مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال نهم، شماره یکم، پیاپی بیست و هفتم، پاییز 1398 (68-59)

Crop Biotech.
Autumn (2019) 9(1): 59-68. DOI: 10.30473/cb.2019.47353.1777

شناسایی و بررسی بیان برخی میکرو RNAهای مرتبط با تنش خشکی در گیاه جو

سجاد زارع[1]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[2*]، احمد اسماعیلی[3]، حسن پاک‌نیت[4]

1. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
2. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
3. استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
4. دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

(تاریخ دریافت: 1398/4/17 - تاریخ پذیرش: 1398/9/20)

Identification and investigation of microRNAs associated with drought stress in barley

Sajjad Zare[1], Farhad Nazarian-Firouzabadi[2*], Ahmad Ismaili[3], Hassan Pakniyat[4]

1. Ph.D.Candidate, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
2. Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
3. Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
4. Associate Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

(Received: Jul. 9, 2019 - Accepted: Dec. 11, 2019)

چکیده

مطالعه سازوکارهای تحمل تنش در گیاه جو، به درک بهتر اساس ژنتیکی تحمل تنش خشکی و در نهایت بهبود خصوصیات ژنتیکی مرتبط با تحمل تنش به کمک روش‌های نوین ژنتیک مولکولی می‌انجامد. در این پژوهش، به‌منظور شناسایی و بررسی بیان برخی میکرو RNAهای درگیر در تحمل تنش خشکی گیاه جو، واکاوی EST های برگ و ریشه در گیاه جو صورت گرفت. اطلاعات اولیه کتابخانه‌ها از پایگاه NCBI دریافت گردید، سپس با کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیکی، پیش‌پردازش داده‌ها و همچنین شناسایی ژن‌های با میزان بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها انجام گرفت. به منظور بررسی بیان ژن‌های منتخب با استفاده از روش Real time-PCR، یک آزمایش به صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلدان روی رقم زراعی نیمروز (متحمل در برابر تنش خشکی) و اکوتیپ جو وحشی اسپانتانئوم (*Hordeum spontaneum*) در سه سطح صفر، 24 و 72 ساعت پس از اعمال تنش خشکی صورت گرفت. با جستجو در بین کانتیگ‌های به‌دست‌آمده، سه miRNA با بیان بالا (ath-miR414، osa-miR2102-5p، osa-miR414) شناسایی شدند. بررسی بیان *miR414* و *miR2102* در نمونه‌های گیاهی جو، نشان داد که میزان بیان این دو miRNA در هر دو ژنوتیپ در پاسخ به تنش خشکی به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) افزایش یافت، به‌طوریکه بعد از 72 ساعت بیان ژن miR414 در ژنوتیپ نیمروز و اسپانتانئوم به ترتیب 2/61 و 2 برابر و بیان ژن miR2102 به ترتیب به میزان 2/4 و 2/8 برابر نسبت به اسپانتئوم (شاهد) در شرایط عدم تنش (صفر ساعت پس از اعمال تنش) افزایش یافتند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، واکاوی بیوانفورماتیکی، تنش خشکی، miRNA.

Abstract

Study of stress tolerance in barley can help for a better understanding of the genetic basis of drought stress tolerance mechanisms and lead to improve the genetic properties associated with drought tolerance through modern molecular genetic techniques. To this end, microRNAs associated with drought stress in barley leaf and root ESTs were analyzed in Nimruz and *spantaneum* barley genotypes. Bioinformatics databases were mined for relevant EST libraries and bioinformatics services were used for pre-processing and identify genes with different expressions among libraries. The expression profile of candidate genes was studied, by using Real time-PCR in a factorial-split plot design, including Nimruz as tolerant and *Spontaneum* as a drought sensitive in pots with three replications. Sampling time was also considered at 0, 24 and 72 hours after drought stress as sub factor. Results of this study led to identification of three highly-expressed miRNAs (ath-miR414, os-miR2102-5p and osa-miR414). The expression analysis showed that miR414 and miR2102 expression was significantly ($P< 0.05$) increased in both genotypes in response to drought stress. After 72h in Nimruz and *Spontaneum*, the expression of miR414 reached 2.61 and 2-fold and the expression of miR2102 was 2.4 and 2.8-fold of that of control (*Spontaneum* at control condition at 0 times), respectively.

Keywords: Bioinformatics, Drought stress, Gene expression, miRNA.

* نویسنده مسئول: فرهاد نظریان فیروزآبادی
E-mail: nazarian.f@lu.ac.ir

مقدمه

تنش خشکی یکی از مشکلات جهانی برای تولید محصولات کشاورزی است و خشکی از ویژگی‌های بارز جغرافیایی کشور ایران بوده و برخورد حداقل یکی از مراحل مهم چرخه زندگی گیاهان با تنش خشکی، اجتناب‌ناپذیر است (Barati *et al*., 2017). جو یکی از گیاهان مهم به‌خصوص در مناطق دیم است. براساس آمار فائو در سال 2018 سطح زیرکشت جو 46 میلیون هکتار و میزان تولید آن 141 میلیون تن بوده است (Faostat, 2018). سطح زیرکشت جو به‌علت افزایش مصرف در صنعت و دامداری به‌ویژه در کشورهای اروپایی در حال افزایش است. همچنین گیاه جو یکی از غلات مهم در کشورهای در حال توسعه، به‌ویژه در مناطقی است که خشکی شدید یکی از عوامل مؤثر بر تولید گیاهان می‌باشد (Barati *et al*., 2017). بنابراین بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه در مقابله با تنش، شناسایی و انتقال ژن‌های دخیل در مقاومت به ارقام پر محصول، امکان توسعه هرچه بیشتر کشت گیاهان به‌خصوص گیاه جو را در مناطق خشک فراهم می‌آورد (Soleimani *et al*., 2017). مطالعات یک دهه اخیر نشان داده است که دسته‌ای از RNAها در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی و متابولیکی شامل پیام‌رسانی 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 زیستی و غیر زیستی نقش دارند (Khraiwesh et al. 2012). میکرو RNAها[1] در واقع مولکول‌های اسید نوکلئیک کوچکی هستند که 25-18 نوکلئوتید طول دارند. این نوع از RNAها از DNA رونویسی می‌شوند، اما به پروتئین ترجمه نمی‌شوند، بلکه عملکرد دیگر ژن‌ها را کنترل می‌کنند. بنابراین، miRNA ژن‌هایی هستند که دیگر ژن‌های کدکننده پروتئینی را تنظیم می‌کنند (Kim 2005) و با نقش تنظیم‌کنندگی مثبت و منفی در شرایط تنش، در سازگاری گیاه به تنش نقش دارند. اغلب miRNAها، ژن‌هایی را کنترل می‌کنند که فاکتورهای نسخه‌برداری را کد می‌کنند و این ویژگی miRNA ها را در مرکز شبکه‌های تنظیم بیان ژن قرار می‌دهد (Ding et al. 2013). چندین برنامه محاسباتی مانند MIRscan (Lim *et al*., 2003) و MiRAlign (Wang *et al*., 2004) برای شناسایی همولوگ‌های miRNAهای شناخته‌شده در ارگانیسم‌هایی با توالی ژنومی در دسترس، طراحی شده‌اند. به کمک این برنامه‌ها، بسیاری از miRNAهای حفاظت‌شده در گیاهان و جانوران با موفقیت پیش‌بینی شده‌اند (Jones-Rhoades and Bartel, 2006; Wang *et al*., 2018; Jaiswal *et al*., 2004; Hsieh *et al*., 2019). مطالعات گسترده‌ای به‌منظور بررسی تغییر بیان برخی ازmiRNA ها در شرایط تنش‌های مختلف از جمله خشکی صورت گرفته است که از جمله می‌توان به miRNAها مانند *miR159*، *miR168*، *miR169*، *miR171*، *miR393* و *miR167* اشاره کرد (Covarrubias and Reyes 2010). بعضی از miRNAها از جمله *miR169* تغییر بیان متفاوتی را در اثر تنش خشکی در گیاهان نشان داده‌اند. به‌طور مثال، Liu *et al*. (2008) کاهش بیان *miR169* را در *Arabidopsis thaliana* ولی Zhao *et al*. (2007) افزایش بیان *miR169* را در برنج در شرایط تنش خشکی گزارش کرده‌اند. با توجه به اهمیت تنش خشکی و همچنین نقش miRNA در القای تحمل این تنش، این تحقیق با هدف بررسی شناسایی برخی

1. microRNA

miRNAهای دخیل در تحمل تنش خشکی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده EST

یک کتابخانه EST '5 مربوط به برگ گیاه جو با شناسه Lib.13887 از پایگاه داده NCBI دریافت گردید. این کتابخانه شامل 2016 توالی EST بود. لازم به ذکر است که جستجوی کتابخانه‌ها بین کتابخانه‌هایی با حداقل 1000 توالی EST صورت گرفت. همچنین دو کتابخانه EST '5 مربوط به ریشه گیاه جو نیز از پایگاه یاد شده دریافت گردیدند. کتابخانه اول با شناسه Lib.9798 شامل 1469 توالی در شرایط بدون تنش (شاهد) و کتابخانه دوم با شناسه Lib.9796 شامل 3863 توالی در شرایط تنش خشکی بود. کتابخانه‌ها مربوط به گیاهان جو رقم Optic بودند که در مرحله سه هفتگی، تنش خشکی روی گیاه جو با قطع آبیاری برای تیمارهای تنش در شرایط گلخانه اعمال شده بود.

پیش‌پردازش، دسته‌بندی و هم‌گذاری توالی‌های EST

برای انجام مرحله پیش‌پردازش از سرویس بیوانفورماتیک EGassembler استفاده شد (Masoudi-Nejad *et al*., 2006). خروجی این سرویس شامل کانتیگ‌ها، سینگلتون‌ها و فایل صف‌بندی توالی‌های EST بود. پارامترهای مربوطه به شرح زیر در نظر گرفته شد: (1) حداقل درصد همانندی برای صف‌بندی در مقابل توالی‌های آلوده‌کننده: 96 درصد (2) از کتابخانه توالی‌های تکرارشونده گیاه جو برای پوشش توالی‌های تکرارشونده و حذف آن‌ها از ESTها استفاده شد. (3) از داده‌های کتابخانه مرکزی توالی‌های ناقل سایت NCBI برای حذف توالی ناقل‌ها استفاده گردید. (4) کتابخانه توالی‌های مربوط به اندامک‌ها با هدف کنار گذاشتن توالی‌های اندامکی، کتابخانه توالی‌های پلاستیدی گیاه جو مورد توجه قرار گرفتند.

دسته‌بندی و هم‌گذاری ESTها به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها در کتابخانه‌ها

ازآنجایی‌که در رابطه با برگ در این مرحله رشدی فقط کتابخانه در شرایط تنش وجود داشت، پس از تشکیل کانتیگ‌ها، کانتیگ‌هایی با حداقل 10 توالی EST، به‌عنوان ژن‌هایی با بیان بالا مدنظر قرار گرفتند. چون برای بافت ریشه کتابخانه شاهد و تنش در یک مرحله رشدی وجود داشت، امکان مقایسه بین دو وضعیت فراهم بود. به همین خاطر توالی‌های EST دو کتابخانه با به‌کارگیری مجدد سرویس EGassembler، هم‌زمان باهم و با در نظر گرفتن حداقل 80 درصد همانندی، دسته‌بندی و هم‌گذاری شدند.

شناسایی miRNAهای پاسخ‌دهنده به تنش خشکی

کانتیگ‌های حاصل در واکاوی داده‌های بافت برگ و ریشه به‌صورت جداگانه و با استفاده از نرم‌افزار C-mii (Numnark *et al*., 2012) مورد واکاوی قرار گرفتند تا miRNAهای احتمالی در بین آن‌ها شناسایی گردد. برای شناسایی miRNAها توالی‌هایی مدنظر قرار گرفتند که شاخص انرژی آزاد (MFEI)[1] مساوی یا بزرگ‌تر از 0/6 کیلوکالری بر مول باشد (Zhang *et al*., 2006).

پیش‌بینی ژن‌های هدف میکرو RNAها

به این منظور از نرم‌افزارهای آنلاین psRNA Target[2] و PMTED[3] استفاده شد. این نرم‌افزارها توالی میکروRNAی مورد نظر را با توالی‌های mRNA ثبت‌شده برای گیاه انتخابی BLAST کرده و توالی‌هایی را معرفی می‌کنند که پتانسیل یک ژن هدف را دارند. این نرم‌افزارها بر اساس (الف) محاسبه میزان

1. Minimum free energy index
2. http://plantgrn.noble.org/psRNAtarget
3. http://pmted.agrinome.org/by_gene.jsp

جفت‌شوندگی توالی miRNAها و توالی هدف و (ب) آنالیز ساختار ثانویه این دو توالی و محاسبه این‌که آیا این دو توالی قابلیت اتصال به هم را دارند یا خیر، توالی ژن‌های هدف را پیش‌بینی می‌کنند. همچنین این نرم‌افزارها قابلیت پیش‌بینی نوع بازدارندگی miRNAها برای ژن هدف به شکل جلوگیری از ترجمه یا قطعه‌قطعه‌کردن mRNA را دارند. در این مرحله چند پارامتر در نظر گرفته می‌شود: (1) تعداد نوکلئوتیدهای غیرمکمل بین توالی miRNAها و ژن هدف نباید بیش از 4 باشد. (2) نوکلئوتیدهای غیر مکمل در ناحیه بازهای 10 و 11 از miRNA با توالی هدف نباید وجود داشته باشد، زیرا گمان می‌رود این ناحیه همان ناحیه‌ایی باشد که در آن شکستگی اتفاق می‌افتد و توالی miRNA از آن ناحیه بریده و در نهایت منجر به تجزیه mRNA هدف می‌شود. با این حال، تا سه نوکلئوتید غیرمکمل بین بازهای 12 تا 23 از miRNA مجاز می‌باشد. (3) نباید بیش از سه نوکلئوتید غیرمکمل به‌صورت متوالی و پشت سر هم بین توالی میکرو RNA و ژن هدفش دیده شود. تنظیمات نرم‌افزار طبق حالت پیش‌فرض بود و بر این اساس جستجو برای یافتن ژن‌های هدف انجام شد و در نهایت برای هر miRNA تعدادی ژن هدف معرفی گردید.

کشت گیاه و اعمال تنش

آزمایش به‌صورت فاکتوریل اسپلیت در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلدان روی رقم زراعی نیمروز (متحمل در برابر تنش خشکی) (Kuhkan *et al.*, 2011) و اکوتیپ جو وحشی اسپانتانئوم (*Hordeum spontaneum*) (با شماره دسترسی 02TN220 از بانک ژن ملی ایران تهیه شد) اجرا شد. ترکیب دو عامل آبیاری (شاهد و آبیاری در 50 درصد FC) و ژنوتیپ (رقم نیمروز و گونه اسپانتانئوم) به‌عنوان عامل اصلی و زمان نمونه‌برداری در سه سطح صفر، 24 و 72 ساعت پس از اعمال تنش خشکی به عنوان عامل فرعی لحاظ گردیدند. پس از کاشت، سپس گلدان‌ها در شرایط گلخانه با 12 ساعت روشنایی به میزان μ mol m^{-2} S^{-1} 180 در دمای 23 درجه سانتی‌گراد و 12 ساعت تاریکی در دمای 20 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله 2 برگی گیاهچه‌ها، تمام گلدان‌ها برای ایجاد شرایط یکسان تنک شدند و بذوری که قوه نامیه آن‌ها از دست رفته بود یا گیاهانی که کاهش رشد داشتند خارج شدند و تعداد کل گیاهان در هر گلدان به 5 عدد رسانده شد. همه گیاهان تا مرحله 5 برگی به میزان FC 100 درصد آبیاری شدند و بعد از مرحله 5 برگی تیمارهای مورد نظر به مدت دو هفته (آبیاری در 50 درصد FC) اعمال گردید، سپس نمونه‌برداری بر اساس تیمارهای زمانی انجام شد.

بررسی بیان miRNAهای شناسایی‌شده

آغازگرهای اختصاصی Stem-Loop و آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر در qRT-PCR برای هر miRNA مطابق با دستورالعمل ارائه‌شده توسط Varkonyi-Gasica *et al.* (2007) طراحی گردید. استخراج RNA با استفاده از محلول ترایزول صورت پذیرفت. برای انجام واکنش qRT-PCR مقدار 50 نانوگرم از RNA به 0/5 میکرولیتر از dNTP 10 میلی‌مولار اضافه شد و به مدت 5 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مخلوط حاصل به‌مدت دو دقیقه روی یخ گذاشته شد. یک میکرولیتر از DTT 0/1 مولار و 0/5 میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس به مخلوط اضافه شد و در ادامه یک میکرولیتر از Stem-loop RT PCR primer اضافه گردید. مراحل واکنش نسخه‌برداری معکوس (ساخت cDNA) به شرح جدول 1 بود.

نتایج و بحث

شناسایی miRNAهای پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در جو

با جستجو در بین کانتیگ‌ها و با نظر گرفتن شاخص انرژی آزاد (MFEI)[1] مساوی یا بزرگ‌تر از 0/6 کیلوکالری بر مول، E-value برابر با 10 و تعداد نوکلئوتید اشتباه حداکثر 4 عدد، دو miRNA شناسایی شدند که یکی از آن‌ها (miR414) دارای بیان افتراقی معنی‌دار ($P\leq0/05$) بین کتابخانه‌های شاهد و تنش خشکی در ریشه جو بود. توالی miRNAهای شناسایی‌شده در جدول 3 آورده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با کمک نرم‌افزار SAS 9.1 انجام گرفت و مقایسات میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد صورت پذیرفت.

آزمون Audic and Claverie (AC) دقیق‌ترین آزمون برای شناسایی تغییرات بیان ژن در مقایسات جفتی است و بر پایه محاسبه احتمال شرطی و با این فرض که بیان ژن‌های مورد بررسی یکسان است مقایسه می‌کند (Audic and Claverie 1997).

برای مثال، بیان افتراقی miRNAها توسط محققین بسیاری گزارش شده است، اما براساس نتایج گزارش‌های مختلف، بیان یک miRNA در شرایط تنش در گیاهان مختلف می‌تواند متفاوت باشد به‌طور مثال، در گیاه آرابیدوپسیس در شرایط تنش خشکی miR169 با کاهش بیان همراه است، با این حال در برنج و در شرایط تنش خشکی، این miRNA افزایش بیان نشان می‌دهد (Hackenberg *et al*., 2015). مطالعات نشان می‌دهند که تغییر در بیان miRNAها در گیاه جو، به‌شدت تحت تأثیر افزایش بیان DREB3[2] می‌باشد (Hackenberg *et al*., 2015). در جریان تنش خشکی در گیاه جو، ژن‌های مورد هدف miRNAها، بیشتر در فرایندهای مانند رشدونمو گیاه و سیگنال‌های هورمونی نقش دارند (Mohseni Fard *et al*., 2017). بر اساس مطالعه Mohseni Fard *et al*. (2017)، تعداد 645 ژن تحت کنترل تنظیمی مثبت miRNAها در رقم مقاوم به تنش خشکی جو قرار داشتند. Kantar *et al*. (2010) نیز به شناسایی miRNAهای جو در شرایط تنش خشکی نشان دادند که تعداد 28 miRNA متعلق به 18 خانواده در جریان تنش تغییر بیان پیدا کرده‌اند که حدود 445 ژن را هدف قرار می‌دادند. بررسی miRNAهای نابالغ جو نشان می‌دهد که طول آن‌ها بین 46 تا 115 نوکلئوتید با متوسط 77 نوکلئوتید می‌باشد (Kantar *et al*., 2010). بررسی الگوی تغییرات بیان miRNA در جو در شرایط سایر تنش‌های غیرزیستی نشان می‌دهد که در هر مرحله رشد، بافت و نوع تنش متفاوت می‌باشند، به‌طور مثال، در پاسخ گیاه جو به تنش عنصر بُر مشخص شده است که میزان بیان miRNAهایی که در ریشه افزایش بیان دارند (مانند *miR2004* و *miR5051*) پایین‌تر از miRNAهایی است که در برگ (مانند *miR171* و *miR444a*) افزایش بیان داشتند (Ozhuner *et al*., 2013).

جدول 1. مراحل واکنش نسخه‌برداری معکوس

مرحله	دما (°C)	زمان	چرخه
1	16	30 دقیقه	1
2	30	30 ثانیه	1
3	42	30 ثانیه	1
4	50	1 ثانیه،	60
5	85	5 دقیقه	1

1. Minimum Free Energy Index

2. Dehydration-responsive element-binding protein 3

جدول 2. آغازگرهای مورد استفاده برای miRNA های مورد بررسی

miRNA	Stem -loop RT PCR primer	آغازگر رو به جلو ('3-'5)	آغازگر برگشتی ('3-'5)
miR414	GTGCTATCCACTGCAGGGTCCGACCTATTCG CACTG GATACGACCAGGGC	CTCGCTTTCGGAAAGGAG ATTT	CTCGACCCTGGG AC GT
miR210 2-5p	GTGCTATGGAGTGCACCCTGGCAGGTATTCG CACTG GATACGACCAGGGG	CTCGCTTTCTCTTGTGAGC TGA	AGAGTTGAGGCC AG GATTGAA

جدول 3. miRNAهای شناسایی‌شده در بین کانتیگ‌های به‌دست‌آمده از کتابخانه‌های EST ریشه جو ($P\leq 0/05$)

miRNA بالغ شناسایی شده	نام کانتیگ	MFEI(kcal/mol)	توالی miRNA
ath-miR414	Contig 377	-0.774	5':UUUUCAUCAUCAUCAUCGUCA:3'
osa-miR2102-5p	Contig 219	-0.648	5':CGGCUCGCCGCCGCCGCCAA:3'

بررسی بیان *miR414* تجزیه واریانس بیان این miRNA نشان داد که تأثیر تنش، ژنوتیپ و زمان به‌ترتیب در سطح 5، 1 و 5 درصد بر بیان آن معنی‌دار می‌باشد (جدول 4). با توجه به نتایج حاصل مشخص شد که در شرایط تنش، بیان این ژن افزایش می‌یابد و 24 ساعت پس از تنش بالاترین میزان بیان در هر دو ژنوتیپ مشاهده شد (شکل 1). بعد از 72 ساعت بیان این ژن در ژنوتیپ نیمروز و اسپانتانئوم به‌ترتیب 2/61 و 2 برابر نسبت به شاهد (اسپانتانئوم در شرایط عدم تنش و زمان صفر) افزایش یافت. در همین رابطه و براساس نتایج Guleria & Yadav (2011) بیان این ژن در برگ‌های جوان بالاتر از برگ‌های مسن بود و با گذشت زمان بیان این ژن کاهش نشان داد. مشخص شده است که تقریباً 34 درصد از ژن‌های مورد هدف این ژن در فرایند نسخه‌برداری دخیل هستند و 14 و 9 درصد به ترتیب در تغییرات پروتئین و ترمیم DNA دخالت دارند (Guleria and Yadav, 2011). به علاوه، ژن‌های هدف این ژن نقش مهمی در تنظیم رونویسی SNF2[1]، پروتئین C2H2 zinc finger و پروتئین‌های خانواده F-Box دارند (Yin *et al.*, 2010)؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که miRNAها در تنظیم بیان ژن‌های متعدد درگیر در مقاومت به تنش خشکی نقش دارند. شناسایی ژن-های هدف با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی توسط Bakhshi *et al.* (2014) نشان داد که فاکتورهای نسخه‌برداری TCP[2] و SBP[3]، ARF[4] و همچنین ژن کدکننده پروتئین آرگونات 1 بیشتر از سایر ژن‌های هدف توسط miRNAهای پاسخگو به تنش‌های غیرزیستی کنترل می‌شوند.

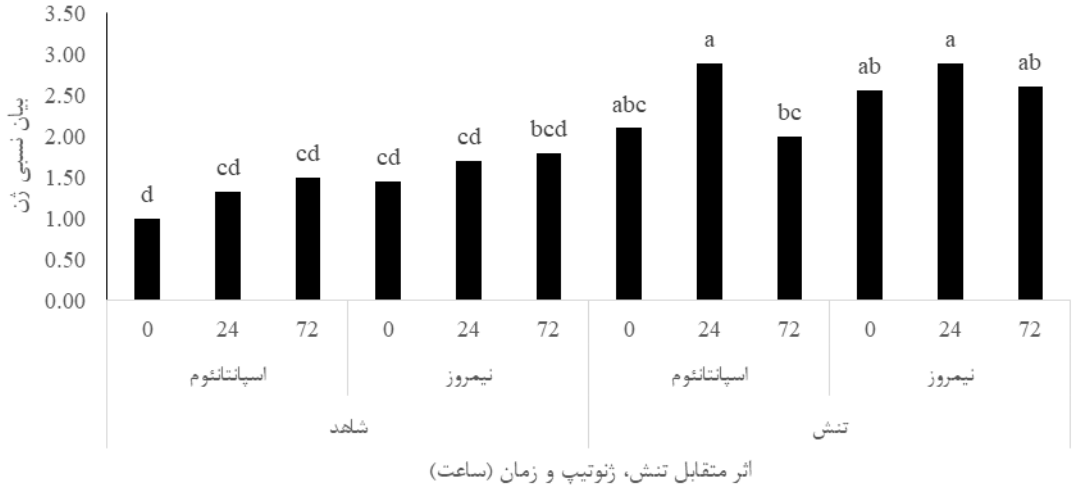
جدول 4. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) بیان نسبی miRNAهای مورد مطالعه

منابع تغییر	درجه آزادی	miR414	miR2102
تنش	1	9/797*	13/04**
رقم	1	1/195**	0/017
تنش × رقم	1	0/001	0/051
خطا	8	0/3222	0/05
زمان	2	1/085*	0/136

1. SWItch/Sucrose Non-Fermentable
2. Teosinte Branched 1, Cycloidea, PCF1
3. SQUAMOSA promoter binding protein-like
4. Auxin response factors

تنش× زمان	2	0/794	0/087
رقم× زمان	2	0/148	0/117
تنش× رقم× زمان	2	0/171	0/016
خطا	16	3/092	0/201
ضریب تغییرات		8/1	6/3

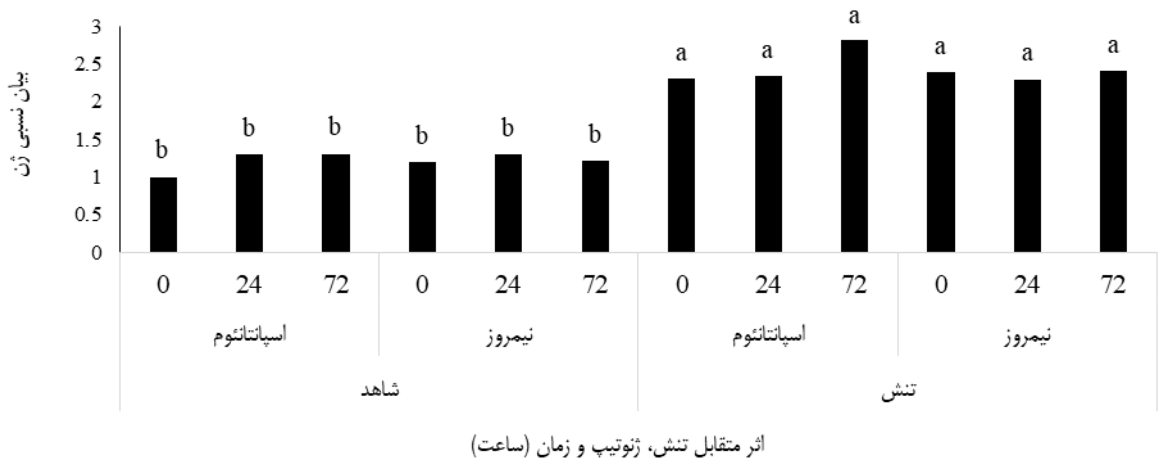
* و **: نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح 5 و 1 درصد.



شکل 1. مقایسه بررسی اثرات متقابل تیمارهای آزمایش بر بیان نسبی *miR414* نسبت به گونه اسپانتانئوم در شرایط شاهد و زمان صفر (آزمون دانکن در سطح 5 درصد)

بررسی بیان miR2102-5p

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تنش در سطح احتمال 1 درصد بر بیان این miRNA، معنی-دار بود (جدول 4). در شرایط تنش بیان ژن *miR2102-5p* با افزایش همراه شد به‌طوری‌که بعد از 72 ساعت بیان این ژن در ژنوتیپ نیمروز و اسپانتانئوم به ترتیب 2/4 و 2/8 برابر نسبت به شاهد (اسپانتانئوم در شرایط عدم تنش) افزایش یافت، اما بین تیمارها در شرایط شاهد با یکدیگر و در شرایط تنش با یکدیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل 2). پیش‌تر Sharma *et al*. (2015) به افزایش بیان این ژن در گیاه برنج در پاسخ به تنش آرسنات و آرسنیت اشاره نموده بودند. اگرچه میکروRNAها از نظر تعداد اندک هستند، اما نقش تنظیم‌کنندگی آن‌ها در بیان ژن‌های گیاهان را نمی‌توان نادیده گرفت، زیرا اغلب mRNAهای مورد هدف miRNAها، عوامل رونویسی هستند (Jones-Rhoades *et al*., 2006).



شکل 2. مقایسه بررسی اثرات متقابل تیمارهای آزمایش بر بیان نسبی *miR2102-5p* نسبت به گونه اسپانتانئوم در شرایط شاهد و زمان صفر (آزمون دانکن در سطح 5 درصد)

همچنین، ارتباط مستقیم بین میکروRNAها و پاسخ به تنش‌های محیطی نیز شناخته‌شده است (Allen *et al*., 2005). در این تحقیق نیز بیان miRNAهای مورد بررسی در ژنوتیپ مقاوم به خشکی از میزان بالاتری برخوردار بود که مهر تأییدی بر به‌کارگیری این miRNAها توسط ژنوتیپ‌های مقاوم در برابر تنش خشکی می‌باشد. یکی از نقش‌های این miRNAها در مواجهه با تنش به تأثیر آن‌ها بر فاکتورهای رونویسی می‌باشد، بیشتر فاکتورهای رونویسی که توسط miRNAها کنترل می‌شوند، در بسیاری از فرایندهای پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (Khraiwesh *et al*., 2012). لازم به ذکر است که بیان miRNAها نه‌تنها در شرایط مختلف، بلکه در گیاهان مختلف نیز متفاوت است (Kong *et al*., 2010).

REFFERENCES

Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. Cell, 121(2): 207-221.

Audic S, Claverie J-M (1997) The significance of digital gene expression profiles. Genome research 7 (10): 986-995

Bakhshi B, Bihamta M, Mohseni Fard A, Tohid Far M (2014) Comprehensive review of the expression of miRNAs in response to abiotic stresses. The first international congress and thirteenth Iranian Congress of Genetics, Tehran, Iran's Genetics Society.

Barati M, Majidi MM, Safari M, Mirlohi A, Zeinalinejad KH (2017) Evaluation of Drought Tolerance Indices and Physiological Traits in Cultivated and Wild Barley. Journal of Crop Production and Processing, 7(2):1-18.

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

Ding Y, Tao Y, Zhu C (2013) Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. J.

exp. botany, 64(11): 3077-3086.
FAO (2018) Food and Agriculture Organization of the United Nations.
Guleria P, Yadav SK (2011) Identification of miR414 and expression analysis of conserved miRNAs from *Stevia rebaudiana*. Genomics Proteomics Bioinf. 9(6): 211-217.
Hackenberg M, Gustafson P, Langridge P, Shi BJ (2015) Differential expression of micro RNA s and other small RNA s in barley between water and drought conditions. Plant Biotechnol. J. 13(1): 2-13.
Hsieh CH, Chen WM, Hsieh YS, Fan YC, Yang PE, Kang ST, Liao CT (2018) A Novel Multi-Gene Detection Platform for the Analysis of miRNA Expression. Scientific reports, 8(1), p.10684.
Jaiswal S, Iquebal MA, Arora V, Sheoran S, Sharma P, Angadi UB, Dahiya V, Singh R, Tiwari R, Singh GP, Rai A (2019) Development of species specific putative miRNA and its target prediction tool in wheat (*Triticum aestivum* L.). Scientific reports, 9(1), p.3790.
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. Funct. Integr. Genomics. 10(4): 493-507.
Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. Bioch. Bioph. Acta (BBA)-Gene Regul. Mechan. 1819(2):137-148.
Kim JC, Lee SH, Cheong YH, Yoo CM, Lee SI, Chun HJ, Yun DJ, Hong JC, Lee SY, Lim CO, Cho MJ (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. The Plant J. 25(3): 247-259.
Kong Y, Elling AA, Chen B, Deng X (2010) Differential expression of microRNAs in maize inbred and hybrid lines during salt and drought stress. Am. J. Plant Sci. 1(02): 69-76.
Kuhkan Sh, Lak M, Yousefi A, Lak I, Fallahi H, Barati A, Akbari H, Rostami H, Jahanbin A, Kekha Gh (2011) Nimrooz, A New Barley Cultivar for Sistan and Warm Areas of Southern Provinces of Iran. Seed and Plant Improv J. 4(1): 727-728
Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP (2003) Vertebrate microRNA genes. Sci. 299(5612): 1540-1540.
Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. Rna, 14(5): 836-843.
Masoudi-Nejad A, Tonomura K, Kawashima S, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo T, Goto S (2006) EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. Nucleic Acids Res. 34: 459-462.
Mohseni Fard EM, Bakhshi B, Keshavarznia R, Nikpay N, Shahbazi M, Salekdeh GH (2017) Drought responsive microRNAs in two barley cultivars differing in their level of sensitivity to drought stress. Plant Physiol. Biochem. 118:121-129.
Numnark S, Mhuantong W, Ingsriswang S, Wichadakul D (2012) C-mii: a tool for plant miRNA and target identification. BMC genomics. 13(7): 120-137.
Ozhuner E, Eldem V, Ipek A, Okay S, Sakcali S, Zhang B, Boke H, Unver T (2013) Boron stress responsive microRNAs and their targets in barley. PloS one, 8(3): e59543.
Sharma D, Tiwari M, Lakhwani D, Tripathi RD, Trivedi PK (2015) Differential expression of microRNAs

by arsenate and arsenite stress in natural accessions of rice. *Metallomics*, *7*(1): 174-187.

Soleimani A, Valizadeh M, Darvishzadeh R, Aharizad S, Alipour H (2017) Evaluation of Yield and Yield Component of Spring Barely Genotypes under Late Season Drought Stress. Journal of Crop Breeding. 9(23): 105-106

Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant methods, 3(1): 1-12.

Wang Y, Makedon FS, Ford JC, Pearlman J (2004) HykGene: a hybrid approach for selecting marker genes for phenotype classification using microarray gene expression data. Bioinformatics, 21(8): 1530-1537.

Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC (2005) Expression of Arabidopsis MIRNA genes. Plant physiol. 138(4): 2145-2154.

Yin ZJ, Shen FF (2010) Identification and characterization of conserved microRNAs and their target genes in wheat (*Triticum aestivum*). Genet. Mol. Res. 9(2):1186-1196.

Zhang BH, Pan XP, Wang Q, Cobb GP, Anderson TA (2006) Computational identification of microRNAs and their targets. Comput. Biol. Chem. 30: 395-407.

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. 4(2): 585-590.