

## بررسی میزان بیان *Pdu-miR398* و *Pdu-miR477* 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

فرحان غضنفری<sup>۱</sup>، محمد ربیعی<sup>۱\*</sup>، بهروز شیران<sup>۱</sup>

۱- بهترتب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

Ghazanfari F<sup>1</sup>, Rabiei M<sup>\*1</sup>, Shiran B<sup>1</sup>

1- MSc Graduate Student, Assistant Professor, Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrood 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 تخدمان بادام تحت تیمارهای سرمایی صفر-۲- درجه سانتی گراد در رقم حساس به سرما Sh12 و ژنوتیپ متحمل به سرمای H صورت گرفت. بیان *Pdu-miR477a-3p* در ژنوتیپ Sh12 تحت تیمار سرمایی -۲ درجه سانتی گراد در بافت‌های بساک و تخدمان 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 ایزارهای 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 *Pdu-miR477a-3p* در ژنوتیپ متحمل به سرما با افزایش بیان ژن‌های هدف پیش‌بینی شده آن، *PduAAE7* و *Pdu-miR398b* همراه بود. بیان متفاوت *Pdu-miR477a-3p* و *PduAAE7* 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

miکرو RNA

qPCR

5'RLM-RACE

## مقدمه

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 تنש‌های محیطی در مطالعات زیادی مشخص شده است (Li et al. 2013; Kohli et al. 2014; Tian et al. 2014; Sun et al. 2013; Bej and Basak 2014). گروهی از RNA‌ها (miRNAs) گوچک (miRNAs) گروهی از RNA‌ها (microRNAs) تنظیم‌کننده‌های زیستی در گیاهان هستند که در پاسخ (sRNAs) به تنش‌های مختلف نقش دارند (Ding Zhou and Guan 2012). گیاهان miRNA‌ها (miRNAs) تنظیم‌کننده کوچک با طول ۲۱ نوکلئوتید هستند که از رونوشت‌های میکروRNA‌های طویل تر مشتق می‌شوند (Miranda et al. 2005). mRNA‌ها بر اساس توالی مکمل غیر کامل mRNA‌های هدف خود را شناسایی می‌کنند. RNA-induced silencing complex (RISC) حاوی miRNA یا siRNA یا mRNA یا سرکوب ترجمه آن‌ها القا می‌کند. آن‌ها با برش mRNA یا سرکوب ترجمه آن‌ها القا می‌کند. تعداد زیادی از miRNA‌های تنظیم‌شونده (Sunkar et al. 2012) با سرما با رهیافت‌های کلوینینگ، بیوانفورماتیک و توالی‌یابی با توان بالا در آرابیدوپسیس (Zhou et al. 2008)، سپیدار (Chen et al. 2009) و برنج (Zhang et al. 2009) Brachypodium (Lv et al. 2012) شناسایی شده‌اند. اگرچه چندین miRNA تشابهاتی در میان گونه‌ها نشان می‌دهند (miR397 و miR169) افزایش بیان miRNA (al. 2010) شناسایی شده‌اند. ولی تفاوت‌هایی هم در تنظیم miRNA‌ها مشاهده شده است 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 (Zhang et al. 2014)، (Liu et al. 2008)، (Cao et al. 2014؛ Koca et al. 2015)، برنج (Lv et al. 2010)، گندم (Tang et al. 2012)، هلو (Barakat et al. 2010)، (Lu et al. 2008)، سپیدار (Zhang et al. 2012) و چمن جاوری (Liu et al. 2008) در پاسخ به سرما می‌باشد.

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 Chinnusamy et al. 2007؛ (Barakat et al. 2012؛ Zhang et al. 2014) به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Bej and Basak 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 ۹۰ تا ۱۰ درصد در مراحل مختلف فنولوژیکی خسارت وارد کند (Miranda et al. 2005). بادام گیاهی چندساله از زیرخانواده Rosaceae، خانواده Pronoidaea و Prunus می‌باشد. بادام عمدها خودناسازگار، دارای ۱۶ عدد کروموزوم ( $2n=2x=16$ ) و یک ژنوم دیپلولئید کوچک در حدود ۳۰۰ Mbp می‌باشد (Rea 2007). اهمیت اعضا این خانواده به خاطر ارزش غذایی بالا و محصولات صنعتی می‌باشد. یکی از مشکلات عمده بادام کاری در کشور، تولید نامنظم و غیرقابل پیش‌بینی آن می‌باشد که بیشتر به دلیل زودگلدهی ژنتوتیپ‌های 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) به طوری که حتی این خسارت به میزان ۶۰ تا ۱۰۰ درصد تخمین زده شده است (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 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

صفر و ۲- درجه سانتی گراد در بافت‌های تخدمان 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 ۴-۵ شاخه تقریباً مشابه با طول ۲۰-۴۰ 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 تخدمان و بساک از ۱۰-۱۲ غنچه از یک شاخه معین به عنوان یک تکرار بیولوژیک انجام پذیرفت. به منظور اعمال تنش ابتدا نمونه‌ها را به مدت ۳ ساعت در دمای صفر درجه سانتی گراد قرار داده و نمونه‌برداری برای هر ژنوتیپ با سه تکرار انجام گرفت. سپس دما را به ۲- درجه سانتی گراد کاهش داده و به مدت دو ساعت نمونه‌ها در این دما قرار گرفتند. نمونه‌برداری (دو تکرار بیولوژیک) از بافت‌های تخدمان و بساک ۱۰-۱۲ عدد تخدمان و بساک در هر تکرار) در هر دو تیمار صفر درجه سانتی گراد و دو ساعت ۲- درجه سانتی گراد برای هر دو ژنوتیپ انجام شد. همچنین ۱۰-۱۲ عدد بافت‌های مادگی و بساک از یک شاخه در هر تکرار بیولوژیک به عنوان کنترل در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد برای هر ژنوتیپ نمونه‌برداری شد. دما و نوع اعمال تنش بر اساس مطالعات پیشین بر روی درصد خسارت بافت تخدمان بادام انتخاب شد، به این ترتیب که دماهای پایین تر از ۳- درجه سانتی گراد منجر به قهوه‌ای شدن تعداد بسیاری از بافت‌های تخدمان می‌شود (Imani and Mohammadkhani 2011; Imani et al. 2012) و بنابراین دماهای کمتر از ۳- درجه سانتی گراد برای بررسی مولکولی بافت تخدمان (به علت صدمه به این بافت) مناسب نمی‌باشد. نمونه‌ها در یخچال

۸۰- درجه سانتی گراد 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*, *miR397*, *miR396*, *miR394*, *miR393*, *miR172*, *miR169* و *Zhou et al.* (*miR398* در پاسخ به تنش سرما افزایش بیان یافته‌اند) (Chen et al. 2012) علاوه بر آن در مطالعه (2008) *miR476a* از قبیل *miR156g-j*, *miR475a,b* و *miR156* تحت *miR476a* در *miR475a,b* 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 *MIR3627*, *MIR477*, *MIR482* و *MIR3627* miRNA شامل *MIR3627* در بین درختان میوه و همچنین درخت مدل سپیدار خیلی حفاظت شده می‌باشند (Solofoharivelo et al. 2014) و عموماً 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).

تاكون گزارشی در رابطه با پاسخ mRNAهای بادام به تنش سرما به خصوص در اندام‌های زایشی نشده‌است، در حالی که تنش سرما می‌تواند بیشترین اثرات تخریبی را داشته باشد. اخیراً Mousavi et al. (2014) تحقیقی را با استفاده از تکنولوژی *RNA-Seq* (RNA توالی‌یابی) به منظور آشکارسازی پاسخ‌های مولکولی در بافت‌های تخدمان 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 تخدمان 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

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

طريق اسپکتروفتو متر و ژل آگارز یک درصد بررسی شد. بررسی بیان miRNA با روش RT-PCR stem-loop یا با اساس روش Varkonyi et al. (2007) و Chen et al. (2005) انجام گرفت.

جهت بررسی بیان miRNAها و ژن‌های هدف آنها سه مرحله به ترتیب ستز cDNA، بررسی محصول توسط End point PCR و به منظور 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 برای هر ژن و آغازگر اختصاصی SYBR Green (Cat. #RR820A)، حاوی miRNA و آغازگر آغازگر برگشت universal انجام شد. این واکنش با سه تکرار تکنیکی برای هر نمونه miRNA و ژن هدف و دو تکرار بیولوژیک Mallory et al. (2004) و Guo et al. (2009) به عنوان کنترل داخلی در انجام شد. همچنین از ژن خانگی 18S rRNA (PdAct1) به عنوان کنترل داخلی در نرمال‌سازی نتایج qPCR استفاده شد.

Karimi et al. (2016) با توالی‌بایی RNAهای کوچک در مطالعه (2016) با نمونه‌های گیاهی مشابه و شرایط تنفس مشابه استفاده شد. karimi et al. (2016) با توالی‌بایی 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 5'-RACE برای انجام 5'-RLM-RACE و توالی آغازگرهای FirstChoice® RLM-Outer و 5'-RACE-Inner بر اساس کیت RACE طراحی شد (جدول ۱).

Rubio-Piña (2011) استخراج RNA کل و بررسی کیفیت RNA به روش and Zapata-Pérez (2011) از

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

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

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

به‌منظور آشکارسازی پاسخ مولکولی بافت‌های تخدمان و بساک بادام در پاسخ به تنش سرما از داده‌های RNAseq حاصل از مطالعه (Mousavi et al. 2014) استفاده شد. داده‌های خام ترانسکریپтом در آرشیو توالی‌های خوانش (SRA) در NCBI قرار داده شده‌است و با شماره SRP041269 قابل دسترس 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 Plant sRNATarget وب سایت (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.

Mousavi et al. (2014)، برای هر microRNA هويت 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 پیش‌تر رابطه بین *Pdu-miR398b* و ژن هدف آن (*pduDUF1639*)، مقایسه بیان آن‌ها در بین ژنتیپ‌های بادام تحت تنش سرما از طریق PCR در زمان واقعی صورت گرفت. در ژنتیپ دیرگل حساس به سرما Sh12 *Pdu-miR398b* افزایش بیان در دو بافت بساک و تخدمان تحت تنش سرمایی -۲ درجه سانتی‌گراد را نشان داد (شکل ۱). همچنین این افزایش بیان

cDNA ستز شده به نسبت ۱ به ۲ رقیق شد، سپس در واکنش PCR در زمان واقعی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیز Rotor (cycling threshold Ct) توسط نرم‌افزار Gene Q Series Software Livak and Schmittgen (2001) نمونه کنترل و  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  انجام شد. برای مقایسه نتایج با ژن کنترل 18srRNA و اکتن، با استفاده از روش student t test با در نظر گرفتن حداقل سطح معنی دار  $<0.05$  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 آدپتور، ستز cDNA، انجام PCR آشیانه‌ای، خالص‌سازی PCR، کلون‌سازی، استخراج پلاسمید و توالی‌بایی نمونه‌ها می‌باشد (Thiebaut et al. 2012). به ۲ میکروگرم 5'RACE DNA از تیمار تحت تنش استخراج شده از بافت تخدمان بادام رقم H از آدپتور 5'RACE DNA لیگاز متصل شد. از آغازگرهای نه تایی تصادفی برای ستز cDNA استفاده شد. آشیانه‌ای برای تکثیر قطعات حاصل از ستز 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 PCR 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 توالی‌بایی شد. پس از توالی‌بایی انتهای برشی توالی‌بایی 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

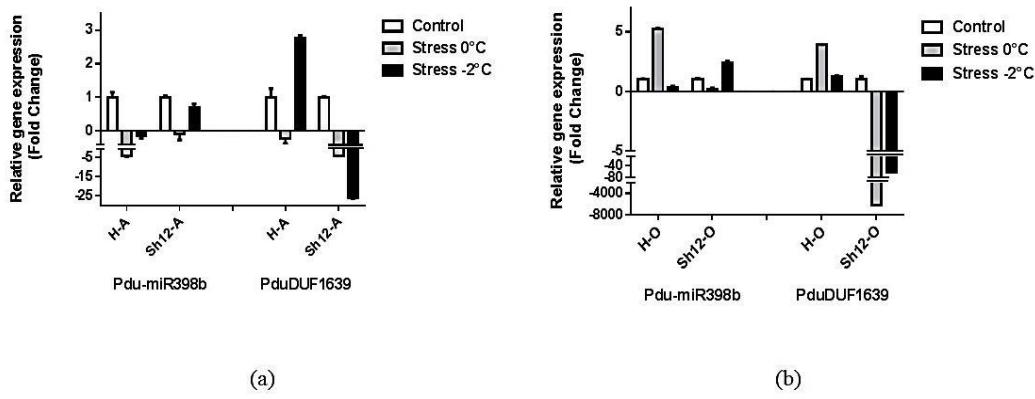
مدت سه و دو ساعت مشاهده گردید. در مقابل افزایش بیان معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) این ژن پس از سه ساعت تیمار صفر درجه سانتی‌گراد در بافت تخدمان ژنوتیپ دیرگل متتحمل به سرما H مشاهده شد. همچنین نتایج آزمون همبستگی بین کل داده‌های بیان *Pdu-miR398b* و ژن هدف ۹ در *pduDUF1639* در ژنوتیپ Sh12 تحت هر دو تیمار تنفس 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 تنفس وجود دارد. دلیل دیگری که می‌توان ذکر نمود این است که کاهش بیان ژن‌های دیگری مانند،<sup>۱</sup> *CSD1*<sup>۲</sup> و *CSD2*<sup>۲</sup> که برای این miRNA پیش‌بینی شده‌اند و احتمالاً پاسخ‌دهنده به سرما در ژنوتیپ H باشند دخیل باشند نه *pduDUF1639*.

<sup>1</sup> Cytosolic copper, zinc superoxide dismutase1<sup>2</sup> Chloroplastic copper, zinc superoxide dismutase2

در بافت تخدمان ژنوتیپ دیرگل متتحمل به سرما H تحت تیمار سرمایی صفر و -۲ درجه سانتی‌گراد نیز دیده شد. در تنفس ۲- درجه سانتی‌گراد افزایش بیان معنی‌دار این miRNA (در سطح ۵ درصد) در بافت تخدمان ژنوتیپ Sh12 (۲/۴۱ FC) و همچنین ژنوتیپ H (۵/۲۳ FC) پس از سه ساعت تیمار صفر درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. میزان بیان *b* *Pdu-miR398b* در بافت بساک ژنوتیپ دیرگل متتحمل به سرما H در سطح تنفس سرمایی -۲ درجه سانتی‌گراد کاهش بیان (-۰/۱۵ FC) نشان داد که با کاهش Karimi et al. (2016) مطابقت دارد و همچنین افزایش بیان ژن هدف پیش‌بینی شده آن *pduDUF1639* در تحقیق حاضر در مطابقت با Mousavi et al. (2014) در مطالعه HSA در مطالعه HSA پیش‌بینی شده آن ژن هدف پیش‌بینی شده *Pdu-miR398b* یا می‌باشد. تغییرات بیان ژن هدف پیش‌بینی شده *Pdu-miR398b* یا *pduDUF1639* تاکنون گزارش نشده است و برای اولین بار در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت. در ژنوتیپ Sh12 کاهش بیان معنی‌دار (در سطح یک درصد) *pduDUF1639* در بافت تخدمان تحت تیمار صفر و -۲ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به

جدول ۲- ژن‌های هدف پیش‌بینی شده از سایت NCBI استخراج شده از سایت

Accession number	ژن هدف پیش‌بینی شده	miRNA توالي ۳'-۵'	miRNA
XP-008220439.1	Protein of unknown function (DUF1639)	CGUGUUUCUCAGGUCGCCUG	<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)		



شکل ۱- مقایسه بیان *Pdu-miR398b* و ژن هدف آن *PduDUF1639* در دو سطح تنفس صفر و -۲°C در دو ژنوتیپ Sh12 و H در بافت بساک بادام (a) و بافت تخدمان (b)

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 ۴-۳ ساعت ABA یا تنش شوری القا می‌شود و پس از ۴۸ ساعت سرکوب شده و نهایتاً در طول تنش‌های بیشتر از ۷۲ ساعت دوباره تجمع پیدا می‌کند. در مقابل تنظیم پویای *miR398* در آراییدوپسیس وجود ندارد و *miR398* به صورت یکنواخت در طول تنش سرکوب می‌شود. بیان ژن هدف *miR398* (SOD) یا (CSD) در تنش‌های اکسیداتیو، شوری، اسید آبیسیسیک، استفاده از ساکاراز و تغییر دماهای شدید متفاوت باعث یک تغییر فوری در سطح‌های CSD می‌شود (Dugas and Bartel 2008). بیان زیاد گیاهان CSD (Yu et al. 2012; Lee et al. 2010; 2008) را از تنش‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند و تحمل نسبت به تنش Sunkar et al. (2006) یخ‌زدگی را در گیاهان تاریخته افزایش می‌دهد. مکانیسم اصلی مسیر *miR398*-CSD در تحمل نسبت به یخ‌زدگی است ولی هنوز کاملاً شناسایی نشده است. (Chen et al. 2013) اکسیداتیو در آراییدوپسیس کاهش می‌یابد (*superoxide dimutases*) (Cu/zn SODs). در مطالعات انجام شده روی *miR398* تحت تنش خشکی در برگ بسیار بیشتر از ریشه است. (Sunkar et al. 2006) این در مطالعات انجام شده روی *miR398* افزایش 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. به دما به طور عمده در شرایط تنش دمایی شناسایی شده‌اند. گلدهی اولین صفتی می‌باشد که با تغییرات شدید دما متأثر می‌شود. مطالعات مقایسه‌ای نشان داده است که *miR156* در مطالعات انجام شده روی *miR398* و *miR172* *miR169* تنش‌های سرما هستند (Lv et al. 2010). در مطالعه (Esmaili et al. 2015) بروز *miR398* در هللو، 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

یکی از microRNAs 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 می‌کند (Axtell 2008). گزارش شده است 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 شده است که در آراییدوپسیس با ۳ مکان ژنی *MIR398b*, *MIR398c* و *MIR398a* کد می‌شود. توالی *MIR398b* و *MIR398c* یکسان است ولی *MIR398a* در یک نوکلئوتید در قسمت ۳' با آن‌ها تفاوت می‌کند (*miR398a/b/c*). بیان (Sunkar and Zhu 2004) می‌باشد که باعث اثر تنظیم‌کنندگی قوی‌تر آن‌ها می‌شود mRNA در آراییدوپسیس مورد هدف قرار می‌دهد: (۱) مس ازوی سوپراکسایدیسموتاز آسیتوزولی (CSD2)، (۲) *CSD1* کلروپلاستی، (۳) یک زیر واحد میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز *COX5b1,2-4* و (۴) چهرون مس برای سوپراکساید دیسموتاز (CCS1) که کوفاکتور مس را به آن‌ها (۱، ۲ و ۳) تحويل می‌دهد (*miR398*). (Jia et al. 2009; Jagadeeswaran et al. 2009) کدکننده سوپراکسایدیسموتاز مس، *CSD1* و *CSD2* را تنظیم منفی می‌کند. آنزیم CSD دارای مس به عنوان کوفاکتور است. هنگامی که میزان اکسیژن آزاد درون سلولی افزایش می‌یابد با کاهش بیان *miR398* بیان ژن‌های کدکننده سوپراکسایدیسموتازها 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 کردن *miR398* نگهداری می‌کند. افزایش یا 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

اکثر DUF<sup>۱</sup>ها 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 DUF<sup>۱</sup>ها نیز می‌تواند بر نقش مهم زیستی آن‌ها اشاره داشته باشد. اعتقاد بر این است که DUF<sup>۱</sup>ها 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 Mawlong et al. (2016) مختلف از جمله تنش سرما اشاره کرد. (ESK1 با نام DUF<sup>۱</sup> با عنوان یک تنظیم کننده منفی ESKIMO 1<sup>۲</sup>) نشان دادند یک DUF<sup>۱</sup> در پروتئین 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 سرما باک و تحت تیمار دمایی ۲–۶ درجه سانتی‌گراد در تطابق با Mawlong et al. (2010) می‌باشد. Bischoff et al. (2010) گزارش کردند یک پروتئین DUF<sup>۱</sup> 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 غیرزیستی 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 ۲–۶ درجه سانتی‌گراد نشان داد که *PduDUF1639* احتمالاً در مکانیسم 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

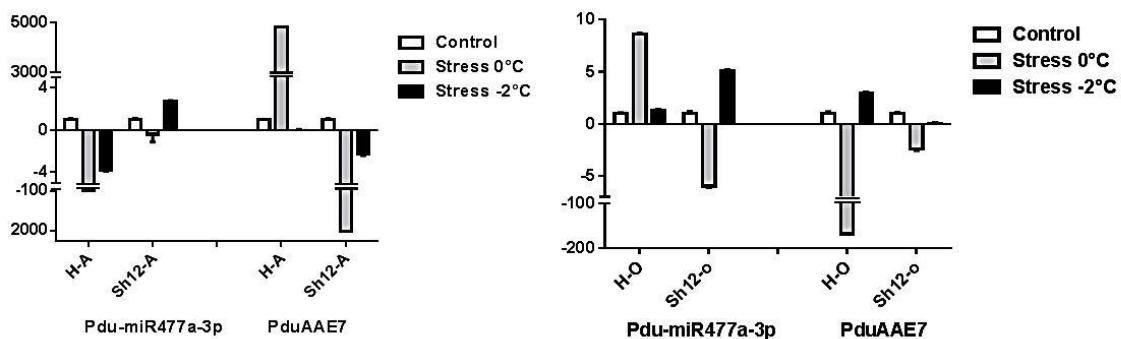
گزارش کردند. با افزایش مدت زمان تنش خشکی، بادام و GN که جز گیاهان متحمل به خشکی به شمار می‌روند برای سازش با شرایط تنش، کاهش بیان *miR398* را نشان دادند. به دلیل افزایش مدت زمان تنش خشکی این گیاهان برای سازش با شرایط محیطی موجود و مبارزه با ROS بروز *miR398* را کاهش دادند. Zhou et al. (2008) نشان دادند در آرابیدوپسیس تحت تنش سرما برخی miRNAها افزایش بیان نشان می‌دهند درحالی که *miR398* به صورت مایلیم و گذرا افزایش بیان نشان داد. Sunkar and Zhu (2004) تیمارشده با تنش سرما نشان داد که *miR398* small RNA تحت تنش سرما کاهش بیان نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر افزایش *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 *Pdu-miR39b* با نتایج متحمل به سرما H کاهش بیان *miR398* 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 واپسیه به ژنوتیپ miRNAها به تنش‌های غیرزیستی فقط در بین گونه‌های مختلف متفاوت نیست بلکه در میان ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه نیز متنوع است همان‌طوری که 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 واپسیه به miRNA ممکن است به این تفاوت کمک کند (Zhang 2015).

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

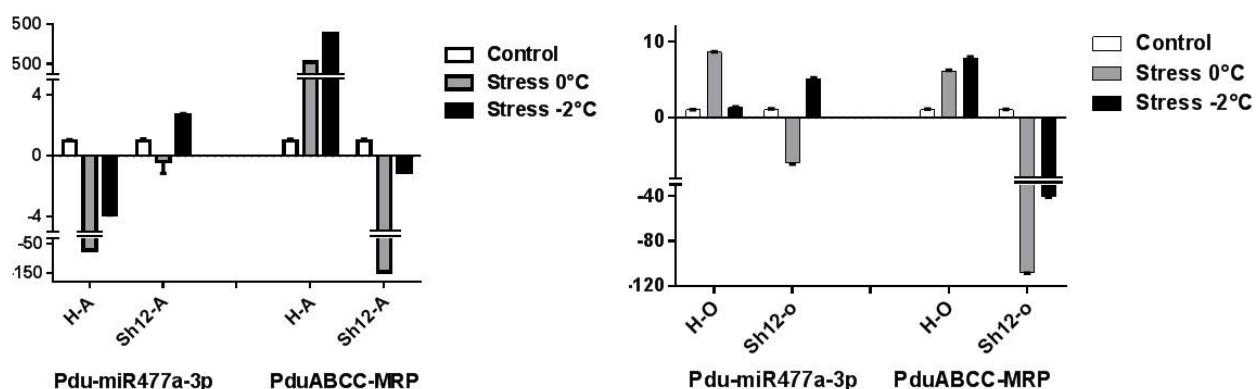
<sup>۱</sup> Domain of unknown function

این سطح تنش کاهش بیان معنی دار (در سطح ۵ درصد) (۳/۸۴) 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 سانتی گراد مشاهده شد. پس با کاهش بیان *Pdu-miR477a-3p* در ژنوتیپ H که متتحمل به سرما بوده می توان 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.

دو بافت بساک و تخدمدان تحت تنش سرمایی صفر درجه سانتی گراد به مدت سه ساعت را مشاهده شد. همچنین این کاهش بیان در بافت بساک ژنوتیپ دیرگل متتحمل به سرما H نیز دیده شد. در حالی که در ادامه تنش پس از دو ساعت تیمار در دمای -۲ درجه سانتی گراد افزایش بیان معنی دار این miRNA (در سطح یک درصد) در بافت بساک ژنوتیپ Sh12 (۲/۷۱ FC) و افزایش بیان غیر معنی دار این miRNA در بافت تخدمدان هر دو ژنوتیپ دیرگل متتحمل و حساس به سرما (به ترتیب، ۱/۳۱ FC و ۵/۱) مشاهده شد. بافت بساک ژنوتیپ دیرگل متتحمل به سرما در



شکل ۲- مقایسه بیان *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف آن *PduAAE7* در دو سطح تنش صفر و -۲ درجه سانتی گراد (a) و بافت تخدمدان (b)



شکل ۳- مقایسه بیان *Pdu-miR477a-3p* و ژن هدف آن *PduABCC-MRP* در دو سطح تنش صفر و -۲ درجه سانتی گراد (a) و بافت تخدمدان (b)

یک منبع اصلی نیتروژن در گیاهان، به عنوان یک واسطه عمل می‌کند که در همگذاری کربن-نیتروژن برای رشد گیاهان و تکامل آن‌ها مشارکت دارد. برای تامین گلوتامین به میزان کافی، سلول‌های گیاهی از گلوتامین سنتازها (GS) استفاده می‌کنند که شامل GS1 سیتوزولی و GS2 پلاستیدی می‌باشد. (Ji (2011) نشان داد که GS1 نسبت به استرنس‌های محیطی مختلف پاسخ می‌دهد و همچنین در هموثوستاز گلوتامین دخیل است. به عنوان مثال، فعالیت GS1 در گوجه‌فرنگی پس از مواجهه با مقادیر مختلف NaCl افزایش می‌یابد (Debouba et al. 2006). بررسی پروتئین‌ها با ژل الکتروفورز دو بعدی 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 H جلوگیری می‌کند و باعث تحمل در رقم متتحمل به سرما 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.

ABC transporter C family *Pdu-miR477a-3p* member 8-like ۱ دارویی (*PduABCC-MRP<sup>1</sup>*) 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 (به ترتیب ۲۵۸۰ و ۷/۱۱ FC) و همچنین افزایش بیان معنی‌داری (در سطح FC یک درصد) پس از دو ساعت تیمار ۲ درجه سانتی‌گراد (۷/۸۶ در بافت تخمدان ژنوتیپ متتحمل 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 (۱۰۸/۲۹ FC) و همچنین کاهش بیان معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) پس از دو ساعت تیمار ۲ درجه سانتی‌گراد (۴۰/۶۹ FC) در بافت تخمدان در ژنوتیپ حساس به سرما Sh12 مشاهده شد. در بافت بساک

<sup>1</sup> *Prunus dulcis* ABC transporter C family member 8-like-multiple resistance protein

به نظر می‌رسد خانواده‌های سه miRNA شامل *MIR482*, *MIR477*, *MIR3627* در بین درختان میوه و همچنین درخت مدل سپیدار (Solofoharivelho et al. 2014) خیلی حفاظت شده باشند. (Lu et al. (2008) miRNA باسخ‌دهنده به تنش سرما در سپیدار که از ۱۴ خانواده Sunkar and Zhu (2004) نیز در گیاه سپیدار در حالی که با نتایج مطالعه حاضر در *miR168a,b* و *miR475a,b* *miR156g-j*, *miR477a,b* افزایش بیان در حالی که با نتایج مطالعه حاضر در ژنوتیپ 12 و همچنین در ژنوتیپ H بادام در بافت تخمدان تحت تنش ۲- درجه سانتی‌گراد مطابقت دارد. ژن هدف *Pdu-miR477a-3p* نیز در گیاه سپیدار در تنش سرما *Sh12* عدم تغییر بیان معنی‌دار در بافت تخمدان و همچنین در بافت بساک ژنوتیپ دیرگل متتحمل به سرما H تحت تنش سرمایی تیمار ۲- درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت نشان داد. در مقابل کاهش بیان معنی‌دار (به ترتیب 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* به طور اختصاصی برخی سوبسیتراهای با زنجیره کوتاه و متوسط را فعال می‌کند (Shockley et al. 2003). در مطالعه‌ای *AAE7* در مقادیر بالا در بافت‌های ریشه، ساقه، برگ و گل بیان شده است (Shockley et al. 2002). جهش در *AAE7* یا ژن *ACN1* (acetate non-utilizing 1) منجر به کاهش تقریباً 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)،

به عنوان یک گیاه متتحمل به سرما ولی عدم افزایش در ژنوتیپ Sh12 به عنوان ژنوتیپ حساس تحت تنفس سرما نشان می‌دهد که این تنظیم کننده در تحمل این ژنوتیپ به سرما از طریق فرایندهایی مانند مکانیسم‌های سم‌زدایی کمک می‌کند. تنفس سرما مولود تنفس اکسیداتیو و سایر تنفس‌ها می‌باشد (Chinnusamy et al. 2007). یکی از پاسخ‌های مشترک گیاهان نسبت به تنفس‌های غیر زیستی القاء تنفس اکسیداتیو است. گزارشات نشان می‌دهد، خسارت یخ‌زدگی در درختان منجر به تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن ROS (Reactive Oxygen Species) شده که منجر به تنفس اکسیداتیو و صدمه دیدن ابرمولکول‌های مختلف درون سلولی می‌شود (Sandve et al. 2011; Thakur et al. 2010). عمدتاً 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 تنفس 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 فعل شدن مکانیسم‌های مهار ROS در گیاهان می‌شود. برای جلوگیری از تجمع پراکسید هیدروژن در طی تنفس‌های سرمایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیداتیو باید کارایی بالا داشته باشد. در مطالعه Ruelland et al. (2009) افزایش در غلظت آنتی-اکسیدانت‌ها همچون گلوتاتیون و آسکوربیات در طی تنفس سرما گزارش شده است. در واقع در هنگام تنفس سرما که موجب القاء تنفس اکسیداتیو می‌شود، برای جلوگیری از اکسیداسیون کترول 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، فلاونونئیدها، آلkalوئیدها و کارتنوئیدها

ژنوتیپ H عدم تغییر بیان معنی‌دار *PduABCC-MRP* (1/۰۵ FC) پس از دو ساعت تیمار ۲- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. در مقایسه با مرحله ابتدایی تنفس سرما، بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ حساس و متتحمل 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 طوری که 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 *Pdu-miR477a-3p* در کاهش یافت. در مقابل روند کاهش بیان *PduABCC-MRP* 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.

ABCC- (ABCC-) MRP، یک زیرمجموعه از انتقال‌دهنده‌های ABC می‌باشد که در فرایندهای فیزیولوژیکی چندگانه که شامل هموئتاز سلولی، سم‌زدایی فلزی و انتقال کاتژوگهای 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 می‌باشد، شناسایی شده‌اند (Klein et al. 2006). که از جمله می‌توان به بیشتر از ۱۲۰ عضو در آرابیدوپسیس و برنج اشاره کرد (Rea 2007). اکثراً ولی نه همه پروتئین‌های ABC، پروتئین‌های نمایی سازمان یافته در غشاء هستند (انتقال‌دهنده‌های ABC) که انتقال بین غشایی انرژی گیرنده از MgATP را تعديل و یا انتقال‌دهنده‌های دیگر را کنترل می‌کنند. این پروتئین‌ها در سم‌زدایی سلولی با انتقال مواد سمی از سیتوزول به واکوئل‌ها دخیل می‌باشد (Bhati et al. 2015). با توجه به این اطلاعات، ژنوتیپ‌های بادام متتحمل به سرما احتمالاً در مسیری که MRP‌ها تنظیم می‌شوند، مکانیسم مشابهی دارند. همچنین نقش انتقال‌دهنده‌های ABC در انتقال کاتژوگهای گلوتاتیون به واکوئل‌ها شناخته شده‌اند و گزارش شده تحت استرس Cd افزایش یافته است (Alvarez et al. 2015). احتمالاً در این مطالعه افزایش بیان انتقال‌دهنده ABC در ژنوتیپ H

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

#### نتیجه‌گیری کلی

بادام به عنوان گیاه مهم اقتصادی خسارات زیادی را در مراحل ابتدایی گلدهی تا نمو میوه در اثر سرمای اواخر زمستان و اوایل بهار متتحمل می‌شود. مطالعه مکانیسم گیاه در پاسخ و تحمل تنش‌های محیطی به کمک بررسی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیابی و مولکولی برای اصلاح گیاهان متتحمل به تنش سرما و یخ‌زدگی ضروری است. *miRNA*ها با توجه به ماهیت ژن هدفشان در تنظیم نمو گیاه نقش دارند. شناسایی رابطه بین *miRNA*ها و ژن‌های هدف در سطح تنش می‌تواند به درک تنظیمات ژن‌ها پس از رونویسی و انتخاب اهداف در مهندسی ژنتیک گیاهان کمک *Pdu-miR477a-3p* 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.

می‌باشد (Ahmad et al. 2010). گیاهان از راهکارهای مختلف برای مقابله با سمت 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. زمانی که یک توالی cDNA جزئی در دسترس باشد کلونینگ توالی‌های تمام طول cDNA را آسان می‌کند. به منظور تأیید این که آیا این ژن‌های هدف به طور مستقیم توسط برش هدایت شده *mRNA*ها و *mRNA* مورد نظر ما سرکوب شده‌اند از تکنیک تغییر یافته 5' RACE 5' برای نقشه‌یابی از انتهای 5' ژن هدف برش یافته را می‌دهد (Thiebaut et al. 2012). به منظور شناسایی محل برش *Pdu-miR477a-3p* روی ژن هدف *PduAAE7* و همچنین تایید اینکه آیا ژن *PduAAE7* هدف مستقیم سرکوب شده توسط توسعه *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 کانتیگ ژن هدف پیش‌بینی شده *pduAAE7* نقشه‌یابی شد. سپس برای خوانش به دست آمده با توالی کانتیگ ژن هدف پیش‌بینی شده الگوریتم BLASTn انجام گرفت نتایج هم‌گذاری در شکل ۴ آمده است.

#### RNA, *PduAAE7* رونوشت

```

CTCCTTGCAALGTCCCCAAAAGGGCTTCCGAGTCCACTCAT
CTTATGGTCTGCTGAAACTTATGGCCCCCTCCACAGTATG
TGCTTGGAAAGCCTGAGTGGGACTCACTTTCCCCGTAACC
CAAGCACGACTTAACGCACGTCAAGGTGTTCGTACATTG
GTTTGGAGGGCTTAGATGTTCAACCCCTCAGACTATGCA
ACCTGTTCCCAGATGGAGCTACCATGGGAGAGATAATG
ATGCGGGAAACCTTGTATGAAGGGGTATTTAAAGAAC

```

جایگاه محل اتصال  
*Pdu-miR477a-3p*

شکل ۴- توالی رونوشت ژن هدف پیش‌بینی شده و توالی مکمل H و توالی نوکلئوتیدی با فونت ایتالیک نشان‌دهنده توالی همدیف شده با توالی ژن هدف *PduAAE7* می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی با زیرخط نشان‌دهنده توالی آغازگر اختصاصی *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, 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 Bioinformatics* 10:264-275.
- Dugas DV and Bartel B (2008). Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represes two 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 Experimental Botany* 60:3531-3544.
- Halliwel 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.

- 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 MI, 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 Tombuloglu 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 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-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.
- Shockley 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.

Shockley 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, Dalmau 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.