

# Đánh giá biểu hiện của phân tử microRNA *osa-miR160a* trên các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *Magnaporthe oryzae* gây bệnh đạo ôn

Nguyễn Bằng Phi<sup>1,2\*</sup>, Nguyễn Đoàn Nguyên Phương<sup>1,3</sup>, Nguyễn Ngọc Bảo Châu<sup>4</sup>, Nguyễn Bảo Quốc<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn Ôn, phường Phú Hoà, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Khoa học Sự sống Nano, Trường Đại học Kanazawa, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Nhật Bản

<sup>4</sup>Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở TP Hồ Chí Minh, 97 Võ Văn Tần, phường 6, quận 3, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>5</sup>Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 5/1/2023; ngày chuyển phản biện 9/1/2023; ngày nhận phản biện 9/2/2023; ngày chấp nhận đăng 1/3/2023

## Tóm tắt:

Bệnh đạo ôn ở lúa do nấm *Magnaporthe oryzae* gây ra làm thiệt hại năng suất lúa mỗi năm đủ để nuôi sống 60 triệu người. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, các phân tử microRNAs liên quan đến khả năng chống chịu với nấm *M. oryzae*. Trong đó, *osa-miR160* được báo cáo là có vai trò điều hòa tăng hiệu quả chống chịu nấm *M. oryzae* bằng cách kiểm soát các gen đáp ứng với auxin, *ARFs* (auxin response transcription factors) trên cây lúa. Trong nghiên cứu này, các tác giả phân tích và đánh giá mức độ tích lũy của *osa-miR160a* trên các giống lúa mẫn cảm và chống chịu với bệnh đạo ôn được trồng tại Việt Nam dựa trên kỹ thuật qRT-PCR. Mặc dù mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* có sự thay đổi khác nhau giữa các giống lúa tại các thời điểm sau khi nhiễm (hpi), nhưng chỉ tại thời điểm 24 hpi mới có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về biểu hiện của *osa-miR160a* giữa nhóm lúa kháng và nhóm lúa mẫn cảm với bệnh đạo ôn. Mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* ở thời điểm 24 hpi trên nhóm lúa kháng cao gấp 2,6 lần so với trên nhóm lúa mẫn cảm. Kết quả này cho thấy, *osa-miR160a* là một chỉ thị phân tử tiềm năng trong việc đánh giá khả năng chống chịu với nấm *M. oryzae* của các giống lúa trồng tại Việt Nam hiện nay.

**Từ khóa:** bệnh đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*, microRNA, *osa-miR160a*, qRT-PCR.

**Chỉ số phân loại:** 1.6, 4.1, 4.6

## Expression profile of microRNA *osa-miR160a* in *Magnaporthe oryzae* resistant and susceptible rice cultivars

Bang Phi Nguyen<sup>1,2\*</sup>, Doan Nguyen Phuong Nguyen<sup>1,3</sup>, Ngoc Bao Chau Nguyen<sup>4</sup>, Bao Quoc Nguyen<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Neighborhood 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Thu Dau Mot University, 6 Tran Van On Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province, Vietnam

<sup>3</sup>Nano Life Science Institute (WPI-NanoLSI), Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan

<sup>4</sup>Faculty of Biotechnology, Ho Chi Minh City Open University, 97 Vo Van Tan Street, Ward 6, District 3, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>5</sup>Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Neighborhood 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 5 January 2023; revised 9 February 2023; accepted 1 March 2023

## Abstract:

Rice blast is caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* due to rice blast enough to feed 60 million people. Recent studies have shown that microRNAs are involved in the rice immunity against *M. oryzae*. In which, *osa-miR160* was reported to play a role in upregulating resistance to *M. oryzae* through the inhibition of auxin response transcription factors (*ARFs*) genes. In this study, we analysed and evaluated the expression level of *osa-miR160a* on blast-resistant and susceptible rice groups grown in Vietnam by the qRT-PCR method. Although the expression of *osa-miR160a* showed different levels of change in rice cultivars at different hours post-inoculation (hpi), only at 24 hpi was there a statistically significant difference in the *osa-miR160a* expression between blast-resistant and susceptible rice groups. The expression level of *osa-miR160a* at 24 post-inoculation (hpi) in the blast-resistant rice group was 2.6 times higher than in the susceptible group. The result showed that *osa-miR160a* would be a potential molecular marker in assessing the resistance against *M. oryzae* of different rice cultivars grown in Vietnam.

**Keywords:** *Magnaporthe oryzae*, microRNA, *osa-miR160a*, qRT-PCR, rice blast.

**Classification numbers:** 1.6, 4.1, 4.6

\*Tác giả liên hệ: Email: phinb@tdmu.edu.vn

## 1. Đặt vấn đề

Bệnh đạo ôn trên lúa do nấm *M. oryzae* gây ra (nhiều tài liệu ghi nấm *Pyricularia grisea* gây bệnh đạo ôn). Ước tính sản lượng lúa bị thiệt hại do bệnh đạo ôn gây ra đủ để nuôi sống 60 triệu người [1]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, microRNA (miRNA) tham gia vào các quá trình sinh lý, sinh hóa và miễn dịch ở cây lúa [2]. Hiện nay, có hơn 60 miRNAs ở cây lúa liên quan đến quá trình lây nhiễm của nấm *M. oryzae* đã được mô tả chức năng [3, 4]. Các miRNAs này được xếp thành 2 nhóm: điều hòa tăng và điều hòa giảm khả năng chống chịu với nấm *M. oryzae*. Trong đó, *osa-miR160* thuộc nhóm miRNA thúc đẩy tăng cường hiệu quả chống chịu nấm *M. oryzae* ở lúa [5]. *Osa-miR160* là một họ miRNA bảo tồn cao trên thực vật, có chức năng chính trong việc điều hòa họ gen *ARFs* ở cây trồng [6]. Trên lúa, sự tăng cường tích lũy của *osa-miR160* giúp đẩy mạnh khả năng kháng nấm *M. oryzae* bằng cách kiểm soát biểu hiện của các mRNA mục tiêu *ARF8*, *ARF10*, *ARF13*, *ARF18* và *ARF22* [3]. Mặt khác, các gen *ARFs* cũng tham gia vào con đường điều hòa sinh trưởng ở cây trồng liên quan đến tín hiệu auxin, vì vậy khi cây lúa có biểu hiện *osa-miR160* tăng quá mức thường mang các đặc điểm bất lợi như hạt nhỏ, lá xoắn và lùn [7]. *osa-miR160* có thể được tổng hợp từ 6 vị trí khác nhau trên hệ gen của cây lúa, tuy nhiên chỉ duy nhất 3 đồng dạng miRNA trưởng thành có biểu hiện là *osa-miR160a*, *osa-miR160e* và *osa-miR160f* [3].

Nghiên cứu của W. Liu và cs (2014) [1] cho thấy, sự gia tăng biểu hiện của *osa-miR160a* trên cây lúa thúc đẩy khả năng chống chịu với nấm *M. oryzae* bằng cách kích hoạt một số cơ chế như: tăng nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tăng cường hoạt hóa các gen kháng *OsPRI*, *OsPRI0*... Tuy vậy, tiềm năng ứng dụng giá trị biểu hiện của *osa-miR160a* như một công cụ phân loại trong sàng lọc các giống lúa chống chịu với nấm *M. oryzae* vẫn chưa đầy đủ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu mức độ tích lũy của *osa-miR160a* được đánh giá ở 10 giống lúa thuộc hai nhóm mẫn cảm và chống chịu với nấm bệnh đạo ôn ở các hạp bằng phương pháp qRT-PCR. Các kết quả đạt được sẽ góp phần hỗ trợ cho các quy trình hiện tại trong công tác phân biệt và cải tiến giống lúa tại Việt Nam.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Các giống lúa, mẫu nấm đạo ôn và môi trường nuôi cấy

Trong nghiên cứu này, 10 giống lúa đã được lựa chọn, bao gồm 5 giống chống chịu và 5 giống mẫn cảm với nấm *Magnaporthe oryzae* (bảng 1). Các giống lúa thuộc nhóm chống chịu hoặc mẫn cảm với nấm *Magnaporthe oryzae* được lựa chọn dựa vào kết quả ở các nghiên cứu trước đây [8].

Thí nghiệm gây bệnh nhân tạo được tiến hành bằng mẫu nấm *Magnaporthe oryzae* LBT2, theo phương pháp đã được mô tả trước đó [8]. Mẫu nấm *M. oryzae* LBT2 được giữ trong môi trường PDA (potato dextrose agar) vài tháng cho thí nghiệm chủng bệnh.

Bảng 1. Khu vực thu mẫu và phân loại các nhóm lúa trong nghiên cứu.

Nhóm lúa	Tên giống	Phân loại	Vị trí thu nhận
Nhóm lúa kháng với nấm <i>M. oryzae</i>	RVT	Giống thơm	Đồng bằng sông Cửu Long
	ST5	Giống thơm	Đồng bằng sông Cửu Long
	IR 50404	Giống thường	Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (International Rice Research Institute -IRRI)
	OM9582	Giống thơm	Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long
	Tè Tép	Giống thường	Đồng bằng sông Cửu Long
Nhóm lúa mẫn cảm với nấm <i>M. oryzae</i>	Jasmine 85	Giống cao sản	Viện Nghiên cứu Lúa Quốc tế (International Rice Research Institute -IRRI)
	OM4900	Giống lai	Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long
	OM7347	Giống lai	Đồng bằng sông Cửu Long
	OM344	Giống cao sản	Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long
	OM576	Giống lai	Đồng bằng sông Cửu Long

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**Chiết xuất RNA:** RNA tổng số (bao gồm miRNA) của mẫu lá nhiễm bệnh ở các thời điểm sau lây nhiễm khác nhau (0, 24, 48 và 72 hpi) được trích ly và thu nhận theo phương pháp Trizol (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ). Nồng độ RNA tổng số sau khi thu nhận được xác định bằng máy NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ). Nồng độ RNA trong mẫu được chuẩn hóa bằng DNaseI (Invitrogen, Hoa Kỳ). Cụ thể, 1 µg RNA tổng số được bổ sung với đệm DNase I 1X để đạt thể tích 50 µl, sau đó bổ sung DNase (200 U/ml) và ủ ở 37°C trong 10 phút. Phản ứng được bất hoạt bằng cách thêm EDTA (axit etylen diamine tetra acetic) 0,5 M, tiếp theo ủ ở 75°C trong 10 phút.

**Phân tích mức độ biểu hiện của *osa-miR160a*:** Mức độ biểu hiện tương đối của *osa-miR160a* được xác định bằng kỹ thuật qRT-PCR với kit SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline, Anh) và các cặp primer đặc hiệu (*osa-miR160aF*: 5'GTGCCTGGCTCCCTGTATG3'; *osa-miR160aR*:

5'TTGCACGCCACCCAGTAG3') như trong mô tả của nghiên cứu trước đây [8]. Phản ứng Real-time PCR được tiến hành trên máy Mygo Pro (IT-IS Life Science Ltd, Vương quốc Anh) với chu trình: biến tính ban đầu ở 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ gồm biến tính ở 95°C trong 10 giây, bắt cặp ở 65°C trong 10 giây và kéo dài ở 72°C trong 20 giây, sau đó sản phẩm được bảo quản ở 10°C. Gen *OsUbi1* được sử dụng làm đối chứng nội vì có khả năng ổn định ở mọi tác động và trên các giống lúa khác nhau [8, 9]. Sự khác biệt trong mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* được ước lượng bằng phương pháp định lượng tương đối [10]. Trong đó, giá trị chu kỳ ngưỡng (Threshold cycle - Ct) là giá trị chu kỳ nhiệt khi hệ thống bắt đầu ghi nhận được tín hiệu phát ra từ phản ứng PCR vượt qua cường độ huỳnh quang nền. Do đó, giá trị Ct tương quan ngược với số lượng bản sao *osa-miR160a* trong mẫu ban đầu. Cụ thể, mẫu chứa càng ít bản sao *osa-miR160a* thì sẽ có Ct càng cao. Mức độ biểu hiện được đánh giá dựa trên giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  với  $\Delta Ct = C_t$  của *osa-miR160a* -  $C_t$  của *OsUbi1*.

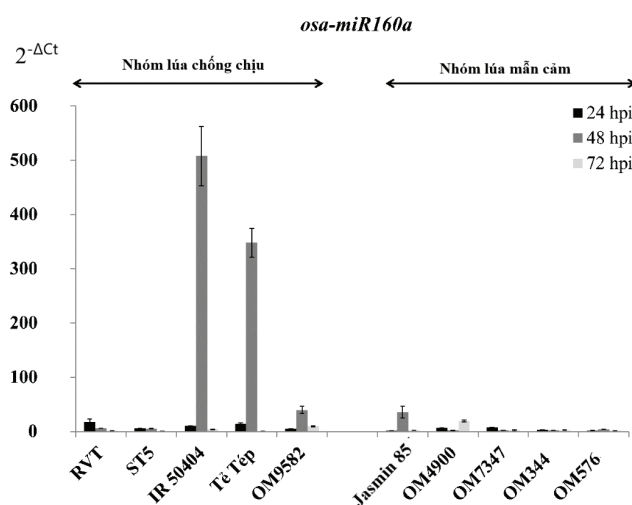
**Phân tích thống kê:** Giá trị nghiên cứu được trình bày dưới dạng trung bình (mean) ± độ lệch chuẩn. Phân tích dữ liệu biểu đồ boxplot được tiến hành bằng phương pháp kiểm định Tukey's test. Phân tích sự khác biệt giữa 2 nhóm lúa kháng và mẫn cảm dựa trên bác bỏ giả thuyết  $H_0$  bằng phương pháp T-test ở mức độ thống kê  $p < 0,05$ . Công cụ thống kê được sử dụng là Microsoft Excel 2016 và Graphpad Prism 8.0.

### 3. Kết quả và bàn luận

#### 3.1. Mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* trên các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae*

Mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* trên các giống lúa bị nhiễm nấm *Magnaporthe oryzae* được đánh giá bằng phản ứng qRT-PCR đối với mẫu lá lúa tại các thời điểm 24, 48 và 72 hpi. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, biểu hiện tăng của *osa-miR160a* được ghi nhận ở 3 giống lúa kháng (RVT, IR50404, Tè Tép) và (IR50404, Tè Tép, OM9582) ở thời điểm 24 và 48 hpi (hình 1).

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây, trong đó sự biểu hiện của *osa-miR160a* được so sánh giữa giống lúa kháng (IRBLkm-Ts) và giống lúa mẫn cảm (LTH). Cụ thể, mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* trên IRBLkm-T cao gấp 4 lần so với giống LTH ở các thời điểm 12 và 24 hpi [5]. Biểu hiện của *osa-miR160a* liên quan đến sự kiểm soát các

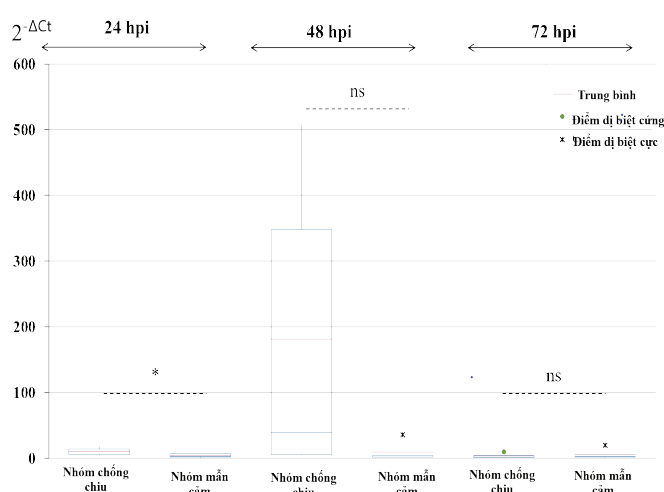


Hình 1. Sự biểu hiện của *osa-miR160a* trên các giống lúa nghiên cứu.

gen mã hóa nhân tố phiên mã đáp ứng auxin (*ARFs*) [7]. Các protein mã hóa bởi gen *ARFs* ở lúa có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế biểu hiện của nhiều gen đáp ứng auxin thông qua việc tương tác với vùng điều hòa của yếu tố đáp ứng auxin (AuxRE) [7], trong đó, auxin là nhân tố chính tác động đến tính kháng nấm *M. oryzae* [5]. *Osa-miR160a* có khả năng kiểm soát 6/25 gen đích trong họ *ARFs* liên quan đến auxin [5]. Trong số đó, sự biểu hiện của *ARF10*, *ARF16* và *ARF17* được cho là có mối liên hệ với tính kháng của lúa [7, 11]. Tuy vậy, mức độ tích lũy của các gen còn lại là *ARF8*, *ARF18* và *ARF22* vẫn chưa được xác định là có mối liên hệ với khả năng chống chịu của cây lúa đối với sự xâm nhiễm của *Magnaporthe oryzae*. Do đó, sự biểu hiện của 3 gen này cần được đánh giá thêm vì sự tích lũy của chúng có thể thay đổi ở cả giống lúa kháng và giống lúa mẫn cảm. Sự dao động trong biểu hiện và mức độ tích lũy của các gen này cũng có thể dẫn đến sự thay đổi về khuynh hướng biểu hiện và tích lũy của *osa-miR160a* trên các giống khác nhau ở hai nhóm lúa nghiên cứu.

#### 3.2. Giá trị chẩn đoán của *osa-miR160a* trên các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với bệnh đạo ôn

Phân tích biểu đồ hộp các giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR160a* được tiến hành trên cả hai nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với *Magnaporthe oryzae* tại các thời điểm 24, 48 và 72 hpi. Kết quả cho thấy, biểu hiện của *osa-miR160a* tăng tại thời điểm 24 hpi trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu ( $p < 0,05$ , hình 2). Mặt khác, không tồn tại khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm lúa nghiên cứu ở các thời điểm 48 và 72 hpi (hình 2).



**Hình 2.** Giá trị biểu hiện của *osa-miR160a* ở hai nhóm lúa nghiên cứu ở các thời điểm 24, 48 và 72 hpi sau lây nhiễm. Dấu \* chỉ mức độ khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa 2 nhóm lúa ( $p < 0,05$ ).

Chúng tôi cũng nhận thấy, sự gia tăng giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR160a* trên các giống lúa chống chịu bệnh đạo ôn cao hơn 2,6 lần so với nhóm mẫn cảm với *Magnaporthe oryzae* (bảng 2).

**Bảng 2.** Giá trị biểu hiện  $2^{-\Delta Ct}$  của các giống lúa trong nghiên cứu.

Giống lúa		24 hpi	48 hpi	72 hpi
Nhóm lúa chống chịu	RVT	17,87	5,96	1,08
	ST5	5,79	5,21	,54
	IR50404	10,16	507,61	3,84
	Tê tép	14,15	347,82	,89
	OM9582	4,63	39,65	9,89
Nhóm lúa mẫn cảm	Jasmine 85	1,12	35,83	2,18
	OM4900	7,06	1,92	19,46
	OM7347	7,48	2,16	2,06
	OM344	2,8	2,25	2,72
	OM576	1,76	4,21	1,16

Cụ thể, ở 24 hpi, giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR160a* của các giống lúa chống chịu và mẫn cảm lần lượt là 10,52-17,87 và 4,04-7,48 (bảng 3).

**Bảng 3.** Mức độ biểu hiện  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR160a* trên các nhóm lúa nghiên cứu ở 24 hpi.

Nhóm lúa	Số lượng	$2^{-\Delta Ct}$ trung bình	Giá trị tối thiểu	Q1	Trung vị	Q3	Giá trị tối đa
Chống chịu với <i>M. oryzae</i>	5	10,52	4,63	5,79	10,16	14,15	17,87
Mẫn cảm với <i>M. oryzae</i>	5	4,04	1,12	1,76	2,80	7,06	7,48

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Y. Li và cs (2014) [5], trong đó chỉ ra sự khác biệt về mức độ tích lũy *osa-miR160a* giữa giống lúa chống chịu và mẫn cảm ở 24 hpi. Do vậy, việc xác định sự khác biệt ý nghĩa trong giá trị

biểu hiện của *osa-miR160a* trên hai nhóm lúa sẽ cung cấp kiến thức bổ ích, hỗ trợ chọn lọc và phân loại các giống lúa chống chịu hoặc mẫn cảm với *Magnaporthe oryzae* ở thời điểm 24 giờ sau lây nhiễm, góp phần vào công tác cải tiến giống tại Việt Nam.

#### 4. Kết luận

Mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* đã được xác định trên các giống lúa thuộc hai nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm *Magnaporthe oryzae*, tác nhân gây bệnh đạo ôn, tại các thời điểm 24, 48 và 72 hpi. Ở 24 hpi, biểu hiện của *osa-miR160a* ở nhóm lúa chống chịu cao hơn 2,6 lần so với nhóm lúa mẫn cảm. Điều này cho thấy, *osa-miR160a* hứa hẹn là một dấu ấn sinh học tiềm năng liên quan đến khả năng chống chịu với bệnh đạo ôn, là công cụ hữu ích trong công tác lai tạo và cải tiến các giống lúa tại Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] W. Liu, J. Liu, L. Triplett, et al. (2014), "Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens", *Annual Review of Phytopathology*, **52**, pp.213-241, DOI: 10.1146/annurev-phyto-102313-045926.
- [2] J. Tang, C. Chu (2017), "MicroRNAs in crop improvement: Fine-tuners for complex traits", *Nature Plants*, **3(7)**, pp.1-11, DOI: 10.1038/nplants.2017.77.
- [3] Y. Li, J. Jeyakumar, Q. Feng, et al. (2019), "The roles of rice microRNAs in rice - *Magnaporthe oryzae* interaction", *Phytopathology Research*, **1(1)**, pp.33-35, DOI: 10.1186/s42483-019-0040-8.
- [4] S. Campo, F.S. Sanuy, R.C. Ramirez, et al. (2021), "A novel transposable element - derived microRNA participates in plant immunity to rice blast disease", *Plant Biotechnology Journal*, **19(9)**, pp.1798-1811, DOI: 10.1111/pbi.13592.
- [5] Y. Li, Y. Lu, Y. Shi, et al. (2014), "Multiple rice microRNAs are involved in immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*", *Plant Physiology*, **164(2)**, pp.1077-1092, DOI: 10.1104/pp.113.230052.
- [6] L. Wu, Q. Zhang, H. Zhou, et al. (2009), "Rice microRNA effector complexes and targets", *The Plant Cell*, **21(11)**, pp.3421-3435, DOI: 10.1105/tpc.109.070938.
- [7] J. Huang, S. Kim, Y. Kim, et al. (2016), "Deregulation of the *OsmiR160* target gene *OsARF18* causes growth and developmental defects with an alteration of auxin signaling in rice", *Scientific Reports*, **6(1)**, pp.1-14, DOI: 10.1038/srep34376.
- [8] N.B. Quoc, N.D.N. Phuong, H.T.T. Trang, et al. (2019), "Expression of *osa-miR7695* against the blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Vietnamese rice cultivars", *European Journal of Plant Pathology*, **155(1)**, pp.307-317, DOI: 10.1007/s10658-019-01772-5.
- [9] J. Bhattacharyya, A.H. Chowdhury, S. Ray, et al. (2012), "Native polyubiquitin promoter of rice provides increased constitutive expression in stable transgenic rice plants", *Plant Cell Reports*, **31(2)**, pp.271-279, DOI: 10.1007/s00299-011-1161-4.
- [10] T.D. Schmittgen, K.J. Livak (2008), "Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_t$  method", *Nature Protocols*, **3(6)**, pp.1101-1102, DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
- [11] A.C. Mallory, B.J. Reinhart, M.W.J. Rhoades, et al. (2004), "MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: Importance of pairing to the microRNA 5' region", *The EMBO Journal*, **23(16)**, pp.3356-3364, DOI: 10.1038/sj.emboj.7600340.