

مقایسه تغییرات بیانی تعدادی از miRNAها در گیاهچه‌ی گندم

حسین سماواتیان¹، بهرام محمد سلطانی^{2*}، رحیم مهربانی³، مجید صادقی زاده⁴، حسین نادری منش⁵

1- استادیار پژوهش بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

2- دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3- دانشیار پژوهش موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

4- استاد گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

5- استاد گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* تهران، صندوق پستی 111-14115

soltanib@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/5/22 پذیرش مقاله: 94/8/10)

چکیده - miRNAها گروه جدیدی از ژن‌های تنظیمی هستند که بیان ژن‌های هدف را در یوکاریوت‌ها کنترل می‌کنند. در تحقیق حاضر، تغییرات بیانی پنج miRNA شامل *tae-miR156*، *tae-miR159*، *tae-miR167*، *miR171* و *tae-miR393* که در پاسخ به بیمارگرها نقش دارند، در روند رشد برگ گیاهچه‌ی گندم رقم Taichung 29 بررسی شد. از آنجا که گیاهچه 10 تا 20 روزه گندم در تحقیقات واکنش گیاه به بیمارگرها مورد استفاده قرار می‌گیرد، هدف پژوهش حاضر بررسی تغییرات بیانی این miRNAها در دوره زمانی مذکور و بصورت مستقل از بیماری است. ابتدا گندم در شرایط گلخانه کشت و 10، 11، 13، 17 و 20 روز پس از کاشت، برگ گندم‌ها برای استخراج RNA و سنتز cDNA استفاده شد. سپس تغییرات بیانی miRNAها با روش qRT-PCR بررسی شد. بررسی‌ها افزایش بیان *tae-miR156* و *tae-miR159* را تا روز هفدهم رشد و سپس کاهش شدید را نشان می‌دهند. از طرفی بیان *tae-miR167* و *tae-miR393* و *tae-miR171* روندی افزایشی را از حوالی روز 13 رشد نشان می‌دهند. این نتایج پیشنهاد می‌کند که در فاصله زمانی روزهای 13 تا 17 تغییرات بنیادین فیزیولوژیکی در گندم رقم Taichung 29 در حال وقوع است که متأثر از نحوه عمل miRNAهاست. از آنجا که عمده اهداف ژنی این miRNAها ناشناخته هستند، تحلیل این تغییرات تنها بر اساس محدود اهداف شناخته شده، پیشنهادکننده تطابق تغییرات بیانی این miRNAها و اهدافشان در مسیرهای پیام‌رسانی، به‌ویژه مسیر اکسین می‌باشد. همچنین، با توجه به الگوی حفاظت شدگی توالی‌های پیش‌ساز miRNAها، کد شدن miRNAهای کارآمد توسط پیش‌سازهای *tae-miR156*، *tae-miR393*، *tae-miR159* نیز پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژگان: miRNA، اکسین، گندم، Taichung 29.

1- مقدمه

زمین‌های زراعی جهان را به خود اختصاص داده و بیشترین ارزش تجاری را در بین محصولات کشاورزی جهان دارد. از لحاظ ژنتیکی، گندم گیاهی هگزاپلوئید است که ژنوم آن حدود

گندم (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, AABBDD) با سطح زیر کشت حدود 240 میلیون هکتار، 17 درصد

به‌وسیله دو برش توسط آنزیم DCL1 از یک رشته بزرگتر RNA که دارای ساختار ساقه-حلقه (stem-loop) بوده و پیش‌ساز (pre-miRNA) نامیده می‌شود تشکیل شده، و ساختار* duplex miRNA:miRNA را بوجود می‌آورد. سپس، miRNA می‌بالغ با کمپلکس RISC تلفیق شده و با ایجاد جفت باز با mRNA ژن هدف، آن را برش داده و یا از ترجمه آن جلوگیری می‌نماید [12]. توالی miRNAهای گیاهی عموماً با توالی ژن هدف از جفت‌شدگی بالایی (نزدیک به کامل) برخوردار است. در حالیکه در خصوص miRNAهای جانوری این جفت‌شدگی ضعیف‌تر است [13، 14]. miRNAهای گیاهی بصورت درون‌زاد در سلول ایجاد می‌شوند و در تنظیم رشد، گل‌دهی، تمایز مریستم، پاسخ به نور، مرفولوژی برگ، تشکیل ریشه، پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده و بسیاری از فرایندهای سلولی نقش آفرینی می‌نمایند [15]. در گیاهان اغلب ژن‌های miRNA در مناطق بین ژنی ایجاد شده و تعداد معدودی از آنها در مناطق آگزونی و اینترونی دیده می‌شوند و رونویسی آنها بصورت انفرادی از محل خودشان انجام می‌گیرد، اما تعداد کمی از آنها در یک مجموعه ژنی و بصورت مشترک از یک پروموتور برای رونویسی استفاده می‌کنند [16-18].

تحقیقات متعدد بیانگر این است که تعدادی از miRNAها در تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی هورمون‌های اکسین، جیبرلین، اسید آبسزیک نقش دارند [11]. به عنوان مثال miR167 و miR393 در تنظیم مسیر پیام‌دهی اکسین و آبسزیک اسید و miR159 در تنظیم مسیر پیام‌دهی اسید جیبرلین و آبسزیک اسید نقش دارند [6، 11، 19]. گزارش‌ها حاکی از تأثیر miR159 بر اعضای خانواده ژنی فاکتور رونویسی MYB، مسیر پیام‌دهی اسید جیبرلین و آبسزیک اسید است [11]. همچنین، miR167 با هدف قرار دادن ژن‌های خانواده Auxin Response Factor (ARF) مسیر پیام‌دهی اکسین را کنترل می‌نماید [20، 4].

پژوهش حاضر با هدف بدست آوردن اطلاعات پایه در خصوص تغییرات بیانی tae-miR156، tae-miR159، miR167، tae-miR171 و tae-miR393 در بازه زمانی مورد استفاده در تحقیقات مرتبط با تنش‌ها انجام گرفت. این

16000 Mbp برآورد گردیده که در مقایسه با ژنوم برنج با 430 Mbp و ذرت با حدود 2500 Mbp وسعت بیشتری برخوردار است [1].

گیاهان توان بالایی در زمینه رشد و نمو، متابولیسم و پاسخ‌دهی به عوامل تنش‌زای محیطی (همچون سرما و شوری) و تنش‌های زنده نظیر قارچ‌ها دارند. رشدونمو و پاسخ به تنش‌ها در گیاهان از طریق چندین تنظیم‌کننده رشد که هورمون نام دارند، تنظیم می‌شود. از جمله این هورمون‌ها می‌توان به آبسزیک اسید، جیبرلین و اکسین اشاره نمود [2، 3]. هورمون اکسین دارای نقش مهم و کلیدی در بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاه است که از طریق تأثیر بر نسخه‌برداری ژن‌ها این نقش را اعمال می‌کند [4]. همچنین هورمون جیبرلین در بسیاری از فرایندهای رشد و نمو گیاه همچون رشد و نمو برگ نقش کلیدی ایفا می‌نماید [5]. اسید آبسزیک نیز نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های محیطی دارد [6]. به عنوان مثال در شرایط کمبود آب نقش مهمی را در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش و بستن روزنه‌ها جهت حفظ آب سلول‌های گیاه دارد. همچنین، سطح آبسزیک اسید در سلول در پاسخ به تنش‌های زنده افزایش می‌یابد و به دنبال آن توقف رشد و نمو گیاه را موجب می‌گردد [۷، ۸]. کاهش رشد سلولی یک شاخص مهم سازگاری برای نجات گیاه در شرایط تنش محسوب می‌شود و انرژی و توان گیاه را به سمت مقابله با تنش سوق می‌دهد [9]. مسیرهای پیام‌رسانی این هورمون‌ها به وسیله بسیاری از تنظیم‌کننده‌های مثبت و منفی در طی روند رشد و نمو و پاسخ به تنش‌ها کنترل می‌شود [10]. از این رو شناخت مسیرهای پیام‌دهی (signaling pathways) مؤثر در رشدونمو و متابولیسم گیاه و عوامل ژنی تنظیم‌کننده و تأثیرگذار روی این مسیرها اهمیت خاصی دارد. در سال‌های اخیر، اهمیت miRNAها، با کشف نقش آنها در تنظیم بسیاری از فرایندهای سلولی مورد توجه قرار گرفته است. miRNAها دسته جدیدی از ژن‌های تنظیمی غیر کدکننده در یوکاریوت‌ها هستند که عموماً حدود 18-24 نوکلئوتید طول داشته و بیان ژن‌های هدف را از طریق برش در mRNA و یا جلوگیری از ترجمه آنها تنظیم می‌کنند. در گیاهان، مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی نیز توسط تعدادی از miRNAها تنظیم می‌شوند [11]. miRNAهای بالغ در گیاهان

تمام RNA های استخراج شده تا زمان استفاده در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کیفیت RNA های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز 1 درصد، و غلظت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفومتر اندازه‌گیری شد. حذف آلودگی احتمالی DNA در نمونه‌های RNA استخراج شده، با تیمار آنزیم DNaseI (Fermentas) به مدت 30 دقیقه در 37 درجه سانتی‌گراد انجام شد. غیرفعال نمودن بقایای آنزیم DNaseI با استفاده از دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه انجام شد. به منظور سنتز cDNA، ابتدا به 1 µg از RNA مورد نظر، توالی پلی A به انتهای RNA های بدون توالی پلی A اضافه گردید. برای این کار بافر و آنزیم پلی A پلیمرز به همراه ATP طبق دستورالعمل شرکت Neb به RNA مورد نظر اضافه و با آب DEPC به حجم مورد نظر رسانده شد و سپس در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 دقیقه جهت انجام واکنش نگهداری شد. سپس پرایمر اختصاصی Anchored-Oligo-dT به میزان 2 µl اضافه و در 65 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه نگهداری شد و بلافاصله یال‌ها به طرف یخ منتقل شد. در مرحله بعدی بافر و آنزیم Reverse Transcriptase (RT) طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز، dNTPs استفاده و با آب DEPC به حجم مورد نظر رسانده شد و سپس در دمای 42 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 دقیقه قرار داده شد و در نهایت به منظور غیر فعال کردن واکنش نمونه در دمای 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه قرار داده شد.

کیفیت cDNA سنتز شده با استفاده از بارگذاری آن روی ژل آگارز 2 درصد و همچنین استفاده از پرایمرهای کنترل داخلی U6 انجام و با RT-PCR بررسی شد.

5-2- آغازگرهای مورد استفاده

در این پژوهش از آغازگر Anchored-Oligo-dT برای سنتز cDNA و از آغازگر برگشت عمومی (Universal) که به ناحیه Anchor بروی توالی Anchored-Oligo-dT متصل می‌شود، استفاده شد. توالی این آغازگرها و همچنین آغازگرهای اختصاصی miR-156، miR-159، miR-167، miR-171، miR-393 و miR-U6 گندم در جدول 1 نشان داده شده است. برای طراحی آغازگرهای مورد استفاده از نرم‌افزارهای IDT primer3، oligoanalyzer و primer blast استفاده شد.

miRNA نقش خود را از طریق تأثیر بر مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی ایفا می‌نمایند. نتایج به دست آمده بیانگر الگوی بیان متفاوت miRNA ها طی روزهای منتخب مورد بررسی و هماهنگ با ژن‌های هدف پیش بینی شده آن‌ها در تحقیقات پیشین می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- نحوه انتخاب miRNA ها:

miRNA های مورد استفاده در این پژوهش بر اساس تحقیقات انجام گرفته روی تغییرات بیانی آن‌ها در تعدادی از پاتوسیستم‌های دیگر گندم، حفاظت شدگی در گیاهان، پاسخ به استرس‌های زنده و غیر زنده، نقش در مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی، اثبات وجود آن‌ها از طریق Northern blot و RT-PCR و پایگاه اطلاعاتی miRBase (<http://mirbase.org>) انتخاب گردیده است.

2-2- بررسی حفاظت شدگی miRNA ها

برای انجام هم‌ردیفی taе-miR156، taе-miR159، taе-miR167، taе-miR171 و taе-miR393 به منظور بررسی حفاظت شدگی آن‌ها در تعدادی از گیاهان تک لپه و دو لپه، ابتدا توالی پیش‌ساز هر کدام از miRNA ها با استفاده از پایگاه اطلاعاتی miRBase بدست آمد و سپس با روش ClustalW و نرم‌افزار MEGA6 هم‌ردیفی روی پیش‌سازها انجام شد.

2-3- کشت و نمونه‌برداری

در این پژوهش رقم گندم Taichung 29 در شرایط گلخانه با دمای 20 ± 2 °C و خاک سترون در گلدان کشت گردید. نمونه‌برداری از برگ گیاهچه‌ها 10، 11، 13، 17 و 20 روز پس از کاشت انجام گردید. پس از نمونه‌برداری، برگ‌ها بلافاصله در ازت مایع منجمد شده و در فریزر 80- تا زمان استخراج RNA نگهداری گردید.

2-4- استخراج RNA و سنتز cDNA تک رشته‌ای

به منظور استخراج RNA برگ‌ها درهاون استریل با استفاده از ازت مایع پودر شدند. استخراج RNA کل از نمونه‌ها با استفاده از تریزول و طبق دستورالعمل شرکت invitrogen انجام شد.

2-6- بیان miRNAها

بیان miRNAها با استفاده از تکنیک qRT-PCR و با دستگاه (Applied Biosystems, Foster ABI Step One7500 City CA, USA) اندازه‌گیری شد. در هر آزمایش دو تکرار برای هر نمونه در نظر گرفته شد، و هر آزمایش نیز دو بار تکرار شد. حجم نهایی هر واکنش 15 میکرولیتر بود، که در آن 1 میکرولیتر از cDNA الگو، 3 میکرولیتر از Evagreen، 0/2 میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت 10 پیکو مولار و 10/8 میکرولیتر از آب دو بار تقطیر سترون استفاده شد. این واکنش برای 45 سیکل در شرایط دمایی 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 ثانیه، 53 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 ثانیه و 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه انجام شد. بلافاصله برای آزمون عملکرد اختصاصی واکنش qRT-PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی 0/3 درجه سانتی‌گراد در هر چرخه بین دمای 60-95 درجه سانتی‌گراد رسم شد. به منظور اطمینان مجدد از اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده، محصولات qRT-PCR بدست آمده در داخل ناقل TA (pTG19-T) کلون شد و سپس توالی‌یابی برای آن‌ها انجام گرفت. برای نرمال‌کردن مقدار RNA استفاده شده در نمونه‌ها از ژن U6 به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد.

2-7- آنالیز داده‌ها

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار اندازه‌گیری شد. از t-test برای مقایسه داده‌ها بین نمونه‌ها استفاده شد. سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان ژن مورد نظر در نمونه مورد آزمایش نسبت به نمونه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. تحلیل آماری با استفاده از آزمون آماری t-test و بر اساس سطح معنی‌داری $p < 0/05$ انجام شد. در این پژوهش روز دهم

پس از کاشت به عنوان روز شاهد در نظر گرفته شد.

3- نتایج**3-1- پیش‌بینی امکان تولید *miR کارآمد توسط****برخی پیش‌سازهای miRNAهای گندم**

پس از هم‌ردیفی توالی‌های پیش‌ساز miRNAهای مورد مطالعه در گیاهان مختلف، مشخص شد که توالی ناحیه miRNA بالغ در گیاهان مختلف از حفاظت شدگی بالایی برخوردار است و این در حالی است که دیگر قسمت‌های پیش‌ساز miRNAها، حفاظت شدگی متفاوتی را نشان می‌دهند. miR156 در ناحیه 5p ساختار پیش‌ساز قرار گرفته و کاملاً حفاظت شده می‌باشد ولی قسمت مکمل آن که در 3p پیش‌ساز قرار گرفته نیز از حفاظت شدگی خوبی برخوردار است. بنابر این احتمال تولید یک *miR و یا به عبارتی miR156-3p کارآمد وجود دارد. در خصوص miR159 که در قسمت 3p پیش‌ساز قرار گرفته، و با توجه به حفاظت شدگی نسبتاً خوبی که در ناحیه مکمل آن مشاهده می‌گردد، پیشنهاد وجود miR159-5p را می‌توان ارایه نمود. miR167 که در قسمت 5p پیش‌ساز قرار گرفته در بین گونه‌های گیاهی حفاظت شده می‌باشد ولی در ناحیه 3p حفاظت شدگی نداشته و احتمال وجود miRNA در ناحیه 3p خیلی ضعیف است. miR171 در قسمت 3p ساختار پیش‌ساز قرار گرفته و در گیاهان تک لپه و دو لپه کاملاً حفاظت شده می‌باشد در حالی که در قسمت مکمل آن حفاظت شدگی کمی مشاهده می‌شود و لذا احتمال حضور miRNA در ناحیه مکمل آن ضعیف است.

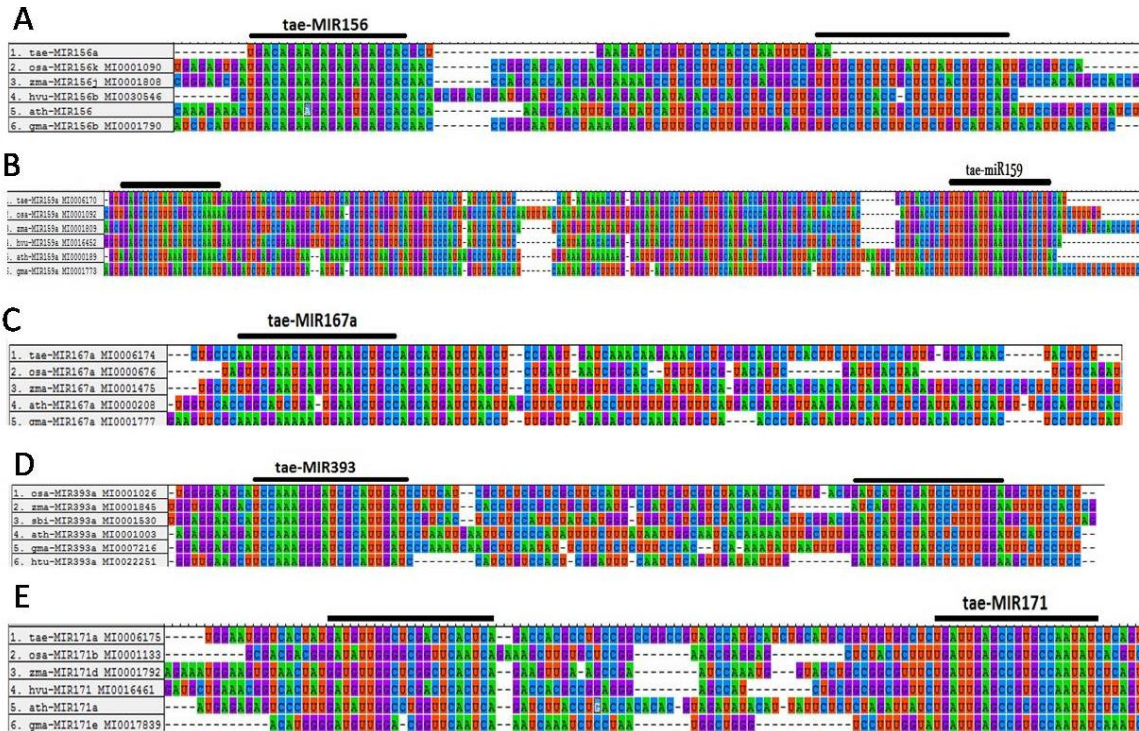
جدول 1 توالی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش

نام آغازگر	توالی
miR156	5'-TGACAGAAGAGAGTGAGCAC-3'
miR159	5'-TTTGGATTGAAGGGAGCTC-3'
miR167	5'-TGAAGCTGCCAGCATGATCT-3'
miR171	5'-TGATTGAGCCGCGCCAATA-3'
miR393	5'-TCCAAAGGGATCGCATTGATC-3'
U6	5'-GGGACATCCGATAAAATT-3'
Universal Anchored-Oligo-dT	5'-AACTCAAGGTTCTTCCAGTCACG-3' 5'-GCGTGCAGTACTACAAGGTTCTTCCAGTCACGACG TTTTTTTTTTTTTTTTTT(v)-3'

2-3- بررسی بیان miRNAهای منتخب در گندم

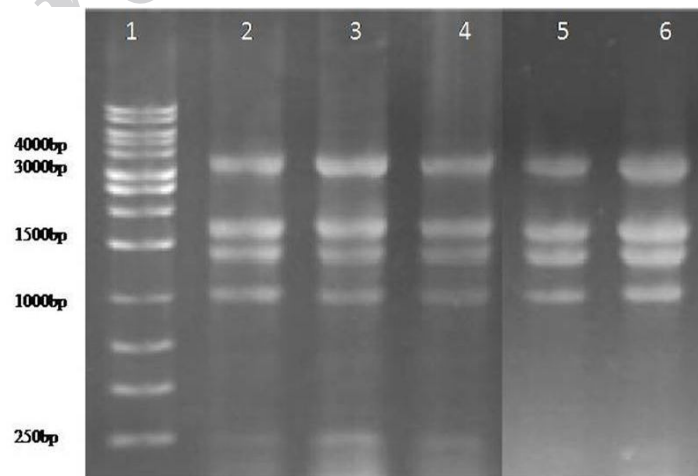
رقم گندم 29 Taichung از معروفترین ارقام گندم در کشاورزی و تحقیقات مربوط به آن است. بنابراین، 10، 11، 13، 17 و 20 روز پس از کاشت این رقم گندم، RNA نمونه‌ها استخراج و روی ژل آگارز یک درصد تعیین کیفیت و توسط دستگاه اسپکترومتری تعیین کمیت شد (شکل 2).

حضور miR393 در ناحیه 5p پیش‌ساز و حفاظت شدگی کامل در گیاهان مورد بررسی مشاهده شد. miR* مربوط به miR939 در ناحیه 3p نیز از حفاظت شدگی بالایی برخوردار است که می‌توان وجود یک miR939-3p کارآمد را پیشنهاد نمود (شکل 1).



شکل 1 هم‌ردیفی پیش‌ساز tae-miR171، tae-miR393، tae-miR167، tae-miR159، tae-miR156 در برخی از گیاهان.

A- هم‌ردیفی tae-miR156، B- هم‌ردیفی tae-miR159، C- هم‌ردیفی tae-miR167، D- هم‌ردیفی tae-miR393، E- هم‌ردیفی tae-miR171



شکل 2 RNA استخراج شده از بافت برگ گندم 29 Taichung و بارگذاری شده روی ژل 1% آگارز

1- Ladder 1kb -2 نمونه روز ده 3- نمونه روز یازده 4- نمونه روز سیزده 5- نمونه روز هفده 6- نمونه روز بیست

گیاهی فاکتورهای رونویسی هستند که نقش مهمی در تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی سلولی دارند [21]. ویژگی اصلی و مهم miRNAهای گیاهی، توانایی آنها در خاموش کردن فاکتورهای رونویسی است [22]. در طی فرایند تکامل بعضی از ژن‌ها به صورت حفاظت شده باقی مانده‌اند که از اهمیت نقش آنها حکایت می‌کند. miRNAهای مورد بررسی در این پژوهش از حفاظت شدگی بالایی در گیاهان برخوردار هستند که با توجه به نقش این miRNAها در کنترل فاکتورهای رونویسی و مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی این حفاظت شدگی توجیه می‌شود (شکل 1). الگوی حفاظت شدگی miRNAهای مورد مطالعه به گونه‌ای است که پیش‌ساز برخی از آنها نظیر miR159 و miR393 دارای حفاظت شدگی گسترده‌ای در دو ناحیه حدود 20 نوکلئوتیدی miRNA و miR* هستند در حالی که سایر miRNAهای مطالعه شده چنین ویژگی حفاظت شدگی را در توالی پیش‌ساز دارا نیستند. این ویژگی پیشنهاد می‌کند که احتمالاً miR*های کارآمدی برای miR159 و miR393 وجود دارد که هنوز ناشناخته هستند.

نتایج بررسی بیان miRNAها در مطالعه حاضر نشان داد که بیان tae-miR156 و tae-miR159 تا 13 روز پس از کشت نسبتاً ثابت بوده و سپس از روز 13 تا 17 افزایش بیان شدیدی داشته‌اند. این در حالیست که طی روزهای 17 تا 20 روند کاهشی شدیدی را نشان می‌دهند. اختلاف میزان بیان بخصوص در روزهای 17 و 20 بین این دو miRNA مشهود است (شکل‌های 3-A, B). از روی این اطلاعات، بنظر میرسد روز هفدهم رشد گندم رقم Taichung 29 دارای تغییرات بنیادینی است که احتمالاً توسط miRNAهای tae-miR156 و tae-miR159 متاثر میشود. از این رو، بررسی بیان اهداف ژنی این دو miRNA در حوالی روز 17 رشد اهمیت می‌یابد.

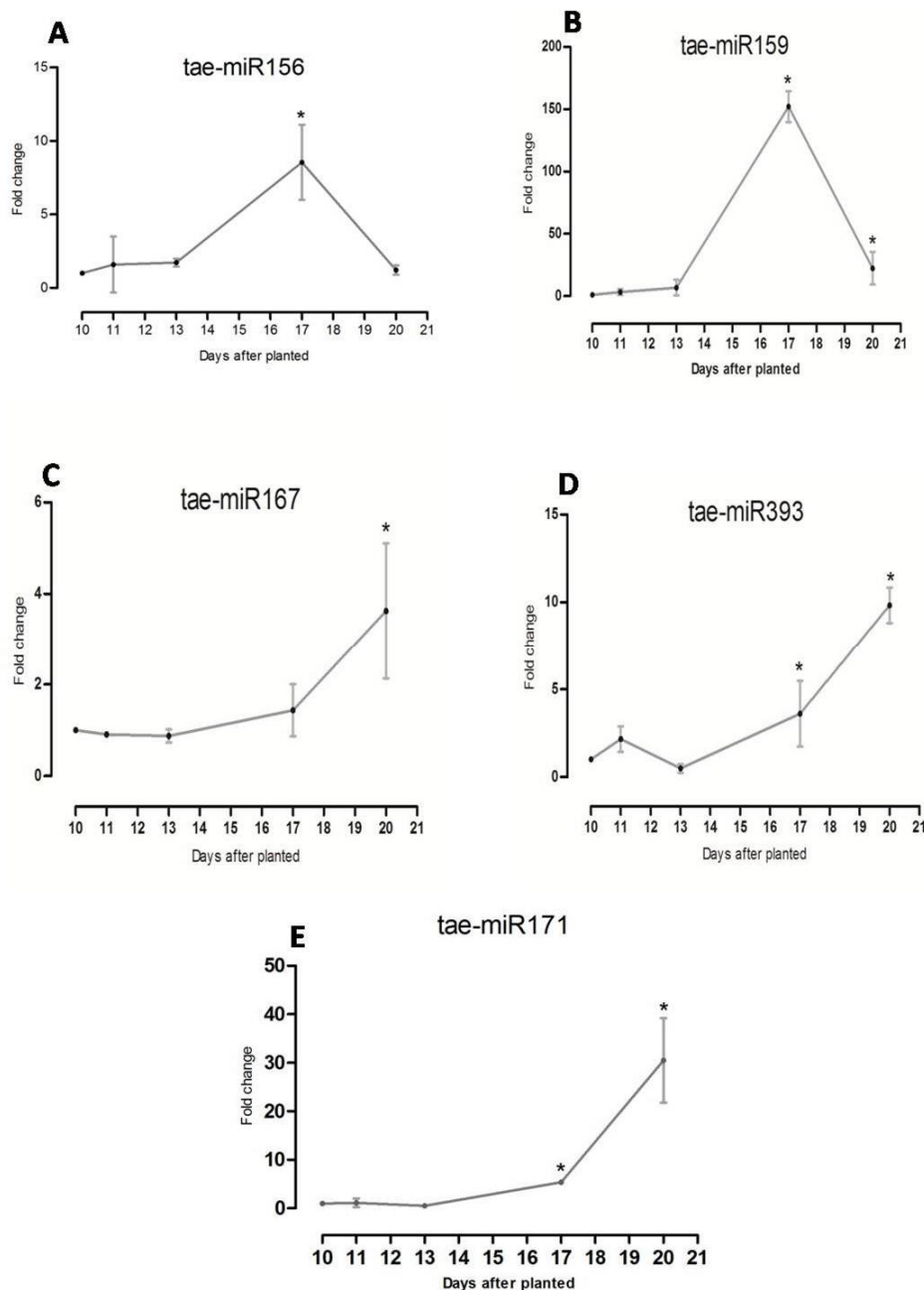
miR156 تغییرات بیانی ویژه‌ای در شرایط مختلف دارد مثلاً، در آلودگی با قارچ عامل سفیدک سطحی گندم *Erysiphe graminis f. sp. tritici* کاهش بیان نشان داده و در مقابل تنش حرارت افزایش بیان داشته است [23]. در تحقیقی دیگر ژن‌های هدف آن، تولید کننده پروتئین‌های مقاومت به بیماری‌های گیاهی یعنی NBS-LRR proteins معرفی شده‌اند [24].

پس از انجام واکنش qRT-PCR آنالیز داده‌های با استفاده از روش t-test حاکی از آن است که الگوی بیان tae-miR156 تا 13 روز پس از کشت روند نسبتاً ثابت و یکسانی داشته و سپس از روز 13 تا 17 با افزایش بیان روبرو می‌گردد که این افزایش بیان نسبت به اولین روز بررسی در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار است. ولی از روز 17 تا 20 با کاهش مواجه شده به صورتی که در روز 20 به سطح روز 10 یعنی اولین روز بررسی بر می‌گردد (شکل 3-A).

علاوه بر این تجزیه و تحلیل آماری بیانگر بیان تقریباً ثابت tae-miR159 تا 13 روز پس از کاشت است و تغییر محسوسی را در طی این روزها نشان نمی‌دهد، این در حالیست که طی روزهای 13 تا 17 با افزایش بیان شدید مواجه شده و سپس بین روزهای 17 تا 20 روند کاهشی را نشان می‌دهد. بیان روزهای 17 و 20 نسبت به اولین روز بررسی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهند (شکل 3-B). مقایسه الگوی تغییرات بیانی tae-miR156 و tae-miR159 با یکدیگر نشان می‌دهد که هر دو miRNA از روند مشابهی پیروی نموده ولی اختلاف میزان بیان بخصوص در روزهای 17 و 20 مشهود است. الگوی بیان tae-miR167 و tae-miR393 و tae-miR171 در مجموع روند مشابهی را نشان می‌دهند. هر سه miRNA در طول دوره بررسی با افزایش بیان مواجه بوده‌اند، به طوری که tae-miR167 در روز 20 نسبت به اولین روز در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار می‌باشد و tae-miR393 در روزهای 17 و 20 در سطح $p < 0/05$ نسبت به روز 10 معنی‌دار شده است (شکل‌های 3-C, D). میزان بیان tae-miR171 بین روزهای 10 تا 13 روند نسبتاً ثابت و یکسانی داشته و سپس از روز 13 به بعد افزایش بیان نشان می‌دهد. بیان روزهای 17 و 20 نسبت به روز 10 در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار می‌باشد (شکل 3-E).

4- بحث

در سال‌های اخیر مطالعه روی تنظیم‌کننده‌های دخیل در میزان بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسانی هورمونی در گیاهان مورد تحقیق قرار گرفته است. در این میان پژوهش بیشتری بر نقش تنظیمی miRNA انجام گرفته است. اکثر ژن‌های هدف miRNAهای



شکل 3 الگوی تغییرات بیانی taе-miR156, taе-miR159, taе-miR167, taе-miR393, و taе-miR171 در طی روزهای منتخب 10، 11، 13، 17 و 20 روز پس از کاشت گندم رقم Taichung 29. داده‌های هر روز شامل دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تجربی می‌باشد و برای نرمال کردن داده‌های بیانی از کنترل داخلی U6 استفاده گردید، سپس تغییرات بیانی تمامی روزها نسبت به روز دهم سنجیده شد. A - taе-miR156 با افزایش بیان معنی‌دار در سطح معنی‌دار $p < 0.05$ روز 17 - B taе-miR159 با تغییر معنی‌دار در سطح معنی‌دار $p < 0.05$ در روزهای 17 و 20 و C - taе-miR167 با الگوی افزایشی بیان و معنی‌دار روز 20 در سطح معنی‌دار $p < 0.05$ D - taе-miR393 دارای روند افزایشی بیان در روزهای 17 و 20 و معنی‌دار در سطح معنی‌دار $p < 0.05$ E - taе-miR171 با الگوی افزایشی بیان از روز 13 و معنی‌دار در روز 17 و 20 در سطح معنی‌دار $p < 0.05$.

طی روزهای ۱۷، ۱۳، ۱۱، ۱۰ و ۲۰ روز پس از کشت بذر در رقم Taichung 29 از روز 13 الگوی افزایشی نشان می‌دهد. به طوری که روز 20 نسبت به اولین روز مورد بررسی در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار می‌باشد. این موضوع می‌تواند مرتبط با رشد گیاه در شرایط طبیعی و عدم تنش‌های زنده و غیر زنده در دوره رشد رقم مورد بررسی باشد.

miR393 از طریق تأثیر بر گیرنده‌های هورمون اکسین یعنی (TIR1) Transport Inhibitor Response 1 و اعضای خانواده پروتئینی AFB signaling F-Box (AFB) Auxin که خود شامل AFB1، AFB2، AFB3 می‌باشد، مسیر پیام‌دهی اکسین را تحت تأثیر قرار می‌دهد [36، 23]. بیان miR393 در گیاه آراییدوپسیس افزایش مقاومت گیاه را نسبت به باکتری بیماری‌زا به وجود آورد [37]. برای اینکه مسیر پیام‌دهی اکسین پایدار و رشد و نمو گیاه طبیعی باشد، لازم است بیان miR393 متناسب باشد. در گیاه آراییدوپسیس حاوی ژن موتانت miR393، تجمع AUX/IAA رخ داده و برگ‌های گیاه حالت طبیعی و نرمال خود را از دست می‌دهند [38]. در پژوهش حاضر، بیان tae-miR393 در طی روزهای مورد بررسی یک روند افزایشی بوده و در روز بیستم به 10 برابری رسد. همچنین روزهای هفدهم و بیستم نسبت به روز دهم (اولین روز مورد بررسی) اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/05$ نشان می‌دهد. با توجه به گزارش‌های سایر محققان افزایش بیان tae-miR393 در طی روزهای مورد بررسی می‌تواند مرتبط با رشد طبیعی برگ‌های گیاهچه‌های گندم در طی روزهای مورد بررسی در شرایط عادی و بدون تنش باشد [20].

تعدادی از ساز و کارهای مرتبط با رشد و نمو گیاه تحت تأثیر اعضای خانواده فاکتور رونویسی SCARECROW-like (SCL)، به عنوان ژن‌های هدف miR171 قرار دارد [26]، که می‌توان به بیوستز کلروفیل در شرایط روشنائی، تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی اکسین و جیبرالین، نموگل، ریشه و برگ اشاره نمود [40، 39، 26، 15]. تحقیقات زیادی نیز در باره الگوی بیان miR171 در شرایط تنش‌های غیر زنده مثل خشکی، شوری، سرما در گیاهان مختلف (آراییدوپسیس، ذرت، برنج و جو) انجام گرفته که نتایج مختلفی را نشان می‌دهد.

همچنین، فاکتورهای رونویسی Squamosa-Promoter Binding Protein-Like (SPL) از اهداف معرفی شده tae-miR156 هستند که کنترل تعدادی از جنبه‌های اساسی گیاه از جمله تغییر مرحله رویشی به زایشی، زمان گلدهی و رشد، شاخه‌زنی و شروع برگ‌دهی، پاسخ به تنش‌ها و مسیر پیام‌دهی اکسین و جیبرلین را بر عهده دارند [26، 25]. ولی هنوز مجموعه اهداف ژنی این miRNA کاملاً شناسایی نشده‌اند و نمی‌توان با قطعیت نحوه اثر miRNA مذکور را در گیاه بررسی نمود.

ژن‌های GAMYB بخشی از اهداف ژنی miR159 معرفی شده‌اند [27]. برای مثال، ژن‌های GAMYB در غلات و آراییدوپسیس در بافت پرچم و بذور بیان بالایی دارند در حالی که تجمع و بیان miR159 کم است. همچنین، بیش بیان miR159 در برنج باعث کاهش OsGAMYB در طی گل‌دهی و ناهنجاری در آن شد [28]. از سوی دیگر miR159 و تعدادی دیگر از miRNAها از طریق فاکتورهای رونویسی خانواده MYB در تنظیم مسیرهای پیام‌دهی جیبرلین و آبسزیک اسید نقش بازی می‌کنند [11]. با توجه به گستردگی اهداف ژنی miR159 و نقش آن در تنظیم بسیاری از فعالیت‌های گیاه از جمله در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده، تحلیل تغییرات بیانی این miRNA طی دوره زمانی مورد آزمایش بسیار مشکل است.

الگوی تغییرات بیانی tae-miR167 و tae-miR393 و tae-miR171 در بازه زمانی مورد بررسی شبیه هم بوده و هر سه miRNA یک الگوی افزایش بیان را در طی روزهای مورد بررسی نشان می‌دهند (شکل‌های 3-C، D، E). در این خصوص روز 17 بحرانی‌ترین روز تغییرات بیانی miRNAهای مورد مطالعه است. فاکتورهای رونویسی ARFs ژن‌های هدف شناخته شده miR167 هستند. مطالعات متعدد نشان می‌دهد، که miR167 بر مسیر پیام‌دهی اکسین [30، 29، 20] و اسید آبسزیک در زمان تنش‌های زنده و غیر زنده (شوری، حرارتی، سرما) تأثیر دارد [32، 31، 23]. علاوه بر این، تحقیقات حاکی از نقش مهم و کلیدی miR167 در پاسخ به تنش خشکی می‌باشد [33-35]. نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که الگوی بیانی tae-miR167

- [4] Hagen G, Guilfoyle T: Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors. *Plant molecular biology* (2002) **49**(3-4):373-385.
- [5] Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N: Gibberellins and abscisic acid signal crosstalk: Living and developing under unfavorable conditions. *Plant cell reports* (2013) **32**(7):1007-1016.
- [6] Wang L, Hua D, He J, Duan Y, Chen Z, Hong X, Gong Z: Auxin response factor2 (arf2) and its regulated homeodomain gene hb33 mediate abscisic acid response in arabidopsis. *PLoS Genet* (2011) **7**(7) : e1002172.
- [7] Wilkinson S, Davies WJ: Aba-based chemical signalling: The co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, cell & environment* (2002) **25**(2):195-210.
- [8] Reyes JL, Chua NH: Aba induction of mir159 controls transcript levels of two myb factors during arabidopsis seed germination. *The Plant Journal* (2007) **49**(4):592-606.
- [9] Chaves M, Oliveira M: Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. *Journal of experimental botany* (2004) **55** (407):2365-2384.
- [10] Huq E: Degradation of negative regulators: A common theme in hormone and light signaling networks? *Trends in plant science* (2006) **11**(1):4-7.
- [11] Liu Q, Chen Y-Q: Insights into the mechanism of plant development: Interactions of mirnas pathway with phytohormone response. *Biochemical and biophysical research communications* (2009) **384**(1):1-5.
- [12] Bartel DP, Chen C-Z: Micromanagers of gene expression: The potentially widespread influence of metazoan micrnas. *Nature Reviews Genetics*.(2004) **5**(5) :396-400.
- [13] Millar AA, Waterhouse PM: Plant and animal micrnas: Similarities and differences. *Functional & integrative genomics* (2005) **5**(3):129-135.
- [14] Axtell MJ, Westholm JO, Lai EC: Vive la difference: Biogenesis and evolution of micrnas in plants and animals. *Genome Biol* (2011) **12**(4):221.
- [15] Eldem V, Okay S, Unver T: Plant micrnas: New players in functional genomics. *Turk J Agric For* (2013) **37**(1):1-21.

برای مثال تنش شوری و خشکی در ذرت و برنج باعث کاهش بیان miR171 گردیده است [41,42]. در مطالعه دیگری بیان برخی از اعضای خانواده miR171 کاهش و برخی افزایش یافته است [43]. بیان miR171 در شرایط تنش های سرما، خشکی و شوری در آرابیدوپسیس افزایش یافته است [35]. نتایج متفاوت بدست آمده از بیان miR171 می تواند از تفاوت در گیاه، شرایط انجام آزمایش، نوع بافت، شدت تنش و نوع تنش باشد [6].

5- نتیجه گیری

miRNAهای مطالعه شده در پژوهش حاضر دارای الگوی بیان افزایشی بعد از 17 روز و یا افزایش بیان پیش از روز 17 و سپس کاهش بیان بوده اند. تحقیق حاضر محدود به روز 17 حیات گیاه گندم را دارای اهمیت تغییرات بیانی miRNAها مورد مطالعه در این پژوهش و اهداف ژنی آنها معرفی می نماید.

6- سپاسگزاری

بدینوسیله از کمک های آقایان علی فصیحی، حامد دبیری و هادی نجفی در آنالیز داده ها تشکر و قدردانی می شود. این تحقیق توسط دانشگاه تربیت مدرس (TMU) و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) حمایت مالی شده است.

7- منابع

- [1] Gill BS, Appels R, Botha-Oberholster A-M, Buell CR, Bennetzen JL, Chalhoub B, Chumley F, Dvořák J, Iwanaga M, Keller B: A workshop report on wheat genome sequencing international genome research on wheat consortium. *Genetics* (2004) **168**(2):1087-1096.
- [2] Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E: Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and molecular biology of plants* (2000) **1158**:e1203.
- [3] Gray WM: Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS biology* (2004) **2** (9) 1270-1273.

- :e48445.
- [28] Alonso-Peral MM, Li J, Li Y, Allen RS, Schnippenkoetter W, Ohms S, White RG, Millar AA: The microRNA159-regulated gamyb-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in arabidopsis. *Plant Physiology* (2010) **154**(2):757-771.
- [29] Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC: Repression of auxin response factor10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal* (2007) **52**(1):133-146.
- [30] 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: Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS letters* (2009) **583**(4):723-728.
- [31] Lu W, Li J, Liu F, Gu J, Guo C, Xu L, Zhang H, Xiao K: Expression pattern of wheat mirnas under salinity stress and prediction of salt-inducible mirnas targets. *Frontiers of Agriculture in China* (2011) **5**(4):413-422.
- [32] Tang Z, Zhang L, Xu C, Yuan S, Zhang F, Zheng Y, Zhao C: Uncovering small rna-mediated responses to cold stress in a wheat thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing. *Plant physiology* (2012) **159**(2):721-738.
- [33] Barrera-Figueroa BE, Gao L, Wu Z, Zhou X, Zhu J, Jin H, Liu R, Zhu J-K: High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress-regulated microRNAs in the inflorescences of rice. *BMC plant biology* (2012) **12**(1):132.
- [34] Li H, Dong Y, Yin H, Wang N, Yang J, Liu X, Wang Y, Wu J, Li X: Characterization of the stress associated microRNAs in glycine max by deep sequencing. *BMC plant biology*.170 :(1) 11 (2011).
- [35] Liu H-H, Tian X, Li Y-J, Wu C-A, Zheng C-C: Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in arabidopsis thaliana. *Rna* (2008) **14**(5):836-843.
- [36] Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD: A plant mirna contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* (2006) **312**(5772):436-439.
- [37] Shukla LI, Chinnusamy V, Sunkar R: The role of microRNAs and other endogenous small RNAs
- [16] Bartel DP: MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell* (2004) **116** (2) :281-97.
- [17] He L, Hannon GJ: MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* (2004) **5**(7):522-531.
- [18] Voinnet O: Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* (2009) **136**(4):669-687.
- [19] Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A: Mir390, arabidopsis tas3 miRNAs, and their auxin response factor targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *The Plant Cell* (2010) **22**(4):1104-1117.
- [20] Yang JH, Han SJ, Yoon EK, Lee WS: Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells. *Nucleic acids research* (2006) **34**(6):1892-1899.
- [21] Sunkar R. (2012) *MicRNAs in plant development and stress responses*. Springer, Science & Business Media. pp 2-28.
- [22] Giacomelli JI, Weigel D, Chan RL, Manavella PA: Role of recently evolved miRNA regulation of sunflower hawrky6 in response to temperature damage. *New Phytologist* (2012) **195**(4):766-773.
- [23] Xin M, Wang Y, Yao Y, Xie C, Peng H, Ni Z, Sun Q: Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology* (2010) **10**(1):123.
- [24] Zhao J-P, Jiang X-L, Zhang B-Y, Su X-H: Involvement of microRNA-mediated gene expression regulation in the pathological development of stem canker disease in populus trichocarpa. *PLoS One* (2012) **7**(9):e44968.
- [25] Wang H, Wang H: The mir156/spl module, a regulatory hub and versatile toolbox, gears up crops for enhanced agronomic traits. *Molecular plant* (2015) **8**(5):677-688.
- [26] Gielen H, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A: MicroRNAs in metal stress: Specific roles or secondary responses? *International journal of molecular sciences* (2012) **13**(12):15826-15847.
- [27] Wang Y, Sun F, Cao H, Peng H, Ni Z, Sun Q, Yao Y: Tamir159 directed wheat tagamyb cleavage and its involvement in anther development and heat response. (2012) **7**(11)

- response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. *Tree physiology* (2007) **27**(10):1459-1470.
- [41] Kong Y, Elling AA, Chen B, Deng X: Differential expression of micrnas in maize inbred and hybrid lines during salt and drought stress. *American Journal of Plant Sciences* (2010) **1**(02):69.
- [42] Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, Zhang W, Zhu J-K: Identification of novel and candidate mirnas in rice by high throughput sequencing. *BMC plant biology* (2008) **8**(1):25.
- [43] Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, Luo L: Genome-wide identification and analysis of drought-responsive micrnas in *oryza sativa*. *Journal of experimental botany* (2010) **61**(15):4157-4168.
- in plant stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* (2008) **1779**(11):743-748.
- [38] Windels D, Bielewicz D, Ebnetter M, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z, Vazquez F: Mir393 is required for production of proper auxin signalling outputs. *PLoS One* (2014) **9**(4):e95972.
- [39] Ma Z, Hu X, Cai W, Huang W, Zhou X, Luo Q, Yang H, Wang J, Huang J: Arabidopsis mir171-targeted scarecrow-like proteins bind to gt cis-elements and mediate gibberellin-regulated chlorophyll biosynthesis under light conditions. (2014) **10** (8) :e1004519.
- [40] Sánchez C, Vielba JM, Ferro E, Covelo G, Solé A, Abarca D, De Mier BS, Díaz-Sala C: Two scarecrow-like genes are induced in