

## تنظیم miR319 و ژن هدف آن MYB3 در طی بهاره‌سازی دو رقم گندم

نوشین آشوری<sup>۱</sup>، رضا فتوت<sup>۲\*</sup>، مریم مرتضایی‌فر<sup>۳</sup>، نسترن مهری<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

۲. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

۳. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۶/۱)

### Regulation of miR319 and its target gene (MYB3) during vernalization in two wheat cultivars

Nooshin Ashoori<sup>1</sup>, Reza Fotovat<sup>2\*</sup>, Maryam Mortezaefar<sup>3</sup>, Nastaran Mehri<sup>3</sup>

1. Former Student of Plant Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.

2. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.

3. Ph.D. candidate, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.

(Received: Apr. 6, 2018 - Accepted: Aug. 23, 2018)

#### Abstract

Many plants adapted to cold climates flower only after an extended period of cold, namely vernalization. In the lifetime of a winter cereals, flowering due to vernalization is not only an essential part of the reproductive process but also a critical developmental stage that can be protect the plant against environmental stresses. This process in cereals such as winter wheat is mainly regulated by the VERNALIZATION genes, *VRN1* and *VRN2*. Although many studies on vernalization in wheat have been reported, the molecular mechanism of vernalization is still largely unknown. Recent studies were shown that a class of small non-coding RNAs, microRNAs (miRNAs), plays a key role in flowering by integrating into the known flowering pathways. In the present study, we investigated the expression of *miR319* and its target gene (*MYB3* transcription factor) under the vernalization treatments in spring and winter wheat cultivars. Our results demonstrate that cold treatment induced the *miR319* expression in both cultivars, but *miR319* level is down-regulated in Norstar and up-regulated in the spring wheat cultivar Baz. Likewise, the expression levels of *MYB3* gene was decreased in both cultivars exposed to vernalization. There was reverse relationship between expression of *miR319* and its target gene *MYB3*. These results highlight the complex interactions between genotypes, miRNA and expression of target gene under different vernalization treatment.

**Keywords:** Cereal plants, Flowering genes, MicroRNA, Transcription factor, Vernalization.

#### چکیده

بسیاری از گیاهان سازگار با اقلیم‌های سرد تنها پس از یک دوره‌ی طولانی سرما گل می‌دهند که بهاره‌سازی نامیده می‌شود. در طول زندگی غلات زمستانه، گلدهی ناشی از بهاره‌سازی تنها یک قسمت از فرآیند تولیدمثلی نبوده بلکه یک مرحله‌ی مهم است که می‌تواند از گیاه در مقابل تنش‌های محیطی محافظت بکند. این فرآیند در غلاتی مثل گندم زمستانه توسط ژن‌های بهاره‌سازی و عمدتاً توسط ژن‌های *VRN1* و *VRN2* کنترل می‌شود. اگر چه مطالعات بسیاری بر روی بهاره‌سازی در گندم گزارش شده است، اما مکانیسم مولکولی بهاره‌سازی هنوز تا حد زیادی ناشناخته است. مطالعات اخیر نشان داده است که یک کلاس از RNAهای غیرکدکننده کوچک، microRNA (miRNAs)، نقش مهمی را در گلدهی با مشارکت در مسیرهای شناخته‌شده گلدهی ایفا می‌کند. در مطالعه حاضر، *miR319* و ژن هدف موردنظر آن، فاکتور رونویسی *MYB3* تحت تیمارهای بهاره‌سازی در دو رقم گندم بهاره و زمستانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیان *miR319* در طی بهاره‌سازی در هر دو رقم القا شد، اما مقدار بیان *miR319* در رقم نورستار کاهش و در رقم بهاره‌ی باز افزایش داشت. هم چنین سطوح بیان ژن *MYB3* در هر دو رقم تحت بهاره‌سازی کاهش یافت. رابطه معکوس بین بیان *miR319* و ژن هدف *MYB3* آن وجود داشت. این نتایج نشان دهنده پیچیدگی اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح بیان miRNA و ژن هدف تحت تیمارهای متفاوت بهاره‌سازی بود.

**واژه‌های کلیدی:** غلات، ژن‌های گلدهی، MicroRNA، عوامل رونویسی، بهاره‌سازی.

## مقدمه

دما به عنوان یک عامل کلیدی، فصل رشد و پراکنش جغرافیایی گیاهان را تعیین می‌کند. گیاهان مجموعه‌ای از مکانیسم‌های سازگاری به دما مثل دوره نهفتگی بذر و جوانه، حساسیت فتوپریودی، بهاره‌سازی و خوگیری به سرما را بروز می‌دهند. غلات زمستانه برای ورود به مرحله گلدهی نیازمند سرما می‌باشند که این فرآیند بهاره‌سازی<sup>۱</sup> نامیده می‌شود. این مکانیسم باعث می‌شود گیاهان بتوانند رشد خود را متناسب با تغییرات فصل کنترل کنند و در شرایط سخت زمستان، خود را از خسارت تنش سرما مصون نگه دارند (Fowler et al., 1996).

بهاره‌سازی شامل دو مرحله مجزای احساس سرما و تبدیل شرایط محیطی به یک جریان تنظیم‌کننده داخلی در القاء گلدهی می‌باشد که با تغییر در بیان ژن‌های مرتبط سبب کاهش موانع گلدهی می‌شود (Zografos and Sung, 2012). در بسیاری از گونه‌های گیاهی سرما و بهاره‌سازی یک نیاز ضروری جهت تکامل اندام تولید مثلی، جلوگیری از گلدهی قبل از فصل زمستان و انتقال به فاز زایشی گیاهان زمستانه در فصل بهار است (Kim et al., 2009) و اگرچه برای گلدهی لازم است اما به تنهایی سبب القای گلدهی نمی‌شود (Bond et al., 2011).

دو نوع گندم نان از نظر تیپ رشدی وجود دارد، که تفاوت آنها به خاطر نیاز به بهاره‌سازی بوده و شامل واریته‌های بهاره و زمستانه می‌باشند (Kumar et al., 2012). بهاره‌سازی در گیاهانی با تیپ رشد زمستانه موجب انتقال از فاز رویشی به زایشی می‌شود به گونه‌ای که این واریته‌ها برای گلدهی به چندین هفته دمای پایین در زمستان نیاز دارند، اما

واریته‌های بهاره گندم برای گلدهی به بهاره‌سازی نیاز ندارند و در دمای معمولی گل می‌دهند. این تفاوت از نظر زراعی مهم است زیرا ارقام بهاره و پائیزه در تاریخ‌های متفاوتی کشت شده و به نواحی مختلفی سازگار می‌باشند (Pidal et al., 2009). تجزیه ژنتیکی در جو و گندم نشان داده است که دلیل اصلی تفاوت در تیپ بهاره و پاییزه، وضعیت آلی در ژن *Vrn1* می‌باشد که بر نمو زایشی و بهاره‌سازی تأثیر می‌گذارد. ژنوتیپ‌های بهاره آل غالب *Vrn1* و ژنوتیپ‌های پاییزه آل مغلوب *vrn1* را حمل می‌کنند. در ژنوتیپ‌های حامل آل بهاره *Vrn1* به طور پیوسته در سطوح بالایی بیان شده و امکان نمو زایشی را بدون نیاز به بهاره‌سازی می‌دهند. در مقابل بیان این ژن در ژنوتیپ‌های بینابین و زمستانه با آل مغلوب *vrn1* کم بوده که موجب فاز رویشی طولانی‌تری می‌شود و القای آن نیاز به سرما دارد (Knox et al., 2010).

در نحوه تنظیم ژن‌های دخیل در بهاره‌سازی به نقش *miRNA* کمتر پرداخته شده است. ملکول‌های *miRNA*، *RNA*های کوچک اندوژن کد نشونده با طول ۱۹-۲۵ نوکلئوتید هستند که در فرایند های مختلف بیولوژیکی نقش حیاتی دارند. نقش *miRNA* در پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی به اثبات رسیده است (Reinhart et al., 2002; Voinnet, 2009; Zhou et al., 2010; Zhang et al., 2012). تغییر در بیان ژن‌های *miRNA* تحت تنش سرما در آرابیدوپسیس و صنوبر با استفاده از روش ریزآرایه شناخته شده است (Zhu, 2008). در گیاه *Brachypodium* ۲۸ *miRNA* می‌پاسخ‌دهنده به سرما شناسایی شده است (Zhang et al., 2009).

گردید. آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و دو فاکتور ارقام گندم در دو سطح ذکر شده و روزهای بهاره‌سازی در سه سطح (صفر، دو و ۱۴ روز) در دمای چهار درجه سانتی‌گراد (از زمان جوانه‌زنی تا آخر نمونه‌برداری) انجام شد انتخاب سطوح تیمار بهاره‌سازی بر اساس مطالعات قبلی انجام شده در گندم صورت گرفت (Laudencia-Chingcuanco *et al.*, 2011). بعد از اعمال تیمارها گل‌دان‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. آبیاری با آب مقطر در اوایل رشد به صورت روزانه و پس از پنجه‌زنی با فواصل یک روز با محلول هوگلند انجام گرفت. در هر سطح تیمار بهاره‌سازی نمونه‌ی برگ‌ی گرفته شد و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت. نمونه‌ها در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور ارزیابی بهاره‌سازی، تعداد نهایی برگ (FLN<sup>۱</sup>) روی ساقه اصلی محاسبه شد این روش به‌طور مستقیم تغییرات فنولوژیکی نظیر انتقال از مرحله رویشی به زایشی را منعکس می‌کند و نیز شاخص مناسب مورفولوژیکی برای تعیین نقطه تکمیل بهاره‌سازی می‌باشد (Fowler *et al.*, 1996; Mahfoozi *et al.*, 2006).

#### واکنش Real-time PCR و بررسی بیان miRNA

##### و ژن هدف آن

برای انجام Real-time PCR نمونه‌های هر تیمار در ازت مایع کوبیده شده و حدود 100 میلی‌گرم از آن به منظور استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج (RNX-Plus ساخت شرکت سیناکلون) طبق دستور العمل انجام شد. به منظور حذف هر گونه باقیمانده

بررسی‌ها نشان داده است چندین خانواده miRNA نقش مهمی را در مسیرهای کنترل‌کننده گلدهی نیز دارند. در گیاهان دو لپه مدارک و شواهد مختلفی برای نقش‌های مختلف و مهم miR319 و ژن‌های هدف آن در فرایند نمو گیاه، در شکل برگ، بیوسنتز جاسمونات و نمو گل پیشنهاد شده است (Palatnik *et al.*, 2003; Schommer *et al.*, 2008b; Nag *et al.*, 2009; Koyama *et al.*, 2010; Ben-Gera and Ori, 2012). عملکرد miR319 در تک لپه‌ای‌ها کمتر شناخته شده است. در برنج خانواده ژنی *miR319* در اندازه برگ برنج نقش دارد. بررسی‌ها نشان داده است که بیان بیش از حد *miR319* باعث افزایش تحمل سرما (چهار درجه سانتی‌گراد) بعد از خوگیری در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد در نشاهای برنج تراریخت شده است همچنین miR319 نقش مهمی در ریخت‌زائی برگ برنج تحت سرما دارد. (Yang *et al.*, 2013). در گیاه آرآیدوپسیس، miR319 به عنوان تنظیم‌کننده ژن‌های هدف دو دسته از عوامل رونویسی، -TCP-like و MYB-like شناخته می‌شود (Navaud *et al.*, 2007; Schommer *et al.*, 2008a). گزارشی از نقش سرما در بیان *miR319* و ژن هدف *MYB3* در گندم نان منتشر نشده است به همین دلیل اختلاف بین تیپ‌های مختلف رشدی گندم نیز از این نظر ناشناخته است. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر سرما و بهاره‌سازی در بیان ژن *miR319* و ژن هدف آن در ارقام مختلف بهاره و زمستانه گندم و مطالعه نقش احتمالی آن در بهاره‌سازی بود.

#### مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو ژنوتیپ گندم، باز با تیپ رشد زودرس و نورستار متحمل به سرما با تیپ رشد زمستانه و نیاز درازمدت به بهاره‌سازی، استفاده

1. Final Leaf Number

YTA SYBR Green qPCR MasterMix 2X با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q با دو تکرار تکنیکال برای هر نمونه انجام شد. داده‌های حاصل از Real-time PCR با استفاده از روش  $\Delta\Delta Ct$  تجزیه و تحلیل شدند.

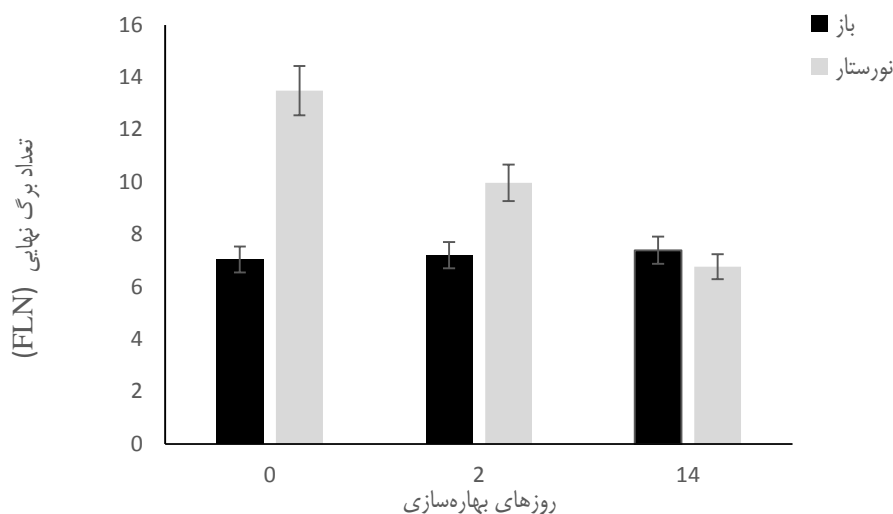
### نتایج و بحث

پاسخ فنوتیپی به سرما و زمان گلدهی با استفاده از تعداد برگ نهایی برآورد شد. با قرار گرفتن گیاهچه‌های گندم در دمای چهار درجه سانتی‌گراد برای تعیین نیاز بهاره‌سازی، تعداد برگ نهایی در رقم زمستانه نورستار کاهش یافت (شکل ۱). با افزایش دوره‌ی بهاره‌سازی، تعداد برگ‌ها در این رقم کاهش بیشتری نشان داد و به ۶ برگ کاهش پیدا کرد. در صورتیکه در رقم بهاره‌ی باز، تعداد روزهای بهاره‌سازی تأثیری بر تعداد نهایی برگ نداشت. بنابراین رشد رویشی رقم بهاره بدون تیمار سرمای بهاره‌سازی، تکمیل می‌شود و بهاره‌سازی تأثیری در شروع دوره گلدهی آن ندارد.

DNA نمونه‌های RNA استخراج شده با استفاده از آنزیم (fermentas، DNase 1) مطابق با دستورالعمل مربوطه تیمار شدند. بررسی کمیت RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (مدل NANODROP 200 ساخت شرکت Thermo SCIENTIFI) انجام شد. برای سنجش کیفیت RNA از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد (رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید) در بافر TAE (Tris/Acetate/EDTA) استفاده شد، توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر (*miR319*, *MYB3*) و ژن *Ta22845* به عنوان ژن خانه‌دار از پایگاه داده‌ی NCBI و miRbase تهیه شد (جدول ۱). آغازگرهای اختصاصی Stem-Loop به منظور تولید cDNA و آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر در qRT-PCR برای هر miRNA مطابق با دستورالعمل ارائه شده (Caifu Chen *et al.*, 2005; Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007) طراحی شدند. فرآیند سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای Stem-Loop با استفاده از کیت Kit Hyperscript<sup>TM</sup> RT master mix مطابق با دستورالعمل ارائه شده انجام شد. واکنش Real-time PCR با استفاده از

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای ژن‌های مورد بررسی در گندم

نام ژن	شماره دسترسی	آغازگر پیش رو	آغازگر پس رو
<i>MYB3</i>	EF114831.1	5'-CACCATTGGGGGTACACTT-3'	5'-TCACTGACGGAGTTGCTGTC-3'
<i>miR319</i>	MIMAT0018211	5'-CGCGCTTGGACTGAAGGGAG3'	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
<i>Ta22845</i>	HG670306.1	5'-GCTGGCTCGTCAACTGATG-3'	5'-GGACCAAGCGTTCTGATTACTC-3'
Stem-loop RT PCR primer	MI0016453	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGGATACGACAGGGAG 3'	



شکل ۱. تغییرات تعداد نهایی برگ در روزهای مختلف بهاره‌سازی در گندم رقم بهاره باز و رقم زمستانه نورستار

بر تغییرات فنولوژیکی آن می‌باشد.

#### تأثیر روزهای بهاره‌سازی بر بیان نسبی ژن‌های MYB3 و miR319

با اعمال تیمار بهاره‌سازی، تغییرات بیان نسبی ژن *miR319* در گیاهچه‌های گندم رقم نورستار و باز متفاوت بود و این ژن در رقم بهاره باز بیان بسیار بیشتری داشت (شکل ۲)، به طوری که تیمار سرما ۱۴ روزه سبب افزایش ۲/۳ برابری بیان این ژن در رقم باز نسبت به شاهد شد. در صورتیکه در گندم زمستانه نورستار بیان نسبی ژن *miR319* در هر دو تیمار بهاره‌سازی نسبت به شاهد بیان منفی داشت و در ۱۴ روز بهاره‌سازی دارای کمترین مقدار بود. این نتایج نشان می‌دهد که اعمال تیمار سرما بیان ژن *miR319* را در هر دو ژنوتیپ تحت تأثیر قرار داده است و این تأثیر به وضوح در ارقام زمستانه و بهاره گندم مورد استفاده در این آزمایش متفاوت است. در سال‌های اخیر مطالعه زیادی در مورد نقش miRNA در پاسخ به تنش‌های زیستی غیرزیستی در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس، برنج و ذرت انجام شده است

بهاره‌سازی در گیاهان مناطق سردسیر مانند ارقام زمستانه گندم یک مکانیسم سازگاری برای گذر از سرما سخت زمستان است (Fowler *et al.*, 1996; Hay and Ellis, 1998). این مکانیسم دوره رشد زایشی را که حساس‌ترین مرحله به سرما می‌باشد از آسیب‌های وارده حفظ کرده و در این گیاهان دوره رشد زایشی تنها هنگامی شروع می‌شود که نیاز گیاه به بهاره‌سازی در اثر سرما اشباع شود (Mahfoozi *et al.*, 2006). هر دو فرآیند آغازش پرموردیای برگ و ظهور برگ‌ها بسیار حساس به درجه حرارت می‌باشند و مطالعات بسیاری ثابت کرده است که سرعت آغازش سنبلچه یک تابع نزولی از تعداد کل برگ است. بنابراین بر اساس نظر محققین از بین روش‌های تعیین مراحل بیولوژیکی و فنولوژیکی غلات، تنها تعداد برگ نهائی می‌تواند تغییرات اساسی بیولوژیکی ورود به دوره زایشی را در گندم به وضوح نشان دهد (Fowler *et al.*, 2001; Limin and Fowler *et al.*, 2006; Mahfoozi *et al.*, 2006). این تغییرات در کاهش تعداد برگ نهائی به وضوح در رقم زمستانه نورستار دیده می‌شود و نشان‌دهنده اثر سرما

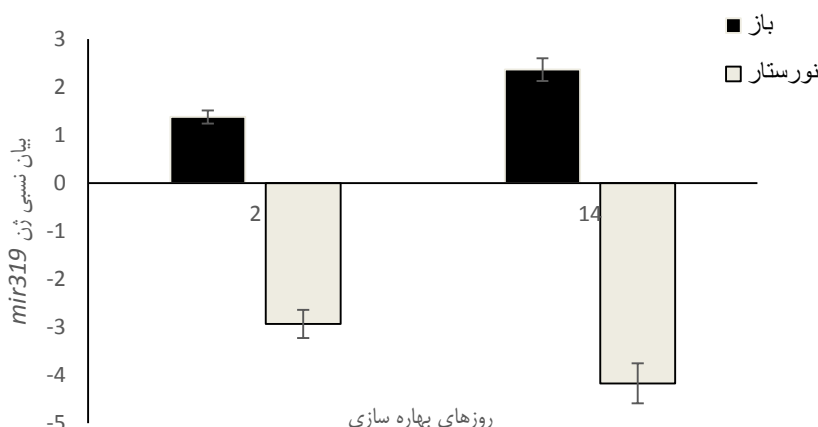
Schommer و همکاران (۲۰۰۸) افزایش بیان ژن *miR319* در گیاهان جهش‌یافته آرابیدوپسیس موجب تأخیر در گلدهی می‌شود. بنابراین کاهش چشمگیر ژن *miR319* در اثر بهاره‌سازی در رقم زمستانه نورستار ممکن است در القای گلدهی نقش داشته باشد. تاکنون در مورد اثر سرما در میزان بیان ژن *miR319* در گندم و رابطه آن با بهاره‌سازی و گلدهی گزارشی نشده است. اختلاف فاحش دو تیپ رشدی بهاره و زمستانه و نیز اثر متقابل آنها با بهاره‌سازی نشان‌دهنده پیچیدگی سازوکار تنظیم گلدهی و اثر ژنوتیپ در گندم می‌باشد.

بطور کلی بهاره‌سازی موجب کاهش بیان ژن *MYB3* در هر دو رقم بهاره و زمستانه شد. گرچه کاهش بیان این ژن هدف *miR319* در رقم زمستانه نورستار نسبت به رقم بهاره باز واضح بود و شدت کاهش بیان آن با اعمال تیمار بهاره‌سازی بیشتر شد (شکل ۳). با افزایش روزهای بهاره‌سازی از دو روز به ۱۴ روز میزان کاهش بیان ژن *MYB3* در رقم بهاره باز از ۳- برابر به ۱- برابر شاهد تغییر یافت. این نتایج بوضوح تأثیر ژنوتیپ و تیپ رشدی گندم را بر بیان ژن *MYB3* نشان می‌دهد.

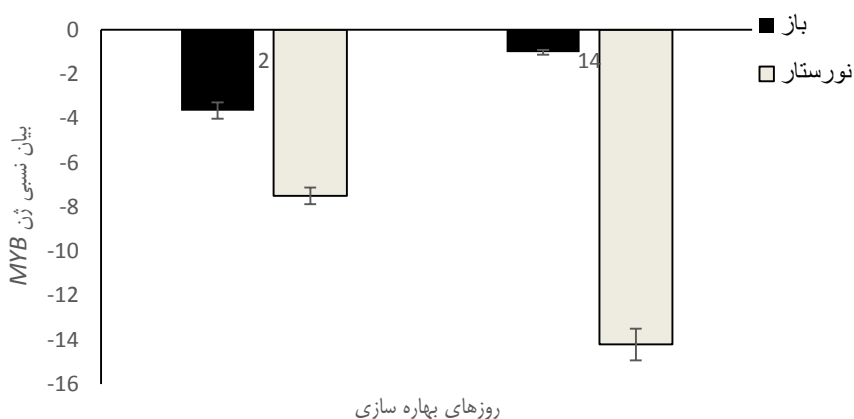
خانواده MYB برای اولین بار در ذرت شناسایی شده و در گیاهان بر اساس تعداد نواحی تکراری به سه زیرگروه تقسیم می‌شوند که بزرگترین و مهمترین زیرگروه R2R3 می‌باشد (Du et al., 2012). عامل رونویسی MYB3 مورد مطالعه در این تحقیق نیز متعلق به این زیرگروه می‌باشد.

( Liu et al., 2008; Ding et al., 2009; Covarrubias and Reyes, 2010). با اینحال مطالعات اندکی در مورد تنظیم اپی ژنتیک سرما نقش عوامل رونویسی و miRNA در گلدهی و بهاره‌سازی وجود دارد (Trevaskis et al., 2007). بررسی‌ها نشان داده است که *miR319* در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی مختلف، از جمله ترانسسانی اسید جیبرلیک، ورود از مرحله رویشی به زایشی، تنظیم بیوستنز اتیلن، ترانسسانی هورمون ABA و نیز شکل برگ گیاه در تنش سرما و شوری دخیل است ( Rhoades et al., 2002; Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Sunkar & Zhu, 2004; Schwab et al., 2005; Reyes & Chua 2007; Liu et al., 2008). علاوه بر این، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک داده‌های ریز آرایه در آرابیدوپسیس نشان داده است که بیان بسیاری از miRNAهای گیاهی از جمله *miR319* در سرما تغییر می‌یابند ( Zimmermann et al., 2004). در این مطالعه بیان ژن *miR319* طی بهاره‌سازی تغییر کرده و میزان سطوح بیان در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متفاوت بود. تیپ‌های مختلف رشدی زمستانه و بهاره در دو ژنوتیپ گندم مورد مطالعه در این آزمایش نشان‌دهنده نقش ژنوتیپ در تنظیم ژن‌های مربوطه می‌باشد (Thiebaut et al., 2012).

تأثیر سرما در تغییر میزان بیان ژن *miR319* در نیشکر (Thiebaut et al., 2012) و آرابیدوپسیس (Thiebaut et al., 2012) گزارش شده است. با توجه به مشاهدات Palatnik و همکاران (۲۰۰۳) و نیز



شکل ۲. اثر روزهای بهاره‌سازی بر بیان نسبی ژن *miR319* در برگ دو رقم گندم باز و نورستار



شکل ۳. اثر روزهای بهاره‌سازی بر بیان نسبی ژن *MYB3* در برگ دو رقم گندم باز و نورستار

گیاهان نیشکر که در معرض سرما قرار داشتند باعث مهار رشد و نمو گیاه شده است (Thiebaut *et al.*, 2012). بنابراین در گندم نیز بهاره‌سازی از طریق تأثیر در بیان *miR319* و ژن هدف آن عامل رونویسی MYB3 احتمالاً می‌تواند تأثیر مشابه بر بیان سایر ژن‌ها داشته باشد. از طرف دیگر تجزیه و تحلیل فیلوژنی توالی‌های پروتئینی در گندم نشان داده است که عامل رونویسی MYB3 در گندم دارای شباهت بسیار زیادی به عامل رونویسی vGAMyb جو با بیش از ۹۷٪ همسانی دارد (Rongmin Chen *et al.*, 2005). عامل رونویسی vGAMyb در نمو گل در جو

با استفاده از لاین‌های جهش‌یافته در گیاه آرآبیدوپسیس نقش حیاتی زیرگروه R2R3 در خوگیری به تنش سرمایی و نمو حاصله به اثبات رسیده است (Zhu *et al.*, 2005). به همین ترتیب در جو، ژن *GAMyb* مسئول رشد بافتی، طول عمر ساقه، گلدهی زودرس و رشد دانه شناخته شده است (Woodger *et al.*, 2003). عوامل رونویسی MYB (*GAMyb*, TC94752) در کنار عامل رونویسی TCP در نیشکر نیز به‌عنوان یک ژن هدف بالقوه برای *miR319* شناسایی شده است (Thiebaut *et al.*, 2012) و بررسی نشان داده است که کاهش سطوح *GAMyb* در

رونویسی MYB بر میزان جیبرلین تأثیر گذاشته و موجب گل‌انگیزی در گندم شود. از طرف دیگر عوامل رونویسی MYB در آراییدوپسیس (MYB33 و MYB101) به عنوان تنظیم‌کننده‌های مثبت پاسخ ABA در طی جوانه‌زنی بذر عمل می‌کنند (Roy, 2016). این نتایج نشان می‌دهد که در مطالعات بعدی اثرات متقابل سطوح بیان ژن *miR319* و ژن هدف با سایر miRNAها و هورمون‌های گیاهی تحت بهاره‌سازی در گندم بایستی مورد توجه قرار گیرد. همان‌طوری که وجود اثر متقابل بین سرما و هورمون ABA بر میزان بیان ژن *miR319* و ژن هدف آن عامل رونویسی MYB در نیشکر نشان داده شده است (Thiebaut *et al.*, 2012).

نقش مهمی دارد و از عناصر بسیار مهم در مسیر ترانس‌اسی جیبرلین در گیاهان می‌باشد (Fiona *et al.*, 2003). نقش جیبرلین در انگیزش گلدهی در لولیوم به اثبات رسیده است (King *et al.*, 2001). از طرف دیگر وجود اثر متقابل در گندم بین تیمار هورمونی با جیبرلین و ژن بهاره‌سازی *VRNI* ثابت شده است (Pearce *et al.*, 2013). در یک مطالعه که بر روی تأثیر بهاره‌سازی بر میزان جیبرلین صورت گرفت مقدار هورمون در اندام هوایی گندم بهاره‌سازی شده بسیار بیشتر از شاهد بوده که نشان‌دهنده اهمیت این هورمون در انگیزش گل در اثر بهاره‌سازی است (Lin and Stafford, 1987). بنابراین احتمال دارد بهاره‌سازی از طریق تغییر در میزان بیان عوامل

## REFERENCES

- Ben-Gera H, and Ori N (2012) Auxin and LANCEOLATE affect leaf shape in tomato via different developmental processes. *Plant Signaling & Behavior* 7(10): 1255-1257.
- Bond DM, Dennis ES and Finnegan EJ (2011) The low temperature response pathways for cold acclimation and vernalization are independent. *Plant, Cell & Environment* 34(10): 1737-1748.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR and Andersen MR (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 33(20): e179-e179.
- Chen R, Ni Z, Nie X, Qin Y, Dong G and Sun Q (2005) Isolation and characterization of genes encoding Myb transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 169(6): 1146-1154.
- Covarrubias AA and Reyes JL (2010) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell & Environment* 33(4): 481-489.
- Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z and Zheng Y (2009) Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany* 103(1): 29-38
- Du H, Feng B-R, Yang S-S, Huang Y-B and Tang Y-X (2012) The R2R3-MYB Transcription Factor Gene Family in Maize. *PLOS ONE* 7(6): e37463.
- Fiona M, Roger K, John J and Frank G (2003) A role for HvGAMYB in anther development. *The Plant Journal* 33(3): 481-491.
- Fowler D, Limin A, Wang S-Y and Ward R (1996) Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Canadian Journal of Plant Science* 76(1): 37-42.
- Fowler DB, Breton G, Limin AE, Mahfoozi S and Sarhan F (2001) Photoperiod and temperature



- interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiology* 127(4): 1676-1681.
- Hay R and Ellis R (1998). The control of flowering in wheat and barley: what recent advances in molecular genetics can reveal. *Annals of Botany* 82(5): 541-554.
- Jones-Rhoades MW and Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* 14(6): 787-799.
- Kim D-H, Doyle MR, Sung S and Amasino RM (2009) Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental* 25: 277-299.
- King RW, Moritz T, Evans LT, Junttila O and Herlt AJ (2001) Long-day induction of flowering in *Lolium temulentum* involves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex. *Plant Physiology* 127(2): 624-632.
- Knox AK, Dhillon T, Cheng H, Tondelli A, Pecchioni N and Stockinger EJ (2010) CBF gene copy number variation at Frost Resistance-2 is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals. *Theoretical and Applied Genetics* 121(1): 21-35.
- Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K and Ohme-Takagi M (2010). TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22(11): 3574-3588.
- Kumar S, Sharma V, Chaudhary S, Tyagi A, Mishra P, Priyadarshini A and Singh A (2012) Genetics of flowering time in bread wheat *Triticum aestivum*: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat. *Journal of Genetics* 91(1): 33-47.
- Laudencia-Chingcuanco D, Ganeshan S, You F, Fowler B, Chibbar R and Anderson O (2011) Genome-wide gene expression analysis supports a developmental model of low temperature tolerance gene regulation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genomics*, 12: 299-299.
- Limin, A. E. and Fowler, D. B. (2006). Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development. *Planta* 224(2): 360-366.
- Lin J-T and E Stafford A (1987). Comparison of the endogenous gibberellins in the shoots and roots of vernalized and non-vernalized chinese spring wheat seedlings. *Phytochemistry* 26(9): 2485-2488.
- Liu H-H, Tian X, Li Y-J, Wu C-A and Zheng C-C (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Rna* 14(5): 836-843.
- Mahfoozi S, Limin AE, Ahakpaz F and Fowler DB (2006) Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. *Field Crops Research* 97(2): 182-187.
- Nag A, King S and Jack T (2009) miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(52): 22534-22539.
- Navaud O, Dabos P, Carnus E, Tremousaygue D and Hervé C (2007) TCP transcription factors predate the emergence of land plants. *Journal of*

- Molecular Evolution 65(1): 23-33.
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC and Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425(6955): 257-263.
- Pearce S, Vanzetti LS and Dubcovsky J (2013) Exogenous Gibberellins Induce Wheat Spike Development under Short Days Only in the Presence of *VERNALIZATION1*. *Plant Physiology* 163: 1433-1445.
- Pidal B, Yan L, Fu D, Zhang F, Tranquilli G and Dubcovsky J (2009) The CArG-box located upstream from the transcriptional start of wheat vernalization gene *VRN1* is not necessary for the vernalization response. *Journal of Heredity* 100(3): 355-364.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B and Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes & Development* 16(13): 1616-1626.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B and Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110(4): 513-520.
- Reyes JL and Chua NH (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal* 49(4): 592-606
- Roy S (2016) Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant Signaling & Behavior* 11(1): e1117723.
- Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chételat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U and Weigel D (2008a) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol* 6(9): e230.
- Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chételat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U and Weigel D (2008b) Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets. *PLOS Biology* 6(9): e230.
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M and Weigel D (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell* 8(4): 517-527.
- Sunkar R and Zhu J-K (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell* 16(8): 2001-2019.
- Thiebaut F, Rojas CA, Almeida KL, Grativol C, Domiciano GC, Lamb CRC, DE ALMEIDA ENGLER J, Hemerly AS and Ferreira PC (2012) Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. *Plant, Cell & Environment* 35(3): 502-512.
- Trevaskis B, Hemming MN, Dennis ES and Peacock WJ (2007) The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends in Plant Science* 12(8): 352-357.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF and Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3: 12-12.
- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136(4): 669-687
- Woodger FJ, Millar A, Murray F, Jacobsen JV and Gubler F (2003) The role of GAMYB transcription factors in GA-regulated gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation* 22(2): 176-184.
- Zhang B, Jin Z and Xie D (2012) Global analysis of non-coding small RNAs in Arabidopsis in response to jasmonate treatment by deep sequencing technology. *Journal of Integrative Plant Biology* 54(2): 73-86.
- Zhang J, Xu Y, Huan Q and Chong K (2009). Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the

- global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics* 10(1): 449.
- Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M and Luo L (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany* 61(15): 4157-4168.
- Zhu J-K (2008) Reconstituting plant miRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(29): 9851-9852.
- Zhu J, Verslues PE, Zheng X, Lee B-H, Zhan X, Manabe Y, Sokolchik I, Zhu Y, Dong C-H and Zhu J-K (2005) HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(28): 9966-9971.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L and Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136(1): 2621-2632.
- Zografos BR and Sung S (2012) Vernalization-mediated chromatin changes. *Journal of Experimental Botany* 63(12): 4343-4348.