

Bitkilerde RNA interferans

RNA interference in plants

Sümer ARAS¹, Semra SOYDAM-AYDIN², Aslı FAZLIOĞLU¹,
Demet CANSARAN-DUMAN³, İlker BÜYÜK¹, Kürşat DERİCİ⁴

ÖZET

RNA interferans (RNAi) mekanizması, hücreye giren çift zincirli RNA'nın (dsRNA) komplementeri olan mRNA zincirinin degradasyonuna yol açması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma (post-transcriptional gene silencing), ya da gen ifadesinin düzenlenmesi olarak tanımlanır. RNAi mekanizması sırasında, hedef mRNA'ya komplementer dizi, 500 kDa ağırlığında ve nükleaz aktiviteli bir RNA-multi protein kompleksi olan RISC faktörü aracılığı ile mRNA'nın anlamlı dizisine bağlanır ve gen susturulma mekanizması bu RISC faktörü aracılığı ile kontrol edilir. Gen susturulması mRNA'nın RISC faktöründe bulunan 'Argounate' proteinle etkileşime girmesi ve 'Dicer' enzimi tarafından tanınıp kesilmesi ile gerçekleşir. Bu mekanizma, genomun virüs kalıtım materyali ve transpozonlar gibi hareketli genetik elementlerin istilasından korunmasını sağlamak amacıyla gerçekleşen doğal bir işlemdir. RNAi mekanizması, ökaryot organizmalarda iki tür molekül tarafından gerçekleştirilir. Bu moleküller 22 nükleotid uzunluğunda miRNA (micro RNA) ve 21-23 nükleotid uzunluğunda, çift zincirli siRNA (small interfering RNA) molekülleridir. Son yıllarda bilim dünyasının önde gelen konuları arasında yer alan RNAi araştırmaları ile çeşitli organizmalarda genlerin işlevlerini inceleme, işlevlerini bilmediğimiz genlerin fonksiyonlarını belirleme, konak patojen ilişkisi, üreme, programlanmış hücre ölümü, tümör oluşumu

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is defined as silencing of gene after transcription (post-transcriptional gene silencing), when double stranded RNA (dsRNA) steps into the cell and cause degradation of endogenic complementary mRNA, or regulation of gene expression process. During RNAi mechanism, complementary sequence of target mRNA connects to sense strand of mRNA by factor of RISC. Gene silencing mechanism is controlled by RISC factor with a mass of 500 kDa which is RNA multi protein complex with nuclease activity. Silencing is occurred by cutting of mRNA, which is interacting with Argounate protein on RISC factor, with Dicer enzyme. This silencing mechanism is natural and takes a position in defending genome and biological function of organisms from invasion of movable genetic material such as viral hereditary material and transposons. RNAi mechanism realized with two kinds of molecules in eukaryotic organisms. These are miRNA (microRNA) which is 22 bp and siRNA (small interfering RNA) which is 21-23 bp. In recent years RNAi has become prominent research area in science world. Several information were achieved with researches of RNAi such as determining function of genes, host-pathogen interaction, reproduction, apoptosis (programmed cell death) and tumorigenesis etc.

¹ Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA

² Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, ANKARA

³ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, ANKARA

⁴ Hitit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, ÇORUM

İletişim / Corresponding Author : Semra SOYDAM-AYDIN

Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, ANKARA

Tel : +90 312 565 55 17

E-posta / E-mail : semrasoydam@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 12.11.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 09.02.2015



gibi birçok alanda bilgi sahibi olunmuştur. Ayrıca; bitkilerde kodlanmayan RNA'ların doku farklılaşması ve gelişiminin kontrolü, sinyal iletimi, fitohormonlarla etkileşim, abiyotik (kuraklık, tuzluluk vb.) ve biyotik (patojenler vb.) stres gibi çevresel etmenlere verilen cevaplarda rol oynadığı görülmüştür. Bu derleme çalışmasında RNAi mekanizmasının temelleri ve bitkilerde RNAi kullanımı açıklanmaya çalışılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Bitki, RNAi, miRNA, siRNA

Also, determined with RNAi researchs that; non-coding RNA plays role in controlling of tissue development and differentiation, signal transduction, interaction with phytohormone, responses of abiotic (drought, salinity etc.) or biotic (pathogens etc.) stress. As a conclusion, this review will try to explain base of RNAi mechanism and usage in plants.

Key Words: Plant, RNAi, miRNA, siRNA

GİRİŞ

Çift zincirli RNA (çzRNA; Double stranded RNA: dsRNA) ile transkripsiyon sonrası gen ifadesinin düzenlenmesinde kullanılan mekanizmaya RNA interferans (RNAi) denir. RNAi hücreye giren dsRNA'nın homoloğu olan mRNA zincirinin degradasyonu aracılığı ile transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizması (post-transcriptional gene silencing) olarak da tanımlanır.

RNAi, Napoli ve arkadaşlarının Petunya bitkisinde "chalcone synthase (CHS)" geninin over-ekspresyonunu sağlamaya çalıştıkları araştırmaları sırasında ortaya çıkan önemli bir buluştur. Araştırmacılar daha mor renkli petunyalarda elde etmek isterken ebruli petunyalarda elde etmişlerdir. (1). Bunun sebebinin CHS içindeki dsRNA bölgesinin dejenerasyonu ile ilgili olduğu ve bunun transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizması olabileceği rapor edilmiştir (2). Çift zincirli RNA'nın gen ekspresyonunu engellediği, Fire ve Mello (1998) tarafından *Ceanorhabditis elegans* ile yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir ve bu çalışmaları ile 2006 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülünün sahibi olmuşlardır (3). Bütün bu gelişmeler sonrasında bilim dünyasının ilgisi RNAi üzerine yoğunlaşmış, genlerin işlevlerini inceleme ve işlevlerini

bilmediğimiz genlerin fonksiyonlarını belirlemek önem kazanmıştır. Bu derleme çalışmasında RNAi mekanizmasının temelleri, bitkilerde gen fonksiyon analizleri için RNAi kullanımı açıklanmaya çalışılacaktır.

RNAi Mekanizması ve Görev Alan RNA Tipleri

RNAi mekanizması sırasında, hedef mRNA'ya komplementer dizi RNA, nükleaz aktiviteli bir RNA-multi protein kompleksi olan RISC faktör (Induced Silencing Complex) üstünde, mRNA'nın anlamlı dizisine bağlanır. Gen susturulması bu RISC faktörü aracılığı ile kontrol edilir. RISC faktöründe bulunan 'Argonate' isimli proteinle etkileşim içerisine giren mRNA, RNaz III ailesi içerisinde yer alan ve bir ribonükleaz olan 'Dicer' enzimi tarafından tanıyıp kesilir ve böylece susturma gerçekleşir (4). RNAi mekanizması, diğer bir deyişle gen susturma mekanizması ökaryot organizmalarda iki tür molekül tarafından gerçekleştirilir. Bu moleküller 22 nükleotid uzunluğunda miRNA (micro RNA) ve 21-23 nükleotid uzunluğunda olan çift zincirli siRNA (small interfering RNA),'dır. (5-9).

miRNA ve siRNA'lar birbirlerine çok benzerler ancak, aralarındaki farklar aşağıdaki gibidir:

- miRNA 1993 yılında, siRNA 1999 yılında keşfedilmiştir.
- miRNA endojen genlerin düzenlenmesinden sorumlu iken, siRNA genom bütünlüğünün korunmasından sorumludur.
- miRNA öncülü saç tokası yapısında tek zincirli RNA (single strand: ssRNAs), siRNA öncülü ise uzun dsRNAs'dır.
- miRNA mRNA yıkımı, translasyonun baskılanmasından sorumludur, siRNA ise DNA metilasyonu, histonların modifikasyonu ve mRNA yıkımından sorumludur.
- miRNA için gerekli Argounate proteinler AGO1, AGO10, siRNA için gerekli Argounate proteinler ise AGO1, AGO4, AGO6, AGO7'dir.
- Bitkilerde miRNA hedef sekansa parsiyel ya da tam komplementerlik sağlarken, siRNA tam komplementerlik sağlar.
- miRNA hücre gelişimi ve farklılaşması, gelişim süreçleri, biyotik ve abiyotik streslere cevapta görev alırken, siRNA transpozonlara ve virüslere karşı korumada ve stres adaptasyonunda görev alır (9-18).

miRNA yolağı nükleusta pri-miRNA'ların, "Drosha enzimi" aracılığı ile yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda ve saç tokası yapısında olan pre-miRNA'lara dönüşümü ile başlar. pre-miRNA'lar sitoplazmaya aktarılır ve diğer bir RNase olan Dicer aracılığı ile miRNA dublekslerine çevrilir. Dicer enziminin işlev görmesinin ardından kısa dsRNA dublekslerin biri baz eşleşmesi aracılığı ile hedef mRNA'ya bağlanmak üzere RISC faktörü ile etkileşime girer. Oluşan bu miRNA'lar translasyonun baskılanması veya mRNA'ların degradasyonuna aracılık etme kapasitelerine sahiptirler. Bu özellikleri ile de modern moleküler biyolojinin ilgi çeken konuları arasında yerlerini almışlardır (19, 20). Bitkilerde translasyonun baskılanması veya direk olarak mRNA'ların parçalanması kapasitelerinden hangisinin gerçekleşeceği miRNA'ların hedef mRNA

üzerinde bağlandıkları bölgeye göre değişiklik gösterir. mRNA'nın translasyona uğramayan bölgesine (untranslated region-UTR) bağlanırsa eksik komplementerlik olur ve translasyon baskılanır. Translasyona uğrayan (open reading frame-ORF) bölgesine bağlanması ise tam komplementerlik gösterir ve Aragunate2 (AGO2) tarafından mRNA'nın yıkımı gerçekleşir (21-23). siRNA'lar öncülü dsRNA'lardır ve dsRNA'lar Dicer enzimi tarafından 3' ucunda çıkıntı kalacak şekilde kesiler 20-25 bp'lik siRNA'ları meydana getirirler. Çift iplik yapısında olan siRNA'lar RISC faktörleri ile birleşerek tek iplikli yapıya dönüşürler ve mRNA degradasyonu ile gen susturma işlevi görürler (19, 20, 24).

RNA İnterferans Teknolojisinin Bitkilerde Kullanımı

Bitkilerde RNA interferans çalışmalarının temelini; Napoli ve arkadaşlarının Petunya bitkisinde *Agrobacterium tumefaciens* vektörü aracılığı ile CHS geninin over-ekspresyonunu sağlanmaya çalıştıkları araştırma oluşturmuştur. Araştırmada pigmentasyon artırılıp daha koyu renkli petunyalarda elde edilmeye çalışılmış ancak renksiz, açık renkli veya alacalı bitkiler elde edilmiştir. Aynı ekibin ileri araştırmaları ile pigment üretiminden sorumlu gen ve homolog genlerin ekspresyonlarının virüsün 35S promotörü tarafından baskılandığı gösterilmiştir. CHS içindeki dsRNA bölgesinin dejenerasyonu ile gen susturmanın gerçekleştiği belirlenmiştir (1, 25).

miRNAi mekanizması ilk kez 2002 yılında Park ve arkadaşlarının Arabidopsis'te yaptıkları araştırma ile keşfedilmiştir. Araştırmada benzer görevleri olan CAF (carpel factory) geni ve HN1 genlerinin miRNA metabolizmalarının da benzer olacağı düşünülmüştür. Bu genlerin fonksiyonlarını belirleyebilmek amacıyla HEN1-1 and CAF-1 mutant Arabidopsis bitkilerinden ve herhangi bir mutasyon içermeyen Arabidopsis bitkisinden miRNA izolasyonu yapılmıştır. Ayrıca potansiyel homolog genleri taşıdığı düşünülen tütün, pirinç ve mısır

bitkilerinden de izolasyon yapılmıştır. Araştırma sonucunda miRNA oluşumunun gelişim tarafından kontrol edildiği ve HEN1-1 and CAF-1 mutant bitkilerde yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir (26). miRNA'ların biyogenezine ilişkin pek çok ayrıntı yine bu model bitki aracılığı ile belirlenmiştir. miRNA günümüze değin Arabidopsis, Oryza, Nicotiana, Z. mays, Sorghum, Populus, Gossypium, Brassica, Vitis, Physcomitrella, Chrysanthemum gibi çok çeşitli bitkilerde belirlenmiştir (27-39). Bitkiler yaşamları sürecinde biyotik faktörler; mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) enfeksiyonu ve zararlı hayvanların saldırıları sonucu oluşan stres faktörleri ve abiyotik faktörler (su, sıcaklık, radyasyon, kimyasallar, manyetik ve elektriksel alanlar) gibi çok çeşitli stres faktörleri ile karşılaşabilirler (40, 41). Bitkiler stresle ilişkili çok çeşitli proteinler, transkripsiyon faktörleri, metabolitler yolu ile ya da epigenetik regülasyonlar yolu ile cevap verebilirler. Epigenetik değişiklikler; özellikle bitki bir abiyotik strese maruz kaldığında gen ekspresyonu değişikliklerinde önemli rol oynayan RNA tarafından yönlendirilmiş DNA metilasyonu, histon ve ya DNA modifikasyonlarını kapsar (42-44).

Bitkilerde kodlanmayan RNA'ların protein kodlayan bir genin duplikasyonundan insersiyona uğraması ya da bitki genomunun %80'inden fazlasını oluşturan transpozonlardan köken alabileceği gibi farklı mekanizmalarla oluşabileceği öngörülmüş ancak bitkilerde biriken mutasyonlar nedeniyle kesin bir köken belirlemenin oldukça zor olduğu belirtilmiştir (45-47). Kökeni konusunda kesin bir kaniya varılamasa da bitkilerde RNAi genom bilimi, genlerin fonksiyonlarını belirleme, doku farklılaşması ve gelişiminin kontrolü, sinyal iletimi, fitohormonlarla etkileşim, çevresel etmenlere verilen cevabın belirlenebilmesi gibi pek çok alanda kullanım potansiyeli olan bir teknolojidir. RNA interferans teknolojisinin bitkilerde uygulamasına yönelik çok çeşitli örnekler vermek mümkündür.

Lindbo ve ark. 1993 yılında gerçekleştirdikleri araştırmada; tütün bitkilerini tütün mozaik virüsü (TEV) kılıf proteini (CP) geni ile manipule etmişlerdir. Başlangıçta transforme olan bitkilerde enfeksiyonun bütün özellikleri görülürken, ileriki haftalarda bitkilerin iyileştiği kaydedilmiştir. İyileşmiş dokularda yapılan moleküler analizler sonucunda TEV dizilerinin transkripsiyonun hala devam ettiği ancak mRNA'larının işlevlerinin olmadığı anlaşılmıştır. Bu çalışmanın sonunda araştırmacılar, gen susturulmasının ya da eş-baskılamanın sitoplazmada lokalize olduğu ve post-transkripsiyon safhasında gerçekleştiği fikrine ulaşmışlardır (48).

Angell ve Baulcombe (1997) araştırmalarında; bitki genomuna aktarılan transgeni taşıyacak olan vektörleri (PVX -Patato Virus X) viral replikasyon esnasında seçilmiş genin de ifade edilmesini sağlamak amacıyla cDNA (komplmenter DNA) içerecek şekilde tasarlamışlardır. Çalışma sonucunda beklenilenin tersine, aktarılan genin ifadesini gözlemlemek yerine, vektör aracılı transgen sisteminin, yüksek seviyede post transkripsiyonel susturmayı indüklediği belirlenmiştir (49).

Defang ve ark (2014) RNAi teknolojisinin mısır (*Zea mays*) bitkisinde şeker kamışı mozaik virüsüne (SCMV) karşı direnç oluşturmada kullanımını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda kılıf protein (cp) geninin transkripsiyonu ile oluşan saç tokası yapısındaki RNA'ların SCMV enfeksiyonunu engellediği görülmüş ve RNA interferans-post transkripsiyonel gen susturma yaklaşımının bitkilerde virüs enfeksiyonlarının kontrol edilmesinde önemli bir yaklaşım olabileceği belirtilmiştir (50). Yapılan diğer çalışmalar ile de gen ekspresyonunun engellenmesi ile virüse dayanıklı bitkilerin elde edilebileceği vurgulanmıştır (51, 52).

Yarmolinsky ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada; sülfat asimilasyonunun asıl enzimi olan sülfat redüktaz (SİR) enziminin ekspresyonunun RNA interferans ile engellenmesinin domates bitkisinde (*Lycopersicon esculentum*) yapraklardaerken

yaşlanmaya sebep olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada SİR Ri mutantlarda (yapraklarında görsel klorofil degradasyonu olan) hidrojen peroksid ve lipid peroksidasyonunun ürünü olan malondialdehit akümülyasyonunun olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda SİR enziminin biyosentetik rolünün yanında erken yaşlanmanın önlenmesinde görev aldığı belirlenmiştir (53).

Shweta ve Jawaid'in 2014 yılı yayınında; pamukbitkisinde kıvrık yaprak fenotipine neden olan Allahabad virusü (CLCUAV) geninin transkriptleri olan AC1 ve AC4 viral replikasyon ve gen susturma mekanizmasında etkili olduğu belirlenmiştir (54). Chunhua ve ark. 2014; araştırmasında ise MYB transkripsiyon faktörlerinin bitki gelişimi, metabolizması ve stres cevaplarında rol oynadığı gösterilmiştir. Çalışmada pirinç bitkisinde R2R3-MYB transkripsiyon faktörünü kodlayan OsMYB103L geninin fonksiyonu araştırılmıştır. OsMYB103L geni çekirdekte lokalize olur ve trans-aktivasyon kapasitesine sahiptir. Çalışma sonucunda bu genin over-ekspresyonunun pirinçte kıvrık yaprak fenotipine neden olduğu görülmüştür. Çalışmanın devamında selüloz sentez genlerinin de (CESAs) ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. OsMYB103L geninin RNAi teknolojisi ile susturulması CESAs geninin ekspresyonunun azaldığı, bitkide selüloz içeriğinin ve yapraktaki kıvrılmanın azaldığı görülmüştür (55).

Kiirika ve ark. 2014; *Medicago truncatula* bitkisinde GTPase MtROP9 geninin susturulması ile patojenik (*Aphanomyces euteiches*) ve simbiyotik mikroorganizmalarla (*Glomus intraradices*, *Sinorhizobium meliloti*) enfekte olmuş transgenik

köklerde (MtROP9i), ROS- ilişkili enzimlerinin baskılandığı ve ROS ürünlerinin azaldığı görülmüştür. Bu çalışmada aynı koşullar altındaki bitkilerde zamana bağlı proteom yanıtları araştırılmıştır. Çalışma sonucunda indüklenen proteinlerin analizleri yapıldığında, ROS üretim ve temizleme mekanizmasının kökler tarafından kontrol edildiği görülürken, MtROP9i alternatif koruma mekanizmalarının olduğu belirlenmiştir (56). Wan ve ark. 2011; kuraklık stresine dayanıklı *Physcomitrella patensis* üzerinde yaptıkları çalışmada kuraklık stresi ile ilişkili 16 miRNA (DsAmR) belirlemişler, miR902a-5p ve miR414'nin kuraklık stresine karşı direnç oluşturma önemli olduğunu bildirmişlerdir (57).

SONUÇ

Sonuç olarak; RNA interferans (RNAi), miRNA ve siRNA'ların keşfi bilim dünyasını gen ifadesi, düzenlenme ve RNA işlevselliği alanlarında araştırmalara yöneltmiştir. RNA interferans (RNAi) mekanizması sadece işlevini bilmediğimiz genlerin fonksiyonlarını öğrenme konusunda değil, stres faktörlerine karşı dayanıklı transgenik bitki elde edilmesinden, patojenlerin neden olduğu hastalıklara karşı savunma mekanizmalarının geliştirilmesi vb. birçok alanda önemli katkılar sağlamıştır. Gelecekte, teknolojik araçların geliştirilmesiyle, farklı bitkilerde ve farklı koşullar altındaki post-transkripsiyonel düzenleme mekanizmalarının daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* result in supression of homologous revesible co-supression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 1990; 2: 279-89.
2. Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA. Chalgone synthase cosuppression phenotypes in *petunia* flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs.complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol*, 1996; 32(5): 957-73.
3. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391 (6669): 806-11.
4. DaneholtB. Advanced Information: RNA interference. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine*. Archived from the original. Retrieved, 2007.
5. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000; 101: 25-33.
6. Allshire R. RNAi and heterochromatin-a hushed-up affair. *Science*, 2002; 297: 1818-9.
7. Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanism and regulations. *Genes Dev*, 2006; 20: 759-71.
8. Zhao T. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev*, 2007; 21(94): 1190-203.
9. Sunkar R. Zhu JK. Micro RNAs and Short-interfering RNAs in Plants. *J Integr Plant Biol*, 2007; 49: 817-26.
10. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009; 136: 642-55.
11. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004; 116: 281-97.
12. Kim VN. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells*, 2005; 19: 1-15.
13. Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004; 16: 2001-19.
14. Kim VN. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009; 10: 126-39.
15. Watanabe T, Totoki Y, Sasaki H, Minami N, Imai H. Analysis of small RNA profiles during development. *Methods Enzymol*, 2007; 427: 155-69.
16. Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003; 31; 299(5607): 716-9.
17. Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One*, 2007; 19; 2(12): e1326.
18. Ashley J, Ian J. The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *Biol Chem*, 2009; 284(27): 17897-901.
19. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002; 297(5589): 2056-60.
20. Khvora A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003; 115(2): 209-16.
21. Saydam F, Degirmenci İ, Güneş HV. Mikro RNA'lar ve kanser. *Dicle Medical Journal* 2011; 38(1): 113-20.
22. Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. MicroRNA: A master Regulator of Cellular Process fro Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng*, 2010; 12: 1-27.
23. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanism for atiny RNA. 2005; 11812: 1753-61.
24. Nowotny M, Yang W. Structural and functional modules in RNA interference. *Curr Opin Struct Biol*, 2009; 19(3): 286-93.
25. William L, David S, Julian TR. Development and testing of the OPLS all atom force field for conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc*, 1996; 118(45): 11225-36.
26. Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. Carpel factory, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 2002; 12(17): 1484-95.
27. Adai A. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res*, 2005; 15: 78-91.

28. Li X, Zhang YZ. Computational detection of microRNAs targeting transcription factor genes in *Arabidopsis thaliana*. *Comput Biol Chem*, 2005; 29: 360-67.
29. Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*, 2005; 17(5): 1397-411.
30. Billoud B, De Paepe R, Baulcombe D, Boccard M. Identification of new small non-coding RNAs from tobacco and *Arabidopsis*. *Biochimie*, 2005; 87(9-10): 905-10.
31. Dezulian T. Conservation and divergence of microRNA families in plants. *Genome Biol*, 2005; 6: 13-38.
32. Bedell JA, Budiman MA, Nunberg A, Citek RW, Robbins D, Jones J, et al. Sorghum genome sequencing by methylation filtration. *PLoS Biol*, 2005; 3(1): e13.
33. Lu S, Sun YS, Shi R, Clark C, Li L, Chiang VL. As in *Populus trichocarpa* are absent from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005; 17: 2186-203.
34. Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa*. *Science*, 2006; 313: 1596-604.
35. Qiu CX, Xie FL, Zhu YY, Guo K, Huang SQ, Nie L, et al. Computational identification of microRNAs and their targets in *Gossypium hirsutum* expressed sequence tags. *Gene*, 2007; 395: 49-61.
36. Xie FL, Huang SQ, Guo K, Xiang AL, Zhu YY, Nie L, et al. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *Febs Lett*, 2007; 581: 1464-74.
37. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci*, 2007; 32(4): 189-97.
38. Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *Plos one*, 2007; 12: 1326-44.
39. Arazi T, Talmor-Neiman M, Stav R, Riese M, Huijser P, Baulcombe DC. Cloning and characterization of micro RNAs from moss. *Plant J*, 2005; 43: 837-48.
40. Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. New York, London: Academic Press, 1972: 697.
41. Lichtenhaler HK. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol*, 1996; 148: 4-14.
42. Cushman JC, Bohnert HJ. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol*, 2000; 3: 117-24.
43. Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol*, 2005; 16: 123-32.
44. Chinnusamy V, Zhu JK. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2009; 12: 1-7.
45. Felippes De FF, Schneeberger K, Dezulian T, Huson DH, Weigel D. Evolution of *Arabidopsis thaliana* microRNAs from random sequences. *RNA New York*, 2008; 14(12): 2455-9.
46. Piriyaongsa J, Jordan IK. Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements. *RNA*, 2008; 14: 814-21.
47. Borchert GM, Holton NW, Williams JD, Hernan WL, Bishop IP, Dembosky JA, et al. Comprehensive analysis of microRNA genomic loci identifies pervasive repetitive element origins. *Mobile Genetic Elements*, 2011; 1(1): 8-17.
48. Lindbo JA, Silva Roales L, Proebsting WM, Dougherty WG. Introduction of highly specific antiviral state in transgenic plants: Implication for regulation gene expression and virus resistance. *Plant Cell*, 1993; 5: 1749-59.
49. Angell SM, Baulcombe DC. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *Embo J*, 1997; 16(12): 3675-84.
50. Gan D, Ding F, Zhuang D, Jiang H, Jiang T, Zhu S, et al. Application of RNA interference methodology to investigate and develop SCMV resistance in maize. *J Genet*, 2014; 93(2): 305-11.
51. Zhang ZY, Yang L, Zhou SF, Wang HG, Li WC, Fu FL. Improvement of resistance to maize dwarf mosaic virus mediated by transgenic RNA interference. *J Biotechnol*, 2011; 153(3-4): 181-7.

52. Zha WJ, Peng XX, Chen RZ, Du B, Zhu LL, He GC. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plantmediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS One*, 2011; 6(5): 20504.
53. Yarmolinsky D, Brychkova G, Kurmanbayeva A, Bekturova A, Ventura Y, Khozin-Goldberg I, et al. Impairment in Sulfite Reductase Leads to Early Leaf Senescence in Tomato Plants. *American Society of Plant Biologists*, 2014; 165: 1505-20.
54. Shweta M, JA Khan. In silico prediction of cotton (*Gossypium hirsutum*) encoded microRNAs targets in the genome of Cotton leaf curl Allahabad virus. *Bioinformatics*, 2014; 10(5): 251-5.
55. Chunhua Y, Dayong L, Xue L, Chengjun J, Lili H, Xianfeng Z, et al. OsMYB103L, an R2R3-MYB transcription factor, influences leaf rolling and mechanical strength in rice (*Oryza sativa*L.). *BMC Plant Biol*, 2014; 14: 158.
56. Kiriika LM, Bergmann HF, Schikowsky C, Wimmer D, Korte J, Schmitz U, et al. Silencing of the Rac1 GTPase MtROP9 in *Medicago truncatula* stimulates early mycorrhizal and oomycete root colonizations but negatively affects rhizobial infection. *Plant Physiol*, 2012; 159(1): 501-16.
57. Wan P, Wu J, Zhou Y, Xiao J, Feng J, Zhao W, et al. Computational Analysis of Drought Stress-Associated miRNAs and miRNA Co-Regulation Network in *Physcomitrella patens*. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2011; 9(1-2): 37-44.