

بررسی الگوی بیان برخی از miRNAها و ژنهای هدف و RNAهای کوچک مشتق شده از tRNA در مسیر پیام‌رسانی فقر فسفات در گیاه کلزا

Investigation of the expression pattern of miRNAs, their target genes, and tRNA-derived small RNAs in the phosphate-deficiency signaling pathway in rapeseed

رضا اورکی جلکانی^۱، کریم سرخه^{۲*}، لیلا نژادصافی^۲

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

دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

۲- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

Oraki Jalakani R¹, Sorkheh K^{*2}, Nejadsadeghi L²

1- MSc student in Plant Breeding and Genetic Engineering, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, P.O. Box 61355/144, Ahvaz, Iran

2- Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, P.O. Box 61355/144, Ahvaz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: k.sorkheh@scu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۳۰)

چکیده

کلزا (*Brassica napus* L.)، گیاهی یک‌ساله از خانواده Brassicaceae و جنس کلیم است که واکنش کودی آن به غلات دانه‌ریز شباهت دارد. اگرچه نیتروژن و گوگرد از عناصر حیاتی برای رشد کلزا محسوب می‌شوند، اما دستیابی به حداکثر پتانسیل عملکرد، مستلزم تأمین کافی فسفر و پتاسیم است. در پژوهش حاضر، تغییرات الگوی بیان نسبی تعدادی از miRNAها، ژنهای هدف آنها و دو نوع RNA کوچک مشتق شده از tRNA (tsRNA) در پاسخ به سطوح مختلف فسفات (۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۰ درصد)، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از بافت ریشه و برگ در هر تیمار با سه تکرار بیولوژیک انجام شد. نتایج نشان داد که در بافت ریشه، بیان ژنهای NAC و SPL9 تحت شرایط کمبود فسفر افزایش، و بیان miRNAهای مرتبط با آنها (miR164 و miR156) کاهش یافت. ژنهای هدف bHLH و GRF8 در مواجهه با تیمارهای کمبود فسفر کاهش بیان نشان دادند، در حالی که الگوی بیان miRNAهای مرتبط با آنها (miR396 و miR390) ابتدا افزایشی و سپس کاهشی بود. ژن HDZIP و miRNA هدف آن، الگوی مشابهی را نشان دادند؛ به‌طوری‌که با اعمال تیمارهای فسفر، ابتدا افزایش و سپس کاهش بیان نسبی در آنها مشاهده شد. در بافت برگ، اعمال تیمار فسفات منجر به افزایش بیان نسبی ژنهای HDZIP و GRF8 و miRNAهای مربوط به آنها (miR166 و miR390) شد. در مقابل، ژنهای NAC و bHLH و SPL9 ابتدا کاهش بیان و سپس در سطوح دیگر تیمار فسفات، افزایش بیان را نشان دادند. همچنین، miRNAهای مرتبط با این ژن‌ها (miR164، miR396 و miR156) همگی افزایش بیان داشتند. این مطالعه، نمایانگر بررسی بیان miRNAها و RNAهای کوچک مشتق شده از tRNA است که در پاسخ به کمبود فسفر (P) فعال می‌شوند و به پیشرفت درک ما از نحوه تنظیم تعادل فسفر که توسط miRNAها میانجی‌گری می‌شود، کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی

کلزا

فسفر

miRNA

tsRNA

qPCR

مقدمه

کلزا گیاهی یک‌ساله از تیره Brassicaceae و جنس *Brassica* است. این گیاه در میان دانه‌های روغنی جهان از نظر تولید روغن در رتبه پنجم قرار دارد و دارای مقادیر بالایی روغن و پروتئین است. دانه کلزا حدود ۴۰ درصد روغن و ۲۳ درصد پروتئین دارد و در فرآیند روغن‌گیری، کنجاله‌ای با پروتئین بالا (حدود ۳۷ درصد) به‌دست می‌آید که به‌عنوان خوراکی مناسب برای دام‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hejazi 2001; Fatahi 2021).

واکنش کلزا به کودها مشابه غلات دانه‌ریز است. مهم‌ترین عناصر غذایی مورد نیاز این گیاه برای رشد، نیتروژن و گوگرد هستند؛ با این حال، برای دستیابی به عملکرد مطلوب، تأمین کافی فسفر و پتاسیم نیز ضروری است. نیتروژن مهم‌ترین عنصر در افزایش عملکرد و بهبود کیفیت محصول است و در افزایش عملکرد دانه، تعداد شاخه‌ها، تعداد جوانه‌ها و طول دوره گل‌دهی نقش مؤثری دارد. کمبود گوگرد موجب کاهش مقدار کلروفیل و در نتیجه زرد شدن برگ‌ها می‌شود. گوگرد همچنین از اجزای اسیدهای آمینه متیونین و سیستئین در پروتئین دانه‌های کلزا است. از سوی دیگر، نیاز گیاه کلزا به پتاسیم بسیار بالاست، به‌طوری‌که بیشترین جذب آن در مرحله رشد ساقه صورت می‌گیرد. کمبود پتاسیم نیز باعث تیره شدن رنگ سبز گیاه و بروز علائم پژمردگی می‌شود (Selimi et al. 2018; Mastafavi Rad et al. 2012; Torkamani et al. 2012).

نیاز گیاه به فسفر جهت حصول عملکرد بالا لازم و ضروری بوده؛ از این رو کلزا عنصر فسفر را به خوبی جذب می‌کند و این جذب در مدت زمان ۸ هفته از رشد طول می‌کشد. مقادیر زیاد فسفر مصرفی، درصد روغن را افزایش داده و به میزان پروتئین می‌افزاید. فسفر درون گیاه متحرک بوده و به سرعت از بافت‌های پیر به سمت بافت‌های جوان‌تر و فعال حرکت می‌کند. ذخیره کافی فسفر در خاک، گیاه را قادر می‌سازد تا یک سیستم ریشه‌ای قوی و سالم در مراحل ابتدایی رشد تشکیل دهد (Qaderi and NoorGholipour 2020). کمبود فسفر قابل جذب در خاک، رشد ریشه و قسمت‌های هوایی گیاه را تضعیف می‌کند. سیستم ریشه‌ای ضعیف، ساقه با انشعاب کم و برگ‌های باریک از علائم کمبود فسفر است. در کمبود شدید فسفر برگ‌ها به رنگ سبز مایل به آبی و اغلب با لکه‌های ارغوانی و ساقه‌ها نیز سبز مایل به آبی و ارغوانی ظاهر

می‌شوند (Hejazi 2006). افزایش فسفر در کلزا بر صفاتی همچون ارتفاع ساقه، تعداد خورجین در بوته، عملکرد دانه و عملکرد روغن اختلاف معنی‌داری دارد (Soltani et al. 2006). فسفر (P) به‌عنوان یک درشت مغذی ضروری برای رشد، نمو و تولیدمثل گیاه، جزء اساسی ساختارهای سلولی است، در متابولیسم انرژی و آبشارهای انتقال پیام‌رسان عمل می‌کند و فعالیت‌های آنزیمی را تنظیم می‌کند. علیرغم فراوانی فسفر در خاک، فرم فسفر موجود برای جذب توسط گیاهان، ارتوفسفات (Pi)، معمولاً به دلیل رسوب با کاتیون‌ها و تبدیل آن به مواد آلی، در سطح پایینی در خاک وجود دارد (Marschner 1995). برای دورزدن دسترسی محدود Pi، گیاهان مجموعه‌ای از پاسخ‌های تطبیقی، به اصطلاح پاسخ‌های گرسنگی فسفر، که شامل فرآیندهای رشدی و بیوشیمیایی متنوعی است، برای افزایش جذب و استفاده Pi ایجاد کرده‌اند (Raghothama 1999). برای شروع این پاسخ‌های تطبیقی، پیام‌رسانی کمبود فسفر از طریق مسیرهای تنظیمی متعددی منتقل می‌شود، که تنظیم رونویسی یا پس از رونویسی بیان ژن و تنظیم پس از ترجمه فعالیت‌های پروتئین، مستند شده است (Franco-Zorrilla et al. 2011; Chiou and Lin 2011; Miura et al. 2005). درحالی‌که چندین فاکتور رونویسی کلیدی مسئول کنترل رونویسی ژن‌های پاسخگو به گرسنگی فسفر (PSR) شناسایی شده‌اند. میکروارناها (miRNAs) به‌عنوان بازیگران جدیدی در تنظیم ژن‌های PSR در سطح پس از رونویسی ظاهر شده‌اند.

miRNA ها RNA های درون‌زا غیرکدکننده با اندازه ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که از یک پیش‌ساز RNA تک رشته‌ای با ساختار ثانویه سنجاق سری تولید می‌شوند. miRNA ها بیان ژن را در سطح پس از رونویسی با جفت شدن پایه به mRNA های هدف خود تنظیم می‌کنند، که غالباً شکست mRNA در گیاهان را باعث می‌شوند (Reinhart et al. 2002; Li et al. 2022; Koochi et al. 2017). علاوه بر این دسته دیگری از RNA های کوچک مشتق شده از tRNA نیز شناسایی شده که در این مطالعه سعی در بررسی بیان آن‌ها و همچنین برهمکنش‌های فی مابین این دسته از RNA های کوچک با سایر میکروارناها و ژن هدف در ارتباط با فقر فسفر در گیاه کلزا، نمود.

miR399، miR447 و miR827 اشاره کرد. این miRNA ها احتمالاً در مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با تنش کمبود فسفر نقش دارند. با این حال، واکنش بسیاری از miRNA ها به کمبود مواد مغذی، ویژگی گونه‌ای (Species-specific) بوده و احتمالاً محصول تکامل اخیر است؛ از این رو، بررسی عملکرد آن‌ها در سازگاری با کمبود فسفر در گونه‌های مختلف ضرورت دارد. علاوه بر این، الگوی پاسخ miRNA ها به کمبود فسفر می‌تواند در بافت‌ها و اندام‌های مختلف متفاوت باشد و این پاسخگویی بافت‌محور نیز در میان گونه‌های مختلف تغییرپذیری دارد. به عنوان مثال، بیان miR395 در شاخه‌های آرابیدوپسیس تحت تنش کمبود فسفر کاهش می‌یابد، در حالی که در شاخه‌های نخود سفید (*Lupinus albus*)، این miRNA با کمبود فسفر به صورت تنظیم مثبت (Up-regulation) مواجه می‌شود (Kuo and Chiou 2011).

تنظیم هماهنگ جذب Pi در ریشه‌ها و تخصیص Pi بین اندام‌ها برای رشد و نمو مناسب گیاه، به‌ویژه در پاسخ به نوسان عرضه فسفر خارجی ضروری است. مطالعات miR399 در *Arabidopsis*، کزرا، کدو تبیل و تنباکو نشان می‌دهد که miR399 به عنوان یک مولکول پیام‌رسان متحرک در هماهنگی هموستاز فسفر بین بافت‌های هوایی و ریشه‌های زیرزمینی عمل می‌کند. اولاً، miR399 در شیره آوند آبکش به فراوانی بیشتر در پاسخ به کمبود فسفر تجمع می‌یابد (Buhtz et al. 2008; Pant et al. 2008). ثانیاً، ژن‌های miR399 در بافت‌های آوندی بیان می‌شوند (Aung et al. 2006). شواهد قوی برای جابجایی miR399 از ساقه به ریشه توسط آزمایش‌های پیوندی ارائه شده است، که در آن miR399 بالغ در پایه‌های نوع وحشی رشد کرده در شرایط P-کافی در هنگام پیوند با پیوندک‌های با بیان بیش از حد miR399 شناسایی شد (Lin 2008; Pant 2008). علاوه بر miRNA ها، نشان داده شده است که سایر کلاس‌های RNA های کوچک به کمبود P پاسخ می‌دهند، مانند RNA های کوچک مشتق شده از ترانسپوزون‌ها و RNA های کوچک مشتق از tRNA، که نشان می‌دهد مجموعه بزرگ‌تری از تنظیم با واسطه RNA کوچک در زمینه پاسخ کمبود P وجود دارد (Hsieh 2009). در آرابیدوپسیس، دسته‌ای از RNA های کوچک با عملکردهای ناشناخته، به نام smRPI1LTR، که به شدت تحت کمبود فسفر القاء می‌شوند، از یک ناحیه بین ژنی حاوی آرایه‌ای از تکرارهای بلند

miR399 اولین miRNA است که نشان داده شده است که به طور خاص توسط کمبود فسفر تنظیم می‌شود و به سرعت با اضافه مجدد P کاهش بیان را از خود نشان می‌دهد (Fujii et al. 2005). ژنوم آرابیدوپسیس شش ژن miR399A تا miR399F را کد می‌کند که همگی توسط گرسنگی فسفر با درجات مختلف القاء می‌شوند. گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس که بیش از حد miR399 را بیان می‌کنند، جذب Pi و تخصیص آن به اندام هوایی را افزایش می‌دهند و در نتیجه سبب افزایش بیش از حد فسفر ساقه زمانی که تحت شرایط P کافی و مناسب رشد قرار می‌گیرد. سطح بالای Pi با کلروز و نکروز در نوک برگ‌های بالغ همراه است که از ویژگی‌های سمیت Pi است (Delhaize and Randall 1995).

مشابه فنوتیپ‌های ناشی از سمیت یا کمبود فسفات (Pi)، در گیاهان تراریخته برنج (*Oryza sativa*) که دچار بیان بیش‌ازحد (Overexpression) همولوگ‌های miR399 هستند، اختلالاتی در جذب و مدیریت این عنصر مشاهده می‌شود (Hu et al. 2011). مطالعات نشان داده است که بیان بیش‌ازحد miR399 آرابیدوپسیس در گوجه‌فرنگی، نه تنها موجب افزایش تجمع فسفات می‌شود، بلکه با تقویت ترشح اسید فسفاتاز و پروتون در ریشه، هیدرولیز فسفر آلی خاک و انحلال فسفات معدنی را تسهیل می‌کند (Gao et al. 2010). بر این اساس، miR399 نقشی کلیدی در حفظ هموستازی فسفات از طریق تنظیم دسترسی، تخصیص و انتقال مجدد آن در گیاه ایفا می‌کند.

در آرابیدوپسیس، سه ژن به عنوان اهداف miR399 پیش‌بینی می‌شود: انتقال دهنده Pi (PHT1;7)، جعبه DEAD و آنزیم E2 conjugating ubiquitin. با این حال، تنها آنزیم E2 رمزگذاری شده توسط UBC24 به صورت تجربی تایید شده است (Allen et al. 2005). UBC24 در شرایط فراوانی فسفر به شدت در ریشه بیان می‌شود و در پاسخ به فقر فسفات بیان نسبی آن کاهش می‌یابد، که این امر به‌طور موقت با تنظیم بالای miR399 همزمان است (Fujii et al. 2005; Bari et al. 2006; Chiou et al. 2006; Kuo and Chiou 2011).

برخی از خانواده‌های miRNA در گونه‌های مختلف، پاسخ‌های مشابهی به کمبود فسفر (P) نشان می‌دهند که از آن جمله می‌توان به miR156، miR159، miR166، miR319، miR395، miR398

دارند. بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی الگوی بیان برخی از میکروارناها و ژن‌های هدف و RNAهای کوچک مشتق شده از tRNA دخیل در مسیر سیگنال‌دهی فقر فسفر در بافت‌های برگ و ریشه گیاه کلزا می‌باشد (Gang et al. 2015).

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مهر ماه سال ۱۴۰۱ در گلخانه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای انجام این طرح بذر کلزا رقم هایولا ۵۰ (Hayolla #50) از شرکت کشت و صنعت شهید رجایی دزفول (ایران) تهیه و آزمایش‌های مربوط با کشت در گلدان به‌منظور ارزیابی تغییرات در بیان ژن‌ها مورد تحقیق قرار گرفت. برای شروع آزمایش آزمون خاک به‌منظور بررسی میزان فسفر قابل دسترس و مواد آلی موجود در خاک توسط آزمایشگاه خاک شناسی زرمندگان شهرستان دزفول انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل مقدار ۰٪ فسفر، ۲۵٪ فسفر، ۵۰٪ فسفر و ۱۰۰٪ مقدار فسفر (به‌عنوان کنترل آزمایش) توصیه شده در گیاه کلزا مورد استفاده قرار گرفت (Selimi Torkamani et al. 2012). بعد از کشت، گلدان‌های آزمایشی در شرایط مساوی (عملیات سله شکنی و آبیاری حسب نیاز) مورد نگهداری قرار گرفتند. این روند تا رسیدن گیاهچه کلزا در حالت استقرار ادامه دار بود (Selimi Torkamani et al. 2012).

استخراج RNA و تیمار DNase I

استخراج RNA کل از بافت برگ و ریشه گیاهچه‌های تحت تنش فسفات و شاهد (کنترل)، با استفاده از کیت استخراج RNA از بافت گیاهی شرکت دنازیست آسیا- مشهد (ایران، Cat. No.: S-1020-50)؛ به‌منظور حذف ژنوم احتمالی در نمونه‌های RNA استخراج شده از تیمار آنزیم DNase I (شرکت سیناکلون، ایران؛ Sina Clone, #MO5402, Iran) بر اساس دستور عمل شرکت سازنده انجام شد.

سنتز cDNA کل و سنتز cDNA مختص هر miRNA و tRNA کوچک

cDNA کل با استفاده از کیت شرکت پارس توس مشهد (ایران، A101162) و مخلوطی از آغازگرهای الیگو dt و هگزامر بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده سازنده کیت انجام گرفت. همچنین،

انتهایی مشتق شده (LTRs) از رتروترانسپوزون کوتاه Copia95 تولید می‌شوند. RNAهای کوچک مشتق از tRNA در موجودات مختلف از باکتری گرفته تا انسان شناسایی (Hsieh 2009) و عملکرد بیولوژیکی این دسته از RNAهای کوچک نیازمند اکتشاف و شناسایی عملکرد آن‌ها است.

مطالعات پیشین بر روی پاسخ‌های miRNAها به تنش‌های محیطی، بر نقش کلیدی آن‌ها در تنظیم فیزیولوژیک گیاه تأکید دارند. به‌طور مثال، (Ebrahimi Khaksefidi et al. 2015) نشان دادند که بیان خانواده‌های miR172 و miR403 در آفتابگردان تحت تنش‌های شوری، گرما، خشکی و کادمیوم، رفتاری پویا دارد که مستقیماً با ماهیت ژن‌های هدف آن‌ها در تنظیم رشد و توسعه مرتبط است. علاوه بر این، (Wang et al. 2013) در گیاه کتان مشاهده کردند که پاسخ بیان miRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها تحت تنش‌های شوری و خشکی، تابعی از شدت تنش و نوع بافت است؛ به‌گونه‌ای که miR398 در ریشه (تحت تنش ۲۵٪ NaCl و miR395 در برگ (تحت تنش ۱٪ PEG، بیشترین میزان تنظیم منفی-Down regulation) را نشان دادند.

گیاهان برای مقابله با محیط‌های فاقد مواد مغذی، باید تغییرات در غلظت مواد معدنی محیط خارجی و محیط داخلی خود را حس کرده و متابولیسم مواد مغذی خود را جهت پاسخگویی به نیازهای رشد گیاه تنظیم کنند. miRNAهای پاسخ‌دهنده به مواد مغذی ممکن است نقش‌های حیاتی در تنظیم پاسخ به کمبود مواد مغذی و همچنین در برقراری ارتباط متقابل (Crosstalk) میان مسیرهای متابولیک مواد مغذی ایفا کنند. تا به امروز، نحوه میانجی‌گری miRNAهای گیاهی در تعامل و ارتباط متقابل میان متابولیسم‌های مختلف مواد مغذی ناشناخته مانده است. مطالعه Gang et al. (2015) به‌طور سیستماتیک بیان miRNAها را تحت شرایط فقر فسفات مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. یافته‌ها نشان داد که برخی از miRNAها به‌طور اختصاصی به کمبود یک ماده مغذی خاص پاسخ می‌دهند، در حالی که برخی دیگر تحت شرایط مختلف کمبود مواد مغذی، به‌گونه‌ای متفاوت تنظیم می‌شوند. این مطالعه تأیید کرد که تعداد زیادی از miRNAها و RNAهای کوچک مشتق شده از tRNA به کمبود مواد مغذی پاسخ می‌دهند و برخی از آن‌ها در میانجی‌گری میان مسیرهای متابولیک مختلف مواد مغذی نقش

غیرفعال کردن آنزیم در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند.

طراحی آغازگرهای حلقه سنجاق سری (Stem Loop)

در این مرحله طراحی اختصاصی رفت و برگشت برای هر miRNA و همچنین ژن‌های هدف و RNA های کوچک مشتق شده از tRNA انجام شد. اطلاعات مورد نیاز از پایگاه mirBase با استفاده از پایگاه اطلاعاتی 3 Primer با آدرس (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) انجام شد. سپس طبق اطلاعات به دست آمده سفارش سنتز آغازگر توسط شرکت سیناکلون (ایران) انجام شد. طبق دستورالعمل شرکت آغازگرهای سنتز شده رقیق‌سازی انجام شد و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. نام، توالی آغازگرها و دمای نقطه ذوب در جدول ۱ نشان داده شده است.

cDNA مختص هریک از miRNA مورد مطالعه طبق دستورالعمل ذیل صورت گرفت:

۱- در مرحله اول از همه نمونه‌های RNA استخراج شده به صورت جداگانه مقدار ۴ میکرولیتر برداشته و به میکروتیوپ ۰/۲ میکرولیتر انتقال داده شد. سپس ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر مربوط به هر miRNA به هر تیوپ و سپس ۲/۵ میکرولیتر آب DEPC اضافه شد.

۲- میکروتیوپ‌های به دست آمده در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت زمان ۵ دقیقه قرار گرفته شد و پس از اتمام بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد. سپس به هر میکروتیوپ بافر واکنش (۲ میکرولیتر)، dNTP (۰/۵ میکرولیتر) و آنزیم M-MLV (۰/۵ میکرولیتر) اضافه شد. در مرحله بعد میکروتیوپ‌ها در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت زمان ۶۰ دقیقه قرار گرفتند و برای

جدول ۱- نام، توالی و دمای ذوب (Tm) آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر	Tm (°C)
Action	F:ACCCGGTTCTTCTCACTGAG	۵۸/۶
	R:AGGATAGCGTGAGGAAGAGC	۵۹/۳
RT-miR156	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGTGCTC	۸۰/۰۸
F-miR156	GTATACTGACAGAAGAGAGTG	۵۵/۹۲
RT-miR396	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACAAGTTC	۷۸/۴۴
F-miR396	GTATACTTCCACAGCTTTCTT	۵۳/۹۷
RT-miR390	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGGCGCT	۸۰/۹۰
F-miR390	GTATACAAGCTCAGGAGGGAT	۵۷/۸۷
RT-tRNA-GLY	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTGCGTC	۸۰/۰۸
tRNA-GLY-F	AACAAGGCGTCTGTAGTCCAA	۵۷/۸۷
RT-tRNA-PRO	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGGGGCA	۸۰/۹۰
tRNA-PRO-F	AACAAGGGGCATTTGGTCTAGT	۵۸/۳۹
bHLH	F: CTATGAACTCGCCACGGTG	۵۹/۳۵
	R: GGTGGTAGGAACGTTCCGTA	۵۹/۳۵
GRF8	F: GCACAACCTAAGAACGCTGCT	۵۹/۳۵
	R: CTCCTCCTGCCTGAAGTTCA	۵۹/۳۵
SPL9	F: CGGTGTAGGTGGGTCTTCTT	۵۹/۳۵
	R: GAAACCTGCTGCACTGTTGA	۵۷/۳۰
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	۵۶/۸۶

این امر بیانگر آن است که کمبود فسفر تأثیر منفی بر بیان ژن هدف bHLH داشته و احتمالاً از طریق تنظیم این محور miRNA-target بر توسعه ریشه در شرایط تنش اثر می‌گذارد (شکل ۱).

در بافت برگ، برخلاف بافت ریشه، کمبود فسفر منجر به افزایش بیان miR396 شد که این امر باعث کاهش نسبی و محدود بیان ژن هدف (bHLH) در تیمار ۰ درصد فسفات شد؛ به‌طوری‌که در اکثر تیمارها، الگوی بیان به‌صورت همسو مشاهده شد (شکل ۲، جدول ۱). همچنین در بافت برگ، میزان بیان ژن bHLH در مقایسه با تیمار شاهد، کاهش اندکی نشان داد و در تیمار ۵۰ درصد فسفات، روند کاهشی بیان آن مشاهده شد.

با توجه به نتایج پژوهش‌های پیشین که نشان می‌دهند miR396 فاکتور رونویسی bHLH به‌طور مستقیم در تنظیم رشد ریشه‌ها در گیاه آرابیدوپسیس نقش دارند (Bao et al. 2014)، می‌توان استنباط کرد که پاسخ‌های متفاوت این محور در بافت‌های مختلف، ناشی از مکانیسم‌های تنظیم‌شده‌ی بافتی (Tissue-specific) است. بر این اساس، احتمال می‌رود در بافت ریشه، محدودیت در بیان این ژن‌ها مستقیماً تحت تأثیر در دسترس بودن فسفر در محیط ریشه باشد که نشان‌دهنده واکنش مستقیم ریشه به وضعیت تغذیه‌ای برای حفظ هموستازی فسفات است.

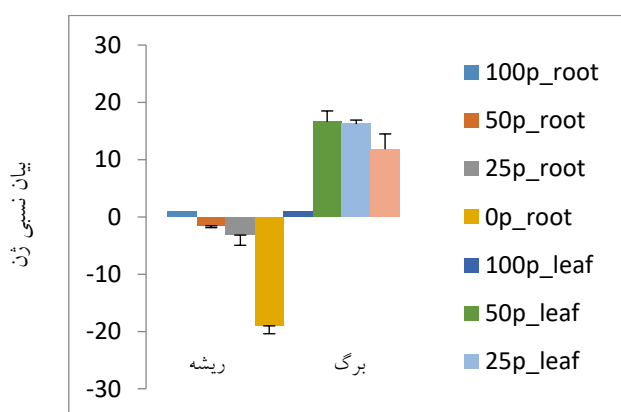
واکنش qPCR و تجزیه و تحلیل الگوی تغییرات نسبی بیان ژن واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (qPCR) با استفاده از کیت سایبرگرین High ROX (شرکت پارس توس، مشهد، Cat. No.: C-101022) و توسط دستگاه Step One (شرکت ABI آمریکا) انجام شد. به‌منظور بررسی تغییرات الگوی بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه از ژن مرجع اکتین (Actin) در ۳ تکرار بیولوژیک و شرایط زمانی و دمایی خاص هر ژن: یک چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (واسرشت‌سازی اولیه)؛ ۴۰ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال هر آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ و در پایان یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) برای آنالیز داده‌ها و بررسی میزان بیان نسبی با استفاده از نرم‌افزار Excel (2007) انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی تغییرات نسبی miR396 و ژن bHLH در بافت ریشه و برگ

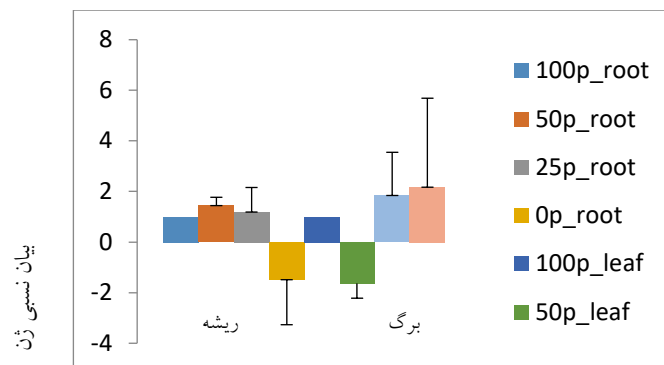
ژن هدف bHLH از جمله فاکتورهای رونویسی است که در فرآیند جوانه‌زنی نقش کلیدی ایفا می‌کند. این فاکتور به‌عنوان یک کنترل‌کننده پایدار در فرآیند جوانه‌زنی در پاسخ به نور عمل کرده و موجب تسهیل جوانه‌زنی ناشی از گرما می‌شود (Groszmann et al. 2010). بر این اساس، miR396 می‌تواند از طریق تنظیم بیان فاکتور رونویسی bHLH، بر این مسیر اثرگذاری کند (Debernardi et al. 2012). مطالعات پیشین بر روی گیاه آرابیدوپسیس نشان داده است که miR396 به‌صورت مستقیم بر ژن‌های تنظیم‌کننده رشد اثر گذاشته و با تأثیر بر عوامل رشد و نمو (شامل برگ، لپه، ساقه، گل و ریشه)، توسعه گیاه را مدیریت می‌کند (Szczygiel et al. 2019). در پژوهش حاضر، بیشترین میزان بیان miR396 در بافت ریشه مربوط به تیمار ۵۰ درصد فسفات بود؛ با این حال، با کاهش سطح فسفات، میزان بیان این miRNA روند کاهشی داشت که در نهایت به تنظیم منفی (Down-regulation) منجر شد. در مقابل، بیان فاکتور رونویسی bHLH در تمامی تیمارها الگوی کاهشی نشان داد؛



شکل ۱- تغییرات بیان نسبی ژن miR396 در بافت ریشه و برگ کلزا در پاسخ به تیمارهای فقر فسفات

یعنی اعضای خانواده SBP/SPL، نسبت داده می شود (Zheng et al. 2019).

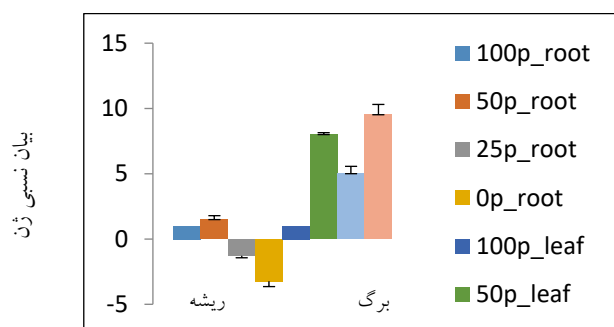
در پژوهش حاضر، در بافت ریشه کلزا، بیان miR156 و ژن هدف SPL9 تحت تیمارهای مختلف فسفر، در مقایسه با تیمار شاهد (۱۰۰ درصد فسفر) تغییرات قابل توجهی نشان داد؛ به طوری که بیان ژن هدف SPL9 در همه تیمارها افزایش یافت و بیشترین افزایش مربوط به تیمار ۲۵ درصد فسفر بود، در حالی که بیان miR156 در تیمارهای ۰ و ۲۵ درصد فسفر روند کاهشی داشت (شکل ۳). همچنین در بافت برگ، miR156 در تمامی تیمارها افزایش بیان نشان داد، اما ژن هدف SPL9 تنها در تیمار ۰ درصد فسفر افزایش بیان داشت و در سایر تیمارها کاهش بیان مشاهده شد (شکل ۴). بررسی ها نشان می دهد که الگوی بیان معکوس بین miR156 و ژن هدف آن در بافت های برگ و ریشه، با گزارش های سایر پژوهشگران نیز همخوانی دارد (Yu et al. 2015; Xu et al. 2016). بنابراین، کاهش نسبی miR156 و افزایش بیان SPL9 در بافت ریشه تحت تیمارهای مختلف فسفر ممکن است ناشی از تأمین مناسب تر برخی مواد غذایی و کاهش نیاز به توسعه بیشتر ریشه باشد؛ وضعیتی که می تواند به فعال سازی ژن های مرتبط با مهار رشد ریشه منجر شود.



شکل ۲- تغییرات بیان نسبی ژن bHLH در بافت ریشه و برگ کلزا در پاسخ به تیمار فقر فسفات

بررسی تغییرات بیان نسبی miR156 و ژن هدف SPL9 در بافت ریشه و برگ

ژن هدف SPL از جمله فاکتورهای رونویسی مهم در گیاهان است که miR156 به عنوان miRNA مرتبط با آن شناخته می شود و در میان فاکتورهای رونویسی، به طور گسترده در اندام های گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است (Yin et al. 2019; Jerome et al. 2020). این miRNA از نظر تکاملی حفاظت شده بوده و بخش عمده مطالعات مربوط به آن در اندام های هوایی گیاهان انجام شده است (Xu et al. 2016). miR156 نقش کلیدی در فرایندهای زیستی متعددی از جمله تنظیم رشد، پاسخ ایمنی، تنظیم متابولیسم و پاسخ به تنش های غیرزیستی ایفا می کند (Jeyakumar et al. 2020). از آنجا که miR156 نخستین بار در ارتباط با تعدیل فاز رویشی در Arabidopsis و ذرت شناسایی شد، نقش تنظیمی آن به طور گسترده در سایر گونه های گیاهی نیز گزارش شده است (Shikata et al. 2012). این miRNA در مراحل اولیه رشد، به ویژه در مرحله گیاهچه، در سطح بالایی تجمع می یابد و با پیشرفت رشد گیاه به تدریج کاهش می یابد. گیاهانی که دارای سطح بالاتری از miR156 هستند، دوره جوانی طولانی تری را نشان می دهند که با افزایش انشعاب، رشد سریع برگ ها و تأخیر در گل دهی مشخص می شود (Sunkar et al. 2012). در Arabidopsis، این الگوی رشد که به صورت هتروپلاستی شناخته می شود، با افزایش حاشیه و پیچیدگی برگ ها و کاهش اندازه سلول همراه است. این تغییرات در همان گیاه به تغییرات متوالی در بیان miR156 و اهداف آن،

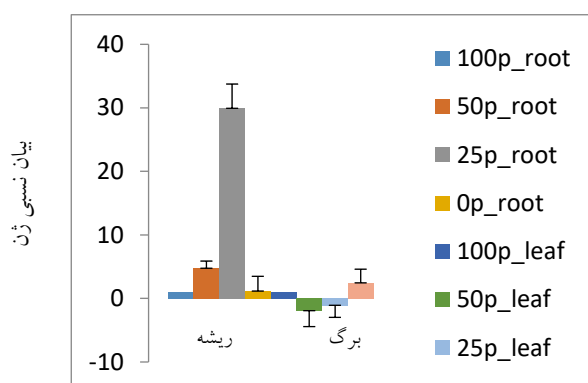


شکل ۳- تغییرات بیان نسبی ژن miR156 در بافت ریشه و برگ کلزا در پاسخ به تیمار فقر فسفات

بررسی بیان نسبی miR390 و ژن GRF8 در بافت ریشه و برگ

خانواده miR390 از سطح بالایی از حفاظت تکاملی در میان گیاهان برخوردار است. این miRNA از طریق مسیرهای پیام رسانی اکسین، در فرایندهای زیستی متعددی از جمله تکوین مریستم انتهایی، پیری برگ، تشکیل ریشه و پاسخ به تنش های زیستی و غیرزیستی نقش

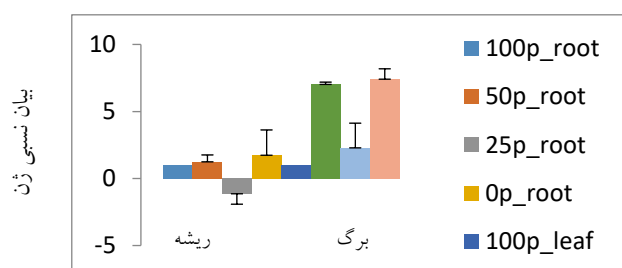
کلیدی ایفا می کند (Allen et al. 2005; Szczygiel-Sommer and Gaj 2019).



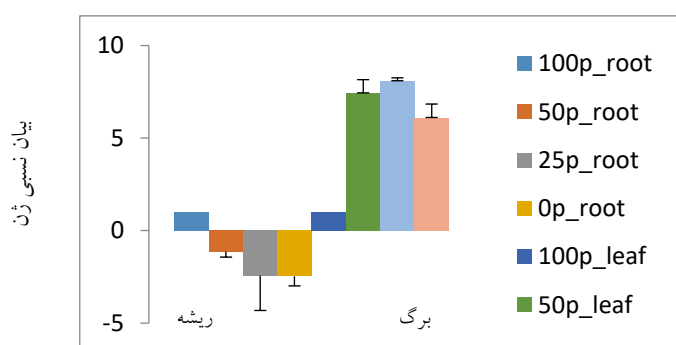
شکل ۴- تغییرات بیان نسبی ژن SPL9 در بافت ریشه و برگ کلزا در پاسخ به تیمار فقر فسفات

عملکرد ژن GRF8 به عنوان یک فاکتور رونویسی اختصاصی گیاهی بوده که نقش مهمی در تکثیر و گسترش سلولی، اثر بر نمو برگ و پاسخ به تنش های زیستی و غیرزیستی دارد (Olunuga et al., 2026). در پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن ها در بافت ریشه کلزا نشان داد که بیان ژن هدف GRF8 در تمامی تیمارهای فسفر نسبت به تیمار شاهد کاهش یافته است. در مقابل، بیان miR390 در اکثر تیمارها افزایش نشان داد (به جز تیمار ۵۰ درصد فسفر که با کاهش بیان همراه بود؛ شکل ۵). این نتایج بیانگر یک همبستگی معکوس (Negative correlation) بین miR390 و فاکتور رونویسی GRF8 در بافت ریشه است که نشان دهنده نقش تنظیمی منفی (سرکوب کنندگی) این miRNA بر ژن هدف خود در ریشه است (شکل ۶).

در مقابل، نتایج حاصل از بافت برگ الگوی متفاوتی را نشان داد؛ به طوری که در این بافت، هم miR390 و هم ژن هدف GRF8 تحت تیمارهای فسفر نسبت به شاهد افزایش بیان داشتند (بیشترین بیان miR390 در تیمار ۰ درصد و بیشترین بیان GRF8 در تیمار ۲۵ درصد فسفر مشاهده شد؛ شکل ۶). مشاهده هم سویی در تغییرات بیان (Co-expression) این دو فاکتور در بافت برگ، برخلاف بافت ریشه، نشان می دهد که در این اندام، مکانیسم تنظیمی مستقیمی از نوع سرکوب کنندگی miRNA بر ژن هدف حاکم نیست یا عوامل تنظیمی دیگری در این مسیر دخالت دارند که مانع از اثر مهاري miR390 بر GRF8 می شوند.



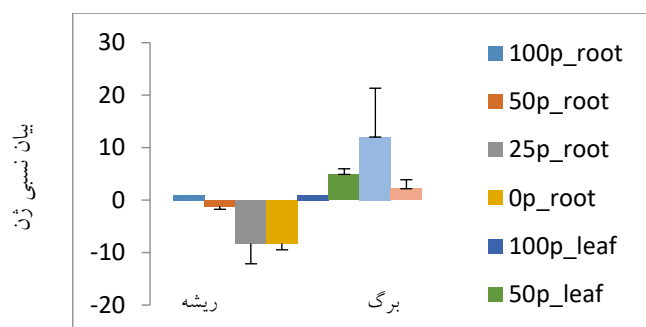
شکل ۵- تغییرات بیان نسبی ژن miR390 در بافت ریشه و برگ کلزا در پاسخ به تیمار فقر فسفات



شکل ۶- تغییرات بیان نسبی ژن GRF8 در بافت ریشه و برگ کلزا در پاسخ به تیمار فقر فسفات

بررسی بیان نسبی tRNA-Gly و tRNA-pro در بافت ریشه و برگ

RNAهای کوچک مشتق شده از RNA ناقل (tsRNA)، شامل قطعات مشتق شده از RNA ناقل (tRFs) و نیمه-RNAهای ناقل (tiRNAs)، RNAهای تنظیمی کوچکی هستند که از RNAهای ناقل (tRNA) بالغ یا پیش ساز پردازش می شوند. این مولکول ها از طریق مکانیسم های متنوعی از قبیل تعامل با پروتئین ها یا mRNA، مهار ترجمه، تنظیم بیان ژن، کنترل چرخه سلولی و ایجاد تغییرات اپی ژنتیک در ساختار کروماتین، ایفای نقش می کنند. توسعه و به کارگیری فناوری های نوین پژوهشی جهت شناسایی نقش های بیولوژیکی tRF ها و tiRNA ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در همین راستا، محققان برای تبیین مکانیسم های مولکولی عملکرد این قطعات، از روش های پیشرفته بیوانفورماتیکی و زیست شناسی مولکولی نظیر ریزآرایه (Microarray) و واکنش زنجیره ای پلیمرز رونویسی معکوس کمی (qRT-PCR) بهره می گیرند (Xie et al. 2020).



شکل ۸- تغییرات بیان نسبی ژن tRNA-Pro در بافت ریشه و برگ کلزا در پاسخ به تیمار فقر فسفات

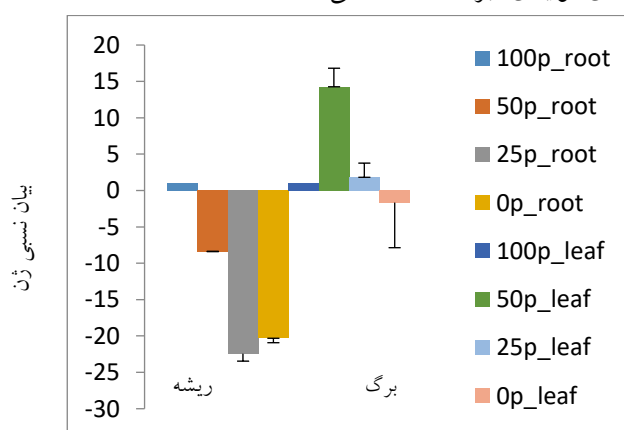
نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پاسخ گیاه به محدودیت فسفات، فرآیندی پیچیده و بافت‌محور (Tissue-specific) است که با تغییرات قابل توجه در سطوح tRNAهای اختصاصی، از جمله tRNA-Pro و tRNA-Gly، همراه است. این یافته‌ها نشان می‌دهند که miRNAها و قطعات مشتق‌شده از tRNA (tsRNAs)، فراتر از نقش‌های ساختاری، به عنوان تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی و مولکولی در مدیریت پاسخ‌های تنش عمل می‌کنند. از نظر مکانیسمی، تفاوت در الگوی بیان این مولکول‌ها در بافت ریشه و برگ، گویای یک استراتژی تنظیمی برای پایش و انطباق با وضعیت مواد مغذی در بخش‌های مختلف گیاه است. در نتیجه، شناسایی این مولکول‌های تنظیمی، مسیر جدیدی را برای اصلاح مولکولی و برنامه‌های مهندسی ژنتیک جهت ارتقای بهره‌وری مصرف فسفر (P-use efficiency) باز می‌کند. این رویکرد نه تنها پتانسیل بهبود عملکرد محصولات کشاورزی در شرایط تنش را دارد، بلکه می‌تواند با کاهش وابستگی به نهاده‌های شیمیایی فسفات، گامی مؤثر در جهت تحقق کشاورزی پایدار و مدیریت زیست‌محیطی بردارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه شهید چمران اهواز بابت حمایت در انجام پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌نمایند.

در مطالعه حاضر، بررسی بیان نسبی tRNA-Gly تحت سطوح مختلف فسفر نشان داد که بیشترین میزان افزایش بیان (تنظیم مثبت) در بافت برگ تحت تیمار ۵۰ درصد فسفر رخ داده است. در مقابل، در بافت ریشه، بیشترین میزان کاهش بیان در تیمار ۲۵ درصد فسفر مشاهده شد که این الگو بیانگر اهمیت نقش tRNA-Gly در پاسخ به شرایط محدودیت فسفر است (شکل ۷). همچنین، نتایج حاصل از تحلیل بیان tRNA-Pro نشان‌دهنده بیشترین افزایش بیان (۲/۱۲) در بافت برگ تحت تیمار ۲۵ درصد فسفر بود؛ در حالی که در بافت ریشه، بیشترین میزان کاهش بیان در تیمارهای ۲۵ درصد (۲۸/۸-) و صفر درصد (۲۴/۸-) فسفر به ثبت رسید (شکل ۸). یافته‌های این پژوهش نشان داد که بیان tRNAهای Gly و Pro تحت تنش فقر فسفر، به شدت تحت تأثیر نوع بافت قرار دارد. مشاهده افزایش بیان این tRNAها در برگ و کاهش آن‌ها در ریشه، نشان‌دهنده یک استراتژی تنظیم‌کننده (Regulatory strategy) متفاوت برای مدیریت منابع فسفات در اندام‌های مختلف گیاه است (Wang et al. 2023; Zhang et al. 2009). نکته قابل توجه، تفاوت الگوی بیان در ریشه و برگ است. کاهش بیان در ریشه ممکن است بازتابی از تغییر در نرخ سنتز پروتئین یا تغییر در فرآیند پردازش tRNA (tRNA cleavage) جهت تولید tsRNAهای کوچک‌تر باشد که به مدیریت تنش کمک می‌کنند. این تفاوت بافت‌محور، نشان می‌دهد که گیاه برای بقا در شرایط محدودیت فسفات، از مکانیسم‌های تنظیم ژنی متفاوتی در اندام‌های جذب (ریشه) و اندام‌های تولیدی (برگ) استفاده می‌کند.



شکل ۷- تغییرات بیان نسبی ژن tRNA-Gly در بافت ریشه و برگ کلزا در پاسخ به تیمار فقر فسفات

منابع

- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005) MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121:207–221.
- Aung K, Lin SI, Wu CC, Huang YT, Su CL, Chiou TJ (2006) *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiology* 141: 1000–1011.
- Bao M, Bian H, Zha Y, Li F, Sun Y, Bai B, Han N (2014) miR396a-mediated basic helix–loop–helix transcription factor bHLH74 repression acts as a regulator for root growth in *Arabidopsis* seedlings. *Plant and Cell Physiology* 55(7): 1343–1353.
- Bari R, Datt Pant B, Stitt M, Scheible WR (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology* 141: 988–999.
- Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J (2008) Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant Journal* 53: 739–749.
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL (2006) Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:412–421.
- Chiou TJ, Lin SI (2011) Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annual Review of Plant Biology* 62: 185–206.
- Debernardi JM, Rodriguez RE, Mecchia MA, Palatnik JF (2012) Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA–target interactions. *PLoS Genetics* 8: e1002419.
- Delhaize E, Randall PJ (1995) Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 107: 207–213.
- Ebrahimi Khaksefidi R, Mirlohi S, Khalaji F, Fakhari Z, Shiran B, Fallahi H, Rafiei F, Budak H, Ebrahimi E (2015) Differential expression of seven conserved microRNAs in response to abiotic stress and their regulatory network in *Helianthus annuus*. *Frontiers in Plant Science* 6: 741.
- Fatahi B (2021) Identification and Potential Role of RNA-Helicase Mechanism in Response to Abiotic Stresses in *Canola* (*Brassica napus*). Master's thesis, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, Garcí'a JA, Paz-Ares J (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics* 39:1033–1037.
- Fu C, Sunkar R, Zhou C, Shen H, Zhang JY, Matts J, Wang ZY (2012) Overexpression of miR156 in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) results in various morphological alterations and leads to improved biomass production. *Plant biotechnology Journal* 10(4): 443–452.
- Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK (2005) A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Current Biology* 15: 2038–2043.
- Gao N, Su Y, Min J, Shen W, Shi W (2010) Transgenic tomato overexpressing *ath-miR399d* has enhanced phosphorus accumulation through increased acid phosphatase and proton secretion as well as phosphate transporters. *Plant Soil* 334:123–136.
- Gang L, Qin A, Diqui Y (2015) Uncovering miRNAs involved in crosstalk between nutrient deficiencies in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 5, 11813.
- Groszmann M, Bylstra Y, Lampugnani ER, Smyth DR (2010) Regulation of tissue specific expression of SPATULA, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 61: 1495–1508.
- Hejazi A (2001) *Canola Cultivation: Planting, Maintenance, and Harvesting*. Rozaneh Publications. Iran. 1–162.
- Hsieh LC, Lin SI, Shih AC, Chen JW, Lin WY, Tseng CY, Li WH, Chiou TJ (2009) Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiology* 151: 2120–2132.
- Hu B, Zhu C, Li F, Tang J, Wang Y, Lin A, Liu L, Che R, Chu C (2011) LEAFTIP NECROSIS1 plays a pivotal role in regulation of multiple phosphate starvation responses in rice. *Plant Physiology* 156: 1101–1115.
- Jerome Jeyakumar JM, Ali A, Wang WM, Thiruvengadam M (2020) Characterizing the role of the miR156-SPL network in plant development and stress response. *Plants* 9(9): 1206.
- Koohi F (2017) Investigation of the expression pattern of conserved miRNAs and their target genes in response to abiotic stresses in cultivated safflower. Master's thesis, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
- Kuo HF, Chiou TJ (2011) The role of MicroRNAs in phosphorus deficiency signaling. *Plant Physiology* 156:1016–1024.
- Li J, Li Y, Wang R, Fu J, Zhou X, Fang Y, Wang Y, Liu Y (2022) Multiple Functions of MiRNAs in *Brassica napus* L. *Life* 12: 1811.
- Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC, Chiou TJ (2008) Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiology* 147: 732–746.
- Marschner H (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London.
- Mastafavi Rad M, Nobahar A, Mahboub Khamami A (2018) *Nutritional Management in Canola Cultivation*. Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Guilan Province Publications, Iran. 1–24.
- Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, et al (2005) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceeding Natural Academic Science of USA* 102: 7760–7765.
- Olunuga OA, Xu L, Adams I, Arabzai MG, Wu T, Gao J, Ke F, Bai Q, Chen S, An C, et al. (2026) Integrative Roles of Growth-Regulating Factors (GRFs) in Leaf

- Morphogenesis, Stress Response, and Crop Regeneration. *Agronomy*. 16(6):675.
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible WR (2008) MicroRNA399 is a long distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant Journal* 53: 731–738.
- Qaderi J, NoorGholipour F (2020) The effect of phosphorus on seed yield and phosphorus use efficiency indices in winter canola cultivars in Kermanshah region. *Water and Soil Sciences and Agricultural Industries* 34(2): 439-459.
- Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 665–693.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Development* 16: 1616–1626.
- Selimi Torkamani F, Madani H, Gomarian M (2012) The effect of phosphorus fertilizer and micronutrient types on agronomic traits of hyola canola variety. Second National Conference on New Achievements in Oilseed Crop Production, Bojnord. <https://civilica.com/doc/235882>
- Shikata M, Yamaguchi H, Sasaki K, Ohtsubo N (2012) Overexpression of Arabidopsis miR157b induces bushy architecture and delayed phase transition in *Torenia fournieri*. *Planta* 236: 1027-1035.
- Soltani A, Azizi M, Khavari-Khorasani S (2006) Canola: Physiology, Agriculture, Breeding, Biotechnology. Mashhad Jihad-e-Daneshgahi Publications, Iran. 1-232.
- Szczygieł-Sommer A, Gaj MD (2019) The miR396–GRF regulatory module controls the embryogenic response in Arabidopsis via an auxin-related pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20): 5221.
- Wang J, Sun J, Miao J, Guo J, Shi Z, He M (2013) A wheat phosphate starvation response regulator Ta-PHR1 is involved in phosphate signalling and increases grain yield in wheat. *Annual of Botany* 111: 1139–1153.
- Wang C, Chen W, Aili M, Zhu L, Chen Y. tRNA-derived small RNAs in plant response to biotic and abiotic stresses. *Front Plant Sci*. 2023 Jan 30;14:1131977.
- Xie Y, Yao L, Yu X (2020) Action mechanisms and research methods of tRNA-derived small RNAs. *Signal Transduction Target Therapy* 5: 109.
- Xu M, Hu T, Zhao J, Park MY, Earley KW, Wu G, Yang L, Poethig RS (2016) Developmental functions of miR156-regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 12: e1006263.
- Yin H, Hong G, Li L, Zhang X, Kong Y, Sun Z, He Y (2019) miR156/SPL9 regulates reactive oxygen species accumulation and immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 109(4): 632-642.
- Yu N, Niu QW, Ng KH, Chua NH (2015) The role of miR156/SPL s modules in Arabidopsis lateral root development. *The Plant Journal* 83: 673-685.
- Zhang S, Sun L, Kragler F (2009) The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiology* 150: 378–387.
- Zheng C, Ye M, Sang M, Wu R (2019) A regulatory network for miR156-SPL module in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* 20(24): 6166.