Crop Biotech.
Autumn and Winter (2013) 5: 93-102

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۱۰۲- ۹۳)

شناسایی microRNAهای مرتبط با تنش خشکی در ریشه برنج در مرحله ابتدایی رشد

بهنام بخشی[۱]*، محمدرضا بی‌همتا[۲]، سیدقاسم حسینی‌سالکده[۳] و مسعود توحیدفر[۴]

۱، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه اصلاح نباتات، تهران، ۲، استاد گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ۳، دانشیار بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ۴، دانشیار بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال‌ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج.

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۹- تاریخ تصویب:۹۲/۱۲/۲۶)

Identification of Drought Related MicroRNAs in Rice Root at Early Stage

B. BAKHSHI[1*], M. R. BIHAMTA[2], GH. HOSSEINI SALEKDEH [3] AND M. TOHIDFAR[4]

1, Department of Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, 2, Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, 3, Associate Professor, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute (ABRII), Karaj, Iran, 4, Associate Professor, Department of Tissue Culture and Genetic Engineering, Agricultural Biotechnology Research Institute (ABRII), Karaj, Iran.

(Received: Dec. 19, 2013 - Accepted: Mar. 17, 2014)

Abstract

Drought stress is one of the most important abiotic stresses that deteriorates rice agriculture of Iran. One of the best ways to establish drought stress tolerance in plants is miRNA mediated post transcriptional gene regulation. MiRNAs are small 19-24 nt regulatory RNAs and play important role in regulating plant gene expression in biotic and abiotic stress. In this study, we selected five miRNAs for promoter analysis and evaluation of differential expression of them under drought stress in roots. Three of them including miR162, miR169 and miR172 are conserved in many plants and the others including miR1425 and miR1880 are rice specific miRNAs. In addition, upstream screening of MIRNA genes showed that upstream region of some MIRNA genes like MIR172 are enriched with important regulatory elements like DRE and ABRE. Quantitative Realtime-PCR was used in this study for analyzing differential expression of evaluated miRNAs. Studying the differential expression of miRNAs in roots under drought condition showed that miR169 was up-regulated but conversely, miR172 was down-regulated. The rest of miRNAs in our study did not show significant differential expression under drought stress. It can be concluded that NF-YA and AP2 as the most important target genes for miR169 and miR172 respectively can play critical roles in response to drought stress.

Keywords: microRNA, *Oryza sativa*, Gene expression, Quantitative Realtime-PCR, Regulatory elements

چکیده

تنش خشکی یکی از مهمترین تنش‌های غیرزنده است که کشاورزی برنج در ایران را تهدید می‌کند. یکی از روش‌های مفید برای ایجاد تحمل به تنش خشکی در گیاهان، تنظیم بیان‌ژن پس از نسخه‌برداری توسط miRNAها است. miRNAها، RNAهای تنظیم‌کننده کوچک ۲۴-۱۹ نوکلئوتیدی هستند که در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده نقش دارند. در این تحقیق، پنج miRNA برای بررسی ناحیه بالادست آن‌ها و ارزیابی تغییر بیان در شرایط تنش خشکی در ریشه برنج انتخاب شدند. از این پنج miRNA، miR1425 و miR1880 اختصاصی برنج و miR162، miR169 و miR172 در بسیاری از گیاهان، حفاظت شده هستند. همچنین، ارزیابی ژن‌های miRNA مورد بررسی نشان داد که بعضی از آن‌ها مثل miR172، دارای عناصر تنظیم‌کننده مهمی مثل DRE و ABRE در بالادست خود هستند. بررسی تغییر بیان miRNAهای مورد ارزیابی در این تحقیق با استفاده از Realtime-PCR کمی انجام شد. نتایج بررسی تغییر بیان نشان داد که در شرایط تنش خشکی در ریشه miR169 افزایش بیان و miR172 کاهش بیان داشته است؛ اما سایر miRNAهای مورد ارزیابی تغییر معنی‌داری نداشته‌اند. NF-YA و AP2 به‌عنوان مهمترین ژن‌های هدف miR169 و miR172 می‌توانند نقش مهمی را در پاسخ به تنش خشکی ایفا کنند.

واژه‌های کلیدی: microRNA، *Oryza sativa*، بیان ژن، Realtime-PCR کمی، عناصر تنظیم‌کننده

* نویسنده مسئول: بهنام بخشی
E-mail: behnam.bakhshi@gmail.com

مقدمه

تنش خشکی از تنش‌های محیطی است که گیاهان معمولاً با آن مواجه هستند. تنش خشکی اثرات مضری را روی فرآیندهای متابولیکی شامل تنظیم بسته‌شدن روزنه‌ها، جذب مواد مغذی و تولید اسمیلات‌های فتوسنتزی[1] دارد که در نهایت می‌تواند منجر به کاهش عملکرد شود (Khraiwesh *et al*., 2012; Sunkar, 2010). گیاهان وقتی با شرایط تنش مواجه می‌شوند، مکانیزم‌های مختلف را در سطوح مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی به‌کار می‌گیرند (Covarrubias and Reyes, 2010) و موجبات اجتناب و تحمل را نسبت به تنش خشکی فراهم می‌کنند. اجتناب از خشکی معمولاً از طریق تغییرات مورفولوژیکی در گیاه مثل کاهش در هدایت روزنه‌ای، کاهش سطح برگ و توسعه سیستم ریشه‌ای حاصل می‌شود. اما از طرف دیگر تحمل به خشکی از طریق مکانیزم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی شامل تنظیم اسمزی و تولید آنتی اکسیدانت‌ها ایجاد می‌شود (Bartels and Sunkar, 2005). هر دوی این استراتژی‌ها تعداد زیادی از ژن‌ها و تجمع پروتئین‌هایی مثل دهیدرین‌ها (پروتئین‌های القاءشده در اثر کم‌آبی)، آنزیم‌های کلیدی برای بیوسنتز اسملیت‌ها و آنزیم‌های سم‌زدا را القاء می‌کنند (Shinozaki and Reddy *et al*., 2004; Yamaguchi-Shinozaki, 2007). مکانیزم‌های تنظیم کننده نسخه‌برداری که بیان ژن‌های القا شونده در خشکی را کنترل می‌کنند، قبلاً بررسی شده است (Golldack *et al*., 2011; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). با شناسایی RNAهای کوچک[2]، توجه‌ها معطوف به تنظیم بیان‌ژن پس از نسخه‌برداری با استفاده از microRNAها (miRNAها) در پاسخ به تنش خشکی شده‌است (Sunkar, 2010). miRNAها، RNAهای تنظیم‌کننده کوچک ۲۴-۱۹ نوکلئوتیدی هستند که به‌وسیله ژن‌های miRNA کد می‌شوند. در مسیر بیوسنتز miRNA، miRNA اولیه[3] به‌وسیله RNA پلی‌مراز II از ژن‌های miRNA نسخه‌برداری می‌شود. در گیاهان، فرآوری miRNA اولیه به miRNA پیش‌ساز[4] به‌وسیله DCL1[5] و با کمک پروتئین‌های HYL1[6] و SE[7] انجام می‌شود.

1. Photosynthetic assimilates
2. Small RNAs
3. Pri-miRNA (Primary miRNA)
4. Pre-miRNA (Precursor miRNA)
5. Dicer-Like 1
6. Hyponastic Leaves1
7. Serrate

miRNAهای پیش‌ساز به‌صورت دورشته‌ای و با ساختار ساقه-حلقه‌ای هستند که پس از فرآوری با پروتئین DCL1، تولید miRNA بالغ[8] می‌کنند (Voinnet, 2009). miRNAها در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی و متابولیکی شامل پیام‌رسانی[9] اکسین، نمو برگ، تشکیل ریشه‌های جانبی، انتقال از مرحله رشد گیاهچه‌ای به رویشی و از رویشی به زایشی و همچنین در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده نقش دارند (Khraiwesh *et al*., 2012). تنظیم بیان ژن توسط miRNAها به دو شکل منفی و مثبت انجام می‌شود. miRNAهایی که در اثر تنش خشکی القاء و بیان mRNAهای هدف را کاهش دهند، تنظیم‌کننده منفی بوده و miRNAهایی که بیان آن‌ها در تنش خشکی کاهش می‌یابد، از نوع تنظیم‌کننده مثبت هستند. بنابراین، miRNAها با نقش تنظیم‌کنندگی مثبت و منفی در شرایط تنش، گیاه را به تنش سازگار می‌کنند. اغلب miRNAها، ژن‌هایی را کنترل می‌کنند که فاکتورهای نسخه‌برداری را کد می‌کنند و این ویژگی، miRNAها را در مرکز شبکه‌های تنظیم بیان‌ژن قرار می‌دهد (Ding *et al*., 2013). برای بعضی از miRNAها مطالعات گسترده‌ای به‌منظور بررسی تغییر بیان آن‌ها در تنش‌های مختلف از جمله خشکی انجام شده است که از جمله آن‌ها می‌توان miR156، miR159، miR167، miR168، miR169، miR171، miR393، miR396 و miR397 را نام برد (Covarrubias and Reyes, 2010). بعضی از miRNAها از جمله miR169، تغییر بیان متفاوتی را در اثر تنش خشکی در گیاهان نشان داده‌اند؛ به‌طور مثال، Li و همکاران (۲۰۰۸) کاهش بیان miR169 را در *Arabidopsis thaliana* ولی Zhao و همکاران (۲۰۰۷) افزایش بیان miR169 را در *Oryza sativa* در تنش خشکی گزارش کرده‌اند. از آنجا که ریشه اولین قسمت گیاه است که تنش را دریافت و پیام آن را ارسال می‌کند، بنابراین مطالعه تغییر بیان miRNAها در ریشه از اهمیت خاصی برخوردار است. در این تحقیق، به‌منظور بررسی تاثیر تنش خشکی در تغییر بیان miRNAها، پنج miRNA از پایگاه اطلاعاتی میربیس[10] انتخاب شدند. سه عدد از آن‌ها در بسیاری از گیاهان، حفاظت شده و شامل miR162، miR169 و miR172 بودند و دو عدد دیگر اختصاصی برنج و شامل miR1425 و miR1880 بودند. تغییر بیان

8. Mature miRNA
9. Signaling
10. miRBase (http://mirbase.org)

miR162 در شرایط تنش خشکی برای *Populus euphratica* (Li *et al*., 2011a)، *Populus tomentosa* (Ren *et al*., 2012) و *Vigna unguiculata* (Barrera-Figueroa *et al*., 2011) قبلاً گزارش شده است. همچنین miR169 در گیاهان *Populus euphratica* (Li *et al*., 2011a)، *Oryza sativa* (Zhao *et al*., 2007; Zhou *et al*., 2010)، *Vigna unguiculata* (Barrera-Figueroa *et al*., 2011)، *Medicago truncatula* (Trindade *et al*., 2010)، *Glycine max* (Kulcheski *et al*., 2011; Li *et al*., 2011b) و *Populus tomentosa* (Ren *et al*., 2012) در شرایط تنش خشکی تغییر بیان نشان داده است. برای miR172 نیز تغییر بیان در گیاهان *Populus euphratica* (Li *et al*., 2011a)، *Populus tomentosa* (Ren *et al*., 2012)، *Oryza sativa* (Zhou *et al*., 2010) و *Solanum tuberosum* (Hwang *et al*., 2011)، در شرایط تنش خشکی مشاهده شده است. با وجود اهمیت مطالعه miRNA در ریشه، مطالعات کمی در این زمینه انجام شده است. تنها مطالعه صورت گرفته در ریشه گیاه برنج توسط Zhao و همکاران (۲۰۰۷) به‌منظور بررسی تغییر بیان miRNAهای miR169، miR393 و miR397 در تنش خشکی و با تیمار PEG انجام شده است (Zhao et al., 2007). بنابراین، با توجه به اهمیت شناسایی miRNAهای مرتبط با تنش خشکی در ریشه گیاه برنج، تحقیق حاضر در این زمینه انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شیوه اعمال تیمار

رقم مورد استفاده در این تحقیق ژنوتیپ IR64، تهیه شده از موسسهٔ بین‌المللی برنج[1] بود. بذور برنج پس از ضدعفونی سطحی در پتری جوانه‌دار شده و سپس به محیط کشت هیدروپونیک حاوی محلول یوشیدا منتقل شدند. پس از دو هفته گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی دو قسمت خاک رس و یک قسمت ماسه منتقل و به مدت دو هفته همه گلدان‌ها به صورت کامل آبیاری شدند. سپس در تیمار خشکی، آبیاری به مدت دو هفته متوقف شد و در این زمان در تیمار شاهد آبیاری به‌صورت عادی انجام گردید. بعد از گذشت دو هفته و مشاهده تفاوت ظاهری و مورفولوژیکی در گیاهان از جمله کاهش رشد، زردشدن و پیچش برگ‌ها در نمونه‌های تیمار خشکی، نمونه‌گیری از تیمار شاهد و خشکی انجام و RNA از بافت ریشه استخراج و در دمای ۸۰- نگهداری شد.

طراحی آغازگر برای miRNAهای مورد بررسی

miRNAهای انتخاب شده شامل miR162a,b (از خانواده miR162)، miR169f,g (از خانواده miR169)، miR172a,d (از خانواده miR172)، miR1425 (از خانواده miR1425) و miR1880 (از خانواده miR1880) بودند که از پایگاه اطلاعاتی میربیس انتخاب شدند. آغازگرهای طراحی شده برای miRNAها در جدول ۱ نمایش داده شده‌اند. همچنین از 18S rRNA به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد.

استخراج RNA، ساخت cDNA (Stem-loop RT PCR) و Real-time PCR کمی[2]

RNA کل از بافت ریشه نمونه‌های شاهد و تنش و با استفاده از واکنش‌گر ترایزول[3] تهیه شد. تیمار RNA کل با DNase I با استفاده از کیت اینویتروژن[4] انجام و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ بررسی شد. در ادامه، ساخت cDNA از RNA کل استخراج شده نیز با استفاده از کیت اینویتروژن انجام شد. در آزمایش‌های انتخاب رقت‌های سریالی[5] بهترین رقت بر اساس بالاترین کارایی[6] انتخاب شد. کارایی واکنش Realtime-PCR کمی در ژن رفرنس و ژن هدف در محدوده نزدیک به صد و حداکثر با اختلاف ۲ تا ۳ درصدی مشاهده شد. واکنش Realtime-PCR کمی در حجم ۲۵µl شامل ۱۲/۵ µl از SYBER، ۱µl آغازگر پیشرو و معکوس و ۳µl از cDNA انجام شد. تخمین فراوانی نسبی miRNA در نمونه‌های نرمال و تنش، مقدار تغییر بیان آن‌ها با استفاده از Ct و فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ به دست آمد (Schmittgen *et al*., 2008).

1. International Rice Research Institute (IRRI)

2. Quantitative Real-time PCR
3. Trizol reagent (Sigma Chemicals, USA)
4. Invitrogen
5. Serial dilution
6. Efficiency

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای miRNAهای مورد ارزیابی

miRNA	آغازگر معکوس[3]	آغازگر پیشرو[2]	آغازگر نسخه‌برداری معکوس ساقه حلقه[1]
18S rRNA	5'CTTGGATGTGG TAGCCGTTT3'	5'ATAACTCGACG GATCGCAAG3'	
miR162a,b	5'GTGCAGGGTCC GAGGT3'	5'CGGCGGTCGAT AAACCTCTGC3'	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACCTGGAT 3'
miR169f,g	5'GTGCAGGGTCC GAGGT3'	5'CGACTAGCCAA GGATGACT3'	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACTAGGCA 3'
miR172a,d	5'GTGCAGGGTCC GAGGT3'	5'GCGGCGGAGAA TCCTGATGA3'	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACATGCAGCA 3'
miR1425	5'GTGCAGGGTCC GAGGT3'	5'GCACCTACGATT CAATCCTTG3'	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACAGCAG 3'
miR1880	5'GTGCAGGGTCC GAGGT3'	5'GGTTCCAAGCG GGCCACT3'	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACAATGCTTA 3'

1. Stem-loop RT PCR primer 2. Forward primer 3. Reverses primer

بررسی منطقه بالادست ژن‌های miRNA مورد بررسی

در این تحقیق در ابتدا توالی بالادست ژن‌های miRNA با استفاده از پایگاه داده NCBI[1] دریافت شد. سپس، به‌منظور شناسایی منطقه شروع نسخه‌برداری[2] و پیشبر[3] ژن‌های miRNA برنج، حدود ۳ kb بالادست پیش‌ساز ساقه-حلقه با استفاده از برنامه آنلاین TSSP مورد جستجو قرار گرفت (Shahmuradov *et al.*, 2005). سپس، عناصر تنظیم‌کننده با استفاده از نرم‌افزار TfsiteScan شناسایی شدند (Ghosh, 2000).

شناسایی ژن‌های هدف و مناطق حفاظت شده[4]

مکان ژنی کدکننده همه miRNAها بر روی کروموزوم‌ها مشخص و به‌منظور شناسایی ژن‌های هدف بالقوه آن‌ها، از پایگاه آنلاین شناسایی ژن‌های هدف miRNAها (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget) استفاده شد. همچنین، به‌منظور شناسایی مناطق حفاظت شده، هم‌ردیفی چندگانه[5] برای پیش‌ساز ساقه-حلقه miRNAها با استفاده از روش Clustal_W در نرم‌افزار MEGA5 انجام شد. برای رسم ساختار miRNAها نیز از نرم افزار Mfold استفاده شد.

نتایج و بحث

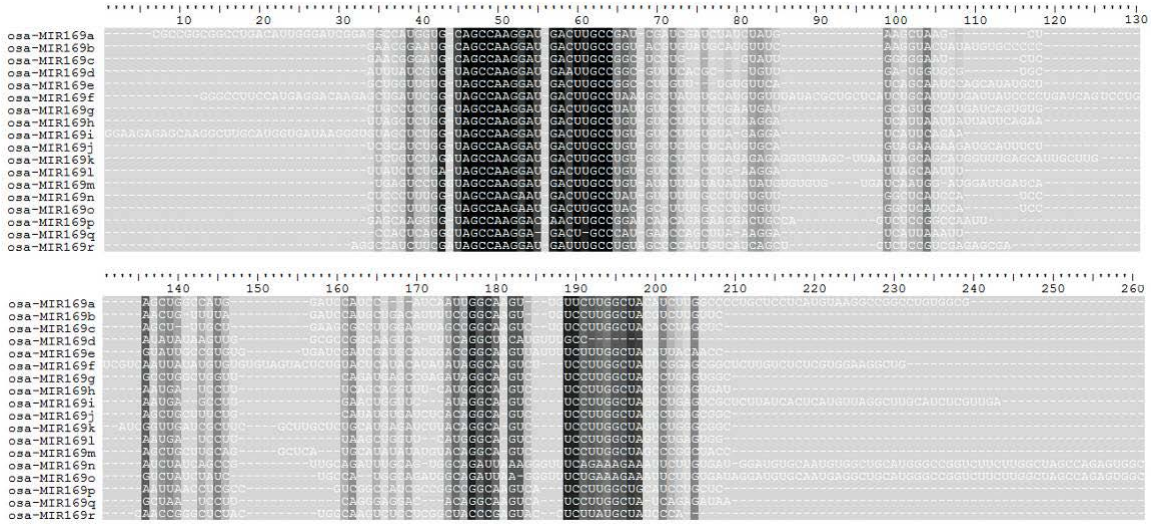
بررسی ساختار خانواده‌های مورد ارزیابی

در گیاهان، خانواده‌های miRNA اغلب تولید miRNAهای بالغ مشابه می‌کنند (Li and Mao, 2006)؛ به‌طوری‌که توالی‌های انتخاب شده از miRNAهای مورد ارزیابی در این تحقیق، هر کدام ممکن است منطبق با چندین عضو از خانواده‌هایشان باشند. توالی مورد بررسی از miR162 منطبق با دو عضو miR162a و miR162b، توالی مورد بررسی از miR172 منطبق با دو عضو miR172a و miR172d و همچنین توالی مورد بررسی miR169 منطبق با دو عضو miR169f، miR169g است و با اعضای miR169h، miR169i، miR169j، miR169k، miR169l و miR169m فقط در یک نوکلئوتید متفاوت است. به همین منظور در این تحقیق، مناطق مختلف توالی ساختار ساقه-حلقه اعضای هر خانواده از نظر میزان حفاظت ارزیابی شد. بررسی‌ها در این تحقیق نشان داد که در حالی‌که، منطقه تولیدکننده miRNAهای بالغ در بازوی 5p و3p برای خانواده‌های مورد ارزیابی، به‌شدت حفاظت شده می‌باشد؛ اما، سایر مناطق ساقه-حلقه کمتر حفاظت شده است. برای مثال، مناطق حفاظت‌شده خانواده miR169 در شکل ۱ و ساختارهای ساقه-حلقه برای miR169f,g و miR169h,I,j,k,l,m (با یک نوکلئوتید تغییر در منطقه 3p نسبت به miR169f,g) از خانواده miR169 در شکل ۲ ارائه شده است. ناحیه تولیدکننده miRNAهای بالغ در همه اعضای یک خانواده معمولاً حفاظت‌شده بوده و به همین دلیل این امکان وجود دارد که اعضای مختلف یک خانواده در کنترل ژن‌های هدف با هم همکاری داشته باشند.

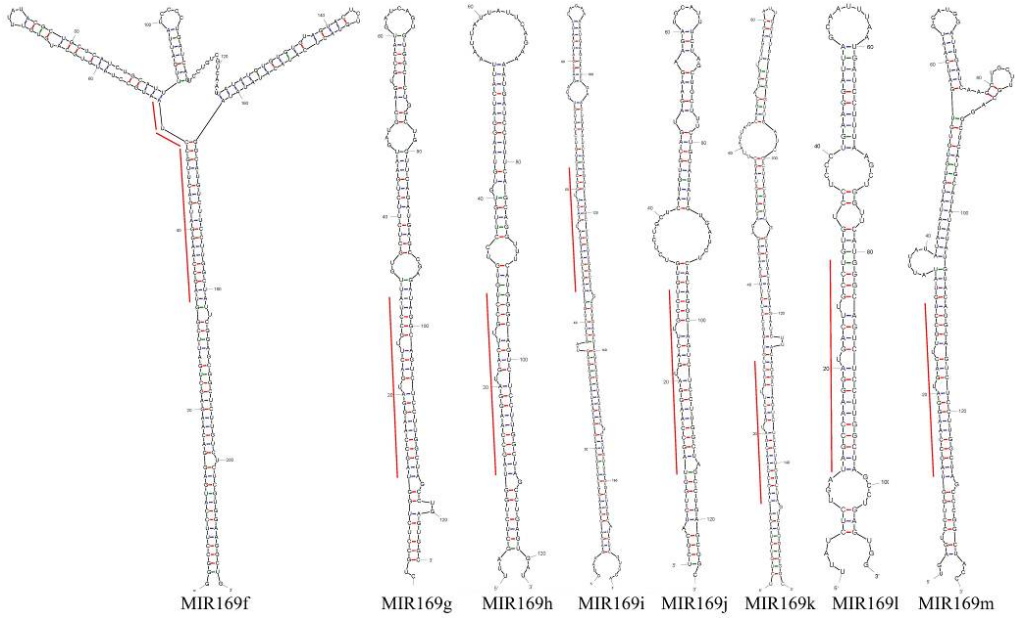
بررسی مناطق بالادست ژن‌های miRNA مورد بررسی

در این تحقیق، 3kb از منطقه بالادست ژن‌های miRNAهای مورد ارزیابی به‌منظور شناسایی عناصر تنظیم‌کننده مهم مورد بررسی قرار گرفتند. از عناصر

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov
2. Transcription start site position (TSSP)
3. Promoter
4. Conserved
5. Multiple alignments



شکل ۱- هم‌ردیفی اعضای خانواده miR169؛ مناطق حفاظت‌شده با رنگ تیره و مناطق کمتر حفاظت‌شده با رنگ روشن مشخص شده‌اند.



شکل ۲- ساختارهای ساقه-حلقه برای هشت عضو خانواده miR169؛ خطوط مشخص شده بر روی ساختار ساقه -حلقه، منطقه تولید miRNA بالغ است.

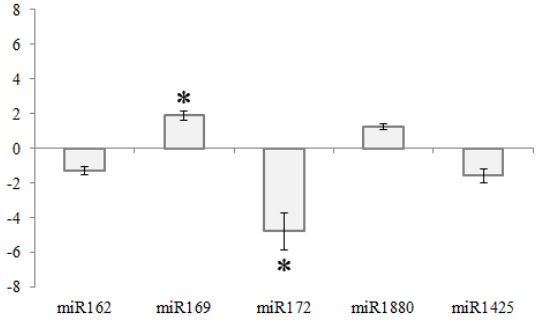
تنظیم‌کننده مهم شناسایی شده می‌توان DRE، ABRE، MYB، GAMyb، P-Box، TGA و ROS-responsive را نام برد. نتایج نشان داد که در بین miRNAهای مورد بررسی، ژن MIR172a، دارای بیشترین عناصر تنظیم‌کننده پاسخگو به تنش، شامل DRE، ABRE، TGA و MYB است. همچنین در بالادست هر کدام از miRNAهای MIR169g، MIR1425 و MIR1880 نیز عنصر تنظیم‌کننده DRE مشاهده شد. برای MIR169g، دو تکرار از عنصر تنظیم‌کننده DRE نزدیک به منطقه شروع نسخه‌برداری مشاهده شد. بررسی بالادست ژن‌های MIR162a و MIR162b نیز نشان داد که تنها یک عنصر تنظیم‌کننده DRE در بالادست MIR162b قرار دارد. همچنین، سایت‌های اتصال برای خانواده فاکتور رونویسی MYB در بالادست اکثر ژن‌های مورد بررسی

مشاهده شد و بعضی از آن‌ها مشابه سایت‌های اتصال شناسایی‌شده برای فاکتور رونویسی MYB می‌باشد که قبلاً در پیشبر ژن‌های پاسخگو به تنش خشکی مثل rd22 مشاهده شده بود و همچنین نقش آن‌ها در القای بیان ژن‌های مرتبط با خشکی در *Arabidopsis thaliana* نیز گزارش شده است (Abe *et al*., 1997). همچنین بعضی از عناصر تنظیم‌کننده اشاره شده در این مطالعه از جمله می‌توان DRE، ABRE، MYB و TGA قبلاً نیز در بالادست ژن‌های miRNA پاسخگو به تنش در *Arabidopsis thaliana* شناسایی شده‌اند (Liu *et al*., 2008).

بررسی تغییر بیان miRNAهای مورد ارزیابی در پاسخ به خشکی

بررسی نتایج تغییر بیان نشان داد که miRNAهای miR162، miR172 وmiR1425 در شرایط تنش خشکی در ریشه کاهش بیان داشته‌اند؛ اما miR169 و miR1880 در شرایط تنش خشکی افزایش بیان را نشان دادند. به‌منظور بررسی معنی‌دار بودن تغییر بیان miRNAها در شرایط تنش خشکی، از آزمون t-Student استفاده شد و نتایج نشان داد که میزان تغییر بیان برای miRNAهای miR172 و miR169 در سطح ۰/۰۵ درصد معنی‌دار است (شکل ۳). همچنین، بررسی میزان تغییر بیان miRNAها نشان داد که، بیشترین میزان تغییر بیان مربوط به miR172 با بیش از ۴ برابر کاهش بیان در شرایط تنش خشکی است. بررسی مطالعات قبلی نشان داد که در گیاه برنج هیچ‌گونه تغییر بیانی در مواجهه با تنش خشکی برای miR162 گزارش نشده است؛ اما در گیاهان *Populus euphratica*، *Populus tomentosa* و *Vigna unguiculata* افزایش بیان آن در شرایط تنش خشکی در بافت برگی گزارش شده است (Barrera-Figueroa *et al*., 2011; Li *et al*., 2011a; Ren *et al*., 2012). مطالعه تغییر بیان miR172 در بافت برگی گیاه برنج در شرایط تنش خشکی و با استفاده از تکنیک ریزآرایه[1]، کاهش بیان آن را نشان داده است (Zhou *et al*., 2010). در تحقیق حاضر نیز کاهش بیان miR172 در شرایط تنش خشکی در ریشه برنج مشاهده شد. بنابراین احتمالاً تغییر بیان این miRNA در گیاه برنج و در شرایط تنش خشکی در کل گیاه همسو است. بررسی تغییر بیان miRNAها در شرایط تنش خشکی در بافت برگی برنج و با استفاده از ریزآرایه افزایش بیان miR169 را نشان داده است (Zhou *et al*., 2010). در تحقیقی دیگر نیز، miR169g به عنوان تنها عضوی از خانواده miR169 بوده که در تنش PEG افزایش بیان نشان داده و این افزایش بیان در ریشه نسبت به اندام‌هوایی بیشتر بوده است (Zhao *et al*., 2007). نتایج تحقیق حاضر نیز منطبق با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعات قبلی در گیاه برنج است.

در دو مطالعه بر روی ریشه گیاه *Glycine max* افزایش بیان miR169 مشاهده شد (Kulcheski *et al*., 2011; Li *et al*., 2011b)؛ در صورتی که در گیاهان *Medicago truncatula* و *Populus tomentosa* کاهش بیان آن در شرایط تنش خشکی مشاهده شده است (Wang *et al*., 2011; Ren *et al*., 2012). علت این عدم‌انطباق در بعضی از گزارش‌ها می‌تواند نوع گیاه، طول دوره و شدت تنش، مرحله، بافت و شرایط رشدی متفاوت و شیوه متفاوت بررسی بیان‌ژن باشد. برای miR1425 و miR1880 که اختصاصی گیاه برنج هستند، هیچ‌گونه تغییر بیانی در شرایط تنش خشکی گزارش نشده است.



شکل ۳- تغییر بیان miRNAهای مورد بررسی در شرایط تنش خشکی. علامت * معنی‌داری در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

شناسایی ژن‌های هدف miRNAهای مورد بررسی

در این مطالعه برای miRNAهای مورد ارزیابی، ژن‌های هدف با استفاده از psRNATarget مورد بررسی قرار گرفت و ۵۴ ژن هدف برای این miRNAها شناسایی شد. شناسایی ژن‌های هدف نشان داد که miR162، بیان endoribonuclease Dicer را کنترل می‌کند. در مطالعه‌ای، Zhixin و همکارانش گزارش کردند که DCL1 پس از نسخه‌برداری به‌صورت منفی توسط miR162 کنترل می‌شود (Xie *et al*., 2003). بنابراین یک تنظیم بازخوردی منفی[2] در بیان DCL1 وجود دارد. بررسی ژن‌های هدف

1. Microarray

2. Negative feedback regulation

برای miR169 نیز نشان داد که این miRNA، زیر واحد A از nuclear transcription factor Y (NF-Y) را هدف قرار می‌دهد. NF-Y، یک فاکتور نسخه‌برداری است که از سه زیر واحد NF-YA، NF-YB و NF-YC تشکیل شده است (Li *et al*., 2008). در مطالعه‌ای نشان داده شد که افزایش بیان NFYB1 در شرایط تنش خشکی، به‌طور معنی‌داری تحمل به خشکی و عملکرد را در آرابیدوپسیس و ذرت افزایش می‌دهد (Nelson *et al*., 2007). در مطالعه دیگری در آرابیدوپسیس مشاهده شد که در اثر تنش خشکی و ABA، بیان miR169 که در NFYA5 دارای سایت هدف می‌باشد، کاهش و در مقابل بیان NFYA5 به شدت افزایش یافته است (Li *et al*., 2008). NF-Y، می‌تواند به عنصر CCAAT box متصل شود (Dorn *et al*., 1987) و برای این اتصال حضور هر سه زیر واحد NF-YA، NF-YB و NF-YC لازم است (Kabe *et al*., 2005). عنصر CCAAT box در پیشبر ۲۵٪ از ژن‌های پروکاریوتی وجود دارد (Mantovani, 1998). از طرف دیگر در بسیاری از پیشبر ژن‌ها، حضور NF-Y برای به‌کارگیری RNA پلی‌مراز II لازم است (Kabe *et al*., 2005). بنابراین هرگونه تغییر بیان این ژن به‌واسطه miR169 می‌تواند در نسخه‌برداری تعدادی زیادی از ژن‌ها تاثیرگذار باشد. دیگر miRNA مورد بررسی در این تحقیق، miR172 بود که نتایج بررسی ژن‌های هدف نشان داد یک ژن AP2 توسط این miRNA کنترل می‌شود. فاکتورهای نسخه‌برداری AP2 قابلیت اتصال به عنصر تنظیم کننده DRE را دارند. پروتئین‌های خانواده AP2/EREBP، اختصاصی گیاهان است و در یک منطقه حدود ۶۰ تا ۷۰ آمینواسیدی مشترک به‌نام دومین AP2 به‌شدت حفاظت شده هستند. افزایش بیان پروتئین‌های متصل‌شونده به DRE که زیرمجموعه AP2/EREBP هستند در شرایط تنش خشکی گزارش شده است (Kizis *et al*., 2001). یکی از مکانیزم‌های افزایش بیان این پروتئین‌ها می‌تواند کاهش بیان miRNAهایی باشد که این ژن‌ها را کنترل می‌کنند. همان‌طور که در نتایج این تحقیق مشاهده شد، miR172 که یک ژن AP2 را هدف قرار می‌دهد، در شرایط تنش خشکی کاهش بیان نشان داده است. بنابراین احتمالاً کاهش بیان این miRNA، افزایش بیان ژن AP2 را به دنبال خواهد داشت که می‌تواند در کنترل برخی ژن‌های مرتبط با تنش خشکی که دارای عنصر تنظیم‌کننده DRE هستند، تاثیرگذار باشد.

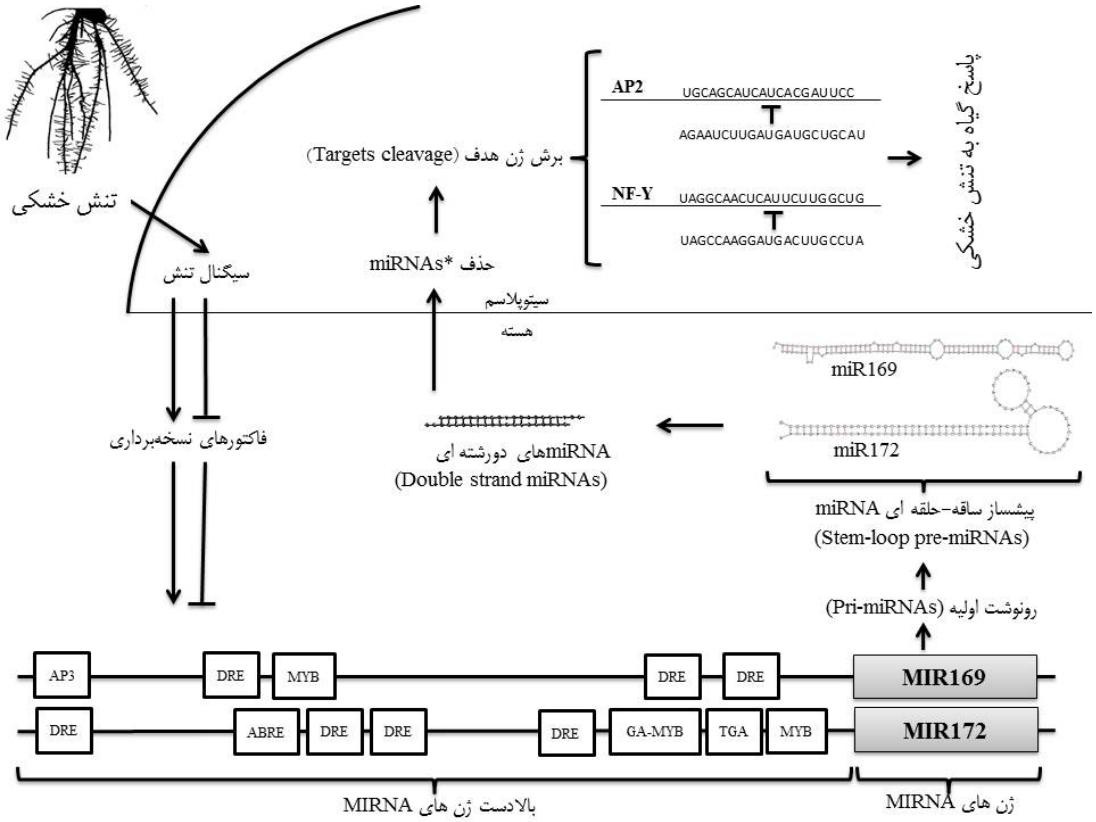
برای miRNAهای اختصاصی گیاه برنج نیز چندین ژن هدف مثل rf1 protein و transmembrane protein 56، برای miR1425 و cytochrome c برای miR1880 شناسایی شد؛ که دارای اهمیت کمتری نسبت به ژن‌های هدف miRNAهای حفاظت‌شده مورد ارزیابی در تنش خشکی هستند.

نتیجه‌گیری کلی

در نتایج این تحقیق مشاهده شد که دو miRNA اختصاصی انتخاب شده که شامل miR1425 و miR1880 بودند تغییر بیان معنی‌داری را نشان ندادند اما از طرف دیگر دو عدد از miRNAهای حفاظت‌شده که شامل miR172 و miR169 بودند تغییر بیان معنی‌داری را نشان دادند. این نتایج نشان‌دهنده این است که احتمالاً این miRNAهای اختصاصی، نقش تنظیمی کمتری را نسبت به miRNAهای حفاظت‌شده مورد بررسی در شرایط تنش دارند. در بین miRNAهای مورد بررسی، miR172 نسبت به سایر miRNAها تغییر بیان بیشتری را نشان داد. همچنین ژن این miRNA، در بالادست خود نسبت به سایر miRNAهای مورد بررسی دارای تعداد بیشتری از عناصر تنظیم‌کننده مهم در تنش خشکی از جمله DRE و ABRE بود که نشان می‌دهد این miRNA احتمالاً هم تحت تاثیر مستقیم تنش خشکی بوده و هم به افزایش هورمون ABAدر شرایط تنش واکنش نشان داده است. در این تحقیق با وجود عناصر تنظیم‌کننده DRE و MYB در بالادست MIR1425 و MIR1880، اما برای آن‌ها در شرایط تنش خشکی تغییر بیان معنی‌داری مشاهده نشد. عدم‌پیوستگی بین وجود عناصر تنظیم‌کننده پاسخگو به فیتوهورومون‌ها و تنش قبلاً نیز گزارش شده است؛ به‌طوری‌که مشاهده شده، miRNAهایی نسبت به فیتوهورومون‌ها و تنش پاسخگو بوده‌اند اما دارای عنصر تنظیم‌کننده مربوط به آن فیتوهورمون و یا تنش نبوده‌اند و یا بالعکس دارای عنصر تنظیم‌کننده مخصوص یک فیتوهورومون و یا تنش بوده‌اند ولی نسبت به آن فیتوهورومون و یا تنش تغییر بیان نشان نداده‌اند (Liu et al., 2009) که علت آن می‌تواند وجود پیام‌رسانی متقابل وسیع بین فیتوهورمون‌ها و همچنین وجود رابطه تنظیمی غیرمستقیم و پیچیده بین فیتوهورمون‌ها، miRNAها و فاکتورهای نسخه‌برداری باشد. بعضی از فاکتورهای نسخه‌برداری که توسط فیتوهورمون‌ها القاء می‌شوند، می‌توانند منجر به تغییر بیان miRNAهایی شوند که همان

فاکتورهای نسخه‌برداری را هدف قرار می‌دهند و در یک مکانیزم خودتنظیمی منجر به تغییر بیان ژن‌های miRNA می‌شوند. نتایج بررسی ژن‌های هدف نیز نشان داد که miR172 یکی از ژن‌های AP2 را هدف قرار می‌دهد، که نقش اساسی در مسیر مستقل از ABA[1] دارد (Kizis *et al*., 2001). از طرف دیگر miR169، بیان NF-Y را کنترل می‌کند که در مسیر وابسته به ABA[2] عمل می‌کند (Li *et al*., 2008). دیگر miRNA حفاظت شده مورد بررسی در این مطالعه، یعنی miR162 با وجود اینکه در بعضی از گیاهان تغییر بیان آن در شرایط تنش خشکی گزارش شده است، ولی در مطالعه قبلی بر روی برنج (Barrera-Figueroa *et al*., 2012) و مطالعه حاضر تغییر بیان این miRNA مشاهده نشد که می‌تواند نشان‌دهنده مکانیزم متفاوت تنظیم DCL1 در گیاهان مختلف باشد. با توجه به حضور عناصر تنظیم کننده در بالادست ژن‌های دو miRNA حفاظت شده miR169 و miR172، فاکتورهای نسخه‌برداری مانند پروتئین‌های AP2 می‌توانند به آن‌ها متصل شوند و میزان نسخه‌برداری از ژن‌های آن‌ها را تغییر دهند. از طرف دیگر، خود miRNAهای بالغ که نسخه‌برداری از آن‌ها با دخالت پروتئین‌های تنظیمی مثل پروتئین‌های AP2 انجام می‌شود، می‌توانند بیان ژن‌های این پروتئین‌ها را در شرایط تنش کنترل کنند. در نتیجه miRNAها می‌توانند نقش مهمی را در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی ایفا کنند (شکل ۴).

1. ABA-independent pathway
2. ABA-dependent pathway



شکل ۴- نقش miRNAها در تغییر پاسخ گیاه به تنش خشکی

REFERENCES

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. Plant Cell 9: 1859-1868.

Barrera-Figueroa BE, Gao L, Diop NN, Wu Z, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ, Zhu JK, Liu R (2011) Identification and comparative analysis of drought-

associated microRNAs in two cowpea genotypes. BMC Plant Biol. 11: 127.

Barrera-Figueroa BE, Gao L, Wu Z, Zhou X, Zhu J, Jin H, Liu R, Zhu J-K (2012) High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress-regulated microRNAs in the inflorescences of rice. BMC Plant Biol. 12: 132.

Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 24: 23-58.

Covarrubias AA, Reyes JL (2010) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. Plant Cell Environ. 33: 481-489.

Ding Y, Tao Y, Zhu C (2013) Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. J. Exp. Bot. 64: 3077-3086.

Dorn A, Bollekens J, Staub A, Benoist C, Mathis D (1987) A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. Cell 50: 863-872.

Ghosh D (2000) Object-oriented transcription factors database (ooTFD). Nucleic Acids Res. 28: 308-310.

Golldack D, Lüking I, Yang O (2011) Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. Plant Cell Rep. 30: 1383-1391.

Hwang EW, Shin SJ, Park SC, Jeong MJ, Kwon HB (2011) Identification of miR172 family members and their putative targets responding to drought stress in *Solanum tuberosum*. Genes Genom. 33: 105-110.

Kabe Y ,Yamada J, Uga H, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H (2005) NF-Y is essential for the recruitment of RNA polymerase II and inducible transcription of several CCAAT box-containing genes. Mol. Cell Biol. 25: 512-522.

Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. BBA-Gene Regul. 1819: 137-148.

Kizis D, Lumbreras V, Pagès M (2001) Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. FEBS Lett. 498: 187-189.

Kulcheski FR, de Oliveira LF, Molina LG, Almerao MP, Rodrigues FA, Marcolino J, Barbosa JF, Stolf-Moreira R, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimaraes FC, Abdelnoor RV, Nascimento LC, Carazzolle MF, Pereira GA, Margis R (2011) Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. BMC genomics 12: 307. doi:10.1186/1471-2164-12-307.

Li A, Mao L (2006) Evolution of plant microRNA gene families. Cell Res. 17: 212-218.

Li B, Qin Y, Duan H ,Yin W, Xia X (2011a) Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in Populus euphratica. J. Exp. Bot. 62: 3765-3779.

Li H, Dong Y, Yin H, Wang N, Yang J, Liu X, Wang Y, Wu J, Li X (2011b) Characterization of the stress associated microRNAs in Glycine max by deep sequencing. BMC Plant Biol. 11: 170.

Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK (2008) The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. Plant Cell, 20: 2238-2251.

Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA & Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. RNA, 14: 836-843.

Liu Q, Zhang YC, Wang CY, Luo YC, Huang QJ, Chen SY, Zhou H, Qu LH, Chen YQ (2009) Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. FEBS Lett 583: 723-728. doi:10.1016/j.febslet.2009.01.020.

Mantovani R (1998) A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. Nucleic Acids

Res. 26: 1135-1143.

Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, Creelman RA, Wu J, Warner DC, Anstrom DC, Bensen RJ, Castiglioni PP, Donnarummo MG (2007) Plant nuclear factor Y (NF–Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. P NATL ACAD SCI-BIOL. 104: 16450-16455.

Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J. Plant Physiol. 161: 1189-1202.

Ren Y, Chen L, Zhang Y, Kang X, Zhang Z, Wang Y (2012) Identification of novel and conserved Populus tomentosa microRNA as components of a response to water stress. Funct Integr Genomics, 12: 327-339.

Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, Chen C (2008) Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. Methods 44: 31-38.

Shahmuradov IA, Solovyev VV, Gammerman A (2005) Plant promoter prediction with confidence estimation. Nucleic Acids Res. 33: 1069-1076.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. J. Exp. Bot. 58: 221-227.

Sunkar R (2010) MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses, Vol. 21: Semin Cell Dev. Biol. pp. 805-811.

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.

Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell 136: 669-687.

Wang T, Chen L, Zhao M, Tian Q & Zhang WH (2011) Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high–throughput sequencing. BMC genomics 12: 367.

Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2003) Negative Feedback Regulation of Dicer-Like1in *Arabidopsis* by microRNA-Guided mRNA Degradation. Curr. Biol. 13: 784-789.

Zhao B, Liang R, Ge L, Li W ,Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y (2007) Identification of drought-induced microRNAs in rice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 354: 585-590.

Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, Luo L (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. J. Exp. Bot. 61: 4157-4168.