



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>  
Journal of Plant Biological Sciences  
E-ISSN: 3041-9603  
Vol. 15, Issue, No. 2, Summer 2023  
Document Type: Research Paper  
Received: 12/12/2023 Accepted: 11/05/2024

## Studying the expression of some candidate MicroRNAs in *Petunia* under drought stress

Sakineh Moshtaghi<sup>1</sup>, Nasrin Moshtaghi<sup>1\*</sup> , Hasan Marashi<sup>1</sup> and Ahmad sharifi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

<sup>2</sup> Department of Horticultural Plants Biotechnology, Iranian Academic for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Province, Mashhad, Iran

### Abstract

Small non-coding RNAs known as microRNAs are essential for responding to biotic and abiotic stresses. A few microRNAs that exhibited varied expressions in the face of drought stress are miR393, miR159, miR169, and miR319. This study examined how these four microRNAs helped petunia deal with drought stress. A 50% drought stress was applied to the petunia plants in the 4 to 6-leave stage, and RNA was isolated from both stressed and control plants. The expression level of microRNAs was examined using the qRT-PCR method under two conditions: control and stress. The data obtained indicated that the expression level of miR319 remained unchanged, while miR393 showed a decrease in expression, and miR169 and miR159 showed increases of 4 and 6.5-fold, respectively.

**Keywords:** Catalase enzyme, Drought stress, microRNA, *Petunia hybrid*, qRT-PCR.

### Introduction

The world is getting warmer, there is less rainfall, and other factors have changed the weather, making it riskier for plants to grow and thrive. It is anticipated that drought will become a more pressing issue in the ensuing decades. Drought is a significant issue that impacts the physiological, biochemical, and molecular processes of plants. In addition to negatively affecting stomatal motions, nutrient absorption, and the synthesis of photosynthetic chemicals, this stress negatively impacts the plant's metabolism and ultimately results in a drop in yield. Like other plant activities, a plant's reaction to stress depends on the proper control of gene expression, which is accomplished by a variety of processes. The alteration of gene expression by post-transcriptional regulation at various developmental stages is one of the most significant of them. Sometimes the activity of short RNAs or microRNAs changes the expression of a gene. These small RNAs play a crucial role in the body's reaction to biotic and abiotic stresses. Certain miRNAs are overexpressed or reduced in response to

\* Corresponding Author: moshtaghi@um.ac.ir



environmental stresses to help plants deal with the stress. Among the microRNAs that exhibited varied expressions under drought stress are miR393, miR159, miR169, and miR319. *Petunia hybrida*, the scientific name for this plant, belongs to the Solanaceae family, which is commonly utilized to create greenery in urban areas. Because drought stress is one of the most significant abiotic stresses and green space is essential to human existence, this study intends to explore the function of microRNAs 159, 319, 169, and 393 in response to drought stress in petunia.

### Materials and methods

An Iranian cultivar of *petunia hybrida* was employed in this experiment. Three generations of the same seeds were self-pollinated. After being sanitized in a 1.5% sodium hypochlorite solution, the petunia plant's seeds were cleaned with sterile distilled water. The seeds were cultured on a culture tray with cleaned peat moss following disinfection. It was moved to the culture chamber, which had a temperature of 25 °C, 16 h of light, and 8 h of darkness. The plant grew to the stage of 4-6 leaves about 4-6 weeks after planting. Based on the Field Capacity (FC), a 50% stress treatment was applied during this stage for 48 h. To extract total RNA, leaf tissue samples from the stressed plant and the control plant were collected independently. For both the control and stressed samples, total RNA extraction was carried out using the RiboEx RNA extraction solution according to the manufacturer's instructions. The methods of Varkoni et al. (2007) and Chen et al. (2005) were used to develop primers. Following primer design, cDNA was produced using Addbio's reverse transcription enzyme and stem-loop PCR. Then, using BioRad equipment, the real-time SYBER Green PCR method was used to examine the expression level of microRNAs under 50% drought stress and in two standard circumstances. Using the CYP gene as an internal control gene and the specific primers for each microRNA, the PCR reaction was carried out using the prepared cDNAs as templates. Using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, the quantitative expression values of genes were determined. Catalase enzyme activity was also tested. Analysis of variance was performed using JMP statistical software version 8 and the mean of treatments was compared using LSD test at the level of 5%.

### Results and discussion

After extracting the RNA from two samples under both stress and control, an agarose gel and spectrophotometry tests revealed that the isolated RNA was of good quality. Consequently, it was evident that the two bands, which corresponded to the 28s and 18s ribosomal RNA, were sharp. Additionally, the extracted samples' absorption numbers at the 280/260 wavelength ranged from 1.85-2, demonstrating the high quality of the extracted RNAs. The isolated RNAs were converted into cDNA. PCR was used to confirm the synthesized cDNAs. Next, they underwent qRT-PCR analysis using primers that were specifically created for them. According to the study's findings, the expression level of microRNA 319 is 50% lower during drought stress than it is under normal condition, essentially remaining the same. Reduced expression of microRNA 393 was observed during drought stress. On the other hand, when the petunia plant is stressed by drought, the expression levels of microRNAs 169 and 159 have increased. Following a 48 h 50% drought stress treatment, the petunia plant had a nearly 4-fold rise in microRNA 169 expression and a 6.5-fold increase in microRNA 159 expression. The obtained data indicated that, of the four microRNAs discussed, miR159 has the highest level of expression, compared to the control state. These findings support the critical and

significant role of miR159 in the petunia plant during drought stress.

**Conclusion**

This study's findings demonstrated that elevating microRNA159 expression in petunia plants improves the plant's resistance to drought stress. The impact that this miR has on the MYB101 and MYB33 proteins is what causes this elevated tolerance. MYBs involved in cell division, morphological regulation, disease resistance, stress response, and the secondary biosynthesis pathway. They most likely fulfill their function in response to stresses including cold, salinity, and drought by altering the hormones auxin and abscisic acid.

## بررسی الگوی بیانی برخی MicroRNA های کاندید در اطلسی تحت تأثیر تنش خشکی

سکینه مشتاقی<sup>۱</sup>، نسرين مشتاقی<sup>۲\*</sup> ، سيد حسن مرعشی<sup>۳</sup> و احمد شریفی<sup>۴</sup>

<sup>۱،۲،۳</sup> گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۴</sup> گروه بیوتکنولوژی گیاهان باغی، جهاد دانشگاهی واحد مشهد، مشهد، ایران

### چکیده

microRNA ها RNA های کوچک غیر کدکننده ای هستند که نقش مهمی در پاسخ به تنش های زیستی و غیر زیستی دارند. گیاهان در مواجهه با تنش های محیطی، به صورت افزایش و یا کاهش بیان microRNA ها با این تنش ها مقابله می کنند. از جمله microRNA هایی که تحت تأثیر تنش خشکی بیان متغیری از خود نشان دادند می توان به microRNA 393، microRNA 159، microRNA 169 و microRNA 319 اشاره کرد. در این پژوهش نقش این ۴ microRNA در مقابله با تنش خشکی در گیاه اطلسی (*Petunia Hybrida*) بررسی شد. ابتدا گیاه اطلسی در مرحله ۴ تا ۶ برگگی تحت تأثیر تنش خشکی ۵۰٪ قرار داده شد و RNA از گیاه تحت تنش و گیاه شاهد استخراج شد. سنتز cDNA با آغازگرهای stem-loop انجام شد. با qRT-PCR میزان بیان microRNA ها در دو حالت تحت تنش و شاهد بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان دادند در طی تنش خشکی ۵۰ درصد، میزان بیان microRNA ۳۱۹ تغییری نداشته است، اما کاهش بیان در microRNA ۳۹۳ مشاهده شد و افزایش بیان ۴ و ۶.۵ برابری به ترتیب در microRNA ۱۶۹ و microRNA ۱۵۹ مشاهده شد. بیشترین میزان بیان در شرایط تنش نسبت به شاهد در microRNA 159 مشاهده شد که این امر نشان دهنده نقش حیاتی این microRNA در شرایط تنش خشکی در گیاه اطلسی است. همچنین جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی کاتالاز در شرایط تنش خشکی در برگ های گیاه اطلسی از نمونه برگ تازه اطلسی در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH=۷ استفاده شد که این نتایج نشان دهنده روند افزایشی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ های گیاه اطلسی تحت تأثیر تنش خشکی است.

**واژه های کلیدی:** تنش خشکی، microRNA، qRT-PCR، آنزیم کاتالاز، اطلسی.

## مقدمه

با توجه به تغییرات شرایط آب و هوایی، گرم شدن زمین و کاهش بارندگی‌ها، شرایط برای رشد و توسعه گیاهان دشوار شده است. تنش خشکی می‌تواند بر بقا، رشد و توسعه گیاه تأثیر بسزایی داشته باشد که نتیجه آن کاهش در کیفیت، عملکرد و تولید زیست توده گیاهی است (Mittler, 2006; Wang et al., 2003). خشکی مسئله‌ای مهم است که بر روند فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان تأثیر می‌گذارد و پیش‌بینی می‌شود در دهه‌های آینده به مشکل بزرگتری تبدیل شود. این تنش تأثیر زیان‌باری بر روند متابولیسم گیاه دارد و بر حرکات روزنه، جذب مواد مغذی و تولید ترکیبات فتوسنتزی اثر منفی گذاشته و در نهایت سبب کاهش محصول می‌شود (Neumann, 2008; Shinozaki et al., 2003; Jaleel et al., 2009). گیاهان در مواجهه با تنش‌ها مانند سایر فعالیت‌های گیاه، نیازمند تنظیم صحیح بیان ژن‌ها است و این فرآیند با سازوکارهای مختلفی تنظیم می‌شود. یکی از مهمترین آنها، تغییر بیان ژن‌ها با تنظیم پس از رونویسی در مراحل مختلف نمو است (Fernandez, 2014; Mathur et al., 2014; Suzuki et al., 2014; Zhu, 2002). همچنین تغییر بیان ژن‌ها با فعالیت RNA های کوچک یا همان microRNA ها انجام می‌شود. miRNA ها، RNA های کوچک غیر کدکننده هستند که به‌عنوان مهمترین تنظیم‌کننده بیان ژن‌های کدکننده پروتئین مطرح هستند. miRNA ها برای اولین بار در سال ۱۹۹۳ در نماتد *Caenorhabditis elegans* کشف شدند (Lee, 1993). این RNA های کوچک، اجزای مهمی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی هستند (Khraiwesh, 2012). تنش‌های

محیطی منجر به کاهش بیان یا بیش بیان برخی از miRNA ها برای مقابله با تنش در گیاهان می‌شوند. از جمله microRNA هایی که تحت تأثیر تنش خشکی بیان متغیری را نشان داده‌اند می‌توان به miR393, miR159, miR169 و miR319 اشاره کرد (Liu et al., 2008; Reyes et al., Abe et al., 2003; Liu et al., 2007; Sunkar et al., 2004; miR393 نقش کلیدی در تنظیم ژن‌های F-box تحت تأثیر شرایط تنش خشکی در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله در *Arabidopsis* (یونجه) (*Medicago thaliana*)، برنج (*Oryza sativa*)، یونجه (*Saccharum officinarum*) دارد (Ferreira et al., 2012). miR393 تحت تأثیر تنش خشکی در اکثر گونه‌های گیاهی بیش بیان می‌شود و به سایر تنش‌ها مانند شوری، درجه حرارت پائین و سمیت آلومینیوم نیز واکنش نشان می‌دهد (Sunkar & Zhu, 2004; Trindade et al., 2010; Arenas-Huerta et al., 2009; Liu et al., 2008; Zhao et al., 2007). miR159 و miR319 توالی‌های بسیار مشابهی دارند، اما ژن‌های متفاوتی را در موجودات زنده تنظیم می‌کنند. اغلب آن‌ها را در یک گروه دسته‌بندی می‌کنند و یا برخی آنان را به‌صورت جداگانه قرار می‌دهند. در حال حاضر هر دو مورد پذیرفته شده است (Meyers et al., 2008). ژن‌های هدف miRNA ها اصولاً فاکتورهای رونویسی هستند. ژن هدف miR319 خانواده TCP و ژن هدف miR159 MYB101 و MYB33 و ژن هدف miR393 خانواده TIR1 و ژن هدف miR169 خانواده NFYA هستند (Liu et al., 2008; Reyes et al., 2004; Sunkar & Zh., 2007).

با توجه به اهمیت تنش خشکی به عنوان یکی از مهمترین تنش های غیر زیستی و همچنین با توجه به نقش فضای سبز و اهمیت آن در زندگی بشر، این پژوهش برای بررسی نقش میکرو RNA های ۱۵۹، ۳۱۹، ۱۶۹ و ۳۹۳ در پاسخ به تنش خشکی در گیاه اطلسی است.

## مواد و روش ها

### مواد گیاهی

در این آزمایش از بذور اطلسی (*Petunia hybrida*) رقم ایرانی استفاده شد. در پژوهش حاضر، لازم است از بذور خالص استفاده شود، برای همین بذرها تا ۳ نسل خود گشن شدند و سپس از بذور ۳ نسل خود گشن شده جهت ادامه پژوهش استفاده شد. بذور گیاه اطلسی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم، ضد عفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شد. بذور پس از ضد عفونی در سینی کشت حاوی پیت ماس شسته شده کشت داده شد. سپس سینی کشت به اتاق کشت با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۴۰ کیلو لوکس منتقل شد. پس از جوانه زدن بذرها، به صورت روز در میان از کود ۲۰:۲۰:۲۰ جهت رشد بهتر استفاده شد. حدود ۶-۴ هفته پس از کشت، رشد گیاه به مرحله ۴ تا ۶ برگگی رسید. در این مرحله تیمار تنش ۵۰ درصد بر اساس ظرفیت زراعی مزرعه (FC) به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. از بافت برگ گیاه تحت تنش و گیاه شاهد به صورت مجزا برای استخراج RNA کل، نمونه برداری انجام شد.

پروتئین های MYB در واقع کلاس متنوعی از پروتئین های متصل شونده به DNA هستند که در تنظیم رونویسی ژن های گیاهی مسئول پاسخ به تنش های محیطی شامل سرما، شوری و خشکی نقش دارند. از ویژگی های این خانواده داشتن دومین حفاظت شده اتصال به DNA یعنی دومین MYB است (Du et al., 2009; Gantet, 2002). این دومین دارای ساختار Helix-Turn-Helix بوده و در شیار بزرگ DNA قرار می گیرد. ژن هدف miR393 خانواده TIR1 است که بعنوان گیرنده ی اکسین عمل می کند و نقش تنظیمی مثبتی در مسیر پیام رسانی اکسین دارند (Ferreira et al., 2012) و در پاسخ به تنش هایی مانند خشکی بیان می شود. خانواده NFYA رمز کننده زیر واحد فاکتور رونویسی Y(NF-Y) در هسته است. پروتئین (NF-Y) فاکتور رونویسی ویژه ای است و نقش کلیدی در پاسخ به تنش های محیطی و نمو گیاه دارد (Liu et al., 2008).

گیاه اطلسی با نام علمی *Petunia hybrida* از خانواده سولاناسه است که در فضای سبز شهری کاربرد زیادی دارد (Ghahraman, 1994). این گیاه نسبتاً دارای رشد سریع با ساقه های منشعب به بلندی و گستردگی ۳۰ سانتی متر است و به صورت گیاه یکساله نگهداری می شود. اطلسی از گیاهان بومی آمریکای جنوبی است و نوع بومی آن در ایران هر چند با گلبرگ کمتر، اما با عطر بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. گل اطلسی، شیپوری شکل و مخملی است که به صورت کم پر یا پر پر و بیشتر به رنگ های سفید، قرمز، بنفش، و یا دو رنگ دیده می شود (Ghasemi, 2010).

نوکلئوتیدی هستند که شناسایی آن‌ها با آغازگرهای معمولی امکان پذیر نیست. برای شناسایی آن‌ها از ساختاری بنام ساقه-حلقه (stem-loop) استفاده شد. بر همین اساس آغازگرها با روش Chen و همکاران (۲۰۰۵) و Varkonyi-Gasic و همکاران (۲۰۰۷) طراحی شدند (جدول ۱). ویژگی این آغازگرها مربوط به شش نوکلئوتید آخر واقع در انتهای ۳' توالی است. این شش نوکلئوتید مکمل وارون توالی انتهایی سر ۳' miRNA ها هستند. به غیر از این شش نوکلئوتید اختصاصی بقیه توالی، توالی عمومی هستند که برای همه miRNA ها یکسان است. جهت بررسی و صحت بیان RNA ها از ژن کنترل داخلی CYP استفاده شد. آغازگرها، توسط شرکت سیناژن سنتز شدند (جدول ۱).

## استخراج RNA کل و تعیین کیفیت و کمیت RNA

استخراج RNA کل با محلول استخراج RNA، RiboEx از شرکت GeneAll برای هر دو نمونه شاهد و تحت تنش بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. سپس بررسی کمیّت و کیفیت RNA استخراجی با الکتروفورز (ژل ۱/۵ درصد) و دستگاه نانو دراپ شرکت BIORAD انجام شد. پس از تأیید کیفیت و کمیّت RNA استخراج شده و مشاهده باندهای RNA ریپوزومی 28S و 18S و همچنین باندهای مربوط به RNA با وزن مولکولی کم، ویال‌ها به فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  منتقل شدند.

## طراحی آغازگرها

miRNA ها توالی‌های کوتاه ۲۴-۲۰

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 1- Sequence of primers used in this research

	توالی
miR 159	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
miR159-RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC TAGAGC
miR159 Forward primer	CGGCCGTTTGGATTGAAGGGA
miR 169	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA
miR169-RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC TCGGCA
miR169 Forward primer	CCGGGCCAGCCAAGGATGACT
miR 319	UUGGACUGAAGGGAGCUCCU
miR319-RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC AGGGAG
miR319 Forward primer	CCGGCG TTGGACTGAAGGGAG
miR 393	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUCC
miR393-RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC GGATCA
miR393 Forward primer	GCGCGC TCCAAAGGGATCGCAT
Reverse primer	GTGCAGGGTCCGAGGT
CYP Forward	AGGCTCATCATTCCACCGTG
CYP Reverse	TCATCTGCGAACTTAGCACCG

$\text{H}_2\text{O}$ ) است تهیه شد. میکروتیوب در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شده و سپس بلافاصله به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. در این فاصله MixII که شامل (۱۰ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر آنزیم، ۱ میکرولیتر RNA با غلظت ۵۰۰ نانوگرم) است آماده و به

پس از طراحی آغازگرها، از روش PCR ساقه-حلقه و آنزیم رونوشت برداری معکوس ساخت شرکت Addbio، جهت سنتز cDNA استفاده شد. در این روش در میکروتیوب شماره ۱، MixI را که شامل (۱ میکرولیتر از dNTP به همراه ۱ میکرولیتر آغازگر RT، ۰.۲ میکرولیتر آغازگر CYP R و

محاسبه شدند. مقایسه بین دو نمونه شاهد و تحت تنش با نرم افزار jmp بررسی شد و بدین صورت مقایسه بین میزان بیان کمی هر microRNA با سایر microRNA ها، تحت تنش خشکی و استاندارد و ژن کنترل با معنی داری در سطح ۱٪ انجام شد.

### استخراج آنزیم آنتی اکسیدانی - کاتالاز

در شرایط تنش در داخل گیاه، رادیکال های آزاد اکسیژن تولید می شوند. این رادیکال ها برای سلول های گیاهی خطرناک هستند، در نتیجه گیاه به دنبال فعال کردن سیستم های دفاعی برای حذف این رادیکال ها هستند. از جمله این سیستم های دفاعی، تولید آنتی اکسیدان هایی مانند کاتالاز است. این آنتی اکسیدان در شرایط تنش خشکی، در پاسخ بیوشیمیایی گیاه فعال می شود (Yang et al., 2014).

جهت استخراج آنزیم کاتالاز، ۵۰ میلی گرم از نمونه برگ تازه و ۵۰ میلی گرم از نمونه ریشه تازه به طور مجزا در ازت مایع پودر شدند. سپس یک میلی لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH=7 حاوی EDTA یک میلی مولار به نمونه ها اضافه شد. سپس نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه توسط سانتریفیوژ یخچال دار با سرعت ۱۲۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند و فرآیند جداسازی انجام شد. مایع شفاف داخل میکروتیوپ ها که حاوی عصاره آنزیمی بود برای سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد (Sairam et al., 2002).

### سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

برای تعیین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز موجود در عصاره آنزیمی از روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. بدین ترتیب ۰/۱ میلی لیتر

MixI اضافه شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. جهت ساخت cDNA برنامه حرارتی ۱۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در یک سیکل، ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه در ۶۰ چرخه و ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. cDNA های سنتز شده جهت بررسی میزان بیان microRNA ها با روش qRT-PCR استفاده شدند.

### بررسی میزان بیان microRNA ها با روش qRT-PCR

در این روش جهت بررسی میزان بیان microRNA ها در دو حالت استاندارد و تحت تنش خشکی ۵۰٪ از روش Real time SYBER Green PCR با دستگاه BioRad استفاده شد. cDNA های ساخته شده به عنوان الگو استفاده شدند و واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی هر microRNA و ژن SYB به عنوان ژن کنترل داخلی انجام شد. برای هر واکنش ۳ تکرار تکنیکی و ۲ تکرار زیستی در نظر گرفته شد. واکنش qRT-PCR برای هر واکنش شامل: ۲ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت، ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل فاقد RNase و ۱۰ میکرولیتر مستر ریل تایم شرکت Amplicon است که در حجم ۲۰ میکرولیتر در چاهک های پلیت مخصوص دستگاه لود شدند. واکنش زنجیره ای پلی مرز با شرایط یک تکرار به مدت ۳۰ دقیقه با دمای ۱۶ درجه سانتی گراد، ۳۵ تکرار با چرخه های ۳۰ ثانیه با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه با دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، ۱۰ ثانیه با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انجام شد. مقادیر بیان کمی ژن ها با روش  $\Delta\Delta-CT$

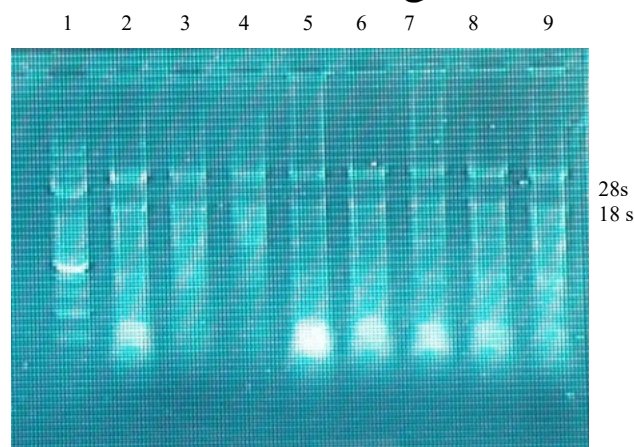


پس از بررسی بر روی ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری مطلوب بود. به طوری که ۲ بانده مربوط به rRNA ریوزومی 28s و 18s به خوبی قابل رویت بود و نشان از سالم بودن RNA داشت. همچنین اعداد جذب نمونه های استخراج شده در طول موج ۲۶۰//۲۸۰ برابر با ۱/۹۴ بود که عددی بین ۲ - ۱/۸۵ است و بالا بودن کیفیت مناسب و مطلوب RNA های استخراجی را نشان داد (شکل شماره ۱). از RNA های استخراجی طبق روش گفته شده، سنتز cdNA صورت گرفت. cdNA های سنتز شده با PCR معمولی تأیید شد. سپس با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، مورد آنالیز qRT-PCR قرار شدند. شکل شماره ۲ نتایج بدست آمده از این واکنش را نشان می دهد.

عصاره آنزیمی به ۲۰ میکرولیتر  $H_2O_2$  افزوده و سپس حجم محلول با محلول ۱۰ میلی مولار فسفات پتاسیم با  $pH=7$  به ۲ میلی لیتر رسانده شد. واکنش آنزیم کاتالاز با افزودن عصاره آنزیمی به مخلوط بالا آغاز شد. سپس جذب ترکیب حاصل در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه هر ۳۰ ثانیه یک بار، با دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. هر یک واحد فعالیت آنزیم کاتالاز برابر با تغییر ۰/۰۱ در جذب نمونه ها در یک دقیقه است. سپس میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برحسب میزان آنزیم موردنیاز برای تجزیه یک میکرومول سوسترای پراکسید هیدروژن در یک دقیقه محاسبه شد.

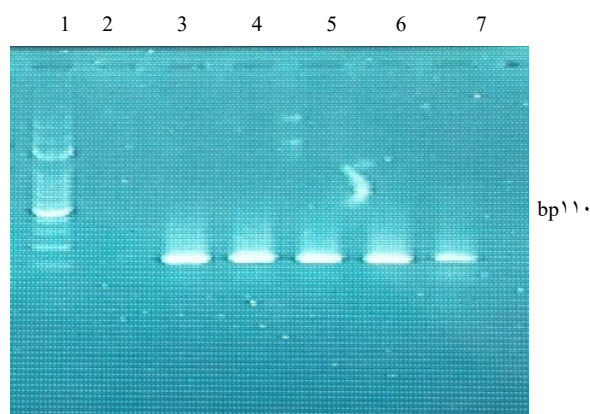
### نتایج و بحث

استخراج RNA های دو نمونه تحت تأثیر تنش و شاهد انجام شد و کیفیت RNA ی استخراج شده



شکل ۱- نتایج استخراج RNA. چاهک ۱، ladder، چاهک ۲ تا ۹ نمونه های استخراج RNA

Figure 1- RNA extraction results. 1, ladder 2 to 9 RNA extraction samples

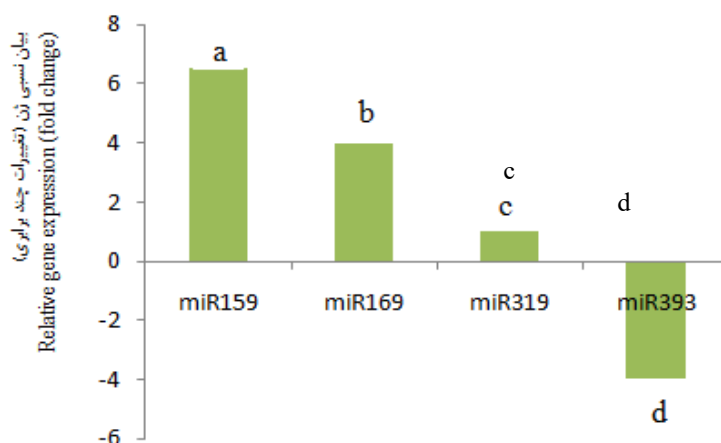


شکل ۲- نتایج سنتز cDNA، چاهک ۱ Ladder، چاهک ۳ تا ۷ نتایج سنتز cDNA

Figure 2- cDNA synthesis results, ladder 1, 3 to 7 cDNA synthesis results

روند افزایشی داشتند. گیاه اطلسی پس از ۴۸ ساعت تیمار تنش خشکی ۵۰٪ افزایش تقریباً ۴ برابری در میزان بیان microRNA169 و افزایش ۶/۵ برابری در میزان بیان microRNA159 از خود نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده در بین ۴ microRNA مطرح شده، miR159 بیشترین میزان بیان را نسبت به حالت کنترل نشان داد که این نتایج نشانگر عملکرد حیاتی و بالای miR159 در گیاه اطلسی در شرایط تنش خشکی است (شکل شماره ۳).

نتایج با تغییرات نورفلورسنت و به صورت منحنی در هر سیکل تکثیری قابل مشاهده است. به طوری که هرچه میزان تکثیر بیشتر باشد، به همان اندازه میزان نور فلورسنت ساطع شده نیز بیشتر خواهد شد. نتایج پژوهش نشان داد میزان بیان ۳۱۹ microRNA تحت تأثیر شرایط تنش خشکی ۵۰٪ نسبت به شرایط نرمال تقریباً بدون تغییر است. microRNA ۳۹۳ تحت تنش خشکی کاهش بیان را نشان داد، اما میزان بیان microRNA های ۱۶۹ و ۱۵۹ در برگ های گیاه اطلسی تحت تنش خشکی



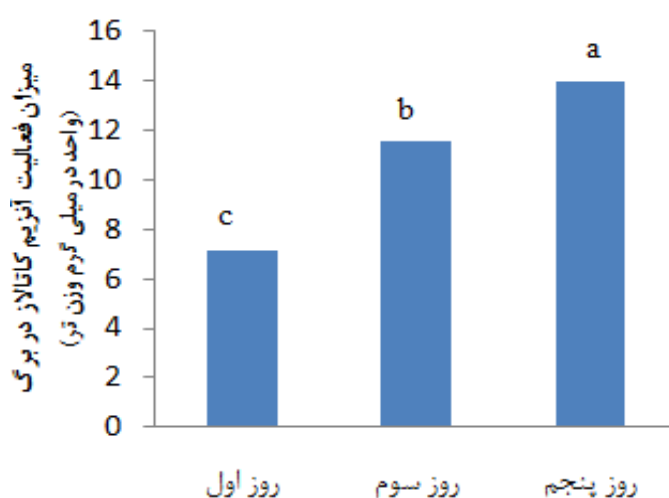
شکل ۳- مقایسه میزان بیان MicroRNA ها

Figure 3- Comparison of MicroRNA expression levels

## تأثیر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

بررسی تغییرات آنزیم کاتالاز در طول اعمال تنش خشکی نشان داد با افزایش میزان تنش، فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت. به طوری که بیشترین میزان بیان را در روز پنجم بعد از اعمال تنش خشکی از خود نشان داد (شکل شماره ۴). پژوهش‌های

انجام شده نشان دادند فعالیت آنزیم کاتالاز در زمان تنش خشکی در گیاهان مختلف افزایش می‌یابد (Khodabin et al., 2020; Kazerani et al., 2019). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز سبب افزایش مقاومت گیاه در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و به عبارتی به افزایش سیستم دفاعی گیاه منجر می‌شود (Hafez et al., 2012).



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاه تحت تنش خشکی ۵۰٪ ظرفیت زراعی. اعداد با حروف مشترک دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD نیست.

Figure 4- The amount of catalase enzyme activity in plant leaves under drought stress of 50 % of field capacity. Numbers with same letters do not have a significant difference at the 5% level using the LSD test.

بیش از این در پژوهش‌های زیادی ارتباط مستقیم بین میکروRNAها و پاسخ به تنش‌های محیطی شناخته شده است. همان‌طور که گفته شد، یکی از راه‌های پاسخ گیاه به تنش، تنظیم بیان ژن‌هاست که این تنظیم بیان به کمک microRNAها انجام می‌شود. در طی این فرآیند در زمان تنش، microRNAها با تغییر در میزان بیان خود، میزان تولید پروتئین‌های هدف خود را نیز تنظیم می‌کنند و بدین‌گونه می‌توانند در گیاه مقاومت و یا حساسیت به تنش را ایجاد کنند.

در آراییدوپسیس در زمان تنش خشکی و تحت

تیمار ABA، میزان بیان miR169 کاهش یافته و در نتیجه سبب افزایش بیان فاکتور رونویسی NFYA5 شده که این فرآیند همراه با تغییر فنوتیپ در گیاه جهت مقاومت به تنش خشکی است (Ding et al., 2009). همچنین در آراییدوپسیس ترانسژن با افزایش بیان ژن NFYA5 مشاهده شده که میزان آب از دست رفته از برگ‌ها به نسبت کاهش یافته و تحمل به تنش خشکی بیشتر شده بود (Zhang et al., 2011). در نتیجه طبق یافته‌ها در گیاه آراییدوپسیس در هر دو حالت، بیش‌بیانی miR169 و یا سرکوب nfya5 افزایش حساسیت به تنش

نشان داده است (Esmaili et al., 2015). در پژوهش‌های قبل به افزایش بیان miR159 تحت تنش خشکی در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس (Liu et al., 2008) و ذرت (Wei et al., 2009) اشاره شده است. در بعضی پژوهش‌ها، کاهش بیان miR159 در گیاهانی از جمله توتون (Xie et al., 2015) و سیب زمینی (Yang et al., 2014) تحت تنش خشکی گزارش شده است. در پژوهشی تحت تنش خشکی افزایش بیان miR159 در برگ‌های گیاه جو و یولاف و کاهش بیان miR159 در ریشه گیاه مطرح شده است (Zou et al., 2023; Hackenberg et al., 2015). در پژوهش حاضر، هدف این بود تا بعضی از miRNA هایی که در گیاهان دیگر به عنوان miR های مقاوم به خشکی مطرح هستند بررسی شوند، تا miR های که در گیاه اطلسی تحت تنش نقش بیشتری دارد، شناسایی شود. بیان ۶.۵ برابری miR159 تحت تنش ۵۰٪ نسبت به نمونه کنترل، مهر تأییدی بر نقش مهم این miR در تنش خشکی است. نقش این miR در مواجهه با تنش خشکی به علت تأثیر آن بر پروتئین های MYB101 و MYB33 است. خانواده ژنی MYB به عنوان ابر خانواده ژنی شناخته شده‌اند که یکی از بزرگترین فاکتورهای رونویسی در گیاهان هستند و دارای تنوع بالایی از نظر عملکرد و ساختمان هستند (Du et al., 2009). MYB ها در مسیر بیوسنتزی ثانویه، کنترل ریخت شناسی، تقسیم سلولی، مقاومت به بیماری ها و پاسخ به تنش ها نقش دارند. در پاسخ به تنش هایی مانند خشکی، شوری و سرما احتمالاً با تغییر هورمون اکسین و اسیدآبسیزیک نقش خود را ایفا می کنند (Jianga, 2004; Paz-Ares, 1987). miR159 در سیگنال دهی هورمون-

خشکی و از دست رفتن بیشتر آب مشاهده شد (Liu et al., 2008). در گیاه یونجه تحت تنش خشکی کاهش بیان miR169 مشاهده شد که حاصل آن ایجاد تحمل در گیاه یونجه است. افزایش بیان miR169 به انسداد رشد و نمو گره ها در گیاه منجر شده است که این افزایش بیان سبب می شود سطح mRNA ژن MtHAP، که در تمایز سلول های گره نقش دارد، کاهش یابد (Combiere et al., 2006). در گوجه فرنگی ترانسژن با افزایش بیان miR169 و تأثیر بر فعالیت ژن های موثر بر باز و بسته شدن روزنه ها، تحمل به تنش خشکی افزایش داشت (Zhang et al., 2011). در خیار بوته ای نیز تحت تنش خشکی بیش بیان miR169 مشاهده شد که بر خلاف آرابیدوپسیس سبب افزایش تحمل به تنش خشکی شده است. در آرابیدوپسیس در تنش خشکی کاهش بیان miR169 و افزایش بیان NFYA5 و تحمل به تنش خشکی مشاهده شده است، اما در خیار بوته ای تحت تنش خشکی، افزایش بیان miR169 و کاهش بیان NFYA5 ساقه و ریشه دیده شد که تحمل به تنش خشکی ایجاد می شود. تحت تنش خشکی کاهش بیان miR169 در آرابیدوپسیس، *P. persica* و *P. virgatum* و یونجه مشاهده شد (Liu et al., 2008). از سوی دیگر، miR169 در برنج، سویا و گوجه فرنگی تحت تنش خشکی بیشتر بیان می شود (Zhou et al., 2010). همچنین در میزان بیان miR159 تحت تنش خشکی در گیاه هلو تغییرات ناچیزی دیده شد، اما در گیاه بادام تحت شرایط تنش شدید خشکی کاهش بیان مشاهده شد. همچنین در هیبرید GN افزایش های ۸ و ۴ برابری به ترتیب در شرایط تنش ملایم و شدید از خود

شرایط تنش خشکی، در میزان بیان microRNA319 تغییری مشاهده نشد، اما میزان بیان microRNA159 و microRNA169 روند افزایشی و میزان بیان microRNA393 روند کاهشی نشان دادند که این نتایج نشان دهنده اهمیت بیشتر microRNA159 و microRNA169 در جهت افزایش مقاومت گیاه به شرایط تنش در گیاه است.

## References

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *Arabidopsis AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15, 63–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.006130>
- Arenas-Huertero, C., Pérez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., Sanchez, F., Covarrubias, A. & Reyes, J. (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molecular Biology*, 70, 385-401. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-009-9480-3>
- Reyes, J. L. (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response stress. *Plant Molecular Biology*, 70: 385–401. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9480-3>
- Combier, J-P., Billy, F., Boualem, A., Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., & Niebel, M. (2006). *MtHAP* is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development*. <https://doi: 10.1101/gad.402806>
- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X. F., Yang, W. J., Wu, Y. M., Huang, Y. B., & Tang, Y. X. (2009) Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family. *Biochemistry* (Moscow). 74, 1-11. <https://doi.org/10.1134/S000629790901>
- Reyes & Chua, (2007) های ABA نقش مهمی دارند (Reyes & Chua, 2007).
- ## نتیجه گیری
- گیاهان در مواجهه با تنش ها با تأثیر بر میزان بیان microRNA ها و نیز تأثیر بر بیان ژن های هدف می توانند واکنش های مقاومت و یا حساسیت نسبت به تنش را از خود نشان دهند. در این پژوهش تحت 0015
- Ding, Y. F., & Zhu, C. (2009) The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 386, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.137>
- Fernandez, J-E. (2014) Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase cropperformance. *Environmental and Experimental Botany*, 103, 158–179. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.12.003>
- Jaleel, C .A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R., & Panneerselvam R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11, 100–105 [in Persian].
- Jianga, C., Gua, J., Chopraa, S., Gua, X., & Peterson, T. (2004). Ordered origin of the typical three-Repeat Myb genes. *Gene*. 326, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.049>
- Hackenberg, M., Gustafson, P., Langridge, P., & Shi, B. J. (2015) Differential expression of micro RNAs and other small RNAs in barley between water and drought conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 13(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/pbi.12220>
- Hafez, Y. M., Bacso, R., Kiraly, Z., Kunstler, A., & Kiraly, L. (2012). Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suppresses necrotic disease symptoms.

- Biochemistry and Cell Biology*, 102, 848-856.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-12-0012-R>
- Gantet, P., & Memelink, J. (2002). Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, 563-569.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02098-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02098-9)
- Ghahraman, A. (1994). Plant Systematics. Volume III. Tehran. Press center of academic publishing. 306 [in Persian].
- Ghasemi, G. H., & Kafi, M. (2010). Scientific and practical floriculture. Esfahan Moalef Press [in Persian].
- Kazerani, B., Navabpour, S., Sabouri, H., Ramezanpour, S. S., Zaynali Nezhad, K., & Eskandari, A. (2019). Evaluation of proline content and enzymatic defense mechanism in response to drought stress in rice. *Plant Physiology*, 9(2), 2749-2757.  
<https://doi.org/10.30495/ijpp.2019.664580>
- Khodabin, G., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Rad, A. H. S., & Modarres-Sanavy, S. A. M. (2020). Effect of drought stress on certain morphological and physiological characteristics of a resistant and a sensitive canola cultivar. *Chemistry and Biodiversity*, 17(2), e1900399.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201900399>
- Khraiwesh, B., Jian-Kang, Z., & Jianhua, Z. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819, 137-148.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.05.001>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-4*. *Cell*, 75, 843-854.  
[https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(93\)90529-Y.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(93)90529-Y.pdf)
- Liu H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A., & Zheng, C. C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated MicroRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14, 836-843. <https://doi.org/10.1261/rna.895308>
- Liu, P. P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H., & Carrington, J. C. (2007). Repression of Auxin response factor 10 by MicroRNA160 is critical for seed germination and post germination stages. *The Plant Journal*, 52, 133-146.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03218> Mathur, S., Agrawal, D., & Jajoo, A. (2014). Photosynthesis response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 137, 116-126.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.010>
- Meyers, B. C., Axtell, M. J., Bartel, B., Bartel, D. P., Baulcombe, D., Bowman, J. L., Cao, X., Carrington, J. C., Chen, X., Green, P. J., Griffiths-Jones, S., Jacobsen, S. E., Mallory, A. C., Martienssen, R. A., Poethig R.S., Qi, Y., Vaucheret, H., Voinnet, O., Watanabe, Y., Weigel, D., & Zhu, J. K. (2008). Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 20, 3186-3190.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.108.064311>
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11, 15-19.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>
- Neumann, P. M. (2008). Coping mechanisms for crop plants in drought prone environments. *Annals of Botany*, 101, 901-907.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcn018>
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P., & Saedler, H. (1987). The regulatory *c1* locus of *Zeamays* oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *Embo Journal*, 3553-3558.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02684.x>
- Reyes, J. L., & Chua, N. H. (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Journal*, 49, 592-606.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02980.x>
- Sairam, R. K., Rao, K. V., & Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotypes to longer salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163, 1037-1046.

- [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00278-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00278-9)
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 410–417. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00092-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00092-X).
- Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2004). Novel and stress-regulated MicroRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 2001–2019. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022830>
- Trindade, I., Capito, C., Dalmay, T., Fevereiro, M., & Santos, D. M. (2010). miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta: An International Journal of Plant Biology; Heidelberg*, 231(3), 705–16. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1078-0>
- regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*, 231, 705–716. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1078-0>
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective roles of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Wei, L., Zhang, D., Xiang, F., & Zhang, Z. (2009). Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. *International Journal of Plant Science*, 170, 979–989. Xie, F., Wang, Q., Sun, R., & Zhang, B. (2015). Deep sequencing reveals important roles of MicroRNAs in response to drought and salinity stress in cotton. *Journal of Experimental Botany*, 66, 789–804. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru437>.
- Yang, J., Zhang, N., Mi, X., Wu, L., Ma, R., Zhu, X., Yao, L., & Jin, X. (2014). Identification of miR159s and their target genes and expression analysis under drought stress in potato. *Computational Biology Chemist*, 53, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2014.09.009>
- Zhang, X., Zou, Z., Gong, P., Zhang, J., Ziaf, K., Li, H., Xiao, F., & Ye, Z. (2011). Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnology Letters*, 33, 403–409. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0436-0>
- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., Ruan, K., & Jin, Y. (2007). Identification of drought-induced MicroRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 585–590. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.022>
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., & Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 61, 4157–4168. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq237>
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>
- Zou, C., Guo, Zh., Zhao, S. H., & Chen, J. (2023). Identification and prediction of functions for drought-responsive microRNAs in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Crop and Pasture Science*, 74(12), 1180–1192. <https://doi.org/10.1071/CP22359>