مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره ششم، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (۳۳-۲۱)

Crop Biotech.
Spring and Summer (2014) 6: 21-33.

بررسی بیان miRNAهای کنترل‌کننده فاکتورهای رونویسی مرتبط با مسیرهای سیگنالینگ اکسین، جیبرلین و اسید آبسزیک، تحت شرایط تنش خشکی در گندم (*Triticum aestivum* L.)

مهدیه صفرزاده[۱]*، رضا فتوت[۲]، محمد رضا عظیمی[۳]، احسان محسنی فرد[۴]، بهنام بخشی[۵]

۱. کارشناس‌ارشد، بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ۲، ۳. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان.
۴، ۵. دانشجوی دکتری، بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۱۹- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۳۰)

Expression Analysis of miRNAs That Regulate Transcription Factors Related to Auxin, Gibberellin and ABA Signaling Pathways, under Water Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.)

M. SAFARZADEH[1]*, R. FOTOVAT[2], M. AZIMI[3], E. MOHSENI FARD[4], B. BAKHSHI[5]
1. M.Sc. Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
2, 3. Assistant Professors, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
4, 5. PhD Student, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.
(Received: Jun. 9, 2014 - Accepted: Sep. 21, 2014)

چکیده

رشد و متابولیسم گیاه تحت تأثیر انواع محرک‌های زنده و غیرزنده از جمله تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد که گیاه از طریق هورمون‌ها به آن‌ها پاسخ می‌دهد. miRNAها، گروهی از RNAهای کوچک غیر کدکننده هستند که برخی از آن‌ها در سیگنالینگ هورمون‌های گیاهی نقش دارند. در این مطالعه با استفاده از تکنیک qRT-PCR، الگوی بیان miR159a,b، miR160، miR167a,b و miR171a، که به‌ترتیب در تنظیم بیان فاکتورهای رونویسی MYB، ARF، ARF، SCL نقش دارند، در دو رقم حساس و متحمل به تنش خشکی در گندم مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی میزان شباهت نوکلئوتیدی نشان داد که بیشترین شباهت در هر یک از این خانواده‌ها در ناحیه تولید کننده miRNA بالغ می‌باشد. آنالیزهای qRT-PCR نشان داد تحت شرایط تنش خشکی miR159a,b در رقم حساس و miR160 و miR167a,b در رقم متحمل افزایش بیان معنی‌داری داشتند. تحت این شرایط در miR171a تغییر بیان معنی‌داری در هر دو رقم مشاهده نشد. احتمالاً افزایش بیان miR159a,b در رقم حساس منجر به کاهش پاسخ ژن‌های MYB درگیر در تنش خشکی خواهد شد. افزایش بیان miR160 و miR167a,b در رقم متحمل، باعث تنظیم اثر متقابل مسیرهای سیگنالینگ اکسین و آبسیزیک اسید و احتمالاً کمک به تحمل تنش، در رقم متحمل به تنش خشکی می‌شوند. همچنین با عدم تغییر بیان miR171a در هر دو رقم، احتمالاً تحت این شرایط بیان ژن‌های SCL از طریق سایر مکانیسم‌های گیاهی تنظیم می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: miRNA، سیگنالینگ هورمون، گندم، تنش خشکی

Abstract

Growth and metabolism of plants are affected by a variety of stimuli, including biotic and abiotic environmental stresses that could leads to responses of the plant through hormone regulation. miRNAs, are a group of Non-coding RNAs that some of them are involved in signaling of plant hormones. In this study, the expression patterns of miR159a,b, miR160, miR167a,b and miR171a have been studied in both drought susceptible and drought tolerant varieties in wheat using qRT-PCR. miR159a,b, miR160, miR167a,b and miR171a could play important roles in MYB, ARF, ARF, and SCL, transcription factors regulation, respectively. High conservation among the studied miRNA families was observed in the mature miRNA producer regions by multiplex alignment of pre-miRNAs. Results of qRT-PCR analysis indicated that expressions of miR160 and miR167a,b in tolerant Variety and miR159a,b in susceptible Variety are increased significantly. However, no significant changes in expression were observed for miR171a in both tolerant and sensitive varieties. Presumably, up-regulation miR159a,b in susceptible variety could be resulted to reduction in the expression of MYB genes involved in drought response. On the other hand, up-regulation of miR160 and miR167a,b in tolerant variety, may lead to regulation of auxin and abscisic acid pathways interaction and probably these miRNAs could contribute in stress tolerance in tolerant variety. In addition, no significant change in miR171a expression demonstrated that expression of SCL could be regulated through other mechanisms in plant.

Keywords: miRNA, Hormone signaling, Wheat, Drought stress

* نویسنده مسئول: مهدیه صفرزاده
E-mail: safarzadeh_mh@yahoo.com

مقدمه

گیاهان همواره در معرض تنش‌های مختلف می‌باشند و این شرایط باعث محدود شدن تولید محصولات گیاهی در سطح جهانی می‌شود (Bray *et al*. 2000). تنش خشکی به طور معنی‌داری در رشد و نمو گیاه تأثیر می‌گذارد (Zhu. 2001). کاهش رشد سلولی به‌عنوان یک خصوصیت سازگاری برای نجات گیاه در شرایط تنش است و به گیاه اجازه می‌دهد انرژی خود را از رشد، به مقاومت به تنش معطوف کند (Chaves and Oliveira. 2004). رشد و نمو در گیاهان با سیگنال‌های داخلی و محیطی همراه است که گیاه از طریق چندین تنظیم کننده رشد که هورمون نام دارند به آن‌ها پاسخ می‌دهد. از جمله این هورمون‌ها می‌توان به آبسیزیک اسید، جیبرلین و اکسین اشاره کرد (Gray. 2004). هورمون‌ها علاوه بر کنترل بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاهی، در پاسخ به تنش‌های محیطی هم نقش داشته و مسیرهای سیگنالینگ آن‌ها، توسط بسیاری از تنظیم‌کننده‌های مثبت و منفی در طول رشد و نمو کنترل می‌شود.

آبسیزیک‌اسید، یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های نمو گیاهی و پاسخ به تنش‌های محیطی می‌باشد (Wang *et al*. 2011). تحت شرایط کمبود آب، آبسیزیک اسید تولید شده، نقش مهمی را در بیان ژن‌های پاسخگو به تنش و بستن روزنه‌ها ایفا می‌کند (Wilkinson and Davies. 2002). در طی تنش‌های غیرزنده، سطح آبسیزیک اسید افزایش می‌یابد که این امر سبب توقف رشد و نمو می‌شود (Reyes and Chua. 2007). جیبرلین یکی از هورمون‌های گیاهی است که نقش مهمی را در رشد و فرایندهای نموی از جمله جوانه‌زنی بذر، نمو برگ، طویل شدن ساقه و گلدهی ایفا می‌کند (Golldack *et al*. 2013). همچنین اکسین به عنوان یک هورمون کلیدی است که بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاهی را از طریق تأثیر بر سطح نسخه‌برداری ARFها، انجام می‌دهد (Hagen and Guilfoyle. 2002). عناصر cis و فاکتورهای رونویسی وابسته به آبسیزیک اسید، در بیان ژن‌های پاسخگو به تنش خشکی، شوری و سرما نقش دارند. سیگنال تنش وابسته به آبسیزیک اسید، بوسیله فاکتور رونویسی AREB[1] که به عناصر تنظیمی ABRE[2] در ناحیه پروموتری متصل می‌شود، باعث القای برخی ژن‌های پاسخگو به تنش می‌شود (Tuteja. 2007).

سیگنالینگ هورمون‌ها در طول رشد و نمو گیاهی توسط تنظیم کننده‌های مثبت و منفی تنظیم می‌شوند(Huq. 2006). در سال‌های اخیر، مطالعات در زمینه روابط بین هورمون‌ها و RNAهای کوچک[3] مورد توجه قرار گرفته‌است. RNAهای کوچک از جمله miRNAها، تنظیم‌کننده سیگنالینگ هورمونی هستند (Liu *et al*. 2009). اولین گزارشی که رابطه‌ی بین miRNAها و هورمون‌ها را نشان داد مطالعه‌ای بر روی موتانت Hyl1 در آرابیدوپسیس بود (Lu and Fedoroff. 2000).

miRNAها، از اعضای مهم RNAهای کوچک تنظیمی، دارای ۲۴-۱۸ نوکلئوتید و غیر کدکننده هستند که موجب خاموشی ژن در بسیاری از یوکاریوت‌ها می‌شوند (Jones-Rhoades *et al*. 2006). miRNAهای بالغ در گیاهان، توسط آنزیم DCL1، به وسیله دو برش از یک رونوشت بزرگتر RNA، تولید می‌شوند که با کمپلکسRISC[4] تلفیق می‌شوند؛ و با mRNA هدف ایجاد جفت باز می‌کند و در نهایت باعث خاموشی بیان ژن از طریق مکانیسم‌های ایجاد شکاف در mRNA و یا سرکوبی ترجمه می‌شود (Bartel and Chen. 2004). نقش‌های مختلف و شناخته شده miRNAها در

1. ABRE-Binding protein
2. ABA-Responsive Element
3. Small RNAs
4. *RNA-Induced Silencing Complex*

گیاهان شامل: تأثیر در نمو گیاهی، انتقال سیگنال، پاسخ به تنش‌های محیطی و غیره می‌باشد (Zhang *et al*. 2006).

مشاهده شده است که در ناحیه تنظیمی پروموتورهای miR159، miR167، miR393، miR168 و miR169، عناصر تنظیمیABRE وجود دارند و آبسیزیک اسید با استفاده از آن‌ها، در تنظیم بیان این miRNAها نقش دارد (Liu *et al*. 2008b). مطالعات اخیر نشان دادند که برخی miRNAها در مسیرهای سیگنالینگ آبسیزیک اسید، جیبرلین و اکسین نقش دارند (Liu *et al*. 2009). به عنوان مثال: miR166 (Ehya *et al*. 2013; Liu and Chen. 2009;) و miR171 (Gielen *et al*. 2012) در مسیرهای سیگنالینگ اکسین و جیبرلین، miR160، miR167، miR168، miR393 (Liu and Chen. 2009) و miR390(Marin *et al*. 2010; Wang *et al*. 2011)، در مسیرهای سیگنالینگ اکسین و آبسیزیک اسید، miR159 وmiR319 (Liu and Chen. 2009) در مسیرهای سیگنالینگ جیبرلین و آبسیزیک اسید نقش دارند. همچنین miR169 و miR164 (Liu and Chen. 2009) در مسیرهای سیگنالینگ اکسین، miR156 در مسیرهای سیگنالینگ جیبرلین (Guo *et al*. 2008) و miR398 در مسیرهای سیگنالیگ آبسیزیک اسید ایفای نقش می‌کنند (Liu and Chen. 2009; Xiong *et al*. 2002) (شکل۱).

با توجه به اهمیت تنش خشکی به‌عنوان یکی ازمهمترین تنش‌های غیرزیستی محدودکننده تولید محصول و با توجه به اهمیت گندم به‌عنوان یکی از مهمترین محصولات گیاهی که ۱۷٪ از زمین‌های زراعی و تأمین ۵۵٪ کربوهیدرات مورد نیاز مردم جهان را به خود اختصاص داده است (Gill *et al*. 2004)؛ این مطالعه به‌منظور بررسی تغییر بیان miR159a,b، miR160، miR167a,b و miR171a که به‌ترتیب با کنترل فاکتورهای رونویسی MYB[1]، ARF[2]، SCL[3]، در کنترل مسیرهای سیگنالینگ اکسین، جیبرلین و آبسیزیک اسید نقش دارند، در دو رقم حساس و متحمل به تنش خشکی در گندم انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار خشکی

در این پژوهش از دو ژنوتیپ متحمل (G1) (SERI M 82) و حساس (G2) (Sw89. 5193/kAu2) به تنش خشکی گندم استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار آبیاری نرمال (۸۰٪ ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۲۰٪ ظرفیت زراعی) در سه تکرار انجام شد. به‌منظور بررسی تأثیر تنش خشکی بر میزان سطح miRNAها در مراحل اولیه رشد، تیمار خشکی پس از مرحله دو برگی اعمال شد و کل نمونه‌های برگی در مرحله به ساقه رفتن برداشت شدند (Faghani *et al*. 2012). نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار داده شده و به $-۸۰^{o}C$ منتقل شدند.

مطالعه الگوی بیان miRNAها تحت تنش خشکی

RNA کل از برگ نمونه‌های شاهد و تیمار با استفاده از ترایزول (Invitrogen, CA, USA) استخراج شد. سپس برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم دی‌اکسی ریبونوکلئازI[4] (Invitrogen, CA, USA) مطابق با دستورالعمل ارائه شده، تیمار شدند. بررسی کمی و کیفی RNAی استخراج شده با استفاده از نانودراپ ND-1000 (Nanodrop technologies, Wilmington, DE, USA) و ژل آگارز ۱٪ انجام شد. طراحی آغازگرهای Stem-Loop برای سنتز

1. MYeloBlastosis
2. Auxin Response Factor
3. SCARECROW-Like proteins
4. Deoxy RibonucleaseI

cDNA و آغازگر های qRT-PCR (جدول۱) بر اساس (Chen *et al*. 2005) انجام شد. واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)، مطابق با دستورالعمل کمپانی انجام شد. بیان miRNAهای مورد مطالعه با استفاده از iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) در دستگاه Bio-Rad System (MyiQ ™ Single-Color) در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر در سه تکرار انجام شد. همچنین از 18S rRNA به‌عنوان ژن کنترل داخلی[1] استفاده شد (Paolacci *et al*. 2009). میزان تغییر بیان miRNAها تحت شرایط خشکی نسبت به شاهد (آبیاری نرمال) در سطح معنی‌داری ۵٪ با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه شد (Jain *et al*. 2006).

1. Reference Gene

شناسایی ژن‌های هدف و بررسی روابط خویشاوندی miRNAهای مورد مطالعه

ژن‌های هدف miRNAهای مذکور با استفاده از مطالعات پیشین و همچنین از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی psRNATarget (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget)، بررسی شدند. همچنین به‌منظور بررسی میزان حفاظت شده‌گی این miRNAها در گیاهان مختلف، هم‌ردیفی چندگانه[2] miRNAها، با استفاده از روش ClustalW و رسم درخت فیلوژنیک مبتنی بر فاصله، بر اساس نزدیک‌ترین همسایه (NJ) (Tamura *et al*. 2011) با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 انجام شد.

2. Multiplex Alignment

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

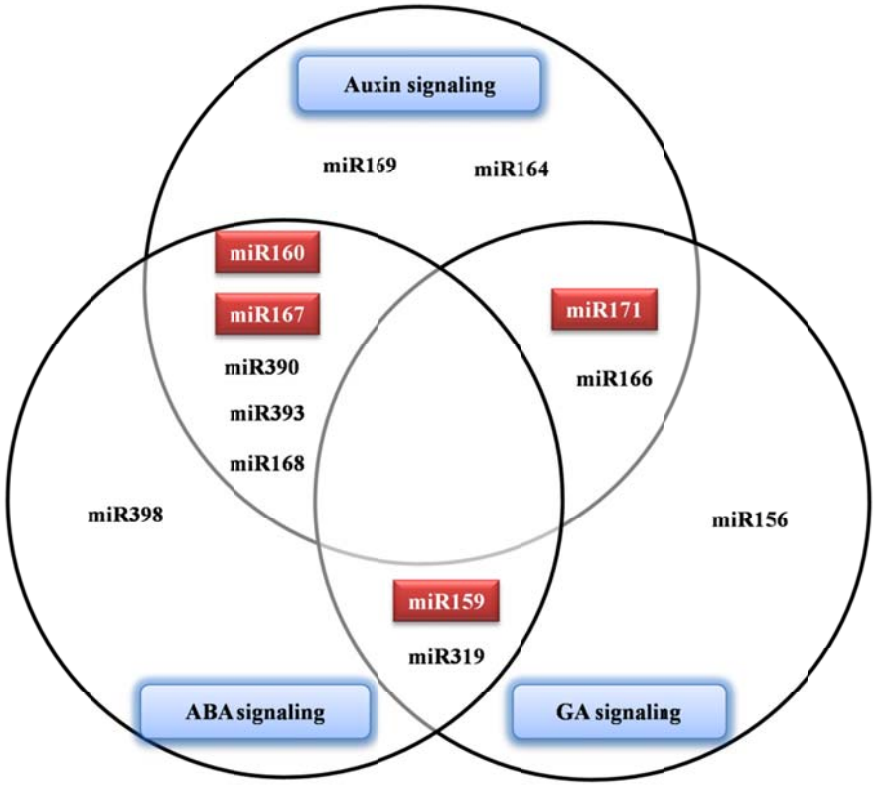
نام	توالی آغازگر های ساقه-حلقه سنتز cDNA
miR159a,b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGAGC
miR160	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGGCAT
miR167a,b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGA
miR171a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGATATT
نام	توالی آغازگر رو به جلو qRT-PCR
miR159a,b	GGAGTTTGGATTGAAGGGA
miR160	TTCGTTGCCTGGCTCCCTGT
miR167a,b	TGAAGCTGCCAGCATGATCT
miR171a	CGGTGATTGAGCCGTGCC
	توالی آغازگر برگشتی (Universal)qRT-PCR
	GTGCAGGGTCCGAGGT

نتایج و بحث

بررسی تغییر بیان miRNAهای مورد بررسی در شرایط تنش خشکی

در این مطالعه بیان miR159a,b، تحت تنش خشکی در هر دو رقم حساس و متحمل افزایش بیان نشان داد اما این افزایش بیان فقط در ارقام حساس معنی‌دار بود (شکل۲). مطالعات پیشین نشان داده است که miR159 از طریق کنترل بیان فاکتورهای رونویسی خانواده MYB، در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ جیبرلین و آبسیزیک اسید نقش دارد (Liu and Chen. 2009). همچنین گزارش شده است که با افزایش آبسیزیک اسید، بیان miR159 افزایش می‌یابد (Tuteja. Reyes and Chua. 2007). بر اساس نتایج این تحقیق، میزان افزایش بیان در miR159a,b در شرایط تنش خشکی در رقم حساس بیشتر از رقم متحمل است. افزایش بیان miR159 در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است؛ به‌طوری که در گیاهانی از جمله *Populus*

euphratica، *Phaseolus vulgaris* و *Oryza sativa* افزایش بیان miR159 در شرایط تنش خشکی گزارش شده است (Arenas-Huertero *et al.* 2009; Li *et al.* 2011a; Zhou *et al.* 2010). همچنین گزارش شده است که تغییر بیان این miRNA می‌تواند متأثر از تغییرات هورمونی باشد به‌طوری که نشان داده شده که آبسیزیک اسید در طی نمو دانه و جیبرلین در طی گلدهی، از طریق اتصال عناصر پاسخ‌دهنده خود، به ناحیه پروموتری ژن‌های miR159، میزان بیان این miRNA را تنظیم می‌کنند (Phillips *et al.* 2007) و miR159 از طریق تنظیم بیان فاکتورهای رونویسی MYB، در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ جیبرلین و آبسیزیک اسید نقش دارد (Achard *et al.* 2004). تغییر بیان miR159a,b در رقم حساس می‌تواند متأثر از پاسخ این miRNA به آبسیزیک اسید در ارقام حساس باشد و این miRNA می‌تواند به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مهم در سیگنالینگ آبسیزیک اسید به خصوص در ارقام حساس نقش ایفا کند. بنابراین با افزایش بیان miR159a,b در رقم حساس، این miRNA، از طریق تأثیر بر mRNAهای فاکتورهای رونویسی MYB، بر کاهش بیان این فاکتورهای رونویسی تأثیر گذاشته و باعث کاهش فعالیت آنها می‌شود. با توجه به نقش فاکتورهای رونویسی MYB در تنظیم بیان تعدادی از ژن‌های درگیر در تنش خشکی، از طریق اتصال به ناحیه پروموتری و همچنین فعال‌سازی ژن‌هایی که توسط آبسیزیک اسید القاء می‌شوند، احتمالاً افزایش بیان این miRNA در رقم حساس منجر به کاهش پاسخ ژن‌های درگیر در تنش خشکی خواهد شد.

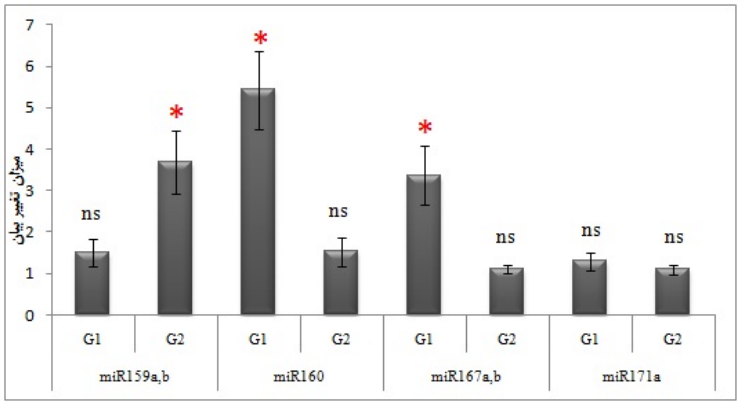


شکل ۱- miRNAهای گیاهی تنظیم‌کننده مسیرهای سیگنالینگ اکسین، جیبرلین و آبسیزیک اسید. miRNAهای مورد مطالعه در این تحقیق قرمز نشان داده شده‌است.

دراین مطالعه با وجود افزایش بیان miR159a,b در شرایط تنش خشکی در رقم حساس، اما برای miR160 و miR167a,b تغییر بیان معنی‌داری در این شرایط مشاهده نشد. در حالی که در شرایط تنش خشکی رقم متحمل miR160 و miR167a,b افزایش بیان نشان دادند (شکل۲). این نتیجه اهمیت تنظیمی miR159a,b را در شرایط تنش خشکی در رقم حساس و miR160 و miR167a,b در شرایط تنش خشکی در رقم متحمل نشان می‌دهد. miR160 از طریق کنترل بیان ARF10، ARF16 و ARF17 و miR167 نیز از طریق کنترل بیان دو فاکتور ARF6 و ARF8، در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ اکسین و آبسیزیک اسید نقش دارند (Liu *et al*. 2007; Liu and Chen. 2009). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۱، Barrera-Figueroa و همکارانش نیز تغییر بیان miRNAها را در ارقام حساس و متحمل در نخود (*Vigna unguiculata*) بررسی کردند. به طور جالبی Barrera-Figueroa و همکارانش نیز افزایش بیان miR160 در شرایط تنش خشکی را در رقم متحمل مشاهده کردند و در گیاه حساس تغییر بیان معنی‌داری برای این miRNA مشاهده نشد (Blanca E Barrera-Figueroa. 2011). این نتایج نقش miR160 در تنظیم فاکتورهای پاسخگو به اکسین را در ارقام متحمل نشان می‌دهد. همچنین در تعدادی دیگر از مطالعات انجام شده نیز افزایش بیان miR160 در شرایط تنش خشکی در گیاهانی مانند *Populus tomentosa*، *Oryza sativa* مشاهده شده است (Yuanyuan Barrera-Figueroa *et al*. 2012; Ren. 2012). علاوه بر این، miR160 و miR167، تحت شرایط تنش خشکی در گیاه لوبیا (Barrera-Figueroa *et al*. 2011)؛ تحت شرایط تنش شوری (Lu *et al*. 2011)، تنش حرارتی (Xin *et al*. 2010) و تنش سرما (Tang *et al*. 2012) در گندم افزایش پیدا کرده است. گزارش شده‌است که افزایش بیان miR160 و miR167a,b در رقم متحمل، باعث تنظیم اثر متقابل مسیرهای سیگنالینگ اکسین و آبسیزیک اسید (Liu *et al*. 2007; Liu and Chen. 2009; Shukla *et al*. 2008) و بیان ژن‌های پاسخگو به تنش (Liu and Chen. 2009) و احتمالاً کمک به تحمل تنش در رقم متحمل نسبت به رقم حساس به خشکی می‌شوند. از طرفی با افزایش سطح miR160 در رقم متحمل، بر کاهش بیان ARF10 تأثیر گذاشته و میزان حساسیت گیاه به آبسیزیک اسید را کاهش می‌دهد (Liu *et al*. 2007; Shukla *et al*. 2008). همچنین در تحقیقی نشان داده شده است که گیاهان تراریخت دارای ARF10 مقاوم به miR160، نسبت به افزایش آبسیزیک‌اسید حساسیت بالایی را در مرحله جوانه‌زنی نشان می‌دهند. ولی گیاهان تراریختی که بیان بالای miR160 داشتند، حساسیت کمی را به آبسیزیک اسید در مرحله جوانه زنی بذر نشان دادند و متحمل‌تر بودند (Liu *et al*. 2007). بنابراین همانطور که در این تحقیق نیز مشاهده شد، افزایش بیان miR160 به‌عنوان یکی از مکانیزم‌های ایجاد تحمل در تنش خشکی می‌تواند باشد و تنظیم منفی ARF10 به وسیله miR160، بر کاهش حساسیت گیاه به آبسیزیک اسید می‌تواند تأثیرگذار باشد. miR167 نیز در مطالعات انجام شده در شرایط تنش خشکی در *Arabidopsis thaliana*، *Populus tomentosa*، *Oryza sativa* و *Glycine max* افزایش بیان نشان داده است (Barrera-Figueroa *et al*. 2012; Li *et al*. 2011a; Li *et al*. 2011b; Liu *et al*. 2008a; Yuanyuan Ren. 2012) که اهمیت افزایش بیان miR167 را در شرایط تنش خشکی نشان می‌دهد. گزارش شده است که تحت تیمار آبسیزیک اسید در برنج، miR167 کاهش بیان می‌یابد و با افزایش ARF8، بافت زایشی نر و مادگی ایجاد شده و نمو زایشی زودرس رخ می‌دهد (Liu

and Chen. 2009). بنابراین احتمالاً افزایش بیان miR167a,b در رقم متحمل در شرایط تنش می‌تواند ناشی تأثیرپذیری کمتر از آبسیزیک اسید در رقم متحمل بوده باشد. گزارش شده است که miR160 و miR167 به صورت متقابل توسط دو هورمون اکسین و هورمون آبسیزیک اسید تنظیم می‌شوند (Ding *et al*. 2013). بنابراین در تنظیم miR160 و miR167 به صورت متقابل توسط این دو هورمون تنظیم می‌شوند و احتمالاً تفاوت در تغییر بیان این دو miRNA در ارقام متحمل و حساس در شرایط تنش خشکی، ناشی از تغییر در میزان این هورمون‌ها و اثرات متقابل آنها می‌تواند باشد. علاوه براین گزارش شده است که تغییر بیان miR167 در تنظیم این اثر متقابل بین آبسیزیک اسید و اکسین و بیان ژن‌های پاسخگو به تنش و سازگاری به تنش نقش دارد (Liu and Chen. 2009). بنابراین از یک طرف تغییر بیان miR167 تحت تأثیر اثر متقابل بین آبسیزیک اسید و اکسین است و از طرف دیگر تغییر بیان miR167 در تنظیم این اثر متقابل نقش دارد. در نتیجه miR167 در یک تنظیم بازخوردی می تواند در شرایط تنش نقش ایفا کند.

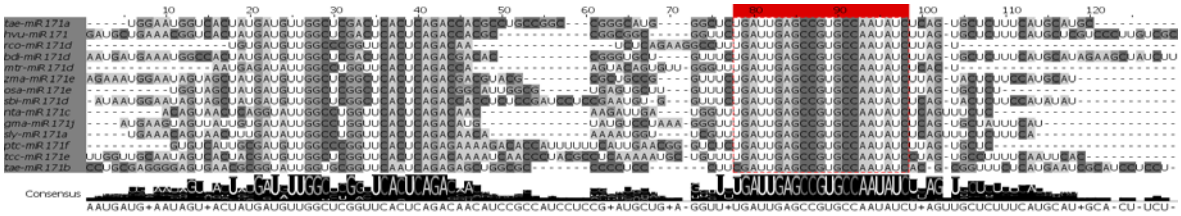
با وجود تغییر بیان miR159a,b ، miR160 و miR167a,b، در شرایط تنش اما هیچ تغییر معنی‌داری برای miR171a در شرایط تنش خشکی چه در رقم حساس و چه در رقم متحمل مشاهده نشد (شکل۲). miR171 بوسیله تنظیم بیان فاکتورهای رونویسی SCL، در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ اکسین و تنظیم مسیرهای سیگنالینگ جیبرلین نقش دارد (Gielen *et al*. 2012). عدم تغییر بیان miR171a در هر دو رقم حساس و متحمل نشان می‌دهد که احتمالاً تحت شرایط تنش خشکی بیان فاکتورهای رونویسی SCL از طریق سایر مکانیسم‌های گیاهی تنظیم می‌شود. همچنین، در مطالعه دیگری تحت شرایط تنش دهیدراسیون در جو، تغییر بیان معنی‌داری در این miRNA، مشاهده نشد (Kantar *et al*. 2010). اما برخلاف نتایج بدست آمده در این تحقیق در مواردی نیز تغییر بیان miR171 در شرایط تنش مشاهده شده است. به طوری که بیان miR171 تحت شرایط تنش شوری و خشکی در ذرت (Yeqin M. Kong. 2010) و برنج (Sunkar *et al*. 2008) کاهش نشان داد. همچنین، در مطالعه دیگری تحت شرایط تنش خشکی در برنج، برخی از اعضای خانواده miR171، افزایش و برخی از آن‌ها کاهش بیان نشان دادند (Zhou *et al*. 2010). بیان این miRNA تحت شرایط تنش خشکی، شوری و سرما در آرابیدوپسیس افزایش یافت (Liu *et al*. 2008b). تفاوت بیان مشاهده شده در این مطالعات می‌تواند ناشی از نوع گیاه، نوع و شدت تنش، شرایط آزمایش، نوع بافت و غیره دانست (Wang *et al*. 2011). فاکتورهای رونویسی SCL، به‌عنوان ژن‌های هدف miR171، در محدوده وسیعی از فرایندهای نموی از جمله الگوهای محوری ریشه، سیگنالینگ هورمون، نمو گل، ریشه و برگ نقش دارند (Eldem *et al*. ; Gielen *et al*. 20122013). در مطالعات پیشین مشخص شد که ژن‌های SCL تنظیم‌کننده مسیرهای سیگنالینگ جیبرلین هستند. همچنین جیبرلین بازدارنده بیان ژن‌های SCL3 و SCL7 می‌باشد، ولی بیان این ژن‌ها تحت تنش خشکی القا می‌شوند (Zhang *et al*. 2011). بنابراین احتمالاً عدم تغییر بیان miR171a، در شرایط تنش خشکی یکی از مکانیزم‌های دخیل در افزایش بیان SCLها می‌باشد و گیاه از این طریق تمام فرایندهای رشد و نموی خود را در شرایط تنش از دست نخواهد داد. علاوه بر سایر miRNAهای مورد بررسی در این تحقیق، مشخص شده‌است که SCL به‌عنوان ژن هدف miR171، علاوه بر سیگنالینگ جیبرلین، در مسیرهای سیگنالینگ اکسین و نمو ریشه نقش دارند و ژن‌های کدکننده اعضای این خانواده، توسط اکسین القا می‌شوند (Sánchez *et al*. 2007).



شکل ۲- نمودار تغییر بیان miRNAهای مورد مطالعه. G1: رقم متحمل. G2: رقم حساس

آنالیز همردیفی توالی‌های pre-miRNA و روابط خویشاوندی

در این مطالعه، به‌منظور بررسی میزان حفاظت‌شدگی و نقش miRNAهای مورد مطالعه در مسیرهای سیگنالینگ هورمونی در گیاهان مختلف، روابط خویشاوندی خانواده miRNAهای miR159a,b، miR160، miR167a,b و miR171a، در برخی از گیاهان بررسی شد. همچنین بررسی نواحی حفاظت شده برای هر یک از miRNAهای مذکور به صورت مجزا در گیاهان مختلف انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که در گیاهان مختلف توالی سنجاق سری miRNA در ناحیه‌تولیدکننده miRNA بالغ، دارای حفاظت‌شدگی می‌باشد. همچنین در ناحیه miRNA* (در ساختار ساقه حلقه در بازوی مقابل miRNA اصلی قرار دارد) نیز حفاظت‌شدگی وجود دارد. در این مطالعه، پس از بررسی و انطباق توالی‌های سنجاق سری miRNAهای خانواده‌های مذکور، مشخص شد که ناحیه تولید کننده miRNA بالغ در همه اعضای هر یک از این خانواده‌های miRNA، حفاظت شده‌است که نشان‌دهنده نقش حفاظت شده این miRNAها در گیاهان مختلف می‌باشد (شکل۳).

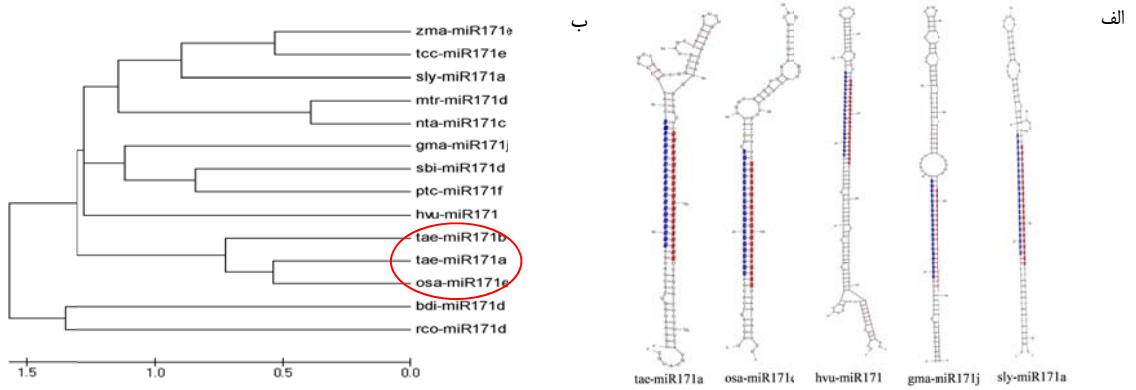


شکل۳- همردیفی چندگانه pre-miRNAهای خانواده miR171 در گیاهان

با وجود ساختار ثانویه تقریباً مشابه در اعضای مختلف یک خانواده miRNA در گیاهان مختلف (شکل۴-الف)، توالی نوکلئوتیدی، مخصوصاً در نواحی غیر از ناحیه تولیدکننده miRNA بالغ، تنوع نشان می‌دهد (شکل۳). بنابراین با وجود تفاوت در توالی ساختارهای ساقه-حلقه، به‌منظور تولید مؤثر miRNA بالغ تقریباً ناحیه ساقه، حفاظت‌شده باقی مانده‌اند (شکل ۳ و شکل۴- الف). تفاوت نوکلئوتیدی بین miRNAهای یک خانواده در گیاهان، عمدتاً مربوط به ناحیه‌ای غیر از ناحیه توالی miRNA بالغ و miRNA* می‌باشد. به‌عنوان مثال، در بین گونه‌های دارای miR171، توالی سنجاق سری miR171e در برنج، با توالی سنجاق سری miR171 در گندم از نظر توالی رابطه نزدیک‌تری

دارد (شکل۴- ب) و تفاوت آن‌ها بیشتر در ناحیه غیر از ناحیه تولید miRNA بالغ می‌باشد (شکل۳).

اهمیت نقش miRNAهای بالغ حفاظت‌شده، در کنترل ژن‌های مهم مانند فاکتورهای رونویسی (Jones-Rhoades *et al*. 2006) می‌تواند توجیه مناسبی برای حفاظت شده بودن توالی این miRNAها در گونه‌های مختلف گیاهان باشد.



شکل ۴- الف: ساختارهای ساقه-حلقه pre-miR171 در *Triticum aestivum*، *Oryza sativa*، *Hordeum vulgare*، *Glycine max* و *Solanum lycopersicum* ب: درخت فیلوژنیک خانواده miR171 در گیاهان.

نتیجه‌گیری کلی

رشد و متابولیسم گیاه تحت تأثیر انواع محرک‌های زنده و غیرزنده، از جمله تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد که گیاه از طریق هورمون‌ها به آن‌ها پاسخ می‌دهد. مسیرهای سیگنالینگ هورمونی توسط بسیاری از تنظیم‌کننده‌های مثبت و منفی در طول رشد و نمو کنترل می‌شود که برخی از miRNAها، گروهی از این تنظیم کننده‌ها هستند.

در این مطالعه تغییر بیان معنی‌داری در miRNAهای مرتبط با سیگنالینگ جیبرلین (miR159a,b و miR171a)، در رقم متحمل و miRNAهای مرتبط با سیگنالینگ اکسین (miR160، miR167a,b و miR171a)، در رقم حساس مشاهده نشد. همچنین miRNAهای مرتبط با سیگنالینگ آبسیزیک اسید دارای بیان متفاوتی بودند. بطوریکه بیان miR159a,b در رقم متحمل، عدم تغییر بیان و در رقم حساس افزایش بیان نشان داد، در حالیکه بیان miR160 و miR167a,b در رقم متحمل، افزایش و در رقم حساس عدم تغییر بیان نشان دادند. می‌توان از miR159a,b، miR160 و miR167a,b به‌عنوان miRNAهای کاندید مقاومت استفاده کرد.

کاهش احتمالی بیان فاکتورهای رونویسی MYB در رقم حساس، بدلیل افزایش بیان miR159a,b باعث کاهش فعالیت این فاکتور رونویسی می‌شود. با توجه به نقش فاکتورهای رونویسی MYB در تنظیم بیان ژن‌های القا شده توسط آبسیزیک اسید و تعدادی از ژن‌های درگیر در تنش خشکی، احتمالاً افزایش بیان این miRNA در رقم حساس، در حساسیت این رقم، تحت شرایط تنش خشکی نقش دارد. همچنین افزایش بیان miR160 و miR167a,b در رقم متحمل، باعث تنظیم اثر متقابل مسیرهای سیگنالینگ اکسین و آبسیزیک اسید و بیان ژن‌های پاسخگو به تنش و احتمالاً کمک به تحمل تنش در رقم متحمل نسبت به رقم حساس به خشکی می‌شوند. همچنین به‌دلیل عدم تغییر احتمالی میزان اکسین به‌علت کاهش بیان ARF6 و ARF8 از طریق افزایش بیان

miR167a,b، اکسین در نمو ریشه ایفای نقش کرده و به تحمل تنش در رقم متحمل نسبت به رقم حساس کمک می‌کند و با افزایش سطح miR160 در رقم متحمل، بر کاهش بیان ARF10 تأثیر گذاشته و میزان حساسیت گیاه به آبسیزیک اسید را کاهش می‌دهد. میزان بالای حفاظت شده‌گی ناحیه تولید کننده miRNA بالغ miRNAهای مذکور در گیاهان مختلف در طی فرایند تکامل، نشان دهنده نقش مهم این miRNAها در گیاهان می‌باشد. بطوری که هر یک از این miRNAهای مذکور، در گیاهان مختلف، خانواده ژنی مشابهی را مورد هدف قرار داده و در مسیرهای مشابهی از جمله سیگنالنگ هورمونی ایفای نقش می‌کنند.

با توجه به نقش miRNAها در تنش‌های زنده و غیرزنده، و نقش برخی از آن‌ها در مسیرهای سیگنالینگ هورمون‌های گیاهی، این مطالعه به‌منظور ارزیابی بیان چهار miRNA حفاظت‌شده که در سیگنالینگ هورمون‌های جیبرلین، اکسین و آبسیزیک اسید نقش دارند، در دو رقم حساس و متحمل به تنش خشکی در گندم انجام شد. اطلاعات حاصل زمینه مطالعات آتی را در رابطه با نقش دقیق و تعامل این miRNAها با سیگنالینگ هورمون‌های گیاهی از طریق فاکتورهای رونویسی فراهم کرده و با مطالعات تکمیلی در این زمینه می‌توان از این miRNAها به منظور دستورزی بیان ژن‌هایی که در افزایش تحمل به تنش خشکی نقش دارند، استفاده نمود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شده و بدینوسیله از همکاری ارزشمند آنها و تمامی عزیزانی که نویسندگان مقاله را در انجام تحقیق یاری نمودند، قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. Science Signalling. 131(14):3357.

Arenas-Huertero C, Pérez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume Phaseolus vulgaris in response to stress. Plant Molecular Biology 70(4):385-401.

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 Biology. 11(1):127.

Barrera-Figueroa BE, Gao L, Wu Z, Zhou X, Zhu J, Jin H, Liu R, and Zhu J-K (2012) High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress-regulated microRNAs in the inflorescences of rice. BMC Plant Biology 12(1):132.

Bartel DP, Chen CZ (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. Nature Reviews Genetics 5(5):396-400.

Blanca E Barrera-Figueroa LG, Ndeye N Diop, Zhigang Wu, Jeffrey D Ehlers, Philip A Roberts,Timothy J Close, Jian-Kang Zhu, Renyi Liu (2011) Identification and comparative analysis ofdrought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. BMC Plant Biology 11:127.

Bray EA, Bailey-Serres J, and Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. Biochemistry and Molecular Biology of Plants:1158-1203.

Chaves M, Oliveira M (2004) Mechanisms underlying plant

resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. Journal of Experimental Botany 55(407): 2365-2384.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. Nucleic Acids Research 33(20):e179-e179.

Ding Y, Tao Y, Zhu C (2013) Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. Journal of Experimental Botany 64(11): 3077-3086.

Ehya F, Monavarfeshani A, Fard EM, Farsad LK, Nekouei MK, Mardi M, Salekdeh GH (2013) Phytoplasma-Responsive microRNAs Modulate Hormonal, Nutritional, and Stress Signalling Pathways in Mexican Lime Trees. PloS one 8(6):e66372.

Eldem V, Okay S, Unver T (2013) Plant microRNAs: new players in functional genomics. Turk. J. Agric. For. 37:1-21.

Faghani E, Khavari-Nejad RA, Salekdeh GH, Najafi F (2012) Evaluation of Cuticular Wax Deposition, Stomata and Carbohydrate of Wheat Leaves for Screening Drought Tolerance. Advances in Environmental Biology. 6(13):4035-4040.

Gielen H, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A (2012) MicroRNAs in Metal Stress: Specific Roles or Secondary Responses? International Journal of Molecular Sciences. 13(12): 15826-15847.

Gill BS, Appels R, Botha-Oberholster AM, Buell CR, Bennetzen JL, Chalhoub B, Chumley F, Dvořák J, Iwanaga M, Keller B (2004) A workshop report on wheat genome sequencing international genome research on wheat consortium. Genetics. 168(2):1087-1096.

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2013) Gibberellins and abscisic acid signal crosstalk: living and developing under unfavorable conditions. Plant Cell Reports:1-10.

Gray WM (2004) Hormonal regulation of plant growth and development. PLoS Biology 2(9):e311.

Guo A-Y, Zhu Q-H, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J (2008) Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. Gene 418(1): 1-8.

Hagen G, Guilfoyle T (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Molecular Biology 49(3-4): 373-385.

Huq E (2006) Degradation of negative regulators: a common theme in hormone and light signaling networks? Trends in Plant Science 11(1):4-7.

Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochem. Biophys. Res. Commun. 345(2):646-651.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 57:19-53.

Kantar M, Unver T, Budak H (2010) Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. Functional & integrative genomics 10(4):493-507.

Li B, Qin Y, Duan H, Yin W, Xia X (2011a)Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in Populus euphratica. Journal of Experimental Botany 62(11):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 Biology 11(1):170.

Liu H-H, Tian X, Li Y-J, Wu C-A, and Zheng C-C (2008a) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. RNA 14(5): 836-843.

Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008b) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. RNA 14(5):836-843.

Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. The Plant Journal 52(1):133-146.

Liu Q, Chen Y-Q (2009) Insights into the mechanism of plant development: interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. Biochemical and Biophysical Research Communications. 384(1):1-5.

Liu Q, Zhang Y-C, Wang C-Y, Luo Y-C, Huang Q-J, Chen S-Y, Zhou H, Qu L-H, Chen Y-Q (2009) Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. FEBS Letters 583(4):723-728.

Lu C, Fedoroff N (2000) A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. The Plant Cell Online 12(12): 2351-2365.

Lu W, Li J, Liu F, Gu J, Guo C, Xu L, Zhang H, Xiao K (2011) Expression pattern of wheat miRNAs under salinity stress and prediction of salt-inducible miRNAs targets. Frontiers of Agriculture in China:1-10.

Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A (2010) miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. The Plant Cell Online. 22(4): 1104-1117.

Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Molecular Biology 10(1):11.

Phillips JR, Dalmay T, Bartels D (2007) The role of small RNAs in abiotic stress. FEBS Letters 581(19):3592-3597.

Reyes JL, 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.

Sánchez C, Vielba JM, Ferro E, Covelo G, Solé A, Abarca D, De Mier BS, Díaz-Sala C (2007) Two SCARECROW-LIKE genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. Tree Physiology. 27(10):1459-1470.

Shukla LI, Chinnusamy V, Sunkar R (2008) The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 1779(11): 743-748.

Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, Zhang W, Zhu JK (2008) Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. BMC Plant Biology. 8(1):25.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. 28(10):2731-2739.

Tang Z, Zhang L, Xu C, Yuan S, Zhang

F, Zheng Y, Zhao C (2012) Uncovering Small RNA-Mediated Responses to Cold Stress in a Wheat Thermosensitive Genic Male-Sterile Line by Deep Sequencing. Plant Physiology. 159(2): 721-738.

Tuteja N (2007) Abscisic acid and abiotic stress signaling. Plant signaling & behavior 2(3):135-138.

Wang L, Hua D, He J, Duan Y, Chen Z, Hong X, Gong Z (2011) Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene HB33 mediate abscisic acid response in Arabidopsis. PLoS Genetics 7(7):e1002172.

Wilkinson S, Davies WJ (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. Plant, Cell & Environment. 25(2):195-210.

Xin M, Wang Y, Yao Y, Xie C, Peng H, Ni Z, Sun Q (2010) Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC Plant Biology. 10(1):123.

Xiong L, Schumaker KS, Zhu J-K (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. The Plant Cell Online 14 (suppl 1): S165-S183.

Yeqin M. Kong AAE, Beibei Chen, Xing Wang Deng (2010) Differential Expression of microRNAs in Maize Inbred and Hybrid Lines during Salt and Drought Stress. American Journal of Plant Sciences 69-76

Yuanyuan Ren LC, Yiyun Zhang, Xiangyang Kang, Zhiyi Zhang, Yanwei Wang (2012) Identification of novel and conserved Populus tomentosa microRNA as components of a response to water stress. Funct Integr Genomics. 12: 327–339.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2006) Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. Developmental Biology. 289(1):3-16.

Zhang Z-L, Ogawa M, Fleet CM, Zentella R, Hu J, Heo J-O, Lim J, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sun T-p (2011) Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 108(5):2160-2165.

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. Journal of Experimental Botany. 61(15):4157-4168.

Zhu J-K (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. Current Opinion in Plant Biology 4(5): 401-406.