

مطالعه الگوی بیان MicroRNA های دخیل در تحمل تنش خشکی در اجداد و خویشاوندان وحشی و اهلی گندم

بتول شهیدی^۱، جعفر احمدی^۲ و صدیقه فابریکی اورنگ^{۳*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- استاد، هیئت علمی گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۳- نویسنده و مسئول مکاتبات، استادیار، هیئت علمی گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

پست الکترونیک: ourang@eng.ikiu.ac.ir, s.ourang910@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۸

چکیده

miRNA ها، مولکول‌های کوچک غیرکدکننده هستند که بیان ژن‌ها را از طریق هضم mRNA یا ممانعت از ترجمه تنظیم می‌کنند. این مولکول‌ها با تنظیم دقیق بیان ژن‌ها، امکان پاسخ مناسب گیاه را به تغییرات مراحل رشدی یا شرایط محیطی فراهم می‌کنند. در این تحقیق با استفاده از تکنیک Real Time-PCR الگوی بیان miRNA159، miRNA160 و miRNA398 به همراه ژن هدف miRNA398 (CSD) در شش گونه متعلق به جنس‌های تریتیکوم و آزیلوپس در کنار دو رقم گندم نان شاهد حساس (دریا) و متحمل به خشکی (سیروان)، در شرایط عدم تنش (FC=100%) و تنش خشکی (FC=25%) مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه qRT-PCR نشان داد که تحت تنش خشکی هر سه miRNA افزایش بیان معنی‌داری ($P \leq 0.01$) نسبت به شرایط عدم تنش داشتند. در بین گونه‌های مورد بررسی بیشترین میزان بیان miRNA159 در گونه *Ae. tauschii*، miRNA160 در گونه *T. urartu* و miRNA398 در گونه *T. durum* و ژن CSD در گونه *T. durum* مشاهده شد. در مقایسه میانگین اثر متقابل گونه و تنش بیشترین درصد افزایش بیان برای هر سه miRNA در شرایط تنش خشکی در سه گونه *T. durum*، *T. urartu* و *Ae. tauschii* مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان افزایش بیان CSD در گونه‌های *T. urartu*، *T. durum* و *Ae. tauschii* به ترتیب با ۶/۶۲، ۶/۲۱ و ۶/۰۳۸ برابر نسبت به شرایط عدم تنش مشاهده گردید. در جمع‌بندی مشخص شد که سه گونه *T. durum*، *T. urartu* و *Ae. tauschii* به دلیل برتری از لحاظ miRNA های عامل ایجاد تحمل می‌توانند کاندیدهای مناسبی برای غنی‌سازی ژرم‌پلاسما گندم نان و اصلاح برای تحمل تنش خشکی باشند.

واژه‌های کلیدی: گندم وحشی، تنش خشکی، miRNA، PCR در زمان واقعی.

مقدمه

(2010). در این زمینه با شناسایی RNAهای کوچک، توجه-ها معطوف به تنظیم بیان ژن پس از نسخه‌برداری با استفاده از miRNAها در پاسخ به تنش خشکی شده است (Sunkar, 2010). RNAهای تک‌رشته‌ای

چگونگی تنظیم بیان ژن‌ها در تنش خشکی، از مهمترین راهکارهای شناسایی اساس فیزیولوژیک-مولکولی مقاومت به تنش به‌شمار می‌رود (Covarrubias and Reyes,)

در تحمل به تنش نیز از طریق تأثیر بر سطح نسخه‌برداری *ARF*‌ها نقش دارد (Hagen and Guilfoyle, 2002). *ARF*‌ها، فاکتورهای رونویسی مهمی هستند که در انتقال سیگنال اکسین از طریق اتصال به عناصر اختصاصی در بالادست ژن‌هایی که توسط اکسین القا می‌شوند، دخیل هستند (Mallory *et al.*, 2005). *miRNA160* از طریق کنترل بیان *ARF10*، *ARF16* و *ARF17* در تنظیم مسیرهای سیگنال اکسین نقش دارد (Rhoades *et al.*, 2002). افزایش بیان *miRNA160* تحت تنش خشکی در لوبیا (Barrera-Lu *et al.*, 2011) و تحت تنش‌های شوری (Lu *et al.*, 2011)، گرما (Xin *et al.*, 2010) و سرما (Tang *et al.*, 2012) در گندم گزارش شده است. افزایش بیان *miRNA160* باعث تنظیم مسیرهای سیگنالینگ اکسین و کمک به تحمل تنش در رقم متحمل نسبت به رقم حساس به تنش خشکی می‌شود.

miRNA398 یکی از *microRNA*های مهم است که در پاسخ به تنش اکسیداتیو نقش دارد (Jagadeeswaran *et al.*, 2009). *miRNA398* ژن کدکننده سوپراکسید دیسموتاز مس (*CSD*) را تنظیم منفی می‌کند. هنگامی که میزان اکسیژن آزاد درون سلولی افزایش می‌یابد با کاهش بیان *miRNA398* بیان ژن‌های کدکننده سوپراکسید دیسموتازها افزایش یافته و مانع صدمه دیدن گیاه توسط اکسیژن آزاد می‌شود. افزایش یا کاهش بیان *miRNA398* بستگی به شرایط فیزیولوژیکی گیاه دارد. کاهش بیان *miRNA398* در پاسخ به تنش اکسیداتیو برای کاهش سطح ROS اتفاق می‌افتد و افزایش بیان آن برای حفظ مس اتفاق می‌افتد (Sunkar *et al.*, 2012). *miRNA398* در تنش‌های اکسیداتیو، خشکی، شوری و اسید آسبزییک باعث یک تغییر فوری در سطح‌های *CSD* می‌شود (Dugas and Bartel, 2010; Yu *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2008). بیان زیاد *CSD* گیاهان را از تنش‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند و تحمل نسبت به تنش خشکی را در گیاهان تراریخته افزایش می‌دهد (Sunkar *et al.*, 2006). سانکار و همکاران در مطالعات انجام شده تحت تنش خشکی افزایش بیان

کوچک تنظیمی و غیرکدکننده ۲۴-۱۸ نوکلئوتیدی هستند که طی فرایندی از RNAهایی با ساختار ساقه-حلقه توسط آنزیم‌های خانواده دایسر به وجود می‌آیند (Bartel and Chen, 2004) و نقش مهمی را در بیان ژن‌ها از طریق تجزیه mRNA یا سرکوب ترجمه ایفا می‌کنند (Jones-Rhoades *et al.*, 2004). در واقع علاوه بر تنظیمات رشد و توسعه شامل تنظیم رشد ریشه و برگ‌ها، مهمترین عمل *miRNA*ها در گیاهان تنظیم فرایندهای مختلف سلولی به منظور سازگار کردن گیاهان به تنش‌های محیطی می‌باشد (Lu and Sun, 2008; Zhou *et al.*, 2010).

تعدادی از ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش در سطح بیان ژن گزارش شده‌اند که بعضی از این ژن‌ها نقش مهمی را در سازش گیاهان در مقابل تنش خشکی از طریق دریافت سیگنال‌های انتقال، شبکه‌های تنظیم کننده بیان ژن در سطح سلولی یا از طریق مقاومت به پسابدگی ایفا می‌کنند (Umezawa *et al.*, 2006). همچنین تعداد زیادی *miRNA* شناسایی شده‌اند که در پاسخ به تنش‌های محیطی گوناگون نقش دارند (Sunkar *et al.*, 2006). تحقیقات نشان داده است که افزایش بیان *miRNA159* به وسیله تنظیم بیان فاکتورهای رونویسی خانواده *MYB* در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده دخیل است (Xin *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011). پروتئین‌های خانواده *MYB* نقش مهمی را در تنظیم بیوسنتز آنتوسیانین (Chen *et al.*, 2005) و پاسخ به سیگنال هورمون ایفا می‌کنند (Gubler *et al.*, 2002). همچنین فاکتور رونویسی *MYB* به فعال‌سازی ژن‌هایی که به وسیله اسید آسبزییک القا می‌شوند کمک می‌کند (Tuteja *et al.*, 2007). نقش *miRNA159* در سیگنال‌دهی هورمون‌های ABA به اثبات رسیده است. اهمیت ABA در پاسخ به تنش توسط نقش آن در بستن روزنه‌ها، نگهداری رشد ریشه و جلوگیری از رشد اندام هوایی است. افزایش بیان *miRNA159* طی تنش خشکی رشد گیاه را به گونه‌ای تنظیم می‌کند تا انرژی گیاه در مسیر سازش با شرایط تنش مصرف شود (Reyes and Chua, 2007).

اکسین یک هورمون کلیدی است که علاوه بر رشد و نمو

miRNA398 را در یونجه، گندم وحشی و سپیدار گزارش کردند (Sunkar *et al.*, 2012).

شناسایی سازوکارهای مولکولی دخیل در پاسخ به تنش خشکی می‌تواند راه را برای مطالعات مرتبط با تولید گیاهان مقاوم به خشکی فراهم نماید. با توجه به اهمیت خشکی به عنوان یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی محدودکننده تولید محصول و اهمیت گندم به‌عنوان یکی از مهمترین محصولات راهبردی کشاورزی، این تحقیق با هدف بررسی تغییر بیان miRNA159، miRNA160 و miRNA398 که به ترتیب با تنظیم فاکتورهای رونویسی *MYB*، *ARF* و *CSD* در کنترل مسیرهای آبسزیک اسید و اکسین نقش دارند و همچنین بررسی الگوی بیان ژن هدف miRNA398 یعنی *CSD*، در شش گونه از خویشاوندان وحشی گندم متعلق به جنس‌های تریتیکوم و آژیلوپس تحت تنش خشکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد و طرح آزمایشی، اعمال تنش و نمونه‌برداری به‌منظور ارزیابی تحمل تنش خشکی شش گونه از

خویشاوندان وحشی گندم متعلق به جنس‌های تریتیکوم و آژیلوپس (جدول ۱)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی انجام شد. برای شکستن خواب بذر و جوانه‌زنی یکنواخت بذرها، نمونه‌های مورد بررسی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. پس از این مرحله از هر نمونه تعداد ۱۰ بذر در هر گلدان در شرایط رشدی گلخانه با دوره نوری ۱۶ : ۸ (روشنایی: تاریکی) و شرایط دمایی ۲۵ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد کشت گردید. از دو رقم گندم نان متحمل (سیروان) و حساس (دریا) به خشکی به‌عنوان شاهد استفاده شد. پس از رشد و استقرار گیاهچه‌های گندم، تنش خشکی در مرحله سه‌برگی و براساس ظرفیت زراعی مزرعه (FC)، در دو سطح عدم تنش (FC = ۱۰۰٪) و تنش خشکی (FC = ۲۵٪) اعمال گردید. نمونه‌برداری در یک بازه زمانی معین و یکسان پس از مشاهده علائم ظاهری اثر تنش بر گیاهان از گیاهچه‌های ۲۸ روزه انجام شد. نمونه‌های برگ‌ی پس از غوطه‌ور شدن در ازت مایع تا انجام مراحل بعدی آزمایش به فریزر ۸۰- منتقل گردیدند.

جدول ۱- اسامی و محل جمع‌آوری گونه‌های خویشاوندان وحشی و اهلی گندم نان

شماره	نام گونه	ژنوم	کد بانک ژن	استان	محل جمع‌آوری
۱	<i>T. boeoticum</i>	(A ^b A ^b)	IUGB-00216*	آذربایجان شرقی	جاده اهر-کلیر
۲	<i>T. urartu</i>	(A ^u A ^u)	IUGB-00124	کردستان	قشلاق مریوان
۳	<i>T. durum</i>	(AABB)	IUGB-00038	اصفهان	گلپایگان
۴	<i>Ae. cylindrica</i>	(DDCC)	IUGB-00200	کرمانشاه	جاده سنقر-اسدآباد
۵	<i>Ae. tauschii</i>	(DD)	IUGB-00260	گیلان	آستارا
۶	<i>Ae. Crassa</i>	(DDMM)	IUGB-01582	لرستان	دلگان
۷	<i>T. aestivum</i>	(AABBDD)	سیروان (شاهد متحمل)	تهیه شده از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج	
۸	<i>T. aestivum</i>	(AABBDD)	دریا (شاهد حساس)	تهیه شده از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج	

*: Ilam University Gene bank

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA کل از نمونه‌های برگ‌ی با استفاده از

کیت RNX-Plus شرکت سیناژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سنجش کمیت RNA به‌وسیله دستگاه

طراحی و سنتز آغازگرهای اختصاصی

پس از انتخاب miRNAهای مورد نظر برای مطالعه الگوی بیان، یک آغازگر ساقه-حلقه برای سنتز cDNA هریک از miRNAها و یک جفت آغازگر برای هر miRNA برای انجام واکنش Real Time PCR براساس روش *Chen et al.* (2005) انتخاب شد. توالی آغازگر ژن هدف miRNA398 یعنی *CSD* از مقاله *Wang et al.* (2014) انتخاب شد. از یک توالی Universal به عنوان آغازگر برگشتی برای تکثیر miRNA در Real Time PCR استفاده شد. همچنین از *18srRNA* به عنوان ژن کنترل داخلی (Reference gene) استفاده گردید. مشخصات توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است.

نانودراپ (2000C ساخت شرکت Thermo 2000C آمریکا) و کیفیت RNA کل استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی شد (شکل ۱). DNA ژنومی احتمالی در نمونه‌های RNA، با استفاده از آنزیم دی‌اکسی ریبونوکلاز I (DNase I) محصول شرکت فرمنتاز طبق دستورالعمل کیت حذف شد. برای سنتز cDNA از کیت (601-602) *Hyper Script* شرکت *GeneAll* مطابق با دستورالعمل و با استفاده از آغازگرهای ساقه-حلقه انجام شد. ساخت cDNA در دستگاه PCR با برنامه دمایی 16°C به مدت ۳۰ دقیقه و 60°C مرحله شامل 30°C به مدت ۳۰ ثانیه، 42°C به مدت ۳۰ ثانیه، 50°C به مدت ۱۰ ثانیه و در نهایت 85°C به مدت ۵ دقیقه انجام گردید (*Chen et al.*, 2005).

جدول ۲- توالی آغازگرهای ساقه-حلقه برای ساخت cDNA و آغازگرهای مورد استفاده در Real Time PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر (5' → 3')	منبع
MIR159 Stem-Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGAGC	<i>Chen et al.</i> 2005
MIR160 Stem-Loop	GTCGTATCCAGTGTGCAGGGTCCGAGTATTCGCACTGGATACGACTGGCAT	<i>Chen et al.</i> 2005
MIR398 Stem-Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGGGG	<i>Wang et al.</i> 2014
Q-MIR 159-F	TTTGGATTGAAGGGGAGCTCTG	<i>Chen et al.</i> 2005
Q-MIR 160-F	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	<i>Chen et al.</i> 2005
Q-MIR 398-F	TATAGCTGTGTTCTCAGGTCG	<i>Wang et al.</i> 2014
Q-Universal-R	CAGTGCAGGGTCCGAGGT	<i>Chen et al.</i> 2005
Q-CSD-F	GGCACCCGAAGATGAAAT	<i>Wang et al.</i> 2014
Q-CSD-R	ATGGACGACAACAGCACG	<i>Wang et al.</i> 2014
Q-18srRNA-F	GGCCGCTCCTAGCCCTAATTG	Housekeeping
Q-18srRNA-R	TGACGACTCTAATTTCTTCAAAGTACG	Housekeeping

RAD (MiniOpticon) در چهار تکرار (دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی) انجام شد. اجزای مخلوط واکنش شامل (7.5 µl Master MixGreen 2X + 0.5 µl) forward/reverse primers (10 µM) + 5.5 µl ddH2O با Real-Time PCR (+ 1 µl cDNA) و چرخه حرارتی در دمای 94°C به مدت ۳ برنامه واسرشت‌سازی اولیه در دمای 94°C به مدت ۳

واکنش‌های Real Time PCR برای miRNAها و ژن هدف

پس از تعیین بهترین غلظت آغازگرها و cDNAها، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی با استفاده از کیت RealQ Plus 2X Master Mix Green (5000850-1250) در حجم ۱۵ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه Bio-

miRNAها و ژن هدف miR398 (CSD)، به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در جدول ۳ ارائه شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود، اختلاف معنی‌داری بین دو سطح تنش و عدم تنش، نوع گونه و اثر متقابل تنش × گونه در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) برای هر سه miRNA و ژن CSD وجود داشت که بیانگر متفاوت بودن پاسخ در بیان ژن‌های مورد مطالعه در گونه‌های مورد بررسی تحت تنش کم آبی می‌باشد. میانگین بیان miRNA159 در دو شرایط نرمال و تنش خشکی در شکل ۲-A نشان داده شده است. میزان بیان miRNA159 تحت تنش خشکی (۳/۸۸۵) نسبت به شرایط عدم تنش (۱/۱۰۹) بیش از سه برابر افزایش نشان داد.

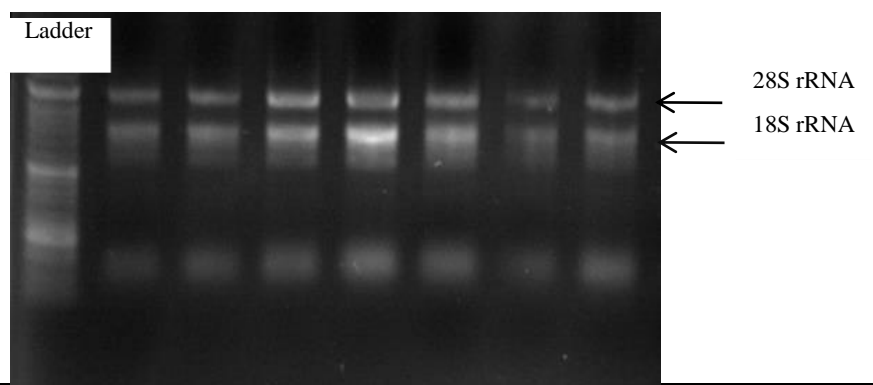
مقایسه میانگین اثر متقابل گونه × تنش از نظر الگوی بیان miRNA159 در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج بدست‌آمده سه گونه *T. durum*، *T. urartu* و *Ae. tauschii* بیشترین میزان افزایش بیان را تحت تنش خشکی نسبت به شرایط عدم تنش نشان دادند و احتمالاً در بیان miRNA159 از نظر پاسخ به ABA در تنش خشکی بیشترین کارایی را دارند. براساس نتایج این تحقیق، بیان نسبی miRNA159 در شرایط تنش در رقم شاهد مقاوم (سیروان) بالاتر از رقم حساس (دریا) بود.

دقیقه، ۴۰ مرحله شامل واسرشت‌سازی در دمای 94°C به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 58°C به مدت ۲۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت رسم منحنی ذوب از دمای 65°C تا 95°C انجام شد.

تجزیه آماری داده‌های حاصل از روش Real time PCR پس از اتمام آزمایش، مقادیر Ct (Cycle threshold) حاصل به محیط Excel انتقال داده شد و پس از مرتب‌سازی، داده‌ها بر اساس تغییرات بیان ژن خانه‌دار *18srRNA* (کنترل داخلی) نرمال شده و میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Pfaffel *et al.*, 2002) محاسبه گردید. پس از محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی، تجزیه واریانس به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین اثر متقابل گونه در تنش با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال مورد نظر توسط نرم‌افزار MSTAC انجام گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان بیان

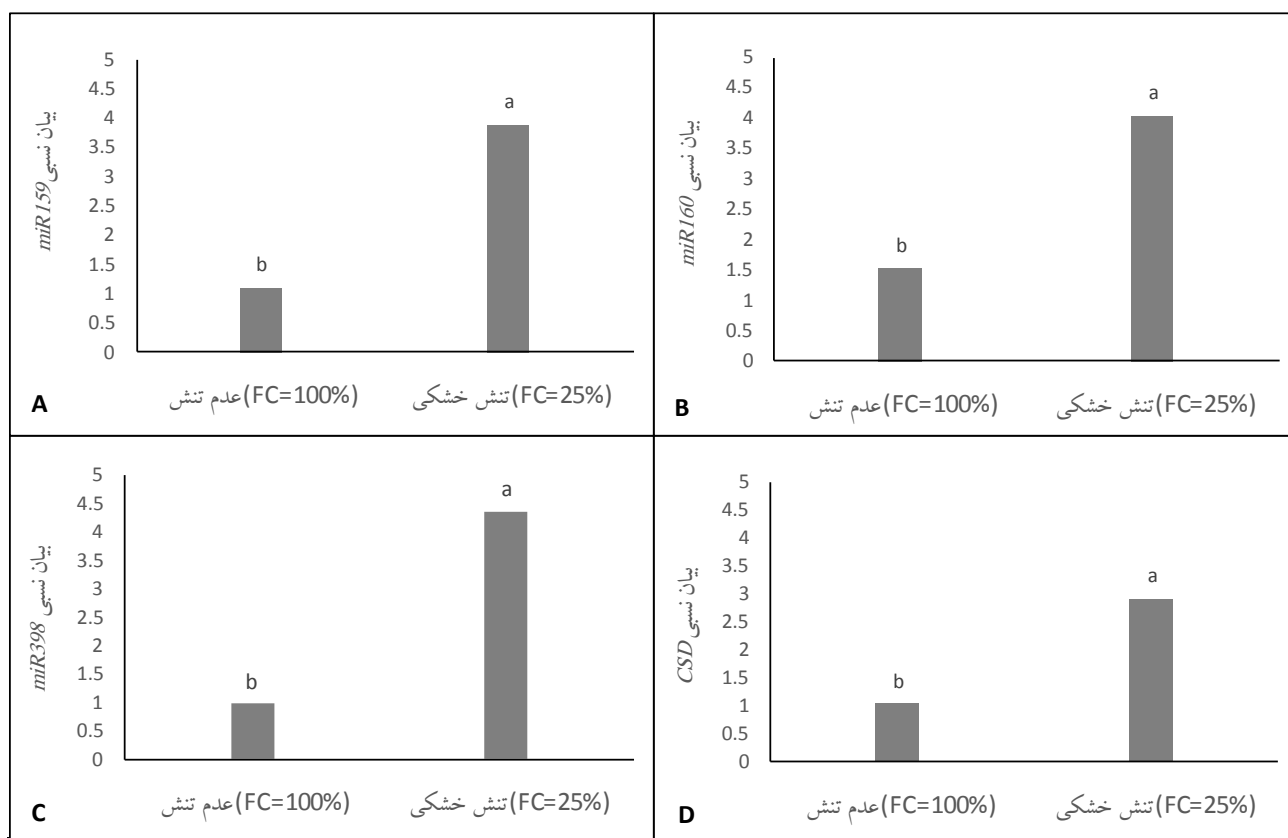


شکل ۱- کیفیت RNA کل استخراج شده گونه‌های زراعی و وحشی گندم روی ژل آگارز یک درصد

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان بیان miRNAها و ژن CSD مورد مطالعه در هشت گونه زراعی و وحشی گندم

CSD	میانگین مربعات (MS)			درجه آزادی (df)	منابع تغییرات (S.O.V)
	miRNA398	miRNA160	miRNA159		
۵۴/۳۸۷**	۱۸۳/۶۵۳**	۱۰۱/۷۹**	۱۲۳/۲۸**	۱	تنش خشکی
۱۱/۳۸۹**	۶۸/۵۰۶**	۴۳/۸**	۲۴/۹**	۷	گونه
۱۲/۴۴۹**	۵۹/۰۳۹**	۴۱/۷۲۷**	۳۰/۰۵**	۷	تنش × گونه
۰/۰۱۱	۰/۰۳۶	۰/۰۲۷	۰/۰۲۶	۴۸	خطای آزمایشی
۵/۴۵	۷/۱۹	۵/۸۹	۶/۴۹		ضریب تغییرات (%)

** معنی دار در سطح احتمال $P \leq 0.01$



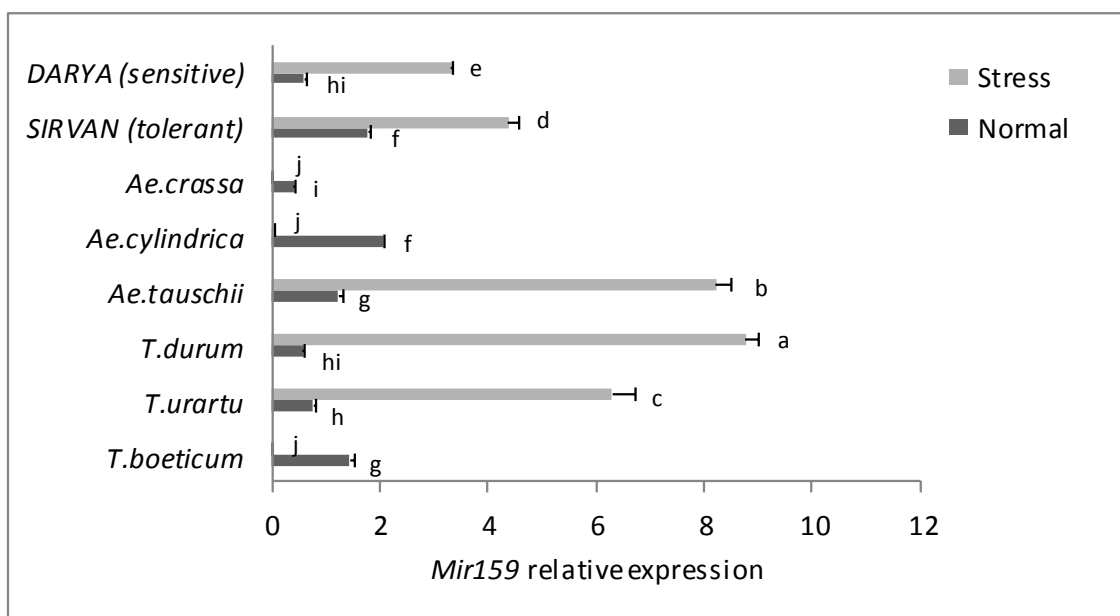
شکل ۲- میزان بیان نسبی miRNA398, miRNA160, miRNA159 و ژن CSD در شرایط عدم تنش (FC=100%) و تنش خشکی (FC=25%) در هشت گونه زراعی و وحشی گندم (میانگین‌های با حروف مشترک در بالای هر ستون، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند).

miRNA160 تحت تنش خشکی با مقدار ۴/۰۴ در مقایسه با شرایط عدم تنش (۱/۵) بیش از ۲/۵ برابر افزایش داشت

میزان بیان نسبی miRNA160 تحت تنش خشکی به طور معنی‌داری افزایش یافت، به طوری که میزان بیان

شرایط عدم تنش بدست آمد (شکل ۴). در هر دو رقم شاهد متحمل (سیروان) و حساس (دریا) افزایش بیان تحت تنش مشاهده شد که این افزایش در رقم متحمل به نسبت ۲/۳۱ برابر بالاتر بود.

(شکل ۲-B). در مقایسه میانگین اثر متقابل گونه و تنش، اختلاف معنی داری بین گونه‌ها ($P \leq 0.01$) از نظر الگوی بیان miRNA160 در پاسخ به تنش خشکی مشاهده شد. به نحوی که بیشترین میزان بیان در گونه‌های *T.durum* و *T.urartu* با افزایش ۱۱/۲۲ و ۷/۱۲ برابری نسبت به

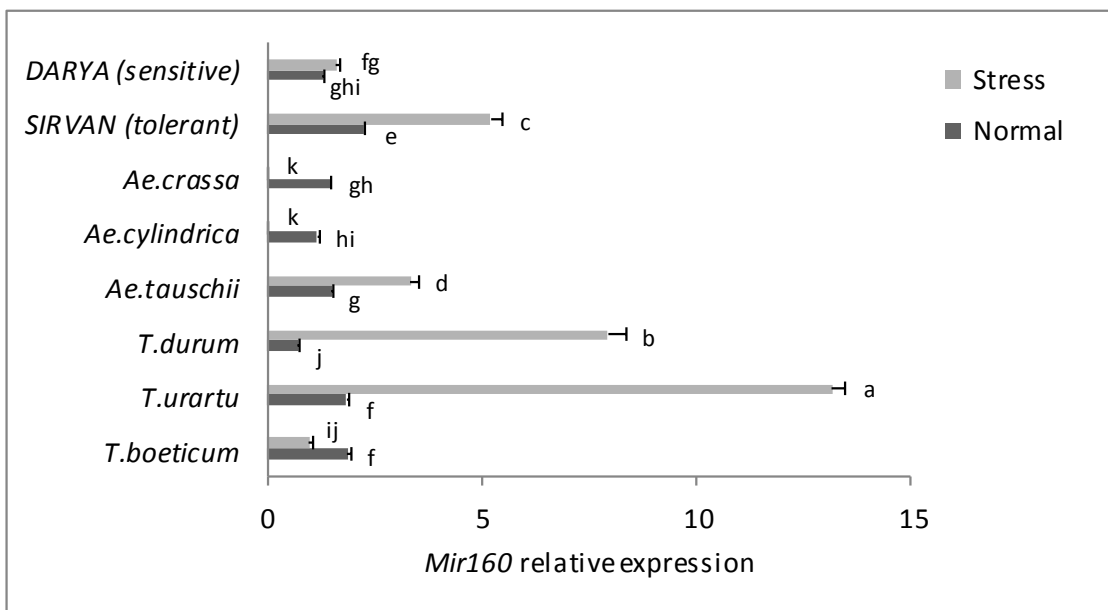


شکل ۳- مقایسه میانگین میزان بیان نسبی miRNA159 در اثر متقابل گونه × تنش در شرایط عدم تنش (FC=100%) و تنش خشکی (FC=25%) در هشت گونه زراعی و وحشی گندم (میانگین‌های با حروف مشترک در بالای هر ستون، تفاوت آماری معنی داری ندارند).

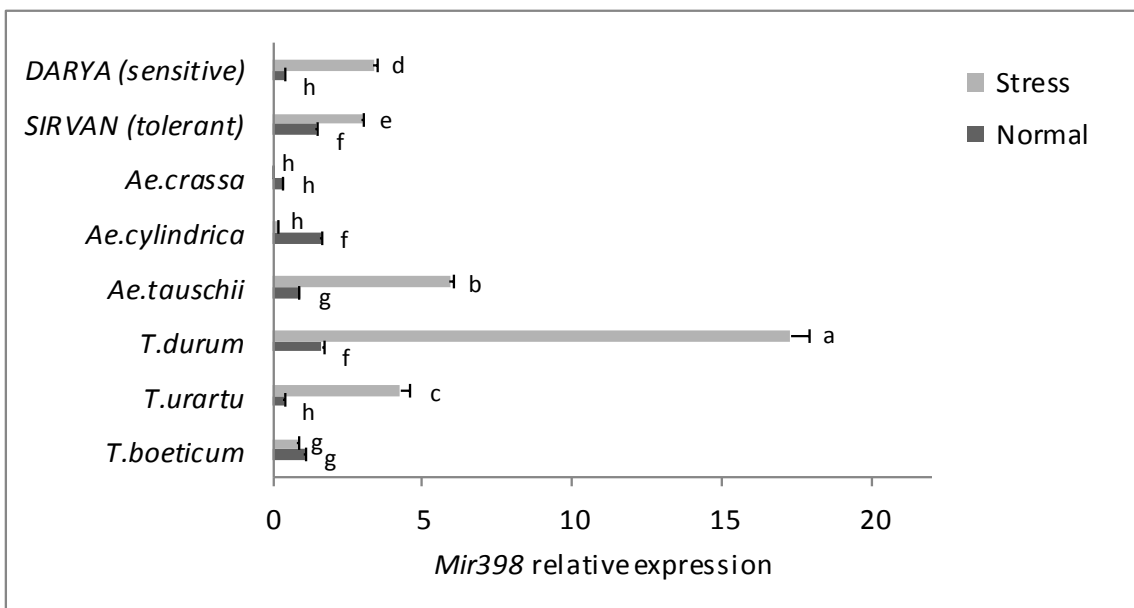
ثبت شد (شکل ۵).

مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در گونه در مورد بیان ژن CSD در شکل ۶ نشان داده شده است. به طوری که بیشترین میزان افزایش بیان ژن CSD در گونه‌های *T.urartu*، *T.durum* و *Ae.tauschii* به ترتیب با ۶/۶۲، ۶/۲۱ و ۶/۰۳۸ برابری نسبت به شرایط عدم تنش مشاهده شد. در رقم شاهد متحمل (سیروان) و حساس (دریا) میزان بیان ژن CSD در شرایط عدم تنش ۱/۸۱۳ و در شرایط تنش خشکی ۰/۲۹۴ بود که ۶/۱ برابر کاهش بیان نشان داد که همین مسئله می‌تواند یکی از دلایل حساسیت این رقم به تنش خشکی باشد (شکل ۶).

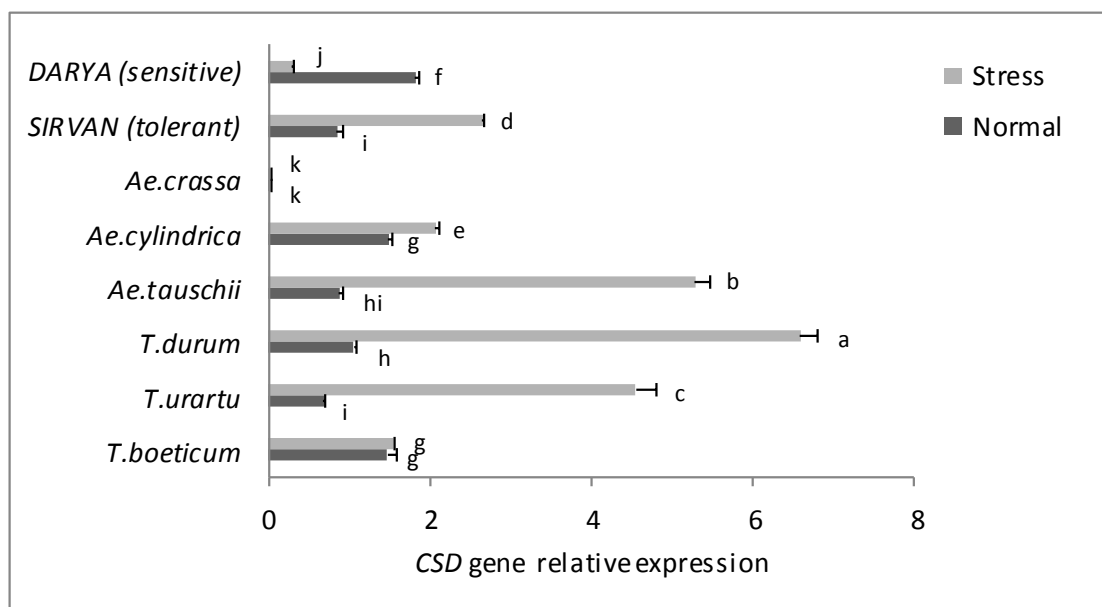
میزان بیان نسبی miRNA398 (شکل ۲-C) و ژن هدف آن (CSD) (شکل ۲-D) تحت تنش خشکی افزایش معنی داری نشان دادند، به طوری که میزان بیان نسبی miRNA398 و ژن هدف CSD در شرایط تنش خشکی به ترتیب ۴/۵ و ۲/۷۸ برابر نسبت به شرایط عدم تنش افزایش یافتند (شکل ۲-C و D). در مقایسه میانگین اثر متقابل گونه در تنش، در سه گونه *T.durum*، *T.urartu* و *Ae. tauschii* و دو رقم شاهد متحمل (سیروان) و حساس (دریا) افزایش بیان معنی داری برای miRNA398 تحت تنش خشکی مشاهده شد. در این مقایسه بیشترین درصد افزایش بیان در دو گونه *T.urartu* و *T.durum* به ترتیب با افزایش ۱۱/۹ و ۱۰/۵۵ برابری نسبت به شرایط عدم تنش



شکل ۴- مقایسه میانگین میزان بیان نسبی miRNA160 در اثرمتقابل گونه × تنش در شرایط عدم تنش (FC=100%) و تنش خشکی (FC=25%) در هشت گونه زراعی و وحشی گندم (میانگین‌های با حروف مشترک در بالای هر ستون، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند).



شکل ۵- مقایسه میانگین میزان بیان نسبی miRNA398 در اثرمتقابل گونه × تنش در شرایط عدم تنش (FC=100%) و تنش خشکی (FC=25%) در هشت گونه زراعی و وحشی گندم (میانگین‌های با حروف مشترک در بالای هر ستون، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند).



شکل ۶- مقایسه میانگین میزان بیان نسبی *CSD* در اثر متقابل گونه \times تنش در شرایط عدم تنش ($FC=100\%$) و تنش خشکی ($FC=25\%$) در هشت گونه زراعی و وحشی گندم (میانگین‌های با حروف مشترک در بالای هر ستون، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند).

بحث

افزایش بیان *miRNA159* و تنظیم منفی آن انجام گردد (Ismaili *et al.*, 2015). مطالعات پیشین نیز نشان داده است که *miR159* از طریق کنترل بیان فاکتور رونویسی خانواده *MYB*، در تنظیم مسیرهای انتقال پیام جیبرلین و آبسزیک اسید نقش دارد (Liu and Chen, 2009). همچنین گزارش شده است که با افزایش آبسزیک اسید، بیان *miRNA159* افزایش می‌یابد (Tuteja *et al.*, 2007). به طوری که نشان داده شده است که آبسزیک اسید از طریق اتصال عناصر پاسخ‌دهنده خود به ناحیه پروموتری ژن‌های *miRNA159*، میزان بیان این *miRNA* را تنظیم می‌کند (Phillips *et al.*, 2007). افزایش بیان *miR159* تحت تنش خشکی در گندم (Safarzadeh *et al.*, 2014; Akdogan *et al.*, 2015)، برنج (Zhou *et al.*, 2010)، آرابیدوپسیس (Reyes and Li, 2007)، تنباکو (Frazier *et al.*, 2011) و ذرت (Li *et al.*, 2013) گزارش شده است.

در این تحقیق افزایش $2/5$ برابری بیان *miRNA160* تحت تنش خشکی مشاهده گردید. *miRNA160* به مکان‌های حفاظت شده موجود در نواحی غیرترجمه شونده ژن

در این تحقیق میزان بیان نسبی *miRNA159* تحت تنش خشکی حدود $3/5$ برابر افزایش نشان داد. نقش *miRNA159* در سیگنال‌دهی هورمون‌های ABA (Abscisic acid) به اثبات رسیده است (Reyes and Chua, 2007). اهمیت ABA در پاسخ به تنش توسط نقش آن در بستن روزنه‌ها، نگهداری رشد ریشه و جلوگیری از رشد اندام هوایی است. نتایج به دست آمده از افزایش بیان *miRNA159* در این آزمایش در توافق با مطالعات پیشین می‌باشد (Sunkar *et al.*, 2012; Safarzadeh *et al.*, 2014). افزایش بیان *miRNA159* طی تنش خشکی رشد گیاه را به گونه‌ای تنظیم می‌کند تا انرژی گیاه در مسیر سازش با شرایط تنش مصرف شود. از آنجا که *miR159* در سیگنال‌دهی ABA نقش دارد، افزایش بیان آن طی شرایط تنش کاملاً منطقی است و یک سازوکار مقاومتی به شمار می‌رود. از سویی ژن *MYB* به عنوان ژن هدف *miRNA159* در رشد و نمو گیاه نقش دارد. بنابراین منطقی به نظر می‌رسد طی شرایط تنش بیان *MYB* کاسته شود و این فرایند توسط

میزان حساسیت گیاه را به آبسزیک اسید کاهش می‌دهد (Shukla et al., 2008; Liu et al., 2007). بنابراین همانطور که در این تحقیق نیز مشاهده شد، افزایش بیان miRNA160 به‌عنوان یکی از سازوکارهای ایجاد تحمل در تنش خشکی می‌تواند باشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده سه گونه *T. durum*، *T. urartu* و *Ae. tauschii* به‌ترتیب با بیشترین میزان بیان miRNA160 می‌توانند مقاومت بیشتری نسبت به تنش خشکی داشته باشند.

نتایج این تحقیق افزایش معنی‌دار در بیان miRNA398 و ژن هدف آن (*CSD*) را نشان داد. ژن هدف miRNA398 سوپراکسید دیسموتاز (*cu/zn SOD*) می‌باشد که در کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش دارد (Trindade et al., 2010). مطابق با نتایج ما، در تحقیقات بررسی تغییر بیان miRNAها در برابر تنش خشکی، افزایش بیان miRNA398 گزارش شده است (Trindade et al., 2010; Kantar et al., 2011). ترینداد و همکاران نیز وجود رابطه مستقیم میان تنظیم سوپراکسید دیسموتاز و پاسخ گیاه را به شرایط کم آبی مطرح کردند (Trindade et al., 2010). بنابراین به نظر می‌رسد که بالاتر بودن میزان بیان miRNA398 و ژن هدف آن موجب کاهش صدمات رادیکال‌های آزاد اکسیژن، کاهش پراکسیداسیون چربی و افزایش شاخص پایداری غشا و در نتیجه مقاومت در برابر کم‌آبی و تنش خشکی می‌شود (Aydin et al., 2014). در این مطالعه ژن هدف miRNA398 یعنی ژن *CSD* بالاترین افزایش بیان را به‌ترتیب در گونه‌های *T. durum*، *T. urartu* و *Ae. tauschii*، رقم شاهد مقاوم سیروان (*T. aestivum*) و *Ae. cylindrica* (شکل ۶). فابریکی اورنگ و مهرآباد (Fabriki-Ourang and Mehrabad, 2019) و فابریکی اورنگ و شهیدی (Fabriki-Purbenab, 2019) و فابریکی اورنگ و شهیدی (Fabriki-Ourang and Shahidi, 2019) گونه‌های مختلف تریتیوم و آزیلوپس این تحقیق را در سه سطح عدم تنش (FC=100%)، تنش متوسط (FC=50%) و تنش شدید (FC=25%) از نظر صفات مرتبط با تنش خشکی و نیز آزیل‌های مختلف آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه قرار دادند. در

های تولیدکننده اکسین متصل شده و بیان آنها را تنظیم می‌نماید (Rhoades et al., 2002). اکسین از طریق تأثیر بر سطح نسخه‌برداری ARFها، در بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاهی و تحمل به تنش ایفای نقش می‌کند. به‌عنوان مثال، اکسین از طریق نمو و معماری ریشه، در تحمل گیاه به تنش‌های خشکی، غرقاب و شوری نقش دارد (Kohli et al., 2013). افزایش بیان miRNA160 در رقم متحمل، باعث تنظیم اثر متقابل مسیرهای انتقال پیام اکسین و اسید آبسزیک و بیان ژن‌های پاسخگو به تنش (Liu and Chen, 2009) و احتمالاً کمک به تحمل تنش خشکی در رقم متحمل نسبت به رقم حساس می‌شود (Safarzadeh et al., 2014).

نتایج این تحقیق در ارتباط با افزایش بیان miRNA160 در پاسخ به تنش خشکی با مطالعات پیشین مطابقت دارد. به‌طوری‌که افزایش بیان miRNA160 در تنش خشکی در گندم گزارش شده است (Akdogan et al., 2015). همچنین افزایش بیان miRNA160 در لوبیا چشم‌بلبلی (Barrera-Figueroa et al., 2011)، رقم متحمل به خشکی نخود (*Vigna unguiculata*) (Barrera-Figueroa, 2011) و برنج (*Oryza sativa*) (Barrera-Figueroa, 2012) تحت تنش خشکی گزارش شده است. علاوه بر این افزایش بیان miRNA160 تحت تنش شوری (Lu et al., 2011)، تنش گرما (Xin et al., 2010) و تنش سرما (Tang et al., 2012) در گندم گزارش شده است. miRNA160 از طریق کنترل بیان *ARF10*، *ARF16* و *ARF17* در تنظیم مسیرهای انتقال پیام اکسین و آبسزیک اسید نقش دارد (Liu and Chen, 2009). گزارش شده است که افزایش بیان miRNA160 در رقم متحمل، باعث تنظیم اثر متقابل مسیرهای انتقال پیام اکسین و آبسزیک اسید (Liu et al., 2007; Liu and Chen, 2009; Shukla et al., 2008) و بیان ژن‌های پاسخگو به تنش (Liu and Chen, 2009) و احتمالاً کمک به تحمل تنش در رقم متحمل نسبت به رقم حساس به خشکی می‌شود. از سویی در رقم متحمل افزایش بیان miRNA160 بر کاهش بیان *ARF10* تأثیر گذاشته و

واریت‌های متحمل نخود، پنبه و گوجه‌فرنگی در مقایسه با واریته‌های حساس، می‌تواند دلیلی برای نقش مهم این آنزیم برای مقابله با تنش شوری باشد (Li and huilan, 2012).

محققان مطالعات زیادی را به منظور شناسایی فاکتورهای نسخه‌برداری در شرایط تنش خشکی که چندین ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند، انجام داده‌اند. این فاکتورهای نسخه‌برداری بعضی مستقل از ABA مانند NAC و DREB و بعضی دیگر وابسته به ABA شامل MYBها می‌باشند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). اخیراً محققان به دنبال استفاده از RNAهای کوچک تنظیم‌کننده یعنی miRNAها هستند که تعداد بسیار زیادی از ژن‌ها و فاکتورهای نسخه‌برداری را کنترل می‌کنند. بنابراین با توجه به این قابلیت مهم تنظیم‌کنندگی، miRNAها در حال حاضر یکی مهمترین ابزارهای ایجاد تحمل به تنش خشکی محسوب می‌شوند. شناسایی miRNAهای دخیل در پاسخ به تنش خشکی و ژن‌های هدف آنها اولین مرحله در انتخاب ابزار برای ایجاد تحمل به تنش‌های محیطی با استفاده از روش‌های کنترل بیان ژن می‌باشد. اطلاعات حاصل از این پژوهش زمینه مطالعات آینده را در رابطه با نقش دقیق و تعامل این miRNAها با انتقال پیام هورمون‌های گیاهی از طریق فاکتورهای رونویسی فراهم کرده و با مطالعات تکمیلی در این زمینه می‌توان از این miRNAها به منظور دست‌ورزی ژن‌هایی که در افزایش تحمل به تنش خشکی نقش دارند، استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان از زحمات و مساعدت‌های دکتر علی‌اشرف مهرابی (دانشیار دانشگاه ایلام) و دکتر علیرضا پورابوقداره برای در اختیار قرار دادن بذرها و گونه‌های جمع‌آوری شده برای این آزمایش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

این راستا و در توافق با نتایج حاصل از افزایش بیان ژن CSD در گونه‌های انتخاب شده این تحقیق، سه گونه اورنگ و مهرآباد (Fabriki-Ourang and Mehrabad) *T. durum*، *Ae. tauschii* و *T. urartu* در گزارش فابریکی اورنگ و مهرآباد (Purbenab, 2019) و رقم مقاوم سیروان (*T. aestivum*) و در گزارش فابریکی اورنگ و شهیدی (Fabriki-Ourang and Shahidi, 2019) بیشترین افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) تحت تنش خشکی را نشان داده‌اند. از این رو تطابق و همسویی افزایش بیان ژن CSD در گونه‌های انتخاب شده این تحقیق با افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) گزارش‌های قبلی مؤلفان (Fabriki-Ourang and Mehrabad Purbenab, 2019; Fabriki-Ourang and Shahidi, 2019) تأیید می‌گردد. همچنین نتایج این تحقیق با نتایج گزارش شده توسط کانتار و همکاران بر روی *T. dicoccoide* در شرایط تنش خشکی مطابقت دارد (Kantar et al., 2011). در مطالعه‌ای دیگر که روی یونجه سربریده (*Medicago truncatula*) تحت تنش خشکی انجام شد افزایش میزان بیان miRNA398 و ژن هدف آن را گزارش کرده‌اند (Trindade et al., 2010).

عوامل تنش‌زای محیطی مانند خشکی، شوری و سرما فاکتورهای مهمی در متابولیسم گیاه و تولید می‌باشند (Mittler and Blumwald, 2010; Filiz and Tombuloglu, 2015; Kebeish et al., 2015). تولید گونه‌هایی از اکسیژن واکنش‌گر (Reactive oxygen species: ROS) از جمله پاسخ‌های عمومی در تنش‌های زنده و غیرزنده می‌باشند (Filiz and Tombuloglu, 2015). این عوامل در کلروپلاست، میتوکندری، غشا پلاسمایی، آپوپلاست، شبکه آندوپلاسمی، پروکسی‌زوم و دیواره سلولی تولید می‌شوند (Sharma et al., 2012). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از بزرگ‌ترین آنزیم‌های شکننده این عوامل مخرب در گیاه می‌باشند. آنزیم SOD، سوپراکسید (O_2^-) را به مولکول اکسیژن و H_2O_2 کاتالیز می‌نماید (Qu et al., 2010). افزایش بیشتر سوپراکسید دیسموتاز در

- distribution of superoxide dismutase (SOD) gene families in *Sorghum bicolor*. Turkish Journal of Biology, 39: 49- 59.
- Frazier, T., Sun, G., Burklew, C. and Zhang, B., 2011. Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. Molecular Biotechnology, 49:159-165.
 - Gubler, F., Chandler, P.M., White, R.G., Llewellyn, D.J. and Jacobsen, J.V., 2002. Gibberellin signaling in barley aleurone cells Control of SLN1 and GAMYB expression. Plant Physiology, 129: 191-200.
 - Hagen, G. and Guilfoyle, T., 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Molecular Biology, 49: 373-385.
 - Ismaili, F., Shiran, B., Mirakhorli, N., Fallahi, H., 2015. Investigation of miR159 and miR171 expression pattern under drought stress in peaches, almonds and GN. Modern Genetics, 10: 416-407.
 - Jagadeeswaran, G., Saini, A. and Sunkar, R., 2009. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis. Planta, 229: 1009-1014.
 - Jones-Rhoades, M.W. And Bartel, D.P., 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Molecular Cell, 14: 787-799.
 - Kantar, M., Lucas, S.J. and Budak, H., 2011. MiRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. Planta, 233: 471-484.
 - Kebeish, R., Hanan, E. and El-Bialy, N., 2015. Effects of gamma radiation on growth, oxidative stress, antioxidant system, and alliin producing gene transcripts in *Allium sativum*. International Journal of Research Studies in Bioscience, 3:161-174.
 - Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P. and Kumar, PP., 2013. The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. Plant cell reports, 1-13.
 - Lee, H., Yoo, S.J., Lee, J., Kim, W., Yoo, S.K., Fitzgerald, H., Carrington, J.C. and Ahn, J.H., 2010. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in Arabidopsis. Nucleic Acids Research, 38: 3081-3093.
 - Li, J.S., Fu, F.L., An, M., Zhou, S.F., She, Y.H. and Li, W.C., 2013. Differential expression of microRNAs in response to drought stress in maize. Journal of Integrative Agriculture, 12:1414-1422.
 - Li, L. and Huilan. Y., 2012. Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant enzyme activity in Arabidopsis plants. Plant Physiology and Biochemistry, 58:46-53.
 - Liu, Q. and Chen, Y.Q., 2009. Insights into the
- ### منابع مورد استفاده
- Akdogan, G., Tufekci, E.D., Uranbey, S. and Unver, T., 2015. miRNA-based drought regulation in wheat. Functional & integrative Genomics, 16: 221-233.
 - Aydın, S., Buyuk, I. and Aras, E.S., 2014. Expression of SOD gene and evaluating its role in stress tolerance in NaCl and PEG stressed *Lycopersicon esculentum*. Turkish Journal of Botany, 38: 89-98.
 - Barrera-Figueroa, B.E. and Gao, L., 2012. High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress regulated microRNAs in the inflorescences of rice. BMC Plant Biology, 12: 132-137.
 - Barrera-Figueroa, B.E., Gao, L., Diop, N.N., Wu, Z.G., Ehlers, J.D., Roberts, P.A., Close, T.J., Zhu, J.K. and Liu, R., 2011. Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. BMC Plant Biology. 11: 127-135.
 - Bartel, D.P. and Chen, C.Z., 2004. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. Nature Reviews Genetics. 5: 396-400.
 - Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., Lao, K.Q., Livak, K.J. and Guegler, K.J., 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Research, 33: 179-186.
 - Chen, R., Ni, Z., Nie, X., Qin, Y., Dong, G. and Sun, Q., 2005. Isolation and characterization of genes encoding MYB transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Science, 169: 1146-1154.
 - Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L., 2010. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. Plant, Cell & Environment, 33(4): 481-489.
 - Dugas, D.V. and Bartel, B. 2008. Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. Plant Molecular Biology, 67:403-417.
 - Fabriki-Ourang, S. and Mehrabad Purbenab S., 2019. Evaluation of variations in physiological and biochemical traits in ancestral and evolutionary species of wheat under water deficit stress. Environmental Stresses in Crop Sciences, 11(4): 791-802.
 - Fabriki-Ourang, S. and Shahidi B., 2019. Evaluation of genetic diversity effects on morpho-physiological and antioxidant responses in different species of *Aegilops* under drought stress. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 26(2): 254-267.
 - Filiz, E. and Tombuloglu, H., 2015. Genome-wide

- Shukla, L.I., Chinnusamy, V. and Sunkar, R., 2008. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(11): 743-748.
- Sunkar, R. Li, Y.F. and Jagadeeswaran, G., 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 17:196-203.
- Sunkar, R., 2010. MicroRNAs with macro effects on plant stress responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21: 805-811.
- Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J.K., 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by down-regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18: 2051-2065.
- Tang, Z., Zhang, L., Xu, C., Yuan, S., Zhang, F., Zheng, Y. and Zhao, C., 2012. Uncovering small RNA-mediated responses to cold stress in a wheat thermo-sensitive genic male-sterile line by deep sequencing. *Plant Physiology*, 159(2): 721-738.
- Trindade, I., Capitaio, C., Dalmay, T., Feveiro, M. and Santos, D., 2010. MiR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*, 231:705-716.
- Tuteja, N., 2007. Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 2: 135-138.
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi, S.K. and Shinozaki, K., 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Science Direct*, 17: 113-122.
- Wang, B., Sun, Y., Song, N., Wei, J.P., Wang, X.J., Feng, H. and Yin, Z.Y., 2014. MicroRNAs involving in cold, wounding and salt stresses in *Triticum aestivum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 90-96.
- Xin, M., Wang, Y., Yao, Y., Xie, C., Peng, H., Ni, Z. and Sun, Q., 2010. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 10: 123-129.
- Yu, X., Wang, H., Lu, Y., De-Ruiter, M., Carriaso, M., Prins, M.V., Tunen, A. and He, Y., 2012. Identification of conserved and novel microRNAs those are responsive to heat stress in *Brassica rapa*. *Journal of Experimental Botany*, 63: 1025-1038.
- Zhou, L.G., Liu, Y.H., Liu, Z.C., Kong, D.Y., Duan, M. and Luo, L.J., 2010. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 61: 4157-4168.
- mechanism of plant development: interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384: 1-5.
- Lu, S.F., Sun, Y.H. and Chiang, V.L., 2008. Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *Plant Journal*, 55:131-151.
- Lu, W., Li, J., Liu, F., Gu, J., Guo, C., Xu, L., Zhang, H. and Xiao, K., 2011. Expression pattern of wheat miRNAs under salinity stress and prediction of salt inducible miRNAs targets. *Frontiers of Agriculture in China*, 1-10.
- Mallory, A.C., Bartel, D.P. and 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 Online*, 17: 1360-1375.
- Mittler, R. and Blumwald, E., 2010. Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annu. Rev. Plant Biology*, 61: 443-462.
- Phillips, J.R., Dalmay, T. and Bartels, D., 2007. The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Letters*, 581(19): 3592-3597.
- Qu, C.P., Xu, Z.R., Liu, G.J., Liu, C., Li, Y., Wei, Z.G. and Liu, G.F., 2010. Differential expression of copper-zinc superoxide dismutase gene of *Polygonum sibiricum* leaves, stems, and underground stems, subjected to high salt stress. *International Journal of Molecular Science*, 11: 5234-5245.
- Reyes, J.L. and Chua, N.H., 2007. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two *MYB* factors during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal*, 49:592-606.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. and Bartel, D.P., 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110: 513-520.
- Safarzadeh, M., Fototo, R., Azimi, M.R., Mohseni Fard, A. and Bakhshi, B., 2014. Investigation of expression of miRNAs controlling transcription factors associated with signaling of auxin, gibberellin and abscisic acid under drought stress conditions in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology of Crop Plants*, 6: 21-33.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessaraki M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 21: 70-76.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2): 221-227.

The Study of microRNAs expression pattern involved in drought stress tolerance in ancestors and wild-domestic relatives of wheat

B. Shahidi¹, J. Ahmadi², S. Fabriki-Ourang^{3*}

1- M.Sc. Student of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

2- Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

3*- Corresponding author, Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Email: s.ourang910@gmail.com, ourang@eng.ikiu.ac.ir

Received: 18.10.2018

Accepted: 28.01.2019

Abstract

MicroRNAs are small non-coding molecules that regulate the expression of genes through mRNA digestion and/or translation inhibition. By accurately regulation the expression of the genes, these molecules allow the plant to respond appropriately to the changes in growth stages or environmental conditions. In this study, the miRNA159, miRNA160, miRNA398, and the miRNA398 targeted gene (*CSD*) were investigated in six species belonging to the *Triticum* and *Aegilops* species, along with the susceptible (DARYA) and tolerant (SIRVAN) check cultivars under drought (FC=25%) and non-stress (FC = 100%) conditions using real-time PCR. The qRT-PCR analysis showed that all three miRNAs had a significant ($P \leq 0.01$) increase in expression under drought stress. The highest expression of miRNA159, miRNA160, miRNA398, and *CSD* gene was observed in the species *Ae. tauschii*, *T. urartu*, *T. durum*, and *T. durum*, respectively. By the mean comparing of species \times stress interaction, the highest expressions were observed in the three species *T. durum*, *T. urartu* and *Ae. tauschii* for all three miRNAs under drought stress. Also, the highest increase in *CSD* expression under drought stress was observed in *T. urartu*, *T. durum* and *Ae. tauschii* equal to 6.62, 6.21 and 0.63 fold in compared to the non-stress condition, respectively. It was concluded that the species *T. urartu*, *T. durum* and *Ae. tauschii* due to their superiority in terms of containing miRNAs causer tolerance, could be suitable candidates for bread wheat germplasm enrichment and breeding to drought stress tolerance.

Keywords: Drought Stress, MiRNA, Real-time PCR, Wild Wheat.