مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره بیست‌ودوم، تابستان ۱۳۹۷ (۵۰-۴۱)

Crop Biotech.
Summer (2018) 22: 41-50.

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

نوشین آشوری[۱]، رضا فتوت[۲*]، مریم مرتضایی‌فر[۳]، نسترن مهری[۳]
۱. دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۲. دانشیار گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۳. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۹- تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/٦/۱)

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

Nooshin Ashoori[1], Reza Fotovat[2*], Maryam Mortezaefar[3], Nastaran Mehri[3]
1. Former Student of Plant Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.
3. Ph.D. candidate, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.
(Received: Apr. 6, 2018 -Accepted: Aug. 23, 2018)

چکیده

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

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

Abstract

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

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

* نویسنده مسئول: رضا فتوت
E-mail: r_fotovat@znu.ac.ir

مقدمه

دما به عنوان یک عامل کلیدی، فصل رشد و پراکنش جغرافیایی گیاهان را تعیین می‌کند. گیاهان مجموعه‌ای از مکانیسم‌های سازگاری به دما مثل دوره نهفتگی بذر و جوانه، حساسیت فتوپریودی، بهاره‌سازی و خوگیری به سرما را بروز می‌دهند. غلات زمستانه برای ورود به مرحله گلدهی نیازمند سرما می‌باشند که این فرآیند بهاره‌سازی[1] نامیده می‌شود. این مکانیسم باعث می‌شود گیاهان بتوانند رشد خود را متناسب با تغییرات فصل کنترل کنند و در شرایط سخت زمستان، خود را از خسارت تنش سرما مصون نگه دارند (Fowler *et al*., 1996).

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

دو نوع گندم نان از نظر تیپ رشدی وجود دارد، که تفاوت آنها به خاطر نیاز به بهاره‌سازی بوده و شامل واریته‌های بهاره و زمستانه می‌باشند (Kumar *et al*., 2012). بهاره‌سازی در گیاهانی با تیپ رشد زمستانه موجب انتقال از فاز رویشی به زایشی می‌شود به گونه‌ای که این واریته‌ها برای گلدهی به چندین هفته دمای پایین در زمستان نیاز دارند، اما واریته‌های بهاره گندم برای گلدهی به بهاره‌سازی نیاز ندارند و در دمای معمولی گل می‌دهند. این تفاوت از نظر زراعی مهم است زیرا ارقام بهاره و پائیزه در تاریخ‌های متفاوتی کشت شده و به نواحی مختلفی سازگار می‌باشند (Pidal *et al*., 2009). تجزیه ژنتیکی در جو و گندم نشان داده است که دلیل اصلی تفاوت در تیپ بهاره و پاییزه، وضعیت آللی در ژن *Vrn1* می‌باشد که بر نمو زایشی و بهاره‌سازی تأثیر می‌گذارد. ژنوتیپ‌های بهاره آلل غالب *Vrn1* و ژنوتیپ‌های پاییزه آلل مغلوب *vrn1* را حمل می‌کنند. در ژنوتیپ‌های حامل آلل بهاره *Vrn1* به طور پیوسته در سطوح بالایی بیان شده و امکان نمو زایشی را بدون نیاز به بهاره‌سازی می‌دهند. در مقابل بیان این ژن در ژنوتیپ‌های بینابین و زمستانه با آلل مغلوب *vrn1* کم بوده که موجب فاز رویشی طولانی‌تری می‌شود و القای آن نیاز به سرما دارد (Knox *et al*., 2010).

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

بررسی‌ها نشان داده است چندین خانواده miRNA نقش مهمی را در مسیرهای کنترل‌کننده گلدهی نیز دارند. در گیاهان دو لپه مدارک و شواهد

1. Vernalization

2. Arabidopsis

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

مواد و روش‌ها

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

به منظور ارزیابی بهاره‌سازی، تعداد نهایی برگ (FLN[1]) روی ساقه اصلی محاسبه شد این روش به‌طور مستقیم تغییرات فنولوژیکی نظیر انتقال از مرحله رویشی به زایشی را منعکس می‌کند و نیز شاخص مناسب مورفولوژیکی برای تعیین نقطه تکمیل بهاره‌سازی می‌باشد (Fowler *et al.*, 1996; Mahfoozi *et al.*, 2006).

واکنش Real-time PCR و بررسی بیان miRNA و ژن هدف آن

برای انجام Real-time PCR نمونه‌های هر تیمار در ازت مایع کوبیده شده و حدود 100 میلی‌گرم از آن به منظور استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج (RNX-Plus ساخت شرکت سیناکلون) طبق دستور العمل انجام شد. به منظور حذف هر گونه باقیمانده DNA نمونه‌های RNA استخراج شده با استفاده از آنزیم (fermentas، DNase 1) مطابق با دستورالعمل مربوطه تیمار شدند. بررسی کمیت RNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ (مدل NANODROP 200 ساخت شرکت Thermo SCIENTIFI) انجام شد. برای سنجش کیفیت RNA از الکتروفورز ژل آگارز

1. Final Leaf Number

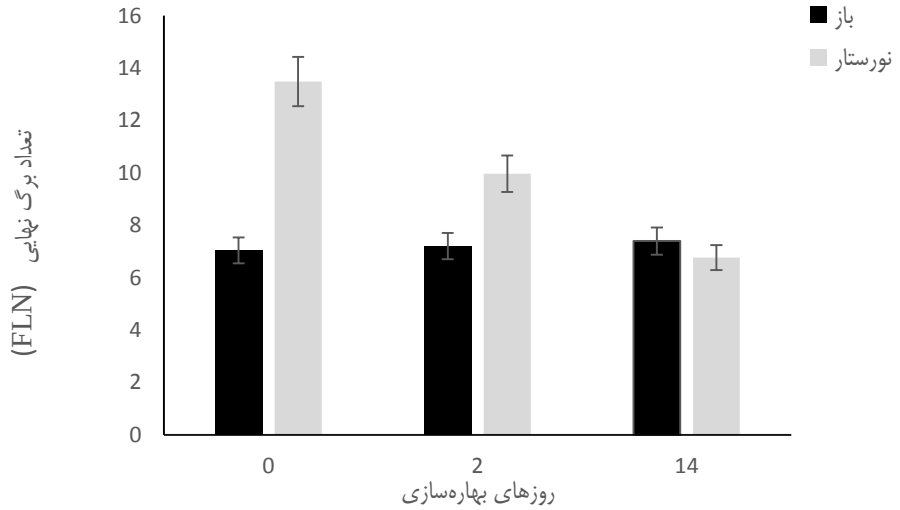
یک درصد (رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید) در بافر TAE (Tris/Acetate/EDTA) استفاده شد، توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر (*miR319, MYB3*) و ژن *Ta22845* به عنوان ژن خانه‌دار از پایگاه داده‌ی NCBI و miRbase تهیه شد (جدول ۱). آغازگرهای اختصاصی Stem-Loop به منظور تولید cDNA و آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر در qRT-PCR برای هر miRNA مطابق با دستورالعمل ارائه‌شده (Caifu Chen *et al.*, 2005; Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007) طراحی شدند. فرآیند سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای Stem-Loop با استفاده از کیت Kit HyperscriptTM RT master mix مطابق با دستورالعمل ارائه شده انجام شد. واکنش Real-time PCR با استفاده از YTA SYBR Green qPCR MasterMix 2X با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q با دو تکرار تکنیکال برای هر نمونه انجام شد. داده‌های حاصل از Real-time PCR با استفاده از روش ΔΔct تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

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

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای ژن‌های مورد بررسی در گندم

نام ژن	شماره دسترسی	آغازگر پیش رو	آغازگر پس رو
MYB3	EF114831.1	5'-CACCATTTGGGGGTACACTT-3'	5'-TCACTGACGGAGTTGCTGTC-3'
miR319	MIMAT0018211	5-'CGCGCTTGGACTGAAGGGAG3'	5-'GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
Ta22845	HG670306.1	5'-GCTGGCTCGTTCAACTGATG-3'	5'-GGACCAAGCGTTCTGATTACTC-3'
Stem-loop RT PCR primer	MI0016453	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGGAG 3'	



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

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

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

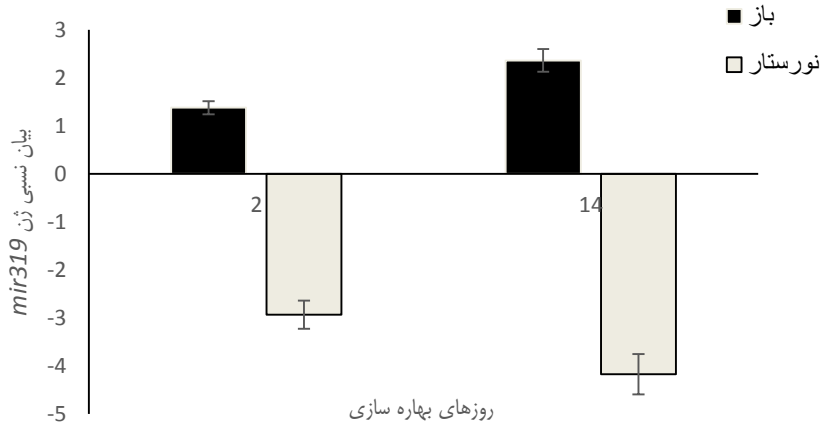
با اعمال تیمار بهاره‌سازی، تغییرات بیان نسبی ژن *miR319* در گیاهچه‌های گندم رقم نورستار و باز متفاوت بود و این ژن در رقم بهاره باز بیان بسیار بیشتری داشت (شکل ۲)، به‌طوری‌که تیمار سرما ۱۴ روزه سبب افزایش ۲/۳ برابری بیان این ژن در رقم باز نسبت به شاهد شد. در صورتیکه در گندم زمستانه نورستار بیان نسبی ژن *miR319* در هر دو تیمار بهاره‌سازی نسبت به شاهد بیان منفی داشت و در ۱۴ روز بهاره‌سازی دارای کمترین مقدار بود. این نتایج نشان می‌دهد که اعمال تیمار سرما بیان ژن *miR319* را در هردو ژنوتیپ تحت تأثیر قرار داده است و این تأثیر به وضوح در ارقام زمستانه و بهاره گندم مورد استفاده در این آزمایش متفاوت است. در سال‌های اخیر مطالعه زیادی در مورد نقش miRNA در پاسخ به تنش‌های زیستی غیرزیستی در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس، برنج و ذرت انجام شده است (Liu *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Covarrubias and Reyes, 2010). با اینحال مطالعات اندکی در مورد تنظیم اپی ژنتیک سرما نقش عوامل رونویسی و miRNA در گلدهی و بهاره‌سازی وجود دارد (Trevaskis *et al.*, 2007). بررسی‌ها نشان داده است که miR319 در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی مختلف، از جمله ترارسانی اسید جیبرلیک، ورود از مرحله رویشی به زایشی، تنظیم بیوسنتز اتیلن، ترارسانی هورمون ABA و نیز شکل برگ گیاه در تنش سرما و شوری دخیل است (Rhoades *et al.*, 2002; Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Sunkar & Zhu, 2004; Schwab *et al.*, 2005; Reyes & Chua 2007; Liu *et al.*, 2008). علاوه بر این، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک داده‌های ریز آرایه در آرابیدوپسیس نشان داده است که بیان بسیاری از miRNAهای گیاهی از جمله miR319 در سرما تغییر می‌یابند (Zimmermann *et al.*, 2004). در این مطالعه بیان ژن *miR319* در طی بهاره‌سازی تغییر کرده و میزان سطوح بیان در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متفاوت بود. تیپ‌های مختلف رشدی زمستانه و بهاره در دو ژنوتیپ گندم مورد مطالعه در این آزمایش نشان‌دهنده نقش ژنوتیپ در تنظیم ژن‌های مربوطه می‌باشد (Thiebaut *et al.*, 2012).

تأثیر سرما در تغییر میزان بیان ژن *miR319* در نیشکر (Thiebaut *et al.*, 2012) و آرابیدوپسیس

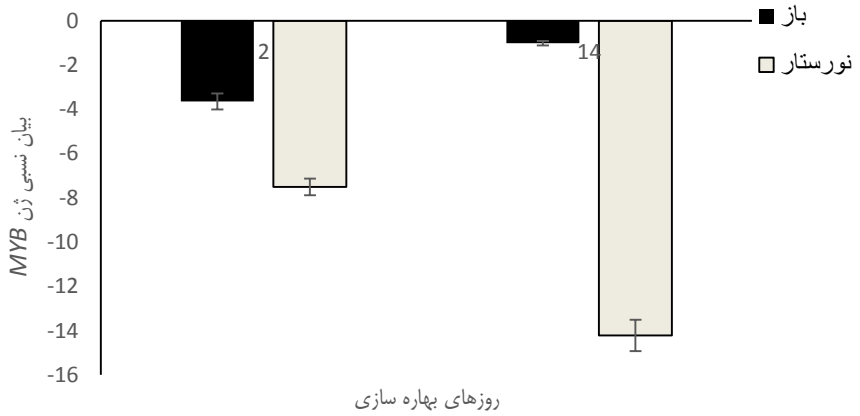
(Thiebaut *et al.*, 2012) گزارش شده است. با توجه به مشاهدات Palatnik و همکاران (۲۰۰۳) و نیز Schommer و همکاران (۲۰۰۸) افزایش بیان ژن *miR319* در گیاهان جهش‌یافته آرابیدوپسیس موجب تأخیر در گلدهی می‌شود. بنابراین کاهش چشمگیر ژن *miR319* در اثر بهاره‌سازی در رقم زمستانه نورستار ممکن است در القای گلدهی نقش داشته باشد. تاکنون در مورد اثر سرما در میزان بیان ژن *miR319* در گندم و رابطه آن با بهاره‌سازی و گلدهی گزارشی نشده است. اختلاف فاحش دو تیپ رشدی بهاره و زمستانه و نیز اثر متقابل آنها با بهاره‌سازی نشان‌دهنده پیچیدگی سازوکار تنظیم گلدهی و اثر ژنوتیپ در گندم می‌باشد.

بطور کلی بهاره‌سازی موجب کاهش بیان ژن *MYB3* در هر دو رقم بهاره و زمستانه شد. گرچه کاهش بیان این ژن هدف *miR319* در رقم زمستانه نورستار نسبت به رقم بهاره باز واضح بود و شدت کاهش بیان آن با اعمال تیمار بهاره‌سازی بیشتر شد (شکل۳). با افزایش روزهای بهاره‌سازی از دو روز به ۱۴ روز میزان کاهش بیان ژن *MYB3* در رقم بهاره باز از ۳- برابر به ۱- برابر شاهد تغییر یافت. این نتایج بوضوح تأثیر ژنوتیپ و تیپ رشدی گندم را بر بیان ژن *MYB3* نشان می‌دهد.

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



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



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

با استفاده از لاین‌های جهش‌یافته در گیاه آرابیدوپسیس نقش حیاتی زیرگروه R2R3 در خوگیری به تنش سرمایی و نمو حاصله به اثبات رسیده است (Zhu *et al.*, 2005). به همین ترتیب در جو، ژن *GAMyb* مسئول رشد بافتی، طول عمر ساقه، گلدهی زودرس و رشد دانه شناخته شده است (Woodger *et al.*, 2003). عوامل رونویسی MYB (GAMyb, TC94752) در کنار عامل رونویسی TCP در نیشکر نیز به‌عنوان یک ژن هدف بالقوه برای miR319 شناسایی شده است (Thiebaut *et al.*, 2012) و بررسی نشان داده است که کاهش سطوح *GAMyb* در گیاهان نیشکر که در معرض سرما قرار دارشتند باعث مهار رشد و نمو گیاه شده است (Thiebaut *et al.*, 2012). بنابراین در گندم نیز بهاره‌سازی از طریق تأثیر در بیان *miR319* و ژن هدف آن عامل رونویسی MYB3 احتمالاً می‌تواند تأثیر مشابه بر بیان سایر ژن‌ها داشته باشد. از طرف دیگر تجزیه و تحلیل فیلوژنی توالی‌های پروتئینی در گندم نشان داده است که عامل رونویسی MYB3 در گندم دارای شباهت بسیار زیادی به عامل رونویسی vGAMyb جو با بیش از ۹۷٪ همسانی دارد (Rongmin Chen *et al.*, 2005). عامل رونویسی vGAMyb در نمو گل در جو نقش مهمی دارد و از عناصر بسیار مهم در مسیر ترارسانی جیبرلین در گیاهان می‌باشد (Fiona *et al.*, 2003). نقش جیبرلین در انگیزش گلدهی در لولیوم به اثبات رسیده است (King *et al.*, 2001). از طرف دیگر وجود اثر متقابل در گندم بین تیمار هورمونی با جیبرلین و ژن بهاره‌سازی *VRN1* ثابت شده است (Pearce *et al.*, 2013). در یک مطالعه که بر روی تأثیر بهاره‌سازی بر میزان جیبرلین صورت گرفت مقدار هورمون در اندام هوائی گندم بهاره‌سازی شده بسیار بیشتر از شاهد بوده که نشان‌دهنده اهمیت این هورمون در انگیزش گل در اثر بهاره‌سازی است (Lin and Stafford, 1987). بنابراین احتمال دارد بهاره‌سازی از طریق تغییر در میزان بیان عوامل رونویسی MYB بر میزان جیبرلین تأثیر گذاشته و موجب گل‌انگیزی در گندم شود. از طرف دیگر عوامل رونویسی MYB در آرابیدوپسیس (MYB33 و MYB101) به عنوان تنظیم‌کننده‌های مثبت پاسخ ABA در طی جوانه‌زنی بذر عمل می‌کنند (Roy, 2016). این نتایج نشان می‌دهد که در مطالعات بعدی اثرات متقابل سطوح بیان ژن *miR319* و ژن هدف با سایر miRNAها و هورمون‌های گیاهی تحت بهاره‌سازی در گندم بایستی مورد توجه قرار گیرد. همان‌طوری‌که وجود اثر متقابل بین سرما و هورمون ABA بر میزان بیان ژن *miR319* و ژن هدف آن عامل رونویسی *MYB* در نیشکر نشان داده شده است (Thiebaut *et al.*, 2012).

REFERENCES

Ben-Gera H, and Ori N (2012) Auxin and Lanceolate affect leaf shape in tomato via different developmental processes. Plant Signaling & Behavior 7(10): 1255-1257.

Bond DM, Dennis ES and Finnegan EJ (2011) The low temperature response pathways for cold acclimation and vernalization are independent. Plant, Cell & Environment 34(10): 1737-1748.

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

Chen R, Ni Z, Nie X, Qin Y, Dong G and Sun Q (2005) Isolation and characterization of genes encoding Myb transcription factor in wheat (*Triticum aestivem* L.). Plant Science 169(6): 1146-1154.

Covarrubias AA and Reyes JL (2010) Post- transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. Plant, Cell & Environment 33(4): 481-489.

Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z and Zheng Y (2009) Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. Annals of Botany 103(1): 29-38

Du H, Feng B-R, Yang S-S, Huang Y-B and Tang Y-X (2012) The R2R3-MYB Transcription Factor Gene Family in Maize. PLOS ONE 7(6): e37463.

Fiona M, Roger K, John J and Frank G (2003) A role for HvGAMYB in anther development. The Plant Journal 33(3): 481-491.

Fowler D, Limin A, Wang S-Y and Ward R (1996) Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. Canadian Journal of Plant Science 76(1): 37-42.

Fowler DB, Breton G, Limin AE, Mahfoozi S and Sarhan F (2001) Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. Plant Physiology 127(4): 1676-1681.

Hay R and Ellis R (1998). The control of flowering in wheat and barley: what recent advances in molecular genetics can reveal. Annals of Botany 82(5): 541-554.

Jones-Rhoades MW and Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Molecular Cell 14(6): 787-799.

Kim D-H, Doyle MR, Sung S and Amasino RM (2009) Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. Annual Review of Cell and Developmental 25: 277-299.

King RW, Moritz T, Evans LT, Junttila O and Herlt AJ (2001) Long-day induction of flowering in Lolium temulentuminvolves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex. Plant Physiology 127(2): 624-632.

Knox AK, Dhillon T, Cheng H, Tondelli A, Pecchioni N and Stockinger EJ (2010) CBF gene copy number variation at Frost Resistance-2 is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals. Theoretical and Applied Genetics 121(1): 21-35.

Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K and Ohme-Takagi M (2010). TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. The Plant Cell 22(11): 3574-3588.

Kumar S, Sharma V, Chaudhary S, Tyagi A, Mishra P, Priyadarshini A and Singh A (2012) Genetics of flowering time in bread wheat Triticum aestivum: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat. Journal of Genetics 91(1): 33-47.

Laudencia-Chingcuanco D, Ganeshan S, You F, Fowler B, Chibbar R and Anderson O (2011) Genome-wide gene expression analysis supports a developmental model of low temperature tolerance gene regulation in wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC genomics, 12: 299-299.

Limin, A. E. and Fowler, D. B. (2006). Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod,

vernalization, and plant development. Planta 224(2): 360-366.

Lin J-T and E Stafford A (1987). Comparison of the endogenous gibberellins in the shoots and roots of vernalized and non-vernalized chinese spring wheat seedlings. Phytochemistry 26(9): 2485-2488.

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

Mahfoozi S, Limin AE, Ahakpaz F and Fowler DB (2006) Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. Field Crops Research 97(2): 182-187.

Nag A, King S and Jack T (2009) miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(52): 22534-22539.

Navaud O, Dabos P, Carnus E, Tremousaygue D and Hervé C (2007) TCP transcription factors predate the emergence of land plants. Journal of Molecular Evolution 65(1): 23-33.

Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC and Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. Nature 425(6955): 257-263.

Pearce S, Vanzetti LS and Dubcovsky J (2013) Exogenous Gibberellins Induce Wheat Spike Development under Short Days Only in the Presence of *VERNALIZATION1*. Plant Physiology 163: 1433-1445.

Pidal B, Yan L, Fu D, Zhang F, Tranquilli G and Dubcovsky J (2009) The CArG-box located upstream from the transcriptional start of wheat vernalization gene *VRN1* is not necessary for the vernalization response. Journal of Heredity 100(3): 355-364.

Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B and Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. Genes & Development 16(13): 1616-1626.

Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B and Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. Cell 110(4): 513-520.

Reyes JL and Chua NH (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. The Plant Journal 49(4): 592-606

Roy S (2016) Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. Plant Signaling & Behavior 11(1): e1117723.

Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chételat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U and Weigel D (2008a) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. PLoS Biol 6(9): e230.

Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chételat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U and Weigel D (2008b) Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets. PLOS Biology 6(9): e230.

Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M and Weigel D (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. Developmental Cell 8(4): 517-527.

Sunkar R and Zhu J-K (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. The Plant Cell 16(8): 2001-2019.

Thiebaut F, Rojas CA, Almeida KL, Grativol C, Domiciano GC, Lamb CRC, DE ALMEIDA ENGLER J, Hemerly AS and Ferreira PC (2012) Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. Plant, Cell & Environment 35(3): 502-512.

Trevaskis B, Hemming MN, Dennis ES and Peacock WJ (2007) The molecular

basis of vernalization-induced flowering in cereals. Trends in Plant Science 12(8): 352-357.

Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF and Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant Methods 3: 12-12.

Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell 136(4): 669-687

Woodger FJ, Millar A, Murray F, Jacobsen JV and Gubler F (2003) The role of GAMYB transcription factors in GA-regulated gene expression. Journal of Plant Growth Regulation 22(2): 176-184.

Zhang B, Jin Z and Xie D (2012) Global analysis of non- coding small RNAs in Arabidopsis in response to jasmonate treatment by deep sequencing technology. Journal of Integrative Plant Biology 54(2): 73-86.

Zhang J, Xu Y, Huan Q and Chong K (2009). Deep sequencing of Brachypodium small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. BMC Genomics 10(1): 449.

Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M and Luo L (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in Oryza sativa. Journal of Experimental Botany 61(15): 4157-4168.

Zhu J-K (2008) Reconstituting plant miRNA biogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(29): 9851-9852.

Zhu J, Verslues PE, Zheng X, Lee B-H, Zhan X, Manabe Y, Sokolchik I, Zhu Y, Dong C-H and Zhu J-K (2005) HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(28): 9966-9971.

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L and Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiology 136(1): 2621-2632.

Zografos BR and Sung S (2012) Vernalization-mediated chromatin changes. Journal of Experimental Botany 63(12): 4343-4348.