Biyolojik süreçlerin önemli genetik düzenleyicisi olan miRNA'ların evrimsel bir bakış açısıyla ele alınması ve olası mekanizmalarının açıklanması, miRNA'ların işlevlerini ve miRNA/hedef etkileşimlerini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır.

Evrimsel olarak uzun zaman önce ayrılmış olsalar da; bazı kara bitkilerinin, gelişimsel kontrol süreçlerinin aynı miRNA/hedef etkileşimlerini içerdiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, büyük oranda farklılık gösteren, oluşum ve yok olma oranları yüksek, türe ya da soya özgü miRNA'lar da tanımlanmıştır. Gelecekte çalışmaların, aynı kontrol

elemanlarının farklı fenotipik çıktılara nasıl neden olduğunu ve türe ya da soya özgü miRNA'ların işlevlerini daha detaylı açıklaması beklenmektedir.

Günümüze kadar pek çok sayıda miRNA tanımlanmış olmasına karşın, henüz çalışılmamış birçok farklı türde, önemli olabilecek çok sayıda miRNA keşfedilmeyi beklemektedir. Gelecekte, bilgisayar temelli araçların daha çok geliştirilmesiyle, farklı hücre tiplerinde ve farklı gelişimsel durumlardaki post-transkripsiyonel düzenleme mekanizmalarının daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması ve belki de hücre ya da dokuya özgü miRNA'ları tanımlamak mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75:843-854.
- [2] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75:855-862.
- [3] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403:901-906.
- [4] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P et al. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 408:86-89.
- [5] Almeida MI, Reis RM, Calin GA. 2011. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research*. 717(1-2):1-8.
- [6] Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. 12(17):1484-1495.
- [7] Griffiths-Jones S. 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Research*. 32:109-111.
- [8] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 57:19-53.
- [9] Khraiwesh B, Zhu J, Zhu J. 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*. 1819(2):137-148.
- [10] Luo Y, Guo Z, Li L. 2013. Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. *Developmental Biology*. 380:133-144.
- [11] Chen X. 2004. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*. 303(5666):2022-2025.
- [12] Kim J, Jung JH, Reyes JL, Kim YS, Kim SY, Chung KS, Kim JA, Lee M, Lee Y, Narry Kim V, Chua NH, Park CM. 2005. MicroRNA - directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *The Plant Journal*. 42(1):84-94.
- [13] Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY. 2005. Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 17:2204-2216.
- [14] Liu D, Song Y, Chen Z, Yu D. 2009. Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*. 136(2):223-236.

- [15] Chen ZH, Bao ML, Sun YZ, Yang YJ, Xu XH, Wang JH, Han N, Bian HW, Zhu MY. 2011. Regulation of auxin response by miR393- targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 77(6):619-629.
- [16] Bian H, Xie Y, Guo F, Han N, Ma S, Zeng Z, Wang J, Yang Y, Zhu M. 2012. Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/TIR1 homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*. 196(1):149-161.
- [17] Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, Bartel DP. 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & Development*. 18:1187-1197.
- [18] Maizel A, Jouannet V. 2012. Trans-acting small interfering RNAs: biogenesis, mode of action, and role in plant development. *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses* (Ed.:Sunkar R.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 83-108.
- [19] Jin D, Wang Y, Zhao Y, Chen M. 2013. MicroRNAs and Their Cross-Talks in Plant Development. *Journal of Genetics and Genomics*. 40(4):161-70.
- [20] Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136(4):642-655.
- [21] Kim VN, Han J, Siomi MC. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10:126-39
- [22] Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Sung GH, Spatafora JW, Carrington JC. 2004. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*. 36(12):1282-1290.
- [23] Bologna NG, Schapire AL, Palatnik JF. 2013. Processing of plant microRNA precursors. *Briefings in Functional Genomics*, 12(1):37-45.
- [24] Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC. 2005. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiology*. 138(4):2145-2154.
- [25] Kurihara Y, Watanabe Y. 2004. Arabidopsis microRNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *PNAS USA*. 101(34):12753-12758.
- [26] Jones-Rhoades MW, Bartel DP. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*. 14(6):787-799.
- [27] Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA. 2005. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Research*. 15: 336-360.
- [28] Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*. 12(4), 221.
- [29] Rogers K, Chen X. 2013. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell Online*. 1-18.
- [30] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. 2002. microRNAs in plants. *Genes Development* 16:1616-1626.
- [31] Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangel JL, Carrington JC. 2007. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE*. 2:e219
- [32] Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke D, Wand Ray A. 2002. DICER- LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends in Plant Sciences*. 7:487-491.
- [33] Tamas D, Anglia E. 2012. Evolution of Plant MicroRNAs. *eLS*. 1-7.
- [34] Fang Y, Spector DL. 2007. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Current Biology*. 17:818-823.
- [35] Bologna NG, Mateos JL, Bresso EG, Palatnik JF. 2009. A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *The EMBO Journal*. 28:3646-3656.
- [36] Yu B, Bi L, Zheng B, Ji L, Chevalier D, Agarwal M, Ramachandran V, Li W, Lagrange T, Walker J, Chen X. 2008. The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *PNAS USA*. 105:10073-10078
- [37] Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*. 12:206-212.
- [38] Yang L, Liu Z, Lu F, Dong A, Huang H. 2006. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 47:841-850.
- [39] Laubinger S, Sachsenberg T, Zeller G, Busch W, Lohmann JU, Ratsch G, Weigel D. 2008. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS USA*. 105:8795-8800
- [40] Kim S, Yang JY, Xu J, Jang IC, Prigge MJ, Chua NH. 2008. Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary microRNAs. *Plant Cell Physiology*. 49(11):1634-1644.
- [41] Dong Z, Han MH, Fedoroff N. 2008. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *PNAS USA*. 105:9970-9975.
- [42] Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X. 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*. 307:932-935.
- [43] Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS. 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *PNAS USA*. 102:3691-3696.
- [44] Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. 110(4):513-520.
- [45] Carrington JC, Ambros V. 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 301:336-338.
- [46] Voinnet O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*. 136(4):669-687.
- [47] Chen K, Rajewsky N. 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics*. 8:93-103.
- [48] Axtell MJ, Bowman JL. 2008. Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends in Plant Science*. 13(7):343-349.
- [49] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120:15-20.
- [50] Rajewsky N. 2006. microRNA target predictions in animals. *Nature Genetics*. 38:8-13.
- [51] Bartel DP. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136:215-233.
- [52] Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. 2006. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*. 46(2):243-259.
- [53] Axtell MJ. 2013. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 64:137-159.

- [54] Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP. 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*. 20(24):3407-3425.
- [55] Fahlgren N, Jogdeo S, Kasschau KD, Sullivan CM, Chapman EJ, Laubinger S, Smith LM, Dasenko M, Givan SA, Weigel D, Weigel D, Carrington, JC. 2010. MicroRNA gene evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 22(4):1074-1089.
- [56] Nozawa M, Miura S, Nei M. 2012. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biology and Evolution*. 4(3):230-239.
- [57] Felippes De FF, Schneeberger K, Dezulian T, Huson DH, Weigel D. 2008. Evolution of *Arabidopsis thaliana* microRNAs from random sequences. *RNA (New York, N.Y.)*. 14(12):2455-2459.
- [58] Li A, Mao L. 2007. Evolution of plant microRNA gene families. *Cell Research*. 17:212-218.
- [59] Piriyaopngsa J, Jordan IK. 2008. Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements. *RNA*. 14:814-821.
- [60] Borchert GM, Holton NW, Williams JD, Hernan WL, Bishop IP, Dembosky JA, Elste JE, Nathaniel E, Gregoire NS et al. 2011. Comprehensive analysis of microRNA genomic loci identifies pervasive repetitive-element origins. *Mobile Genetic Elements*. 1(1):8-17.
- [61] Nozawa M, Miura S, Nei M. 2010. Origins and Evolution of MicroRNA Genes in *Drosophila*. *Genome Biology and Evolution*. 2:180-189.
- [62] Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC. 2011. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell*. 23(2):431-442.
- [63] Xiao Y, Xia W, Yang Y, Mason AS, Lei X, Ma Z. 2013. Characterization and Evolution of Conserved MicroRNA through Duplication Events in Date Palm (*Phoenix dactylifera*). (M. Robinson-Rechavi, Ed.) *PLoS ONE*. 8(8):e71435.
- [64] Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC. 2007. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*. 447:1126-1129.
- [65] Zhao T, Li G, Mi S, Li S, Hannon GJ, Wang XJ, Qi Y. 2007. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Development*. 21(10):1190-1203.
- [66] Axtell MJ, Bartel DP. 2005. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *The Plant Cell*. 17:1658-1673.
- [67] Willmann MR, Poethig RS. 2007. Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 10(5):503-511.
- [68] Floyd SK, Bowman JL. 2004. Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants. *Nature*. 428:485-486.
- [69] Shabalina SA, Koonin EV. 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology & Evolution*. 23(10):578-587.
- [70] Millar AA, Waterhouse PM. 2005. Plant and animal microRNAs: Similarities and differences. *Functional & Integrative Genomics*. 5(3):129-135.
- [71] Axtell MJ. 2008. Evolution of microRNAs and their targets: are all microRNAs biologically relevant? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*. 1779(11):725-734.
- [72] Jones-Rhoades MW. 2012. Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Molecular Biology*. 80(1)-16.
- [73] Arteaga-Vázquez M, Caballero-Pérez J, Vielle-Calzada JP. 2006. A family of microRNAs present in plants and animals. *The Plant Cell*. 18(12):3355-3369.
- [74] Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Cai X et al. 2012. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*. 22:107-126.
- [75] Axtell MJ, Synder JA, Bartel D. 2007. Common functions for diverse small RNAs of land plants. *The Plant Cell*. 19(6):1750-1769.
- [76] Zhang L, Chia JM, Kumari S, Stein JC, Liu Z, Narechania A, Maher CA, Guill K, McMullen MD, Ware D. 2009. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS Genetics*. 5(11):e1000716
- [77] Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC. 2007. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal*. 52(1):133-146
- [78] Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY. 2005. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 17(8):2204-2221.
- [79] Heisel SE, Zhang Y, Allen E, Guo L, Reynolds TL, Yang X, Kovalic D, Roberts JK. 2008. Characterization of unique small RNA populations from rice grain. *PLoS ONE*. 3:e2871.
- [80] Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, Zhang W, Zhu JK. 2008. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC Plant Biology*. 8:25
- [81] Zhu QH, 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 Research*. 18:1456-1465.
- [82] Klevebring D, Street NR, Fahlgren N, Kasschau KD, Carrington JC, Lundeberg J, Jansson S. 2009. Genome-wide profiling of *Populus* small RNAs. *BMC Genomics*. 10:620.
- [83] Pantaleo V, Szittyta G, Moxon S, Miozzi L, Moulton V, Dalmay T, Burgyan J. 2010. Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *The Plant Journal*. 62:960-976.
- [84] Szittyta G, Moxon S, Santos DM, Jing R, Fevereiro MP, Moulton V, Dalmay T. 2008. High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC Genomics*. 9:593.
- [85] Lelandais-Briere C, Naya L, Sallet E, Calenge F, Frugier F, Hartmann C, Gouzy J, Crespi M. 2009. Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *The Plant Cell*. 21:2780-2796.
- [86] Qiu D, Pan X, Wilson IW, Li F, Liu M, Teng W, Zhang B. 2009. High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*). *Gene*. 436:37-44.
- [87] Talmor-Neiman M, Stav R, Frank W, Voss B, Arazi T. 2006. Novel micro-RNAs and intermediates of micro-RNA biogenesis from moss. *The Plant Journal*. 47:25-37.
- [88] Ma Z, Coruh C, Axtell MJ. 2010. *Arabidopsis lyrata* small RNAs: transient MIRNA and small interfering RNA loci within the *Arabidopsis* genus. *The Plant Cell*. 22(4):1090-1103.

[89] Barrera-Figueroa BE, Wu Z, Liu R. 2012. Abiotic stress-associated microRNAs in plants: discovery, expression analysis, and evolution. *Frontiers in Biology*. 8(2):189-197.

[90] 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. *Annals of Botany*. 103(1):29-38.

[91] Li W, Cui X, Meng Z, Huang X, Xie Q, Wu H, Jin H, Zhang D, Liang W. 2012. Transcriptional regulation of *Arabidopsis* MIR168a and argonaute1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiology*. 158(3):1279-1292.