**Crop Biotech.**
Autumn and Winter (2013) 5: 49-59

**مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی**
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۵۹- ۴۹)

# تأثیر تنش گرما بر تغییرات بیانی miR398 در گیاه آفتابگردان

**ریحانه ابراهیمی[۱]، بهروز شیران [۲]*، اسماعیل ابراهیمی[۳] و حسین فلاحی[۴]**

**۱، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، ۲، استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، ۳، استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ۴، استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه**

**( تاریخ دریافت:۹۲/۷/۳ - تاریخ تصویب:۹۲/۱۰/۴ )**

# The Effect of Heat Stress on Expression Alternation of miR398 in *Helianthus annuus* L.

**R. EBRAHIMI[1]*, B. SHIRAN[2], E. EBRAHIMIE[3] AND H. FALLAHI[4]**

1, M.Sc. Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, 2, Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, 3, Assistant Professor, Department of Crop Production and Plant Breeding, Shiraz University, Shiraz, Iran, 4, Assistant Professor, Department of Biology, Razi University, Kermanshah, Iran

( Received: Sep. 25, 2013 - Accepted: Dec. 25, 2013)

**Abstract**

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs approximately 21-22 nucleotides long and have been identified as negative regulators of gene expression in the post-transcriptional level in plants and animals. Temperature is one of the most important climate change factors and higher temperatures affect agriculture and crop production adversely. In this study, the expression pattern of miR398 and NtGT5b target gene of this miRNA were measured in root and leaf tissues of sunflower (*Helianthus annuus*) in various heat stress conditions (0h, 1.5h, 3h , 6h) at $42^0$C temperature by qRT-PCR. The results showed different pattern of miRNA expression in both root and leaf tissues during mild, moderate and severe heat stress, respectively.miR398 was highly up regulated and its target gene down regulated in leaf tissue that showed thermo tolerance of this tissue for term of heat stress. There is a different miRNA expression patterns in leaf and root tissues under various stress conditions which is an indication of induced signal transmission after heat stress. Investigating miR398 network shows that this miRNA through the presence of important genes and transcription factors such as AFO and INO has the ability to change the pattern of gene expression of many processes such as growth, development and response to stress.

**Keywords:** miR398, Target gene, NtGT5b gene, Heat stress, Sunflower

**چکیده**

microRNAها، RNAهایی کوچک به‌طول تقریبی ۲۲-۲۱ نوکلئوتید هستند که توسط ژنوم موجود کد شده، هیچ نوع پروتئینی را کد نمی‌کنند و به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی بیان ژن در مرحله پس از رونویسی در گیاهان و جانوران شناخته شده‌اند. دما یکی از مهمترین فاکتورهای آب و هوایی مؤثر بر کشاورزی محسوب می‌شود و دمای بالا اثرات نامساعدی بر رشد، نمو و عملکرد محصولات زراعی گیاهان می‌گذارد. در این پژوهش الگوی بیانmiR398 و ژن هدف آن NtGT5b در بافت برگ و ریشه گیاه آفتابگردان زراعی در شرایط کنترل و تحت تنش گرما با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۱/۵، ۳ و ۶ ساعت با استفاده از روش qRT-PCR بررسی گردید. نتایج حاصل از این آزمایش تفاوت الگوی بیان این miRNA را در دو بافت برگ و ریشه و در خلال تنش ملایم، متوسط و شدید گرما نشان داد. تنش گرما سبب افزایش بیان سریع miR398 و کاهش میزان رونوشت همانند ژن هدف NtGT5bدر بافت برگ شد، که نشان‌دهنده ایجاد مقاومت این بافت در مواجهه با تنش گرما است. وجود الگوهای بیانی متفاوت miRNA در بافت‌های برگ و ریشه در سطوح مختلف تنش می‌تواند بیانگر جابه‌جایی علامت‌های القاء شده پس از تنش گرما به بافت برگ و ریشه رخ داده باشد. بررسی شبکه miR398 نشان داد که این miRNA به واسطه حضور ژن‌های مهم نظیر فاکتورهای رونویسی AFO وINO قابلیت تغییر الگوی بیان‌ژن را در بسیاری از شبکه‌های رشد، نمو و پاسخ به تنش در گیاهان دارند.

**واژه‌های کلیدی:** miR398، ژن هدف، NtGT5b، تنش گرما، آفتابگردان

* نویسنده مسئول: بهروز شیران
E-mail: beshiran45@gmail.com

## مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یکی از گیاهان دانه روغنی متعلق به تیره (Compositae) می‌باشد که زراعت آن در سراسر جهان به سه دلیل عمده، زیبابودن گل، مصرف مستقیم دانه (مصرف آجیلی) و تولید روغن انجام می‌گردد (Vollmann and Rajcan, 2010). آفتابگردان گیاهی گرمادوست بوده و در میانگین دمای شبانه‌روزی ۱۰ تا بیش از ۳۲ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند (Khajehpour, 2004).

تغییرات آب و هوا و تنش‌های غیرزیستی بر کشاورزی و تولید محصول تأثیر نامساعدی دارند و دما یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی به‌ویژه برای محصولات گرمسیری به‌حساب می‌آید (Chauhan *et al.*, 2011). دمای بالا اغلب با تابش زیاد، خشکی و باد شدید اتفاق می‌افتد که تمام این‌ها می‌تواند صدمات وارده به گیاه را تشدید کنند (Devasirvatham *et al.*, 2012). در اثر فعالیت‌های انسان تغییر در غلظت $CO_2$ و گازهای گلخانه‌ای همچون متان، کلروفلوروکربن و نیتروس‌اکسیداز رخ داده و باعث شده است تا دمای جهانی در قرن بیستم به میزان تقریبی ۰/۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۱۰۰ این میزان به ۱/۸ تا ۴/۵ درجه سانتی‌گراد برسد؛ این تغییرات دمایی منجر به ایجاد تنش گرما و سبب بروز مشکلات عدیده‌ای در زمینه کشاورزی در سراسر جهان گردیده است (Chauhan *et al.*, 2011). افزایش دما به صورت موقت و پایدار سبب تغییرات مورفولوژیکی، آناتومیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان می‌شود که این عوامل بر رشد و نمو گیاه مؤثر بوده و ممکن است کاهش عملکرد اقتصادی گیاه را در پی داشته باشد (Wahid *et al.*, 2007). گیاه به محض قرار گرفتن در دمای بالا و دریافت علامت‌های محیطی تغییراتی را در سطح مولکولی ایجاد می‌کند، از جمله این اتفاقات بیان microRNAها می‌باشد که در شرایط تنش، میزان بیان آن‌ها تغییر می‌کند (Chen *et al.*, 2012).

microRNAها یا miRNAها، RNAهایی کوچک به‌طول تقریبی ۲۲-۲۱ نوکلئوتید هستند که توسط ژنوم موجود کد شده، هیچ نوع پروتئینی را کد نمی‌کنند و به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم بیان‌ژن پس از رونویسی در گیاهان و جانوران شناخته شده‌اند. miRNAها بیان ژن‌ها را با قطعه قطعه‌کردن و یا جلوگیری از ترجمه ژن‌های هدف تنظیم می‌کنند. عامل کلیدی در مکانیسم کارکردی miRNA وجود بازهای مکمل ما بین ژن هدف و miRNA است. مشاهدات حاکی از آن است که مکمل‌بودن کامل بازها بین ژن‌های هدف و miRNA منجر به قطعه‌قطعه‌شدن مولکول‌های رونوشت ژن هدف شده، این درحالی است که جفت‌شدگی ناکامل بازها در بخش مرکزی سبب جلوگیری از ترجمه رونوشت ژن هدف می‌شود (Bartel, 2004). ویژگی اصلی و مهم miRNAها در هموستازی گیاه نسبت به فاکتورهای رونویسی، توانایی آن‌ها در خاموش‌کردن فاکتورهای رونویسی است (Giacomelli *et al.*, 2012) و اکثر ژن‌های هدف miRNAهای گیاهی فاکتورهای رونویسی هستند (Sunkar, 2012). برخی از miRNAها در بسیاری از فرآیندهای رشدی گیاه بیان می‌شوند، این در حالی است که برخی از آن‌ها تنها در مراحل خاصی از نمو یا تحت شرایط محیطی خاص نظیر تنش خشکی، غرقاب‌شدن و یا کوتاه‌شدن روز بیان می‌شوند. این مولکول‌های کوچک دارای عملکردهای متنوعی نظیر: تنظیم بیان‌ژن، اثر متقابل با هورمون‌های گیاهی، جوانه‌زنی بذر، تغییر فاز رویشی به زایشی، آغاز گل‌دهی، تولید بذر، مورفوژنز برگ، تشکیل ریشه و بافت‌های آوندی، دخیل‌بودن در سنتز ta-siRNA و تحت تأثیر قراردادن سنتز سایر miRNAها هستند. تعدادی از miRNAها شناسایی شده‌اند که در بین بافت‌های مختلف از طریق سیستم آوندی همچون مولکول‌های آب یا آهن جابه‌جا می‌شوند (Jin *et al.*, 2013). برای نمونه miR398 به‌عنوان ژن مرکزی در شبکه‌های تنظیمی محسوب می‌شود (Zhu *et al.*, 2011) و یکی از miRNAهای حفاظت‌شده گیاهی است که با پیش‌بینی‌های کامپیوتری و آنالیز توالی‌های تحت تنش در آرابیدوپسیس شناخته شده است. خانواده miR398 در برنج، یونجه و lotus به شدت حفاظت شده هستند. در آرابیدوپسیس خانواده miR398 به‌وسیله سه جایگاه‌ژنی کد می‌شوند که شامل miR398a، miR398b و miR398c می‌باشند. در بین miRNAهای پاسخ‌دهنده به تنش، miR398 به‌طور مستقیم شبکه‌های تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش را تحت تأثیر قرار می‌دهد و پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را همچون خشکی، شوری، تنش اکسیداتیو و آلودگی‌های باکتریایی تنظیم می‌کند (Sunkar and Zhu, 2004; Zhu *et al.*, 2011). miR398 به‌عنوان اولین miRNA شناخته شده در مقابله با تنش‌ها است. نقش مؤثر این miRNA در واکنش به تنش گرما در گیاه آفتابگردان فرصتی مناسب برای درک مکانیسم پاسخ این گیاه به تنش گرما ایجاد می‌کند. با توجه به اهمیت فراوان آفتابگردان در تولید دانه‌های روغنی و اینکه تنش‌های غیرزیستی یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر عملکرد

آفتابگردان می‌باشند و تا به‌حال گزارشی مبنی بر پیداکردن miRNAهای درگیر درپاسخ به تنش غیرزیستی گرما در این گیاه ارائه نشده است. هدف از این پژوهش بررسی روند تغییرات بیانی این miRNA در دو بافت برگ و ریشه در گیاهان تحت تنش گرما و شاهد و نحوه کنترل بیان ژن هدف آن انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### آنالیز بیوانفورماتیکی

### شناسایی ژن هدف و طراحی آغازگر

پیش از این حضور miR398 در آزمایشگاه در گیاهچه‌های آفتابگردان توسط MonavarFeshani *et al.* (2011) تائید شده بود. آغازگرهای ساقه- حلقه[1] براساس روش Chen *et al.* (2005) طراحی گردید. با استفاده از ویژگی‌های شناسایی ژن هدف برای miRNAها همچون، تعداد باز ناهمسان[2] بین توالی miRNA و ژن هدف بیش از چهار نوکلئوتید نباشد؛ ناهمسانی در بازهای ۱۰ و ۱۱ بین توالی miRNA با توالی هدف وجود نداشته باشد و بیش از سه نوکلئوتید ناهمسان به‌صورت متوالی و پشت سر هم بین توالی miRNA و ژن هدف آن دیده نشود (Jones-Rhoades and Bartel, 2004) با استفاده از نرم‌افزار آنلاین psRNAtarget (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/) ژن هدف miR398 پیش‌بینی گردید. توالی پیش‌بینی‌شده هدف برای miR398 با توالی قسمتی از همولوگ ژن NtGT5b به شماره AB176524.1 به‌صورت معکوس و وارونه مکمل توالی miR398 است (TACGCCACCTGAGAACAC). تنها این ژن توسط نرم‌افزار آنلاین psRNAtarget به‌عنوان ژن هدف ارائه شده است که در توالی‌های EST[3] آفتابگردان موجود بود. طراحی آغازگر رفت و برگشت ژن هدف با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 صورت گرفت. لیست آغازگرها در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به‌طول miRNA و ژن هدف یک باند به اندازه تقریبی ۸۰ جفت باز برای miRNAها و یک باند به طول تقریباً ۱۲۰ باز برای ژن‌های هدف مشاهده گردید.

### آنالیز موتیف[4] و پروسایت[5] ژن‌های هدف

به‌منظور بررسی دقیق‌تر عملکرد پروتئین ژن هدف جدید ارائه شده، دریافت پروسایت و موتیف توالی‌های پروتئینی با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین Pfam (http://pfam.sanger.ac.uk/) و ELM (http://elm.eu.org/) صورت گرفت. بدین‌صورت که توالی پروتئینی ژن هدف در قسمت sequence قرار داده شد و از حالت default نرم‌افزار استفاده شد.

### رسم شبکه‌ژنی

بررسی ارتباطات ما بین ژن هدف و miRNA انتخابی با استفاده از دیتابیس[6] گیاهی RESNET نرم‌افزار PathwayStudio نسخه شماره ۹ انجام شد. این دیتابیس شامل ژن‌های گیاهان مدل و سایر گیاهان نظیر جو، ذرت، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و تنباکواست. این نرم‌افزار به کمک یک نرم‌افزار داده کاوی متن به‌نام MedScan اطلاعات مربوط به ژن‌ها را با استفاده از الگوریتم‌هایی همچون آزمون t-test، به یک فرم قابل درک تبدیل می‌کند. با استفاده از این نرم‌افزار می‌توان ارتباطات عملکردی مابین ژن‌ها، miRNAها، مکانیسم‌های سلولی و تنش‌ها را مشاهده کرد (Nikitin *et al.*, 2003; Hosseinpour *et al.*, 2012).

### آنالیز آزمایشگاهی

### کشت گیاهان و اعمال تیمار حرارتی

جوانه‌زنی بذور هیبرید رقم سیرنا آفتابگردان، ضدعفونی شده با قارچ‌کش، در شرایط آزمایشگاه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. گیاهچه‌های یک هفته‌ای دارای ریشه‌چه و برگ‌های کوتیلدونی به ظروف پلاستیکی ۱/۵ لیتری حاوی محلول غذایی ¼ غلظت هوگلند با pH برابر ۵/۸ (Hoagland and Arnon, 1950) انتقال یافتند و یک هفته پس از استقرار گیاهچه‌ها غلظت محیط کشت از ¼ به ½ قدرت تغییر یافت. به‌منظور جلوگیری از خفگی ریشه‌ها، هوادهی با پمپ هوا، روزانه به‌مدت ۸ ساعت انجام گردید. گیاهچه‌ها تا مرحله ۶ برگی در این محلول غذایی نگهداری شدند. به‌منظور جلوگیری از تنش نوری نمونه‌برداری در شب انجام شد. گیاهچه‌های ۶ برگی به اتاقک رشد مرطوب ساخت شرکت ممرت آلمان (Memmert)، با دمای ۴۲±۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰٪، (Senthil-Kumar *et al.*, 2003; Mashkina *et al.*, 2010; Mangelsen *et al.*, 2011; Ceylan *et al.*, 2013) جهت اعمال تیمار حرارتی کل گیاه منتقل شدند. شایان ذکر است استفاده از رطوبت برای جلوگیری از بروز تنش خشکی

1. Stem loop
2. Mismatch
3. Expressed Sequence Tags
4. Motif
5. Prosite
6. Database

حین اعمال تنش صورت گرفت (Hewezi *et al.*, 2008). نمونه‌گیری ۱/۵، ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تنش (Mangelsen *et al.*, 2011) از دو بافت برگ و ریشه در شرایط کنترل و تنش با در نظر گرفتن ۲ تکرار بیولوژیک انجام شد. بافت‌ها پس از نمونه‌گیری سریعاً در ازت مایع منجمد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. برای اطمینان از ایجاد تنش به گیاهان، میزان پرولین در بافت برگ و ریشه با استفاده از روش Bates *et al.* (1973) اندازه‌گیری شد.

**استخراج RNA و آنالیز Real-Time PCR**

استخراج RNA کل با استفاده از محلول تریزول[1] شرکت Invitrogen بر اساس دستورالعمل شرکت صورت گرفت. استخراج RNA برای نمونه‌های هر تکرار بیولوژیکی به‌صورت جدا انجام گردید. کیفیت و کمیت نمونه‌هایRNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد. پیش از سنتز cDNA، RNAهای هر تکرار بیولوژیکی براساس غلظت با یکدیگر مخلوط شدند. سنتز cDNA مولکول‌های miRNA با استفاده از کیت primescript RT reagent محصول شرکت Takaraصورت گرفت. سنتز cDNA برای ژن هدف به روش معمول و با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای dT[2] صورت گرفت. به‌منظور بررسی میزان تغییرات بیان microRNA و ژن هدف در سطوح مختلف تنش از واکنش PCR در زمان واقعی[3] با استفاده از دستگاه Rotor gene-Q از شرکت Qiagene استفاده گردید. واکنش PCR با حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر انجام شد. برنامه واکنش شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ثانیه و سپس طی ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه برای ۵ ثانیه، ۶۰ درجه برای ۳۰ ثانیه بود. ژن 18SrRNAبه‌عنوان کنترل داخلی در نرمال‌سازی نتایج استفاده شد. آنالیز نتایج حاصل از PCR در زمان واقعی با استفاده از روش مقایسه‌ای $C_T$ انجام شد (Schmittgen and Livak, 2008). آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

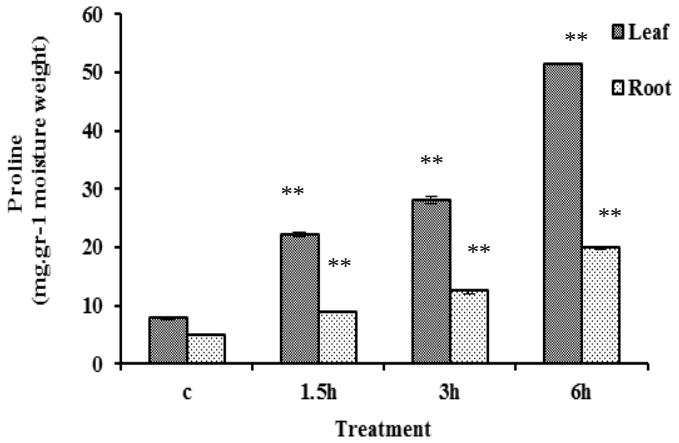
## نتایج و بحث

به منظور حصول اطمینان از تنش وارده به گیاهان میزان پرولین در دو بافت ریشه و برگ مورد بررسی قرار گرفت. پرولین یکی از مواد دخیل در مکانیسم‌های مقاومتی فیزیولوژیکی گیاهی در مواجه با تنش‌ها می‌باشد (Dobra *et al.*, 2010). میزان پرولین در بافت برگ و ریشه و درسطوح مختلف تنش از نظر آنالیزهای آماری ($p<۰/۰۰۱$) معنی‌دار بود. همان‌طور که دیده می‌شود با افزایش شدت تنش میزان پرولین نیز در دو بافت سیر صعودی داشته و بالاترین میزان پرولین در تنش ۶ ساعت دیده شد. این نتایج بیانگر تلاش گیاه برای مقابله با تنش گرما است و تنش وارد شده به گیاهان را تائید کرد (شکل ۱).

ژن‌های هدف miR398 که تاکنون گزارش شده‌اند در مناطقی از سلول قرار دارند که فتوسنتز و تنفس گیاهی را کنترل می‌کنند و از بخش‌های حیاتی و مهم گیاه محسوب می‌شوند؛ بنابراین می‌توان اظهار داشت، این miRNA یکی از تنظیم‌کنندگان مهم چرخه‌های فتوسنتز و تنفس محسوب شود. در این پژوهش برای اولین بار همولوگ ژن NtGT5b به‌عنوان ژن هدف miR398 مورد بررسی قرار گرفت. تا کنون گزارشی مبنی بر نقش فیزیولوژیکی این ژن گزارش نشده است. NtGT5b یک نوع گلیکوترانسفراز است. محرک‌های محیطی تنش‌زا تغییر مسیر متابولیسمی را به گیاهان تحمیل می‌کنند؛ این امر تولید ترکیبات اسمولیتی مؤثر در سازگاری گیاهان از جمله ساکارز را در پی دارد (Allakhverdiev *et al.*, 2008). گلیکوترانسفرازها آنزیم‌هایی هستند که در ساخت الیگوساکاریدها، پلی‌ساکاریدها و قندهای اتصالی دخیل هستند. این مولکول‌ها تنوع زیادی داشته و دارای عملکردهای مختلفی نظیر ساختار و علامت‌های ذخیره مواد می‌باشد. بیشتر واکنش‌های گلیکولیزشدن[4] که ساختارهای الیگوساکاریدی متنوع در سلول‌های یوکاریوتی را ایجاد می‌کند در دستگاه گلژی اتفاق می‌افتد (Breton *et al.*, 2006). miR398 به عنوان یک تنظیم‌کننده مهم در تنش‌های مختلف مطرح است. آنالیز داده‌ها، بیان متغیر miR398 و ژن هدف آن را در سطوح مختلف تنش و بافت‌های برگ و ریشه نشان داد که مبین مؤثر بودن این miRNA در پاسخ به تنش گرما در آفتابگردان است (جدول۲).

افزایش معنی‌دار miR398 در سطوح تنش ملایم، متوسط و شدید و کاهش میزان رونوشت ژن هدف NtGT5b بافت برگ نسبت به حالت کنترل در زمان‌های ابتدایی تنش گرما، نشان‌دهنده ایجاد مقاومت این بافت در مواجهه با تنش است که منجر به بسته‌شدن روزنه، کاهش فتوسنتز و در نتیجه کاهش سنتز قند می‌شود (شکل ۲).

1. Trizol
2. OligodT
3. Real-Time PCR
4. Glycosylation




شکل ۱- میزان پرولین بافت برگ و ریشه گیاه آفتابگردان تحت تنش گرمایی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های صفر (کنترل)، ۱/۵، ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تنش

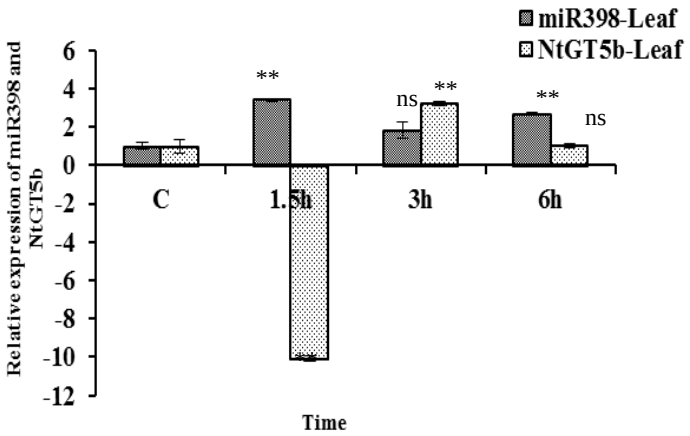
جدول ۱- آغازگرهای طراحی‌شده برای بررسی بیان miR398، ژن مشابه NtGT5b و 18SrRNA در آفتابگردان

| آغازگر | توالی |
|---|---|
| miR398-RT | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGGGCG-3' |
| miR398-F | 5'-GCCGCCGTGTTCTCAGGT-3' |
| Universal | 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' |
| NtGT5b-F | 5'-GCCCTCAACAGCGTCTCTAC-3' |
| NtGT5b-R | 5'-AAGGGCTGCAAACAATTCTC-3' |
| 18SrRNA-F | 5'-TTCAGACTGTGAAACTGCGAATGG-3' |
| 18SrRNA-R | 5'-TCATCGCAGCAACGGGCAAA-3' |

جدول ۲- تغییرات بیان miR398 و ژن هدف مشابه NtGT5b تحت شرایط کنترل و تنش گرما در گیاه آفتابگردان

| نام نمونه | میزان تغییر بیان miR398 نسبت به سطح کنترل | میزان تغییر بیان NtGT5b نسبت به سطح کنترل |
|---|---|---|
| تنش ۱/۵ ساعت برگ | $\uparrow 3/42^{**}$ | $\downarrow 10/07^{**}$ |
| تنش ۳ ساعت برگ | $\uparrow 1/82^{ns}$ | $\uparrow 3/23^{**}$ |
| تنش ۶ ساعت برگ | $\uparrow 2/68^{**}$ | $\uparrow 1/01^{ns}$ |
| تنش ۱/۵ ساعت ریشه | $\uparrow 1/65^{*}$ | $\downarrow 2/28^{**}$ |
| تنش ۳ ساعت ریشه | $\downarrow 8^{**}$ | $\uparrow 3/17^{**}$ |
| تنش ۶ ساعت ریشه | $\downarrow 2/92^{**}$ | $\uparrow 1/28^{ns}$ |

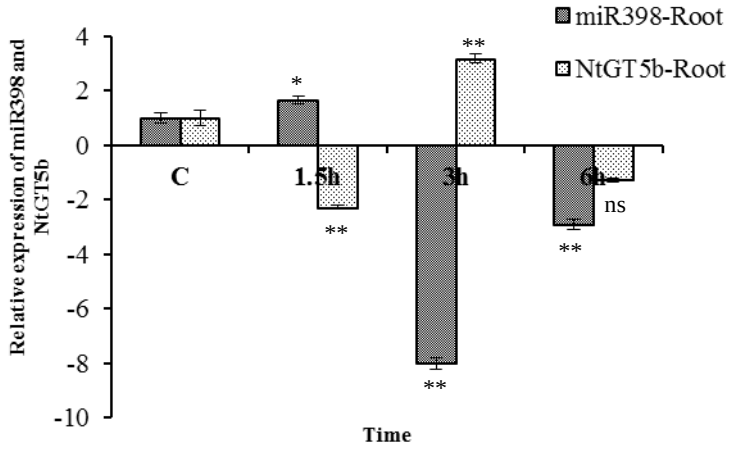
علامت ↓ و ↑ به‌ترتیب نشان‌دهنده کاهش و افزایش بیان، علامت * و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داربودن در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و علامت ns نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار بودن تحت آزمون t-test می باشد.




شکل ۲- الگوی بیان miR398 و ژن هدف مشابه NtGT5b در بافت برگ تحت تنش گرمایی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های صفر (کنترل)، ۱/۵، ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تنش

بیان miR398 در آرابیدوپسیس و گیاهچه‌های ۱۵ روزه ذرت کشت‌شده در خاک، تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت افزایش نشان داد (Guan *et al.*, 2013). با افزایش مدت زمان تنش و نیاز به سازگارشدن گیاه جهت مقابله با تنش میزان رونوشت ژن هدف افزایش یافته است که در راستای افزایش بیان miR398 بوده است. با توجه به این موضوع که سه نوع نحوه تنظیم بیان ژن هدف توسط miRNAها وجود دارد. بیان مشابه بین ژن هدف و miRNAها می‌تواند بیانگر تنظیم نامنسجم miRNA باشد که در این نوع تنظیم miRNA در یک سلول و در همان زمان، ژن هدف آن در سلول مجاور بیان می‌شود و به احتمال زیاد این موضوع به‌دلیل بیان سایر ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی ناشناخته کنترل‌کننده این ژن و فعال‌شدن سایر شبکه‌های متابولیسمی موجود در شبکه مقاومت به تنش گرما است. افزایش سنتز آنزیم گلیکوترانسفراز سبب کاتالیز انتقال قندها جهت تولید ATP در مواجهه با تنش شدید شده که از تجزیه پروتئین‌ها به‌منظور تولید ATP جلوگیری کند و گیاه با کاهش میزان پروتئین روبرو نشود که یکی از مکانیسم‌های مقاومت به گرما محسوب می‌شود و تائیدی بر مقاوم بودن گیاه آفتابگردان در برابر گرما است.

روند تغییرات بیان miR398 و رونوشت هدف آن در بافت ریشه، ابتدا افزایش و سپس کاهش نشان داد (شکل ۳). بافت ریشه نقش مهمی را در رشد و نمو گیاه دارد، به شرایط تنش بسیار حساس بوده و با افزایش دما تنفس ریشه کاهش می‌یابد (Ahuja, 2008). در تنش ملایم افزایش سریع miR398 منجر به کاهش بیان‌ژن هدف شده است اما با شدت‌یافتن تنش، گیاه به مقابله با تنش برآمده و میزان رونوشت ژن هدف بدلیل تأمین انرژی موردنیاز افزایش یافته است. این تغییرات بیان miR398 مسلماً به دلیل فعال‌شدن و بیان ژن‌های دیگر است اما با توجه به دانش کم در رابطه با نقش دقیق این miRNA در نمو ریشه و علامت‌های انتقالی مابین ساقه- ریشه در شرایط معمول و تنش؛ نیاز به مطالعه بیشتر این miRNA در بافت ریشه احساس می‌شود.




شکل ۳- الگوی بیان miR398 و NtGT5b در بافت ریشه تحت تنش گرمایی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های صفر (کنترل)، ۱/۵، ۳ و ۶ ساعت پس از اعمال تنش

مطالعات پیشین کاهش بیان miR398 و افزایش بیان ژن‌های هدف CSD1، CSD2 و CCS به جهت از بین‌بردن گونه‌های اکسیژن فعال، تحریک سنتز و افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی را نشان می‌دهد (Zhu *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). افزایش بیان miR398 در گیاهان یونجه تحت تنش خشکی در بافت برگ نسبت به بافت ریشه شدیدتر بود (Trindade *et al.*, 2010). Yu *et al.* (2012) پنج خانواده miRNA حفاظت‌شده و ۴ خانواده جدید در گیاه *Brassica rapa* که در پاسخ به تنش گرما نقش داشتند را شناسایی کردند. ازجمله miRNAهای حفاظت‌شده miR398a وmiR398b بودند که با کاهش میزان این دو miRNA به منظور جلوگیری از تأثیرحرارت برگیاه، ژن‌هدف CSD1 افزایش بیان نشان داد. Jia *et al.* (2009) گزارش کردند بیان miR398 در پاسخ به تنش شوری در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تحت تیمار NaCl کاهش و میزان رونوشت ژن‌های هدف آن، CSD1 و CSD2 به مرور زمان افزایش می‌یابد که این به دلیل از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن است.

ژن NtGT5b ممکن است در پاسخ به تنش‌های زیستی همچون قارچ‌ها نقش داشته باشد، این نتیجه‌گیری از بررسی پروسایت‌های توالی پروتئین این ژن به‌دست آمد. همان‌طور که در جدول ۳ دیده می‌شود، ژن NtGT5b دارای پروسایت‌های UDPGT، AHSA1 و Cerato-platanin می‌باشد. خانواده پروسایت UDPGT در پاسخ‌های دفاعی گیاهی نقش داشته و با تحریک سالیسیلیک‌اسید و پاتوژن به‌عنوان مولکول علامت‌دهی عمل می‌کند و سبب فعال‌شدن بسیاری از متابولیت‌های ثانویه درگیر در شبکه‌های دفاعی همچون فلاونوئید می‌شود (Yonekura-Sakakibara*et al.*, 2007; Lillo *et al.*, 2008). پروسایت AHSA1 با دومین میانی HSP90 واکنش می‌دهد و فعالیت ATPase را تحریک می‌کند (Lotz *et al.*, 2003). احتمالاً به‌عنوان فعال‌کننده HSP90 عمل کرده و در همکاری با HSP90 سبب افزایش مقاومت به شرایط تنش می‌شود (Panaretou *et al.*, 2002). پروسایت خانواده Cerato-platanin در واکنش‌های نکروزه‌شدن و سنتز فیتوآلکسین[1] که به‌عنوان یکی از رخدادهای مرتبط با پاسخ‌های دفاعی گیاه به‌دلیل تقابل میزبان و پاتوژن محسوب می‌شوند، نقش دارد (Sbrana *et al.*, 2007).

به هنگام رسم شبکه مابین miR398 و ژن NtGT5b ارتباطی مابین آن‌ها در شبکه پیدا نشد. این ژن تا به امروز به عنوان ژن هدف miR398 گزارش نشده و می‌تواند انتخاب مناسبی برای مطالعات آینده ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش، در گیاه آفتابگردان محسوب شود. شبکه‌ژنی برای miR398 و ژن NtGT5b رسم گردید (شکل ۴). حضور ژن‌های درگیر در شبکه‌ژنی این miRNA نظیر سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، AFO و INO (تنظیم آوندهای آبکش در انتقال مواد را انجام می‌دهد) بیانگر اهمیت بسیار بالای این miRNA در پاسخ به تنش‌ها است. تنظیم غیرمستقیم miR398 توسط miR156، miR157 و miR159 از طریق فاکتور رونویسی SPL بسیار قابل توجه است. این چنین به‌نظر می‌رسد miR156 به‌عنوان یک تنظیم‌کننده

1. Phytoalexin

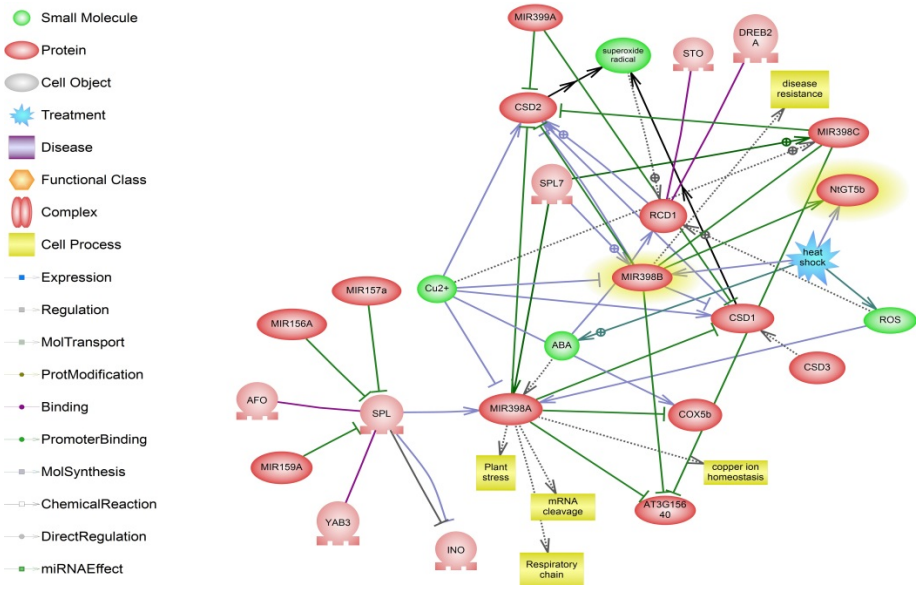
اصلی[1] شبکه‌های miRNA است. تا به امروز بررسی پاسخ miR399 در تنش کمبود فسفات صورت گرفته است اما با توجه به این موضوع که CSD1 و CSD2 جزء ژن‌های هدف آن محسوب می‌شوند (Bartel, 2004)؛ تقابل این دو miRNA در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌تواند نتایج بسیار جالبی ارائه نماید. تنش گرما به‌سرعت میزان بیان miR398 و رونوشت ژن‌های هدف CSD1، CSD2، CCS (AT3G15640) و Cox5b را کاهش می‌دهد. این ژن‌ها تنظیم‌کننده‌های منفی ژن‌های پاسخ به تنش گرما بوده و سبب ایجاد مقاومت به گرما در گیاه می‌شوند (Guan *et al.*, 2013).

تغییر متناوب بیان miRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها در هر سطح تنش حاکی از بیان کوتاه‌مدت اما تأثیرگذار miRNAها جهت مقابله گیاه با تنش می‌باشد. این کاهش و افزایش بیان به‌طور قطع شبکه‌های ژنی و متابولیسمی زیادی را در گیاه فعال کرده که تا به امروز ناشناخته هستند، با این وجود این تغییرات بیانی سبب مقاومت و تحمل گیاه آفتابگردان در برابر تنش مذکور شده است. این موضوع اهمیت توالی‌یابی ژنوم این گیاه را بیش از پیش آشکار می‌سازد؛ تا بتوان در آینده از ژن‌های مقاومت این گیاه در مطالعات ژنتیکی و مهندسی ژنتیک و تولید ارقام مقاوم به تنش استفاده کرد. miRNA مورد بررسی جزء miRNAهای حفاظت‌شده بوده و می‌توان اظهار داشت که ژن هدف مورد بررسی در گونه‌های مختلف گیاهی حضور داشته و دارای نقش‌های تنظیمی مشابهی در پاسخ به تنش‌ها می‌باشد. با این وجود بسته به نوع گیاه، شرایط رشد، نوع بافت و سلول روند بیان آن‌ها متفاوت خواهد بود. در هر سطح تنش میزان تغییر miRNA و ژن هدف متفاوت بود که این موضوع می‌تواند ناشی از فعال‌شدن شبکه‌های مختلف علامت‌دهی در هر سطح تنش به جهت رهایی، مقابله و یا سازگاری به تنش رخ داده باشد. خاطر نشان می‌گردد تفاوت الگوی بیانی دیده شده در تنش مذکور با تحقیقات پیشین می‌تواند به‌دلیل دور بودن شاخه فیلوژنتیکی گیاه آفتابگردان از سایر گونه‌های مورد بررسی باشد. همچنین شرایط متفاوت آزمایشی و روش اعمال تنش را نمی‌توان نادیده گرفت. با این وجود در مورد رشد و نمو گیاهان در طول تنش و تغییرات مولکولی رخ داده در حین تنش نسبت به تغییرات فیزیولوژیکی، دانش اندکی وجود دارد و این بررسی می‌تواند در پیشبرد دانش بشری در رابطه با بیان تأثیرگذار این مولکول‌های کوچک بر رفتار گیاهان در برابر تنش گرما، به عنوان یکی از تنش‌های مهم پیش‌روی بشر در سال‌های آتی نقشی کوچک ایفا نماید.

1. Master regulator

جدول ۳- بررسی پروسایت‌های ژن NtGT5b

| Family | Description | Entry type | Envelope Start | Envelope End | E-value |
|---|---|---|---|---|---|
| UDPGT | Uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) | Family | 22 | 459 | 3.50E-31 |
| AHSA1 | Activator of Hsp90 ATPase homolog 1-like protein Provide feedback | Family | 285 | 393 | 0.041 |
| Cerato-platanin | Cerato-platanin | Family | 350 | 436 | 0.18 |




شکل ۴- شبکه miR398 و ژن هدف آن در تنش گرما در گیاه آفتابگردان

## REFERENCES


Ahuja LR (2008) Response of crops to limited water: Understanding and modeling water stress effects on plant growth processes. ASA-CSSA-SSSA.

Allakhverdiev S, Kreslavski V, Klimov V, Los D, Carpentier R, Mohanty P (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. Photosynth. Res. 98: 541-550.

Bartel DP (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell. 116: 281-297.

Bates L, Waldren R, Teare I (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39: 205-207.

Breton C, Šnajdrová L, Jeanneau C, Koča J, Imberty A (2006) Structures and mechanisms of glycosyltransferases. Glycobiology. 16: 29R-37R.

Ceylan H, Türkan I, Sekmen A (2013) Effect of Coronatine on Antioxidant Enzyme Response of Chickpea Roots to Combination of PEG-Induced Osmotic Stress and Heat Stress. J. Plant Growth Regul. 32: 72-82.

Chauhan H, Khurana N, Tyagi A, Khurana J, Khurana P (2011) Identification and characterization of high temperature stress responsive genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and their regulation at various stages of development. Plant Mol. Biol. 75: 35-51.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. Nucleic Acids Research, 33:e179

Chen L, Ren Y, Zhang Y, Xu J, Sun F, Zhang Z, Wang Y (2012) Genome-wide identification and expression analysis of heat-responsive and novel microRNAs in *Populus tomentosa*. Gene. 504: 160-165.

Devasirvatham V, Tan DKY, Gaur PM, Raju TN, Trethowan RM (2012) High temperature tolerance in chickpea and its implications for plant improvement. Crop

and Pasture Science. 63: 419-428.

Dobra J, Motyka V, Dobrev P, Malbeck J, Prasil IT, Haisel D, Gaudinova A, Havlova M, Gubis J, Vankova R (2010) Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. J.Plant Physiol. 167: 1360-1370.

Giacomelli JI, Weigel D, Chan RL, Manavella PA (2012) Role of recently evolved miRNA regulation of sunflower HaWRKY6 in response to temperature damage. New Phytol. 195: 766-773.

Guan Q, Lu X, Zeng H, Zhang Y, Zhu J (2013) Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermo tolerance in Arabidopsis. Plant J. 74: 840-851.

Hewezi T, LégerM, Gentzbittel L (2008) A Comprehensive Analysis of the Combined Effects of High Light and High Temperature Stresses on Gene Expression in Sunflower. Ann. Bot. 102: 127-140.

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Circular. 347:32.

Hosseinpour B, Hajihoseini V, Kashfi R, Ebrahimi E, Hemmatzadeh F (2012) Protein interaction network of *Arabidopsis thaliana* female gametophyte development identifies novel proteins and relations. PLOS ONE. 7:e49931.

Jia X, Wang WX, Ren L, Chen QJ, Mendu V, Willcut, B, Dinkins R, Tang X, Tang G (2009) Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populustremula* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 71: 51-59.

Jin D, Wang Y, Zhao Y, Chen M (2013) MicroRNAs and their cross-talks in plant development. J. Genet. Genomics. 40: 161-170.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Mol. Cell. 14: 787-799.

Khajeh-pour M (2004) Industrial crops. University Jihad publications of Isfahan branch.

Lillo C, Lea US, Ruoff P (2008) Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. Plant Cell Environ. 31: 587-601.

Lotz GP, Lin H, Harst A, Obermann WM (2003) Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. J. Biol. Chem. 278: 17228-17235.

Mangelsen E, Kilian J, Harter K, Jansson C, Wanke D, Sundberg E (2011) Transcriptome Analysis of High-Temperature Stress in Developing Barley Caryopses: Early Stress Responses and Effects on Storage Compound Biosynthesis. Mol. Plant. 4: 97-115.

Mashkina EV, Usatov AV, Skorina MV (2010) Comparative analysis of thermotolerance of sunflower chlorophyll mutants. Genetika. 46: 178-184.

Nikitin A, Egorov S, Daraselia N, Mazo I (2003) Pathway studio the analysis and navigation of molecular networks. Bioinformatics. 19: 2155-2157.

Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R (2002) Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha. Mol. Cell. 10: 1307-1318.

Sbrana F, Bongini L, Cappugi G, Fanelli D, Guarino A, Pazzagli L, Scala A, Vassalli M, Zoppi C, Tiribilli B (2007) Atomic force microscopy images suggest aggregation mechanism in cerato-platanin. Eur. Biophys. J. 36: 727-732.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat. Protoc. 3:1101-1108.

Senthil-Kumar M, Srikanthbabu V, Mohan Raju B, Shivaprakash N, Udayakumar M (2003) Screening of inbred lines to develop a thermo tolerant sunflower hybrid using the temperature induction response (TIR) technique: a novel approach by exploiting residual variability. J. Exp. Bot. 54: 2569-2578.

Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. Plant Cell. 16: 2001-2019.

Sunkar R (2012) MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses. Verlag Berlin Heidelberg, Springer.

Trindade I, Capitão C, Dalmay T, Fevereiro MP, Dos Santos DM (2010) miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. Planta 231: 705-716.

Vollmann J, Rajcan I (2010) Oil Crop Breeding and Genetics. In: Vollmann J, Rajcan I (ed) Oil Crops, Springer, New York, pp 1-30.

Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007) Heat tolerance in plants: An overview. Environmental and Experimental Botany. 61:1 99-223.

Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Niida R, Saito K (2007) Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in Arabidopsis by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics. J. Biol. Chem. 282: 14932-14941.

Yu X, Wang H, Lu Y, Ruiter M, Cariaso M, Prins M, Tunen A, He Y (2012) Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in *Brassica rapa*. J. Expe. Bot. 63: 1025-1038.

Zhu C, DingY, Liu H (2011) MiR398 and plant stress responses. Physiol. Plant. 143: 1-9.