ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴
صفحه ۴۱۶-۴۰۷

بررسی الگوی بیان *miR159* و *miR171* تحت تنش خشکی در هلو، بادام و GN

Study the expression pattern of *miR159* and *miR171* under drought stress in peach, almond and GN

فضیله اسماعیلی[۱]، بهروز شیران*[۱]، ندا میرآخورلی[۱]، حسین فلاحی[۲]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استاد، استادیار، دانشگاه شهرکرد، ایران
۲- استادیار، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

Esmaeili F[1], Shiran B[*2], Mirakhorli N[3], Fallahi H[4]

1. MSc Student, Professor, Assistant Professor, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Assistant Professor, Razi University, Kermanshah

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Beshiran45@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۸- تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

میکرو RNAها، RNAهای کوچکی هستند که هیچ پروتئینی کد نمی‌کنند و به عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی بیان ژن در یوکاریوت‌ها فعالیت دارند. *miR159* و *miR171* میکرو RNAهای مهمی هستند که در رشد و نمو گیاه و همچنین پاسخ به تنش نقش دارند. در این پژوهش نقش *miR159* و *miR171* به عنوان میکرو RNAهای کلیدی در برگ هلو و بادام و هیبرید GN بررسی شد. به این منظور دو سطح تنش ملایم و شدید خشکی جهت مقایسه با نمونه شاهد در نظر گرفته شد. استخراج RNA برای هر سه نمونه انجام شد و در مرحله بعد سنتز cDNA ساقه-حلقه صورت گرفت. همچنین بروز *miR171* و *miR159* با روش qRT-PCR بررسی شد. مقایسه بین نمونه شاهد و تنش، و بررسی معنی‌دار بودن بیان میکروRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها با استفاده از آزمون T-test دوتایی انجام شد. شبکه ژنی برای این میکروRNAها تحت تنش خشکی با استفاده از نرم‌افزار Pathway studio 7 رسم شد. نتایج، نشان داد که *miR159* و *miR171* به تنش خشکی پاسخ دادند. ژن‌های *MYB33* و *SCL6* به ترتیب به عنوان ژن هدف *miR159* و *miR171* به صورت بیوانفورماتیکی پیش‌بینی شدند. این دو ژن در رشد و نمو گیاه دخیل هستند. رشد ضعیف یکی از ویژگی‌های مشخص گیاهان تحت شرایط تنش به‌خصوص تنش خشکی است که باعث کاهش متابولیسم گیاه و تغییر مسیر منابع غذایی در جهت سازش با شرایط جدید می‌شود. *miR159* و *miR171* با توجه به ماهیت ژن هدف-شان در تنظیم و توسعه گیاه نقش داشتند و طی شرایط تنش، تغییر بیان معنی‌داری نشان دادند.

واژه‌های کلیدی

بادام
تنش خشکی
میکرو RNA
هلو
cDNA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]

مقدمه

میکرو RNA[1]ها، RNAهای کوچک غیر کد شونده هستند که بروز ژن را در گیاهان و حیوانات تنظیم می‌کنند (Jones-Rhoades et al. 2006). میکروRNAهای گیاهی اولین بار در آرابیدوپسیس گزارش شدند. این RNAها نقش مهمی در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی ایفا کرده و به عنوان تنظیم کننده‌های منفی بیان ژن در یوکاریوت‌ها فعالیت دارند (Jover-Gil et al. 2005). طول میکروRNAها در حیوانات ۲۲-۲۰ نوکلئوتید و در گیاهان ۲۴-۱۹ نوکلئوتید است (Reinhart et al. 2002; Bartel 2004). حضور نوکلئوتید اوراسیل در اولین مکان انتهای ´۳ میکرو RNAهای بالغ نشان می‌دهد که در همه اجداد گیاهی شامل خزه‌ها، بازدانه‌ها، تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها بصورت کاملا حفاظت شده هستند (Zhang et al. 2006). میکروRNAها از طریق قطعه قطعه کردن mRNAهای هدف و یا جلوگیری از ترجمه، فعالیت تنظیمی خود را اعمال می‌کنند (Unver et al. 2009). آن‌ها در گیاه نقش‌های مهمی از جمله رشد، هدایت سیگنال، تجزیه پروتئین، پاسخ به تنش‌های محیطی و هجوم عوامل بیماری‌زا و همچنین تنظیم بیوژنز خود را ایفا می‌کنند (Zhang et al. 2006). در این بین *miR159* از جمله میکروRNAهای درگیر در رشد و توسعه گیاهان به شمار می‌رود و نقش آن در سیگنال‌دهی هورمون‌های ABA و GA به اثبات رسیده‌است (Reyes and Chua 2007). Jones-Rhoades et al. (2006) چهار فاکتور رونویسی *MYB33*، *MYB65*، *MYB101* و *MYB104* را به عنوان ژن هدف برای *miR159* گزارش کردند. Achard et al. (2004) and Zhang et al. (2006) نقش *miR159* را در انتقال فاز رشدی گیاهان کشف و تنظیم ژن‌های *MYB33* و *MYB65* را توسط *miR159* در شروع گلدهی اثبات کردند و بیان داشتند که افزایش بیان *miR159* باعث تاخیر در گلدهی طی روزهای کوتاه شده‌است. همچنین *GAMYB* که تنظیم کننده مثبت *LEAFY* می‌باشد (عامل مهم در گسترش گلدهی) یکی دیگر از ژن‌های هدف *miR159* می‌باشد.

miR171 نیز یکی از میکروRNAهای درگیر در رشد و توسعه گیاهان است. بیان این میکروRNA توسط تنش‌های غیرزنده مانند شوری و خشکی سرکوب می‌شود (Zhang et al. 2011). ژن‌های هدف *miR171* فاکتورهای رونویسی خانواده *GRAS* مانند *SCL* و *SCR* هستند. مطالعات ثابت کرده که سه ژن *SCL1/2/4* در آرابیدوپسیس و چهار ژن دیگر آن در برنج با *miR171* جفت می‌شوند. خانواده ژنی *SCL* دارای نقش‌های زیادی شامل رشد و نمو گیاه، سیگنال‌دهی هورمون جیبرلین، گامتوژنز، شکل‌گیری مریستم جانبی است (Kantar et al. 2010). همچنین ژن *SCR* مورد هدف *miR171a/b/c* قرار می‌گیرد. این ژن یکی از عوامل مهم در تقسیم سلولی و رشد شعاعی ریشه بوده و در پاسخ به تنش‌ها مانند تنش خشکی شرکت می‌کند (Ma et al. 2011). هدف از این تحقیق بررسی نقش میکروRNAهای 171 و 159 در پاسخ به تنش خشکی و همچنین اثر تنظیمی آن‌ها در بروز ژن هدف مربوطه در هلو، بادام و هیبرید هلو- بادام GN می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پیش‌بینی ژن‌های هدف به روش بیوانفورماتیکی

شناسایی ژن هدف برای میکروRNAها بسیار ساده می‌باشد، چرا که توالی آن‌ها با توالی ژن‌های هدفشان به طور تقریبی یا کاملا مکمل هستند. این موضوع به خصوص در میان میکروRNAهای گیاهی بارزتر است (Bartel et al. 2004). miRNAها عموما به ناحیه 3'-UTR، و یا ناحیه رونویسی شونده mRNA هدف خود متصل می‌شوند و از بروز آن جلوگیری می‌کنند (Zhang et al. 2008). بنابراین می‌توان رونوشت‌های هدف یعنی همان توالی‌های مکمل miRNA را توسط الگوریتم Blast پیش‌بینی کرد (Zhang et al. 2007). برای یافتن ژن‌های هدف *miR159* و *miR171* از پایگاه اطلاعاتی Rose (http://210.218.199.249/rose/) استفاده شد. در این مرحله چند فاکتور مد نظر گرفته شد (Zhang et al. 2008 الف) تعداد ناجورجفت‌ها بین میکروRNA و هدف آن نباید از چهار عدد بیشتر باشد؛ ب) بین مکان بازهای ۱۰ و ۱۱ نباید ناجور جفت وجود داشته باشد. زیرا در این ناحیه برش اتفاق می‌افتد و منجر به تجزیه mRNA هدف می‌شود؛ ج) بیشتر از یک عدد ناجور جفت نباید بین مکان بازهای یک و نه وجود داشته باشد؛ د) تا سه عدد ناجور جفت بین مکان بازی ۲۳-۱۲ قابل قبول است؛ ه) سه ناجور جفت نباید پشت سرهم وجود داشته باشند. مشخصات ژن‌های هدف پیش‌بینی شده در جدول ۱ آمده‌است.

[1] Micro RNA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]

جدول۱- مشخصات ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای *miR159* و *miR171* با استفاده از سایت Rose

miRNA	Target symbol	Accession	Discription
miR159	MYB33, ATMYB33	ppa003628m	myb domain protein 3
miR171b	HAM3, ATHAM3	ppa001781m	GRAS family transcription factor

کشت نهال، اعمال تنش خشکی و نمونه‌گیری

تعداد هجده نهال شامل شش نهال هلو رقم جی.اچ.هیل، شش نهال بادام رقم سفید و شش نهال هیبرید هلو-بادام اسپانیایی " GN 15" که همگی از طریق رویشی تکثیر شده بودند و از نظر ژنتیکی کاملا یکسان بودند از مرکز تحقیقات کشاورزی استان چهارمحال بختیاری تهیه شد. در بهمن ماه ۱۳۹۰ تمام نهال‌های یکساله در گلدان‌های ده کیلوگرمی با ترکیب خاک (کمپوست و شن رودخانه به نسبت ۳ به ۱) کشت شدند و در گلخانه تحت شرایط کاملا کنترل شده (۱۶ ساعت نور، دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲±۱۵درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. عناصر غذایی مکمل و سمپاشی علیه آفات در گلدان‌ها انجام شد. اوایل فروردین ماه ۱۳۹۲ از برگ‌های جوان (سومین و چهارمین برگ از انتهای نهال) نمونه‌برداری صورت گرفت و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شدند و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه-گیری از برگ‌های جوان به منظور استخراج RNA با کیفیت بالا انجام شد چون در گیاه بادام با بالا رفتن سن برگ متابولیت‌های ثانویه افزایش یافته و شدیدا بر کیفیت RNA استخراجی اثر می-گذارد. نمونه‌گیری اولیه در شرایط آبیاری کامل گیاه (نمونه کنترل) صورت گرفت و تنش خشکی در شرایط بدون آبیاری گلدان‌ها به مدت هفت و ده روز اعمال شد. محتوای نسبی آب برگ[1] به عنوان شاخصی برای اطمینال از اعمال تنش خشکی در نظر گرفته شد و RWC طی ۱۲ روز اندازه‌گیری شد و در نهایت روز هفتم و دهم برای نمونه‌گیری انتخاب شد (Thapa et al. 2011). نمونه‌های روز هفتم به عنوان نمونه تنش ملایم و نمونه-های روز دهم به عنوان نمونه تنش شدید در نظر گرفته شد. به منظور کاهش خطا و جلوگیری از نوسانات حرارتی گلخانه‌ای کلیه نمونه‌گیری‌ها در ساعت ۱۰ صبح انجام شد در این بررسی از دو تکرار بیولوژیک نمونه‌گیری برای شرایط کنترل، تنش ملایم و شدید انجام شد.

استخراج RNA کل و سنتز cDNA اختصاصی میکروRNA

۱۰۰ میلی‌گرم از بافت مورد نظر (بافت برگ) با کمک هاون چینی استریل در نیتروژن مایع به خوبی کوبیده شده و برای استخراج RNA کل از روش Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011) استفاده شد (شکل۱). غلظت RNA با کمک دستگاه بیوفتومتر و طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. مقدار کل RNA برحسب میکروگرم در میکرولیتر محاسبه شد. همچنین جهت تعیین کیفیت RNA نیز میزان دو میکروگرم از هر نمونه روی ژل یک درصد آگارز، الکتروفورز شد تا نسبت به کیفیت بالای آن اطمینان حاصل شود. پس از اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای RNA ریبوزومی 18S و 28S و همچنین باند مربوط به RNA با وزن ملکولی کم[2]، تیمار آنزیمی DNaseI بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز برای تمامی نمونه‌ها اعمال شد. تیوب-های حاوی RNA جهت نگهداری، در دمای۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای ساخت cDNA میکروRNA، ابتدا آغازگرهای ساقه-حلقه طبق دستوالعمل Varkonyi-Gasic et al. (2007) و Chen et al. (2002) طراحی شد (جدول ۲).

پس از طراحی آغازگر، برای ساخت cDNA از روش Varkonyi-Gasic et al. (2007)، روش PCR ساقه-حلقه و آنزیم رونوشت-برداری معکوس[3] ساخت شرکت فرمنتاز استفاده شد. یک میکرولیتر RNA ۲۰۰ نانوگرم به همراه یک میکرولیتر آغازگر RT (100 µM) مخلوط شد و حجم واکنش با استفاده از آب DEPC به ۶/۵ میکرولیتر رسانده شد. جهت حذف ساختار ثانویه نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن سریعا به ظرف حاوی یخ منتقل شد. سپس دو

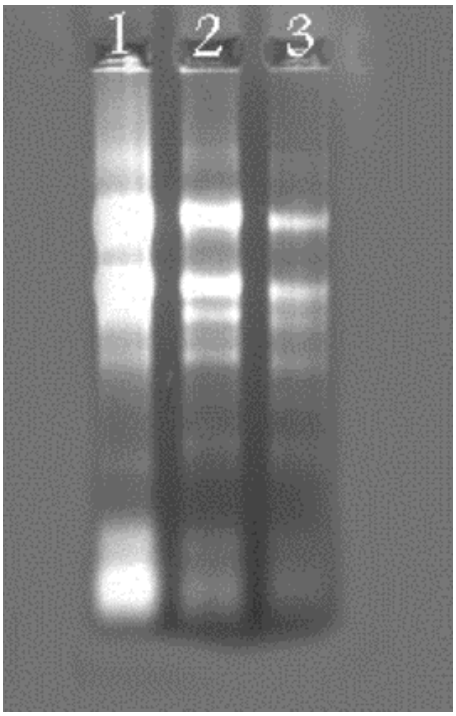
[1] Relative water content (RWC)

[2] Low molecular weight RNA

[3] Reverse transcriptase

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]

میکرولیتر بافر واکنش (5X)، یک میکرولیتر dNTP (10 mM)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم رونوشت برداری معکوس (200 u/µl) و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم RNase inhibitor (40 U/µL) به هر تیوب افزوده شد. حجم نهایی واکنش ۱۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. جهت ساخت cDNA برنامه حرارتی Stem-loop PCR با شرایط زیر اجرا شد: ۳۰ دقیقه ۱۶ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، یک ثانیه ۵۰ درجه سانتی‌گراد.



شکل۱- الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA کل استخراج شده به ترتیب یک تا سه در بادام ، هلو و GN بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز.

جهت تکثیر cDNA، یک میکرولیتر cDNA به همراه دو مکیرولیتر بافر واکنش (5X)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP(10 mM)، ۰/۴ میکرولیتر آغازگر رفت (10 µM)، ۰/۴ میکرولیتر آغازگر برگشت (10 µM) و ۰/۴ میکرولیتر آنزیم *Taq* polymerase مخلوط شد و حجم نهایی واکنش با استفاده از ۱۵/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل به ۲۰ رسانده شد. برنامه PCR نهایی[1] با شرایط زیر اجرا شد: دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (شکل۲).

سنتز cDNA برای ژن‌های هدف

طراحی آغازگر ژن‌های هدف با استفاده از سایت NCBI و نرم-افزار Primer3 صورت گرفت. در طراحی آغازگر برای ژن‌های هدف توجه به این نکته ضروری بود که حتما ناحیه مکمل با میکروRNA تکثیر شود. با در نظر گرفتن این ضرورت، برای ژن-های هدف آغازگر اختصاصی طراحی شد. آغازگرهای طراحی شده از نظر طول قطعه آغازگری، دمای اتصال، و عدم وجود آغازگر–دایمر توسط نرم‌افزار Vector NTI 10 آزمون شد. همچنین برای اطمینان از تکثیر صحیح، آغازگرها با ژنوم هلو Blast شدند. cDNA با استفاده الیگونوکلئوتیدهای Poly A و آنزیم رونوشت‌برداری معکوس ساخت شرکت فرمنتاز سنتز شد. یک میکرولیتر RNA ۲۰۰ نانوگرم به همراه یک میکرولیتر آغازگر oligo dt مخلوط شد و حجم واکنش با استفاده از آب DEPC به ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد. جهت حذف ساختار ثانویه نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن سریعا به ظرف حاوی یخ منتقل شد. سپس چهار میکرولیتر بافر (5X)، دو میکرولیتر dNTP (10 mM)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت‌برداری معکوس (200 U/µl) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RNase inhibitor (40 U/µl) به هر تیوب افزوده شد. مواد با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به خوبی مخلوط شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و برای اتمام واکنش ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. جهت حصول اطمینان از تکثیر صحیح cDNA ژن هدف برنامه PCR نهایی مشابه با برنامه اجرا شده برای میکروRNA انجام شد.

بررسی بروز *miR159* و *miR171* و ژن‌های هدف آن‌ها با استفاده از واکنش qRT-PCR

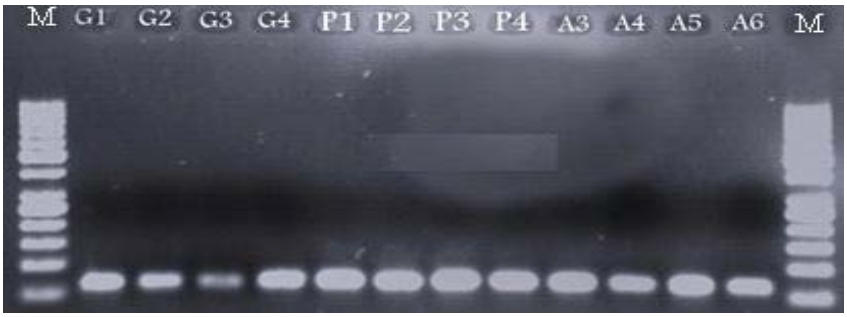
به منظور بررسی تغییرات بروز میکروRNAهای مورد بررسی و ژن‌های هدف آن‌ها از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی[2] استفاده شد. واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از مخلوط واکنش تاکارا، حاوی SYBR Green و آغازگر اختصاصی در

[1] End point PCR

[2] Real-time PCR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]



شکل۲- الکتروفورز محصول Endpoint PCR مربوط به *miR159* روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. به ترتیب از سمت راست ۴ نمونه نام-گذاری شده با حرف A مربوط به بادام، چهار نمونه نام‌گذاری شده با حرف P مربوط به هلو و چهار نمونه نام‌گذاری شده با حرف G مربوط به هیبرید GN می‌باشد. M سایز مارکر لدر 50 bp است و اندازه نوار تکثیر یافته حدود ۶۷ جفت باز می‌باشد.

جدول۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای *miR159* و *miR171* به همراه ژن‌های هدف آن‌ها (*MYB33* و *SCL6*)

RT primer- miR159	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACAAGAGC
RT primer- miR171	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACTGATAT
miR159-Forward primer	CGGCGGTGGAGTGACAGGA
miR171-Forward primer	TTCCTTTTGAGCCGTGCCA
Universal Primer	GTGCAGGGTCCGAGGT
MYB33-Forward primer	TGGAGCTCCCTTCACTCCAA
MYB33-Reverse primer	ATGGAGCAAAGCATCCAGCA
SCL6- Forward primer	ACTCGCGCAAGGGATATTGG
SCL6- Reverse primer	GGTGTTGGTGTGAAGGAGCA

دستگاه روتورژن، کیاژن آلمان انجام شد. ۱۲ میکرولیتر از مخلوط واکنش شامل شش میکرولیتر مخلوط واکنش تاکارا حاوی SYBR Green، یک میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر آغازگر رفت، یک میکرولیتر آغازگر برگشت و سه میکرولیتر آب مقطر استریل بود. این واکنش با چهار تکرار تکنیکی و دو تکرار بیولوژیک انجام شد. همچنین از ژن خانگی 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی در نرمال سازی نتایج qRT-PCR استفاده شد. بیان نسبی میکروRNA با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. مقایسه بین نمونه شاهد و تنش با استفاده از آزمون T-test دوتایی انجام شد.

رسم شبکه ژنی

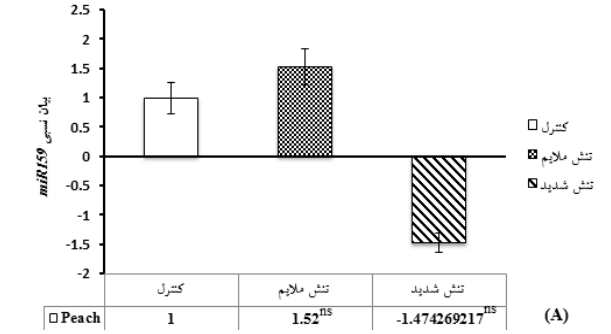
رسم تعامل‌های موجود برای *miR159* و *miR171* توسط نرم‌افزار پتوی استودیو ۷ انجام گرفت. برای این کار از پایگاه داده گیاهی RESNET موجود در این نرم‌افزار استفاده شد که شامل آخرین عملکردهای منسوب به ژن‌های گیاهی می‌باشد. این نرم‌افزار اطلاعات خودش را به کمک یک نرم‌افزار دیگر به نام MedScan که یک نرم‌افزار داده کاوی متن است جمع‌آوری می‌کند و سپس این اطلاعات را به یک فرم قابل درک و ارائه در می‌آورد.

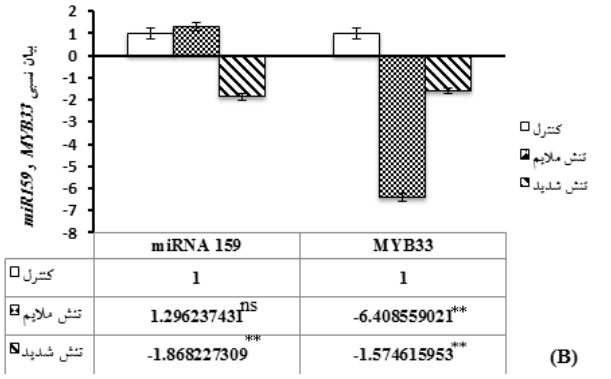
نتایج و بحث

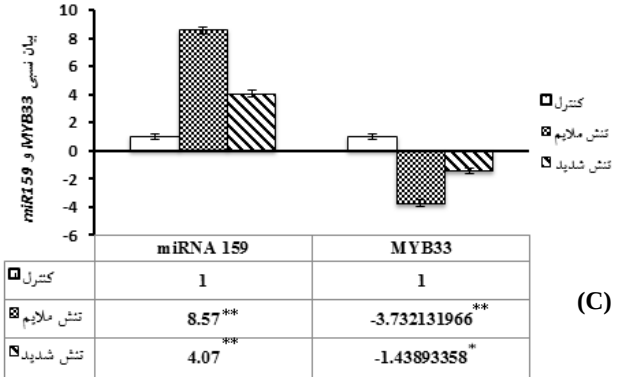
میزان محتوای نسبی آب برگ طی دوازده روز اندازگیری شد و با توجه به آن روز هفتم سطح تنش اول (ملایم) و روز دهم سطح تنش دوم (شدید) در نظر گرفته شد. مقدار RWC در نمونه‌های کنترل به ترتیب در هلو ۹۰ درصد و در بادام و GN15 ۸۸ درصد بود. با اعمال تنش خشکی میزان RWC روند کاهشی داشت و در روز هفتم در هلو، بادام و GN15 به ترتیب ۷۵ درصد ، ۷۹ درصد و ۸۰ درصد شد. این روند کاهشی تا روز دهم ادامه داشت و در روز دهم در هلو، بادام و GN15 به کمترین مقدار به ترتیب به ۶۷ درصد، ۶۹ درصد و ۷۲ درصد رسید. در روزهای دهم و دوازدهم این مقدار ثابت ماند. نتایج حاصل از qRT-PCR نشان داد که تغییرات بیان *miR159* در هر دو سطح تنش در هلو تغییرات

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]

ناچیزی داشته، اما در بادام طی تنش شدید کاهش معنی‌دار این میکروRNA مشاهده شد. در هیبرید GN افزایش بیان هشت و چهار برابری به ترتیب طی تنش ملایم و شدید مشاهده شد (شکل۳). *MYB33* به عنوان ژن هدف *miR159*، در بادام و GN که تغییرات بیان *miR159* در آن‌ها معنی‌دار بود، مورد بررسی قرار گرفت. همانطورکه در شکل۳ مشاهده می‌شود این ژن در بادام و GN در سطح تنش ملایم و شدید کاهش بیان معنی‌دار داشته‌است. نقش *miR159* در سیگنال‌دهی هورمون‌های ABA به اثبات رسیده‌است (Reyes and Chua 2007). ABA یک هورمون با چندین فعالیت است که در همه اندام‌ها و بافت‌های زنده گیاهان یافت می‌شود. اهمیت ABA در پاسخ به تنش توسط نقش آن در بستن روزنه‌ها، نگهداری رشد ریشه و جلوگیری از رشد اندام هوایی است. نتایج به دست آمده از الگوی بیان *miR159* در بادام، هلو و GN هماهنگ با مطالعات پیشین می‌باشد (Eldem et al. 2012; Sunkar et al. 2012). افزایش بیان *miR159* طی تنش خشکی رشد گیاه را به گونه‌ای تنظیم می‌کند تا انرژی گیاه در مسیر سازش با شرایط تنش مصرف شود. در هلو طی تنش ملایم و شدید تغییرات معنی‌داری در بیان این میکروRNA مشاهده نشد، بنابراین *miR159* در سازگاری این گیاه در شرایط خشکی نقش مهمی نداشت. در بادام بیان *miR159* در شرایط تنش ملایم، افزایش و ژن هدف آن کاهش بیان را نشان داد. اگرچه بیان میکروRNA و ژن هدف به صورت معکوس بود، اما از آنجا که افزایش بیان *miR159* معنی‌دار نبود، بنابراین احتمال می‌رود که مکانیسم تنظیمی دیگری بروز ژن هدف را طی تنش ملایم کاهش داده‌است، در تنش شدید بیان این *miR159* همسو با ژن هدف آن کاهش یافته‌است. این موضوع می‌تواند به دلیل تنظیم ژن هدف روش ناهماهنگ[1] باشد. این نوع تنظیم بیان زمانی رخ می‌دهد که میکروRNA در یک سلول و ژن هدف آن در سلول مجاور باشد (Siani et al. 2012) و یا اینکه مکانیسم دیگری به جز miRNA در تنظیم بیان این ژن دخالت دارد (شکل۳). در GN بیان *miR159* طی دو سطح تنش افزایش یافته و بیان ژن هدف آن کاهش داشته‌است. طی تنش ملایم، افزایش بیان *miR159* بیشتر بوده و به موازات آن، ژن هدف نیز به میزان بیشتری کاهش





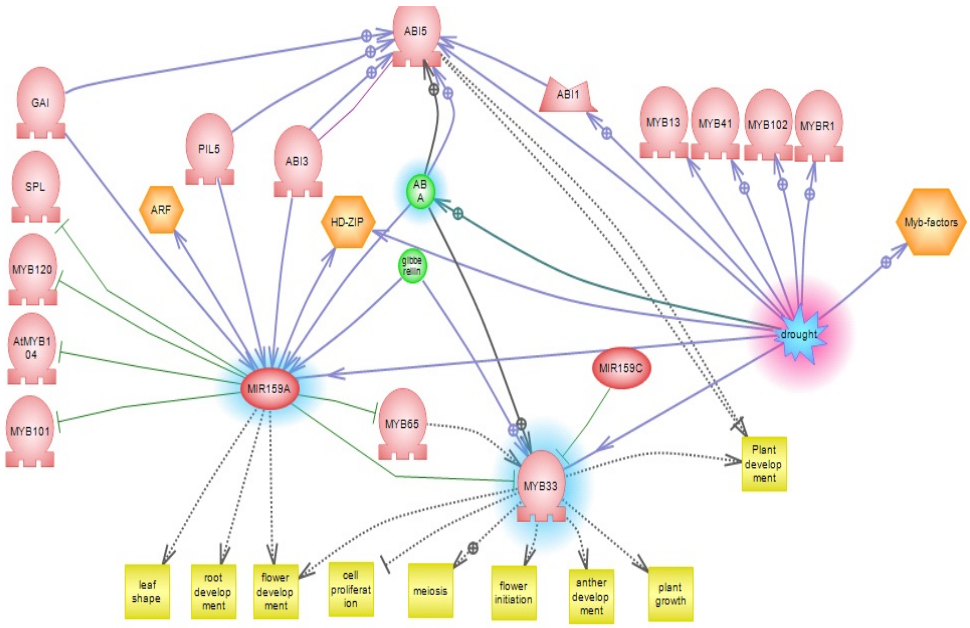


شکل۳- الگوی بیان *miR159* و ژن هدف آن (*MYB33*) در بافت برگ هلو (A)، بادام (B) و GN (C) تحت تیمار تنش خشکی در مقایسه با نمونه کنترل. ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد

یافت. در سطح تنش شدید افزایش بیان *miR159* نسبت به سطح ملایم کمتر است و ژن هدف آن نیز کاهش کمتری داشته‌است. این هماهنگی در تغییرات بیان miRNA و ژن هدف آن موید تنظیم ژن *MYB33* توسط *miR159* در گیاه GN است. ABA به عنوان هورمون تنش شناخته می‌شود و غلظت آن طی شرایط تنش افزایش می‌یابد. افزایش غلظت هورمون ABA باعث جلوگیری از

[1] Non-coherent

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]



شکل۴- شبکه برهم‌کنش‌های موجود برای *miR159* در شرایط تنش خشکی

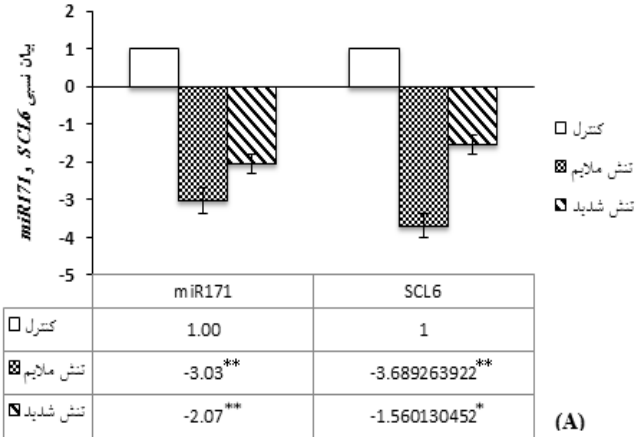
رشد اندام هوایی و پاسخ به تنش می‌شود و از آنجا که *miR159* در سیگنال‌دهی ABA نقش دارد، افزایش بیان آن طی شرایط تنش کاملا منطقی است و یک مکانیسم مقاومتی به شمار می‌رود. همچنین گیاه در شرایط تنش سعی در جلوگیری از رشد و توسعه اندام هوایی خود جهت ذخیره انرژی دارد. از طرفی ژن *MYB33* در رشد و نمو گیاه نقش دارد. بنابراین منطقی به نظر می‌رسد طی شرایط تنش بیان آن کاسته شود و این فرآیند توسط افزایش بیان *miR159* انجام می‌شود. در نتیجه *miR159* در GN نقش مهمی در تحمل خشکی دارد.

نتایج حاصل از رسم شبکه برهم‌کنش‌های موجود برای *miR159* سرکوب چهار ژن *MYB104/101/65/33* را توسط این میکروRNA نشان داد (شکل ۴). همچنین حضور هورمون‌های آبسیزیک اسید و جیبرلین نقش *miR159* را در سیگنال‌دهی این دو هورمون تایید کرد. همانطور که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود تنش خشکی باعث افزایش غلظت هورمون ABA می‌شود و این موضوع باعث تجمع *miR159* طی تنش خشکی می‌شود. در مطالعه حاضر *MYB33* به عنوان ژن هدف انتخاب شد و شبکه رسم شده نقش آن را در فرآیندهای بیولوژیکی مختلف از جمله رشد و نمو گیاه و همچنین شروع و نمو گلدهی نشان داد. متقابلا تنش خشکی باعث رشد ضعیف می‌شود و از رشد و نمو گیاه طی شرایط تنش جلوگیری می‌کند. بنابراین در شرایط تنش بیان ژن *MYB33* باید کاسته شود و *miR159* این تنظیم منفی را انجام می‌دهد. همچنین شبکه نشان می‌دهد که *miR159* در رشد و نمو ریشه نیز نقش دارد.

نتایج حاصل از روش qRT-PCR کاهش بیان *miR171* را در سطح تنش ملایم و شدید در هلو نشان داد. همچنین در بادام بروز این میکروRNA در سطح تنش ملایم نسبت به حالت کنترل تغییری محسوسی نداشت در حالی‌که در سطح تنش شدید کاهش معنی‌دار نشان داد. در GN نیز بیان *miR171* در سطح تنش ملایم دو برابر شد (شکل ۵). یکی از ژن‌های درگیر در رشد و نمو، به عنوان ژن هدف این میکروRNA انتخاب شد. این ژن با نام *SCL6* یک عامل رونویسی[1] از خانواده بزرگ عوامل رونویسی GRAS یا SCARECROW LIKE می‌باشد. نتایج حاصل از روش qRT-PCR نشان داد بروز این ژن در هلو، بادام و GN در سطح تنش ملایم و شدید کاهش یافته‌است (شکل ۵). در مطالعه حاضر در هلو، بادام و GN هم *miR171* و هم ژن هدف آن به طور همزمان الگوی کاهش بیان از خود نشان داده‌اند (شکل ۵).

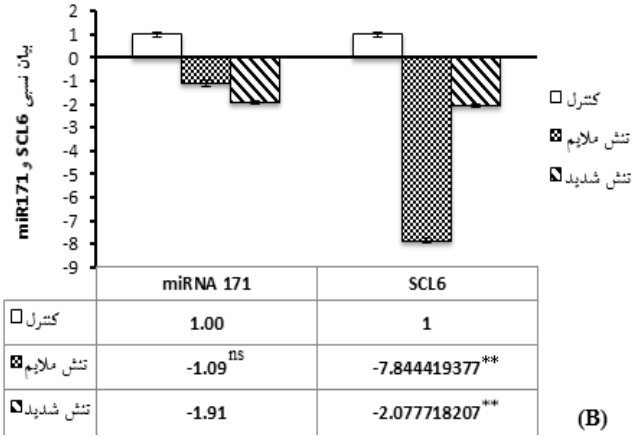
[1] Transcription factor

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]



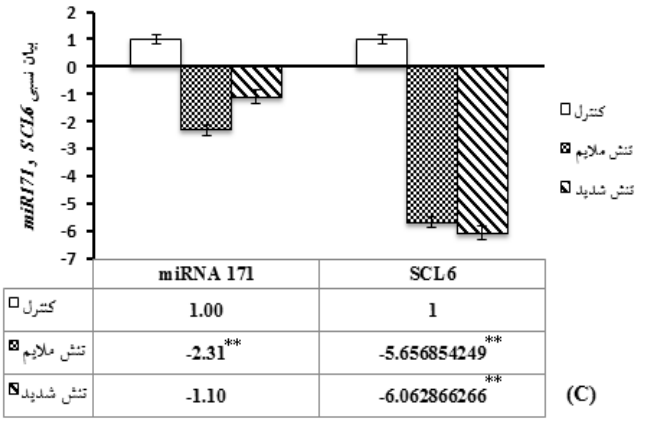
	miR171	SCL6
کنترل	1.00	1
تنش ملایم	-3.03**	-3.689263922**
تنش شدید	-2.07**	-1.560130452*

(A)



	miRNA 171	SCL6
کنترل	1.00	1
تنش ملایم	-1.09ns	-7.844419377**
تنش شدید	-1.91	-2.077718207**

(B)



	miRNA 171	SCL6
کنترل	1.00	1
تنش ملایم	-2.31**	-5.656854249**
تنش شدید	-1.10	-6.062866266**

(C)

شکل۵- الگوی بیان *miR171* به همراه ژن هدف (*SCL6*) در بافت برگ هلو (A)، بادام (B) و GN (C) تحت تیمار تنش خشکی در مقایسه با نمونه کنترل. ns ، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد.

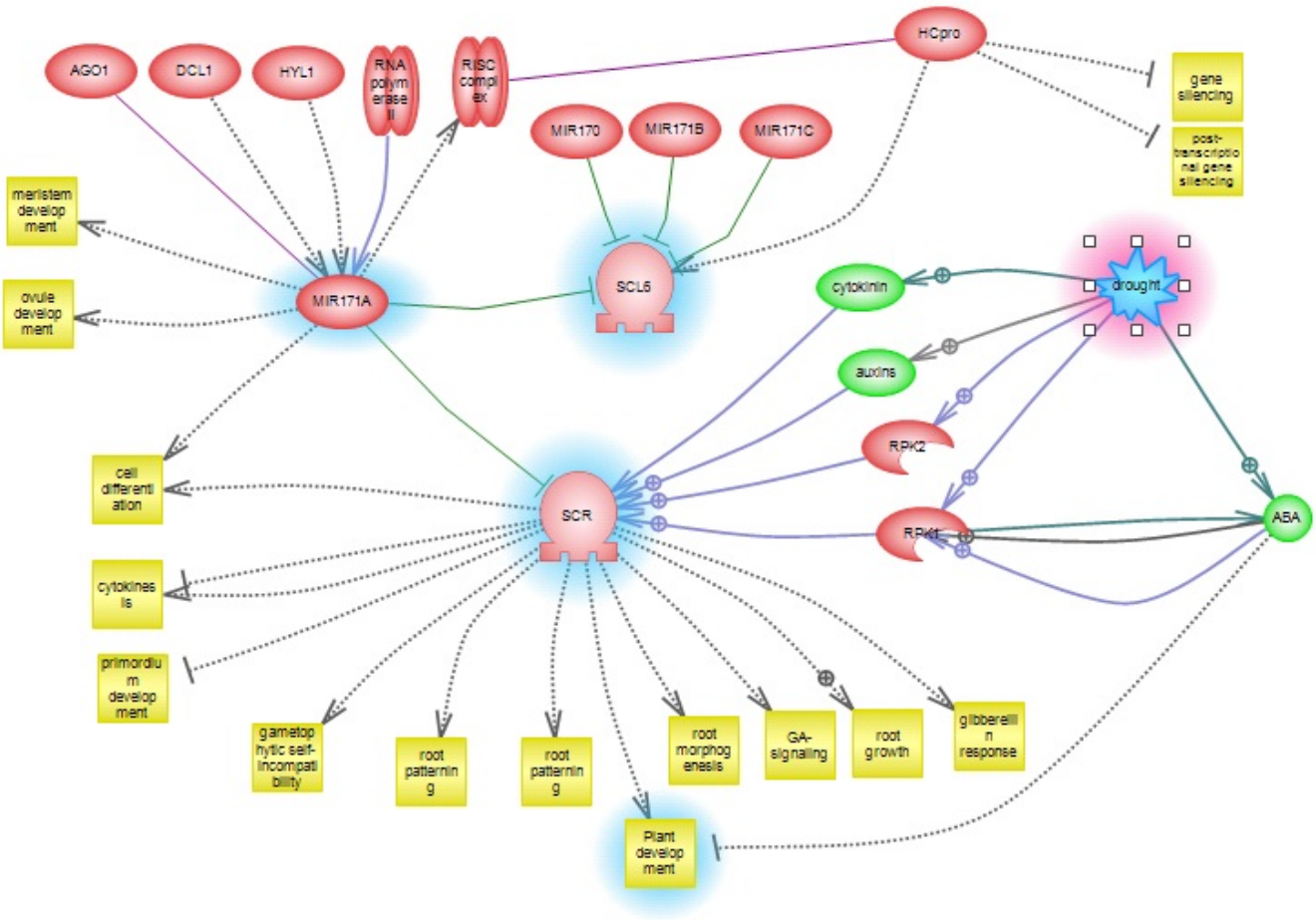
این موضوع می‌تواند به دلیل تنظیم ژن هدف توسط این میکروRNA به روش ناهماهنگ باشد. در واقع کاهش بیان ژن *SCL6* در پاسخ به تنش خشکی استراتژی گیاه جهت کاهش متابولیسم و ذخیره انرژی برای مبارزه و سازش با شرایط تنش است. اما نتایج مربوط به کاهش بیان *miR171* پیشنهاد می‌کنند که مکانیسم‌های دیگری در زمینه تنظیم بیان ژن *SCL* وجود دارد و *miR171* تنها تنظیم کننده بیان آن نمی‌باشد زیرا نتایج رسم شبکه ژنی نشان داد که این ژن علاوه بر *miR171* توسط *miR170* نیز تنظیم می‌شود (شکل ۶).

نتایج حاصل از رسم شبکه تعامل‌های موجود برای *miR171* در شرایط تنش خشکی در شکل۶ نشان داده شده‌است. همانطور که مشاهده می‌شود، بیان ژن‌های *SCL6* و *SCR* توسط *miR171* سرکوب می‌شود. تنش خشکی نیز مستقیما بروز ژن *SCL6* را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اما در مورد ژن *SCR* این تنظیم به واسطه دو پروتئین کیناز با نام‌های RPK1 و RPK2 اتفاق می‌افتد. پروتئین‌های کینازی جز گروه پروتئین‌های تنظیمی به شمار می‌آیند و در تنظیم سیگنال‌های انتقال دهنده و بیان ژن‌های پاسخ دهنده به تنش نقش دارند. شبکه ژنی نشان داد که تنش خشکی و هورمون ABA باعث افزایش بیان این دو پروتئین شده و آن‌ها نیز به نوبه خود بیان ژن *SCR* را افزایش می‌دهند. این ژن در رشد ریشه نقش دارد بنابراین کاهش بیان *miR171* جهت افزایش بیان این ژن طی شرایط خشکی مورد انتظار است. نتایج حاصل از شبکه نشان داد که ژن *SCL6* علاوه بر *miR171* توسط *miR170* نیز سرکوب می‌شود. بنابراین تغییرات بیان همسوی این ژن و *miR171* می‌تواند به دلیل هدف قرار دادن ژن *SCL6* توسط *miR170* در سه گیاه مورد بررسی باشد.

رشد ضعیف یکی از ویژگی‌های مشخص گیاهان تحت شرایط تنش به خصوص تنش خشکی است که باعث کاهش متابولیسم گیاه و تغییر مسیر منابع غذایی در جهت سازش با شرایط جدید می‌شود. *miR159* و *miR171* با توجه به ماهیت ژن هدف‌شان در تنظیم و توسعه گیاه نقش داشتند و طی شرایط تنش، تغییرات بیان معنی‌داری نشان دادند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]



شکل۶- شبکه برهمکنش‌های موجود برای *miR171* در شرایط تنش خشکی

سپاسگزاری

از دانشگاه شهرکرد در تامین بخشی از هزینه‌های این تحقیق کمال تشکر را داریم. همچنین از آقای دکتر اسماعیل ابراهیمی برای کمک در رسم شبکه ژنی سپاسگزاریم.

منابع

Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. Development 131:3357-3365.
Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116:281-297.
Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Research 33:e179-e179.
Eldem V, Akçay UÇ, Ozhuner E, Bakır Y, Uranbey S, Unver T (2012) Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing. PloS One 7:e50298.
Jones-Rhoades MW, Bartel D, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annual Review of Plant Biology 57:19-53.
Jover-Gil S, Candela H, Ponce M, (2005) Plant microRNAs and development. International Journal of Developmental Biology 49:733.
Kantar M, Unver T, Budak H (2010) Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. Functional and Integrative Genomics 10:493-507.
Ma Z, Coruh C, Axtell MJ (2011) Arabidopsis lyrata small RNAs: transient miRNA and small interfering RNA loci within the Arabidopsis genus. Plant Cell 22:1090-1103.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]

Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. Genes and Development 16:1616-1626.
Reyes JL, Chua NH (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. Plant Journal 49:592-606.
Rubio-Piña JA, Zapata-Pérez O (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. Electronic Journal of Biotechnology 14:11-11.
Saini A, Li Y, Jagadeeswaran G, Sunkar R (2012) Role of microRNAs in Plant Adaptation to Environmental Stresses. In MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses 219-232.
Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. Trends in Plant Science 17:196-203.
Thapa G, Dey M, Sahoo L, Panda SK (2011) An insight into the drought stress induced alterations in plants. Biologia Plantarum 55, 603-613.
Unver T, Namuth-Covert DM, Budak H (2009) Review of current methodological approaches for characterizing microRNAs in plants. International Journal of Plant Genomics. doi: 10.1155/2009/262463
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 3:12.
Zhang B, Pan X, Stellwag EJ (2008) Identification of soybean microRNAs and their targets. Planta 229:161-182.
Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA (2006) Conservation and divergence of plant microRNA genes. Plant Journal 46:243-259.
Zhang B, Wang Q, Wang K, Pan X, Liu F, Guo T, Anderson TA (2007) Identification of cotton microRNAs and their targets. Gene 397:26-37.
Zhang X, Zou Z, Zhang J, Zhang Y, Han Q, Hu T, Ye Z (2011) Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the *sft* mutant. Febs Letters 585:435-439.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.11.1]