



Orta ve şiddetli seviyelerde bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana*'da miR393 ekspresyonu üzerine etkisi

Ceyhun Kayıhan*

Başkent Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 06790, Ankara, Türkiye
ORCID ID orcid.org/0000-0003-1684-4147

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:

İlk gönderi 20 Ağustos 2020

Kabul 11 Kasım 2020

Online 29 Aralık 2020

Araştırma Makalesi

DOI: [10.30728/boron.783209](https://doi.org/10.30728/boron.783209)

Anahtar kelimeler:

Arabidopsis thaliana,
Bor,
Ekspresyon,
miR393,
Toksosite.

ÖZET

Bitkilerde korunmuş olan mikroRNA (miRNA) ailelerinden biri olan miR393, birçok kritik gelişimsel süreçlerde rol oynamaktadır. Bu çalışmada, Stem-Loop (SL) kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile 1 mM (1B) ve 3 mM (3B) boric aside maruz kalan *Arabidopsis thaliana*'da miR393'ün ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Ayrıca, miR393'ün *A. thaliana*'da hedeflediği genler ve bu genlerin Gen Ontoloji (GO) zenginleştirme analizi yapılmıştır. *A. thaliana* bitkisinde toksik seviyelerde bor uygulamaları sonrası, *A. thaliana* fidelerinin gelişimlerinde gerileme ve fidelerin yaprak uçlarında kloroz gözlemlenmiştir. *A. thaliana*'da 1B uygulaması miR393 ekspresyonu 2,9 kat artırırken, 3B uygulaması 2,7'lik bir artışa sebep olmuştur. miR393'ün 5' ve 3' ucundaki olgun dizilere göre başlıca hedef genleri; auxin sinyal F-box, S-adenosil-L-metiyonin-bağımlı metiltransferaz süper aile proteinlerini, Kinezin benzeri kalmodulin-bağlanma proteinlerini, Lösin-zengin reseptör benzeri protein kinaz aile proteinlerini, 1-deoksi-D-ksilüloz 5-fosfat sentaz enzimini, ARM tekrar süper aile proteinlerini ve myb-benzeri HTH transkripsiyonel regülatör aile proteinlerini kodlayan genler ve bHLH ve WRKY33 transkripsiyon faktörleridir. Öte yandan, miR393'ün hedeflediği genlerin GO zenginleştirme analizine göre başlıca Biyolojik Süreçleri şu şekildedir: Oksin ile aktifleşmiş sinyal yolağı, oksin uyarısına hücrel cevap, çeşitli gelişim süreçleri ve farklı hücrel cevaplardır. Moleküler Fonksiyonlar ise, oksin bağlayıcı, inositol heksakisfosfat bağlayıcı ve hormon ve alkol bağlayıcı şeklinde kategorize edilebilir. Sonuç olarak, bor toksisitesi altında tespit edilen büyüme geriliği, miR393 hedefli oksin regülasyonu ve bHLH gibi ilişkili transkripsiyon faktörleri ile ilgili olabilir.

Effect of boron toxicity on miR393 expression at moderate and severe levels in *Arabidopsis thaliana*

ARTICLE INFO

Article history:

Received August 20, 2020

Accepted November 11, 2020

Available online December 29, 2020

Research Article

DOI: [10.30728/boron.783209](https://doi.org/10.30728/boron.783209)

Keywords:

Arabidopsis thaliana,
Boron,
Expression,
mir393,
Toxicity.

ABSTRACT

miR393, one of the microRNA (miRNA) families preserved in plants, plays a role in many critical developmental processes. In this study, expression levels of miR393 were determined in *Arabidopsis thaliana* exposed to 1 mM (1B) and 3 mM (3B) boric acid by Stem-Loop (SL) quantitative reverse transcription polymerase chain reaction method. In addition, genes targeted by miR393 in *A. thaliana* and Gene Ontology (GO) enrichment analysis of these genes were performed. After application of toxic levels of B in *A. thaliana* plant, a decrease in the growth of *A. thaliana* seedlings and chlorosis on the leaf tips of the seedlings were observed. While 1B application caused a 2.9 fold increase in miR393 expression, 3B application caused a 2.7 fold increase in this expression. According to the mature sequences at the 5' and 3' ends of miR393, the main target genes are; genes coding Auxin signaling F-box, S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein, kinesin-like calmodulin-binding protein, Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 3, ARM repeat superfamily protein, myb-like HTH transcriptional regulator family protein and bHLH, and WRKY33 transcription factors. On the other hand, according to the GO enrichment analysis, the main Biological Processes of the genes targeted by miR393 are as follows: The auxin-activated signaling pathway, the cellular response to auxin, various developmental processes, and different cellular responses. Molecular functions can be categorized as auxin binding, inositol hexakisphosphate binding and hormone and alcohol binding. As a result, growth retardation detected under boron toxicity may be related to miR393 targeted auxin regulation and associated transcription factors such as bHLH.

*Sorumlu yazar: ckayihan@baskent.edu.tr

1. Giriş (Introduction)

Bor (B), bitkiler için mutlak gerekli mikro besin elementidir [1]. Bununla birlikte, yüksek bor seviyesi, dünyadaki önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir ve bitki gelişimi ile mahsul verimini olumsuz etkilemektedir [2]. Birçok ülke, özellikle kurak veya yarı kurak topraklara sahip olanlar, aşırı bor sebebiyle verim kaybından muzdariptir [3]. Bor, büyüme için gerekli seviyenin çok az üstünde bile olsa, birçok bitki için kolayca toksik olabilir [4]. Bor toksisitesi, hücre duvarı yapısında değişikliklere ve borun biyolojik moleküllerin ribozlarına bağlanması nedeniyle, hücre bölünmesinin ve gelişiminin bozulmasına neden olur [5]. Tipik olarak, toksik bor, gövde ve kök büyümesinde inhibisyona ve eski yaprakların uçlarında ve kenarlarında klorotik veya nekrotik bölgelerle ayırt edilen yaprak yanmasına yol açar [6,7]. Çoğu bitki türünde, bor kökler tarafından emildikten sonra, ksileme yüklenir ve transpirasyon akışı yoluyla gövdeye geçer ve yeniden dağıtılmadan eski yapraklarda birikir; bu nedenle yapraklardaki bor içeriği ile toksisite semptomlarının şiddeti arasında doğrudan bir ilişki vardır [8]. Bor toksisitesi altında köke ve gövdeye özgü akuaporinleri kodlayan genlerin aşağı regülasyonu, hücreden hücreye su hareketinde azalmaya ve gövdelere su akışında azalmaya neden olmaktadır [9]. Bu nedenle, yaprak ve gövdede bor toksisite semptomları köklerden daha şiddetlidir. Borun toksik etkileri devam ederse, boron cis konfigürasyonlu moleküllerde çoklu hidroksil gruplarına karşı yüksek reaktivitesi nedeniyle azot ve şeker metabolizmasının baskılanma durumu gelişir [10]. Bu sitotoksik etkiler, metabolik bozukluğa ve oksidatif strese neden olur [10]. Öte yandan, aşırı bor varlığında, bitki inhibisyonu nedenlerinden bir diğeri foto-oksidatif strestir [5] ve oksidatif stres sonucu reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı birikimi, pigmentleri, lipidleri, nükleik asitleri, proteinleri ve inaktive edici enzimleri oksitleyerek hücre ölümüne neden olabilir [11]. Bitkiler, ROS birikimine karşı antioksidan enzimleri içeren süpürücü mekanizmalarına sahiptir. İlişkili olarak, domateste, antosiyaninin ve flavonoidin artmış seviyesi [12], fesleğende daha yüksek fenolik içerik [13], ve nohutta ve soya fasülyesinde, süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), ve askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitelerinde anlamlı artışlar [14], toksik bor koşulları altında belirlenmiştir.

Bor toksisitesine karşı bitki toleransı, türler hatta çeşitler arasında bile büyük farklılıklar göstermektedir [3]. Bitkilerde bor toksisitesine karşı toleransın altında yatan mekanizmalar hala tartışmalıdır. Otsu bitki türleri için önerilen en yaygın kabul gören teori, bor dışı akış taşıyıcıları yoluyla hücreler arası bor seviyelerinin azaltılmasıdır. Örneğin; arpada (*Hordeum vulgare*), köklerdeki bor dışı akım taşıyıcısı *BOR1*'in yukarı regülasyonu, borun topraktan emilimini azaltır [15]. Buna karşın; *BOR1*'e homolog olan *BOR2*'nin yapraklardaki yukarı regülasyonu, borun simplastlar-

dan apoplastlara taşınmasına neden olur [16]. Benzer şekilde, köklerdeki başka bir dışarı akış taşıyıcısı olan nodulin benzeri iç proteinin (NIP) aşağı regülasyonu da borun köklerden gövdelere taşınmasını azaltarak, yer üstü bitki parçalarında bor birikimini azaltmaktadır [17]. Öte yandan, yakın bir zamanda yapılan fizyolojik bir çalışma fesleğenin bor toksisitesine karşı tolerans mekanizmalarında yaprak antosiyaninleri tarafından foto korumanın rol oynadığı göstermiştir [18]. Bu durum, bor toksisitesine karşı farklı mekanizmaların rol oynayabileceğini göstermiştir.

Omiks teknolojileri ile yapılan son moleküler çalışmalar, toksik borun yanıtları ve biyolojik yollarla olası ilişkileri hakkında önemli bilgiler sağlamıştır [19,20]. Önemli olarak, bu çalışmalarda, bor homeostazisinin WRKY, MYB ve NAC gibi transkripsiyon faktörlerindeki değişiklikler ile düzenlendiğini öne sürülmüştür. Ayrıca, temel heliks-döngü-heliks aile proteininin (bHLH) ekspresyon seviyesi, bor toksisitesi altında hassas ve toleran buğday çeşitlerinin yaprak ve kök dokularında aşağı yönlü regüle olduğu ve bu transkripsiyon faktörünün, bitkilerdeki bor toksisitesi yanıtına katılabileceği bildirilmiştir [20]. Bununla birlikte, stres sırasında genlerin nasıl regüle olduğu sorusunu cevaplamak, yeni genler bulmak kadar önemlidir [21]. Bundan dolayı, mikroRNA'lar (miRNA), post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunun anahtar düzenleyicileri olarak, stres açını keşfetmek için iyi adaylardır. Bu kodlanmayan küçük RNA'lar, 21 ila 24 nükleotid uzunluğunda, bitkilerde geniş bir dağılıma sahiptir. Bu miRNA'lar, bitkilerde, doğrudan hedef mRNA'yı susturarak ya da hedef mRNA'nın translasyonunu inhibe ederek genlerin ekspresyonlarını negatif yönlü regüle ederler [22]. Kanıtlar, bitki miRNA'larının bitki büyümesinin ve gelişiminin düzenlenmesinde ve ayrıca biyotik ve abiyotik streslere yanıtta çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir [23]. Örneğin, *A. thaliana*'da miR399'un *UBC24* transkript seviyesini düzenleyerek fosfor (P) homeostazını sağladığı deneysel olarak kanıtlanmıştır [24]. Buna karşın, miR395, sırasıyla *APS* ve *SULTR2;1*'i hedefleyerek, sülfat (S) birikimi ve dağılımını düzenlenmesine aracılık etmektedir [25]. Benzer şekilde, artan kanıtlar, bitki miRNA'larının bor streslerine yanıtta çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir [26]. Örneğin, daha önce yapılan bir çalışmada, narenciye yapraklarında miR397a'nın ksilemin ikincil hücre duvarı biyosentezini düzenleyerek bor toksisitesinin bitkiye olan etkisinin azaltılmasında rol oynadığı bildirilmiştir [27]. Bu nedenle, bitkide bor toksisitesine cevaben değişen miRNA'ların belirlenmesi tolerans mekanizmasının belirlenmesi için önem arz etmektedir. Bu çalışmada, literatürde ilk defa oksin reseptörleri *TIR1*, *AFB1*, *AFB2* ve *AFB3*'ü ve aşağı yönlü regüle olduğu daha önce belirlenen bHLH transkripsiyon faktörünü hedefleyen miR393'ün ekspresyon seviyeleri 1 mM (1B) ve 3 mM (3B) borik aside maruz kalan *A. thaliana*'da olgun miRNA'ları tespit etmek ve çoğaltmak için önemli bir strateji olan Stem-loop (SL) kan-

titatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi [28,29] ile belirlenmiştir. Bu yöntemde, bir saç tokası yapısı olarak tasarlanan SL primeri, miRNA'ya komplementer olan 3' çıkıntıya sahiptir. Daha sonra, miRNA-spesifik primerler ve bir evrensel primer, olgun miRNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonu için kullanılır [30]. Ayrıca, bu çalışmada miR393'ün *A. thaliana*'da diğer hedeflediği genler ve bu genlerin Gen Ontoloji (GO) Zenginleştirme analizi yapılmıştır.

2. Malzemeler ve yöntemler (Materials and methods)

2.1. Büyüme koşulları ve bor uygulamaları (Growth conditions and boron treatments)

Büyütme koşulları ve bor uygulamaları için Arabidopsis (*A. thaliana* Columbia ekotipi) tohumlarının, önce %70'lik etil alkol ile 2 dakika, ardından %15'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile 10 dakika yıkanarak yüzeyleri sterilize edilmiştir. Ardından tohumlar distile su ile 3 kez durulanmıştır ve normal (100 µM) ve toksik (1 mM ve 3 mM H₃BO₃) B konsantrasyonları içeren MS besiyerine [31] transfer edilmiştir. 3 günlük, 4°C'deki vernelezyonun ardından çimlenme ve büyüme 22°C'de iklim kabininde, 16/8-h ışık fotoperiyodu ile gerçekleştirilmiştir. İki haftanın ardından fideler hasat edilmiştir ve ileri analizler için kullanılmıştır.

2.2. Kantitatif gerçek zamanlı PZR koşulları (Quantitative real-time PCR conditions)

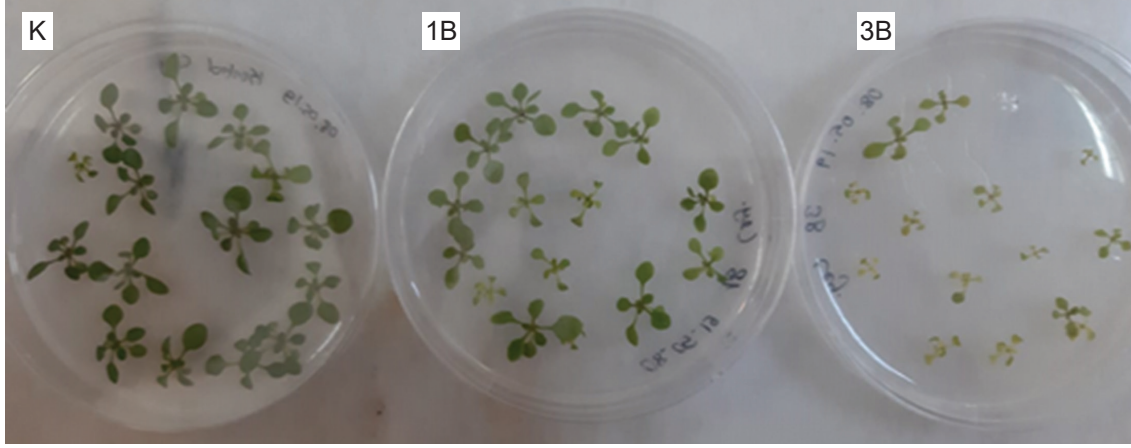
İki haftalık *A. thaliana* fidelerinden TRIzol reaktifi (Ambion) ile toplam RNA izole edilmiştir. İzolasyon protokolü şu şekildedir: 0,2 gram *A. thaliana* yaprakları sıvı nitrojen ile havanda öğütülmüş ve toz haline gelen yaprak örneği önceden soğutulmuş eppendorf tüplerine transfer edilmiştir. Ardından, 1 ml TRIzol reaktifi tüplere eklenmiş ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında tüpler vorteks ile karıştırılmış ve devamında tüpler 5 dakika boyunca oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 900 µl yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 180 µl kloroform eklenmiş ve tüpler vortekslenerek 3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler, 4°C'de maksimum hızda 15 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatanttan 450 µl yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 200 µl kloroform eklenmiştir. Tüpler vortekslenerek oda sıcak-

lığında 3 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından, tüpler, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca maksimum santrifüjlenmiştir ve üst fazdan 400 µl alınarak yeni tüpe transfer edilmiştir ve üzerine eşit hacimde izopropanol eklenmiş ve tüpler birkaç kez tersyüz edilerek, 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüpler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüjlenmiş ve elde edilen pelet 1 ml %75'lik etanol ile 3 dakika boyunca yıkanmıştır. Daha sonra, 5 dakika boyunca oda sıcaklığın maksimum hızda santrifüjlene pelet 10 dakika boyunca kuruma-ya bırakılmıştır. Son olarak, kurutulan pelet üzerine 50 µl Dietil Pirokarbonat'lı su eklenmiş ve 65°C'de 15 dakika boyunca inkübe edilerek çözülmüştür. RNA'nın sağlamlığı ve kalitesini kontrol etmek için agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Ardından RNA saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop (Denovix, ABD) ile belirlenmiştir. İzole edilen toplam RNA'lar kullanıma kadar -80°C'de saklanmıştır.

miRBase veritabanı, miR393 sekansını elde etmek üzere kullanılmıştır. SL-geri transkripsiyon ve ileri primerler [32] protokolüne uygun bir şekilde özel olarak tasarlanmıştır. miR393 için primer sekansları Tablo 1'de verilmiştir. miR393 ekspresyonu, kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR) metodu ile belirlenmiştir [33]. Öncelikle, 1 µg RNA, RNaz içermeyen su, 2 µL SL primeri içeren 12 µL'lik karışımlar hazırlanmıştır. Bu karışımlar, 5 dakika 65°C'de, ardından 2 dakika buzda inkübe edilmiştir. Sonrasında, 5X reaksiyon tamponu, RiboLock RNaz inhibitörü (20 U/µL), 10 mM dNTP ve ters transkriptaz karışımlara eklenmiştir. Karışımlar 30 dakika boyunca 16°C'de inkübe edilmiştir ve 60 döngü boyunca 30°C'de 30 s, 42°C'de 30 s ve 50°C'de 1 s olarak şekilde atımlı geri transkripsiyona maruz bırakılmıştır. Ardından tüpler 70°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. qRT-PCR analizleri için, 1 µL cDNA, 7 µL 2X Master Mix (Thermo Scientific) ve final konsantrasyon 0,3 µM olacak şekilde primerler eklenerek total hacim nükleazsız su ile 15 µL'ye tamamlanmıştır. qRT-PCR koşulları, 95°C'de 10 dakika ilk denatürasyon, ardından 40 döngü 95°C'de 15 s, 59°C'de 30 s, 72°C'de 30 s olarak belirlenmiştir. Erime eğrisi (melting curve) 40 döngü sonrası 60-95°C'de analiz edilmiştir. Normalizasyon aktin (*ACT2*) geni kullanılarak gerçekleştirilmiştir [20] ve 2^{-ΔΔCt} her bir karşılaştırmada ekspresyon kat farklılıklarını belirlemek üzere kullanılmıştır.

Tablo 1. miR393 ekspresyon analizi için kullanılan primerler (Primers used for miR393 expression analysis).

Primer İsmi	5' – 3' yönünde sekans
miR393-SL-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGATCA
miR393_F	CGTAATTCCAAAGGGATCGCAT
Universal_R	GTGCAGGGTCCGAGGT
ACT2_F	CTTGACCTTGCTGGACGTGA
ACT2_R	AATTTCCCGCTCTGCTGTTG



Şekil 1. Toksik B uygulamalarına maruz kalmış *Arabidopsis thaliana* fidelikleri. K: kontrol, 1B: 1 mM H₃BO₃ uygulaması, 3B: 3 mM H₃BO₃ uygulaması. (*Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to toxic B treatments. K: control, 1B: 1 mM H₃BO₃ treatment, 3B: 3 mM H₃BO₃ treatment).

2.3. miR393 hedef genlerinin bilgisayarimsal tahmini ve GO zenginleştirme analizi (Computational prediction of target genes of miR393 and GO enrichment analysis)

A. thaliana'da miR393'ün hedeflerini belirlemek için, olgun miRNA dizileri miRBase veri tabanı kullanılarak (sürüm 22.1, <http://www.mirbase.org/>) belirlenmiştir [34]. Daha sonra, bu olgun miR393 dizileri kullanılarak miR393 hedef genleri psRNATarget veri tabanında belirlenmiştir (version 2, <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) [35].

miR393'ün belirlenen hedef genlerinin GO zenginleştirme analizi 10.08.2020 tarihinde güncellenen PANTHER veritabanı kullanılarak (sürüm 14, <http://geneontology.org/>) yapılmıştır [36]. Referans liste *A. thaliana* seçilerek yapılmıştır. GO biyolojik süreç ve moleküler fonksiyon sonuçları test tipi Fisher's exact ve doğrulama FDR seçilerek yapılmıştır ($P < 0,05$).

2.4. İstatistiksel analizler (Statistical analyses)

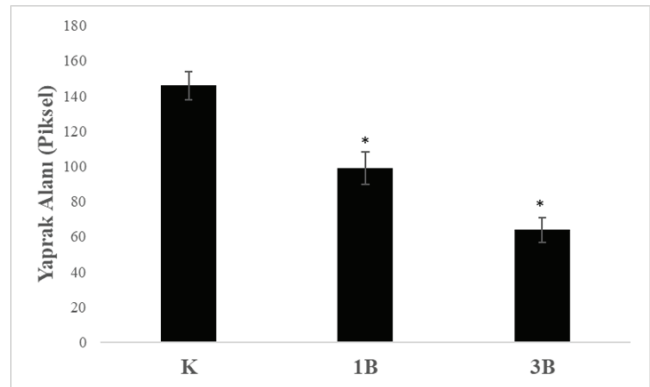
qRT-PCR deneyleri, dört biyolojik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir ($n=4$). Veriler istatistiksel olarak t-testinin parametrik olmayan versiyonu kullanarak analiz edilmiştir. Öte yandan, yaprak alanı verileri, dört biyolojik tekrar ve her tekrardan en az 10 bitki olacak şekilde Java tabanlı ImageJ programı kullanılarak elde edilmiştir. Yaprak alanı verileri, SPSS istatistik programı kullanılarak Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile analiz edilmiştir. Veriler, ortalama ve standart hata birlikte olacak şekilde verilmiştir.

3. Bulgular (Results)

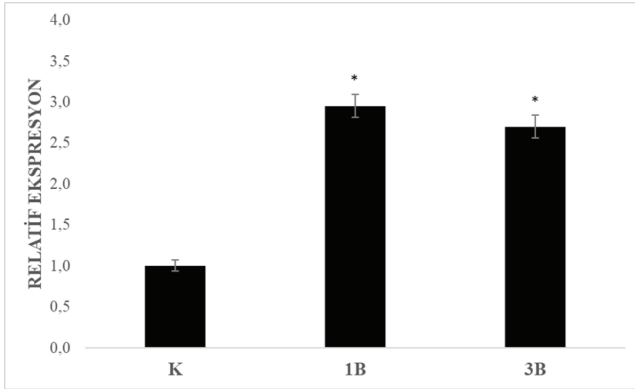
A. thaliana bitkisinde toksik seviyelerde bor uygulamaları sonrası, *A. thaliana* fidelerinin gelişimlerinde gerileme ve fidelerin yaprak uçlarında kloroz gözlemlenmiştir (Şekil 1). Hatta beklendiği üzere, yaprak alanı verilerine göre bor toksisitesinin artan konsantrasyonuna karşılık, *A. thaliana* yapraklarında kısmi sararma

ve büyüme geriliği artmıştır (Şekil 2). Öte yandan, *A. thaliana*'da 1B uygulaması miR393 ekspresyonu 2,9 kat artırırken, 3B uygulaması 2,7'lik bir artışa sebep olmuştur (Şekil 3).

miR393'ün 5' ve 3' ucundaki olgun dizilere göre (5p ve 3p) başlıca hedef genleri; auxin sinyal F-box, S-adenosil-L-metiyonin- bağımlı metiltransferaz süper ailesi proteinlerini kodlayan genler, Kinezin benzeri kalmodulin-bağlanma proteinlerini kodlayan genler, Lösin-zengin reseptör benzeri protein kinaz ailesi proteinlerini kodlayan genler, 1-deoksi-D-ksilüloz 5-fosfat sentaz enzimini kodlayan gen, ARM tekrar süper ailesi proteinlerini kodlayan genler, myb-benzeri HTH transkripsiyonel regülatör ailesi proteinlerini kodlayan genler ve bHLH, ve WRKY33 transkripsiyon faktörleridir (Tablo 2). Öte yandan, miR393'ün hedefle-



Şekil 2. Toksik B uygulamaları altında *Arabidopsis thaliana*'nın yaprak alanında (piksel) değişim. K: Kontrol, 1B: 1 mM H₃BO₃ uygulaması, 3B: 3 mM H₃BO₃ uygulaması. Ondört bağımsız biyolojik tekrardan gelen ortalama ve standart hata gösterilmektedir ($p < 0,05$). Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti (*) kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. (Changes in leaf area (pixel) in *Arabidopsis thaliana* under toxic B treatments. K: control, 1B: 1 mM H₃BO₃ treatment, 3B: 3 mM H₃BO₃ treatment. The mean and standard error from fourteen independent biological replicates are shown ($p < 0.05$). An asterisk above the error bars represents significant differences between control and B-toxicity-treated samples.)



Şekil 3. *Arabidopsis thaliana*'da toksik B uygulamaları altında miR393'ün ekspresyon seviyelerindeki değişim. K: Kontrol, 1B: 1 mM H₃BO₃ uygulaması, 3B: 3 mM H₃BO₃ uygulaması. Üç bağımsız biyolojik tekrardan gelen ortalama ve standart hata gösterilmektedir (p<0,05). Hata çubukları üzerindeki yıldız işareti (*) kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. (Changes in expression level of miR393 in *Arabidopsis thaliana* under toxic B treatments. K: control, 1B: 1 mM H₃BO₃ treatment, 3B: 3 mM H₃BO₃ treatment. The mean and standard error from three independent biological replicates are shown (p<0.05).) An asterisk above the error bars represents significant differences between control and B-toxicity-treated samples.

diği genlerin GO zenginleştirme analizine göre başlıca Biyolojik Süreçleri şu şekildedir: Polen matürasyonu, Oksin ile aktifleşmiş sinyal yolağı, Oksin uyarısına hücrel cevap, SCF-bağımlı proteozomal ubikuitin-bağımlı protein katabolik süreç, Stamen gelişimi, Floral organ gelişimi, Gelişimsel matürasyon, Proteazom aracılı ubikuitin bağımlı protein katabolik süreç, Çiçek gelişimi, Oksin yanıtı, Hormon aracılı sinyal yolağı, Hormon uyarısına hücrel cevap, Organik maddeye hücrel cevap, Hücrel makromolekül katabolik süreç, Hormon cevabı, Endojen uyarıcı cevabı ve Organik madde cevabı (Tablo 3). miR393'ün hedeflediği

genlerin Gen Ontoloji (GO) Zenginleştirme analizine göre Moleküler Fonksiyonları, Oksin bağlayıcı, İnositol heksakisfosfat bağlayıcı ve Hormon ve alkol bağlayıcı şeklinde kategorize edilebilir (Tablo 4).

4. Tartışma (Discussion)

Bitki miRNA'ların 2002'de önemli bir post-transkripsiyonel düzenleyici olarak bulunuşunun ardından [37] bitki büyüme ile gelişiminde önemli rollerinin önerilmesiyle [38], çevresel strese cevaba olan katkılarının ileri ki çalışmalarla incelenmesi [39,40] miRNA'ları gündemde önemli bir yere getirmiştir. Bu çalışmalarda miRNA'ların bitkilerdeki birçok çevresel stresin adaptif cevabında bulunduğunu öne sürülmüştür [41,42]. Literatürde ilk olacak şekilde, arpa [43] ve turuncgillerde [44] bor toksisitesine cevapta bazı miRNA'nın değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca, çok yakın zamanda, toksik bor koşullarına maruz kalan *A. thaliana*'da jasmonat ve etilen mekanizmalarıyla ilişkili olan transkripsiyon faktörlerinin hedeflediği miRNA'ların ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir [45]. Buna göre; miR159, miR319, miR394 ve miR172 ekspresyon seviyeleri orta seviyede bor toksisitesi altında dramatik bir şekilde artarken, daha şiddetli B toksisitesi uygulaması altında ilginç bir şekilde bu miRNA'ların ekspresyonu kontrol koşullarına göre değişmediği önerilmiştir. Bu çalışmada ise; literatürde ilk defa miR393'ün ekspresyon seviyesi *A. thaliana*'da 1 ve 3 mM B koşulları altında belirlenmiştir. Buna göre *A. thaliana*'da orta ve şiddetli seviyelerde toksik bor uygulamaları, miR393'ün ekspresyonunu yaklaşık 3 kat arttırmıştır. *A. thaliana*'da miR393'ün başlıca hedefleri oksin reseptörlerini kodlayan F-box genleri (Transport Inhibitor Response Protein1 (*TIR1*), Auxin Signaling F Box Protein 2 (*AFB2* ve *AFB3*)) ve bHLH transkripsiyon faktörüdür [46-48] (Tablo 3). İlişkili olarak, bir önceki çalışmamızda bHLH ekspresyon

Tablo 2. miR393'ün olası hedeflediği genlerden bazıları. ath-miR393a-5p: UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUCC, ath-miR393a-3p: AUCAUGCUAUCUCUUUGGAUU, AGI: Arabidopsis Genome Initiative, (Some of the possible target genes of miR393).

miRNA	Hedef Gen AGI Kodu	Beklenen Değer	Hedef Gen Tanımı
ath-miR393a-5p	AT1G12820	1.0	auxin sinyal F-box 3 (AFB3)
ath-miR393a-5p	AT3G26810	1.0	auxin sinyal F-box 2 (AFB2)
ath-miR393a-5p	AT3G62980	1.0	F-box/RNI benzeri süper ailya protein (TIR1)
ath-miR393a-3p	AT1G26850	2.0	S-adenosil-L-metionin-bağımlı metiltransferaz süper ailya p
ath-miR393a-5p	AT4G03190	2.0	GRR1-benzeri protein 1 (GRH1)
ath-miR393a-5p	AT3G23690	2.5	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-bağlanma süper ailya prc
ath-miR393a-3p	AT5G65930	3.0	Kinezin benzeri kalmodulin-bağlanma proteini
ath-miR393a-3p	AT3G19420	3.0	PTEN 2
ath-miR393a-5p	AT2G38470	3.0	WRKY DNA-bağlanma protein 33 (WRKY33)
ath-miR393a-5p	AT5G65700	3.0	Lösin-zengin reseptör benzeri protein kinaz ailya proteini (BA
ath-miR393a-5p	AT2G24210	3.0	Terpen sentaz 10 (TPS10)
ath-miR393a-5p	AT5G11380	3.0	1- deoksi-D-ksilüloz 5-fosfat sentaz 3 (DXPS3)
ath-miR393a-3p	AT1G61350	3.5	ARM tekrar süper ailya proteini
ath-miR393a-3p	AT3G23020	3.5	Tettrapeptid tekrar (TPR) benzeri süper ailya proteini
ath-miR393a-3p	AT3G13040	3.5	myb-benzeri HTH transkripsiyonel regülatör ailya proteini

Tablo 3. miR393'ün hedeflediği genlerin GO zenginleştirme biyolojik süreç analizi (GO enrichment biological process analysis of genes targeted by miR393).

GO: Biyolojik Süreç	Kat Zenginleştirme	İşlenmemiş p-değeri
Polen matürasyonu	> 100	9.42E-10
Oksin ile aktifleşmiş sinyal yolağı	> 100	2.48E-08
Oksin uyarısına hücrel cevap	90.93	1.23E-07
SCF-bağımlı proteozomal ubikuitin-bağımlı protein katabolik süreç	72.53	2.92E-07
Androecium gelişimi	72.53	7.77E-09
Stamen gelişimi	72.53	7.77E-09
Floral whorl development	39.46	1.48E-07
Floral organ gelişimi	31.34	4.51E-07
Gelişimsel matürasyon	30.93	7.90E-06
Proteazom aracılı ubikuitin bağımlı protein katabolik süreç	24.18	2.04E-05
proteazomal protein katabolik süreç	22.82	2.56E-05
Çiçek gelişimi	21.51	2.78E-06
Üreme sürgün sistem gelişimi	20.64	3.39E-06
Oksin yanıtı	20.38	3.95E-05
Hormon aracılı sinyal yolağı	18.00	6.54E-06
Polen gelişimi	17.61	6.92E-05
Gametofit gelişimi	16.52	9.88E-06

Tablo 4. miR393'ün hedeflediği genlerin GO zenginleştirme moleküler fonksiyon analizi. (GO enrichment molecular function analysis of genes targeted by miR393).

GO: Moleküler Fonksiyon	Kat Zenginleştirme	İşlenmemiş p-değeri
Oksin bağlayıcı	> 100	6.40E-11
Inositol heksakisfosfat bağlayıcı	> 100	1.14E-09
Hormon bağlayıcı	> 100	7.54E-09
Alkol bağlayıcı	> 100	1.58E-08

seviyesi, bor toksisitesi altında hassas ve tolerant buğday çeşitlerinin yaprak ve kök dokularında aşağı yönlü regüle olduğu ve bu transkripsiyon faktörünün, bitkilerdeki bor toksisitesi yanıtına katılabileceği bildirilmiştir [20]. miR393 ve hedef genlerinin düzenleyici modülünün kök yapısının kontrolü [49], yaprak gelişiminin düzenlenmesi [50] ve normal bitki büyümesinin sağlanması [51] gibi oksin cevabını manipüle eden birçok fonksiyonu olduğu keşfedilmiştir [52]. Bu miRNA'nın aynı zamanda biyotik ve abiyotik stres ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir [53,54]. Pirinçte yapılan benzer araştırmalar, miR393'ün biyolojik fonksiyonlarının ve oksin yolağı ile düzenlenme mekanizmasının yüksek bitkilerde korunmuş olduğunu kanıtlamıştır [55-57]. B toksisitesine benzer şekilde, miR393'ün *A. thaliana*'da [53], pirinçte [58] ve şeker kamışında (*Saccharum spp.*) [59] kuraklık stresi sırasında yukarı yönlü regüle olduğu bildirilmiştir.

miR393'ün hedefi, *A. thaliana*'da oksin reseptörü olan TIR1'i kodlar. TIR1 enzimi ubikitinasyon yolu ile Aux/IAA proteinlerinin degradasyonunu destekleyerek oksin sinyallenmesinin pozitif bir regülatördür [60]. Ya-

kın zamanda yapılan bir çalışmada miR393'ün aşırı eksprese edildiği pirinç fidelerinin büyümesinin 1 günlük kuraklık uygulamasıyla kontrol bitkilerine kıyasla bastırıldığı bildirmiştir [57]. miR393'ü aşırı eksprese eden pirinçler aynı zamanda sentetik oksin analog uygulamalarına karşı aşırı duyarlılık göstermiştir [57]. Bu nedenle, artan miR393 seviyeleri, oksin sinyallenmesini aşağı regüle eder ve kuraklık stresi altında bitki büyümesini azaltabilir. Ayrıca, miR393'ün inhibe edildiği transgenik *A. thaliana* bitkisinde yaban tipe göre *AtTIR1*, *AtAFB1*, *AtAFB2*, ve *AtAFB3* ekspresyonları artmış ve bu transgenik bitkilerin tuz ve absisik asit streslerine karşı dirençleri artmıştır [61]. Dolayısıyla, *A. thaliana* bitkisinde miR393'ün kısmı de olsa fonksiyon kaybı tuz stresine karşı tolerans kazandırmıştır [61]. Kuraklık stresine ve tuz streslerine benzer şekilde, bor toksisitesi altında tespit edilen büyüme geriliği, miR393 hedefli oksin reseptör regülasyonu ve bHLH transkripsiyon faktörü ile ilişkili olabilir. Bu nedenle, miR393 inhibisyonuna yönelik yaklaşımlar, bor toksisitesine karşı tolerant bitkiler yetiştirme amacıyla kullanılabilir.

5. Sonuçlar (Conclusions)

Sonuç olarak, bor toksisitesinin artan konsantrasyonuna karşılık, *A. thaliana* yapraklarında kısmi sararma ve büyüme geriliği artmıştır. Öte yandan, *A. thaliana*'da 1B ve 3B uygulamaları, miR393 ekspresyonunu 3 kata yakın artışa sebep olmuştur. Bor toksisitesi altında tespit edilen büyüme geriliği, miR393 hedefli oksin reseptör regülasyonu ve bHLH transkripsiyon faktörü ile ilişkili olabilir. Dolayısıyla, miR393 inhibisyonuna veya *AtTIR1*, *AtAFB1*, *AtAFB2*, ve *AtAFB3* aşırı ekspresyonuna yönelik yaklaşımlar bor toksisitesine karşı tolerant bitkiler yetiştirme amacıyla kullanılabilir.

Teşekkür (Acknowledgement)

Bu çalışmanın oluşmasında desteklerinden dolayı Dr. Doğa Selin KAYIHAN'a ve öğrencilerim Su Naz MUTLU, İrmak YILMAZ ve Melis Vuşlat TUNÇ'a teşekkür ederim.

Kaynaklar (References)

- [1] Warrington K., The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants, *Ann. Bot.*, 37, 629-672, 1923.
- [2] Landi M., Degl'Innocenti E., Pardossi A., Guidi L., Antioxidant and photosynthetic responses in plants under boron toxicity: a review, *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, 7 (3), 255-270, 2012.
- [3] Nable R. O., Bañuelos G. S., Paull J. G., Boron toxicity, *Plant Soil*, 193, 181-198, 1997.
- [4] Mengel K., Kirkby E. A., Principles of Plant Nutrition, 5th edition, Springer, Hollanda, 2001.
- [5] Reid R., Hajes J. E., Post A., Stangoulis J. C. R., Graham R. D., A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants, *Plant Cell Environ.*, 25, 1405-1414, 2004.
- [6] Bennett W. F., Nutrient Deficiencies and Toxicities in Crop Plants, 1st Edition, APS, A.B.D., 1993.
- [7] Fitzpatrick K. L., Reid R. J., The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley roots, *Plant Cell Environ.*, 32, 1357-1365, 2009.
- [8] Reid R., Understanding the boron transport network in plants, *Plant Soil*, 385, 1-13, 2014.
- [9] Macho-Rivero M. A., Herrera-Rodríguez M. B., Brejcha R., Schaffner A. R., Tanaka N., Fujiwara T., González-Fontes A., et al., Boron toxicity reduces water transport from root to shoot in Arabidopsis plants. Evidence for a reduced transpiration rate and expression of major PIP aquaporin genes, *Plant Cell Physiol.*, 59, 841-849, 2018.
- [10] Princi M. P., Lupini A., Araniti F., Longo C., Mauceri A., Sunseri F. Abenavoli M. R., Plant Metal Interaction, Chap. 5: Boron Toxicity and Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives, Elsevier, 2016.
- [11] Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V., Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Ann. Bot.*, 91, 179-194, 2003.
- [12] Cervilla L. M., Blasco B., Rios J. J., Rosales M. A., Sanchez-Rodriguez E., Rubio-Wilhelmi M. M., Romero L., et al., Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants, *J. Bot.*, 1-17, 2012.
- [13] Pardossi A., Romani M., Carmassi G., Guidi L., Landi M., Incrocci L., Maggini R., et al., Boron accumulation and tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) with green or purple leaves, *Plant Soil*, 395, 375-389, 2015.
- [14] Ardic M., Sekmen A. H., Tokur S., Ozdemir F., Turkan I., Antioxidant response of chickpea plants subjected to boron toxicity, *Plant Biol.*, 11, 328-338, 2009.
- [15] Reid R. J., Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley, *Plant Cell Physiol.*, 48, 1673-1678, 2007.
- [16] Reid R. J., Fitzpatrick K. L., Redistribution of boron in leaves reduces boron toxicity, *Plant Signaling Behav.*, 4 (11), 1091-1093, 2009.
- [17] Schnurbusch T., Hayes J., Hrmova M., Baumann U., Ramesh S. A., Tyerman S. D., Langridge P., et al., Boron toxicity tolerance in barley through reduced expression of the multifunctional aquaporin *HvNIP2;1*, *Plant Physiol.*, 153, 1706-1715, 2010.
- [18] Landi M., Guidi L., Pardossi A., Tattini M., Gould, K. S., Photoprotection by foliar anthocyanins mitigates effects of boron toxicity in sweet basil (*Ocimum basilicum*), *Planta*, 240, 941-953, 2014.
- [19] Öz M. T., Yılmaz R., Eyidoğan F., de Graaff L., Yücel M., Öktem H. A., Microarray analysis of late response to boron toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves, *Turk. J. Agric. For.*, 33, 191-202, 2009.
- [20] Kayihan C., Öz M. T., Eyidogan F., Yucel M., Öktem H. A., Physiological, biochemical, and transcriptomic responses to boron toxicity in leaf and root tissues of contrasting wheat cultivars, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 35, 97-109, 2017.
- [21] Zhang B., MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress, *J. Exp. Bot.*, 66, 1749-1761, 2015.
- [22] Ma X., Cao X., Mo B., Chen X., Trip to ER: MicroRNA-mediated translational repression in plants, *RNA Biol.*, 10, 1586-1592, 2013.
- [23] Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P., Bartel B., MicroRNAs and their regulatory roles in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 19-53, 2006.
- [24] Kraft E., Stone S. L., Ma L., Su N., Gao Y., Lau O. S., Deng X. W., et al., Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 139, 1597-1611, 2005.

- [25] Liang G., Yang F., Yu D., MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, 62 (6), 1046-1057, 2010.
- [26] Lu Y. B., Yang L. T., Qi Y. P., Li Y., Li Z., Chen Y. B., Huang Z. R., et al., Identification of boron-deficiency-responsive microRNAs in *Citrus sinensis* roots by illumina sequencing, *BMC Plant Biol.*, 14, 123, 2014.
- [27] Huang J. H., Qi Y. P., Wen S. X., Guo P., Chen X. M., Chen L. S., Illumina microRNA profiles reveal the involvement of miR397a in Citrus adaptation to long-term boron toxicity via modulating secondary cell-wall biosynthesis, *Sci. Rep.*, 6, 22900, 2016.
- [28] Kramer M. F., Stem-loop RT-qPCR for miRNAs, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 95 (1), 5-10, 2011.
- [29] Gautam V., Singh A., Singh S., Sarkar A. K., An efficient LCM based method for tissue specific expression analysis of genes and miRNAs, *Sci. Rep.*, 6, 21577, 2016.
- [30] Balcells I., Cirera S., Busk P. K., Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers, *BMC Biotech.*, 11, 70, 2011.
- [31] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497, 1962.
- [32] Varkonyi-Gasic E., Wu R., Wood M., Walton E. F., Hellens R. P., Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs, *Plant Methods*, 3, 12, 2007.
- [33] Kayihan D. S., Kayihan C., Çiftçi Y. Ö., Excess boron responsive regulations of antioxidative mechanism at physio-biochemical and molecular levels in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol. Biochem.*, 109, 337-345, 2016.
- [34] Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S., miR-Base: from microRNA sequences to function, *Nucleic Acids Res.*, 47 (D1), D155-D162, 2019.
- [35] Dai X., Zhuang Z., Zhao P. X., psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release), *Nucleic Acids Res.*, 46 (W1), W49-W54, 2018.
- [36] Mi H., Muruganujan A., Ebert D., Huang X., Thomas P. D., PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools, *Nucleic Acids Res.*, 47 (D1), D419-D426, 2019.
- [37] Llave C., Xie Z., Kasschau K. D., Carrington J. C., Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA, *Science*, 297 (5589), 2053-2056, 2002.
- [38] Bartel D., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116 (2), 281-297, 2004.
- [39] Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P., Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress induced miRNA, *Mol. Cell*, 14 (6), 787-799, 2004.
- [40] Zhang B. H., Pan X. P., Wang Q. L., Cobb G. P., Anderson T. A., Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis, *Cell Res.*, 15, 336-360, 2005.
- [41] Hsieh L. C., Lin S. I., Shih A. C. C., Chen J. W., Lin W. Y., Tseng C. Y., Li W. H., et al., Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing, *Plant Physiol.*, 151, 2120-2132, 2009.
- [42] Wu J., Zhang Y., Zhang H., Huang H., Folta K. M., Lu J., Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurens* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology, *BMC Plant Biol.*, 10, 234, 2010.
- [43] Ozhuner E., Eldem V., Ipek A., Okay S., Sakcali S., Zhang B., Boke H., et al., Boron stress responsive microRNAs and their targets in barley, *PLoS ONE*, 8 (3), e59543, 2013.
- [44] Huang J. H., Qi Y. P., Wen S. X., Guo P., Chen X. M., Chen L. S., Illumina microRNA profiles reveal the involvement of miR397a in citrus adaptation to long-term boron toxicity via modulating secondary cell-wall biosynthesis, *Sci. Rep.*, 6, 22900, 2016.
- [45] Kayihan D. S., Kayihan C., Çiftçi Y. Ö., Moderate level of toxic boron causes differential regulation of microRNAs related to jasmonate and ethylene metabolisms in *Arabidopsis thaliana*, *Turk. J. Bot.*, 43, 167-172, 2019.
- [46] Kepinski S., Leyser O., The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor, *Nature*, 435 (7041), 446-451, 2005.
- [47] Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M., The F-box protein TIR1 is an auxin receptor, *Nature*, 435 (7041), 441-445, 2005.
- [48] Dharmasiri N., Dharmasiri S., Weijers D., Lechner E., Yamada M., Hobbie L., Ehrismann J. S., et al., Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins, *Dev. Cell*, 9 (1), 109-119, 2005.
- [49] Vidal E. A., Araus V., Lu C., Parry G., Green P. J., Coruzzi G. M., Gutierrez R. A., Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (9), 4477-4482, 2010.
- [50] Si-Ammour A., Windels D., Arn-Boulidoires E., Kutter C., Ailhas J., Meins F., Vazquez F., miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the TIR1/AFB2 auxin receptor clade and auxin-related development of *Arabidopsis* leaves, *Plant Physiol.*, 157, 683-691, 2011.
- [51] Chen Z. H., Bao M. L., Sun Y. Z., Yang Y. J., Xu X. H., Wang J. H., Han N., et al., Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in *Arabidopsis*, *Plant Mol. Biol.*, 77 (6), 619-629, 2011.
- [52] Windels D., Bielewicz D., Ebnetter M., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulinska Z., Vazquez F., miR393 is required for production of proper auxin signalling outputs, *PLoS One*, 9, e95972, 2014.

- [53] Sunkar R., Zhu J. K., Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis, *Plant Cell*, 16, 2001-2019, 2004.
- [54] Navarro L., Dunoyer P., Jay F., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O., et al., A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling, *Science*, 312, 436–439, 2006.
- [55] Gao P., Bai X., Yang L., Lv D., Pan X., Li Y., Cai H., et al., *osa-MIR393*: a salinity- and alkaline stress-related microRNA gene, *Mol. Biol. Rep.*, 38, 237-242, 2011.
- [56] Bian H., Xie Y., Guo F., Han N., Ma S., Zeng Z., Wang J., et al., 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 Phytol.*, 196, 149-161, 2012.
- [57] Xia K., Wang R., Ou X., Fang Z., Tian C., Duan J., Wang Y., et al., *OsTIR1* and *OsAFB2* downregulation via *OsmiR393* overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice, *PLoS One*, 7, e30039, 2012.
- [58] Zhao B., Liang R., Ge L., Li W., Xiao H., Lin H., Ruan K., et al., Identification of drought-induced microRNAs in rice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354, 585-590, 2007.
- [59] Ferreira T. H., Gentile A., Vilela R. D., Costa G. G., Dias L. I., Endres L., Menossi M., microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum spp.*), *PLoS One*, 7, e46703, 2012.
- [60] Dharmasiri S., Estelle M., The role of regulated protein degradation in auxin response, *Plant Mol. Biol.*, 49, 401-409, 2002.
- [61] Long R., Li M., Li X., Gao Y., Zhang T., Sun Y., Kang J., et al., A novel miRNA sponge form efficiently inhibits the activity of miR393 and enhances the salt tolerance and ABA insensitivity in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 35, 409-415, 2017.