

Arabidopsis thaliana'daki ath-mir156 Gen Ailesinin in Silico Analizi In Silico Analysis of the ath-mir156 Gene Family in *Arabidopsis thaliana*

Merve BALABAN

Siirt Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Siirt, Türkiye

<https://orcid.org/0000-0000-0002-4188-1110>

Behcet İNAL*

Siirt Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Siirt, Türkiye

<https://orcid.org/0000-0003-2215-2710>

Araştırma Makalesi

Geliş Tarihi

16/08/2022

Kabul Tarihi

26/08/2022

Özet

MikroRNA (miRNA), gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde işlev gören küçük (~ 22 nükleotid) kodlamayan bir RNA molekülüdür. Önceki çalışmalar, miRNA'nın bitkilerin olumsuz koşullara karşı direnç kabiliyetinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışmada, önemli bir model organizma olan *Arabidopsis thaliana*'da miR156 ailesine dizilerin olgun, öncül ve promotor dizi karakterizasyonu yapılmıştır. Biyoinformatik yaklaşımı kullanarak, ath-miR156 gen promotörlerinde öngörülen cis düzenleyici elementleri ve aynı anda miR156 hedefli genleri tahmin edilmiştir. Sonuçlar, olgun ath-miR156 dizilerinde yüksek koruma olduğunu, ancak öncü dizilerde olmadığını göstermiştir. ath-miR156 gen promotörlerinde bulunan çeşitli cis düzenleyici elementlerin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arabidopsis, kodlamayan RNA, miR156, mikroRNA.

Research Article

Received

16/08/2022

Accepted

26/08/2022

DOI

10.5281/zenodo.7236645

Abstract

MicroRNA (miRNA) is a small (~22 nucleotides) non-coding RNA molecule that functions in the post-transcriptional regulation of gene expression. Previous studies have shown that miRNA plays an important role in the ability of plants to resist adverse conditions. In this study, mature, precursor and promoter sequence characterization of miR156 family sequences in *Arabidopsis thaliana*, an important model organism, was performed. Using the bioinformatic approaches, predicted cis regulatory elements in ath-miR156 gene promoters and simultaneously miR156 targeted genes were predicted. The results showed high conservation of mature ath-miR156 sequences, but not leader sequences. Various cis regulatory elements have been identified in the ath-miR156 gene promoters.

Keywords: Arabidopsis, microRNA, non-coding RNA, miR156.

1. Giriş

MikroRNA'lar (miRNA'lar) bitki ve hayvanlarda transkripsiyon sonrasında mRNA'ların parçalanması veya belirli genlerin ekspresyonunun baskılanması yoluyla gen düzenlemesinde önemli işlevlere sahip 20-24 nükleotit uzunluğunda kodlamayan RNA'lardır.

Polimeraz 2 tarafından DNA'dan sentezlenen primer miRNA, DGCR8 proteini tarafından tanınır. Drosha&DGCR8 kompleksi etkileşerek RNA moleküllerini kesip prekürsör microRNA'yı oluşturur. Prekürsör microRNA artık bir veya daha çok genin mRNA'sını inaktive edebilmek için taşıyıcı molekül yardımıyla sitoplazmaya geçip DICER tarafından tanınır. DICER öncül diziyi (stem loop) keser ve kısa çift zincirli mikroRNA molekülünü oluşturur. Sonraki adımda Argonaute protein 2 (Ago2), DICER ile etkileşir microRNA sarmalı çözülür ve tek zincirli iplik salınır. Ago2'de kalan zincir (rehber zincir olarak adlandırılır) bazı ilave proteinler ile RISC kompleksi oluşturmak için etkileşir. Bu kompleks artık hedef genin mRNA'sının 3' UTR (untranslated region) kısmına komplementer olarak bir veya birden çok geni inaktive edebilir (1-4).

Hemen hemen tüm ökaryotlarda tanımlanmış olan miRNA'lar gen ifadesi dengesini sağlamak ve çevresel stres faktörlerine karşı adaptasyona izin vermek için transkripsiyon faktörleri ile birlikte hareket ederler (5,6). Olgun miRNA dizileri öncül dizilerinden türetilmektedir. Wang ve arkadaşları çalışmalarında, çeşitli üyelerin bazı miRNA ailelerinin aynı olgun miRNA dizilerine sahip olduğu ancak farklı öncüllerden türetildiğini buna ilaveten aynı öncüllere sahip olan miRNA'ların farklı çeşitlilikte olgun dizilere dönüştüğünü bildirmişlerdir (7,8). miRNA genlerinin öncül dizilerinin aydınlatılması ve analizi miRNA promotörlerinin bulunmasına ve fonksiyonlarını anlamaya yardımcı olacaktır.

Bitkilerde tanımlanan ilk miRNA miRNA156 ailesi üyeleridir (9). Mir156 bitki büyümesinin geçişini düzenlemede, çiçek ve bitki mimarisinde, hedef gen olan SQUAMOSA promotör bağlayıcı protein benzeri (SPL)'lerini negatif yönde modüle ederek çiçek gelişimi ve meyve kabuğu renginin oluşumunda rol oynamaktadır (6,10).

SPL Klad-I genleri büyük boyutları, miRNA156 ve miR157 bağlanma bölgelerinin eksiklikleri ve bitkinin farklı organları arasında ifade edilmeleri ile karakterize edilir (11-13). Klad-I genlerine benzer şekilde, SPL Klad-II üyeleri nispeten büyüktür ancak Klad-III genleri daha kısa uzunluktadır. Her ikisi de miR156 ve miR157 tarafından negatif düzenlemeden yoksundur. miR156 ve miR157 mutantlarındaki dizi analizleri ve ifade verileri, klad-IV SPL genlerinin miR156 ve miR157'nin her ikisi tarafından da düzenlendiğini göstermektedir (12,14).

miR156 ailesi bitkiler aleminde yüksek oranda korunmuştur ve çok sayıda bitki türünde tespit edilmiştir (15,16). Düşük gimnospermler bitkilerin yanı sıra çok sayıda monokotiledon ve dikotiledon bitkiler dahil olmak üzere yüksek bitki Magnoliophyta'lara kadar uzak akraba türlerde de bulunmuştur (17-19). Farklı bitki türleri arasında miR156'lar, 1 ila 31 arasında değişiklik göstermekte olup toplam varyasyon düşük yapılı bitkilerden yüksek yapılı bitkilere doğru artan bir eğilim göstermektedir (10).

miR156, dikkate değer bir biçimde hayvan miRNA'sına benzerliği nedeniyle ilk olarak *Arabidopsis thaliana*'da tanımlanmıştır (20). *Arabidopsis thaliana*, bitki biyolojisinde model organizma olarak yaygın bir şekilde kullanılan küçük çiçekli bir bitkidir. *Arabidopsis*, lahana ve turp gibi kültür türlerini içeren hardal (*Brassicaceae*) ailesinin bir üyesidir. *Arabidopsis* tarımsal açıdan büyük bir öneme sahip değildir, ancak küçük genom boyutu ve yetiştirme kolaylığı, genetik ve moleküler biyolojide temel araştırmalar için önemli avantajlar sunar. Genomik dizileme *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*, *Brassicaceae*)'da 16 SPL genini ortaya çıkarmıştır. Bu genler uzun ve kısa olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir; bunlardan ikincisi büyük ölçüde miR156 ve miR157 mikroRNA'ları tarafından düzenlenmektedir (10,11,21).

Bu çalışmada biyoinformatik araçlar kullanılarak, ath-miR156 mikro RNA ailesinin olgun ve öncül dizilerinin karakterize edilmesi ve bu miRNA'lara ait promotör dizilerini tespit etmek ve promotörlerinde bulunan cis-düzenleyici elementlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Analizden elde edilen bulgularla miR156'nın bitki türlerinde korunmuş dizi analizi ve çeşitliliğin anlaşılmasında literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Genomik analiz

Ath-miR156'ya ait bütün öncül dizi, olgun dizi ve lokasyon bilgileri miRBase veritabanından elde edilmiştir (<http://www.miRBase.org/>) (22). Sekanslar MEGA11 (23) programı kullanılarak CLUSTALW (24) ile dizilenmiştir.

2.2. Ath-miR156'nın potansiyel promotörlerinin belirlenmesi

Promotör tahmini için, her bir ath-miR156 geninin öncül mikroRNA'larının upstream dizileri Ensembl *Arabidopsis thaliana* genom veritabanından indirilmiştir (25). Öncül-miRNA'nın 5' kısmındaki 1500 bp'lik dizi promotör bölge olarak alınmıştır. TSS'ler (Transkripsiyon Başlangıç Bölgesi), kanonik çekirdek promotör elementlerini - BRE'ler (B tanıma elementi), TATA kutuları, INR'ler (başlatıcı motif) ve DPE'ler (3' promotör elementi) ve bu elementlerin sinerjik kombinasyonlarını taramak için bir araç olan YAPP (Eukaryotic core promoter predictor) (26) ile tahmin edilmiştir. Elde edilen promotörler, pre-miR156'nın 5' kısmına en yakın olanlardır.

2.3 Ath-miR156 ailesinin cis-düzenleyici elemanlarının analizi

Potansiyel promotör bölgeleri (pre-miRNA'ların 5' bölgesindeki 1500 bp'lik bölge) cis-düzenleyici unsurları ve motifleri tahmin etmek için kullanılmıştır. Bitki cis-etkili düzenleyici DNA

elemanları veritabanı olan SOGO NEW PLACE (27), ath-miR156 ailesinin cis-düzenleyici elemanlarını analiz etmek için kullanılmıştır.

2.4. Hedef genlerin tahmini ve işlevleri

Arabidopsis thaliana'nın olgun ath-miR156 dizileri miRBase veritabanından elde edilmiştir. ath-miR156a/b/c/d/e/f/g/h/i/j'nin hedef genleri, psRNATarget (Sürüm 2017) kullanılarak, daha sıkı bir beklenti ≤ 2 kesme eşiği dışında, varsayılan parametreler girilerek tanımlanmıştır. Hedeflenen genlerin bilgilerini doğrulamak için RAP-DB veritabanı kullanılmıştır. Uniprot veritabanı, ath-miR156 hedefli genlerin işlevlerini belirlemek için kullanılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

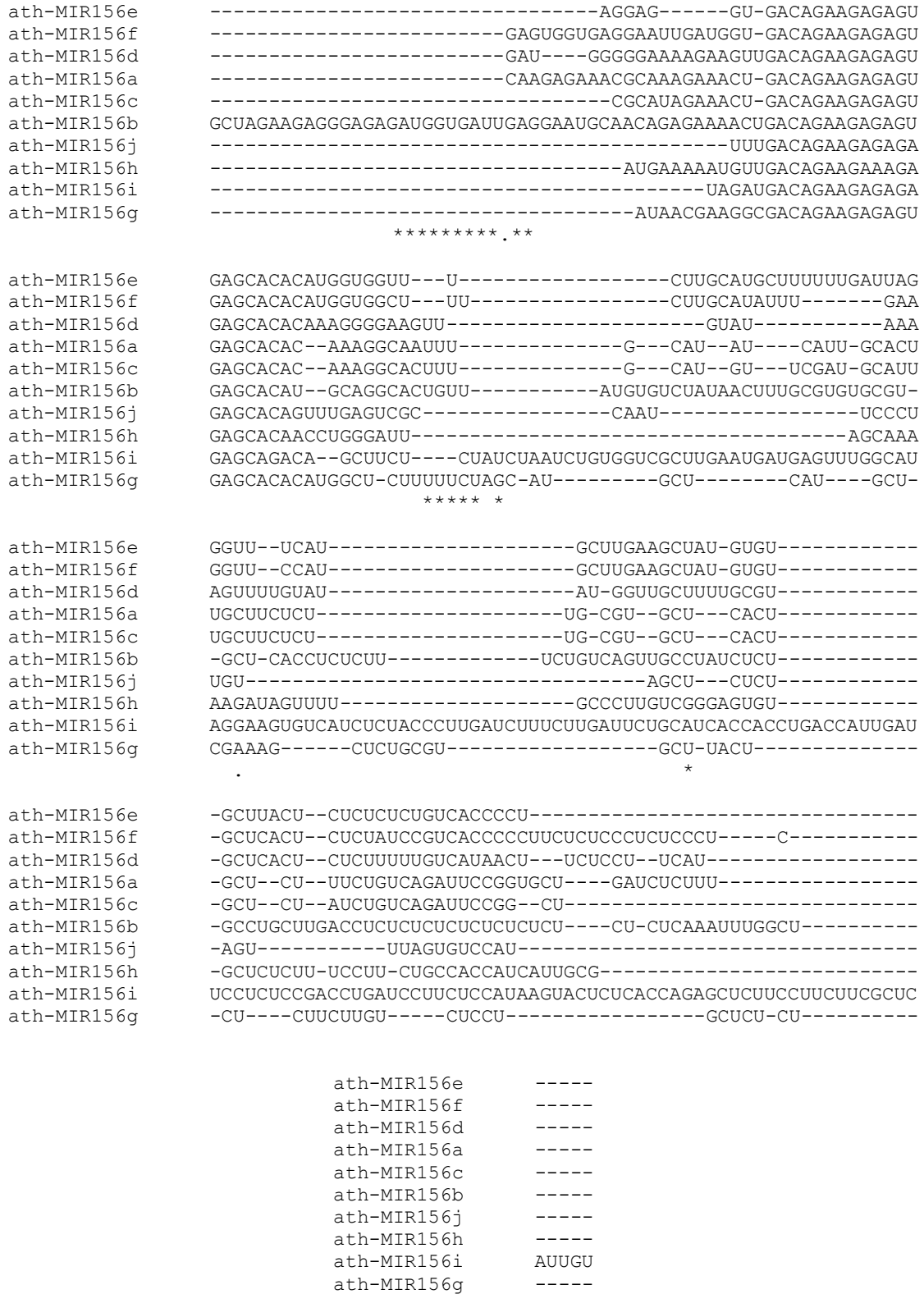
3.1. Ath-miR156 gen ailesi sekans kıyaslanması

miRBase veritabanından elde edilen bilgiler ışığında, *Arabidopsis thaliana*'da miR156 ailesine ait ath-miR156a, ath-miR156b, ath-miR156c, ath-miR156d, ath-miR156e, ath-miR156f, ath-miR156g, ath-miR156h, ath-miR156i ve ath-miR156j'yi içeren 10 gen bulunduğu belirlenmiştir.

miRBase veritabanından elde edilen bilgilere göre miR156a/b/c/d/e/f/g/h/i/j genleri kromozom (chr) üzerinde sırasıyla, chr2: 10676451-10676573; chr4: 15074899-15075081; chr4: 15415418-15415521; chr5: 3456632-3456749; chr5: 3867207-3867313; chr5: 9136106-9136237; chr2: 8412516-8412618; chr5: 22597012-22597117 ve chr1: 19806917-19807113 lokasyonunda yer almaktadır.

Öncül dizi ve olgun diziler kıyaslandığında, tamamen ortak bir baz dizilimine rastlanmadığı görülmüştür (Şekil 1,2). Özellikle stem-loop dizi hizalamasına bakıldığında ath-miR156j'nin diğer miRNA'larından daha kısa bir diziye sahip olduğu görülmüştür. MiR156 öncüllerinin çeşitlendirilmiş dizileri, miR156 gen ekspresyonunun nicelleştirilmesinde primer tasarlanması için yararlı bir kaynak olarak görülmektedir. Daha önce yapılmış bir çalışmada miR156'ailesine ait olgun dizilerin, öncül dizilere göre nisbeten kendi aralarında daha korunmuş olduğu dolayısı ile öncü dizilerin daha değişken olduğunu belirtmişlerdir (10).

Olgun miRNA hizalamasına bakıldığında ath-miR156d-3p ve miR 156a-3p'nin uzunluklarının diğerlerinden daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca ath-miR156e, ath-miR156d-5p, ath-miR156i dizilerinin çok benzer olduğu sadece 14 ve 20. sıradaki bazlarda farklılık bulunduğu gözlenmiştir. Ancak genel olarak incelendiğinde olgun miRNA'lar arasında korunmuş dizilerin olduğu görülmüştür.

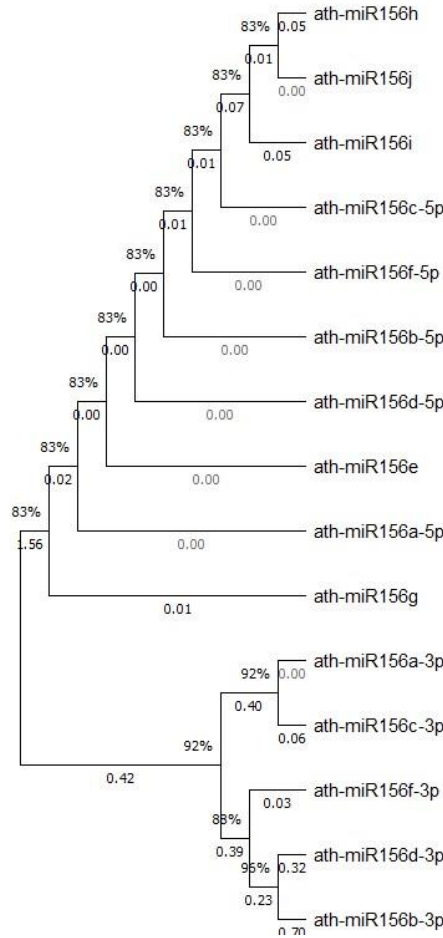


Şekil 1. Arabidopsis thaliana'daki öncül ath-miR156 dizilerinin hizalanması

Arabidopsis thaliana'daki ath-mir156 Gen Ailesinin in Siliko Analizi

Species/Abbrv																				*	*	*	
1. ath-miR156a-5p	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	U	G	A	G	C	A	C			
2. ath-miR156a-3p	G	C	U	C	A	C	U	G	C	U	C	U	U	U	C	U	G	U	C	A	G	A	
3. ath-miR156e	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	U	G	A	G	C	A	C			
4. ath-miR156i	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	U	G	A	G	C	A	G			
5. ath-miR156d-5p	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	U	G	A	G	C	A	C			
6. ath-miR156d-3p	G	C	U	C	A	C	U	C	U	C	U	U	U	U	G	U	C	A	U	A	A	C	
7. ath-miR156b-5p	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	U	G	A	G	C	A	C			
8. ath-miR156b-3p	U	G	C	U	C	A	C	C	U	C	U	U	U	C	U	G	U	C	A	G	U		
9. ath-miR156h	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	A	G	A	G	A	G	C	A	C				
10. ath-miR156f-5p	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	U	G	A	G	C	A	C			
11. ath-miR156f-3p	G	C	U	C	A	C	U	C	U	C	U	A	U	C	C	G	U	C	A	C	C		
12. ath-miR156j	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	U	G	A	G	C	A	C			
13. ath-miR156g	C	G	A	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	U	G	A	G	C	A	C			
14. ath-miR156c-5p	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	U	G	A	G	C	A	C			
15. ath-miR156c-3p	G	C	U	C	A	C	U	G	C	U	C	U	A	U	C	U	G	U	C	A	G	A	

Şekil 2. Arabidopsis thaliana'daki olgun ath-miR156 ailesine ait dizilerinin hizalanması



Şekil 3. miR156 ailesine ait öncül dizilerin oluşturduğu filogenetik sınıflandırılma

miRNA ailesine ait öncül sekansların oluşturduğu NJ filogenetik ağacına bakıldığında miRNA156'ya ait üyelerini temel olarak %96 ve %83 bootstrap değerleri ile ayrıştırılarak iki gruba ayırmıştır. Birinci grupta ath-miR156a-3p, ath-miR156b-3p, ath-miR156c-3p, ath-miR156d-3p, ath-miR156f-3p üyeleri yer almıştır. İkinci grupta ise ath-miR156h, ath-miR156j, ath-miR156i, ath-miR156c-5p, ath-miR156f-5p, ath-miR156b-5p, ath-miR156d-5p, ath-miR156e, ath-miR156a-5p, ath-miR156g üyeleri yer almıştır (Şekil 3).

3.2. Ath-miR156 gen promotörlerinin cis-düzenleyici elementlerinin analizi

YAPP programı kullanılarak ath-miR156 gen promotörleri üzerindeki cis-düzenleyici elementler Tablo 1'de gösterildiği gibi belirlenmiştir. TATA, DPE, INR ve BRE (yalnızca ath-miR156d'de) motifleri bu çalışmada araştırılan bütün miR156 genlerinde tespit edildi.

Cis-düzenleyici elementler, bitki promotörlerinde korunmuş dizilere sahip ve çeşitli stres durumlarına yanıt veren genlerle ilişkilidir (5). Tanımlanan ilk ökaryotik çekirdek promotör elementi olan TATA kutusu, TATATAAG konsensüs dizisine sahiptir ve transkripsiyon başlangıç bölgesinin yaklaşık 29 bp yukarısında ortalanmıştır. INR (Initiator motif), transkripsiyon başlangıç bölgesini kapsar (korunmuş A) ve birden fazla pirimidin (Y) içeren bir konsensüs dizisine sahiptir. İlk olarak Drosophila promotörlerinde ve daha sonra memeli promotörlerinde keşfedilen DPE (downstream promoter element), transkripsiyon başlangıç bölgesinin yaklaşık 31 bp aşağısında ortalanmıştır (28).

Tipik olarak, promotörler TATA kutusu INR, DPE ve BRE (B recognition element) içerirler. Çekirdek promotördeki elementler olan bu elemanlar, sadece transkripsiyonun başlatılmasına aracılık etmekle kalmaz, aynı zamanda düzenleyici bir unsur olarak da işlev görür (19).

TATA kutusu iyi karakterize edilmiş bir promotör elementidir. Bu çalışmada, araştırılan promotörlerde düzinelere TATA kutusu bulunmuştur (Tablo 1). Bu da MIR156'ların işlevsel evriminin yanı sıra MIR156'larda TATA kutusunun yüksek oranda korunduğunu göstermektedir.

Tablo 1. YAPP programı kullanılarak promotör bölge cis-düzenleyici elementlerin analizi

Core promoter elements	Sinerjik kombinasyonlar									
	ath-mir-156a	ath-mir-156b	ath-mir-156c	ath-mir-156d	ath-mir-156e	ath-mir-156f	ath-mir-156g	ath-mir-156h	ath-mir-156i	ath-mir-156j
INR	3	9	7	2	10	11	11	5	5	7
TATA	8	9	12	4	29	17	11	5	5	15
DPE	7	2	5	2	25	10	6	6	10	10

Arabidopsis thaliana'daki ath-mir156 Gen Ailesinin in Siliko Analizi

Tablo 2. Ath-miR156 gen ailesi 5' düzenleyici bölge dizilerinde tespit edilen potansiyel cis-düzenleyici elementler. 5' düzenleyici bölgedeki 1.5 kb'lık bölgede YAPP ve PLACE programı kullanılarak tespit edilen diziler

Cis-regülatör elementler	Sekans	miR156									
		A	b	c	d	e	f	g	h	i	j
WRKY71OS	TGAC	3	8	6	8	7	5	8	15	8	9
WBBOXPCWRKY1	TTTGACY	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1
TATABOX3	TATTAAT	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0
MYBCOREATCYCB1	AACGG	1	0	1	2	2	1	0	3	0	0
MYB2AT	TAACGTG	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	1	0	0	1	2	0	0	1	2	3
MYBCORE	CNGTTR	1	3	4	2	4	2	2	3	4	3
MYB1AT	WAACCA	0	2	2	4	1	2	3	3	2	4
MYBST1	GGATA	0	2	0	1	5	2	0	1	3	0
MYB1LEPR	GTTAGTT	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0
MYBPLANT	MACCWAMC	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
MYBGAHV	TAACAAA	0	0	0	1	0	2	1	0	1	0
MYBATRD22	CTAACCA	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2
MYBPZM	CCWACC	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
MYCCONSUSAT	CANNTG	6	2	10	2	20	8	16	12	8	10
MYCATERD1	CATGTG	0	0	0	1	1	1	2	0	0	2
MYCATRD22	CACATG	0	0	0	1	1	1	2	0	0	2

PLACE programı kullanılarak elde edilen bulgular ışığında, ath-miR156e geni en yüksek sayıda/çeşitlilikte cis-düzenleyici elementlere sahiptir. Bunu takip eden sırasıyla ath-miR156h/j/g/i/c=d/f/b/a olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte cis-düzenleyici element çeşitliliği kıyaslandığında miR156c ve miR156d en çeşitlilik taşıyan genler olarak belirlenmiştir.

Arabidopsis'te, miR156d ve miR156f, AT5G10946 ve AT5G26146 genlerinin intronunda aynı yönde tanımlanmıştır. İlginç şekilde SPL geninin ekzonları içinde kendi kendini düzenleyen bir mekanizma sağlamaktadır (10).

Önceki çalışmalar, Arabidopsis'te miR156b/miR156c ve miR156e/miR156f gibi tandem duplikasyon olarak karakterize edilen hemen hemen tüm miR156 ailesi üyelerinin aynı intergenik bölge içinde meydana geldiğini göstermiştir (29). Ath-miR156 gen promotörlerinde bulunan cis-düzenleyici unsurları üzerine yapılan analiz, miRNA'ların işlevlerini tanımak için önemli bir destek sunabilir (10).

TATA elementleri (Tablo 2) bitki hormonal sinyaline verilen yanıtın düzenlenmesinde muhtemel bir rol oynamıştır (10,19). MYC ve MYB bağlanma bölgeleri (Tablo 2) sırasıyla absisik aside yanıt ve kuraklık indüksiyonunda yer alır (10). WRKY elementleri bitki immun defans sisteminde görev alır (30). Bu da miR164 gen ailesinin kuraklık, absisik asit, biyotik ve abiyotik durum koşullarında yüksek oranda düzenlendiğini gösterir. MIR156 genlerinin çoğunun hipoksi, düşük sıcaklıklar ve dehidrasyon stresi yanıt süreçlerinde önemli olduğunu gösterilmiştir. Özellikle, tüm miR156'lar bitki büyümesi ve gelişiminin birçok yönünü düzenleyen ışığa duyarlılık yolunda yer almıştır (10).

Bu sonuçlar, miRNA öncü dizilerinin filogenetik analizinin miRNA'ların evrimsel geçmişini daha net bir şekilde yansıtabileceğini, miRNA olgun dizilerinin ise miRNA'ların korunma özelliğini gösterebileceğini güçlü bir şekilde doğrulamıştır (10).

3.3. Ath-miR156 hedef genlerin tanımlanması

Arabidopsis'te miR156, SQUAMOSA'nın 10 üyesini hedeflemektedir. Bunlar, promotör bağlama protein gibi (SPL) transkripsiyon faktörleri ailesinden (SPL2, SPL3, SPL4, SPL5, SPL6, SPL9, SPL10, SPL11, SPL13, SPL15) genleridir. Tek gen mutasyonlarının işlev kazanımı veya işlev kaybı fenotipi, bu aileler içinde yüksek derecede işlevsel fazlalık ortaya koymaktadır.

SPL3'ün fonksiyon kaybı mutasyonlarının belirgin bir fenotipi yoktur, ancak bu genin veya onun yakından ilişkili paralogları olan SPL4 ve SPL5'in yapısal ekspresyonu erken çiçek açan bir fenotip üretir, yaprağın eksen dışı yüzeyinde trikomların üretimini hızlandırır (31,32) ve hücre boyutunda ve yetişkin yapraklara özgü hücre sayısında değişiklikleri sağlar (33). SPL9'un aşırı ekspresyonu, yaprak başlama oranını azaltır ve yaprak boyutunu artırır (34) ve benzer bir fenotip, SPL15'in bir fonksiyon kazancı mutantında gözlenir (33). SPL9 veya SPL15'teki fonksiyon kaybı mutasyonlarının gelişim üzerinde minör etkileri vardır. Bu ilgili genler için çifte mutant bitkiler, tek mutantlardan daha güçlü bir fenotipe sahiptir, bu da onların hem vejetatif faz değişimini hem de çiçeklenmeyi desteklediğini ortaya koymaktadır (34,35).

4. Sonuçlar

In silico yaklaşımlar kullanılarak Arabidopsis thaliana'daki miR156 gen ailesinin incelendiği bu çalışmada promotör bölgede çeşitli stres faktörleriyle ilişkili cis düzenleyici elementlerin bulunduğu, olgun ath-miR156'ların yüksek korunmuş diziler barındırdığı ancak öncül dizilerde korunmuş dizilere rastlanmadığı belirlenmiştir.

Kaynaklar

1. microRNAs – function & biogenesis [Internet]. [cited 2022 Aug 16]. Available from: <https://www.tamirna.com/micrornas-function-biogenesis/>
2. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009 Feb;136(4):642–55.
3. Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell. 2009 Feb;136(4):669–87.
4. Axtell MJ. Classification and comparison of small RNAs from plants. Annu Rev Plant Biol. 2013;64:137–59.
5. Sollome J, Martin E, Sethupathy P, Fry RC. Environmental contaminants and microRNA regulation: Transcription factors as regulators of toxicant-altered microRNA expression. Toxicol Appl Pharmacol. 2016 Dec;312:61–6.
6. Yue E, Tao H, Xu J. Genome-wide analysis of microRNA156 and its targets, the genes encoding SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) transcription factors, in the grass family Poaceae. J Zhejiang Univ Sci B. 2021 May;22(5):366–82.
7. Wang C, Shangguan L, Kibet KN, Wang X, Han J, Song C, et al. Characterization of microRNAs identified in a table grapevine cultivar with validation of computationally predicted grapevine miRNAs by miR-RACE. PLoS One. 2011;6(7):e21259.
8. Wang C, Han J, Liu C, Kibet KN, Kayesh E, Shangguan L, et al. Identification of microRNAs from Amur grape (vitis amurensis Rupr.) by deep sequencing and analysis of microRNA

- variations with bioinformatics. BMC Genomics. 2012;13(1):122.
9. Preston JC, Hileman LC. Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. Front Plant Sci. 2013;4:80.
 10. Wang C, Wang Q, Zhu X, Cui M, Jia H, Zhang W, et al. Characterization on the conservation and diversification of miRNA156 gene family from lower to higher plant species based on phylogenetic analysis at the whole genomic level. Funct Integr Genomics. 2019 Nov;19(6):933–52.
 11. Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettessheim K, Saedler H, Huijser P. Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. Gene. 1999 Sep;237(1):91–104.
 12. Salinas M, Xing S, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. Planta. 2012 Jun;235(6):1171–84.
 13. Wang Y, Hu Z, Yang Y, Chen X, Chen G. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SBP-box gene family in grapevine. Russ J Plant Physiol [Internet]. 2010;57(2):273–82. Available from: <https://doi.org/10.1134/S1021443710020160>
 14. Cho SH, Coruh C, Axtell MJ. miR156 and miR390 Regulate tasiRNA Accumulation and Developmental Timing in Physcomitrella patens . Plant Cell [Internet]. 2012;24(12):4837–49. Available from: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103176>
 15. Willmann MR, Poethig RS. Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. Curr Opin Plant Biol. 2007 Oct;10(5):503–11.
 16. Cui J, You C, Chen X. The evolution of microRNAs in plants. Curr Opin Plant Biol. 2017 Feb;35:61–7.
 17. Ren G, Wang B, Zhu X, Mu Q, Wang C, Tao R, et al. Cloning, expression, and characterization of miR058 and its target PPO during the development of grapevine berry stone. Gene [Internet]. 2014;548(2):166–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811191400804X>
 18. Yang J, Liu X, Xu B, Zhao N, Yang X, Zhang M. Identification of miRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile and its maintainer fertile lines of Brassica juncea. BMC Genomics. 2013 Jan;14:9.
 19. Sunkar R, Jagadeeswaran G. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. BMC Plant Biol. 2008 Apr;8:37.
 20. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs in plants. Genes Dev. 2002 Jul;16(13):1616–26.
 21. Cardon GH, Höhmann S, Nettessheim K, Saedler H, Huijser P. Functional analysis of the Arabidopsis thaliana SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. Plant J. 1997 Aug;12(2):367–77.
 22. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42(Database issue):D68–73.
 23. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016 Jul;33(7):1870–4.
 24. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007 Nov;23(21):2947–8.
 25. About Arabidopsis thaliana [Internet]. [cited 2022 Aug 16]. Available from: http://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Index
 26. YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor [Internet]. [cited 2022 Aug 16]. Available from: <http://www.bioinformatics.org/yapp/cgi-bin/yapp.cgi>
 27. Genome Information Database System for Innovation of Crop and Livestock Production [Internet]. [cited 2022 Aug 16]. Available from: <https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en>
 28. Thrall JMH, Goodrich JA. Promoters. In: Maloy S, Hughes K, editors. Brenner's Encyclopedia of Genetics. Second Edi. Massachusetts: Academic Press; 2013. p. 472–4.
 29. Maher C, Stein L, Ware D. Evolution of Arabidopsis microRNA families through duplication events. Genome Res. 2006 Apr;16(4):510–9.
 30. Bektas Y. The synthetic elicitors 2,6-dichloro-isonicotinic acid (INA) and 2,4-dichloro-6-((E)-[(3-methoxyphenyl)imino]methyl)phenol (DPMP) enhances tomato resistance against bacterial

- canker disease with different molecular mechanisms. *Physiol Mol Plant Pathol* [Internet]. 2021;116:101740. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576521001417>
31. Gandikota M, Birkenbihl RP, Höhmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J.* 2007 Feb;49(4):683–93.
 32. Wu G, Poethig RS. Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development.* 2006 Sep;133(18):3539–47.
 33. Usami T, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H. The more and smaller cells mutants of Arabidopsis thaliana identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development.* 2009 Mar;136(6):955–64.
 34. Wang J-W, Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D. Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell.* 2008 May;20(5):1231–43.
 35. Schwarz S, Grande A V, Bujdoso N, Saedler H, Huijser P. The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 2008 May;67(1–2):183–95.