ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٦
صفحه ٦٤١ - ٦٢٧

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[١]، محمد ربیعی*[١]، بهروز شیران[١]

١- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

Ghazanfari F[1], Rabiei M[*1], Shiran B[1]

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: ٩٦/٠٤/٢٠ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١٢/١٣)

چکیده

بادام (*Prunus dulcis* Mill.) به‌عنوان 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 تاثیر قرار می‌دهد. از آنجایی‌که miRNAها نقش مهمی در تنظیم پاسخ به تنش از طریق تاثیر متقابل بر mRNAهای هدفشان دارند، در این مطالعه برای اولین‌بار 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 ٢- 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 ٢- درجه سانتی‌گراد در بافت‌های بساک و تخمدان رقم حساس به سرما Sh12 افزایش بیان داشت، در حالی‌که 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 به‌عنوان 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

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 (Afshari and Parvane 2013).

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 ali. 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 آرابیدوپسیس (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 آرابیدوپسیس کاهش می‌یابد (Sunkar et al. 2006).

تحقیقات مختلفی miRNAهای پاسخ‌دهنده به سرما را در گونه‌های گیاهی مختلف مانند، آرابیدوپسیس (Sunkar and Zhu 2004; Liu et al. 2008)، 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

2009) معرفی کرده‌اند. در مطالعات مختلف در گیاهان گزارش شده‌است که *miR156/157*، *miR159/319*، *miR165/166*، *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 Lu et al. (2008) 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 معمولا خانواده فاکتورهای رونویسی را مورد هدف قرار می‌دهند. بدین ترتیب این miRNAها را تنظیم کننده‌های 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-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* 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-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* و ژن‌های هدف آن‌ها این آزمایش در دو سطح تنش سرما شامل صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد در بافت‌های تخمدان و بساک بادام در دو ژنوتیپ دیرگل و نسبتا 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 ٦ سال انجام گرفت، بدین ترتیب که تعداد ٥-٤ شاخه تقریبا مشابه با طول ٤٠-٢٠ 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 ٥ درصد قرار گرفتند. نمونه‌برداری بافت‌های تخمدان و بساک از ١٢-١٠ غنچه از یک شاخه معین به‌عنوان یک تکرار بیولوژیک انجام پذیرفت. به‌منظور اعمال تنش ابتدا نمونه‌ها را به مدت ٣ ساعت در دمای صفر درجه سانتی‌گراد قرار داده و نمونه‌برداری برای هر ژنوتیپ با سه تکرار انجام گرفت. سپس دما را به ٢- درجه سانتی‌گراد کاهش داده و به مدت دو ساعت نمونه‌ها در این دما قرار گرفتند. نمونه‌برداری (دو تکرار بیولوژیک) از بافت‌های تخمدان و بساک (١٢-١٠ عدد تخمدان و بساک در هر تکرار) در هر دو تیمار صفر درجه سانتی‌گراد و دو ساعت ٢- درجه سانتی‌گراد برای هر دو ژنوتیپ انجام شد. همچنین ١٢-١٠ عدد بافت‌های مادگی و بساک از یک شاخه در هر تکرار بیولوژیک به‌عنوان کنترل در دمای ١٠ 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 پایین تر از ٣- 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 ٣- درجه سانتی‌گراد برای بررسی مولکولی بافت تخمدان (به‌علت صدمه به این بافت) مناسب نمی‌باشد. نمونه‌ها در یخچال ٨٠- 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

توالی‌یابی RNAهای کوچک در مطالعه Karimi et al. (2016) با نمونه‌های گیاهی مشابه و شرایط تنش مشابه استفاده شد.

karimi et al. (2016) با توالی‌یابی microRNAهای بافت بساک و تخمدان بادام تحت تنش سرما برخی miRNAهای پاسخ دهنده به تنش سرما از جمله *Pdu-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* را گزارش نمودند که تایید آن‌ها در این تحقیق با روش qPCR صورت گرفت.

طراحی آغازگر برای بررسی بیان miRNA توسط نرم‌افزار miRNA Primer Designer و بررسی بیان ژن هدف توسط نرم‌افزار Primer3 انجام گرفت. هم‌چنین طراحی آغازگر برای انجام 5′RLM-RACE با نرم‌افزار 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 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 miRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها سه مرحله به‌ترتیب سنتز cDNA، بررسی محصول توسط End point PCR و به‌منظور تایید و هم‌چنین بررسی تغییرات بروز آن‌ها تحت تنش سرما واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز 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 نمونه‌ی 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) به‌عنوان کنترل داخلی در نرمال‌سازی نتایج qPCR استفاده شد.

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

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 به‌دست 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 5′RACE DNA آداپتور الیگونوکلئوتیدی 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 به‌عنوان 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 به‌عنوان خویشاوند نزدیک بادام و گیاه مدل در خانواده Rosaceae، تعداد ۱۱۷ miRNAهای حفاظت شده شناسایی شد که شش microRNA حفاظت شده (*Pdu-miR162*، *Pdu-miR166d*، *Pdu-miR394b*، *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.

به‌منظور 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 دسترس می‌باشد.

از آنجایی‌که 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 Plant 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 به‌دست آمده از طریق سایت psRNATarget مورد بررسی قرار گرفت (Dai and Zhao 2011). به‌منظور 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

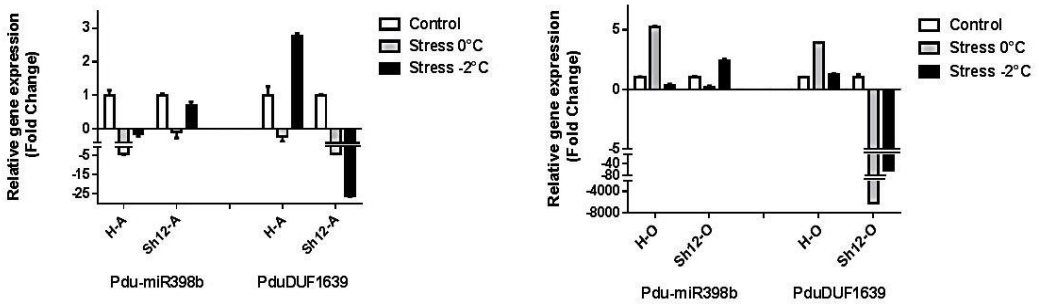
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

در بافت تخمدان ژنوتیپ دیرگل متحمل به سرما H تحت تیمار سرمایی صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد نیز دیده شد. در تنش ۲- درجه سانتی‌گراد افزایش بیان معنی‌دار این miRNA (در سطح ۵ درصد) در بافت تخمدان ژنوتیپ Sh12 (۲/٤۱ FC) و هم‌چنین ژنوتیپ H (۵/۲۳ FC) 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 ۲- درجه سانتی‌گراد کاهش بیان (۰/۱۵ FC-) 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 پیش بینی 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 ۲- درجه سانتی‌گراد به ترتیب به 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 (۰/۲۷-) 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 احتمالا پاسخ‌دهنده به سرما در ژنوتیپ H باشند دخیل باشند نه *pduDUF1639*.

[1] Cytosolic copper, zinc superoxide dismutase1
[2] Chloroplastic copper, zinc superoxide dismutase2

جدول۲- ژن‌های هدف پیش‌بینی شده *Pdu-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* استخراج شده از سایت NCBI

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



(a) (b)

شکل۱- مقایسه بیان *Pdu-miR398b* و ژن هدف آن *PduDUF1639* در دو سطح تنش صفر و ۲°C- در دو ژنوتیپ Sh12 و H در بافت بساک بادام (a) و بافت تخمدان (b)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

miR398 یکی از microRNAهای مهم است که در پاسخ به تنش اکسیداتیو و همئوستازی مس نقش دارد و اولین miRNA گزارش شده‌است که در تنش اکسیداتیو با کاهش بیان نقش تنظیمی خود را ایفا می‌کند (Axtell 2008). گزارش شده‌است که *miR398b* در پاسخ به تنش سرما نیز نقش دارد (Jagadeeswaran et al. 2009). این miRNA در تنش‌های زیستی و غیرزیستی درگیر است و با تنظیم میزان اکسیژن آزاد درون سلولی نقش خود را اعمال می‌کند. *miR398* یک میکرو RNA حفاظت شده‌است که در آرابیدوپسیس با ۳ مکان ژنی *MIR398a*، *MIR398b* و *MIR398c* کد می‌شود. توالی *MIR398b* و *MIR398c* یکسان است ولی *MIR398a* در یک نوکلئوتید در قسمت ′۳ با آن‌ها تفاوت می‌کند (Sunkar and Zhu 2004). بیان *miR398b/c* بیشتر از *miR398a* می‌باشد که باعث اثر تنظیم‌کنندگی قوی‌تر آن‌ها می‌شود (Juszczak and Baier 2012). *miR398* حداقل چهار mRNA را در آرابیدوپسیس مورد هدف قرار می‌دهد: (۱) مس/روی سوپراکسایددیسموتاز۱سیتوزولی (CSD1)، (۲) CSD2 کلروپلاستی، (۳) یک زیر واحد میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز c، *COX5b1,2-4* و (٤) چپرون مس برای سوپراکساید دیسموتاز (CCS1) که کوفاکتور مس را به آن‌ها (۱، ۲ و ۳) تحویل می‌دهد (Jia et al. 2009; Jagadeeswaran et al. 2009). *miR398* دو ژن کدکننده سوپراکسیددیسموتاز مس،CSD1 و CSD2 را تنظیم منفی می‌کند. آنزیم CSD دارای مس به‌عنوان کوفاکتور است. هنگامی‌که میزان اکسیژن آزاد درون سلولی افزایش می‌یابد با کاهش بیان miR398 بیان ژن‌های کدکننده سوپراکسیددیسموتازها افزایش یافته و مانع از صدمه دیدن گیاه توسط اکسیژن آزاد می‌شود. در نتیجه *miR398* در پاسخ به تنش نقش دارد و به تنش اکسیداتیو پاسخ می‌دهد. *miR398* توسط فقدان و کمبود مس نیز القا می‌شود و همئوستازی مس را از طریق قطعه قطعه کردن CDSI mRNA نگهداری می‌کند. افزایش یا کاهش بیان *miR398* بستگی به شرایط فیزیولوژیکی گیاه دارد. کاهش بیان *miR398* در پاسخ به تنش اکسیداتیو جهت کاهش سطح ROS اتفاق می‌افتد و افزایش بیان آن جهت حفظ مس روی می‌دهد (Sunkar et al. 2012). مطالعات مختلف نشان دادند که تعدادی از miRNAها تحت شرایط تنش هم افزایش بیان و هم کاهش بیان نشان می‌دهند و پاسخ miRNAها به تنش‌های 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 ۳-٤ ساعت ABA یا تنش شوری القا می‌شود و پس از ٤٨ ساعت سرکوب شده و نهایتاً در طول تنش‌های بیش‌تر از ۷۲ ساعت دوباره تجمع پیدا می‌کند. در مقابل تنظیم پویای *miR398* در آرابیدوپسیس وجود ندارد و *miR398* به‌صورت یکنواخت در طول تنش سرکوب می‌شود. بیان ژن هدف *miR398* (SOD یا CSD) کاملا همبستگی معکوس با سطح *miR398* دارد. *miR398* در تنش‌های اکسیداتیو، شوری، اسید آبسیسیک، استفاده از ساکارز و تغییر دماهای شدید متفاوت باعث یک تغییر فوری در سطح‌های CSD می‌شود (Dugas and Bartel 2008; Yu et al. 2012; Lee et al. 2010). بیان زیاد CSD گیاهان را از تنش‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند و تحمل نسبت به تنش یخ‌زدگی را در گیاهان تراریخته افزایش می‌دهد (Sunkar et al. 2006). مکانیسم اصلی مسیر CSD–miR398 در تحمل نسبت به یخ‌زدگی است ولی هنوز کاملاً شناسایی نشده‌است (Chen et al. 2013). Cu/zn SODs (superoxide dimutases) ژن‌های هدف *mir398* می‌باشند که سطح بیان آن‌ها با سرما و تنش‌های اکسیداتیو در آرابیدوپسیس کاهش می‌یابد (Sunkar et al. 2006). در مطالعات انجام شده روی *miR398* تحت تنش خشکی Sunkar et al. (2012) افزیش بیان *miR398* را در یونجه، گندم وحشی و سپیدار گزارش کردند، آن‌ها بیان داشتند که این افزایش بیان در برگ بسیار بیش‌تر از ریشه است. smRNAs پاسخ‌دهنده به دما به‌طور عمده در شرایط تنش دمایی شناسایی شده‌اند. گلدهی اولین صفتی می‌باشد که با تغییرات شدید دما متاثر می‌شود. مطالعات مقایسه‌ای نشان داده است که *miR156*، *miR169*، *miR172* و *miR398* میکرو RNAهای پاسخ‌دهنده به تنش‌های 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، هم‌چنین 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 تنش‌های بیش از ۷۲ ساعت

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

گزارش کردند. با افزایش مدت زمان تنش خشکی، بادام و GN که جز گیاهان متحمل به خشکی به‌شمار 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* به‌صورت ملایم و گذرا افزایش بیان نشان داد. Sunkar and Zhu (2004) با آنالیز توالی‌یابی با توان بالا کتابخانه small RNA تیمارشده 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 به‌خاطر 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 احتمالا 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. به‌خوبی 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* به‌نام *pduDUF1639* تاکنون گزارش نشده‌است. گرچه مکانیسم عمل اکثر DUFها مشخص نشده‌است 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 DUF[1]ها نیز می تواند 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* به‌عنوان یک تنظیم کننده منفی سرماسازگاری عمل می‌کند. جهش در پروتئین DUF، *ESKIMO 1* باعث افزایش تحمل به یخ‌زدگی در آرابیدوپسیس می‌شود که اهمیت آن‌ها در پاسخ به تنش را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر القاء 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 به‌نام TBL در سنتز و جابجایی سلولز دیواره ثانویه، احتمالا 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 القاء بیان معنی‌دار *Pdu-miR398b* و کاهش بیان معنی‌دار ژن هدف آن *PduDUF1639* در رقم حساس به سرما Sh12 و تحت تنش سرمایی ۲- درجه سانتی‌گراد نشان داد که *PduDUF1639* احتمالا 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.

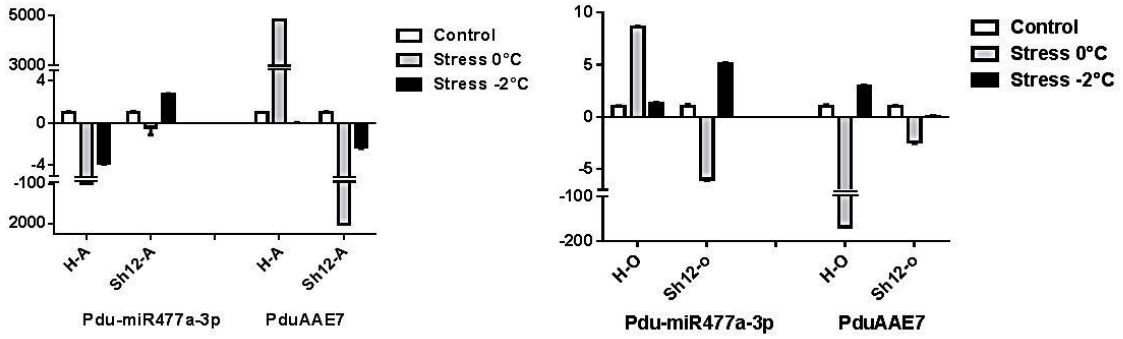
به‌منظور بررسی میزان بیان *Pdu-miR477a-3p* و رابطه آن با ژن‌های هدف آن (*pduAAE7* و *pduABCC-MRP*)، مقایسه بیان آن‌ها در بین ژنوتیپ‌های بادام تحت تنش سرما از طریق PCR در زمان واقعی صورت گرفت (شکل ۲). در ژنوتیپ دیرگل حساس به سرما Sh12، کاهش بیان غیر معنی‌دار *Pdu-miR477a-3p* در

[1] Domain of unknown function

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]

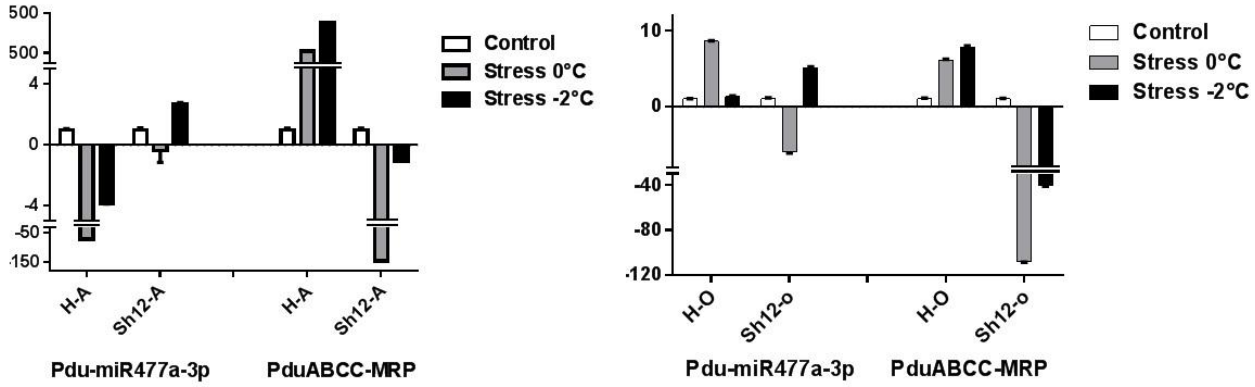
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

دو بافت بساک و تخمدان تحت تنش سرمایی صفر درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت را مشاهده شد. هم‌چنین این کاهش بیان در بافت بساک ژنوتیپ دیرگل متحمل به سرما H نیز دیده شد. در حالی‌که در ادامه تنش پس از دو ساعت تیمار در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد افزایش بیان معنی‌دار این miRNA (در سطح یک درصد) در بافت بساک ژنوتیپ Sh12 (FC ۲/۷۱) و افزایش بیان غیر معنی‌دار این miRNA در بافت تخمدان هر دو ژنوتیپ دیرگل متحمل و حساس به سرما (به‌ترتیب،FC ۱/۳۱ و ۵/۱) مشاهده شد. بافت بساک ژنوتیپ دیرگل متحمل به سرما در این سطح تنش کاهش بیان معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) (FC ۳/۸٤-) 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 ۲- 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)

شکل۲- مقایسه بیان *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف آن *PduAAE7* در دو سطح تنش صفر و ۲- °C در دو ژنوتیپ Sh12 و H در بافت بساک بادام (a) و بافت تخمدان (b)



(a) (b)

شکل۳- مقایسه بیان *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف آن *PduABCC –MRP* در دو سطح تنش صفر و ۲- °C در دو ژنوتیپ Sh12 و H در بافت بساک بادام (a) و بافت تخمدان (b)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

به‌نظر می‌رسد خانواده‌های 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 میکرواری، ۱۹ عدد miRNA پاسخ‌دهنده به تنش سرما در سپیدار که از ١٤ خانواده miRNA منشا می‌گیرند شناسایی کردند. در مطالعه Sunkar and Zhu (2004) نیز در گیاه سپیدار در تنش سرما *miR168a,b* و *miR477a,b* افزایش بیان در حالی‌که *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 سانتی‌گراد مطابقت دارد. ژن هدف *Pdu-miR477a-3p* یا *pduAAE7* در ژنوتیپ Sh12 عدم تغییر بیان معنی‌دار در بافت تخمدان و هم‌چنین در بافت بساک ژنوتیپ دیرگل متحمل به سرما H تحت تنش سرمایی تیمار ۲- درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت نشان داد. در مقابل کاهش بیان معنی‌دار (به‌ترتیب در سطوح ۵ و ۱ درصد) این ژن پس از سه ساعت تیمار صفر درجه سانتی‌گراد 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 آن‌ها را نشان می‌دهد. هم‌چنین نتایج آزمون همبستگی بین کل داده‌های 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 می‌تواند گویای تنظیم منفی *pduAAE7* از طریق *Pdu-miR477a-3p* در این ژنوتیپ‌ها باشد.

ژن *AAE7* به‌طور اختصاصی برخی سوبستراهای با زنجیره کوتاه و متوسط را فعال می‌کند (Shockey et al. 2003). در مطالعه‌ای *AAE7* در مقادیر بالا در بافت‌های ریشه، ساقه، برگ و گل بیان شده‌است (Shockey et al. 2002). جهش در *AAE7* یا ژن *ACN1* (acetate non-utilizing 1) منجر به کاهش تقریبا ۵۰ درصدی در کربن ۱۳ نشانه‌گذاری شده گلوتامین که یک منبع اصلی کربن در جوانه‌ها است می‌شود، و منجر به کاهش چشم‌گیری در سطوح متابولیت‌های اولیه می‌شود (Allen et al. 2011). گلوتامین (Gln)، یک منبع اصلی نیتروژن در گیاهان، به‌عنوان یک واسطه عمل می‌کند که در همگذاری کربن-نیتروژن برای رشد گیاهان و تکامل آن‌ها مشارکت دارد. برای تامین گلوتامین به‌میزان کافی، سلول‌های گیاهی از گلوتامین سنتتازها (GS) استفاده می‌کنند که شامل GS1 سیتوزولی و GS2 پلاستیدی می‌باشد. Ji (2011) نشان داد که GS1 نسبت به استرس‌های محیطی مختلف پاسخ می‌دهد و همچنین در هومئوستاز گلوتامین دخیل است. به‌عنوان مثال، فعالیت GS1 در گوجه‌فرنگی پس از مواجهه با مقادیر مختلف NaCl افزایش می‌یابد (Debouba et al. 2006). بررسی پروتئین‌ها با ژل الکتروفورز دوبعدی نشان داد که GS1 در پاسخ به تیمار سرما تجمع می‌یابد (Kwon et al. 2007). با توجه به این یافته‌ها و القای *pduAAE7* تحت تنش سرما در این مطالعه، چنین برداشت می‌شود که *Pdu-miR477a-3p* با نقش تنظیمی روی *pduAAE7* از کاهش Gln که برای رشد و نمو ضروری است جلوگیری می‌کند و باعث تحمل در رقم متحمل به سرما H می‌گردد. 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 متابولیت‌های اولیه شده و حساسیت به سرما افزایش می‌یابد.

ژن هدف دیگر *Pdu-miR477a-3p*، ABC transporter C family member 8-like می‌باشد که منطقه پروتئین‌های مقاومت چند دارویی (*PduABCC-MRP*[1]) را کد می‌کند که افزایش بیان معنی‌داری (در سطح ۵ درصد) در بافت بساک و تخمدان پس از سه ساعت تیمار سرمایی صفر درجه سانتی‌گراد (به‌ترتیب FC ۲۵۸۰ و FC ٦/١١) و همچنین افزایش بیان معنی‌داری (در سطح یک درصد) پس از دو ساعت تیمار ۲-درجه سانتی‌گراد (FC ٧/٨٦) در بافت تخمدان ژنوتیپ متحمل به سرما H نشان داد. در مقابل کاهش بیان معنی‌دار (در سطح یک درصد) این ژن پس از سه ساعت تیمار سرمایی صفر درجه سانتی‌گراد (FC ١٠٨/٢٩-) و هم‌چنین کاهش بیان معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) پس از دو ساعت تیمار ۲-درجه سانتی‌گراد (FC ٤٠/٦٩-) در بافت تخمدان در ژنوتیپ حساس به سرما Sh12 مشاهده شد. در بافت بساک

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

ژنوتیپ H عدم تغییر بیان معنی‌دار *PduABCC–MRP* (FC ۱/۰۵) پس از دو ساعت تیمار ۲- درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد دارای میزان بالاتری بود (شکل ۳). بررسی روند تغییرات *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف *PduABCC–MRP* آن تحت تیمارهای سرمایی رابطه معکوس آن‌ها را نشان می‌دهد به طوری‌که در ژنوتیپ Sh12 با افزایش میزان بیان *Pdu-miR477a-3p* پس از دو ساعت تیمار ۲- درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد در مقایسه با تیمار سرمایی اولیه و افزایش میزان *بیان PduABCC–MRP* مشاهده شد.

پروتئین‌های مرتبط با مقاومت چند دارویی ABCC (ABCC-MRP)، یک زیرمجموعه از انتقال‌دهنده‌های ABC می‌باشند که در فرایندهای فیزیولوژیکی چندگانه که شامل هومئوستاز سلولی، سم زدایی فلزی و انتقال کانژوگه‌های گلوتاتیون می‌باشد، دخیل می‌باشد (Bhati et al. 2015). در گونه‌های گیاهی مختلف، ژن‌های مرتبط با پروتئین‌های مقاومت دارویی چندگانه که متعلق به زیرخانواده انتقال‌دهنده‌های ABC می‌باشند، شناسایی شده‌اند (Klein et al. 2006). که از جمله می‌توان به بیشتر از ۱۲۰ عضو در آرابیدوپسیس و برنج اشاره کرد (Rea 2007). اکثرا ولی نه همه پروتئین‌های ABC، پروتئین‌های نمایی سازمان یافته در غشاء هستند (انتقال‌دهنده‌های ABC) که انتقال بین غشایی انرژی گیرنده از MgATP را تعدیل و یا انتقال‌دهنده‌های دیگر را کنترل می‌کنند. این پروتئین‌ها در سم‌زدایی سلولی با انتقال مواد سمی از سیتوزول به واکوئل‌ها دخیل می‌باشند (Bhati et al. 2015). با توجه به این اطلاعات، ژنوتیپ‌های بادام متحمل به سرما احتمالا در مسیری که MRPها تنظیم می‌شوند، مکانیسم مشابهی دارند. همچنین نقش انتقال‌دهنده‌های ABC در انتقال کانژوگه‌های گلوتاتیون به واکوئل‌ها شناخته شده‌اند و گزارش شده تحت استرس Cd افزایش یافته است (Alvarez et al. 2015). احتمالا در این مطالعه افزایش بیان انتقال‌دهنده ABC در ژنوتیپ H به‌عنوان یک گیاه متحمل به سرما ولی عدم افزایش در ژنوتیپ Sh12 به عنوان ژنوتیپ حساس تحت تنش سرما نشان می‌دهد که این تنظیم کننده در تحمل این ژنوتیپ به سرما از طریق فرایندهایی مانند مکانیسم‌های سم‌زدایی کمک می‌کند. تنش سرما مولد تنش اکسیداتیو و سایر تنش‌ها می‌باشد (Chinnusamy et al. 2007). یکی از پاسخ‌های مشترک گیاهان نسبت به تنش‌های غیر زیستی القاء تنش اکسیداتیو است. گزارشات نشان می‌دهد، خسارت یخ‌زدگی در درختان منجر به تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن ROS (Reactive Oxygen Species) شده که منجر به تنش اکسیداتیو و صدمه دیدن ابرمولکول‌های مختلف درون سلولی می‌شود (Sandve et al. 2011; Thakur et al. 2010). عمدتا انواع اکسیژن فعال هم‌چون رادیکال آزاد اکسیژن (O^{2-})، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروژن (OH^-) در کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی‌زوم و آپوپلاست سلول‌های گیاهی تولید می‌شوند (Halliwell 2006). گونه‌های فعال اکسیژن در تنش سرما و یخ‌زدگی ایجاد شده و می‌تواند 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 مکانیسم‌های مهار ROS در گیاهان می‌شود. برای جلوگیری از تجمع پراکسید هیدروژن در طی تنش‌های سرمایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیداتیو باید کارایی بالا داشته باشد. در مطالعه Ruelland et al. (2009) افزایش در غلظت آنتی-اکسیدانت‌ها هم‌چون گلوتاتیون و آسکوربات در طی تنش سرما گزارش شده‌است. در واقع در هنگام تنش سرما که موجب القاء تنش اکسیداتیو می‌شود، برای جلوگیری از اکسیداسیون کنترل نشده، یکسری آنزیم‌های کلیدی مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و دیگر پراکسیدازها فعال می‌شوند که موجب سم‌زدایی H_2O_2 می‌شود (Roychoudhury et al. 2012؛ Gratao et al. 2008). مکانیسم‌های غیر آنزیمی نیز موجب سم‌زدایی ROS می‌شود که آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی اصلی مانند گلوتاتیون (GSH) و هم‌چنین ویتامین‌ها، فلاوونوئیدها، آلکالوئیدها و کارتنوئیدها

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

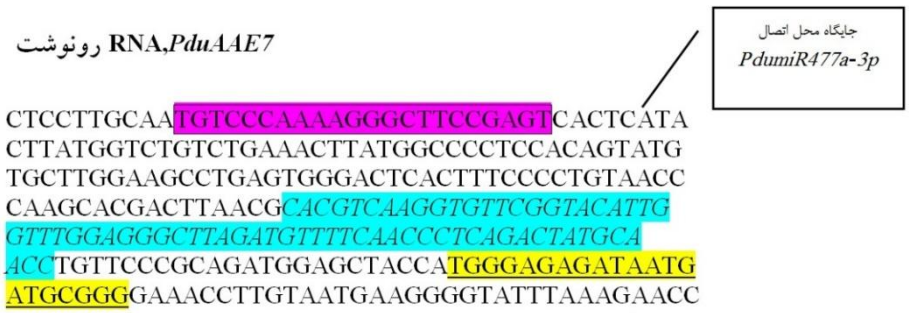
می‌باشند (Ahmad et al. 2010). گیاهان از راهکارهای مختلف برای مقابله با سمیت استفاده می‌کنند. Kim et al. (2007) گزارش کردند که ABC transporter ATPDR8 در تنش کادمیوم، در بیرون راندن کادمیوم از غشا پلاسمایی به سلول‌های اپیدرمی ریشه کمک می‌کند.

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 پلیمراز است. زمانی‌که یک توالی cDNA جزیی در دسترس باشد کلونینگ توالی‌های تمام طول cDNA را آسان می‌کند. به‌منظور تأیید این‌که آیا این ژن‌های هدف به‌طور مستقیم توسط برش هدایت‌شده miRNAها 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 تایید 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، آغازگراختصاصی ژن و توالی مکمل *Pdu-miR477a-3p* بر روی کانتیگ ژن هدف پیش‌بینی شده *pduAAE7* نقشه‌یابی شد. سپس برای خوانش به‌دست آمده با توالی کانتیگ ژن هدف پیش‌بینی شده الگوریتم BLASTn انجام گرفت نتایج هم‌گذاری در شکل ٤ آمده است.

همانطور که در نتایج دیده می‌شود مشابهت در طول توالی با رونوشت *pduAAE7* دیده می‌شود ولی طول توالی هم‌ردیف شده با آن کوتاه است. با توجه به نتایج به‌دست آمده پیشنهاد می‌شود که *Pdu-miR477a-3p* احتمالا دارای چندین جایگاه برش باشد. Wu et al. (2010) گزارش کردند که miRNAهایی وجود دارند که می‌توانند چندین ژن را مورد هدف قرار دهند و همچنین miRNAهایی هستند که می توانند یک ژن را تنظیم کنند. هر چند در محل برش نتیجه توالی‌یابی miRNA ناقص است ولی نتایج حاصل تایید کننده احتمالی ژن هدف می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

بادام به‌عنوان گیاه مهم اقتصادی خسارات زیادی را در مراحل ابتدایی گلدهی تا نمو میوه در اثر سرمای اواخر زمستان و اوایل بهار متحمل می‌شود. مطالعه مکانیسم گیاه در پاسخ و تحمل تنش‌های محیطی به کمک بررسی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی برای اصلاح گیاهان متحمل به تنش سرما و یخ‌زدگی ضروری است. miRNAها با توجه به ماهیت ژن هدفشان در تنظیم نمو گیاه نقش دارند. شناسایی رابطه بین miRNAها و ژن‌های هدف در سطح تنش می‌تواند به درک تنظیمات ژن‌ها پس از رونویسی و انتخاب اهداف در مهندسی ژنتیک گیاهان کمک نماید. در مطالعه حاضر بیان *Pdu-miR398b* و *Pdu-miR477a-3p* در ژنوتیپ متحمل به سرما H کاهش و در ژنوتیپ حساس به سرما Sh12 افزایش داشت که می‌تواند از عوامل موثر بر تفاوت حساسیت آن‌ها نسبت به سرما باشد.



شکل ٤- 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

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). Nulcear 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, Zhebentyayeva 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 repressestwo Cu/Zn superoxide dismutases. Plant Molecular Biology 67:403-417.

Esmaeili 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 Exprimental 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 Uetzet 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

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) Evaluacio´n 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 datausing 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 NACdomain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. Current Biology 14:1035-1046.
Martínez-Gómez P, Sánchez-Pérez1 R, Dicenta1 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 Exprimental 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 Exprimental 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]

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.
Solofoharivelo 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 hyper accumulator *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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-06-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.14.0]