

تأثیر تنش شوری بر الگوی بیان miR160 و miR167 و ژن‌های هدف آن‌ها در گیاه آفتابگردان

Effect of salt stress on expression pattern of miR160 and miR167 and their target genes in sunflower

فهیمة خلجی^۱، بهروز شیران^{۱*}، فریا رفیعی^۱

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد، استادیار، دانشگاه شهرکرد

Khalaji F¹, Shiran B^{*1}, Rafiee F¹

1- Msc, Professor, Assistant Professor, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: beshiran45@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

شوری یکی از تنش‌های محیطی متداول است که رشد و نمو گیاه را محدود می‌کند. مطالعات مولکولی در پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف نشان داده است که گیاه در مواجهه با تنش‌ها، الگوی بیان ژن‌های بروز یافته و تنظیم‌کننده خود را تغییر می‌دهد. miRNAها دسته مهمی از تنظیم‌کننده‌های بیان ژنی می‌باشند که نسبت به تنش‌های محیطی پاسخ‌های متنوعی می‌دهند و نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن‌ها در مراحل پس از رونویسی ایفا می‌کنند. در این مطالعه بیان miR160 و miR167 و ژن‌های هدف آن‌ها، به‌ترتیب ژن BU026935 و ژن ARF6 در دو بافت برگ و ریشه و دو سطح تنش شوری ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم و شرایط غیرتنش (شاهد) به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بیولوژیکی بررسی شد. تنش شوری در مرحله شش برگی و مدت زمان ۲۴ ساعت اعمال شد. پس از سنتز cDNA با روش stem-loop RT-PCR، میزان بیان miR160 و miR167 به روش qRT-PCR اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در غلظت‌های مورد بررسی شوری، بیان miR160 در بافت برگ ابتدا افزایش و سپس کاهش می‌یابد. در حالی که مقادیر تغییرات بیان، نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان معنی‌دار miR160 در بافت ریشه تحت تنش ۷۵ میلی‌مولار بود، بیان آن در تنش ۱۵۰ میلی‌مولار با شرایط کنترل تفاوت معنی‌داری از نظر آماری نداشت. بیان ژن BU026935 نسبت به شاهد در هر دو سطح شوری و هر دو بافت افزایش بیان نشان داد. miR167 تنها در بافت برگ تحت تنش شوری ۷۵ میلی‌مولار کاهش بیان معنی‌دار نشان داده است. نتایج مطالعات و رسم شبکه مشخص کرد که یکی از دلایل اصلی کاهش اکسین در شرایط تنش شوری، افزایش miR167 می‌باشد. ژن ARF6 در بافت برگ و ریشه در شوری ۷۵ میلی‌مولار و ریشه در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار کاهش بیان نشان داد.

واژه‌های کلیدی

آفتابگردان
ژن ARF6
ژن BU026935
miR160
miR167

مقدمه

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی بوده که گیاهان زراعی سراسر جهان را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد. تنش شوری قادر است از راه‌های متعددی همچون سمیت عناصر، تخریب ساختمان خاک، کاهش تهویه خاک و تنش آبی ناشی از غلظت بالای نمک باعث خسارت به گیاهان شود. واکنش گیاهان به تنش شوری متفاوت است به گونه‌ای که گیاه ممکن است با تکمیل دوره رشد خود طی دوره‌هایی با شدت کم‌تر تنش، از اثرات تنش فرار کند و یا ممکن است تغییرات خاصی در وضعیت متابولیکی آن رخ داده و از این راه گیاه قابلیت اجتناب از تأثیرات تنش و یا تحمل به آن را پیدا کند. در دهه‌ی گذشته مطالعات مولکولی در پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف و فرآیند تحمل گیاه به این تنش‌ها، مورد توجه محققان قرار گرفته است. نتایج این مطالعات حاکی از آن است که سیستم‌های منظم و پیچیده‌ای در پاسخ به تنش شوری در گیاهان درگیر هستند به طوری که در مواجهه با تنش، الگوی بیان ژن‌ها و تنظیم کننده‌های مرتبط با آن‌ها تغییر می‌کند. شناسایی این ژن‌ها و تنظیم کننده‌های آن‌ها تحت تنش‌های محیطی با هدف تولید گیاهان تراریخته مقاوم به تنش از اهمیت خاصی برخوردار است (Moore et al. 2011). microRNA (miRNA)، RNAهای کوچک ۲۴-۲۱ نوکلئوتیدی هستند که نقش حیاتی در تنظیم بیان ژن‌ها در مراحل پس از رونویسی برعهده دارند. این RNAها نقش تنظیم‌کنندگی منفی در بیان ژن‌های گیاهی و جانوری با دو روش تجزیه mRNA هدف و یا از طریق چسبیدن به mRNA هدف و ممانعت از ترجمه آن ایفا می‌نمایند (Bartel 2004; Voinnet 2009; Zhang et al. 2009; Sunkar et al. 2012). ژن‌هایی را بر عهده دارند که در ارتباط با روندهای تکاملی مختلف از جمله قطبیت اندام‌ها (Bowman 2004)، رشد برگ (Chuck et al. 2007a)، تعیین جنسیت (Chuck et al. 2007) و نرعی‌می یا ماده عقی‌می (Millar and Gubler 2005) می‌باشند. اغلب miRNAها در جانوران و گیاهان حفاظت شده هستند. چندین miRNA اختصاصی تنش در گیاهان مدل تحت شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی شامل کمبود مواد غذایی، سرما، شوری بالا، آلودگی باکتریایی (Navarro et al. 2006)، پرتوتابی

UV-B و تنش‌های مکانیکی شناسایی شده‌اند (Khraiwesh et al. 2012). miR160 در تعدادی از گونه‌های گیاهی شامل آرابدوپسیس و برنج پیش‌بینی و به وسیله روش‌های آزمایشگاهی تایید شده است. miR160 به مکان‌های حفاظت شده موجود در نواحی غیرترجمه‌شونده ژن‌های تولیدکننده اکسین متصل شده و بیان آن‌ها را تنظیم می‌نماید (Rhoades et al. 2002). miR167 بیان دو ژن ARF6 و ARF8 را در آرابدوپسیس کنترل نموده و تولید مثل جنسی نر و ماده را تنظیم می‌نماید (Wu et al. 2006). در اغلب مطالعات، بیان miRNA تحت شرایط تنش تنها در یک بافت مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل حاکی از امکان تفاوت بیان miRNA در بافت‌های مختلف است. بدین صورت که در یک تنش خاص، یک miRNA در یک بافت بیان می‌شود، اما در بافت دیگر بیان نمی‌شود و یا در یک بافت کاهش بیان و در بافت دیگر در همان تنش افزایش بیان نشان می‌دهد. در همین راستا (Sunkar et al. 2012) الگوی بیان چهار miRNA را طی تنش کم آبی در دو بافت برگ و ریشه بررسی کرده و گزارش کردند که miR408 در برگ افزایش بیان اما در ریشه کاهش بیان نشان می‌دهد. همچنین در مطالعه آنان، miR156a و miR171 در برگ القا شدند اما بیان آن‌ها در ریشه تغییری نکرد (Sunkar et al. 2012).

با توجه به اینکه تا به حال هیچ گزارشی مبنی بر تایید حضور miR160 و miR167 در آفتابگردان ارائه نشده است، پژوهش حاضر به منظور تایید حضور miR160 و miR167 و ژن هدف آن‌ها BU026935 و ARF6 در گیاه آفتابگردان در بافت برگ و ریشه و نیز چگونگی تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر الگوی بیان این دو miRNA و ژن‌های هدف آن‌ها در دو بافت برگ و ریشه به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

تجزیه بیوانفورماتیکی

ژن‌های miRNA گیاهی از پایگاه اطلاعاتی توالی miRBase انتخاب شدند

(http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml). در ابتدا و برای miRNAهای شناسایی شده، آغازگر universal و

بخش آزمایشگاهی

کشت گیاهان و اعمال تیمار شوری

بدور رقم سیرنا آفتابگردان به مدت یک هفته درون دو لایه کاغذ صافی در درون انکوباتور با دمای 22 ± 1 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. کشت گیاهچه‌های یک هفته‌ای، به صورت هیدروپونیک در محلول هوگلند (Hoagland and Arnon 1950) یک چهارم قدرت انجام شد. پژوهش حاضر به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. پس از گذشت هفت روز، محلول هوگلند یک‌دوم قدرت جایگزین محلول یک‌چهارم قدرت شد. هوادهی با پمپ هوا، روزانه به مدت ۸ ساعت انجام شد. در مرحله‌ی سه هفته‌گی، گیاهچه‌ها تحت تنش ۷۵ mM و ۱۵۰ mM شوری قرار گرفتند و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش، از دو بافت برگ و ریشه‌ی کلیه تیمارهای مورد ارزیابی، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله در درون ازت مایع قرار داده شدند و تا زمان استخراج RNA در دمای -80°C درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آغازگرهای stem-loop RT بر اساس روش (Chen et al. 2005) و (Varkonyi et al. 2007) و با توجه به توالی‌های موجود برای miRNAها، طراحی شدند. به منظور پیش‌بینی ژن‌های هدف miR167 و miR160 از نرم‌افزار آنالین psRNA target (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) استفاده شد. طراحی آغازگر رفت و برگشت ژن هدف با استفاده از نرم‌افزار آنالین Primer3 صورت گرفت. لازم به ذکر است که لیست آغازگرها در جدول ۱ ارائه شده است.

جهت درک چگونگی ارتباط بین تنش شوری، miRNAهای مورد مطالعه و ژن‌های هدف آن‌ها از نرم‌افزار Pathway Studio 7 (elsevier) استفاده شد. این نرم‌افزار با جمع‌بندی اطلاعات موجود برای داده‌های بیولوژیکی که در PubMed و پایگاه‌های معتبر داده نظیر KEGG (protein interaction database; <http://www.genome.jp/kegg/>)، BIND (metabolic database; <http://www.genome.jp/kegg/>)، GO (Gene Ontology) (<http://www.bind.ca/>) وجود دارند، ارتباط بین داده‌های متنوع را به شکل شبکه در اختیار محققین قرار می‌دهد.

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای بررسی بیان miR167، miR160، ARF6 و 18S rRNA در آفتابگردان

آغازگر	توالی (5'-3')
miR160-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGGCAT
miR160-F	TTGTGCCTGGCTCCCTGT
miR167-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGATCA
miR167-F	GGCGGTTGAAGCTGCCAGCA
Universal	GTGCAGGGTCCGAGGT
BU026935-F	ACCCGTTTTCAAGCAATCC
BU026935-F	AGGAAAACGACCCAACTGAA
ARF6-F	GTCTTGAAGGCCAACTGGAG
ARF6-F	CTCTTGCGGCGACACTATTT
18S rRNA-F	TTCAGACTGTGAAACTGCGAATGG
18S rRNA-R	TCATCGCAGCAACGGGCAAA

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات پرولین، سدیم، پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم در دو بافت برگ و ریشه و دو سطح تنش (۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار) و شرایط کنترل

میانگین مربعات صفات					منابع تغییرات
نسبت پتاسیم به سدیم	پتاسیم	سدیم	پرولین	درجه آزادی	
۷۷۰۲/۳**	۱/۱۴**	۰/۰۰۷۱**	۲۲۴/۴۵**	۲	شوری
۱۰۳۳/۷**	۱۵/۵۱**	۰/۰۰۴۷**	۲۷۳/۰۷**	۱	بافت
۳۶/۸۲ ^{ns}	۰/۰۸۴**	۰/۰۰۰۵**	۴۷/۵۷**	۲	اثر متقابل
۱۳/۰۹	۰/۰۰۶۳	۰/۰۰۰۰۷	۰/۳۹	۱۲	خطا
				۱۷	کل
۸/۴۳	۳/۴۹	۱۲/۶۶	۵/۰۱		تغییرات (CV)

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

استفاده شد. برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی و دو تکرار بیولوژیکی در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SAS 9.0 و MSTAT-C انجام و جهت مقایسات میانگین از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد. آنالیز داده‌های Real Time بر اساس روش Ct (Schmittgen and Livak 2008) انجام شد.

نتایج و بحث

به‌منظور اطمینان از تنش وارده به گیاهان، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش، میزان پرولین، سدیم و پتاسیم در دو بافت ریشه و برگ مورد بررسی قرار گرفت. بررسی داده‌های حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد تأثیر تنش شوری و نوع بافت برای میزان پرولین، درصد سدیم، پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم در سطح یک درصد معنی دار است. اثر متقابل تنش و بافت برای صفت نسبت پتاسیم به سدیم معنی دار نشد اما این اثر متقابل برای سه صفت دیگر یعنی میزان پرولین، سدیم و پتاسیم در سطح یک درصد معنی دار بود. نتایج آزمایش نشان داد که شوری بر میزان پرولین تأثیر معنی دار (در سطح یک درصد) داشته است، به طوری که میزان پرولین در شرایط تنش نسبت به کنترل در هر دو بافت ریشه و برگ افزایش معنی داری نشان داد (شکل ۱). این یافته با نتایج مطالعات قبلی در تنش شوری مطابقت داشت (Khedr et al. 2003; Akram et al. 2009; Munns and Tester 2008; Trovato et al. 2008). پرولین به دسته مهمی از محلول‌های آلی آمینواسیدی تعلق داشته، تجمع آن رابطه مستقیمی

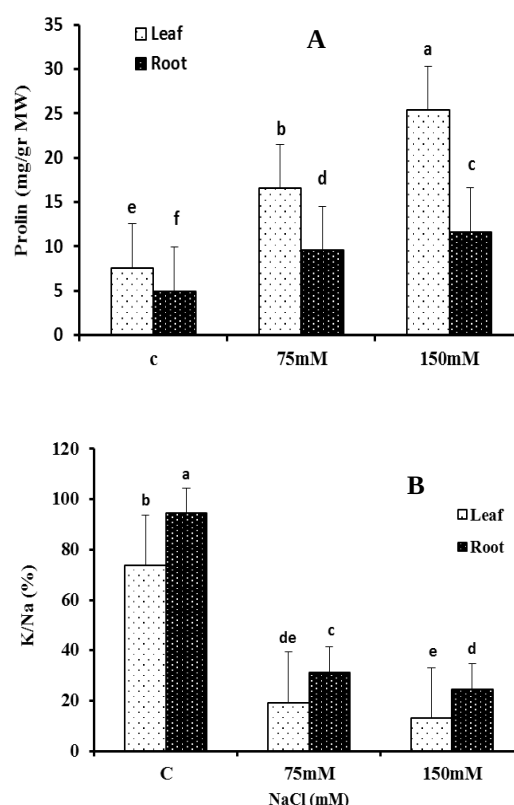
به‌منظور بررسی میزان تنش وارده به گیاهان مورد مطالعه نمونه‌برداری جهت اندازه‌گیری پرولین، سدیم و پتاسیم نیز در همین زمان صورت پذیرفت. استخراج و اندازه‌گیری پرولین به روش بیتز و همکاران (Bates et al. 1973) و با استفاده از بافت - تر برگ و ریشه و معرف ناین هیدرین اسید انجام شد. درصد سدیم و پتاسیم نیز به روش Hald (1974) و با استفاده از دستگاه فلیم‌فوتومتر اندازه‌گیری شدند.

استخراج RNA و تجزیه Real-Time PCR

جداسازی RNA کل با استفاده از محلول استخراج TRIZOL، ساخت شرکت Invitrogen و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز و روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ساخت شرکت اپندورف آلمان تعیین شد. سنتز cDNA مربوط به miRNA با استفاده از کیت Takara (Cat. #RR037A, Japan) و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. جهت اطمینان از وجود cDNA، برنامه end point اجرا و به منظور تایید نهائی، محصول end point بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد قرار گرفت. ساخت آگارگر توسط شرکت ماکروژن کره صورت گرفت. چگونگی الگوی بیان miRNAهای مورد مطالعه و ژن‌های هدف آنها با استفاده از واکنش PCR در زمان واقعی (Real-time PCR) با استفاده از دستگاه Rotor gene-Q از شرکت Qiagen ارزیابی شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر انجام شد. برنامه واکنش شامل ۹۵ درجه به مدت یک دقیقه و سپس طی ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه برای پنج ثانیه، ۶۰ درجه برای ۳۰ ثانیه بود. ژن 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی در نرمال‌سازی نتایج

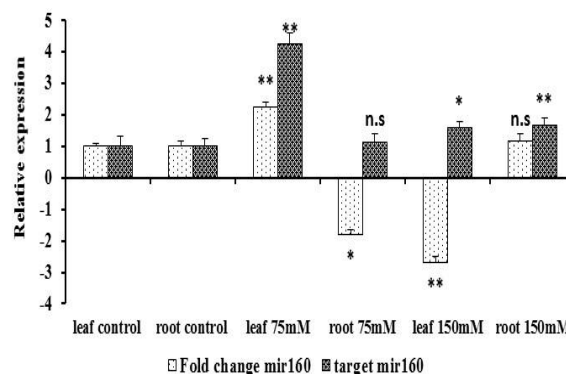
همچنین نتایج حاصل نشان داد که تنش شوری به صورت معنی-داری (در سطح پنج درصد) موجب کاهش نسبت پتاسیم به سدیم می شود (شکل ۱). نکته قابل توجه وجود اختلاف معنی دار بین دو بافت برگ و ریشه در شرایط کنترل از نظر نسبت پتاسیم به سدیم می باشد. از سوی دیگر، در هر دو بافت در هر دو سطح شوری نیز اختلاف معنی داری وجود داشت و نسبت به شاهد افت بسیار شدیدی را شاهد بودیم که بیانگر افزایش شدید تجمع سدیم و در نتیجه کاهش نسبت پتاسیم به سدیم می باشد. در بررسی های سایر محققان نیز به اثرات زیان آور شوری بر کاهش نسبت پتاسیم به سدیم در شرایط شور اشاره شده است (Khoshgoftarmanesh et al. 2002; Malakoti et al. 2002; Mozaffari and Malakoti 2004). (Noreen and Ashraf et al. 2010) نیز پیشنهاد کردند که می توان از نسبت پتاسیم به سدیم به عنوان یک معیار قابل قبول برای تعیین میزان تحمل به شوری در گیاهان استفاده کرد. در این مطالعه نسبت پتاسیم به سدیم در شرایط تنش نسبت به شرایط کنترل در هر دو بافت کاهش معنی داری یافت که آهنگ این کاهش در برگ چشمگیرتر از ریشه بود (جدول ۲). افزایش نسبت پتاسیم به سدیم در شرایط نرمال، در صورتی وقوع می یابد که شاهد کاهش جذب سدیم در عین بالا بودن جذب پتاسیم باشیم (Jackson and Volk 1997). نتایج پژوهش های برخی از محققان نشان داده که افزایش نسبت پتاسیم به سدیم در محیط رشد گیاه، سبب بهبود رشد آفتابگردان و ذرت شده است (Benlloch et al. 1994). همچنین با افزایش شوری، یون سدیم در برگ آفتابگردان افزایش و نسبت پتاسیم به سدیم کاهش یافته است (Delgado and Sanchez-Raya 1999; Aminpanah and Sorooshzadeh 2004) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. بر اساس نتایج حاصل از qRT-PCR بیان *miR160* و *miR167* آفتابگردان تحت شرایط بدون تنش و دو تیمار شوری (۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار) تعیین شد. مطالعات اخیر نشان می دهند که *miRNA*ها کلاس مهمی از تنظیم کننده های ژن می باشند که بعد از اعمال تیمارهای تنش های غیرزیستی دچار تغییر بیان می شوند (Zhao et al. 2009; Ding et al. 2009). تنش شوری بیان *miRNA160* و ژن هدف آن (*BU026935*) را به طور معنی داری در نمونه های برگ و ریشه در دو سطح تنش شوری تغییر داد (شکل ۲).

با تحمل به شوری دارد و در درون سلول های گیاهی به عنوان ماده حفظ کننده تعادل اسمزی بین سیتوپلاسم و واکوئل عمل می کند (Flowers et al. 1977). علاوه بر این، پرولین نقش اسمولاتی به عنوان مخزن کربن و نیتروژن داشته و گیاه را در برابر صدمات رادیکال های آزاد حفاظت می کند (Matysik et al. 2002). در پژوهش حاضر میزان تجمع پرولین در بافت برگ نسبت به ریشه بطور معنی داری (در سطح یک درصد) بیشتر بود که با یافته های (Mohamed and Ismail 2011) مطابقت دارد. نتایج حاصل از پژوهش (Sultana et al. 1999) حاکی از افزایش معنی دار میزان پرولین در برنج تحت تنش شوری نسبت به کنترل می باشد. (Cavelierl 1983) بیان داشته است افزایش میزان پرولین در گیاهان تحت تنش شوری، در واقع نوعی واکنش گیاه نسبت به کاهش پتانسیل آب در محیط ریشه می باشد. در این زمان پرولین با کم کردن پتانسیل اسمزی سلول های ریشه، شرایط لازم برای جذب آب و عناصر غذایی را فراهم می کند (Khedr et al. 2003).



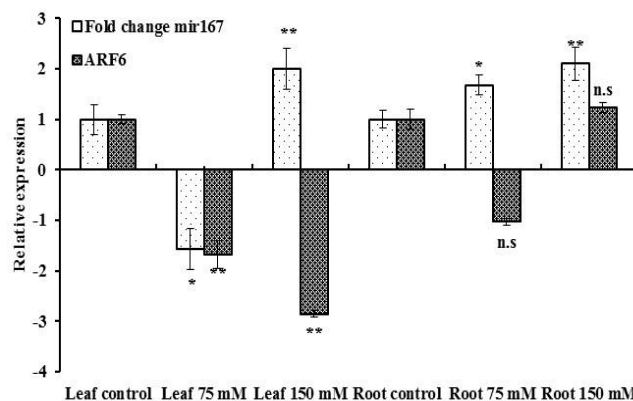
شکل ۱- مقدار پرولین (A) و نسبت پتاسیم به سدیم (B) در دو بافت برگ و ریشه و در دو سطح تنش ۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم در مقایسه با کنترل

تنظیمی *miR160* برای ژن *BU026935* در ریشه تحت شوری ۷۵ میلی مولار و برگ تحت شوری ۱۵۰ میلی مولار الگوی هماهنگ و یا نیمه هماهنگ بود. نتایج نشان داد بیان ژن *BU026935* نسبت به شاهد در هر دو سطح شوری و هر دو بافت افزایش داشت که این افزایش در بافت برگ بیشتر بود. بر اساس مطالعات (2008) Munns and Tester به محض قرار گرفتن گیاه در محیط شور، سرعت رشد برگ‌های در حال توسعه کاهش یافته، ظهور برگ‌های جدید آهسته‌تر و در صورت ادامه تنش متوقف شده، شاخه‌ها و شاخساره‌های کم‌تری تشکیل می‌شود. نکته جالب این‌که حساسیت رشد شاخساره‌ها به شوری نسبت به رشد ریشه بیش‌تر است، این امر به دلیل آن است که کاهش سرعت رشد برگ نسبت به ریشه مصرف آب به وسیله گیاه را کاهش داده و بنابراین امکان حفظ آب و تعدیل غلظت‌های نمک موجود در خاک فراهم می‌شود. با توجه به این نکته، ژن *BU026935* در پاسخ به تنش شوری به‌ویژه در بافت برگ و مراحل اولیه تنش نقش دارد. بنابراین مطالعه این ژن در تنش شوری مفید است، زیرا تاکنون عملکردی از این ژن گزارش نشده است. (Lu et al. (2011) بررسی یک واریته مقاوم به تنش شوری گندم (Fengkang 8)، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش ۲۰۰ میلی مولار نمک مشاهده کردند که *miR160* در ریشه افزایش بیان نشان داد. در مطالعه حاضر *miR160* تحت تنش ۱۵۰ میلی مولار در ریشه افزایش بیان داشت. بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که شدت شوری بالا موجب افزایش بیان *miR160* شده است. با استفاده از نرم‌افزار *Pathway Studio7*، شبکه اینتراکشن‌های موجود بین این ژن‌ها، پروتئین‌ها و *miRNA*ها رسم و بررسی شد. شبکه رسم شده نقش کلیه *miRNA*های مورد بررسی را در تنش شوری تایید کرد. تغییرات بیانی *miRNA*ها در هر سطح از تنش متغیر بود و روند بیان آن‌ها با ژن‌های هدف خود در اغلب موارد روندی ناهماهنگ نشان داد که می‌تواند به دلیل تفاوت مابین سلول هدف و سلولی که *miRNA* در آن بیان می‌شود، بوده باشد و این موضوع بیان‌گر پیچیده بودن شبکه تنظیمی *miRNA*ها می‌باشد. نتایج حاصل از رسم اینتراکشن‌های موجود برای *miR160* تاییدکننده تنظیم منفی فاکتورهای رونویسی ARF توسط این *miRNA* است.

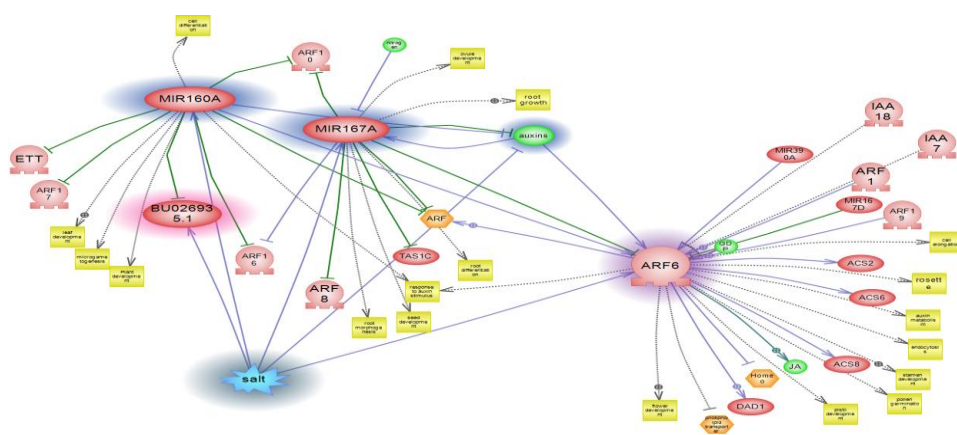


شکل ۲- نمودار بیان نسبی *miR160* و ژن هدف آن *BU026935* در ریشه و برگ آفتابگردان در حالت کنترل و تنش (۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار). وجود علامت * و ** در بالای هر ستون نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در شرایط تنش و کنترل به ترتیب در سطوح احتمال پنج و یک درصد و ns غیر معنی‌دار می‌باشد

BU026935 تنها ژنی بود که به‌عنوان ژن هدف *miR160* توسط نرم‌افزار آنالیز *psRNA target* شناسایی شد. در غلظت‌های مورد بررسی شوری، بیان *miR160* در بافت برگ ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت به‌گونه‌ای که در شوری ۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار به ترتیب شاهد افزایش و کاهش بیان معنی‌دار نسبت به شرایط نرمال بودیم. به بیان دیگر، به ازای افزایش میزان شوری در برگ بیان *miR160* کاهش می‌یابد که این امر نشان‌دهنده حساس بودن آن نسبت به شوری می‌باشد. در مقابل، مقادیر تغییرات بیان نشان‌دهنده کاهش بیان معنی‌دار *miR160* در بافت ریشه تحت تنش ۷۵ میلی مولار بود، در حالی که در تنش ۱۵۰ میلی مولار بیان آن با شرایط کنترل تفاوت معنی‌داری از نظر آماری نداشت. بیش‌ترین مقدار تغییرات بیان برای *miR160* در بافت برگ در شوری ۷۵ میلی مولار مشاهده شد. از سوی دیگر، ژن هدف آن یعنی *BU026935* طی تنش ۱۵۰ میلی مولار در دو بافت و نیز در تنش ۷۵ میلی مولار در بافت برگ، افزایش بیان معنی‌داری داشت. با توجه به اینکه بیان *miR160* در بافت برگ تحت تنش شوری ۷۵ میلی مولار و ریشه تحت تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار نسبت به شاهد افزایش یافت و ژن هدف آن نیز در این دو بافت افزایش بیان نشان داد، در نتیجه نوع تنظیم *miR160* و ژن هدف آن از نوع تنظیم ناهماهنگ بود. در مقابل، از آنجایی که شاهد کاهش بیان *miR160* در ریشه در تنش ۷۵ میلی مولار و برگ در تنش ۱۵۰ میلی مولار و افزایش بیان ژن *BU026935* بودیم، لذا الگوی



شکل ۳- نمودار بیان نسبی *miR167* و ژن هدف آن *ARF6* در ریشه و برگ آفتابگردان. در حالت کنترل و تنش (۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار). وجود علامت * و ** در بالای هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در شرایط تنش و کنترل به ترتیب در سطوح احتمال پنج و یک درصد و ns غیر معنی دار می باشد.



شکل ۴- رسم شبکه ژنی مربوط به اثر شوری بر بیان *miR167* و *miR160* و ژن هدف آن‌ها *ARF6* با نرم افزار Pathway studio 7.0

که نتیجه آن افزایش ریشه های جانبی می باشد. طبق مطالعات Youning et al. (2009) تنش شوری در غلظت های بالا موجب کاهش رشد ریشه های جانبی و اندام زایی می شود که در نتیجه کاهش میزان اکسین می باشد. نتایج مطالعه حاضر بیانگر افزایش بیان *miR160* در تنش شدید و در نتیجه کاهش میزان اکسین بود. همانطور که بیان شد و نتایج آزمایش حاضر نیز نشان داد، میزان پرولین در تنش شدید بیشتر از تنش ملایم است و در تنش شوری، پرولین با کم کردن پتانسیل اسمزی سلول های ریشه، شرایط لازم برای جذب آب و عناصر غذایی را فراهم می کند (Khedr et al. 2003). در چنین شرایطی گیاه رشد خود را با کاهش سنتز اکسین کاهش داده اما با افزایش پرولین شرایط را برای جذب آب و عناصر غذایی فراهم می کند. نتیجه تجزیه و تحلیل بیان نسبی *miR167* و ژن هدف *ARF6* در شکل ۳ نشان

همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود این ژن ها در فرآیندهای بیولوژیکی مختلف نقش دارند و بیان آن ها را سرکوب می کند. همچنین وجود اتصال بین تیمار شوری و *miR160* نشان دهنده نقش این miRNA در شرایط تنش شوری است. *miR160* احتمالاً در شبکه سیگنال دهی بوسیله تنظیم TIR1 که یک عضو مهم از SCF E3 ubiquitin ligase است، درگیر می باشد که موجب انحطاط پروتئین های Aux/IAA در پاسخ به اکسین می شوند (Gray et al. 2001; Mallory et al. 2005) (شکل ۴). تنش شوری موجب افزایش رشد ریشه ها به منظور جذب آب و مواد غذایی از لایه های پایینی خاک می شود. افزایش بیان *miR160* موجب کاهش تعداد ریشه های جانبی و کاهش باروری می شود (sunkar et al. 2007). نتایج این پژوهش بیانگر کاهش بیان *miR160* در شوری ۷۵ میلی مولار و افزایش میزان اکسین می باشد

پاسخ‌دهنده به سیگنال اکسین رونویسی انجام می‌دهند، به‌طور منفی تنظیم می‌کند. در نتیجه با توجه به تأثیر زیاد تغییر در الگوی بیان فاکتورهای رونویسی بر روی بیان ژن‌های مرتبط با آن‌ها، می‌توان انتظار داشت که کاهش یا افزایش جزئی در بیان *miR167* منجر به افزایش و یا کاهش بیان فاکتورهای رونویسی و ژن‌های پاسخ به سیگنال اکسین شود (Mallory et al. 2005). اکسین در تنظیم رشد گیاه دخالت داشته و غلظت آن در پاسخ به شوری تغییر پیدا می‌کند. IAA با تغییر در تعداد و اندازه برگ‌ها، موازنه آبی گیاه را تنظیم می‌کند (Cleland 1987).

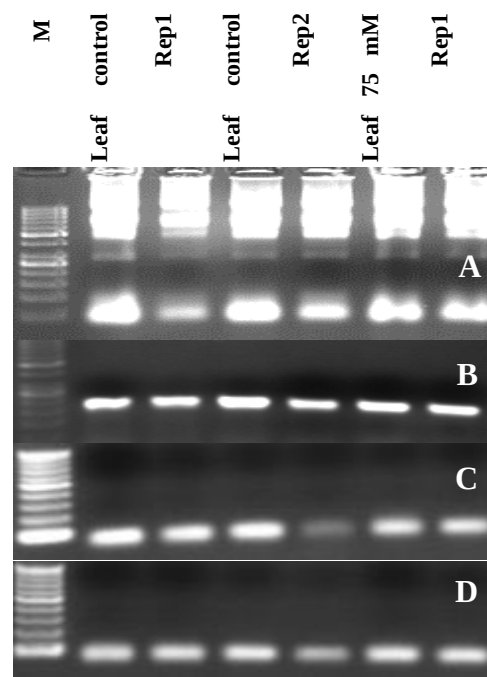
در برنج، طی پنج روز پس از اعمال تیمار شوری (NaCl) کاهش معنی‌داری در سطوح اکسین گزارش شده‌است (Nayyer and Walter 2003). همچنین تنش شوری موجب کاهش سطح اکسین به میزان ۷۵ درصد در گوجه فرنگی شد (Dunlap and Binzel 1996). تنش شوری در تعادل فیتوهورمون‌ها تغییر ایجاد کرده، افزایش حجم ABA را در برگ تحریک کرده و حجم اکسین، جیبرلین و سیتوکینین را کاهش می‌دهد (Yurekli et al. 2001). می‌توان گفت احتمالاً یکی از دلایل اصلی کاهش اکسین در تنش شوری افزایش بیان *miR167* باشد. این کاهش اکسین در شرایط تنش به این دلیل است که گیاه سعی در حفظ بقای خود داشته و تا حد امکان از رشد جلوگیری می‌نماید تا انرژی خود را صرف زنده ماندن کند. نتایج Liu et al. (2008) در گیاهچه‌های دو هفته‌ای آراییدوپسیس در شوری ۳۰۰ میلی‌مولار نشان داد که *miR156h*، *miR167c*، *miR167d*، *miR168* و *miR171b* به‌طور تدریجی از دو تا ۲۴ ساعت بعد از قرارگرفتن در معرض شوری افزایش بیان داشتند. همچنین نتایج این محققین حاکی از آن بود که *miR167a* بعد از ۲ ساعت تنش خشکی تجمع یافته و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش افزایش چشمگیری می‌یابد؛ در حالی که *miR168* ابتدا افزایش یافته و بعد از ۱۶ ساعت به سطح نرمال بازگشت. نتایج Liu et al. (2008) با نتایج افزایش بیان *miR167* در مطالعه حاضر مطابقت دارد. با افزایش بیان *miR167* انتظار کاهش رشد آفتابگردان در شرایط شوری را داشتیم که کاهش رشد در مطالعه حاضر مشاهده شد.

داده شده‌است. ژن *ARF6* در مطالعات قبلی صورت‌گرفته بر روی آراییدوپسیس، گندم و برنج (Lu et al. 2011; Liu et al. 2008; Sunkar et al. 2012)، به‌عنوان ژن هدف *miR167* معرفی شده بود. همانطور که ملاحظه می‌شود *miR167* تنها در بافت برگ تحت شوری ۷۵ میلی‌مولار کاهش بیان معنی‌دار نشان داده و در بافت ریشه در شوری ۷۵ میلی‌مولار و برگ و ریشه در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری افزایش بیان داشته است. در مقابل، ژن *ARF6* در بافت برگ و ریشه در شوری ۷۵ میلی‌مولار و ریشه در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار کاهش بیان و در بافت ریشه در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار افزایش بیان نشان داد اما بیان ژن *ARF6* در بافت ریشه نسبت به شاهد غیرمعنی‌دار بود. همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص است تنها هنگامی که افزایش سه برابری بیان ژن *ARF6* صورت گرفت، شاهد تنظیم هماهنگ این ژن توسط *miR167* بودیم. در آراییدوپسیس به عنوان یک گیاه مدل، بیان *miR167* تحت تنش خشکی و شوری نشان‌دهنده‌ی نقش آن در پاسخ به تنش می‌باشد (Covarrubias and Reyes 2009). *miR167* و *miR164* در نقطه زمانی ۰/۵ ساعت در لاین NC286 ذرت کاهش بیان نشان دادند، که بیانگر قابلیت این miRNAها در شروع دریافت سیگنال تنش شوری می‌باشد. در آزمایش میکروآرای که تأثیر سه تنش غیرزیستی (شوری، خشکی و سرما) بر روی آراییدوپسیس در مرحله دو هفته‌گی بررسی شده بود، *miR167* نسبت به تیمار شوری شدید (۳۰۰mM NaCl) و مانیتول ۲۰۰mM پاسخ داد (Covarrubias and Reyes 2009). Liu et al. (2008) بیان داشتند که miRNAهای *miR393*، *miR167*، *miR168* و *miR394* در دسته پاسخ مستقیم در برابر تنش یا محرک‌های خارجی قرار دارند. دو ژن هدف *miR167* (*ARF6* و *ARF8*) فاکتورهای پاسخ‌دهنده اکسین هستند که با جنبه‌های مهم کشاورزی مانند رشد گیاه و پاسخ در برابر تنش‌های محیطی درگیر هستند (Fedoroff 2002; Himmelbach 2003; Achard 2006). بنابراین *miR167* می‌تواند نقشی بالقوه در برنامه‌های مقاومت به تنش بوسیله اثرات شبکه‌های سیگنال‌دهی اکسین ایفا نماید و با تنظیم میزان بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به سیگنال اکسین، میزان رشد گیاه را طی شرایط تنش تنظیم نماید. همچنین *miR167* چند عامل رونویسی را که از ژن‌های

بسته به شرایط، یکی از این ژن‌ها را به عنوان ژن هدف اصلی مورد هدف قرار داده و از رونویسی آن جلوگیری می‌کنند. علاوه بر دلایل ذکر شده برای تنظیم ناهماهنگ و نیمه هماهنگ که باعث سرکوب جزئی ژن هدف و یا بیان miRNA در یک سلول و بیان ژن هدف آن در سلول مجاور می‌شود (Saini et al 2012)، با تجزیه شبکه مشخص شد که علاوه بر *miR167*، *miR390* و *miR160* نیز بیان ژن *ARF6* را کنترل می‌نمایند. چندین فاکتور رونویسی (*IAA18*، *IAA7*، *IAA1* و *IAA19*) نیز بیان ژن *ARF6* را کنترل می‌کنند که این عوامل و همچنین ژن کنترل کننده دیگر می‌تواند دلیل تنظیم ناهماهنگ *ARF6* توسط *miR167* در این پژوهش باشد. این نکته نشان‌دهنده نیاز به رسم شبکه ژنی و یافتن عوامل موثر در بیان یک ژن می‌باشد. همانطور که در شبکه رسم شده مشاهده می‌شود ژن *ARF6* بیان مثبت ژن‌های *ACB6*، *ACB8* و *ACB1* را تنظیم می‌کند که مسئول تولید اتیلن در گیاه هستند و همانطور که اشاره شد در تنش شوری میزان اتیلن در گیاه کاهش می‌یابد. بنابراین افزایش بیان *miR167* و در نتیجه کاهش بیان *ARF6* و در نهایت کاهش بیان ژن‌های *ACB6*، *ACB8* و *ACB1* مورد انتظار می‌باشد. از دیگر وظایف *ARF6* تولید جاسمونیک اسید است و طبق مطالعات (Walia et al. 2007) یکی از وظایف جاسمونیک اسید پاسخ به تنش شوری می‌باشد. *miR160* دارای چندین ژن هدف می‌باشد (شکل ۴) از جمله ETT، که این فاکتور رونویسی دارای چندین عملکرد از جمله فعال‌کننده‌ی فاکتورهای رونویسی و DNA binding می‌باشد؛ بنابراین با افزایش بیان *miR160* شاهد کاهش یا عدم فعالیت این ژن و در نتیجه کاهش رونویسی به صورت غیر مستقیم خواهیم بود. مطالعه این ژن می‌تواند در پیشبرد مطالعات رونویسی ژن موثر باشد.

سپاسگزاری

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



شکل ۵- الکتروفورز ژل آغاز ۱/۵ درصد RNA استخراج شده از نمونه‌های بافت برگ کنترل و تحت تنش (A)؛ فراورده Endpoint PCR با آغازگرهای 18S (B)؛ آغازگرهای اختصاصی *miRNA160* (C)؛ آغازگرهای اختصاصی *miRNA167* (D). (M) نشانگر اندازه 50 bp لدر

بیان هر جفت ژن در پاسخ به تنش دارای سه حالت است: جفت ژن دارای همبستگی مثبت یا منفی با یکدیگر باشند و یا این‌که هیچ‌گونه همبستگی بین آن‌ها وجود نداشته باشد. این موضوع باعث می‌شود شناسایی روابط ژنی با استفاده از ابزارهای آماری کلاسیک مانند ضریب همبستگی پیرسون مشکل شود. از این رو وجود روش‌های بیوانفورماتیکی که قادر به شناسایی روابط بین جفت ژن‌ها و یا گروه‌های ژنی هستند حائز اهمیت است. در دهه گذشته اکثر تحقیقات انجام شده در زمینه بیولوژی گیاهی روی عملکرد یک ژن منفرد متمرکز شده بود اما امروزه تجزیه‌های ژنتیکی روی گیاه آراییدوپسیس وجود شبکه‌های تنظیمی را ثابت کرده و دانشمندان به جای تمرکز بر روی یک ژن خاص، سعی دارند روابط بین ژنی و چگونگی همکاری ژن‌ها در شبکه‌های ژنی را کشف کنند. بنابراین رسم شبکه‌های ژنی حائز اهمیت است. همانطور که در شبکه ژنی (شکل ۴) مشخص است، *miR160* و *miR167* هر کدام دارای چند ژن هدف می‌باشند که

منابع

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Straeten VD, Peng J, Harberd, NP (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-94.
- Akram MS, Ashraf M, Akram NA (2009) Effectiveness of potassium sulfate in mitigating salt-induced adverse effects on different physio-biochemical attributes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Flora* 204: 471-483.
- Aminpanah H, Sorooshzadeh A (2004) Assessment of calcium nitrate effect on sodium and potassium distribution in seedlings of rice under saline conditions. *Journal of Biology* 18: 92-100.
- Ashraf Sh, Afshari Ah, Abadi A (2010) Calculation of salinity of calcium salts, sodium and potassium on ion concentration in the plant. *Quarterly Journal of Plants and Ecosystems* 22:39-52. (In Farsi)
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116:281-297.
- Bates LS, Waldron RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39:205-217.
- Benlloch M, Ojeda MA, Ramos J, Rodríguez-Navarro A. (1994). Salt sensitivity and low discrimination between potassium and sodium in bean plants. *Plant and Soil* 166: 117-123.
- Cavelierl AJ (1983) Proline and glycin-betain accumulation by *Sparina alterniflora* L. in response to NaCl and nitrogen in a controlled environment. *Oecologia* 57: 20-24.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ (2005) Real time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acid Research* 33:179-186.
- Chuck G, Meeley R, Irish E, Sakai H, Hake S (2007) The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1." *Nature genetics* 39, no 12: 1517-1521.
- Cleland RE (1987) Auxin and cell elongation. In: P. J. Davies (ed). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Kluwer . Dordrecht, The Netherlands pp. 132-148.
- Covarrubias AA, Reyes JL (2009) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell and Environment*. 33: 453-685.
- Delgado IC, Sanchez-Raya AJ (1999) Physiological response of seedling sunflower to salinity and K sources. *Communications in Soil Science and plant analysis* 30:5-6.
- Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z, Zheng Y (2009) Differential of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany* 103:29-38.
- Dunlap JR, Binzel ML (1996) NaCl reduces Indol-3-acetic acid levels in the roots of tomato plants independent of stress-induced abscise acid. *Plant Physiology* 112: 379-384
- Fedoroff NV (2002) Cross-talk in abscisic acid signaling. 140: re 10.
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 28:89-121.
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M (2001) Auxin regulates SCF (TIR1) dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414:271-276.
- Hald PM (1947) measurement of sodium and the flame photometer for the potassium in biological materials. *Journal of Biology Chemistry* 167:499-510
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in plant biology* 6: 470-479.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular* 347:32.
- Jackson WA, Volk RJ (1997) Role of potassium in photosynthesis and respiration. pp 109-188.
- Mohamed AN, Ismail MR (2011) Changes in organic and inorganic solutes of in vitro tomato cultivars under NaCl stress. *Australian Journal of Crop Science* 5:939-944.
- Khedr AHA, Abbas MA, Wahid AAA, Quick WP, Abogadallah GM (2003) Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancretium maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* 54: 2553-2562.
- Khoshgoftarmanesh A, Sadat S (2002) Mineral nutrition of vegetables and horticultural crops under saline conditions, the Department of Horticulture Department of Agriculture, Agricultural Education Press and Publishing. pp 87. (In Farsi)
- Khraiweh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819:137-148.
- Leung AKL, Sharp PA (2010) MicroRNA Functions in Stress Responses. *Molecular Cell* 40: 205-215.
- Liave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002) Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297: 2053-2056.
- 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.
- Lu W, Li J, Liu F, Gu J, Guo C, Xu L, Xiao K (2011). Expression pattern of wheat miRNAs under salinity stress and prediction of salt-inducible miRNAs targets. *Frontiers of Agriculture in China* 5: 413-422.
- Malakoti M, Keshavarz CC, Saadat S, Khldbryn B (2002) Nutrition of plants in salinity conditions. Publications of Horticulture Department, Department of Agriculture, Iran. (In Farsi)
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B (2005) MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17: 1360-1375.
- Matysik J, Alia Balu B, Mohanty P (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* 82: 525-531.
- Millar AA, Gubler F (2005) The Arabidopsis GAMBYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *The Plant Cell Online* 17: 705-721.

- Moore JW, Loake GJ, Spoel SH (2011) Transcription dynamics in plant immunity. *The Plant Cell* 23: 2809-2820.
- Mozaffari V, Malakoti VJ (2002) Effects of potassium fertilizers on yield of sunflower in three years and changes of chlorine in Urmia, oilseeds Optimum Nutrition (Proceedings), publisher Khanyran. (In farsi)
- Munns R and Tester M (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59:651-681.
- Nayyer H, Walter DP (2003) Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat affected by calcium and abscisic acid. *Plant Biology* 46: 275-279.
- Noreen S, Ashraf M (2010) Modulation of salt (NaCl) induced effects on oil composition and fatty acid profile of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid. *Society of Chemical Industry* 90: 2608-2616.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513-520.
- Saini A, Li Y, Jagadeeswar G, Sunkar R (2012) Role of microRNAs in Plant Adaptation to Environmental Stresses. *Springer* 15: 219-232.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3: 1101-1108.
- Sultana N, Ikeda T, Itoh R (1999) Effect of NaCl on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice. *Environmental and Experimental Botany* 42: 211-220.
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science* 12: 301-309.
- Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. *Plant Science* 4: 196-203.
- Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 2001-2019.
- Trovato M, Mattioli R, Costantino P (2008) Multiple Roles of proline in Plant Stress Tolerance and Development. *Rendiconti Lincei* 19: 325-346.
- Varkonyi GE, Wu R, Wood M (2007) A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 2007: 3-12
- Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16:123-132.
- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669-687.
- Walia H, Wilson C, Condamine P, Liu X, Ismail AM, Close TJ (2007) Large scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. *Plant, Cell and Environment* 30: 410-421.
- Wu MF, Tian Q, Reed JW (2006) Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* 133:4211-8.
- Wang Y, LiK, Li X (2009) Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology* 166: 1637-1645.
- Yürekli F, Türkan I, Porgali ZB, Topçuoglu SF (2001) Indoleacetic acid, gibberellic acid, zeatin, and abscisic acid levels in NaCl-treated tomato species differing in salt tolerance. *Israel journal of plant sciences* 49:269-278.
- Zhang BH, Pan X and Sellwang E (2009) Identification of soybean microRNAs and their targets. *Planta* 229:161-192.
- Zhang. BH, Pan X, Anderson TA (2006) Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS letters* 580:3753-3762.
- Zhao B, Ge L, Liang R, Li W, Ruan K, Lin H, Jin Y (2009) Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC Molecular Biology* 8:10-29.

Effect of salt stress on expression pattern of miR160 and miR167 and their target genes in sunflower

Khalaji F¹, Shiran B^{*1}, Rafiee F¹

1. Msc Student, Professor, Assistant Professor, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

* Corresponding Author, Email: beshiran45@gmail.com

ABSTRACT

Salinity is a common environmental stress that seriously affects plant growth. The results of molecular researches in relation to environmental stresses showed that expression pattern of genes and their regulators were changed in response to stresses. miRNA's are an important class of gene expression regulators that diversely responds to environmental stresses and have a key role in post transcriptional regulation. In this study, the expression of *miR160* and *miR167* were studied by qRT-PCR at two salinity levels, (75 and 150 mM NaCl) and control condition in both root and leaf tissues. A factorial experiment based on completely randomized design(CRD) with three replication was used in this study. Plants were exposed to salinity stress in six-leaf stage and after 24 h sampling from leaf and root was performed then samples were freezed in liquid nitrogen. cDNA was synthesized with stem-loop RT-PCR procedure. Expression of *miR160* and *miR167* was measured using qRT-PCR technique. The results showed that the expression of *miR160* was firstly increased and then decreased. While the values of fold change showed significant reduction of *miR160* expression in 75mM salinity level, it didn't show any significant differences comparing to control condition at 150 mM salinity. The expression of *BU026935* gene in both salinity levels and tissues were increased in comparison to control. *MiR167* was significantly down regulated at 75 mM salinity. The results of network analysis revealed that increasing *miR167* expression under salinity condition is leading to auxin reduction. *ARF6* expression level was decreased at 75mM salinity level in both root and leaf tissues. At 150 mM salinity level *ARF6* gene showed down regulation only in root tissue.

Key Words

ARF6 gene, *BU026935* gene, *miR160*, *miR167*, Sunflower