

بررسی الگوی بیان *Pdu-miR160a*، *Pdu-miR168* و *Pdu-miR171a* و ژن‌های هدف آن‌ها در اندام‌های زایشی بادام در پاسخ به تنش سرما

Study the expression pattern of *Pdu-miR160a*, *Pdu-miR168* and *Pdu-miR171a* and their target genes in reproductive tissues of almond in response to cold stress

مرضیه کریمی^۱، بهروز شیران^{۱*}، محمد ربیعی^۱، حسین فلاحی^۲

۱- به ترتیب دانش آموخته دکتری، استاد، استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

Karimi M¹, Shiran B^{*1}, Rabiei M¹, Fallahi H²

1- Graduated PhD Student, Professor, Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shiran@sku.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۹ - تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۲/۱۹)

چکیده

سرماي دیرس بهاره به‌عنوان مهم‌ترین محدودیت محیطی برای بادام محسوب می‌شود و به‌واسطه صدمه به بافت‌های زایشی همه ساله منجر به خسارت قابل توجهی در تولید محصول آن می‌شود. از آنجایی که اطلاعات بسیار محدودی در رابطه با پاسخ این گیاه به تنش سرمازدگی بهاره وجود دارد و از طرف دیگر با توجه به نقش مهم تنظیمی miRNAها در بسیاری از شبکه‌های تنظیمی، بر اساس اطلاعات حاصل از آنالیز نتایج توالی‌یابی RNA و RNAهای بادام، سه ژن *Pdu-miR160a*، *Pdu-miR168* و *Pdu-miR171a* به‌عنوان miRNAهای پاسخ دهنده به تنش سرما به‌همراه ژن‌های هدف‌شان انتخاب و به‌منظور تأیید نتایج توالی‌یابی، بیان آن‌ها با استفاده از روش RT-qPCR در اندام‌های زایشی دو ژنوتیپ متحمل H و حساس به سرما Sh12 تحت دو تیمار تنش صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، نقش تنظیمی منفی سه miRNA مورد مطالعه را در پاسخ به هر دو تیمار تنش سرمایی در ژنوتیپ H نشان داد. اما بر خلاف ژنوتیپ H، نقش تنظیمی مثبت *Pdu-miR168* و *Pdu-miR171a* در پاسخ به تنش سرما در رقم Sh12 آشکار شد. نتایج آزمون همبستگی پیرسون، وجود همبستگی منفی بین *Pdu-miR160a* و *PduARF18* تحت هر دو تنش سرمایی را تنها در اندام‌های زایشی بساک و تخمدان رقم Sh12 نشان داد. این در حالی بود که وجود همبستگی منفی میان *Pdu-miR168* و *PduAGO1* تنها در تخمدان ژنوتیپ H تحت هر دو تنش تیمار سرمایی مشاهده شد. همچنین اثر تنظیمی منفی *Pdu-miR171a* بر ژن هدف *PduSCL6* تحت تنش ۲- درجه سانتی‌گراد در تخمدان ژنوتیپ H و هر دو بافت زایشی رقم Sh12 آشکار شد.

واژه‌های کلیدی

بادام

تنش سرما

miRNA

RT-qPCR

مقدمه

آنتی اکسیدانت‌ها می‌شود. این پروتئین‌ها و متابولیت‌ها به حفاظت غشاهای گیاهی کمک می‌کند و از تخریب سلول در برابر تنش سرما از طریق پایدار کردن چربی‌های غشا، پروتئین‌ها، حفظ میانکنش‌های آب‌گریز، هموستازی یون‌ها و مهار گونه‌های فعال اکسیژن^۴ حفاظت می‌کنند (Sinha et al. 2015). پیشرفت در زمینه پژوهش‌های زیست‌شناسی مولکولی نشان داده است که پاسخ گیاه به تنش تنها در سطح mRNA یا سطح پروتئین‌ها نیست و در سطح پس از رونویسی نیز می‌باشد (Phillips et al. 2007). مطالعات جدید نقش مهم RNAهای کوچک^۵ به‌ویژه میکروRNAها^۶ را در پاسخ و سازگاری گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پیشنهاد می‌کند (Rogers and Chen 2013; Kruszka et al. 2014). miRNA به‌عنوان عامل تنظیم‌کننده در بسیاری از شبکه‌های تنظیمی مختلف گیاهی تحت تنش‌های مختلف شناخته شده‌اند (Chiou 2007; Kawashima 2009; Liu et al. 2008; Liang et al. 2010; Barakat et al. 2012). از این رو شناسایی miRNA به‌عنوان بخش جدایی‌ناپذیر از شبکه تنظیمی در شرایط تنش می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در راستای ارتقای تحمل ارقام بادام و خویشاوندان آن به تنش‌های مختلف به‌ویژه تنش سرما فراهم آورد. miRNAها، مولکول‌های غیرکد شونده کوچک و اندوژن هستند که نقش حیاتی در تنظیم بیان ژن در مرحله پس از رونویسی در یوکاریوت‌ها و ویروس‌ها بازی می‌کنند. این مولکول‌های کوچک تنظیمی، نقش خود را از طریق اثر متقابل اختصاصی با توالی‌های مکمل که منجر به تجزیه شدن یا جلوگیری از ترجمه mRNA ژن هدف می‌شود، به‌دست می‌آورند (Eldem et al. 2013). از مشخصه‌های این مولکول‌های کوچک غیر کد شونده در گیاهان، طول ۲۴-۲۱ نوکلئوتیدی و همولوژی بالا با توالی ژن هدف می‌باشد (Eldem et al. 2013; Saini et al. 2012). در چند سال اخیر روش‌های توالی‌یابی با توان بالا^۷ که توالی‌یابی نسل جدید^۸ نیز نامیده می‌شوند برای شناسایی miRNAها در موجودات مختلف بهره‌گیری می‌شود، این روش‌ها

تنش‌های محیطی نظیر تنش سرما از بزرگ‌ترین چالش‌ها در تولید محصولات کشاورزی به‌شمار می‌روند. گیاهان در محدوده دمایی مشخصی قادر به رشد و نمو هستند. هر گونه نوسانات دمایی سبب کاهش رشد محصول و یا از بین رفتن کامل آن می‌شود. درختان میوه از زمان باز شدن جوانه‌های گل در خلال گل‌دهی و تا مرحله میوه کوچک سبز نسبت به صدمه سرما بسیار حساس هستند (Dezhampour 2013). عامل سرما و یخبندان نسبت به سایر عوامل تهدید کننده در زیربخش‌های زراعی و باغی از سهم بسیار بالایی برخوردار است و پهنه وسیعی از حاصل‌خیزترین مناطق تولیدی ایران و قسمت عمده محصولات اقتصادی مهم کشور، همه ساله در معرض تهدید تنش سرما و یخ‌زدگی قرار دارند (Akbar Aghdami et al. 2013). یکی از محصولات مهم کشاورزی در ایران بادام است که به‌دلیل نیاز سرمایی کم و پاسخ رشدی سریع به افزایش دما همه ساله آسیب‌های جبران‌ناپذیری از ناحیه تنش سرمای دیررس بهاره به این محصول وارد می‌شود، به‌طوری که در برخی از سال‌ها این میزان خسارت به ۶۰ الی ۱۰۰ درصد نیز می‌رسد (Afshari and Parvaneh 2013). سرما و یخ‌زدگی بهاره می‌تواند در مراحل فنولوژیکی مختلف از ابتدای مرحله‌ی تورم جوانه تا چغاله در بادام خسارت وارد نماید (Miranda et al. 2005; Imani et al. 2012). اثرات محدود کننده سرما از طریق کاهش فتوسنتز، جذب آب و مواد مغذی و در نهایت کاهش تولید محصول بروز می‌نماید (Mousavi et al. 2014a). در گیاهان تحمل به یخ‌زدگی از طریق القای آبشارهای سیگنالی که منجر به تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نظیر تغییر در ترکیبات چربی غشا و تغییر در بیان ژن‌ها می‌شود، بهبود می‌یابد. تغییرات در بیان ژن‌ها منجر به تجمع چندین پروتئین حفاظتی نظیر پروتئین‌های ضد یخ‌زدگی^۱، پروتئین‌های غالب و فراوان در اواخر مرحله جنین‌زایی^۲، پروتئین‌های شوک گرمایی^۳، پروتئین‌های تنظیمی سرما و نیز متابولیت‌هایی نظیر آمینواسیدها، قندهای حل شونده، اسیدهای معدنی، رنگدانه‌ها، پلی‌آمین‌ها و

⁴ Reactive oxygen species (ROS)

⁵ SmallRNA (sRNA)

⁶ microRNAs (miRNA)

⁷ high-throughput sequencing

⁸ Next Generation Sequencing

¹ Antifreeze proteins (AFPs)

² Late embryogenesis abundant proteins (LEA)

³ Heat shock proteins (HSP)

مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام گرفت. شاخه‌های یکساله مشابه از نظر اندازه، قطر و تعداد جوانه، با طول ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌متر از قسمت‌های میانی نمونه‌برداری و بعد از جداسازی، در آب حاوی ساکارز ۵ درصد قرار داده شدند. تیمارهای تنش سرما در این آزمایش، شامل تنش صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت و تنش ۲- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت بود. اعمال این نوع تنش بر اساس مطالعه Mousavi et al. (2014b) انجام شد. پس از اعمال تنش (صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد)، نمونه‌برداری از بافت‌های زایشی تخمدان و بساک به‌طور جداگانه در سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. از نمونه‌های شاهد نیز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده ذخیره و نگهداری شدند. طراحی آغازگرهای مربوط به miRNA با استفاده از نرم‌افزار miRNA Primer Designer و طراحی آغازگرهای مربوط به ژن‌های هدف با استفاده از ابزار primer blast انجام گرفت (جدول ۱). استخراج RNA از گیاه بادام بر اساس نتایج به‌دست آمده از مطالعه Mousavi et al. (2014b) و بر اساس روش Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011) انجام شد. که به نوعی روش تغییر یافته Yang et al. (2008) بود، صورت گرفت. در این روش به راحتی ترکیبات فنل، پلی‌ساکارید و سایر آلودگی‌های متابولیتی حذف می‌شوند، از این‌رو RNA به‌دست آمده دارای کیفیت و خلوص بالایی می‌باشد. کمیت و کیفیت RNA از طریق اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۱/۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی بیان miRNA، cDNA آن با استفاده از روش stem-loop RT PCR سنتز شد. این روش توسط Chen et al. (2005) و نیز Varkonyi-Gasic et al. (2007) به‌منظور بررسی بیان miRNAها معرفی شد. جهت بررسی بیان ژن‌های هدف نیز، cDNA هر نمونه با استفاده از آغازگر عمومی الیگو dT سنتز شد. جهت اطمینان از تکثیر صحیح cDNA و طراحی صحیح آغازگرها، واکنش PCR End point بر روی نمونه‌های cDNA سنتز شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ژن صورت گرفت. در نهایت به‌منظور تأیید و مقایسه بیان ژن‌ها در بین ژنوتیپ مورد مطالعه H و رقم Sh12، از روش RT-qPCR استفاده شد. این واکنش به‌وسیله مخلوط واکنش Takara

حجم بالایی از اطلاعات بیولوژیکی را با هزینه و زمان کم در مقایسه با روش‌های قدیمی فراهم آورده است (Saimi 2012). تاکنون استفاده از تکنیک‌های مختلف sRNA-Seq منجر به شناسایی miRNAهای حفاظت شده و جدید در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله آرابیدوپسیس، برنج، ذرت، بادام زمینی، زردآلو ژاپنی، گلابی و هلو شده است (Fahlgren et al. 2007; Sunkar et al. 2008; Gao et al. 2012; Barakat et al. 2012; Chi et al. 2011; Liu et al. 2014; Wu et al. 2014). در میان این تحقیقات miRNAهای پاسخ دهنده به تنش سرما نظیر miR160، miR166، miR171، miR398، miR477 در گونه‌های گیاهی مختلف مانند آرابیدوپسیس (Sunkar and Zhu 2004; Liu et al. 2008)، سپیدار (Lu et al. 2008)، برنج (Lv et al. 2010)، گندم (Tang et al. 2012)، هلو (Barakat et al. 2012)، چای (Zhang et al. 2014)، گوجه فرنگی (Cao et al. 2014; Koca et al. 2015) و پنبه (Wang et al. 2016) شناسایی شده‌اند. در مطالعه Mousavi et al. (2014a) و Karimi et al. (2016) برای اولین بار توالی‌یابی RNA و sRNAهای بادام با هدف بررسی پاسخ گیاه به تنش سرما در سطح مولکولی در اندام‌های زایشی صورت گرفته است. با توجه به نتایج حاصل از این دو مطالعه، در این بررسی miRNAهای Pdu-miR168، Pdu-miR160a و Pdu-miR171a به‌عنوان miRNAهای پاسخ دهنده به تنش سرما انتخاب و به‌منظور تأیید نتایج توالی‌یابی، الگوی بیان آن‌ها همراه با ژن‌های هدفشان با استفاده از روش RT-qPCR در بافت‌های زایشی دو ژنوتیپ متحمل و رقم حساس به سرما تحت تیمارهای مختلف تنش سرما مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور تأیید miRNAهای Pdu-miR168، Pdu-miR160a و Pdu-miR171a به‌عنوان miRNAهای پاسخ دهنده به تنش سرما بر اساس نتایج sRNA-seq و نیز مقایسه بیان این miRNAها و ژن‌های هدفشان در بین دو ژنوتیپ نسبتاً دیرگل و متحمل به سرما با نام H و رقم شاهرود ۱۲ (Sh12) به‌عنوان رقم دیرگل و حساس به سرما (Mousavi et al. 2014a)، نمونه‌برداری از این دو نوع ژنوتیپ به روش شاخه بریده (Imani et al. 2012) در

زایشی بساک و تخمدان به‌طور جداگانه با ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی مورد مطالعه قرار گرفت. ژن‌های هدف پیش‌بینی شده توسط سایت psRNATarget (Dai and Zhao 2011) و با استفاده از کاتینگ‌های حاصل از توالی‌یابی RNA بادام در مطالعه Mousavi et al. (2014a) و نیز توالی miRNAها حاصل از مطالعه Karimi et al. (2016) پیش‌بینی شدند (شکل ۱).

به‌طور کلی، بررسی تغییرات بیان ژن *Pdu-miR160a* روند کاهش بیان این miRNA را در پاسخ به تنش سرما در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه نشان داد. کاهش بیان معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) *Pdu-miR160a* در بافت بساک ژنوتیپ H و در تنش ۲- درجه سانتی‌گراد (FC= -۳/۶۶) مشاهده شد. در حالی‌که در بافت تخمدان در دو سطح تنش، تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین بررسی تغییرات بیان ژن هدف *PduARF18*^۲ در بافت بساک ژنوتیپ H، افزایش بیان معنی‌دار (FC= ۱/۳۷) را در تنش صفر درجه سانتی‌گراد و کاهش بیان معنی‌دار (FC= -۲/۰۷) را در تنش ۲- درجه سانتی‌گراد نشان داد. در بافت تخمدان نیز کاهش بیان معنی‌دار، تنها در تنش صفر درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۲).

حاوی SYBER GREEN به‌همراه آغازگرهای اختصاصی و cDNA رقیق شده در حجم ۱۲ میکرولیتر انجام گرفت. برای هر نمونه از سه تکرار تکنیکی استفاده شد. نرمال‌سازی نتایج داده‌های بیان نیز با استفاده از ژن کنترل داخلی 18S rRNA (Mallory et al. 2004) برای miRNAها و ژن اکتین (Guo et al. 2009) برای ژن‌های هدف صورت گرفت. Ct^۱ برای هر نمونه توسط نرم‌افزار Rotor-Gene Q Series Software به‌دست آمد و مقایسه نتایج با ژن‌های کنترل داخلی، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) انجام شد. میزان تغییر بیان miRNAها و ژن‌های هدف در شرایط تنش نسبت به کنترل، نیز با استفاده از آزمون t در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

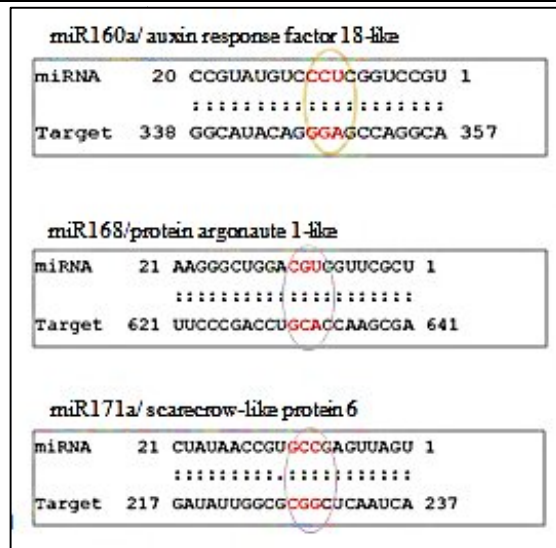
تغییرات الگوی بیان miRNAهای *Pdu-miR168*، *Pdu-miR160a* و *Pdu-miR171a* به‌همراه ژن‌های هدف‌شان، در دو ژنوتیپ متحمل H و نیز حساس Sh12، با استفاده از روش RT-qPCR در شرایط کنترل، تنش صفر درجه سانتی‌گراد (به مدت ۳ ساعت) و تنش ۲- درجه سانتی‌گراد (به مدت ۲ ساعت) در بافت‌های

^۱ cycling threshold

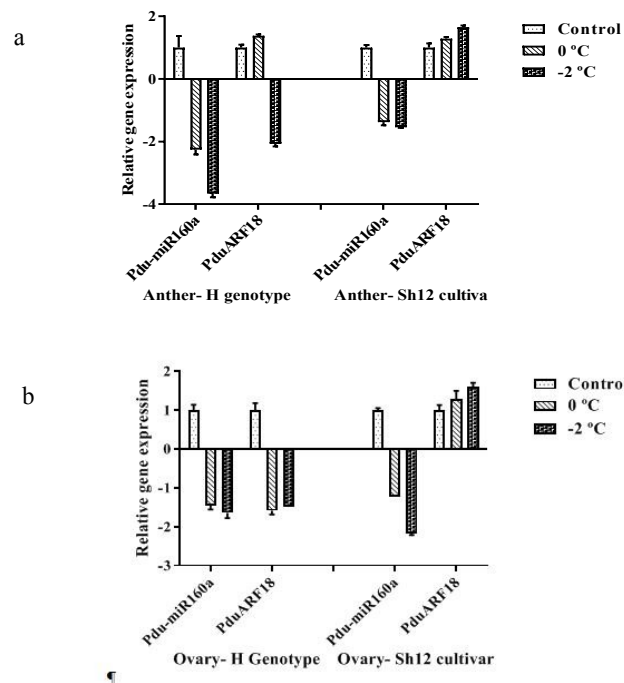
^۲ Auxin Response Factor18

جدول ۱- لیست آغازگرهای طراحی شده به‌منظور بررسی بیان miRNAها و ژن‌های هدف پیش‌بینی شده

نام آغازگر	توالی آغازگر (۵'-۳')	TM (°C)
<i>Pdu-miR160a</i> -RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGGCAT	۸۵/۵
<i>Pdu-miR160a</i> -F	GCGGCGGTGCCTGGCTCCCTG	۷۳/۱
<i>Pdu-miR168</i> -RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCCCG	۸۶/۳
<i>Pdu-miR168</i> -F	GCGGCGGTGCTGGTGCAGGTC	۷۳/۶
<i>Pdu-miR171a</i> -RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGATATT	۸۳/۸
<i>Pdu-miR171a</i> -F	GCGGCGGTGATTGAGCCGTGCC	۷۱/۵
Universal	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	۶۴/۶
<i>PduARF18</i> -F	TCGAGCAACCCCTTATGTAGTG	۶۰/۱
<i>PduARF18</i> -R	CCCGAATGAAGTTGTGGAAGA	۶۰/۳
<i>PduAGO1</i> -F	GTCCAGCCAGACCATCAGTT	۶۰/۵
<i>PduAGO1</i> -R	AGGGCGTATAGGGTGCATAG	۶۰/۵
<i>PduSCL6</i> -F	GCAGAGCTGATCGAAACAGG	۵۹/۵
<i>PduSCL6</i> -R	GGTGTGATGTGAAGGAGCA	۵۸/۴



شکل ۱- جستجوی محاسباتی برای مشابهت دو miRNA پاسخ دهنده به تنش سرمای کاندید و mRNA ژنهای هدف پیش‌بینی شده آنها، توسط سایت psRNATarget (محل جفت‌شدگی مرکزی در بین بازهای ۹ تا ۱۱ در شکل نشان داده شده است).



شکل ۲- مقایسه بیان نسبی Pdu-miR160a و ژن هدف آن PduARF18 در دو ژنوتیپ H و Sh12 تحت دو سطح تنش صفر و -۲ درجه سانتی‌گراد در بافت بساک (a) و تخمدان (b) بادام

تنش سرمایی در هر دو بافت زایشی بساک و تخمدان مشاهده شد. نتایج آزمون همبستگی بین داده‌های بیان Pdu-miR160a و Pdu-ARF18 تحت هر دو تنش سرمایی، همبستگی ۰/۸۵- و

مقایسه روند و الگوی تغییرات بیان، بین miRNA و ژن هدف، ارتباط منفی را در بافت بساک در پاسخ به تنش صفر درجه سانتی‌گراد ژنوتیپ H نشان داد، در حالی‌که در رقم Sh12، این ارتباط تنظیمی منفی مابین miR160 و ژن هدف در همه تیمارهای

انعطاف‌پذیری رشد را نشان داده‌اند، که همین ارتباط تنظیمی سبب سازگار شدن رشد گیاه در شرایط مختلف می‌شود. در شرایط معمول رشد، توزیع تنظیم شده و متفاوت درون سلولی اکسین، کمک به فرایندهای مختلف سازگاری نظیر، شکل‌گیری جنین، اندام‌زایی، شکل‌گیری مریستم و ترویج می‌شود. اکسین در گیاه دارای دو حرکت سریع و آهسته می‌باشد، در حرکت سریع، مسافت‌های طولانی از بافت جوان و فعال اندام هوایی به سمت ریشه‌ها را طی می‌کند و در حرکت آهسته از سلولی به سلول دیگر جابجا می‌شود، که این جابجایی توسط پمپ‌های ایفلاکس^۴ و اینفلاکس^۵ تنظیم می‌شود (Rahman 2013). پروتئین‌های متعلق به خانواده‌های ژنی AUX/LAX و PIN به‌عنوان بزرگ‌ترین تنظیم‌کننده انتقال سلولی اکسین به شمار می‌روند (Rahman 2013). ارتباط بین تنش سرما و اکسین، از طریق نقش این تنش بر روی عملکرد پروتئین‌های PIN و در نتیجه انتقال درون سلولی اکسین مشخص شده است (Shibasaki et al. 2009). تنش سرما بر روی جابه‌جایی قطبی اکسین از طریق بازدارندگی انتخابی انتقال درون سلولی حامل‌های ایفلاکس اکسین اثر می‌گذارد. میزان غیر طبیعی اکسین در بین سلول‌های ساقه یا ریشه، سبب نمو غیرمعمول اندام‌ها در طی تنش سرما، نظیر تأخیر در رشد و تولید مثل و فقدان علائم حیاتی معمول در طی تنش سرما می‌شود (Khraiwesh et al. 2012). از این‌رو یکی از مکانیسم‌های گیاه برای مقابله با تنش، تنظیم فاکتورهای مختلف در مسیر سیگنالینگ اکسین توسط miRNAها می‌باشد. تاکنون در مطالعات مختلفی، عملکردهای متنوعی از miR160، نظیر نقش در جوانه‌زنی بذر، نمو مراحل بعد از جنینی، اثر متقابل مسیرهای تنظیمی وابسته به ABA و اکسین، به‌واسطه نقش تنظیمی این miRNA بر روی فاکتور ARF10 شناسایی شده است (Liu et al. 2007)، اما هنوز اثر تنظیمی miR160 بر ARF18 به‌ویژه در تنش سرما به روشنی مشخص نشده است. نقش ARF18 در تقسیم سلولی، تمایز و نیز تجمع نشاسته در بذر مشخص شده است (Huang et al. 2016). هر چند که نقش مهم miR160 در تنش خشکی و ABA گزارش شده است (Ding et al. 2013)، اما در

۰/۹- را به‌ترتیب در اندام‌های زایشی بساک و تخمدان رقم Sh12 نشان داد.

miR160 در میان سلسله‌های گیاهی، از خزها تا گیاهان عالی بسیار حفاظت شده است و تشابه توالی بالغ آن در بسیاری از گونه‌های گیاهی تا بیش از ۸۰ درصد می‌باشد. ژن‌های هدف این miRNA، فاکتورهای پاسخ دهنده به اکسین^۱ می‌باشند. در آرآبیدوپسیس از میان ۲۳ ARF شناسایی شده، ARF10، ARF16 و ARF17، به‌عنوان ژن‌های هدف miR160 محسوب می‌شوند که دارای عملکرد حفاظت شده با کمی تفاوت متمایز می‌باشند. ARF به تنهایی قادر به تنظیم ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین نیستند و به مشارکت و همکاری با بازدارنده‌های AUX/IAA در پاسخ به اکسین، احتیاج دارند. AUX/IAA با ARFها در ناحیه دومین کربوکسی ترمینال‌شان^۲ تشکیل دایمر می‌دهند و نتیجه این اتصال عدم بیان ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین می‌باشد (Guilfoyle and Hagen 2007). در زمانی که سطح اکسین افزایش می‌یابد، AUX/IAA متصل با ARF، متصل به کمپلکس SCF^{TIR1/AFB} شده و یوبی کوئیتینه می‌شود. یوبی کوئیتینه شدن سبب دگریده شدن آن‌ها توسط پروتئوزوم 26S می‌شود. به‌دنبال دگریده شدن، پروتئین ARF آزاد و رونویسی از ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین را فعال می‌نماید. ARFها علاوه بر اینکه می‌توانند فعال‌کننده ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین باشند، می‌توانند بازدارنده نیز باشند. سیگنالینگ اکسین نقش کلیدی در بسیاری از فرایندهای رشد و نمو گیاه، از مرحله جنینی تا پیری دارد، اغلب این فرایندها از طریق بیان ژن‌های تنظیم شونده توسط اکسین شروع می‌شود. این ژن‌ها توسط دو نوع از خانواده فاکتورهای رونویسی، برای کنترل بیان ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین نیاز است، یکی از خانواده‌های ژنی ARFها هستند، که از طریق دومین متصل شونده به DNA، با عناصر پاسخ به اکسین^۳ واقع بر پروموتور ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین متصل و سبب فعالیت یا بازدارندگی این ژن‌ها می‌شوند. گروه دوم نیز بازدارنده‌های AUX/IAA هستند که سبب پاسخ ژن‌ها به اکسین می‌شوند. بسیاری از مطالعات، هم در سطح مولکولی و هم در سطح سلولی، ارتباط اکسین با تنظیم

⁴ Efflux

⁵ Influx

¹ Auxin Response Factor/ARF

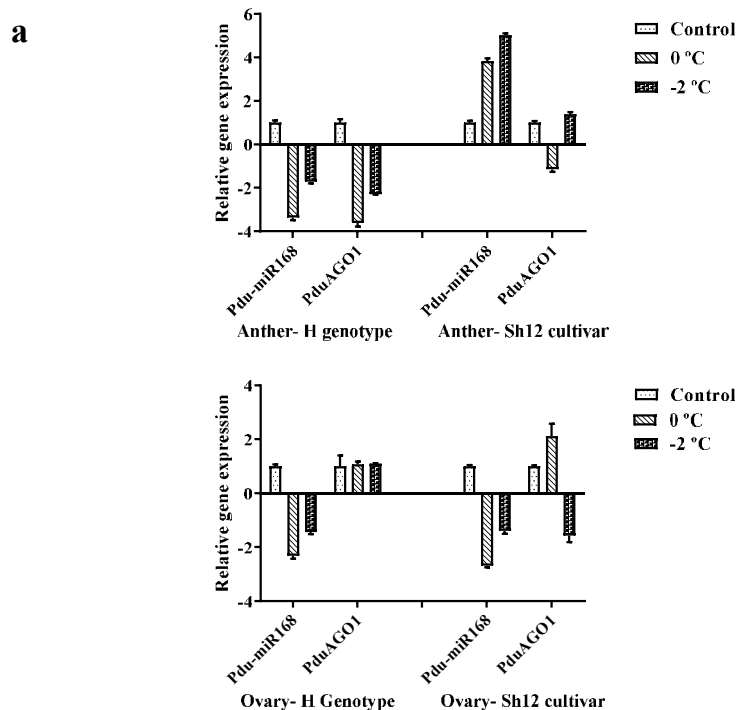
² CTD

³ AUXRE

دو ژنوتیپ متحمل و حساس در این مطالعه نیز می‌تواند مؤید این نتیجه باشد.

مقایسه الگوی بیان *Pdu-miR168* در هر دو بافت زایشی ژنوتیپ H و Sh12، اثر تنظیمی منفی این miRNA را در پاسخ به تنش سرما در ژنوتیپ H و اثر تنظیمی مثبت آن را در بافت بساک رقم Sh12 نشان داد (شکل ۳). بر خلاف روند افزایش بیان این miRNA در بافت بساک ژنوتیپ Sh12، در بافت تخمدان آن، همانند هر دو بافت زایشی ژنوتیپ H، اثر تنظیمی منفی این miRNA در پاسخ به تنش سرما مشاهده شد، به طوری که در تنش ۲- درجه سانتی‌گراد، کاهش بیان معنی‌دار ۱/۳۹ برابری را نشان داد (شکل ۳). اما در بافت بساک این ژنوتیپ حساس، افزایش معنی‌دار بیان ($FC = 5/03$) در تنش ۲- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. بررسی ارتباط تنظیمی *Pdu-miR168* و *PduAGO1* ارتباط تنظیمی منفی بین این دو ژن را تنها در پاسخ به تنش در ساعات اولیه (صفر درجه سانتی‌گراد) در هر دو بافت زایشی دو ژنوتیپ مورد مطالعه نشان داد.

مطالعه Thiebaut et al. (2012) و Lu et al. (2008)، عدم تغییرات معنی‌دار بیان این miRNA به ترتیب در نیشکر و سپیدار در هنگام تنش سرما گزارش شده است که این نتایج با نتایج این مطالعه که در آن عدم تغییرات معنی‌دار بیان miR160 در تنش ۲- درجه سانتی‌گراد در هر دو ژنوتیپ متحمل H و حساس Sh12 مشاهده شده، مطابقت دارد. از آنجایی که بیان سایر ARFها توسط miRNAهای دیگر نظیر miR167 و نیز miR390 در مسیر تنظیمی miR390- TAS3-ARF2/ARF3/ARF4 نیز تنظیم می‌شود و از طرفی نقش تنظیمی miR167 در پاسخ به تنش سرما در گیاهان مختلفی نظیر آرابیدوپسیس (Liu et al. 2008)، گوجه فرنگی (Koca et al. 2015)، برنج (Lv et al. 2010) و گندم (Tang et al. 2012) نشان داده شده است، می‌توان چنین برآورد نمود که ممکن است miR167 با تنظیم بیان ژن‌های ARF، در تنظیم مسیر سیگنالینگ اکسین در هنگام تنش سرما نقش داشته باشد و miR160 نقش مؤثر و اصلی در تنظیم این مسیر در زمان تنش سرما نداشته باشد. عدم مشاهده الگوی بیانی متفاوت در بین



شکل ۳- مقایسه بیان نسبی *Pdu-miR168* و ژن هدف آن *PduAGO1* در دو ژنوتیپ H و Sh12 تحت دو سطح تنش صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد در بافت بساک (a) و تخمدان (b) بادام

تنش‌های زیستی، مطالعات کمتری در مورد نقش پروتئین‌های AGO1 در تنش‌های غیرزیستی صورت گرفته است. مطالعات متعددی نشان داده است که miR168 و AGO1 ممکن است از لحاظ رونویسی تنظیم کننده یکدیگر باشند، به‌عنوان مثال در یک بررسی مشخص شد، با افزایش سطح پروتئین‌های AGO1، miR168 قادر خواهد بود با کمپلکس RISC تلفیق شود و رونوشت AGO1 را مورد هدف قرار دهد، اما در زمانی که میزان این پروتئین کاهش می‌یابد، miR168 به میزان کمتری می‌تواند با کمپلکس RISC ترکیب شود و بنابراین افزایش در میزان رونوشت AGO1 مشاهده می‌شود (Johnston and Hutvagner 2011). هر چند تجمع miR168 در هنگام تنش‌های مختلف غیرزیستی اتفاق می‌افتد، اما هنوز عملکرد miR168 و ژن هدف آن، AGO1 به درستی مشخص نیست. در گیاهان عالی یک مسیر تنظیمی مشترک برای کنترل میزان بیان miR168 در پاسخ به ABA و سایر تنش‌های غیرزیستی مشاهده شده است. در مطالعات انجام شده، توالی پروموتور miR168a در آرآبیدوپسیس مورد بررسی قرار گرفت و عناصر سیس با نام ABRE در آن شناسایی شد که این موضوع بیانگر ارتباط بین رونویسی miR168a و پروتئین‌های متصل شونده به ABRE بوده است. فاکتورهای رونویسی Leuzipper با نام AREB/ABF در انتقال سیگنال تنش وابسته به ABA از طریق اتصال با موتیف‌های ABRE واقع در پروموتور ژن‌هایی نظیر miR168 در بیان آن‌ها نقش دارد. رگولان AREB/ABF به‌عنوان مهم‌ترین کاست تنظیمی رونویسی در تنظیم بیان ژن وابسته به ABA محسوب می‌شود. این پروتئین‌ها در مراحل اولیه انتقال سیگنال ABA عمل کرده و بسیاری از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را تنظیم می‌کنند. شواهد بیوشیمیایی و ژنتیکی نشان می‌دهد، فعال شدن مستقیم بیان miR168 به‌وسیله 4 عضو از خانواده AREB/ABF صورت می‌گیرد (Li et al. 2012). در مطالعه‌ای که توسط Wang et al. (2015) صورت گرفت، نقش تنظیمی پروتئین HOS1 بر پروتئین AGO1، از طریق افزایش بیان miR168 در آرآبیدوپسیس مشخص شد. با توجه به اینکه ABA به‌عنوان سیگنال مهم در بسیاری از تنش‌های غیرزیستی از جمله

همچنین نتایج آزمون همبستگی بین داده‌های بیان *Pdu-miR168* و *PduAGO1* همبستگی منفی به میزان ۰/۸۹- را در تخمدان ژنوتیپ H تحت هر دو تنش تیمار سرمایی نشان داد که این نتیجه می‌تواند گویای تنظیم منفی ژن هدف *PduAGO1* از طریق *Pdu-miR168* در این بافت باشد. بر خلاف ژنوتیپ متحمل H، بررسی تغییر بیان برای ژن هدف *PduAGO1* در رقم Sh12، کاهش معنی‌دار (FC=-۱/۵۶) بیان این ژن را در بافت تخمدان، در پاسخ به تیمار تنش ۲- درجه سانتی‌گراد نشان داد.

miR168، به‌عنوان شناخته شده‌ترین miRNA می‌است که در زمان تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی القا می‌شود. این miRNA به‌همراه ژن هدفش، پروتئین آرگونات^۱ نقش اساسی را در شبکه تنظیمی پاسخ به تنش بازی می‌کند. القای بیان این miRNA سبب تنظیم هموستازی AGO1 در سطح پس از رونویسی می‌شود (Li et al. 2012; Khraiwesh et al. 2012). miR168 علاوه بر پاسخ به تنش، در قطبیت برگ و نیز تنظیم سایر miRNAها نقش دارد. نقش هومولوگ‌های miR168، در گونه‌های مختلف نظیر آرآبیدوپسیس، سپیدار و تنباکو و نیز در گیاهان تک لپه نظیر ذرت، برنج و گندم، در پاسخ به تنش‌های مختلف غیرزیستی مانند شوری، خشکی، تنش سرما، گرما، اشعه UV و تنش مکانیکی مشخص شده است (Liu et al. 2008; Zhou et al. 2008; Jia et al. 2010; Zhou et al. 2010). پروتئین‌های AGO، به‌منظور نمو گیاهان از اهمیت زیادی برخوردار هستند و در مکانیسم تنظیم بیان ژن‌ها از طریق ارتباط با siRNAهای نظیر siRNA و miRNAها نقش دارند. تاکنون نقش‌های مختلفی برای پروتئین‌های AGO، نظیر حفظ یکپارچگی ژنوم، کنترل سنتز پروتئین‌ها، پایداری RNA و تولید مجموعه‌ی وسیعی از siRNAها معرفی شده است. در میان پروتئین‌های AGO در آرآبیدوپسیس، AGO1 به‌عنوان جز اصلی در کمپلکس خاموشی القا شده توسط RNA محسوب می‌شود. تحقیقات نشان داده است که وقوع جهش در ژن *AGO1* سبب افزایش میزان رونوشت ژن‌های هدف miRNAهای مختلف می‌شود. هر چند مطالعات مختلفی در مورد نقش AGO1 در تنش‌های زیستی گزارش شده است، اما به نسبت

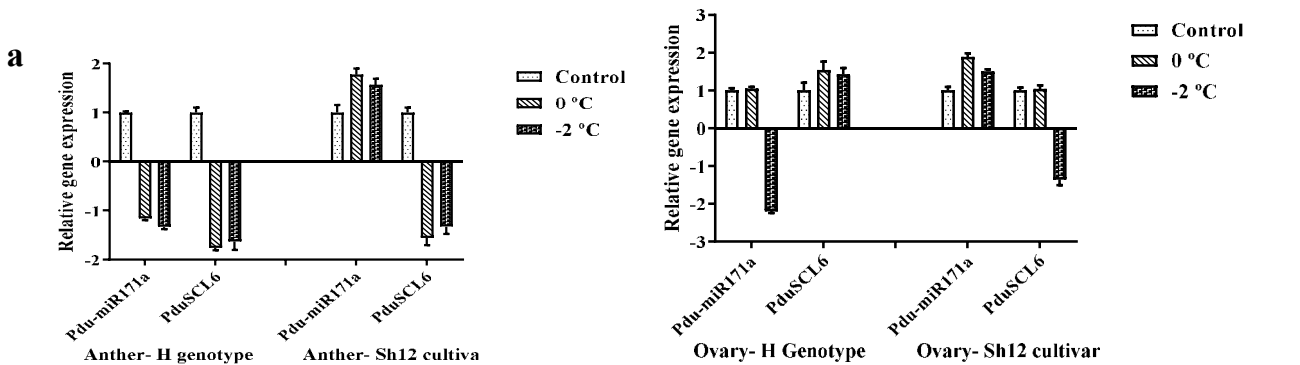
^۱ AGO1

تنش سرما می‌باشد و از طرفی وجود عناصر سیس ABRE در پروموتور miR168 می‌تواند گویای ارتباط مستقیم بین سیگنال ABA و بیان miR168 تحت تنش باشد و از آنجایی که سیگنالینگ ABA نقش اساسی در بیان ژن‌های پاسخ دهنده به تنش سرما را دارد، یکی از دلایل افزایش بیان miR168 می‌تواند به این علت باشد که در سیگنالینگ ABA، ژن‌های AREB/ABF افزایش بیان یافته و آن‌ها نیز از طریق اتصال به عناصر سیس ABRE در پروموتور این miRNA، سبب افزایش رونویسی و بیان آن شوند. این مکانیسم تنظیمی که موجب افزایش بیان miR168 می‌شود، بر خلاف انتظار در ژنوتیپ متحمل H تحت تنش سرما مشاهده نشد که می‌توان علت آن را در عواملی همچون نوع تیمار سرمایی و نیز شرایط و زمان نمونه‌برداری و یا وجود مکانیسم سازگاری با دخالت عوامل تنظیمی دیگر در برابر تنش سرما در ژنوتیپ متحمل H دانست.

بررسی الگوی بیان miR171a در بافت بساک و تخمدان ژنوتیپ متحمل H روند کاهش بیان را با افزایش شدت تنش سرما نشان داد این در حالی بود که نتایج حاصل از sRNA-seq در مطالعه Karimi et al. (2016)، افزایش بیان معنی‌دار این miRNA را در دو بافت زایشی نشان داد. بررسی الگوی بیان ژن هدف *PduSCL6* کاهش بیان معنی‌دار این ژن را در بافت بساک ژنوتیپ H، به میزان ۱/۷۵- و ۱/۶۳- به ترتیب پس از سه ساعت تیمار سرمایی صفر و دو ساعت تنش ۲- درجه سانتی‌گرادی نشان داد (شکل ۴)، در حالی که این ژن در بافت تخمدان در پاسخ به

تنش سرما تغییر بیان معنی‌داری را نشان نداد. بررسی تغییر بیان miR171a در رقم حساس به سرمای Sh12 در بافت بساک، افزایش بیان معنی‌دار آن را در سطح تنش صفر درجه سانتی‌گراد ($FC=1/77$) نشان داد. در حالی که در بافت تخمدان این miRNA در مرحله ابتدایی تنش صفر درجه سانتی‌گراد تغییر بیان معنی‌دار را نشان نداد. از طرف دیگر بررسی اثر تنظیمی *Pdu-miR171a* بر روی ژن هدف *PduSCL6* نشان داد که این miRNA در بافت تخمدان رقم Sh12 در سطح تنش ۲- درجه سانتی‌گراد اثر تنظیمی منفی داشته است.

یکی از miRNAهای قدیمی و حفاظت شده است که نقش‌های متعددی را در رشد و نمو گیاهان بازی می‌کند (Ma et al. 2010). اعضای مختلف خانواده miR171 در گیاهان دارای وظایف متعددی هستند، این وظایف شامل سازمان‌دهی شعاعی ریشه (Helariutta et al. 2000)، انتقال سیگنال (Bulow et al. 2012)، شاخه‌زایی (Wang et al. 2010)، انتقال فاز و تعیین مریستم گل (Curaba et al. 2013) و نیز تحمل به انواع تنش‌های غیرزیستی (Ma et al. 2010) می‌باشد. نقش miR171 در مقابله با تنش‌های گوناگون در گونه‌های مختلفی نظیر آراییدوپسیس، جو، ذرت و سیب‌زمینی گزارش شده است (Huang et al. 2017). در آراییدوپسیس سه ژن GRAS توسط miR171 تنظیم می‌شود که شامل SCL6/SCL6-IV، SCL22/SCL6-III و SCL27/SCL6-II (که با نام HAM یا LAM نیز شناخته می‌شود) می‌باشند.



شکل ۴- مقایسه بیان نسبی *Pdu-miR171a* و ژن هدف آن *PduSCL6* در دو ژنوتیپ H و Sh12 تحت دو سطح تنش صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد در بافت بساک (a) و تخمدان (b) بادام

برابر تنش، ژن‌های سم‌زدای ROS، نظیر سوپر اکسید دسموتاز^۳، آسکوربات پراکسیداز^۴، کاتالاز^۵ و گلوکاتیون پراکسیداز^۶ افزایش می‌یابند و آنزیم‌های مربوط به این ژن‌ها در تمام سلول‌ها پخش می‌شود. مطالعات نشان داده است که پروتئین DELLA از تجمع ROS از طریق افزایش بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های پایش ROS جلوگیری می‌کند (Ishibashi et al. 2012; Zhou et al. 2017). از پیامد دیگر تنش سرما کاهش کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II و در نهایت جلوگیری از فتوستتس می‌باشد (Zhou et al. 2017). بنابراین مکانیسم تنظیمی گیاه در این شرایط شامل کاهش بیوستتس GA و در نتیجه افزایش میزان پروتئین DELLA می‌باشد. SCL6 پروتئینی است که از طریق بازدارندگی PORC^۷ سبب کاهش بیوستتس کلروفیل II و در نهایت کاهش فتوستتس می‌شود. بنابراین در زمان تنش سرما، پروتئین تجمع یافته DELLA به SCL6 متصل و سبب بازدارندگی آن برای بیان ژن PORC می‌شود. در مطالعه حاضر کاهش بیان مشاهده شده ژن SCL6 در بافت بساک ژنوتیپ H و رقم Sh12، می‌تواند نشان دهنده پاسخ تنظیمی گیاه در دو سطح رونویسی و در سطح پس از رونویسی از طریق سرکوب بیان ژن SCL6 به واسطه پروتئین DELLA باشد که در نهایت موجب تنظیم بیوستتس کلروفیل و جلوگیری از کاهش فتوستتس در هنگام تنش شود. در این بررسی بیان متفاوت و وابسته به بافت زایشی miR171 در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه مشاهده شد. این اختلاف مشاهده شده در الگوی بیان می‌تواند به دلیل پاسخ تنظیمی متفاوت گیاه باشد که بسته به ژنوتیپ، گونه و نیز جنس متفاوت است، همان‌طور که در گیاهی مانند آرابیدوپسیس افزایش بیان این miRNA (Liu et al. 2008) و در برنج کاهش بیان آن (Lv et al. 2010) مشاهده شده است.

نتیجه‌گیری کلی

بادام یکی از درختان مهم میوه در ایران می‌باشد. مشکل عمده این گیاه سرمازدگی زمستانه و بهاره می‌باشد. به‌نحوی که سرمای اواخر زمستان و اوایل بهار خسارت جبران ناپذیری به بافت‌های

فاکتورهای رونویسی نقش‌های مهمی در تنظیم نمو گیاه و فرایندهای فیزیولوژیکی بازی می‌کنند. خانواده ژنی GRAS، تاکنون در ۳۰ گونه گیاهی متعلق به ۲۰ جنس مورد مطالعه قرار گرفته است. از میان پروتئین‌های GRAS، تنها برخی از پروتئین‌های SCL^۱ مکانیسم تنظیمی در سطح پس از رونویسی توسط خانواده miR171 را نشان داده‌اند. با وجود بررسی و مشخص شدن نقش تنظیمی miR171 و ژن هدف آن یعنی SCL در مکانیسم‌های مختلف گیاهی تحت شرایط گوناگون، هنوز چگونگی مکانیسم مولکولی عملکرد این miRNA و ژن هدفش به روشنی مشخص نشده است. در بررسی‌های صورت گرفته بر روی پروتئین DELLA در تنش سرما و نیز تأثیر آن در فتوستتس، تا حدودی نقش عملکردی ژن هدف SCL6 مشخص شده است. پروتئین‌های DELLA، از اجزای اصلی مسیر سیگنال GA هستند. در این مسیر، سیگنال GA (اسید جیبرلیک) توسط پذیرنده GA با نام GIDI^۲ دریافت می‌شود. اتصال GAهای فعال زیستی با GIDI، سبب اثر متقابل GIDI با دومین DELLA پروتئین‌های DELLA می‌گردد. این اثر متقابل، سبب اتصال پروتئین DELLA با کمپلکس SCF-E3 ubiquitin ligase و در نهایت تجزیه شدن DELLA توسط پروتئوزوم 26S می‌شود. بنابراین GA با اثر تنظیمی منفی بر روی DELLA موجب افزایش رشد گیاه می‌شود. در هنگام تنش سرما مشخص شده است که CBFهای القا شده توسط تنش سرما و سیگنالینگ GA، رشد گیاه و تحمل به تنش را در زمان تنش تنظیم می‌کنند. در واقع CBF القا شده از طریق مکانیسم وابسته به DELLA، رشد گیاه را محدود می‌کند. در این مکانیسم CBF1 میزان GA را از طریق افزایش رونویسی ژن GA2 اکسیداز (GA2ox3، GA2ox6) کاهش و سبب تجمع DELLA می‌گردد. محدود کردن رشد به واسطه DELLA، یکی از پاسخ‌های تنظیمی گیاه در زمان تنش سرما می‌باشد (Achard et al. 2008). همچنین از دیگر مضرات تنش سرما تجمع ROSهاست که منجر به آسیب غیرقابل بازگشت به غشا و سیستم فتوستتزی در سطح سلول می‌شود. در مکانیسم‌های دفاعی در

³ SOD

⁴ APX

⁵ CAT

⁶ GPX

⁷ Pchlide oxidoreductase

¹ Scarecrow-like

² GA-Insensitive Dwarf1

بساک رقم Sh12 افزایش بیان معنی دار و در هر دو بافت زایشی ژنوتیپ متحمل H، کاهش بیان آن‌ها مشاهده شد. تنظیم منفی *PduARF18* از طریق *Pdu-miR160a* در اندام‌های زایشی رقم Sh12 مشاهده شد و تنظیم منفی *PduAGO1* از طریق *Pdu-miR168* در بافت تخمدان ژنوتیپ H تحت هر دو تنش تیمار سرمایی مشاهده شد. همچنین اثر تنظیمی منفی *Pdu-miR171a* بر ژن هدف *PduSCL6* تحت تنش ۲- درجه سانتی‌گراد در تخمدان ژنوتیپ H و هر دو بافت زایشی رقم Sh12 آشکار شد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دارند که از دانشگاه شهرکرد به پاس فراهم نمودن شرایط و امکانات لازم برای اجرای این پروژه تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از دکتر علی ایمانی که در تهیه مواد گیاهی کمک شایانی نمودند، تشکر ویژه می‌شود.

زایشی آن وارد می‌نماید. اکثر روش‌های مورد استفاده جهت مقابله با سرمازدگی، کاربرد اقتصادی و مطلوبی نداشته است. لازمه غلبه بر این مشکل توسعه ارقام متحمل از طریق شناسایی و درک صحیح از تغییرات و تنظیمات بیان ژن‌ها در سطح رونویسی و پس از رونویسی می‌باشد. miRNAها به‌عنوان بخش اصلی در شبکه‌های تنظیمی در سطح پس از رونویسی شناخته شده‌اند، از این رو شناسایی miRNAهای پاسخ دهنده به تنش سرما و به‌کارگیری آن‌ها از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک می‌تواند کمک شایانی را در بهبود صفات دخیل در بروز تحمل به تنش سرما نماید، از این‌رو در این مطالعه نقش تنظیمی miRNAهای *Pdu-miR160a*، *Pdu-miR168* و *Pdu-miR171a* تحت تنش سرما به‌همراه ژن هدفشان از طریق بررسی بیان آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی کاهش بیان سه miRNA مورد مطالعه را در پاسخ به تنش سرما در ژنوتیپ متحمل H نشان داد. اختلاف الگوی بیان مابین دو ژنوتیپ حساس و متحمل برای *Pdu-miR168* و *Pdu-miR171a* مشاهده شد، به نحوی که در بافت

منابع

- Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P (2008) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *The Plant Cell* 8:2117-2129.
- Afshari H, Parvane T (2013) Study the effect of cold treatments on some physiological parameters of 3 cold resistance almond cultivars. *Life Science Journal* 4s:4-16.
- Akbar Aghdami Sh, Tohidloo Gh, Paknejad F, Hamidi A (2013) The effects of low temperatures on seed germination and related traits of fifty wheat cultivars under laboratory condition. *Iranian Journal of Agronomy and Plant Breeding* 1:25-34. (In Farsi).
- Barakat A, Sriram A, Park J, Zhebentyayeva T, Main D, Abbott A (2012) Genome wide identification of chilling responsive microRNAs in *Prunus persica*. *BMC Genomics* 13:481.
- Bulow L, Bolivar JC, Ruhe J, Brill Y, Hehl R (2012) 'MicroRNA Targets', a new AthaMap web-tool for genome-wide identification of miRNA targets in *Arabidopsis thaliana*. *BioData Mining* 5:7.
- Cao X, Wu Z, Jiang F, Zhou R, 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.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Lao KQ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* 20:e179-e179.
- Chi X, Yang Q, Chen X, Wang J, Pan L, Chen M, Yang Zh, He Y, Liang X, Yu Sh (2011) Identification and Characterization of microRNAs from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) by High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 11:e27530.
- Chiou TJ (2007) The role of microRNAs in sensing nutrient stress. *Plant Cell Environment* 3:323-332.
- Curaba J, Talbot M, Li Z Helliwell C (2013) Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinacy in barley. *BMC Plant Biology* 13:6.
- Dai X, Zhao PX (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids research* 2:W155-W159.
- Dezhampour J (2013) Evaluation of spring frost damage in different types of almond and apricot varieties. *Horticulture Science* 3:301-309. (In Farsi).
- Ding Y, Tao Y, Zhu C (2013) Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. *Journal of experimental botany* 11:3077-3086.
- Eldem V, Okay S, Ünver T (2013) Plant microRNAs: new players in functional genomics. *Turkish Journal Agriculture Forestry* 37:1- 21.

- Fahlgren N, Hill ST, Carrington JC, Carbonell A (2015) P-SAMS: a web site for plant artificial microRNA and synthetic trans-acting small interfering RNA design. *Bioinformatics* 1:157-158.
- Gao Z, Shi T, Luo X, Zhang Z, Zhuang W, Wang L (2012) High-throughput sequencing of small RNAs and analysis of differentially expressed microRNAs associated with pistil development in Japanese apricot. *BMC genomics* 1:371.
- Guilfoyle TJ, Hagen G (2007) Auxin response factors. *Current opinion in plant biology* 5:453-460.
- Guo P, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai G, Li R, Korff MV, Varshney RK, Graner A, 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* 12:3531-3544.
- Helariutta, YH, Fukaki J, Wyszocka-Diller K, Nakajima J, Jung G, Sena Hauser, MT, Benfey, PN (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* 101:555-567.
- Huang J, Li Z, Zhao D (2016) Dereglulation of the OsmiR160 target gene OsARF18 causes growth and developmental defects with an alteration of auxin signaling in rice. *Scientific reports* 6:29938.
- Huang W, Peng S, Xian Z, Lin D, Hu G, Yang L, Ren M, Li Z (2017) Overexpression of a tomato miR171 target gene SIGRAS24 impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. *Plant biotechnology journal* 4:472-488.
- Imani A, Ezaddost M, Asgari F, Masoumi S, 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.
- Ishibashi Y, Tawaratsumida T, Kondo K, Kasa S, Sakamoto M, Aoki N, ZhengSH, Yuasa T, Iwaya-Inoue M (2012) Reactive oxygen species are involved in gibberellin/abscisic acid signaling in barley aleurone cells. *Plant physiology* 4:1705-1714.
- Jia X, Ren L, Chen QJ, Li R, Tang G (2009) UV-B-responsive microRNAs in *Populus tremula*. *Journal of Plant Physiology* 18: 2046–2057.
- Johnston M, Hutvagner G (2011) Posttranslational modification of Argonautes and their role in small RNA-mediated gene regulation. *Silence* 1:5.
- Karimi M, Ghazanfari F, Fadaei A, Ahmadi L, Shiran B, Rabei M, Fallahi H (2016) The small-RNA profiles of almond (*Prunus dulcis* Mill.) reproductive tissues in response to cold stress. *PloS one* 6:e0156519.
- Kawashima CG, Yoshimoto N, Maruyama-Nakashita A, Tsuchiya YN, Saito K, Takahashi H, Dalmay T (2009) Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant Journal* 57:313-321.
- Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA-Genes Regulatory Mechanisms)* 2:137-148.
- Koca I, Filizb E, Tombulogluc H (2015) Assessment of miRNA expression profile and differential expression pattern of target genes in cold-tolerant and cold-sensitive tomato cultivars. *Biotechnology & Biotechnology Equipment* 5:851-860.
- Koca I, Filizb E, 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* 5:851-860.
- Kruszka K, Pacak A, Swida-Barteczka A, Nuc P, Alaba S, Wroblewska Z (2014) Transcriptionally and post-transcriptionally regulated microRNAs in heat stress response in barley. *Journal of Experimental Botany* 6:6123-6135.
- Li W, Cui X, Meng Z, Huang X, Xie Q, Wu H, Jin H, Zhang D, Liang W (2012) Transcriptional regulation of Arabidopsis MIR168a and argonaute1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant physiology* 3:1279-1292.
- Liang G, Yang FX, Yu DQ (2010) MicroRNA 395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 62:1046-1057.
- Liu H, Qin C, Chen Z, Zuo T, Yang X, Zhou H, Xu M, Cao Sh, Shen Y, Lin H, He X, Zhang Y, Li L, Ding H, Lübberstedt T, Zhang Zh, Pan G (2014) Identification of miRNAs and their target genes in developing maize ears by combined small RNA and degradome sequencing. *BMC genomics* 1:25.
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14:836-843.
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal* 1:133-146.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods* 25:402-408.
- Lu S, Sun YH, Chiang VL (2008) Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *The Plant Journal* 1:131-151.
- Lv DK, Bai X, Li Y, Ding XD, Ge Y, Cai H, Ji W, Wu N, Zhu YM (2010) Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene* 1:39-47.
- Ma HS, Liang D, Shuai P, Xia XL, Yin WL (2010) drought inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* *Journal of Experimental Botany* 61:4011-4019.
- Miranda C, Santesteban G, Royo B, De Pamplona U (2005) Variability in the relationship between frost temperature and injury level for some cultivated *Prunus* species. *HORTSCIENCE*. 2:357-361.
- Mousavi S, Alisoltani A, Shiran B, Fallahi H, Ebrahimie E, Imani A, Houshmand S (2014a) De novo transcriptome assembly and comparative analysis of differentially expressed genes in *Prunus dulcis* Mill. in response to freezing stress. *PloS one* 8:e104541.
- Mousavi SS, Shiran B, Immani A, Hooshmand S, Ebrahimi A (2014b) Assessment of some Physiological

- traits related to freezing stress in almond varieties with different flowering time. *Journal of Crop Production and Processing* 12:235-246. (In Farsi).
- Phillips JR, Dalmay T, Bartels D (2007) The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Letters* 581:3592–3597.
- Rahman A (2013). Auxin: a regulator of cold stress response. *Physiologia plantarum* 1:28-35.
- Rogers K, Chen X (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell* 7:2383-2399.
- Rubio-Piña JA, Zapata-Pérez O (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 5:11-18.
- Saini A, Li Y, Jagadeeswaran G, Sunkar R (2012) Role microRNAs in plant adaptation to environmental stresses. In: Sunkar R (Ed.) *MicroRNA in Plant Development and Stress Responses*. Springer, Berlin, Heidelberg, 219-232
- Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A (2009) Auxin response in Arabidopsis under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell* 21:3823-3838.
- Sinha S, Kukreja B, Arora P, Sharma M, Pandey GK, Agarwal M, Chinnusamy V (2015). The omics of cold stress responses in plants. In: Pandey GK (Ed.) *Functional Genomics Perspectives. Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*. Springer New York 143-194.
- Sunkar R, Zhu JK (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 2001–2019.
- Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, Zhang W, Zhu JK (2008) Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC Plant Biology* 8:25.
- Tang Z, Zhang L, Xu C, Yuan S, Zhang F, Zheng Y, Zhao C (2012). Uncovering small RNA-mediated responses to cold stress in a wheat thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing. *Plant physiology* 2:721-738.
- Thiebaut F, Rojas CA, Almeida KL, Grativol C, Domiciano GC, Lamb CR, Engler Jde A, Hemery AS, Ferreira PC (2012) Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. *Plant Cell & Environment* 3:502-512.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods* 1:12.
- Wang B, Duan CG, Wang X, Hou YJ, Yan J, Gao C, Kim JH, Zhang H, Zhu JK (2015) HOS1 regulates Argonaute1 by promoting transcription of the microRNA gene MIR168b in Arabidopsis. *The Plant Journal* 6:861-870.
- Wang Q, Liu N, Yang X, Tu L, Zhang X (2016) Small RNA-mediated responses to low-and high-temperature stresses in cotton. *Scientific reports* 6:35558.
- Wang L, Mai YX, Zhang YC, Luo QA, Yang HQ (2010) MicroRNA171c- targeted SCL6-II, SCL6-III, and SCL6-IV genes regulate shoot branching in Arabidopsis. *Molecular plant*. 3:794-806.
- Wu J, Wang D, Liu Y, Wang L, Qiao X, Zhang S (2014) Identification of miRNAs involved in pear fruit development and quality. *BMC Genomics* 15:953.
- Yang G, Zhou R, Tang T, Shi S (2008) Simple and efficient isolation of high-quality total RNA from *Hibiscus tiliaceus*, a mangrove associate and its relatives. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 3:257-264.
- Zhang Y, Zhu X, Chen X, Song C, Zou Z, Wang Y, Wang M, Fang W, Li X (2014) Identification and characterization of cold-responsive microRNAs in tea plant (*Camellia sinensis*) and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC plant biology* 1:271.
- Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, Luo L (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany* 61:4157-4168.
- Zhou X, Wang G, Sutoh K, Zhu JK, Zhang W (2008). Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 11:780-788.
- Zhou X, Chen S, Wu H, Xu H (2017) Effects of Cold Stress on the Photosynthesis and Antioxidant System of *Rhododendron chrysanthum* Pall. Preprint 1:1-10.