

بررسی بیان miR160 و miR393 و ژن‌های هدف آن‌ها در نیشکر تحت

تنش غرقابی

Investigating the expression of miR160 and miR393 and their target genes in sugarcane under waterlogging stress

رحیم غزی^۱، لیلا نژادصادقی^{۲*}، خسرو مهدی‌خانلو^۲، داریوش نباتی احمدی^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- به‌ترتیب استادیار، استادیار، دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید

چمران اهواز، اهواز، ایران

Ghezzi R¹, Nejadsadeghi L^{*2}, Mehdikhanlou Kh², Nabati Ahmadi D²

1- MSc Graduate Student of Genetics and Plant Breeding, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Assistant Professor, Assistant Professor, Associate Professor, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (Corresponding author: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir)

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۷)

چکیده

غرقابی یکی از تنش‌های غیرزیستی است که رشد و عملکرد نیشکر را کاهش می‌دهد. نیشکر نسبتاً به تنش غرقابی متحمل است با این حال میزان آسیب به گیاه به ژنوتیپ، شرایط محیطی، مرحله‌ی رشد و مدت زمان تنش بستگی دارد. به‌دلیل عدم وجود اطلاعات کافی از نقش تنظیمی miRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها در پاسخ گیاه نیشکر به تنش غرقابی، براساس نتایج حاصل از مطالعات در گیاهان مدل و هم‌خانواده از جمله سورگوم، miR160 و miR393 و ژن‌های هدف آن‌ها یعنی AEF17 و AFB2 انتخاب و بیان آن‌ها با استفاده از روش qRT-PCR در دو وارپته تجاری CP48-103 و CP69-1062 تحت تیمار ۷ و ۱۴ روز تنش غرقابی در مقایسه با گیاهان شاهد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مقایسه بیان نسبی نشان داد، miR160 و miR393 در هر دو وارپته تحت شرایط تنش افزایش بیان داشتند و نقش مهار منفی آن‌ها در کاهش بیان ژن هدف یعنی AFB2 و AEF17 نمایان گشت. نقش تنظیم منفی miR160 و miR393 بر ژن‌های AFB2 و AEF17 در تنش ۱۴ روز بیش‌تر بود، همچنین در وارپته CP69-1062 در مقایسه با وارپته CP48-103 این نقش برجسته‌تر بود.

واژه‌های کلیدی

تنظیم منفی

ریز RNA

ریشه‌های هوایی

ژن‌های هدف

واريته نيشكر انجام گرفته مشخص شد، تحت تنش غرقابي رشد ريشه‌هاي هوايي تحريك شده، به طوري كه گياهان تحت تنش در مقايسه با گياهان شاهد حجم قابل توجهي ريشه هوايي توليد نمودند.

تحمل به تنش‌هاي غيرزيستي پديده بسيار پيچيده‌اي است و شامل اثر متقابل بين عناصر پاسخ دهنده به تنش و فاکتورهاي مولكولي و بيوشيميايي متعددي است كه رشد و نمو گياه را تحت تأثير قرار مي‌دهند. به همراه تغيير در بيان عوامل رونويسي، ژن‌ها و اجزاي پيام‌رسان، تغيير در پروفایل ريزRNAها تحت تنش‌هاي محيطي مختلف گزارش شده است (Zhang 2015). ريز RNAهاي گياهي در واقع RNAهاي كوچك تنظيمي به طول ۲۰ تا ۲۴ نوكلئوتيد هستند و نتيجه رونويسي ژن‌هاي MIR توسط RNA پليمراز II مي‌باشند كه در دامنه وسيعي از فرايندهاي رشد و نمو از جمله پاسخ به تنش‌هاي زستي و غيرزيستي نقش دارند (Zhang and Wang 2015). ريزRNAها نقش اصلي را در پاسخ گياهان به تنش‌هاي غيرزيستي بازي مي‌كنند و پاسخ به تنش‌هاي غيرزيستي توسط آن‌ها از طريق تعديل سطح رونوشت خود، رونوشت ژن‌هاي هدف و يا از طريق تغيير در فعاليت مجموعه ريزRNA-پروتئين صورت مي‌گيرد. اين امر منجر به تغيير زمان، محل و ميزان بيان پروتئين‌ها از ژن‌هاي گدكننده و در نتيجه كنار آمدن و سازگار شدن گياه به شرايط نامساعد محيطي مي‌شود (Xu et al. 2019). اين سيستم كنترل بيان ژن در سطح پس از رونويسي يك مكانيسم حياتي براي تحمل تنش توسط گياهان به‌شمار مي‌رود كه از طريق برش و يا مهار بيان ژن‌هاي هدف وارد عمل مي‌شود.

تجزيه و تحليل توالي‌هاي RNA كوچك به دست آمده از گياه آرابيدوپسيس تحت تنش‌هاي غيرزيستي مختلف بارويكردهاي مقايسه‌اي و محاسباتي منجر به شناسايي تعداد زيادي ريزRNA شد كه در پاسخ گياه به تنش‌هاي غيرزيستي نقش اصلي را ايفا مي‌كنند (Sunkar and Zhu 2004). براي مثال miR395 تحت شرايط بدون تنش در گياه شناسايي نشد، در حالي‌كه اين ريز RNA در شرايط كمبود گوگرد افزايش بيان نشان داد. در شرايط عادي سطوح پايين miR160، miR393 و miR167 براي تنظيم دقيق فاکتورهاي پاسخ دهنده به اكسين (ARF) و رونويسي از

نيشكر بالاترين عملكرد زيست‌توده در بين گياهان زراعي را دارد و حدود ۷۰ درصد شكر دنيا را تأمين مي‌كند (Wang et al. 2016). عملكرد نيشكر به طور قابل توجهي تحت تأثير تنش‌هاي غيرزيستي¹ مانند خشكي، شوري و غرقابي قرار مي‌گيرد. تنش غرقابي پديده‌اي با گسترش جهاني است كه رشد و بقاي گياه نيشكر را به شدت تحت تأثير قرار مي‌دهد و مي‌تواند منجر به کاهش عملكرد اين گياه بين ۱۵ تا ۴۵ درصد شود (Gomathi and Chandran 2009). درك بهتر شرايط فيزيولوژيكي و مكانيسم مولكولي گياه نيشكر در پاسخ به شرايط غرقابي مي‌تواند به توسعه استراتژي‌هايي براي حفظ محصول در شرايط غرقابي كمك كند. شرايط ماندابي و بالا بودن آب زيرزميني در مراحل اوليه رشد و شكل‌گيري اجزاء عملكرد مي‌تواند با افزايش مرگ و مير پنجه‌ها و کاهش سرعت رشد گياه منجر به کاهش عملكرد شود (Jain et al. 2017). بخش اعظم خسارت تنش غرقابي مربوط به کاهش اكسيژن در محيط ريشه است كه در نتيجه کاهش تبادلات گازي بين محيط هوايي و بخش ريزوسفر اتفاق مي‌افتد. علاوه بر اين، تنش غرقابي فرايندهاي فيزيولوژيكي از قبيل تنفس، تراوايي سلول‌هاي ريشه و هم‌چنين جذب آب و عناصر غذايي را تحت تأثير قرار مي‌دهد. تنش غرقابي ممكن است زماني‌كه سطح آب زيرزميني تا سطح خاك تنها ۱۰ تا ۱۵ سانتيمتر فاصله داشته باشد نيز اتفاق افتد. براي گياه نيشكر سطح ايستابي ايدئال ۴۰ تا ۹۵ سانتيمتر در نوسان است (Omary and Izuno 1995). مرگ سريع نوک ريشه‌ها در واكنش به كمبود اكسيژن به طور معمول با تحريك رشد ريشه‌هاي هوايي در گونه‌هاي مقاوم همراه است. گلاز و همكاران (۲۰۰۲) مشاهده كردند در نواحي كه سطح آب زيرزميني به ۱۵ سانتيمتر برسد، کاهش عملكرد نيشكر مشاهده شد. تشكيل ريشه‌هاي هوايي يكي از تغييرات مورفوفيزيولوژيكي معمول در گياهان متحمل در پاسخ به شرايط غرقابي است (Fukao et al. 2019). اين ريشه‌هاي خاص دسترسي به آب و مواد غذايي را در غياب ريشه‌هاي اصلي گياه بر عهده مي‌گيرند. در تحقيقي كه توسط گيلبرت و همكاران (۲۰۰۷) بر روي چند

¹ Abiotic stresses

کشت نیشکر را به خود اختصاص می‌دهند. واریته CP69-1062 میانرس و واریته CP48-103 دیررس می‌باشد. ترکیب خاک گلدان‌ها متشکل از یک‌سوم خاک زراعی، یک‌سوم ماسه و یک‌سوم کود دامی پوسیده می‌باشد. به‌منظور اعمال تنش غرقابی، گلدان‌ها به‌صورت همزمان در تشت‌های پر از آب به‌طوری که ارتفاع آب به دو سانتی‌متر بالای سطح خاک برسد، قرار داده شدند (Jain et al. 2017). شرایط ماندابی ذکر شده بسته به تیمار به مدت ۷ و ۱۴ روز برقرار بود. تیمار شاهد نیز به شیوه معمولی و بسته به نیاز گیاه آبیاری شد. اندازه‌گیری پارامترهای رشد بلافاصله پس از پایان تنش صورت گرفت. برای این منظور گیاهان به‌همراه ریشه از گلدان‌ها خارج شدند و پس از شستشوی ریشه صفات مورفولوژیک مانند وزن تازه اندام‌های هوایی و وزن ریشه‌های هوایی با ترازوی دقیق (دقت ۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد. برای این منظور ریشه‌ها از محل سطح خاک از اندام‌های هوایی جدا شد و پس از شستشو توزین شدند. پس از آن ریشه‌های هوایی به‌کمک تیغ آزمایشگاه از ریشه‌های اصلی گیاه و ساقه، جدا و توزین شدند.

میزان کلروفیل و کارتنوئید برگ نیز به روش آرنون (۱۹۴۹) به‌دست آمد. برای این منظور برگ‌های تازه نمونه‌ها به قطعات ریزی تبدیل و مقدار ۰/۵ گرم از هر نمونه جدا شد. به این نمونه‌ها ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. عصاره به‌دست آمده به‌ترتیب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. مقدار کلروفیل a، b و کارتنوئید به‌ترتیب با استفاده از فرمول (۱)، (۲) و (۳) به‌دست آمد:

$$\text{Chl.a:} [12.7 (\text{OD}_{663}) - 2.69 (\text{OD}_{645})] \times [V/1000 \times W] \quad (1)$$

$$\text{Chl.b:} [22.9 (\text{OD}_{645}) - 4.68 (\text{OD}_{663})] \times [V/1000 \times W] \quad (2)$$

$$\text{Car:} [(1000 \times \text{OD}_{470} - 1.82\text{Chla} - 85.02\text{Chlb}) / 198] \times [V/1000 \times W] \quad (3)$$

در روابط بالا، OD جذب نور در طول موج مورد نظر، V حجم محلول سانتریفیوژ شده و W وزن تر نمونه بر حسب گرم است. نمونه‌برداری از گیاهچه‌ها بلافاصله پس از پایان دوره تنش در سه تکرار بیولوژیکی صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع

ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین مورد نیاز است. اما در شرایط تنش این ریزRNAها افزایش بیان نشان می‌دهند تا سطح رونویسی از ARF کاهش یابد. بنابراین miR160، miR393 و miR167 با سرکوب بیان ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین سبب کاهش رشد و نمو گیاهان در شرایط تنش شده و احتمالاً به این شیوه سبب افزایش تحمل گیاه به تنش می‌شوند (Sunkar et al. 2012). miR160 به مکان‌های حفاظت شده موجود در نواحی غیرترجمه شونده ژن‌های سنتز کننده اکسین متصل شده و بیان آن‌ها را تنظیم می‌کند (Rhoades et al. 2012). این ریزRNA عوامل پاسخ دهنده به اکسین را هدف قرار می‌دهد و حضور آن در گیاه نیشکر و بسیاری از گیاهان زراعی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مختلف گزارش شده است (Gentile et al. 2013). miR393 یکی دیگر از ریزRNAهای محافظت شده در گیاهان است که در رشد ریشه، توسعه اندام‌های هوایی و در پاسخ گیاهان به تنش‌ها نقش دارد. این ریزRNA بیان ژن‌های هدف خود یعنی خانواده ژن‌های اکسین AFB2 را کنترل می‌کند (Bian et al. 2012).

با توجه به نتایج مطالعات صورت گرفته، miR160 و miR393 ژن‌های هدف آن یعنی ARF17 و AFB2 به‌منظور بررسی نقش آن‌ها در پاسخ گیاه به تنش غرقابی و شکل‌گیری ریشه‌های هوایی در دو واریته نیشکر در شرایط غرقابی انتخاب و پروفایل بیانی آن‌ها به کمک تکنیک qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این طرح در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز و در فاصله زمانی اسفند ۱۳۹۹ تا اردیبهشت ۱۴۰۰ انجام پذیرفت. گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت دو واریته CP48-103 و CP69-1062 که از مؤسسه تحقیقات توسعه نیشکر و صنایع جانبی تهیه شده بودند در گلدان‌های پلاستیکی (حجم ۱۰ کیلوگرم) کشت و به مدت ۷۵ روز در شرایط گلخانه نگه‌داری شدند. این مطالعه بر اساس آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. این دو واریته از مهم‌ترین واریته‌های موجود در کشت و صنعت‌های نیشکری استان خوزستان هستند و در مجموع بیش از ۷۰ درصد از سطح زیر

استفاده از آغازگر عمومی Oligo dT صورت گرفت. برای اطمینان از طراحی صحیح و عملکرد اختصاصی آغازگرهای طراحی شده و همچنین پیدا کردن بهترین دمای اتصال به cDNA سنتز شده، واکنش PCR بر روی نمونه‌های cDNA سنتز شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. در نهایت به منظور تایید و مقایسه بیان نسبی ژن‌ها از روش qRT-PCR و کیت SYBR HiFi Mix Plus ساخت شرکت مبنای طرب استفاده شد. برای هر نمونه از سه تکرار تکنیکی استفاده شد و نرمال‌سازی نتایج داده با استفاده از rRNA 18s برای rRNAها و ژن Actin برای ژن‌های هدف انجام گرفت. مقایسه بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد و میزان تغییر بیان ریزRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها در دو واریته و سطوح مختلف تیماری با استفاده از آزمون LSD و در سطح معنی‌داری ۱ و ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار R (نسخه ۴,۳,۳) صورت گرفت (Liu et al., 2012). ژن‌های هدف برای psRNATarget با miR393 و miR160 استفاده از نرم‌افزار (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget) و با استفاده از پارامترهای تعیین شده و به کمک داده‌های موجود در سایت NCBI برای گیاه نیشکر انجام گرفت (Dai et al. 2018). میان‌کنش و شبکه ارتباطی بین ژن‌های هدف نیز با استفاده از نرم‌افزار آنالین geneMANIA بررسی و ترسیم شد.

قرار داده و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. طراحی آغازگر برای miR160 و miR393 با استفاده از نرم‌افزار miRNA Primer Designer و برای ژن‌های هدف ARF17 و AFB2 با استفاده از نرم‌افزار Primer3 صورت گرفت (جدول ۱). طراحی پرایمر ریزRNAها بر اساس دستورالعمل (Varkonyi-Gasic 2007) صورت گرفت. استخراج RNA کل از گیاهان تنش دیده و شاهد با استفاده از بافر ترایزول شرکت Invitrogen و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. در این روش ترکیبات فنلی، پلی‌ساکارید و سایر آلودگی‌های متابولیتی حذف شد. پس از استخراج RNA کل بلافاصله جهت حذف آلودگی DNA ژنومی از RNAهای استخراج شده، از آنزیم DNase I و مطابق دستورالعمل (Invitrogen) استفاده شد. از این رو RNA به دست آمده دارای کیفیت و خلوص بالایی بود. کمیت و کیفیت RNA به دست آمده به روش نانودراپ و ژل آگارز ۱٪ مورد تایید قرار گرفت. ریزRNAها به دلیل کوتاه بودن توالی و همچنین عدم وجود دم پلی‌A در انتهای ۳' نیاز به روش ویژه‌ای برای سنتز cDNA دارند. برای این منظور از دستورالعمل ارائه شده توسط کرامر (۲۰۱۱) استفاده شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت Invitrogen، ۲۰۰ نانوگرم از RNA کل، جهت سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Reverse (Invitrogen) transcription III صورت گرفت. سنتز cDNA ژن هدف نیز با

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده به منظور بررسی بیان ریزRNAها و ژن‌های هدف

MIR gene	Primer (5' → 3')
miR160-RT	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT GGC AT
miR160-F	ACTGCCTGGCTCCCTGT
miR393-RT	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG CGA TCA AT
miR393-F	GAGGATCCTCCAAAGGG
Universal	GTGCAGGTCCGAGGT
ARF17-F	CGACCGTAGACTTGACCCA
ARF17-R	CTCTGGGCTGGTGGTTGCA
AFB2-F	CGGTAAGGGTAGATGCC
AFB2-R	TTCTGGCTTCTTGGTGACT

نتایج و بحث

الکترون متوقف می‌شود. در این شرایط گیاهان برای بقا بایستی از یک مسیر جایگزین برای تأمین انرژی استفاده می‌کنند. این مسیر جایگزین، از متابولیسم تخمیری برای تأمین ATP مورد نیاز گیاه بهره می‌برد، اما در این مسیر از هر مولکول گلوکز تنها ۲ مولکول ATP نصیب گیاه می‌شود و این در حالی است که در شرایط هوازی ۳۶ مولکول ATP به ازای هر مولکول گلوکز بدست می‌آید (Taiz and Zeiger, 2010). بنابراین گیاهان در شرایط غرقابی متحمل گرسنگی خواهند شد. گیاهانی که در شرایط تنش غرقابی قرار می‌گیرند کمبود کربوهیدرات و انرژی را به دلیل کاهش فتوسنتز و تنفس هوازی تجربه خواهند کرد، از این رو رشد آن‌ها کاهش می‌یابد (Fukao et al., 2019). در این رابطه جاین و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی اثر تنش غرقابی بر روی اجزاء عملکرد ۱۴ واریته نیشکر گزارش نمودند که وزن کل اندام‌های هوایی در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش نشان داده است.

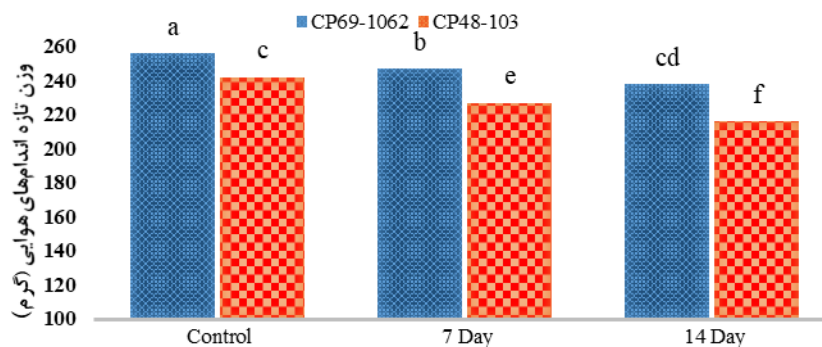
نتایج تجزیه واریانس داده‌های این مطالعه برای صفات مورفوفیزیولوژیک در جدول ۲ نمایش داده شده است. براساس نتایج تجزیه واریانس اثر تنش غرقابی، واریته و اثر متقابل تنش غرقابی و واریته بر صفات بررسی شده معنی‌دار بود. براساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین کاهش وزن اندام‌های هوایی مربوط به واریته CP48-103 بود. در این واریته تنش غرقابی ۷ و ۱۴ روز به ترتیب سبب کاهش وزن اندام‌های هوایی به میزان ۶/۷ و ۱۱/۵ درصد در مقایسه با شاهد شد. تحت تنش ۷ و ۱۴ روز در واریته CP69-1062 وزن تازه اندام‌های هوایی به ترتیب ۴/۶ و ۷/۶ درصد در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد (شکل ۱).

اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون در تنفس هوازی عمل می‌کند. از این رو در غیاب اکسیژن چرخه کربس و زنجیره انتقال

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تنش غرقابی و واریته بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیک نیشکر

MS(میانگین مربعات)					
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تازه ریشه‌های هوایی	وزن تازه اندام‌های هوایی	کلروفیل کل	کارتونوئید
تنش غرقابی	۲	۶۴/۳۱**	۹۷/۸۴**	۵۴/۸۰**	۱۱/۱۱**
واریته	۱	۲۷/۱۱**	۵۵۴/۷۶**	۲۲/۵۲**	۲/۳۳**
ماندایی × واریته	۲	۰/۲/۱*	۳۶/۶۴ ^{n.s}	۳۲/۰ ^{n.s}	۰/۴/۰ ^{n.s}
خطا	۱۲	۳/۲۳	۱۲/۸۴	۰/۴۸	۰/۳۴
ضریب تغییرات %		۹/۱۱	۱۶/۱۲	۳/۱۷	۷/۶۶

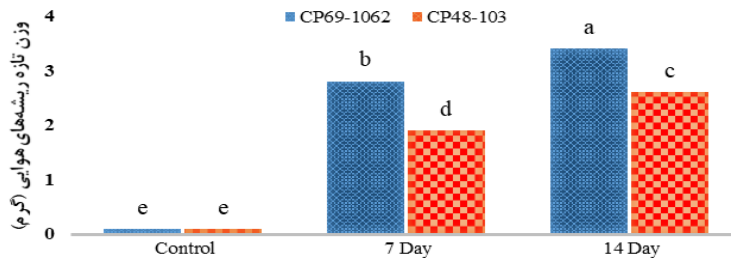
معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد ** معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، * غیر معنی‌داری، n.s



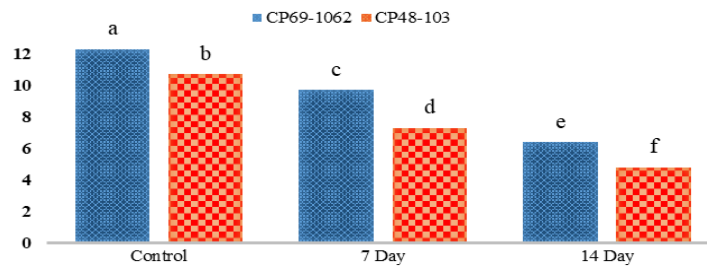
شکل ۱- تغییرات وزن اندام‌های هوایی دو واریته در شرایط تنش ۷ و ۱۴ روز در مقایسه با شاهد

سیستم ریشه‌های قدیمی می‌شوند (Gomathi and Chandran 2009). تشکیل ریشه‌های هوایی که پتانسیل جایگزینی ریشه‌های قدیمی را دارند به‌عنوان یکی از توانایی‌های گیاهان متحمل در پاسخ به تنش غرقابی شناخته می‌شود (Malik et al., 2001). نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد اختلاف رنگدانه‌های فتوسنتزی در دو واریته و سطوح مختلف تنش معنی‌دار (در سطح ۱٪) بود. مقایسه میانگین این صفات نشان داد بیشترین میزان کلروفیل کل و کارتنوئید در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار ۱۴ روز ثبت شد. بیشترین مقدار کلروفیل کل (مجموع کلروفیل a و b) در واریته CP69-1062 و کمترین مقدار در واریته CP48-103 ثبت شد (شکل ۳). میزان کارتنوئید نیز تحت تنش ۷ و ۱۴ روز در واریته CP48-103 بیشترین کاهش را نشان داد (شکل ۴).

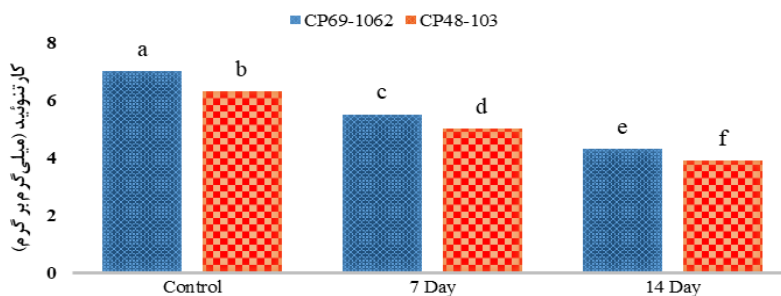
وزن تازه ریشه‌های هوایی نیز شرایط مشابهی با وزن تازه ریشه داشت و در شرایط تنش نسبت به گیاهان شاهد افزایش وزن مشاهده شد. به‌طوری که نتایج مقایسه میانگین نشان از افزایش معنی‌دار وزن تازه ریشه‌های هوایی در سطح احتمال ۵ درصد داشت. وزن تازه ریشه‌های هوایی تحت تنش ۷ و ۱۴ روز در مقایسه با شاهد در واریته CP69-1023 به ترتیب ۵/۱ و ۸/۷ درصد و در واریته CP48-103 به ترتیب ۳/۴ و ۵/۳ درصد افزایش نشان داد (شکل ۲). در گیاه نیشکر تشکیل ریشه‌های هوایی یکی از رایج‌ترین پاسخ واریته‌های متحمل به تنش غرقابی است. به‌طور مکرر مشاهده شده است که تشکیل این ریشه‌ها در لایه‌های سطحی خاک که غنی از اکسیژن هستند اتفاق می‌افتد. ریشه‌های هوایی دارای منافذ زیادی بوده و به گیاه کمک می‌کنند تا جذب آب و عناصر غذایی را در شرایط غرقابی ادامه دهد و جایگزین



شکل ۲- تغییرات وزن تازه ریشه‌های هوایی در دو واریته در شرایط تنش ۷ و ۱۴ روز در مقایسه با شاهد



شکل ۳- تغییرات کلروفیل کل در دو واریته در شرایط تنش ۷ و ۱۴ روز در مقایسه با شاهد



شکل ۴- تغییرات کارتنوئید در دو واریته در شرایط تنش ۷ و ۱۴ روز در مقایسه با شاهد

واریانس اثر تنش غرقابی و واریته بر بیان این ریزRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها معنی‌دار (در سطح احتمال ۱ درصد) بود. بررسی تغییرات بیان miR160 در پاسخ به تنش غرقابی در هر دو واریته مورد مطالعه روند افزایشی نشان داد. افزایش بیان معنی‌دار (در سطح احتمال ۱ درصد) miR160 در تنش ۷ و ۱۴ روز در مقایسه با شاهد مشاهده شد (به ترتیب $FC: 2/1$ و $FC: 3/7$). در واریته CP69-1062 در مقایسه با واریته CP48-103 این افزایش بیان نیز معنی‌دار (در سطح احتمال ۵ درصد) بود (شکل ۵).

در طول دوره تنش غرقابی کاهش محتوای کلروفیل در بسیاری از گیاهان متحمل و حساس گزارش شده است. این رخداد و تغییر نسبت کلروفیل a/b توسط گوماتی و چاندران (۲۰۰۹) در گیاه نیشکر گزارش شده است. عوامل متعددی از جمله کاهش محتوای نیتروژن در واحد سطح برگ، افزایش سطح گونه‌های اکسیژن فعال و تسریع در پیری برگها به عنوان مسئول کاهش میزان کلروفیل و کارتنوئیدها در شرایط تنش غرقابی ذکر شده‌اند (Malik et al. 2001).

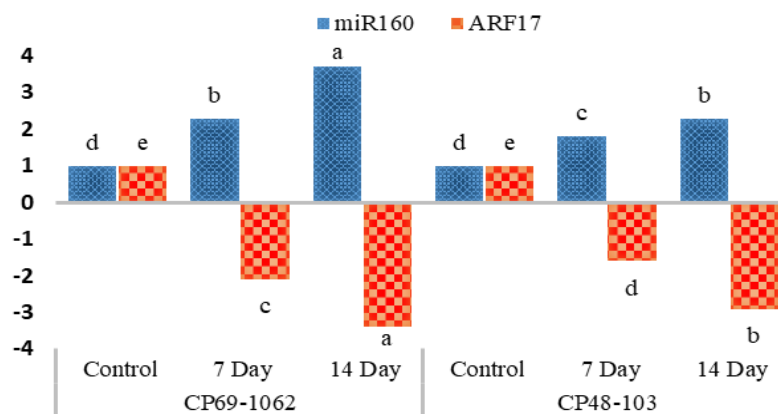
نتایج تجزیه واریانس داده‌های این مطالعه برای ریزRNAهای miR160 و miR393 و ژن‌های هدف آن‌ها یعنی ARF17 و AFB2 در جدول ۳ نمایش داده شده است. براساس نتایج تجزیه

¹ Fold change

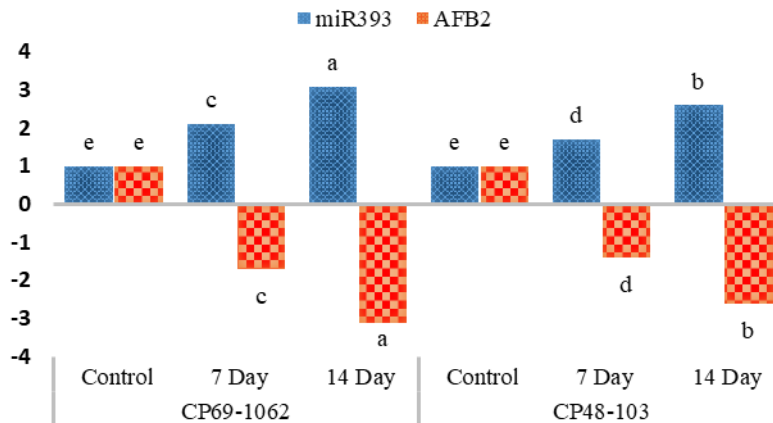
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تنش غرقابی و واریته اثر متقابل آن‌ها بر بیان ریزRNAها و ژن‌های هدف مورد مطالعه

MS میانگین مربعات ()					
منابع تغییرات	درجه آزادی	miR160	miR393	ARF17	AFB2
تنش ماندابی	۲	۱/۷۶**	۴/۲۸**	۳/۶۶**	۲/۱۸**
واریته	۱	۱۲/۴۲**	۲۵/۲۲**	۱۹/۷۲**	۱۵/۳۹**
ماندابی × واریته	۲	۰/۲۲ ^{ns}	۱/۴۴ ^{ns}	۰/۸۷ ^{ns}	۰/۱۷ ^{ns}
خطا	۱۲	۰/۳۱	۰/۶۶	۰/۵۸	۰/۴۲
ضریب تغییرات %		۸/۴۵	۱۲/۸	۶/۱۸	۹/۶۷

ns غیر معنی‌داری، * معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۵- مقایسه بیان نسبی miR160 و ژن هدف آن ARF17 در دو واریته CP48-103 و CP69-1062 تحت دو سطح تنش در مقایسه با شاهد



شکل ۶- مقایسه بیان نسبی miR393 و ژن هدف آن AFB2 در دو واریته CP69-1062 و CP48-103 تحت دو سطح تنش در مقایسه با شاهد.

بررسی بیان ژن ARF17 نشان از کاهش معنی‌دار (در سطح احتمال ۱ درصد) بیان آن با افزایش مدت زمان تنش دارد. به‌طوری که در تنش ۷ روز (FC: -۱/۸) و در تنش ۱۴ روز (FC: -۳/۱) در مقایسه با شاهد کاهش بیان داشت. کاهش بیان نسبی ژن ARF17 در واریته CP69-1062 در مقایسه با واریته CP48-103 نیز معنی‌دار (در سطح احتمال ۵ درصد) بود. این نتایج نقش تنظیم منفی miR160 بر علیه ژن هدف ARF17 را به‌خوبی مشخص نمود. بررسی بیان miR393 در پاسخ به تنش غرقابی در هر دو واریته مورد مطالعه در مقایسه با شاهد نشان از افزایش بیان این ریز RNA داشت. بیان miR393 در تنش ۷ روز (FC: ۱/۹) و ۱۴ روز (FC: ۲/۹) در مقایسه با شاهد در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. بیان miR393 در واریته CP69-1062 در هر دو سطح تنش در مقایسه با واریته CP48-103 معنی‌دار (در سطح احتمال ۵ درصد) بود. همچنین بیان AFB2 در هر دو سطح تنش ۷ روز (FC: -۱/۶) و ۱۴ روز (FC: -۲/۸) در مقایسه با شاهد در سطح احتمال ۱ درصد کاهش داشت. کاهش بیان نسبی این ژن در واریته CP60-1062 در مقایسه با واریته CP48-103 در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد (شکل ۶). با وجودی که ظرفیت تشکیل ریشه‌های هوایی در بسیاری از گونه‌های گیاهی یک صفت ژنتیکی است اما تحت شرایط خاصی مانند برخی از تنش‌های محیطی از قبیل غرقابی، کمبود عناصر غذایی، سمیت عناصر سنگین و خمیدگی ساقه بوجود آیند (Steffens and Rasmussen 2016). فرایند تشکیل ریشه‌های هوایی در گیاهان شامل سه مرحله است؛ القاء، شروع و توسعه

(De Klerk et al. 1999). رخدادهای مولکولی کلیدی در این فرایند در مراحل القاء و شروع اتفاق می‌افتند. نقش هورمون اکسین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مرکزی در کنترل رشد ریشه‌های هوایی در گیاهان به‌خوبی شناخته شده است. از سوی دیگر نقش ژن‌های وابسته به پیام‌رسانی اکسین روز به روز شناخته‌تر می‌شود. در گیاه نیشکر تشکیل ریشه‌های هوایی رایج‌ترین واکنش ارقام متحمل به تنش غرقابی است. معمولاً مشاهده شده است که تشکیل این ریشه‌ها در لایه‌های سطحی خاک که غنی از اکسیژن است، رخ می‌دهد. اکسین یک تنظیم‌کننده کلیدی است که تقریباً در تمام جنبه‌های رشد و نمو گیاه از جوانه‌زنی تا پیری و مرگ مشارکت دارد. مطالعات نشان داده است که اکسین این فرآیندها را از طریق بیان ژن‌های خانواده فاکتورهای پاسخ دهنده به اکسین (ARF) تنظیم می‌کند. عوامل رونویسی ARF متعلق به خانواده‌ای از پروتئین‌ها است که ژن‌های وابسته به اکسین را از طریق اتصال به عناصر متصل‌شونده به اکسین (AuxREs) در ناحیه پروموتور کنترل می‌کنند (Salmon et al. 2008). یکی از کلیدی‌ترین عملکردهای این عوامل رونویسی، میان‌کنش با پروتئین‌های Aux/IAA می‌باشد. بیشتر انواع ARF شناخته شده در کنترل رشد ریشه‌های هوایی نقش دارند. نقش این عوامل رونویسی در تحریک رشد ریشه‌های هوایی با استفاده از تولید لاین‌های موتانت دارای افزایش بیان یا ناکاوت^۱ شده برای این ژن‌ها، در گیاه آرابیدوپسیس نمایان شده است (Gutierrez et al. 2009). پیش‌بینی نقش ریز RNAها در هدف قرار دادن ژن‌ها که توسط

^۱ Knock out

miR393 یکی از ریزRNAهای محافظت شده در گیاهان است که در رشد ریشه، توسعه اندام‌های هوایی و در پاسخ گیاهان به تنش‌ها نقش دارد. این ریزRNAهای هدف خود یعنی خانواده ژن‌های پیام‌رسان اکسین (*AFB2*) (*AUXIN SIGNALING F-BOX*) *PROTEIN2*) را کنترل می‌کند. این ژن‌ها همولوگ ژن‌های خانواده TIR در گیاه آراییدوپسیس بوده و هشت عضو دارند که اعضای *FBL1* تا *FBL4* توسط miR393 برش می‌خورند (Shu et al. 2015). دریافت و عملکرد پیام‌رسانی هورمون اکسین در گیاهان به ژن‌های *TIR/AFB2* وابسته است. این ژن‌ها به‌عنوان بخشی از یک شبکه تنظیم هورمون اکسین عمل نموده و در نهایت فعالیت ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین را مهار می‌کنند. فعالیت گیرنده *TIR/AFB2* توسط miR393 کنترل می‌شود (Navarro et al. 2006). این ریزRNA به‌عنوان مهم‌ترین تنظیم کننده اکسین شناخته می‌شود (Iglesias et al. 2014) و در تنظیم رشد ریشه و برگ‌ها نقش دارد (Bian et al. 2012).

در گیاه برنج افزایش بیان miR393 سبب تغییر در زاویه برگ پرچم، ارتفاع گیاه، طول ریشه‌های اولیه، نمو بذر و حساسیت به اکسین و همچنین سبب افزایش حساسیت گیاه به تنش شوری و خشکی شده است (Xia et al. 2012). افزایش بیان miR393 تحت تیمار هورمون IAA در گیاه آراییدوپسیس مشاهده شده است (Chen et al. 2011). در این مطالعه تحت تیمار IAA افزایش بیان miR393 منجر به افزایش حساسیت گیاه به اکسین شد و در نتیجه مهار رشد ریشه‌های اولیه، افزایش رشد ریشه‌های جانبی، تغییر در ظاهر برگ‌ها و توقف گلدهی اتفاق افتاده است. Bai و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند قرار گرفتن گیاه جو در معرض سمیت Al^{3+} بیان miR393 را در بخش کلاهک ریشه سرکوب نمود، در حالی که افزایش بیان miR393 مهار رشد طولی ریشه توسط Al^{3+} را خنثی نموده و باعث کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال شد.

در این مطالعه افزایش بیان miR160 و miR393 و کاهش بیان ژن هدف آنها یعنی *ARF17* و *AFB2* مشاهده شد. با توجه به نقش این دو ژن و اثر آنتاگونیستی آنها در کنترل فرآیندهای رشد و نمو گیاه، افزایش تولید ریشه‌های هوایی در گیاهان تحت تنش در مقایسه با گیاهان شاهد را می‌توان به تغییرات بیان این ژن‌ها

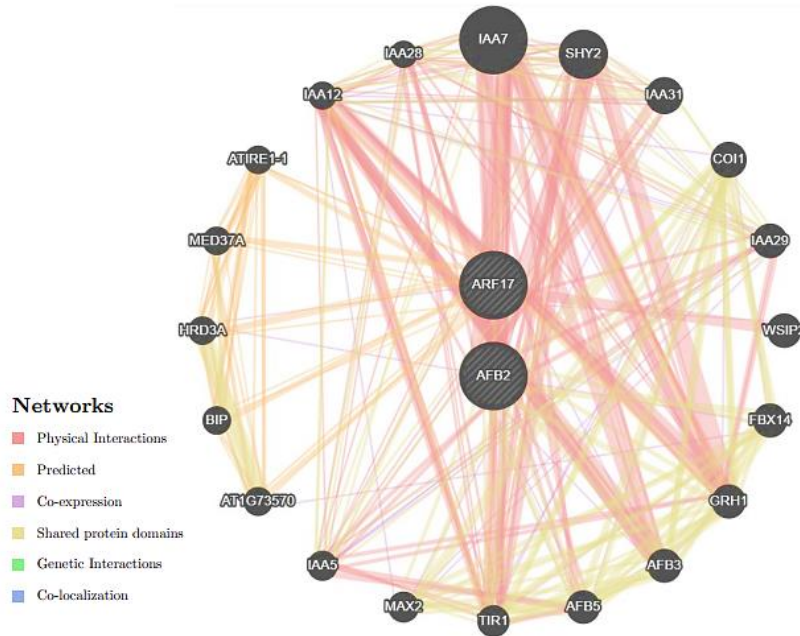
مطالعات مولکولی تأیید شده است، مشخص نمود که *ARF6* و *ARF8* توسط miR167 و *ARF17* توسط miR160 از طریق برش رونوشت هدف، مهار می‌شوند (Khan et al. 2011).

miR160 به مکان‌های حفاظت شده موجود در نواحی غیرترجمه شونده ژن‌های سنتز کننده اکسین متصل شده و بیان آنها را تنظیم می‌کند (Rhoades et al. 2012). این ریزRNA عوامل پاسخ دهنده به اکسین (*ARF*) را هدف قرار می‌دهد و حضور آن در گیاه نیشکر و بسیاری از گیاهان زراعی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مختلف گزارش شده است (Gentile et al. 2013). miR160 و ژن هدف آن (*ARFs*) نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان دارند. پیش از این نیز مهار فعالیت *ARF10* و *ARF16* توسط miR160 در مرحله جوانه‌زنی گیاه آراییدوپسیس گزارش شده است (Mallory et al. 2005). علاوه بر این مهار فعالیت *ARF10* و *ARF16* توسط این ریزRNA سبب افزایش تحمل گیاه گوجه‌فرنگی به پسابیدگی و حفظ تعادل آب در گیاه شده است (Liu et al. 2016). مشارکت این ریزRNA در پاسخ به تنش گرما در گندم (Kumar et al. 2015) و جو (Kruszka et al. 2014) نیز گزارش شده است. افزایش بیان این ریزRNA به‌طور مصنوعی در گیاهان سبب ایجاد گیاهان کوچک با برگ‌های دنداندار و پیچ خورده رو به بالا شده است (Liu et al. 2017).

در گیاه آراییدوپسیس *ARF6*، *ARF8* و *ARF17* با مهار بیان ژن‌های *GH3.3*، *GH3.5* و *GH3.6* و افزایش بیان *GH3s* شکل‌گیری ریشه‌های هوایی را باعث می‌شوند (Gutierrez et al. 2012). *ARF17* تشکیل ریشه‌های هوایی را از طریق مهار بیان ژن *GH3* به‌طور منفی تنظیم می‌کند، در نتیجه هموستازی اکسین را تغییر می‌دهد. در مقابل *ARF6* و *ARF8* از طریق افزایش بیان ژن *GH3* شکل‌گیری ریشه‌های هوایی را بطور مثبت تنظیم می‌کنند (Lakehal et al. 2019a). در سطح پس از رونویسی miR160 و miR167 بیان *ARF17*، *ARF6* و *ARF8* را مهار می‌کنند. از طرفی این عوامل رونویسی پاسخ دهنده به اکسین بیان miR160 و miR167 را به‌طور متقابل تحت تاثیر قرار می‌دهند (Gutierrez et al. 2012). نتایج این مطالعات پیشنهاد می‌کند که تعادل بین مهار *ARF17* و افزایش بیان *ARF6* و *ARF8* شکل‌گیری ریشه‌های هوایی را از طریق یک شبکه پیچیده تنظیمی القاء می‌کند.

درد (شکل ۷). این ژن‌ها بطور عمده در سنتز هورمون اکسین در اندام‌های هوایی و کنترل رشد ریشه از طریق تنظیم تعادل نسبت اکسین با سایتوکینین نقش دارند.

نسبت داد. نقشه ارتباط ژنی برای ژن‌های ARF17 و AFB2 نشان از دخالت ژن‌های کنترل کننده بیان هورمون اکسین و همکاری ژن‌های IAA، FBX، TIR، GRH با ژن‌های هدف مورد مطالعه



شکل ۷- شبکه ژنی و ارتباط ژن‌های دخیل در بیان هورمون اکسین و ژن‌های ARF17 و AFB2

کننده آن‌ها است. در این مطالعه نقش تنظیمی miR160 و miR393 به همراه ژن‌های هدف آن‌ها یعنی ARF17 و AFB2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی بیان این ریزRNAها به همراه ژن‌های هدف، علاوه بر اثبات نقش کنترل منفی و نقش آن‌ها در تحریک رشد ریشه‌های هوایی در شرایط تنش، تفاوت واریته‌های CP48-103 و CP69-1062 و عملکرد بهتر واریته CP69-1062 در پاسخ به تنش غرقابی را از این نظر نیز نشان داد.

نتیجه‌گیری کلی

یکی از راه‌های غلبه بر خسارت تنش غرقابی توسعه واریته‌های متحمل از طریق شناسایی و درک صحیح روابط موجود در تنظیم بیان ژن‌ها به‌ویژه در سطح پس از رونویسی است. این مطالعه با بررسی برخی شاخص‌های تحمل به تنش غرقابی در دو واریته CP48-103 و CP69-1062 نشان داد که این دو واریته از نظر سازگاری به تنش غرقابی تفاوت‌هایی دارند که بخشی از این تفاوت‌ها مربوط به پاسخ‌های مورفوفیزیولوژیکی و ژن‌های کنترل

منابع

Wang J, Zhao T, Yang B, Zhang S (2017) Sucrose metabolism and regulation in sugarcane. *Journal of Plant Physiology and Pathology* 5:2.
 Gomathi R, Chandran K (2009) Effect of water logging on growth and yield of sugarcane clones. *Sugarcane Breeding Institute (SBI-ICAR). Quarterly News Letter* 29:1-2.
 Omary M, Izuno FT (1995) Evaluation of sugarcane evapotranspiration from water table data in the everglades

agricultural area. *Agricultural Water Management* 27:309-319.
 Glaz B, Edme S J, Miller JD, Milligan SB, Holder DG (2002) Sugarcane cultivar response to high summer water tables in the Everglades. *Agronomy Journal* 94:624-629.
 Malik AI, Colmer TD, Lamber H, Schortemeyer M (2001) Changes in physiological and morphological traits of roots and shoots of wheat in response to different depths of waterlogging. *Plant Physiology* 28:1121-1131.

- Gilbert RA, Curtis R, Rainbolt D, Morris R, Bennett C (2007) Morphological responses of sugarcane to longterm flooding. *Agronomy Journal* 99:1622-1628.
- Zhang B, Wang Q (2015) MicroRNA-based biotechnology for plant improvement. *Journal of cellular physiology* 230:1-15.
- Xu J, Hou Q M, Khare T, Verma S. K, Kumar V (2019) Exploring miRNAs for developing climate-resilient crops: A perspective review. *Science of the Total Environment* 91-104.
- Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell* 16:2001-2019.
- Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in plant science* 17:196-203.
- Rhoades MW (2012) Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant molecular biology* 80:3-16.
- Gentile A, Ferreira TH, Mattos RS, Dias LI, Hoshino AA, Carneiro MS, Menossi M, (2013) Effects of drought on the microtranscriptome of field-grown sugarcane plants. *Planta* 237:783-798.
- Bian H, Xie Y, Guo F, Han N, Ma S, Zeng Z, Zhu M (2012) Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/TIR1 homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* 196:149-161.
- Arnon, D.L (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts PPO in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 1-15.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods* 3:1-12.
- Liu N, Landreh M, Cao K, Abe M, Hendriks G. J, Kennerdell J. R, Bonini N. M (2012) The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 482:519-523.
- Kramer MF (2011) Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current protocols in molecular biology* 95:15-10.
- Steffens B, Rasmussen A (2016) The physiology of adventitious roots. *Plant physiology* 170:603-617.
- De Klerk GJ, Van Der Krieken W, de Jong JC (1999) Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 35:189-199.
- Salmon J, Ramos J, Callis J (2008) Degradation of the auxin response factor ARF1. *The Plant Journal* 54:118-128.
- Gutierrez L, Bussell JD, Pacurar DI, Schwambach J, Pacurar M, Bellini C (2009) Phenotypic plasticity of adventitious rooting in Arabidopsis is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *The Plant Cell* 21:3119-3132.
- Khan GA, Declerck M, Sorin C, Hartmann C, Crespi M, Lelandais-Brière C (2011) MicroRNAs as regulators of root development and architecture. *Plant molecular biology* 77:47-58.
- 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. *The Plant Cell* 17:1360-1375.
- Kumar M, Sahu SK, Kumar R, Subuddhi A, Maji RK, Jana K, Basu J (2015) MicroRNA let-7 modulates the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection via control of A20, an inhibitor of the NF- κ B pathway. *Cell host and microbe* 17:345-356.
- Kruszka K, Pacak A, Swida-Barteczka A, Nuc P, Alaba S, Wroblewska Z, Szweykowska-Kulinska Z (2014). Transcriptionally and post-transcriptionally regulated microRNAs in heat stress response in barley. *Journal of experimental botany* 65:6123-6135.
- Liu Q, Yan S, Yang T, Zhang S, Chen YQ, Liu B (2017) Small RNAs in regulating temperature stress response in plants. *Journal of integrative plant biology* 59:774-791.
- Lakehal A, Chaabouni S, Cavel E, Le Hir, Ranjan R, Raneshan, Z, Bellini C (2019) A molecular framework for the control of adventitious rooting by TIR1/AFB2-Aux/IAA-dependent auxin signaling in Arabidopsis. *Molecular plant* 12:1499-1514.
- Gutierrez L, Mongelard G, Floková K, Păcurar D. I, Novák O, Staswick P, Bellini C (2012). Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *The Plant Cell* 24:2515-2527.
- Shu W, Liu Y, Guo Y, Zhou H, Zhang J, Zhao S, Lu M (2015) A *Populus* TIR1 gene family survey reveals differential expression patterns and responses to 1-naphthaleneacetic acid and stress treatments. *Frontiers in plant science* 719.
- Chu L, He X, Shu W, Wang L, Tang F (2021) Knockdown of miR393 promotes the growth and biomass production in poplar. *Frontiers in Plant Science* 12:11-18.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Jones JD (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312:436-439.
- Iglesias MJ, Terrile MC, Windels D, Lombardo MC, Bartoli CG, Vazquez F, Casalongué CA (2014) MiR393 regulation of auxin signaling and redox-related components during acclimation to salinity in Arabidopsis. *PLoS One* 9:e107678.
- Xia K, Wang R, Ou X, Fang Z, Tian C, Duan J, Zhang M (2012) OsTIR1 and OsAFB2 downregulation via OsmiR393 overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *PLoS one* 7:e30039.
- Chen ZH, Bao ML, Sun YZ, Yang YJ, Xu XH, Wang JH, Zhu MY (2011) Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in Arabidopsis. *Plant molecular biology* 77:619-629.
- Bai B, Bian H, Zeng Z, Hou N, Shi B, Wang J, Han N (2017) miR393-mediated auxin signaling regulation is involved in root elongation inhibition in response to toxic aluminum stress in barley. *Plant and Cell Physiology* 58:426-439.

Dai X, Zhuang Z, Zhao, PX (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic acids research* 46:49-54.

Fukao T, Barrera-Figueroa B.E, Juntawong P, Peña-Castro J M (2019) Submergence and waterlogging stress in plants: a review highlighting research opportunities and understudied aspects. *Frontiers in Plant Science* 340.

Jain R, Singh S.P, Singh A, Singh S, Chandra A, Solomon S (2017) Response of foliar application of nitrogen compounds on sugarcane grown under waterlogging stress. *Sugar Tech* 18:433-436.