

بررسی میزان بیان *Pdu-miR477* و *Pdu-miR398* و ژن‌های هدف

آن‌ها تحت تنش سرما در بادام

Evaluation of the expression pattern of *Pdu-miR398* and *Pdu-miR477* and their gene targets on reproductive tissues of almond in response to cold stress

فرحناز غضنفری^۱، محمد ربیعی^{۱*}، بهروز شیران^۱

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

Ghazanfari F¹, Rabiei M^{*1}, Shiran B¹

1- MSc Graduate Student, Assistant Professor, Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mrabiei@yandex.ru

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۴/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

بادام (*Prunus dulcis* Mill.) به عنوان گیاه خشکباری مهم جهت نمو جوانه‌های میوه به سرمای زمستان نیاز دارد ولی یخ زدگی در آخر زمستان و ابتدای بهار منجر به صدمه به بافت‌های زایشی در این گیاه و در نتیجه کاهش میزان باروری می‌شود. تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش سرما از طریق تغییر الگوی بیان ژن نمو و تولید گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از آنجایی که miRNAها نقش مهمی در تنظیم پاسخ به تنش از طریق تأثیر متقابل بر mRNAهای هدفشان دارند، در این مطالعه برای اولین بار بیان دو miRNA با توالی حفاظت شده در گیاهان مختلف و مرتبط با ایجاد تحمل به سرما، *Pdu-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p*، در بادام بررسی شد. در این تحقیق بررسی بیان در بافت‌های زایشی بساک و تخمدان بادام تحت تیمارهای سرمایی صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم حساس به سرما Sh12 و ژنوتیپ متحمل به سرمای H صورت گرفت. بیان *Pdu-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* تحت تیمار سرمایی ۲- درجه سانتی‌گراد در بافت‌های بساک و تخمدان رقم حساس به سرما Sh12 افزایش بیان داشت، در حالی که آن‌ها در بافت بساک ژنوتیپ متحمل به سرما H کاهش بیان داشتند. ژن‌های هدف miRNAهای موردنظر با ابزارهای بیوانفورماتیکی پیشگویی شدند. یک همبستگی منفی بین *Pdu-miR398b* و ژن هدف پیش‌بینی شده آن *PduDUF1639* در ژنوتیپ Sh12 تحت هر دو تیمار تنش سرمایی مشاهده شد. هم‌چنین کاهش بیان *Pdu-miR477a-3p* در ژنوتیپ متحمل به سرما با افزایش بیان ژن‌های هدف پیش‌بینی شده آن، *PduAAE7* و *ABC transporter* همراه بود. بیان متفاوت *Pdu-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* و ژن‌های هدف پیش‌بینی شده آن‌ها در رقم‌های حساس و متحمل به سرمای بادام می‌تواند به عنوان دلیلی بر دخیل بودن آن‌ها در پاسخ به تنش سرما در این گیاه باشد.

واژه‌های کلیدی

بادام
تنش سرما
میکرو RNA
qPCR
5'RLM-RACE

مقدمه

تنش سرما مشابه سایر تنش‌های غیر زیستی گونه‌های گیاهی زیادی را تهدید می‌کند و باعث محدودیت پراکندگی جغرافیایی درختان و سایر گونه‌های گیاهی شده و رشد و عملکرد گیاهان را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Chinnusamy et al. 2007; Barakat et al. 2012; Zhang et al. 2014). یخبندان بهاره یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های محیطی در درختان میوه از جمله بادام می‌باشد. در طول زمستان جوانه‌ها در حال کمون و سخت هستند اما با افزایش دما آن‌ها متورم شده و به شکوفه تبدیل شده و در نتیجه تحمل آن‌ها به خسارت یخ‌زدگی کاهش می‌یابد. این تنش می‌تواند به درخت بادام ۱۰ تا ۹۰ درصد در مراحل مختلف فنولوژیکی خسارت وارد کند (Miranda et al. 2005). بادام گیاهی چندساله از زیرخانواده Pronoidaea، خانواده Rosaceae و جنس *Prunus* می‌باشد. بادام عمدتاً خودناسازگار، دارای ۱۶ عدد کروموزوم ($2n=2x=16$) و یک ژنوم دیپلوئید کوچک در حدود ۳۰۰ Mbp می‌باشد (Rea 2007). اهمیت اعضا این خانواده به‌خاطر ارزش غذایی بالا و محصولات صنعتی می‌باشد. یکی از مشکلات عمده بادام کاری در کشور، تولید نامنظم و غیرقابل پیش‌بینی آن می‌باشد که بیشتر به‌دلیل زودگلدهی ژنوتیپ‌های بومی، هم‌زمان نبودن گلدهی ارقام مورد استفاده در باغات، وجود پدیده خودناسازگاری یا مصادف شدن گلدهی با سرمای بهاره می‌باشد (Martínez-Gómez et al. 2007) به‌طوری‌که حتی این خسارت به میزان ۶۰ تا ۱۰۰ درصد تخمین زده شده‌است (2013 Afshari and Parvane).

پاسخ گیاهان به تنش وابسته به نوع بافت و یا اندام تحت تنش است. پیچیدگی پاسخ گیاهان به تنش در سطح رونویسی برای بافت یا سلول اختصاصی است و بستگی به نوع، طول مدت و همچنین سطح تنش محیطی دارد (Pinheiro and Chaves 2011). پاسخ‌های مولکولی گیاهان به تنش‌های غیرزیستی شامل برهمکنش و تداخل مسیرهای مولکولی مختلف است (Takahashi et al. 2004). گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن از اولین پیام‌های تولید شده در پاسخ به تنش هستند که پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی را تنظیم می‌کنند و مطالعات بسیاری بر روی تاثیرات اکسیداتیو گونه‌های فعال اکسیژن در پاسخ به تنش وجود

دارد (Molassiotis and Fotopoulos 2011). گیاهان از طریق مکانیسم‌های اختصاصی که شامل تغییر بیان ژن‌ها می‌باشد به تنش سرما پاسخ می‌دهند. نقش مهم microRNAها در پاسخ به تنش‌های محیطی در مطالعات زیادی مشخص شده‌است (Li et al. 2013; Kohli et al. 2014; Tian et al. 2014; Sun et al. 2015). microRNAها (miRNAs) گروهی از RNAهای کوچک (sRNAs)، تنظیم‌کننده‌های زیستی در گیاهان هستند که در پاسخ به تنش‌های مختلف نقش دارند (Bej and Basak 2014). miRNAهای گیاهان RNAهای تنظیم‌کننده کوچک با طول ۲۱ نوکلئوتید هستند که از رونوشت‌های میکروRNAهای طویل‌تر مشتق می‌شوند (Ding Zhou and Guan 2012). miRNAها بر اساس توالی مکمل غیر کامل mRNAهای هدف خود را شناسایی می‌کنند. RISC (RNA-induced silencing complex) حاوی miRNA یا siRNA خاموش‌کنندگی ژن‌ها را بعد از رونویسی آن‌ها با برش mRNA یا سرکوب ترجمه آن‌ها القا می‌کنند (Sunkar et al. 2012). تعداد زیادی از miRNAهای تنظیم‌شونده با سرما با رهیافت‌های کلونینگ، بیوانفورماتیک و توالی‌یابی با توان بالا در آرآیدوپسیس (Zhou et al. 2008)، سپیدار (Chen et al. 2012)، *Brachypodium* (Zhang et al. 2009) و برنج (Lv et al. 2010) شناسایی شده‌اند. اگرچه چندین miRNA تشابهاتی در میان گونه‌ها نشان می‌دهند (miR397 و miR169 افزایش بیان می‌یابند) ولی تفاوت‌هایی هم در تنظیم miRNAها مشاهده شده‌است که پیشنهاد اختصاصی بودن آن‌ها را در بین گونه‌ها می‌کند. در مورد ژن‌های هدف miRNAهایی که در پاسخ به سرما سطح بیان آن‌ها تغییر می‌کند اطلاعات کمی وجود دارد. Cu/zn SODs (superoxide dimutases) ژن‌های هدف mir398 می‌باشند که سطح بیان آن‌ها با سرما و تنش‌های اکسیداتیو در آرآیدوپسیس کاهش می‌یابد (Sunkar et al. 2006).

تحقیقات مختلفی miRNAهای پاسخ‌دهنده به سرما را در گونه‌های گیاهی مختلف مانند، آرآیدوپسیس (Sunkar and Zhu 2008; Liu et al. 2004)، چای (Zhang et al. 2014)، گوجه‌فرنگی (Cao et al. 2014; Koca et al. 2015)، برنج (Lv et al. 2010)، گندم (Tang et al. 2012)، هلو (Barakat et al. 2012)، سپیدار (Lu et al. 2008) و چمن جاوری (Zhang et al.

صفر و ۲- درجه سانتی گراد در بافت‌های تخمدان و بساک بادام در دو ژنوتیپ دیرگل و نسبتاً متحمل به سرما H و حساس به سرما Sh12 تهیه شده از مرکز تحقیقات نهال و بذر کرج در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شهرکرد انجام گرفت.

نمونه‌برداری در مرحله غنچه صورتی (popcorn stage) از درختان با طول عمر ۶ سال انجام گرفت، بدین ترتیب که تعداد ۵-۴ شاخه تقریباً مشابه با طول ۴۰-۲۰ سانتی‌متر انتخاب و براساس تکنیک شاخه بریده، شاخه‌های یکساله از قسمت‌های میانی درخت تهیه شد (Imani et al. 2012). شاخه‌ها پس از جداسازی از درخت در آب حاوی ساکارز ۵ درصد قرار گرفتند. نمونه‌برداری بافت‌های تخمدان و بساک از ۱۲-۱۰ غنچه از یک شاخه معین به‌عنوان یک تکرار بیولوژیک انجام پذیرفت. به‌منظور اعمال تنش ابتدا نمونه‌ها را به مدت ۳ ساعت در دمای صفر درجه سانتی‌گراد قرار داده و نمونه‌برداری برای هر ژنوتیپ با سه تکرار انجام گرفت. سپس دما را به ۲- درجه سانتی‌گراد کاهش داده و به مدت دو ساعت نمونه‌ها در این دما قرار گرفتند. نمونه‌برداری (دو تکرار بیولوژیک) از بافت‌های تخمدان و بساک (۱۲-۱۰ عدد تخمدان و بساک در هر تکرار) در هر دو تیمار صفر درجه سانتی‌گراد و دو ساعت ۲- درجه سانتی‌گراد برای هر دو ژنوتیپ انجام شد. همچنین ۱۲-۱۰ عدد بافت‌های مادگی و بساک از یک شاخه در هر تکرار بیولوژیک به‌عنوان کنترل در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای هر ژنوتیپ نمونه‌برداری شد. دما و نوع اعمال تنش بر اساس مطالعات پیشین بر روی درصد خسارت بافت تخمدان بادام انتخاب شد، به این ترتیب که دماهای پایین‌تر از ۳- درجه سانتی‌گراد منجر به قهوه‌ای شدن تعداد بسیاری از بافت‌های تخمدان می‌شود (Imani and Mohammadkhani 2011; Imani et al. 2012) و بنابراین دماهای کمتر از ۳- درجه سانتی‌گراد برای بررسی مولکولی بافت تخمدان (به‌علت صدمه به این بافت) مناسب نمی‌باشد. نمونه‌ها در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

با توجه به در دست نبودن توالی کامل ژنوم بادام، در این تحقیق از نتایج توالی‌یابی RNAهای بادام انجام گرفته توسط Mousavi et al. (2014) و همچنین از داده‌های حاصل از آنالیز

(2009) معرفی کرده‌اند. در مطالعات مختلف در گیاهان گزارش شده‌است که *miR165/166*، *miR159/319*، *miR156/157*، *miR169*، *miR172*، *miR393*، *miR394*، *miR396*، *miR397* و *miR398* در پاسخ به تنش سرما افزایش بیان یافته‌اند (Zhou et al. 2008). علاوه بر آن در مطالعه (Chen et al. 2012) برخی از miRNAها از قبیل *miR156g-j*، *miR475a,b* و *miR476a* تحت تنش سرما در سپیدار کاهش بیان نشان داده‌اند. همچنین (2008) Lu et al. با انجام ریزآرایه نشان دادند که در گیاهان تنش داده شده با سرما *Ptc-miR477a,b* افزایش بیان نشان می‌دهد. با توجه به گزارش‌های مختلف موجود به‌نظر می‌رسد خانواده‌های سه miRNA شامل *MIR477*، *MIR482* و *MIR3627* در بین درختان میوه و همچنین درخت مدل سپیدار خیلی حفاظت شده می‌باشند (Solofoharivelo et al. 2014) و معمولاً خانواده فاکتورهای رونویسی را مورد هدف قرار می‌دهند. بدین ترتیب این miRNAها را تنظیم‌کننده‌های اصلی فرایندهایی مثل نمو گیاهان، سیگنال‌های هورمونی و پاسخ به تنش را تحت تاثیر خود قرار داده‌اند (Axtell 2008).

تاکنون گزارشی در رابطه با پاسخ miRNAهای بادام به تنش سرما به‌خصوص در اندام‌های زایشی نشده‌است، در حالی‌که تنش سرما می‌تواند بیش‌ترین اثرات تخریبی را داشته باشد. اخیراً (Mousavi et al. 2014) تحقیقی را با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی RNA (RNA-Seq) به‌منظور آشکارسازی پاسخ‌های مولکولی در بافت‌های تخمدان و بساک بادام در پاسخ به تنش سرما انجام داده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی الگوی بیان *Pdu-miR477a-3p* و *Pdu-miR398b* و ژن‌های هدف آن‌ها تحت تیمارهای تنش سرما در ارقام حساس و متحمل در بافت‌های زایشی تخمدان و بساک در گیاه بادام با روش qPCR و نیز بررسی محل برش ژن هدف *Pdu-miR477a-3p* با روش (5'RLM-RACE5' RNA Ligase Mediated-Rapid Amplification of CDNA Ends) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی میزان بیان *Pdu-miR477a-3p* و *Pdu-miR398b* و ژن‌های هدف آن‌ها این آزمایش در دو سطح تنش سرما شامل

طریق اسپکتروفتومتر و ژل آگارز یک درصد بررسی شد. بررسی بیان *miRNA* با روش *stem-loop RT-PCR* بر اساس روش (Chen et al. (2005) و (Varkonyi et al. (2007) انجام گرفت. جهت بررسی بیان *miRNA* ها و ژن های هدف آن ها سه مرحله به ترتیب سنتز *cDNA*، بررسی محصول توسط *End point PCR* و به منظور تایید و همچنین بررسی تغییرات بروز آن ها تحت تنش سرما واکنش زنجیره ای پلی مرز در زمان واقعی (*Real-Time PCR*) انجام شد.

واکنش *PCR* در زمان واقعی با استفاده از مخلوط واکنش Takara (Cat. #RR820A)، حاوی *SYBR Green* و آغازگر اختصاصی برای هر ژن و آغازگر رفت اختصاصی *miRNA* و آغازگر برگشت *universal* انجام شد. این واکنش با سه تکرار تکنیکی برای هر نمونه ی *miRNA* و ژن هدف و دو تکرار بیولوژیک انجام شد. همچنین از ژن خانگی *18S rRNA* (Mallory et al. (2004) و *PdAct1* (Guo et al. 2009) به عنوان کنترل داخلی در نرمال سازی نتایج *qPCR* استفاده شد.

توالی یابی *RNA* های کوچک در مطالعه (Karimi et al. 2016) با نمونه های گیاهی مشابه و شرایط تنش مشابه استفاده شد. (karimi et al. (2016) با توالی یابی *microRNA* های بافت بساک و تخمدان بادام تحت تنش سرما برخی *miRNA* های پاسخ دهنده به تنش سرما از جمله *Pdu-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* را گزارش نمودند که تایید آن ها در این تحقیق با روش *qPCR* صورت گرفت.

طراحی آغازگر برای بررسی بیان *miRNA* توسط نرم افزار *miRNA Primer Designer* و بررسی بیان ژن هدف توسط نرم افزار *Primer3* انجام گرفت. همچنین طراحی آغازگر برای انجام *5'RLM-RACE* با نرم افزار *primer3* انجام گرفت. آداپتور برای انجام *5'RLM-RACE* و توالی آغازگرهای *5'-RACE-Outer* و *5'-RACE-Inner* بر اساس کیت *FirstChoice®RLM-* RACE طراحی شد (جدول ۱).

استخراج *RNA* کل و بررسی کیفیت *RNA* به روش Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011) انجام شد. کمیت و کیفیت *RNA* از

جدول ۱- لیست آغازگرهای طراحی شده برای بررسی بیان *miRNA*، ژن هدف و محل برش دقیق ژن هدف از طریق روش *5'RLM-RACE*

نام آغازگر-آداپتور	توالی 5'→3'	TM	نام آغازگر-آداپتور	توالی 5'→3'	TM
<i>Pdu-T477a-3p-1-F</i>	GCC TGA AGA CCA ACA AAA CCA	۵۹/۴	<i>Pdu-miR398b-RT</i>	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC AGG GG	۸۷/۱
<i>Pdu-T477a-3p-1-R</i>	TAG CTG GGG TGC AAC TAA CAG	۶۱/۳	<i>Pdu-miR398b -F</i>	GCG GCG CGT GTT CTC AGG TCG	۶۹/۲
<i>Pdu-T477a-3p-2-F</i>	CCT CCA CCC TCT GTT CTC CT	۶۲/۵	<i>Pdu-miR477a-3p-RT</i>	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC GTC CC	۸۷/۱
<i>Pdu-T477a-3p -2-R</i>	AGT CCC ACT CAG GCT TCC AA	۶۰/۵	<i>Pdu-miR477a-3p F</i>	GCG GCG GTT GGG GGC TCT TTT G	۶۹/۶
<i>Pdu-T477a-3p -RACE Outer</i>	GTC GTT GGA CTT CTG GTA GCA A	۶۰/۵۵	Universal_reverse	ATC CAG TGC AGG GTC CGA GG	۶۴/۶
<i>Pdu-T477a-3p -RACE Inner</i>	GAG ATG AAC TCC TGC TCT CAT	۶۰/۱۶	<i>Pdu-miR398b -F</i>	ACG TCC CGT GGA AGC AAT AG	۶۰/۵
<i>Pdu-T477a-3p -RACE Forward</i>	CGA ATG ATA GAG TTG CCG GGA	۶۰/۴۸	<i>Pdu-miR398b -R</i>	GAT AAG GAC CCG GCC AAT CA	۶۰/۵
<i>5'-RACE-Outer</i>	CAT GGC TAC ATG CTG ACA GCC TA	۶۸/۵	<i>5'-RACE-Inner</i>	TCA CGC GGA TCC ACA GCC TAC TGA TGA GTC GAT G	۸۲/۶

miRNAهای حفاظت شده شناسایی شد که شش *microRNA* حفاظت شده (*Pdu-miR394b*, *Pdu-miR166d*, *Pdu-miR162*, *Pdu-miR398b*, *Pdu-miR7122a-3p* و *Pdu-miR477a-3p*) بروز متفاوتی را تحت تنش سرما نشان دادند و E-value برابر یک داشتند (Karimi et al. 2016). در این مطالعه به بررسی الگوی بیان *Pdu-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* و همچنین تنظیم ژن هدف آنها در بافت‌های زایشی بادام در دو رقم متحمل به سرما H و حساس به سرما Sh12 پرداخته شد.

به منظور آشکارسازی پاسخ مولکولی بافت‌های تخمدان و بساک بادام در پاسخ به تنش سرما از داده‌های RNAseq حاصل از مطالعه (Mousavi et al. 2014) استفاده شد. داده‌های خام ترنسکریپتوم در آرشیو توالی‌های خوانش (SRA) در NCBI قرار داده شده‌است و با شماره SRP041269 قابل دسترسی می‌باشد.

از آنجایی که miRNAهای گیاهی اهداف خود را از طریق اتصال نزدیک جفت‌بازهای مشابه تشخیص می‌دهند، جستجوی محاسباتی شباهت توالی ژن هدف و miRNA می‌تواند برای پیش‌بینی رابطه miRNA و ژن هدف استفاده شوند. با استفاده از توالی miRNAها و کانتیگ‌های حاصل از RNAseq بادام در مطالعه (Mousavi et al. 2014)، پیش‌بینی ژن‌های هدف از طریق وب سایت sRNATarget (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget) انجام شد. عمل شناسایی توالی‌های پیش‌بینی شده از طریق تشابه توالی موردنظر با توالی DNA و یا توالی پروتئین شناخته شده در بانک‌های اطلاعاتی بر پایه الگوریتم BLASTN انجام شد.

با توجه به در دست بودن داده‌های RNA-Seq (Mousavi et al. 2014)، برای هر microRNA هویت ژن‌ها تعیین شد (جدول ۲). توالی ژن‌ها و miRNAهای به دست آمده از طریق سایت psRNATarget مورد بررسی قرار گرفت (Dai and Zhao 2011). به منظور بررسی بیش‌تر رابطه بین *Pdu-miR398b* و ژن هدف آن (*pduDUF1639*)، مقایسه بیان آنها در بین ژنوتیپ‌های بادام تحت تنش سرما از طریق PCR در زمان واقعی صورت گرفت. در ژنوتیپ دیرگل حساس به سرما Sh12، *Pdu-miR398b* افزایش بیان در دو بافت بساک و تخمدان تحت تنش سرمایی ۲- درجه سانتی‌گراد را نشان داد (شکل ۱). همچنین این افزایش بیان

cDNA سنتز شده به نسبت ۱ به ۲ رقیق شد، سپس در واکنش PCR در زمان واقعی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیز PCR در زمان واقعی یا Ct (cycling threshold) توسط نرم‌افزار- Rotor Gene Q Series Software به دست آمد. مقایسه نتایج با ژن کنترل 18srRNA و اکتین، با استفاده از روش (Livak and Schmittgen 2001) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) انجام شد. برای مقایسه Ct نمونه کنترل و تنش از student t test با در نظر گرفتن حداقل سطح معنی‌دار ۰/۰۵ استفاده شد.

جهت بررسی محل دقیق برش miRNA در توالی ژن هدف از طریق روش 5'RLM-RACE استفاده شد. مراحل آزمایش در بررسی محل دقیق برش miRNA در توالی ژن هدف شامل الحاق آداپتور، سنتز cDNA، انجام PCR آشیانه‌ای، خالص‌سازی محصول PCR، کلون‌سازی، استخراج پلاسمید و توالی‌یابی نمونه‌ها می‌باشد (Thiebaut et al. 2012). به ۲ میکروگرم RNA استخراج شده از بافت تخمدان بادام رقم H از تیمار تحت تنش سرما صفر درجه سانتی‌گراد DNA 5'RACE آداپتور الیگونوکلوئیدی به کمک T4-RNA لیگاز متصل شد. از آغازگرهای نه‌تایی تصادفی برای سنتز cDNA استفاده شد. PCR آشیانه‌ای برای تکثیر قطعات حاصل از سنتز cDNA حاوی محل برش انجام گرفت. PCR اول با استفاده از آغازگر خارجی 5'RACE و یک آغازگر خارجی اختصاصی ژن انجام گرفت. PCR دوم با استفاده از واکنش PCR اولیه به عنوان الگو، آغازگر داخلی 5'RACE و یک آغازگر داخلی اختصاصی ژن انجام گرفت (Thiebaut et al. 2012). سپس محصول PCR خالص‌سازی شد. همچنین قطعات حاصل در وکتور کلون شده سپس استخراج پلاسمید انجام گرفت. هردو محصول حاصل از خالص‌سازی محصول PCR و استخراج پلاسمید توالی‌یابی شد. پس از توالی‌یابی انتهای برشی توالی‌یابی شده بر روی ژن هدف نقشه‌گذاری شد و محل دقیق برش مشخص شد.

نتایج و بحث

پس از بررسی در پایگاه اطلاعاتی miRBase و بلاست در مقابل توالی microRNAهای شناخته شده هلو به عنوان خویشاوند نزدیک بادام و گیاه مدل در خانواده Rosaceae، تعداد ۱۱۷

مدت سه و دو ساعت مشاهده گردید. در مقابل افزایش بیان معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) این ژن پس از سه ساعت تیمار صفر درجه سانتی‌گراد در بافت تخمدان ژنوتیپ دیرگل متحمل به سرما H مشاهده شد. همچنین نتایج آزمون همبستگی بین کل داده‌های بیان *Pdu-miR398b* و ژن هدف *pduDUF1639* در ژنوتیپ Sh12 تحت هر دو تیمار تنش سرمایی همبستگی منفی (-0.27) را نشان داد، که می‌تواند گویای تنظیم منفی *pduDUF1639* از طریق *Pdu-miR398b* در این ژنوتیپ باشد. یکی از دلایلی که چنین ارتباط منفی در ژنوتیپ H مشاهده نشد می‌تواند تاخیری باشد که در پاسخ به این تنش وجود دارد. دلیل دیگری که می‌توان ذکر نمود این است که کاهش بیان ژن‌های دیگری مانند، $CSD1^1$ و $CSD2^2$ که برای این miRNA پیش‌بینی شده‌اند و احتمالاً پاسخ‌دهنده به سرما در ژنوتیپ H باشند دخیل باشند نه *pduDUF1639*.

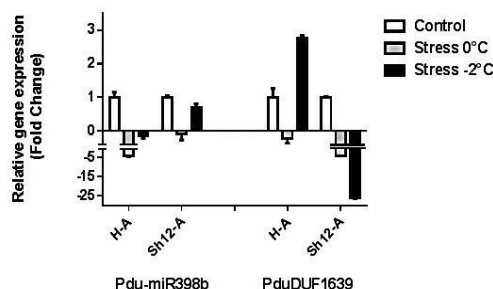
در بافت تخمدان ژنوتیپ دیرگل متحمل به سرما H تحت تیمار سرمایی صفر و -2°C درجه سانتی‌گراد نیز دیده شد. در تنش -2°C درجه سانتی‌گراد افزایش بیان معنی‌دار این miRNA (در سطح ۵ درصد) در بافت تخمدان ژنوتیپ Sh12 (FC 2.41) و همچنین ژنوتیپ H (FC 5.23) پس از سه ساعت تیمار صفر درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. میزان بیان *Pdu-miR398b* در بافت بساک ژنوتیپ دیرگل متحمل به سرما H در سطح تنش سرمایی -2°C درجه سانتی‌گراد کاهش بیان (FC -0.15) نشان داد که با کاهش بیان آن در داده‌های NGS کتابخانه تنش HSA در مطالعه Karimi et al. (2016) مطابقت دارد و همچنین افزایش بیان ژن هدف پیش‌بینی شده آن *pduDUF1639* در تحقیق حاضر در مطابقت با داده‌های کتابخانه تنش HSA در مطالعه Mousavi et al. (2014) می‌باشد. تغییرات بیان ژن هدف پیش‌بینی شده *Pdu-miR398b* یا *pduDUF1639* تاکنون گزارش نشده‌است و برای اولین بار در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت. در ژنوتیپ Sh12 کاهش بیان معنی‌دار (در سطح یک درصد) *pduDUF1639* در بافت تخمدان تحت تیمار صفر و -2°C درجه سانتی‌گراد به ترتیب به

¹ Cytosolic copper, zinc superoxide dismutase1

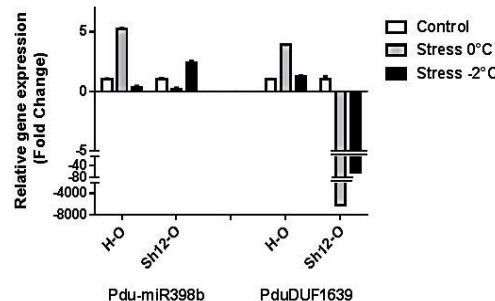
² Chloroplastic copper, zinc superoxide dismutase2

جدول ۲- ژن‌های هدف پیش‌بینی شده *Pdu-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* استخراج شده از سایت NCBI

Accession number	ژن هدف پیش‌بینی شده	miRNA (۵'→۳')	miRNA
XP-008220439.1	Protein of unknown function (DUF1639)	CGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	<i>Pdu-miR398b</i>
XP-008223306.1	Acetate/butyrate-CoA ligase AAE7, peroxisomal (AAE7)	UUGGGGGCUCUUUUGGGACG	<i>Pdu-miR477a-3p</i>
XP-008228319.1	ABC transporter C family member 8-like(ABCC)		



(a)



(b)

شکل ۱- مقایسه بیان *Pdu-miR398b* و ژن هدف آن *PduDUF1639* در دو سطح تنش صفر و -2°C در دو ژنوتیپ Sh12 و H در بافت بساک بادام (a) و بافت تخمدان (b)

miR398 یکی از microRNAهای مهم است که در پاسخ به تنش اکسیداتیو و همئوستازی مس نقش دارد و اولین *miRNA* گزارش شده است که در تنش اکسیداتیو با کاهش بیان نقش تنظیمی خود را ایفا می کند (Axtell 2008). گزارش شده است که *miR398b* در پاسخ به تنش سرما نیز نقش دارد (Jagadeeswaran et al. 2009). این *miRNA* در تنش های زیستی و غیرزیستی درگیر است و با تنظیم میزان اکسیژن آزاد درون سلولی نقش خود را اعمال می کند. *miR398* یک میکرو RNA حفاظت شده است که در آرآبیدوپسیس با ۳ مکان ژنی *MIR398a*، *MIR398b* و *MIR398c* کد می شود. توالی *MIR398b* و *MIR398c* یکسان است ولی *MIR398a* در یک نوکلئوتید در قسمت ۳' با آن ها تفاوت می کند (Sunkar and Zhu 2004). بیان *miR398b/c* بیشتر از *miR398a* می باشد که باعث اثر تنظیم کنندگی قوی تر آن ها می شود (Juszczak and Baier 2012). *miR398* حداقل چهار mRNA را در آرآبیدوپسیس مورد هدف قرار می دهد: (۱) مس/روی سوپراکساید دیسموتاز استیوزولی (CSD1)، (۲) CSD2، کلروپلاستی، (۳) یک زیر واحد میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز *c*، *COX5b1,2-4* و (۴) چپرون مس برای سوپراکساید دیسموتاز (CCS1) که کوفاکتور مس را به آن ها (۱، ۲ و ۳) تحویل می دهد (Jia et al. 2009; Jagadeeswaran et al. 2009). *miR398* دو ژن کدکننده سوپراکساید دیسموتاز مس، CSD1 و CSD2 را تنظیم منفی می کند. آنزیم CSD دارای مس به عنوان کوفاکتور است. هنگامی که میزان اکسیژن آزاد درون سلولی افزایش می یابد با کاهش بیان *miR398* بیان ژن های کدکننده سوپراکساید دیسموتازها افزایش یافته و مانع از صدمه دیدن گیاه توسط اکسیژن آزاد می شود. در نتیجه *miR398* در پاسخ به تنش نقش دارد و به تنش اکسیداتیو پاسخ می دهد. *miR398* توسط فقدان و کمبود مس نیز القا می شود و همئوستازی مس را از طریق قطعه قطعه کردن CDSI mRNA نگهداری می کند. افزایش یا کاهش بیان *miR398* بستگی به شرایط فیزیولوژیکی گیاه دارد. کاهش بیان *miR398* در پاسخ به تنش اکسیداتیو جهت کاهش سطح ROS اتفاق می افتد و افزایش بیان آن جهت حفظ مس روی می دهد (Sunkar et al. 2012). مطالعات مختلف نشان دادند که تعدادی از *miRNA* ها تحت شرایط تنش هم افزایش بیان و هم کاهش بیان نشان

می دهند و پاسخ *miRNA* ها به تنش های غیرزیستی بسیار پویا است. (Jia et al. 2009). ثابت کردند که تنظیم *miR398* در پاسخ به ABA و تنش شوری در گیاهان پویا است. در درخت سپیدار، *miR398* ابتدا تحت تیمار ۳-۴ ساعت ABA یا تنش شوری القا می شود و پس از ۴۸ ساعت سرکوب شده و نهایتاً در طول تنش های بیش تر از ۷۲ ساعت دوباره تجمع پیدا می کند. در مقابل تنظیم پویای *miR398* در آرآبیدوپسیس وجود ندارد و *miR398* به صورت یکنواخت در طول تنش سرکوب می شود. بیان ژن هدف *miR398* (SOD یا CSD) کاملاً همبستگی معکوس با سطح *miR398* دارد. *miR398* در تنش های اکسیداتیو، شوری، اسید آبسیسیک، استفاده از ساکارز و تغییر دماهای شدید متفاوت باعث یک تغییر فوری در سطح های CSD می شود (Dugas and Bartel 2008; Yu et al. 2012; Lee et al. 2010). بیان زیاد CSD گیاهان را از تنش های اکسیداتیو حفاظت می کند و تحمل نسبت به تنش یخ زدگی را در گیاهان تراریخته افزایش می دهد (Sunkar et al. 2006). مکانیسم اصلی مسیر CSD-miR398 در تحمل نسبت به یخ زدگی است ولی هنوز کاملاً شناسایی نشده است (Chen et al. 2013). Cu/zn SODs (superoxide dimutases) ژن های هدف *mir398* می باشند که سطح بیان آن ها با سرما و تنش های اکسیداتیو در آرآبیدوپسیس کاهش می یابد (Sunkar et al. 2006). در مطالعات انجام شده روی *miR398* تحت تنش خشکی (Sunkar et al. 2012) افزایش بیان *miR398* را در یونجه، گندم وحشی و سپیدار گزارش کردند، آن ها بیان داشتند که این افزایش بیان در برگ بسیار بیش تر از ریشه است. *smRNAs* پاسخ دهنده به دما به طور عمده در شرایط تنش دمایی شناسایی شده اند. گلدھی اولین صفتی می باشد که با تغییرات شدید دما متاثر می شود. مطالعات مقایسه ای نشان داده است که *miR156*، *miR169*، *miR172* و *miR398* میکرو RNA های پاسخ دهنده به تنش های سرما هستند (Lv et al. 2010). در مطالعه Esmaili et al. (2015) بروز *miR398* در هلو، طی دو سطح تنش خشکی افزایش قابل توجهی داشته است، هم چنین در بادام و GN افزایش بیان آن طی تنش ملایم (بیش از ۷۲ ساعت) مشاهده شد. (Jia et al. 2009) نیز در مطالعه خود بر گونه درختی سپیدار افزایش بیان *miR398* را در طول تنش های بیش از ۷۲ ساعت

اکثر DUFها مشخص نشده است ولی در مطالعات مختلف برخی اثرات فیزیولوژیک مانند تحمل به تنش‌های غیرزیستی به آن‌ها نسبت داده می‌شود که در این رابطه حفاظت شدگی بسیاری از DUF¹ها نیز می‌تواند بر نقش مهم زیستی آن‌ها اشاره داشته باشد. اعتقاد بر این است که DUFها یا پروتئین‌های با عملکرد نامشخص تنها در شرایط خاصی مورد نیاز هستند (Häuser et al. 2012) که از این شرایط خاص می‌توان به تنش‌های غیرزیستی مختلف از جمله تنش سرما اشاره کرد. (Mawlong et al. 2016) نشان دادند یک DUF با نام *ESK1* به عنوان یک تنظیم کننده منفی سرما سازگاری عمل می‌کند. جهش در پروتئین *DUF ESKIMO 1* باعث افزایش تحمل به یخ زدگی در آرابیدوپسیس می‌شود که اهمیت آن‌ها در پاسخ به تنش را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر اللقاء بیان *PduDUF1639* در رقم متحمل به سرما H در بافت بساک و تحت تیمار دمایی ۲- درجه سانتی‌گراد در تطابق با مطالعه (Mawlong et al. 2016) می‌باشد. (Bischoff et al. 2010) گزارش کردند یک پروتئین DUF دیگر به نام TBL در سنتز و جابجایی سلولز دیواره ثانویه، احتمالاً با تحت تاثیر قرار دادن وضعیت استریفیکاسیون پلیمرهای پکتینی و پایداری غشاء که جایگاه اولیه تاثیر تنش‌های غیر زیستی سلول می‌باشد درگیر در تحمل به تنش می‌باشد. با توجه به این یافته‌ها و اللقاء بیان معنی‌دار *Pdu-miR398b* و کاهش بیان معنی‌دار ژن هدف آن *PduDUF1639* در رقم حساس به سرما Sh12 و تحت تنش سرمای ۲- درجه سانتی‌گراد نشان داد که *PduDUF1639* احتمالاً در مکانیسمی مشابه با TBL در مطالعه (Bischoff et al. 2010) عمل نموده و اثر تنظیمی منفی *Pdu-miR398b* باعث کاهش بیان *PduDUF1639* و در نتیجه ناپایداری غشا و افزایش حساسیت به سرما شود.

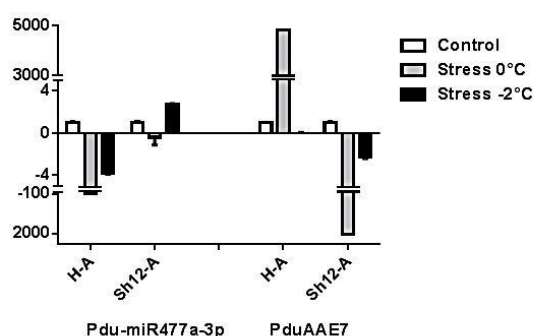
به منظور بررسی میزان بیان *Pdu-miR477a-3p* و رابطه آن با ژن‌های هدف آن (*pduAAE7* و *pduABCC-MRP*)، مقایسه بیان آن‌ها در بین ژنوتیپ‌های بادام تحت تنش سرما از طریق PCR در زمان واقعی صورت گرفت (شکل ۲). در ژنوتیپ دیرگل حساس به سرما Sh12، کاهش بیان غیر معنی‌دار *Pdu-miR477a-3p* در

گزارش کردند. با افزایش مدت زمان تنش خشکی، بادام و GN که جز گیاهان متحمل به خشکی به شمار می‌روند برای سازش با شرایط تنش، کاهش بیان *miR398* را نشان دادند. به دلیل افزایش مدت زمان تنش خشکی این گیاهان برای سازش با شرایط محیطی موجود و مبارزه با ROS بروز *miR398* را کاهش دادند. (Zhou et al. 2008) نشان دادند در آرابیدوپسیس تحت تنش سرما برخی miRNAها افزایش بیان نشان می‌دهند درحالی‌که *miR398* به صورت ملایم و گذرا افزایش بیان نشان داد. (Sunkar and Zhu 2004) با آنالیز توالی‌یابی با توان بالا کتابخانه small RNA تیمار شده با تنش سرما نشان داد که *miR398* تحت تنش سرما کاهش بیان نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر افزایش بیان ملایم *Pdu-miR398b* تحت هر دو تیمار تنش سرمایی در هر دو بافت بساک و تخمدان در ژنوتیپ حساس به سرما Sh12 بادام با نتایج (Zhou et al. 2008) مطابقت دارد ولی در تضاد با نتایج (Sunkar and Zhu 2004) می‌باشد. از طرف دیگر در ژنوتیپ متحمل به سرما H کاهش بیان *Pdu-miR39b* با نتایج (Sunkar and Zhu 2004) مطابقت دارد. تفاوت در بیان *miR398* در میان مطالعات مختلف ممکن است به خاطر تفاوت در گونه، ژنوتیپ (رقم)، دوره و مدت تنش سرما در مطالعات مختلف باشد (Zeng et al. 2010). پاسخ وابسته به ژنوتیپ miRNAها به تنش‌های غیرزیستی فقط در بین گونه‌های مختلف متفاوت نیست بلکه در میان ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه نیز متنوع است همان‌طوری‌که در این مطالعه بین ژنوتیپ حساس به سرما Sh12 و ژنوتیپ متحمل به سرما H این تفاوت دیده می‌شود. با کاهش بیان *Pdu-miR398b* در ژنوتیپ H که متحمل به سرما است احتمالاً این کاهش بیان در افزایش تحمل به سرما دخالت داشته است و همچنین ممکن است افزایش بیان این miRNA در ژنوتیپ Sh12 در حساسیت این ژنوتیپ به سرما نقش داشته باشد. به خوبی شناخته شده است که ژنوتیپ یک گونه گیاهی ممکن است در ظرفیت پاسخ به تنش غیرزیستی متفاوت باشد. تنظیم ژن وابسته به miRNA ممکن است به این تفاوت کمک کند (Zhang 2015).

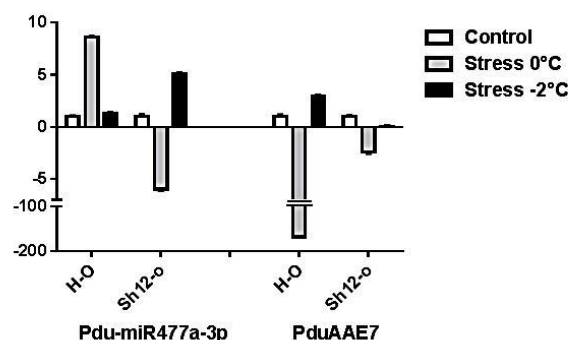
تغییرات بیان ژن هدف پیش بینی شده برای *Pdu-miR398b* به نام *pduDUF1639* تاکنون گزارش نشده است. گرچه مکانیسم عمل

¹ Domain of unknown function

این سطح تنش کاهش بیان معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) FC) $-3/84$ نشان داد. در مقایسه با مرحله ابتدایی تنش سرما، میزان افزایش بیان بالاتر *Pdu-miR477a-3p* در ژنوتیپ حساس به سرما پس از دو ساعت تیمار -2°C درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. پس با کاهش بیان *Pdu-miR477a-3p* در ژنوتیپ H که متحمل به سرما بوده می‌توان پیشنهاد کرد که این کاهش بیان در افزایش تحمل به سرما دخالت داشته است و افزایش بیان این *Pdu-miR477a-3p* در ژنوتیپ Sh12 در حساسیت این ژنوتیپ به سرما دخالت دارد.

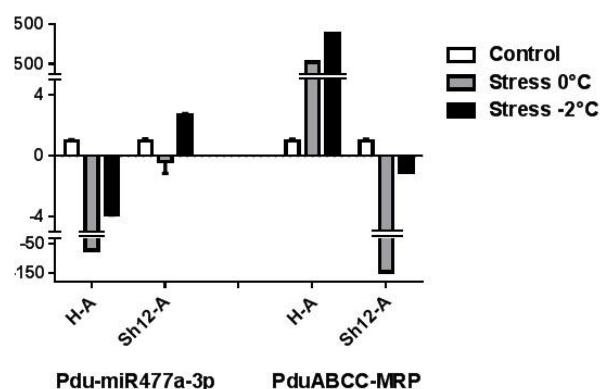


(a)

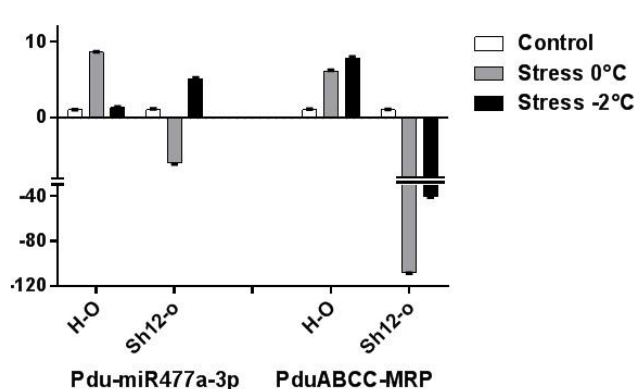


(b)

شکل ۲- مقایسه بیان *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف آن *PduAAE7* در دو سطح تنش صفر و -2°C در دو ژنوتیپ H و Sh12 در بافت بساک بادام (a) و بافت تخمدان (b)



(a)



(b)

شکل ۳- مقایسه بیان *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف آن *PduABCC-MRP* در دو سطح تنش صفر و -2°C در دو ژنوتیپ H و Sh12 در بافت بساک بادام (a) و بافت تخمدان (b)

یک منبع اصلی نیتروژن در گیاهان، به عنوان یک واسطه عمل می کند که در همگذاری کربن-نیتروژن برای رشد گیاهان و تکامل آن ها مشارکت دارد. برای تامین گلوتامین به میزان کافی، سلول های گیاهی از گلوتامین سنتتازها (GS) استفاده می کنند که شامل GS1 سیتوزولی و GS2 پلاستیدی می باشد. (Ji 2011) نشان داد که GS1 نسبت به استرس های محیطی مختلف پاسخ می دهد و همچنین در هومئوستاز گلوتامین دخیل است. به عنوان مثال، فعالیت GS1 در گوجه فرنگی پس از مواجهه با مقادیر مختلف NaCl افزایش می یابد (Debouba et al. 2006). بررسی پروتئین ها با ژل الکتروفورز دوبعدی نشان داد که GS1 در پاسخ به تیمار سرما تجمع می یابد (Kwon et al. 2007). با توجه به این یافته ها و القای *pduAAE7* تحت تنش سرما در این مطالعه، چنین برداشت می شود که *Pdu-miR477a-3p* با نقش تنظیمی روی *pduAAE7* از کاهش Gln که برای رشد و نمو ضروری است جلوگیری می کند و باعث تحمل در رقم متحمل به سرما H می گردد. از طرف دیگر در رقم حساس به سرما القاء بیان *Pdu-miR477a-3p* باعث کاهش میزان بیان ژن هدف و در نتیجه کاهش در سطوح متابولیت های اولیه شده و حساسیت به سرما افزایش می یابد.

ژن هدف دیگر *Pdu-miR477a-3p*، ABC transporter C family member 8-like می باشد که منطقه پروتئین های مقاومت چند دارویی (*PduABCC-MRP¹*) را کد می کند که افزایش بیان معنی داری (در سطح ۵ درصد) در بافت بساک و تخمدان پس از سه ساعت تیمار سرمایی صفر درجه سانتی گراد (به ترتیب FC ۲۵۸۰ و FC ۶/۱۱) و همچنین افزایش بیان معنی داری (در سطح یک درصد) پس از دو ساعت تیمار ۲-درجه سانتی گراد (FC ۷/۸۶) در بافت تخمدان ژنوتیپ متحمل به سرما H نشان داد. در مقابل کاهش بیان معنی دار (در سطح یک درصد) این ژن پس از سه ساعت تیمار سرمایی صفر درجه سانتی گراد (FC ۱۰۸/۲۹-) و همچنین کاهش بیان معنی دار (در سطح ۵ درصد) پس از دو ساعت تیمار ۲-درجه سانتی گراد (FC ۴۰/۶۹-) در بافت تخمدان در ژنوتیپ حساس به سرما Sh12 مشاهده شد. در بافت بساک

به نظر می رسد خانواده های سه miRNA شامل *MIR477*، *MIR482* و *MIR3627* در بین درختان میوه و همچنین درخت مدل سپیدار خیلی حفاظت شده باشند. (Solofoharivelo et al. 2014) Lu et al. (2008) بر اساس نتایج میکروآرای، ۱۹ عدد miRNA پاسخ دهنده به تنش سرما در سپیدار که از ۱۴ خانواده miRNA منشأ می گیرند شناسایی کردند. در مطالعه Sunkar and Zhu (2004) نیز در گیاه سپیدار در تنش سرما *miR168a,b* و *miR477a,b* افزایش بیان در حالی که *miR156g-j*، *miR475a,b* و *miR476a* کاهش بیان نشان دادند که با نتایج مطالعه حاضر در ژنوتیپ Sh12 و همچنین در ژنوتیپ H بادام در بافت تخمدان تحت تنش ۲- درجه سانتی گراد مطابقت دارد. ژن هدف *Pdu-miR477a-3p* یا *pduAAE7* در ژنوتیپ Sh12 عدم تغییر بیان معنی دار در بافت تخمدان و همچنین در بافت بساک ژنوتیپ دیرگل متحمل به سرما H تحت تنش سرمایی تیمار ۲- درجه سانتی گراد به مدت دو ساعت نشان داد. در مقابل کاهش بیان معنی دار (به ترتیب در سطوح ۵ و ۱ درصد) این ژن پس از سه ساعت تیمار صفر درجه سانتی گراد در دو بافت بساک و تخمدان مشاهده شد. همچنین این کاهش بیان در بافت تخمدان ژنوتیپ H تحت تیمار سرمایی مشابه دیده شد. بررسی روند تغییرات *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف *pduAAE7* آن تحت تیمارهای سرمایی رابطه معکوس آن ها را نشان می دهد. همچنین نتایج آزمون همبستگی بین کل داده های بیان *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف *pduAAE7* در هر دو ژنوتیپ و تحت هر دو تیمار تنش سرمایی همبستگی منفی (۰/۵۳-) را نشان داد، که می تواند گویای تنظیم منفی *pduAAE7* از طریق *Pdu-miR477a-3p* در این ژنوتیپ ها باشد.

ژن *AAE7* به طور اختصاصی برخی سوبستراهای با زنجیره کوتاه و متوسط را فعال می کند (Shockey et al. 2003). در مطالعه ای *AAE7* در مقادیر بالا در بافت های ریشه، ساقه، برگ و گل بیان شده است (Shockey et al. 2002). جهش در *AAE7* یا ژن *ACN1* (1 acetate non-utilizing) منجر به کاهش تقریباً ۵۰ درصدی در کربن ۱۳ نشانه گذاری شده گلوتامین که یک منبع اصلی کربن در جوانه ها است می شود، و منجر به کاهش چشم گیری در سطوح متابولیت های اولیه می شود (Allen et al. 2011). گلوتامین (Gln)،

¹ *Prunus dulcis* ABC transporter C family member 8-like-multiple resistance protein

به عنوان یک گیاه متحمل به سرما ولی عدم افزایش در ژنوتیپ Sh12 به عنوان ژنوتیپ حساس تحت تنش سرما نشان می دهد که این تنظیم کننده در تحمل این ژنوتیپ به سرما از طریق فرایندهایی مانند مکانیسم های سم زدایی کمک می کند. تنش سرما مولد تنش اکسیداتیو و سایر تنش ها می باشد (Chinnusamy et al. 2007). یکی از پاسخ های مشترک گیاهان نسبت به تنش های غیر زیستی القاء تنش اکسیداتیو است. گزارشات نشان می دهد، خسارت یخ زدگی در درختان منجر به تولید انواع گونه های فعال اکسیژن ROS (Reactive Oxygen Species) شده که منجر به تنش اکسیداتیو و صدمه دیدن ابرمولکول های مختلف درون سلولی می شود (Sandve et al. 2011; Thakur et al. 2010). عمدتاً انواع اکسیژن فعال هم چون رادیکال آزاد اکسیژن (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروژن ($OH^\cdot$) در کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی زوم و آپوپلاست سلول های گیاهی تولید می شوند (Halliwell 2006). گونه های فعال اکسیژن در تنش سرما و یخ زدگی ایجاد شده و می تواند باعث سرعت بخشیدن به پراکسیداسیون لیپیدها شود و در نتیجه بر سیالیت غشاء سلول اثر گذاشته و به علت تغییر در لیپیدهای غشاء موجب نفوذپذیری غشاء گردد (Tian et al. 2012). بنابراین این پاسخ موجب فعال شدن مکانیسم های مهار ROS در گیاهان می شود. برای جلوگیری از تجمع پراکسید هیدروژن در طی تنش های سرمایی سیستم دفاعی آنتی اکسیداتیو باید کارایی بالا داشته باشد. در مطالعه Ruelland et al. (2009) افزایش در غلظت آنتی اکسیدانت ها هم چون گلوکاتایون و آسکوربات در طی تنش سرما گزارش شده است. در واقع در هنگام تنش سرما که موجب القاء تنش اکسیداتیو می شود، برای جلوگیری از اکسیداسیون کنترل نشده، یکسری آنزیم های کلیدی مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و دیگر پراکسیدازها فعال می شوند که موجب سم زدایی H_2O_2 می شود (Roychoudhury et al. 2012; Gratao et al. 2008). مکانیسم های غیر آنزیمی نیز موجب سم زدایی ROS می شود که آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی اصلی مانند گلوکاتایون (GSH) و هم چنین ویتامین ها، فلاوونوئیدها، آلکالوئیدها و کارتنوئیدها

ژنوتیپ H عدم تغییر بیان معنی دار *PduABCC-MRP* (FC 1/05) پس از دو ساعت تیمار ۲- درجه سانتی گراد مشاهده شد. در مقایسه با مرحله ابتدایی تنش سرما، بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل به سرما پس از دو ساعت تیمار ۲- درجه سانتی گراد دارای میزان بالاتری بود (شکل ۳). بررسی روند تغییرات *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف *PduABCC-MRP* آن تحت تیمارهای سرمایی رابطه معکوس آن ها را نشان می دهد به طوری که در ژنوتیپ Sh12 با افزایش میزان بیان *Pdu-miR477a-3p* پس از دو ساعت تیمار ۲- درجه سانتی گراد در دو بافت در مقایسه با تیمار سرمایی اولیه، میزان بیان *PduABCC-MRP* کاهش یافت. در مقابل روند کاهش بیان *Pdu-miR477a-3p* در ژنوتیپ H در بافت تخمدان پس از دو ساعت تیمار ۲- درجه سانتی گراد در مقایسه با تیمار سرمایی اولیه و افزایش میزان بیان *PduABCC-MRP* مشاهده شد.

پروتئین های مرتبط با مقاومت چند دارویی ABC (-) ABCC (MRP)، یک زیرمجموعه از انتقال دهنده های ABC می باشند که در فرایندهای فیزیولوژیکی چندانگانه که شامل هومئوستاز سلولی، سم زدایی فلزی و انتقال کانزوگه های گلوکاتایون می باشد، دخیل می باشد (Bhati et al. 2015). در گونه های گیاهی مختلف، ژن های مرتبط با پروتئین های مقاومت دارویی چندانگانه که متعلق به زیرخانواده انتقال دهنده های ABC می باشند، شناسایی شده اند (Klein et al. 2006). که از جمله می توان به بیشتر از ۱۲۰ عضو در آرابیدوپسیس و برنج اشاره کرد (Rea 2007). اکثراً ولی نه همه پروتئین های ABC، پروتئین های نمایی سازمان یافته در غشاء هستند (انتقال دهنده های ABC) که انتقال بین غشایی انرژی گیرنده از MgATP را تعدیل و یا انتقال دهنده های دیگر را کنترل می کنند. این پروتئین ها در سم زدایی سلولی با انتقال مواد سمی از سیتوزول به واکوئل ها دخیل می باشند (Bhati et al. 2015). با توجه به این اطلاعات، ژنوتیپ های بادام متحمل به سرما احتمالاً در مسیری که MRP ها تنظیم می شوند، مکانیسم مشابهی دارند. همچنین نقش انتقال دهنده های ABC در انتقال کانزوگه های گلوکاتایون به واکوئل ها شناخته شده اند و گزارش شده تحت استرس Cd افزایش یافته است (Alvarez et al. 2015). احتمالاً در این مطالعه افزایش بیان انتقال دهنده ABC در ژنوتیپ H

می‌باشند (Ahmad et al. 2010). گیاهان از راهکارهای مختلف برای مقابله با سمیت استفاده می‌کنند. (Kim et al. 2007) گزارش کردند که ABC transporter ATPDR8 در تنش کادمیوم، در بیرون راندن کادمیوم از غشا پلاسمایی به سلول‌های اپیدرمی ریشه کمک می‌کند.

روش (RNA Ligase Mediated – RACE (RLM-RACE یک پیشرفت جدید در RACE کلاسیک می‌باشد (Shaefer 1995). تکثیر سریع انتهای cDNA (RACE) یک تکنیک بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز است. زمانی که یک توالی cDNA جزئی در دسترس باشد کلونینگ توالی‌های تمام طول cDNA را آسان می‌کند. به‌منظور تأیید این که آیا این ژن‌های هدف به‌طور مستقیم توسط برش هدایت‌شده miRNA و mRNA مورد نظر ما سرکوب شده‌اند از تکنیک تغییر یافته 5' RACE برای نقشه‌یابی جایگاه‌های برش استفاده می‌کنیم. 5' RACE اجازه نقشه‌یابی از انتهای 5' ژن هدف برش‌یافته را می‌دهد (Thiebaut et al. 2012). به‌منظور شناسایی محل برش *Pdu-miR477a-3p* روی ژن هدف *PduAAE7* و همچنین تأیید اینکه آیا ژن *PduAAE7* هدف مستقیم سرکوب شده توسط *Pdu-miR477a-3p* می‌باشد تکنیک تغییر یافته 5' RACE برای نقشه‌یابی محل برش استفاده شد. جهت بررسی محل برش *Pdu-miR477a-3p* بر روی ژن هدف پیش‌بینی شده *pduAAE7*، توالی‌های خوانش، آغازگر اختصاصی ژن و توالی مکمل *Pdu-miR477a-3p* بر روی کانتینگ ژن هدف پیش‌بینی شده *pduAAE7* نقشه‌یابی شد. سپس برای خوانش به‌دست آمده با توالی کانتینگ ژن هدف پیش‌بینی شده الگوریتم BLASTn انجام گرفت نتایج هم‌گذاری در شکل ۴ آمده است.

رونوشت RNA, *PduAAE7*

CTCCTTGCAA TGTCCCAAAAGGGCTTCCGAGT CACTCATA
CTTATGGTCTGTCTGAAACTTATGGCCCTCCACAGTATG
TGCTTGGAAGCCTGAGTGGGACTCACTTCCCTGTAACC
CAAGCAGACTTAACG CACGTC AAGGTGTTCCGGTACATTG
GTTTGGAGGGCTTAGATGTTTCAACCCCTCAGACTATGCA
ACCTGTTCCCGCAGATGGAGCTACCA TGGGAGAGATAATG
ATGCGGG GAAACCTTGTAAATGAAGGGTATTAAAGAACC

جایگاه محل اتصال
PdumiR477a-3p

شکل ۴- توالی رونوشت ژن هدف پیش‌بینی شده و توالی مکمل *Pdu-miR477a-3p* بر روی آن. توالی نوکلئوتیدی با فونت ایتالیک نشان‌دهنده توالی هم‌ردیف شده با توالی ژن هدف *PduAAE7* می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی با زیرخط نشان‌دهنده توالی آغازگر اختصاصی RACE *PduAAE7* می‌باشد.

منابع

- Afshari H, and Parvane T (2013). Study the effect of cold treatments on some physiological parameters of 3 cold resistance Almond cultivars. *Life Science Journal* 10:4-16.
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G and Sharma S, (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* 30:161-75.
- Allen E, Moing A, Wattis JA, Larson T, Maucourt M, Graham IA, Rolin D and Hooks MA (2011). Evidence that ACN1 (acetate non-utilizing 1) prevents carbon leakage from peroxisomes during lipid mobilization in Arabidopsis seedlings. *Biochemical Journal* 437:505-513.
- Alvarez S, Berla BM, Sheffield J, Cahoon RE, Jez JM and Hicks LM. (2009). Comprehensive analysis of the Brassica juncea root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics* 9:2419-2431.
- Arumaganathan K, Earle ED (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9:208-218.
- Axtell MJ (2008). Evolution of microRNAs and their targets: are all microRNAs biologically relevant. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779:725-734.
- Barakat A, Sriram A, Park J, Zhebentayeva T, Main D, and Abbott A (2012) Genome wide identification of chilling responsive microRNAs in *Prunus persica*. *BMC Genomics* 13:481.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics biogenesis mechanism and function. *Cell* 116:281-297.
- Bej S, and Basak J, (2014) MicroRNAs: The potential biomarkers in plant stress response. *American Journal of Plant Sciences* 5:748-759.
- Bhati KK, Sharma S, Aggarwal S, Kaur M, Shukla V, Kaur J, Mantri S and Pandey AK (2015) Genome-wide identification and expression characterization of ABCC-MRP transporters in hexaploid wheat. *Frontiers in Plant Science* 6:488.
- Bischoff V, Nita S, Neumetzler L, Schindelasch D, Urbain A, Eshed R, Persson S, Delmer D and Scheible WR (2010) Trichome birefringence and its homolog AT5G01360 encode plant-specific DUF231 proteins required for cellulose biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 153:590-602.
- Cao X, Wu Z, Jiang F, Zhou R and Yang Z (2014) Identification of chilling stress-responsive tomato microRNAs and their target genes by high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Genomics* 15:1130.
- Carrington JC and Ambros V (2003) Role of MicroRNAs in plant and animal development. *Science* 301:236-238.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT and Lao KQ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 33:e179-e179.
- Chen L, Zhang Y, Ren Y, Xu J, Zhang Z and Wang Y, (2012) Genome-wide identification of cold-responsive and new microRNAs in *Populus tomentosa* by high-throughput sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417:892-896.
- Chen Y, Jiang J, Song A, Chen S, Shan H, Luo H, Gu S, Sun J, Zhu L, Fang W and Chen F (2013). Ambient temperature enhanced freezing tolerance of *Chrysanthemum dichrum* CdICE1 Arabidopsis via miR398. *BMC Biology* 11:121.
- Chinnusamy V, Zhu J and Zhu JK (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Science* 12:444-451.
- Dai X and Zhao PX (2011) PsRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* 39:155-159.
- Debouba M, Gouia H, Suzuki A and Ghorbel MH (2006) NaCl stress effects on enzymes involved in N assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. *Plant Physiology* 163:1247-1258.
- Ding J, Zhou S and Guan J (2012). Finding microRNA targets in plants: Current status and perspectives. *Genomics Proteomics Bioinforma* 10:264-275.
- Dugas DV and Bartel B (2008). Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Molecular Biology* 67:403-417.
- Esmaili F, Shiran B, Mirakhorli N. and Fallahi H (2015). Study the expression pattern of miR159 and miR171 under drought stress in peach, almond and GN. *Modern Genetics Journal* 10: 407-416. (In Farsi).
- Gratao PL, Monteiro CC, Peres LEP and Azevedo RA (2008). The isolation of antioxidant enzymes from mature tomato (cv. Micro-Tom) plants. *HortScience* 43:1608-10.
- Guo P, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai G, Li R, Korff MV, Varshney RK, Graner A and Valkoun J (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* 60:3531-3544.
- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141:312-322.
- Häuser R, Pech M, Kijek J, Yamamoto H, Titz B, Naeve F, Tovchigrechko A, Yamamoto K, Szaflarski W, Takeuchi N, Stellberger Th, Diefenbacher ME, Nierhaus KH and Uetz P (2012) RsfA (YbeB) Proteins Are Conserved Ribosomal Silencing Factors. *PLoS Genetics* 8:e1002815.
- Imani A and Mahamadkhani Y (2011). Characteristics of almond selections in relation to late frost spring. *International Journal of Nuts and Related Sciences* 2:31-34.
- Imani A, Ezaddost M, Asgari F, Masoumi S and Raeisi I (2012). Evaluation the resistance of almond to frost in controlled and field conditions. *International Journal of Nuts and Related Sciences* 3:29-36.
- Jagadeeswaran G, Saini A and Sunkar R (2009) Biotic and abiotic stress downregulate miR398 expression in Arabidopsis. *Planta* 229:1009-1014.

- Ji Y (2011) The role of cytosolic glutamine synthetases in abiotic stress and development in *Arabidopsis thaliana*. Master thesis. University of Saskatchewan Saskatoon.
- Jia X, Wang WX, Ren L, Chen QJ, Mendu V, Willcut B, Dinkins R, Tang X, Tang G (2009) Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Plant Molecular Biology* 71:51-9.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP and Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57:19-53.
- Juszczak I and Baier M (2012). The strength of the miR398-Csd2-CCS1 regulon is subject to natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 586:3385-3390.
- Kim JY, Park SJ, Jang B, Jung CH, Ahn SJ, Goh CH, Cho K, Han O and Kang H (2007). Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *The Plant Journal* 50:439-51.
- Klein ML, Burla B and Martinoia E (2006) The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Letters* 580:1112-22.
- Koca I, Filizb E and Tombulogluc H (2015) Assessment of miRNA expression profile and differential expression pattern of target genes in cold-tolerant and cold-sensitive tomato cultivars. *Biotechnology and Biotechnology Equipment* 29:851-860.
- Kodad O, Morales F and Socias R (2010) Evaluación de la tolerancia de las flores de almendro a las heladas por la fluorescencia de clorofila. *Información Técnica Económica Agraria* 106:142-150.
- Kohli D, Joshi G, Deokar AA, Bhardwaj AR, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Srinivasan R and Jain PK (2014) Identification and characterization of wilt and salt stress-responsive MicroRNAs in chickpea through high-throughput sequencing. *PLOS One* 9: e108851.
- Kwon S. I. Bae M. S. Cho E. J. and Park O. K. (2007) Role of the methionine sulfoxide reductase MsrB3 in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 48:1713-1723.
- Lee H, Yoo SJ, Lee J, Kim W, Yoo SK, Fitzgerald H, Carrington JC and Ahn JH (2010). Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 38: 3081-3093.
- Li B, Duan H, Li J, Deng XW, Yin W and Xia X (2013) Global identification of miRNAs and targets in *Populus euphratica* under salt stress. *Plant Molecular Biology* 81:525-539.
- Liang G, Yang FX and Yu DQ (2010) MicroRNA 395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 62:1046-1057.
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA and Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14:836-843.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lu S, Sun YH, Amerson H and Chiang VL (2007) MicroRNAs in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and their association with fusiform rust gall development. *Plant Journal* 51 1077-1098.
- Lu S, Sun YH and Chiang VL (2008) Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *The Plant Journal* 55:131-151.
- Lv DK, Bai X, Li Y, Ding XD, Ge Y, Cai H, Ji W, Wu N and Zhu YM (2010) Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene* 459:39-47.
- Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP and Bartel B (2004) MicroRNA regulation of NAC domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Current Biology* 14:1035-1046.
- Martínez-Gómez P, Sánchez-Pérez R, Dicenta F, Howad W, Arús P and Gradziel TM (2007) Almond. In *Fruits and Nuts*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 229-242.
- Mawlong I, Ali K and Tyagi A (2016) Cloning and characterization of a water deficit stress responsive transcription factor gene from *Oryza sativa* L. *Indian Journal of Experimental Biology* 54:26-36.
- Miranda C, Santesteban G, Royo B and De Pamplona U, (2005) Variability in the relationship between frost temperature and injury level for some cultivated *Prunus* species. *Horticultural Science* 40:357-361.
- Molassiotis A and Fotopoulos V (2011). Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree. *Plant Signaling and Behavior* 6:210-214.
- Mousavi S, Alisoltani A, Shiran B, Fallahi H, Ebrahimie E, Imani A and Houshmand S (2014) De novo transcriptome assembly and comparative analysis of differentially expressed genes in *Prunus dulcis* Mill. in response to freezing stress. *PLOS One* 9:e104541.
- Pinheiro C and Chaves MM (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany* 62:869-882.
- Rea PA (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology* 58:347-375.
- Roychoudhury A, Basu S and Sengupta DN (2012). Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum* 34:835-847.
- Rubio-Piña JA and Zapata-Pérez O (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 14:11-18.
- Ruelland E, Marie-Noelle Vaultier MN and Hurry V (2009). Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research* 49:35-150.
- Sandve SR, Kosmala A, Rudi H, Fjellheim S, Rapacy M, Yamada T and Rognli OA (2011). Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates. *Plant science* 180:69-77.
- Shaefer B (1995) Revolution in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Analytical Biochemistry* 227:255-273.
- Shockey JM, Fulda MS and Browse J (2003) *Arabidopsis* contains a large superfamily of acyl-activating enzymes.

- Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme A synthetases. *Plant Physiology* 132:1065-1076.
- Shockey JM, Fulda MS and Browse JA (2002) Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiology* 129:1710-1722.
- Solomonharivelo MC, Walt AP, Stephan D, Burger JT and Murray SL (2014) MicroRNAs in fruit trees: discovery, diversity and future research directions. *Plant Biology* 16:856-865.
- Sun W, Julie Li YS, Huang HD, Shyy JY and Chien S (2010) MicroRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annual Review of Biomedical Engineering* 12:1-27.
- Sun X, Xu L, Wang Y, Yu R, Zhu X, Luo X, Gong Y, Wang R, Limera C, Zhang K and Liu L (2015) Identification of novel and salt-responsive miRNAs to explore miRNA-mediated regulatory network of salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics* 16:197.
- Sunkar R and Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2001-2019.
- Sunkar R, Kapoor A and Zhu JK (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18:2051-2065.
- Sunkar R, Li YF and Jagadeeswaran G (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Sci* 17:196-203.
- Takahashi S, Seki M, Ishida J, Satou M, Sakurai T, Narusaka M, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2004). Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a full-length cDNA microarray. *Plant Molecular Biology* 56:29-55.
- Tang Z, Zhang L, Xu C, Yuan S, Zhang F, Zheng Y and Zhao C (2012) Uncovering small RNA-mediated responses to cold stress in a wheat thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing. *Plant Physiology* 159:721-738.
- Thakur P, Kumar S, Malik JA, Berger JD and Nayyar H (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environmental and Experimental Botany* 67:429-443.
- Thiebaut F, Rojas CA, Almeida KL, Grativol C, Domiciano GC, Lamb CR, Engler Jde A, Hemerly AS and Ferreira PC (2012) Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. *Plant Cell and Environment* 35:502-12.
- Tian SK, Lu LL, Yang XE, Huang HG, Wang K and Brown PH (2012). Root adaptations to cadmium-induced oxidative stress contribute to Cd tolerance in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Biologia Plantarum* 56:344-50.
- Tian Y, Tian Y, Luo X, Zhou T, Huang Z, Liu Y, Qiu Y, Hou B, Sun D, Deng H, Qian Sh and Yao K (2014) Identification and characterization of microRNAs related to salt stress in broccoli using high-throughput sequencing and bioinformatics analysis. *BMC Plant Biology* 14:226.
- Trindade I, Capitao C, Dalmay T, Fevereiro MP and Santos DM (2010) MiR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 231:705-716.
- Tzfira T, Zuker A and Altman A (1998) Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application on future forests. *Trends Biotechnology* 16:439-446.
- 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.
- Wu S, Huang S, Ding J, Zhao Y, Liang L, Liu T, Zhan R, and He X (2010) Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene* 29:2302-2308.
- Yang W, Liu XD, Chi XJ, Wu CA, Li YZ, Song LL, Liu XM, Wang YF, Wang FW and Zhang CA (2011) Dwarf apple MbDREB1 enhances plant tolerance to low temperature drought and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Planta* 233:219-229.
- Yu X, Wang H, Lu Y, de Ruiter M, Cariaso M, Prins M, van Tunen A and He Y (2012). Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in *Brassica rapa*. *Journal of Experimental Botany* 63:1025-1038.
- Zeng HQ, Zhu YY, Huang SQ and Yang ZM (2010) Analysis of phosphorus-deficient responsive miRNAs and cis-elements from soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Plant Physiology* 167:1289-1297.
- Zhang B (2015) MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 66:1749-1761.
- 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* 10:449.
- Zhang Y, Zhu X, Chen X, Song Ch, Zou Zh, Wang Y, Wang M, Wanping F and Li X (2014) Identification and characterization of microRNAs in tea plant (*Camellia sinensis*) and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Plant Biology* 14:271.
- Zhao B, Ge L, Liang R, Li W, Ruan K, Lin H and Jin Y (2009) Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC Molecular Biology* 10:29.
- Zhou X, Wang G, Sutoh K, Zhu JK and Zhang W (2008) Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779:780-788.