عناصر تنظیمی بالادست، ژن‌های هدف بالقوه و الگوی بیان سه miRNA پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در دو رقم انگور

اعظم مؤیدی‌نژاد[1]، بهروز محمدپرست[2,*]، قاسم حسینی سالکده[3]، احسان محسنی‌فرد[4] و محمدعلی نجاتیان[5]

١- دانشجوی دکتری، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر، ملایر

٢- استادیار، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر، ملایر

٣- استاد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

٤- استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

٥- دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، قزوین

(تاریخ دریافت: ١٣٩٧/١٢/١٩ – تاریخ پذیرش: ١٣٩٨/٠٤/٢٧)

چکیده

میکروRNAها (miRNAs) به‌عنوان گروهی از RNAهای کوچک غیرکدکننده نقش مهمی در تنظیم رشد، نمو و پاسخ گیاهان به تنش‌های مختلف ایفا می‌کنند. در این تحقیق بیان سه miRNA پاسخ‌دهنده به خشکی (miR160، miR159 و miR169) با استفاده از qRT-PCR در دو رقم انگور متحمل (یاقوتی) و حساس به خشکی (بیدانه‌سفید) تحت شرایط تنش خشکی مورد مقایسه قرار گرفت. به‌منظور شناسایی عناصر تنظیمی بالقوه در پروموتر miRNAهای مورد بررسی، توالی بالادست پیش ساز این miRNAها توسط پایگاه داده‌ای PlantCARE مورد آنالیز قرار گرفت. موتیف‌های مرتبط با خشکی مانند ABREها و MBSها در مناطق تنظیمی miRNAها شناسایی شدند. سه فاکتور رونویسی مرتبط با سیگنالینگ هورمون‌های گیاهی اسید آبسیزیک (ABA) و اکسین به‌عنوان مهم‌ترین ژن‌های هدف miRNAهای مورد بررسی، شناسایی شدند. الگوی بیان miRNAهای مورد بررسی بسته به نوع miRNA و نوع رقم، متفاوت بود، به‌طوری‌که بیان miRNA159 تحت تأثیر تنش در رقم بیدانه‌سفید بدون تغییر بود و در رقم یاقوتی افزایش یافت اما بیان miRNA160 و miRNA169 در دو رقم مورد بررسی به‌صورت معکوس تغییر یافت. پروفایل بیان وابسته به ژنوتیپ (رقم) نشان داد که پاسخ miRNAها به تنش خشکی در میان ژنوتیپ‌های خیلی نزدیک با حساسیت متفاوت به تنش نیز متفاوت است. به‌طورکلی با توجه به نقش ژن‌های هدف بالقوه miRNAهای مورد بررسی، به‌نظر می‌رسد که تغییر بیان miRNAهای ارزیابی‌شده درنهایت به تحمل بهتر تنش خشکی در رقم یاقوتی منجر می‌شود.

واژگان کلیدی: بیدانه‌سفید، خشکی، ژن هدف، عناصر تنظیمی، یاقوتی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **b.mohammadparast@malayeru.ac.ir**

مقدمه

انگور یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی است که از زمان‌های بسیار قدیم مورد استفاده بشر قرار گرفته است و ازنظر اقتصادی و تجاری دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای می‌باشد. ایران به‌علت برخورداری از شرایط جغرافیایی و اقلیمی مناسب، یکی از مهم‌ترین مناطق پرورش انگور در جهان محسوب می‌شود. بر اساس آمار سازمان بین‌المللی انگور (OIV)، کشور ما از نظر سطح زیر کشت در جایگاه یازدهم و از نظر میزان تولید انگور پس از کشورهای چین، ایتالیا، آمریکا، اسپانیا، فرانسه، ترکیه، هند، آرژانتین و شیلی در جایگاه دهم جهان قرار دارد (OIV, 2019). تغییرات حاصل از تنش خشکی تولیدات کشاورزی را در مناطق گسترده‌ای از جهان ازجمله ایران، با محدودیت روبرو می‌سازد (Hosseini *et al*., 2018). اگرچه درختان انگور به‌طورکلی مقاوم به خشکی هستند، اما کمبود بارندگی در فصل‌های بهار و تابستان مراحل مهم نموی این گیاه را با کمبود آب توأم با دمای بالا مصادف می‌سازد که در صورت عدم تأمین آب کافی از طریق آبیاری کمیت و کیفیت محصول کاهش می‌یابد. در سطح مولکولی، ژن‌های مختلف پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در گیاهان شناسایی و مشخص‌شده‌اند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). این ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش یا به‌طور مستقیم در حفاظت سلولی نقش دارند و یا فاکتورهای رونویسی (TF) هستند که بیان ژن‌های پایین‌دست را تنظیم می‌کنند. با کشف RNAهای کوچک، اهمیت تنظیم بیان ژن‌ها در سطح پس از رونویسی توسط میکروRNAها (miRNAs) در پاسخ به تنش خشکی مشخص شده و مورد توجه قرار گرفت (Carrington and Ambros, 2003). miRNAها گروهی از RNAهای کوچک تنظیمی غیرکدکننده با طولی بین ۲۴-۱۹ نوکلئوتید هستند که بیان ژن‌های هدف را در سطح پس از رونویسی تنظیم می‌کنند. علاوه‌بر نقش کلیدی این مولکول‌ها در فرآیندهای گوناگون سلولی مانند تکثیر سلولی، مرگ سلولی و تمایز سلولی، miRNAها نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های محیطی از طریق مشارکت در دریافت تنش، سیگنالینگ تنش و سازگاری به تنش ایفا می‌کنند (Jones-Rhoades *et al*., 2006). miRNAها از طریق تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی نقش مهمی در تحمل یا اجتناب از خشکی در گیاهان ایفا می‌کنند (Covarrubias and Reyes, 2010; Shuai *et al*., 2013). miRNAهایی که توسط تنش خشکی القا می‌شوند بیان mRNAهای هدف خود که ممکن است پروتئین‌های عملکردی منفی درگیر در پاسخ به تنش باشند را کاهش می‌دهند. در مقابل miRNAهای کاهش بیان‌یافته، منجربه تجمع mRNAهایی می‌شوند که در سازگاری با شرایط تنش مؤثرند. بیشتر این miRNAها ژن‌های کدکننده‌ی فاکتورهای رونویسی را مورد هدف قرار می‌دهند که همین امر miRNAها را در مرکز شبکه‌های تنظیمی ژن قرار می‌دهد (Ding *et al*., 2013). تغییر الگوی بیان بسیاری از miRNAهای مؤثر در رشد و نمو گیاهان در طی تنش نشان می‌دهد که استمرار رشد و نمو گیاه در این شرایط احتمالاً تحت تأثیر miRNAهای پاسخ‌دهنده به تنش است (Sunkar *et al*., 2012). miRNAهایی که در بهبود رشد و نمو گیاه نقش دارند، به‌صورت متفاوتی در طول واکنش به تنش‌های غیرزنده بیان می‌شوند (Kumar, 2014). تحت شرایط تنش محیطی، miRNAهای خاصی بیان شده و یا این‌که miRNAهای جدید جهت مقابله با تنش سنتز خواهند شد (Khraiwesh *et al*., 2012). بسیاری از miRNAها از طریق کنترل بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ به اسید آبسیزیک، پیام‌رسانی اکسین، محافظت اسمزی و مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به تنش خشکی دخالت دارند (Covarrubias and Reyes, 2010; Marin *et al*., 2010). در سال‌های اخیر با استفاده از تکنیک‌های توالی‌یابی با کارایی بالا (high-throughput sequencing) تعدادی از miRNAهای حفاظت‌شده و اختصاصی انگور شناسایی شده‌اند (Pantaleo *et al*., 2010; Wang *et al*., 2011, 2012). miRNAهای پاسخ‌دهنده به خشکی در

بسیاری از گونه‌های گیاهی شناسایی و گزارش شده‌اند (Ferdous *et al.*, 2015). با این‌وجود، هیچ مطالعه‌ای به‌طور خاص برای شناسایی miRNAهای پاسخ‌دهنده به خشکی در انگور گزارش نشده است. اگرچه درخت انگور (تاک) به‌طورکلی به‌عنوان یک گونه درختی مقاوم به خشکی قلمداد می‌شود، اما تحقیقات مختلف نشان داده است که ارقام مختلف این گونه سطوح متفاوتی از تحمل به خشکی را نشان می‌دهند. مطالعه و مقایسه ارقام و ژنوتیپ‌های گیاهی که در حساسیت به خشکی متفاوت هستند، رویکرد مناسبی برای کشف مکانیسم‌های طبیعی تحمل به خشکی است (Zheng *et al.*, 2010). با توجه به نقش بسیار مهم miRNAها در تنظیم بیان ژن‌ها در سطح پس از رونویسی، احتمالاً این مولکول‌ها در سازگاری ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف به تنش کم‌آبی نقش دارند. لذا شناسایی و مقایسه بیان چنین miRNAهایی می‌تواند نقش خاص آن‌ها را در شبکه‌های نظارتی تنظیم‌کننده سازگاری به تنش‌های محیطی مشخص سازد (Pagliarani *et al.*, 2017). به‌منظور شناسایی نقش miRNAها در تحمل به خشکی و مقایسه تغییرات بیان آن‌ها تحت تنش خشکی در دو رقم انگور، در این تحقیق بیان سه miRNA پاسخ‌دهنده به خشکی (miR160، miR159 و miR169)، در دو رقم انگور متحمل به خشکی (یاقوتی) و حساس به خشکی (بیدانه‌سفید) تحت شرایط تنش مورد مقایسه قرار گرفت. هر سه miRNA انتخابی ازجمله miRNAهای حفاظت‌شده هستند و ارتباط آن‌ها با تنش‌های محیطی در تحقیقات مختلف در سایر گیاهان مشخص شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تنش: نهال‌های ریشه‌دار دوساله یکنواخت ازنظر ژنتیکی از دو رقم انگور یاقوتی و بیدانه‌سفید در به گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ٢٦ و ارتفاع ٢٥ سانتی‌متر منتقل شدند. به هر گلدان ده کیلوگرم خاک با نسبت ٣:١:١ از ترکیب خاک، ماسه و کود پوسیده دامی اضافه شد. پس از انتقال نهال‌ها به گلدان‌ها و قبل از آغاز رشد بهاره، هرس دو جوانه بر روی هر نهال صورت گرفت. در طول دوره رشد تا آغاز آزمایش، آبیاری معمول (سه بار در هفته) و پنج بار محلول‌پاشی برگ‌ها با کود کامل (نیتروژن ٩ درصد، فسفر ٩ درصد، پتاسیم ٩ درصد، بور ٠/٠١ درصد، مس ٠/٠٠٢ درصد، روی ٠/٠٠٢ درصد، آهن ٠/٠٢ درصد، منگنز ٠/٠١درصد و مولیبدن ٠/٠٠١ درصد) بر روی نهال‌ها صورت گرفت. پس از شروع آزمایش رطوبت گلدان‌های شاهد هر رقم در حد ظرفیت مزرعه حفظ شد. برای این منظور قبل از شروع آزمایش، گلدان‌های شاهد هر رقم تا حد غرقاب آبیاری شدند و دو روز بعد یعنی پس از خروج آب ثقلی، این گلدان‌ها توزین و وزن هر یک ثبت شد. در طول دوره آزمایش نیز این گلدان‌ها روزانه توزین شدند و مقدار آب لازم برای رسیدن به حد رطوبت ظرفیت مزرعه به هر یک اضافه می‌شد. در نهال‌های تحت تنش، اعمال تنش به‌صورت قطع آبیاری برای یک دوره ١٨ روزه صورت گرفت. نمونه‌گیری برگی برای استخراج RNA از نهال‌های تنش دیده زمانی صورت گرفت که محتوای نسبی آب (RWC) برگ دو رقم به حدود ٧٥ درصد رسید. این شرایط در ارقام بیدانه‌سفید و یاقوتی به‌ترتیب یازده و پانزده روز پس از قطع آبیاری حاصل شد. نمونه‌های برگی در سه تکرار (هر تکرار معادل یک نهال) و از برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته هر تیمار (برگ‌های چهارم تا هفتم) تهیه شد. برگ‌ها بلافاصله به ازت مایع منتقل و تا زمان استخراج RNA در فریزر ٨٠- نگهداری شدند.

طراحی آغازگر برای miRNAها: توالی سه miRNA انتخابی از miRNAهای حفاظت‌شده گیاهی، شامل vvi-miR159c (از خانواده miR159)، vvi-miR160a,b (از خانواده miR160) و vvi-miR169v (از خانواده miR169) از پایگاه اطلاعاتی miRBase[1] گرفته شد. طراحی آغازگرهای ساقه–حلقه برای سنتز cDNA و آغازگرهای رفت اختصاصی هر miRNA برای تکثیر در qRT-PCR طبق روش چن و همکاران (Chen *et al.*, 2005a) و وارکونی–گاسیک و همکاران (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007) صورت گرفت.

1- http://www.mirbase.org/

آغازگر برگشت با توالی universal (5'-GTGCAGGGT CCGAGGT-3') برای تکثیر miRNAها مورداستفاده قرار گرفت. از ژن اکتین (ACT) به شماره دسترسی EC969944 به‌عنوان کنترل داخلی در نرمال‌سازی نتایج qRT-PCR استفاده شد (Luo *et al.*, 2018). توالی آغازگرهای رفت اختصاصی و برگشت universal طراحی‌شده برای هر miRNA و توالی آغازگرهای رفت و برگشت ژن کنترل داخلی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- آغازگرهای طراحی‌شده برای miRNAهای مورد بررسی

Table 1. Designed primers for the investigated miRNAs

نام آغازگر Primer name	توالی Sequence
vvi-miR 159c RT	5'-GTTGGCTCTGGTGCAG GGTCCGAGGTATTCGCAC CAGAGCCAACTAGAGC-3'
vvi-miR 159c forward	5'-GGGGTTTGGATTGAAGG GA-3'
vvi -miR 160a,b RT	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGG GTCCGAGGTATTCGCACCA GAGCCAACTGGCAT-3'
vvi -miR 160a,b forward	5'-TTGTGCCTGGCTCCCTG A-3'
vvi-miR169v RT	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGG GTCCGAGGTATTCGCACCA GAGCCAACCCGGCA-3'
vvi-miR169v forward	5'-GGGGAAGCCAAGGATG AAT-3'
Universal reverse	5'-GTGCAGGGTCCGAGG T-3'
Actin forward	5'-GACAATGGATGGACCA GATTCA-3'
Actin reverse	5'-CTTGCATCCCTCAGCAC CTT-3'

استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش qRT-PCR: استخراج RNA از ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های برگی گیاهان تنش دیده و شاهد با استفاده از محلول ترایزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به‌منظور حذف هرگونه باقیمانده DNA نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I (Invitrogen) مطابق با دستورالعمل ارائه‌شده توسط شرکت تیمار شدند. کیفیت نمونه‌های RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت FIREScript RT cDNA Synthesis (Solis BioDyne) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. واکنش qRT-PCR در حجم ۲۵ µl با استفاده از 2×SYBR Green PCR master mix (Takara, Japan) و دستگاه Rotor Gene 6000X شرکت Corbbet در سه تکرار بیولوژیک برای هر تیمار و دو تکرار تکنیکی برای هر تکرار بیولوژیک صورت گرفت. در هر واکنش ۱۰۰ پیکوگرم از cDNA و ۵ پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت اختصاصی هر ژن استفاده شد. چرخه‌های حرارتی به‌صورت یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه و فعال شدن آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ده دقیقه و به‌دنبال آن ۴۰ چرخه متوالی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ثانیه و اتصال آغازگرها و بسط در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه اعمال شد. مقدار تغییر بیان miRNAها تحت شرایط خشکی نسبت به شاهد با استفاده از Ct و فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ به‌دست آمد (Schmittgen *et al.*, 2008). آزمون معنی‌داری تغییر بیان miRNAها در شرایط خشکی نسبت به شاهد با استفاده از آزمون t و در سطح معنی‌داری حداقل ۵ درصد بررسی شد.

آنالیز پروموتر miRNAهای مورد بررسی: جهت شناسایی عناصر تنظیمی در ناحیه پروموتری miRNAهای مورد بررسی ابتدا توالی ۳kb بالادست پیش‌ساز ساقه-حلقه از پایگاه اطلاعاتی Ensembl Plants[1] دریافت شد. برای شناسایی جایگاه آغاز رونویسی (TSS) هر پیش‌ساز miRNA، این توالی‌ها توسط نرم‌افزار آنلاین TSSP[2] مورد بررسی قرار گرفتند (Solovyev *et al.*, 2010). سپس ۱۰۰۰ جفت باز یا کمتر از توالی بالادست هر TSS به‌منظور شناسایی عناصر تنظیمی بالقوه در پروموتر miRNAهای مورد بررسی توسط پایگاه داده‌ای PlantCARE[3] مورد آنالیز قرار گرفت (Lescot *et al.*, 2002).

شناسایی ژن‌های هدف miRNAهای مورد بررسی: شناسایی ژن‌های هدف برای miRNAهای مورد بررسی با

1- http://www.plants.ensembl.org
2- http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=tss p&grou p=programs&subgroup=promoter
3- http://bioinformatics.psb.ugent.be/we btools/plant care/html

استفاده از پایگاه آنلاین شناسایی ژن‌های هدف miRNAها (psRNATarget[1]) و معیارهای پیش‌فرض انجام گرفت. ضوابط و محدودیت‌های پیش‌فرضی که برای شناسایی ژن‌های هدف بالقوه در نظر گرفته شد، عبارت بودند از: یک امتیاز به ازای هر عدم جفت‌شدگی میان miRNA و ژن هدف و نیم امتیاز به ازای هر جفت‌شدگی U:G و در نهایت دو امتیاز برای هر حباب در نظر گرفته شد. حداکثر امتیاز مجاز برای معرفی ژن هدف جدید ۳ در نظر گرفته شد. در ناحیه seed (نوکلئوتیدهای ۲ تا ۹ miRNA) که نقش اصلی را در شناسایی و اتصال miRNA به ژن هدف دارد تنها اجازه یک عدم جفت‌شدگی داده شد.

نتایج و بحث

آنالیز پروموتر miRNAهای مورد بررسی: علاوه‌بر موتیف‌های کاملاً حفاظت‌شده TATA box و CAAT box درمجموع، ۱۲ نوع عنصر تنظیمی Cis دیگر، شامل موتیف‌های خاص و عناصر پاسخ‌دهنده به تنش در پروموتر miRNAهای مورد بررسی شناسایی شد. موتیف‌های مرتبط با تنش مانند ABREها و MBSها اغلب به‌صورت تک‌نسخه در مناطق تنظیمی miRNAهای مورد مطالعه شناسایی شدند که نشان می‌دهد بیان این miRNAها مخصوص بافت یا وابسته به شرایط تنشی است (Ibraheem *et al*., 2010). جدول ۲ نام و تعداد عناصر تنظیمی Cis شناسایی شده برای هرmiRNA را نشان می‌دهد. عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به اسیدآبسیزیک (ABREs)، دمای بالا (HSEs)، خشکی (MBSs) و دمای پایین (LTRs) ازجمله عناصر تنظیمی مهم در پروموتر ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش هستند. در تحقیق حاضر حضور عناصر تنظیمی مرتبط با خشکی شامل MYB و MYC در ناحیه پروموتر miRNAهای مورد بررسی، تأییدی بر تأثیرپذیری آن‌ها از تنش خشکی است. به‌طور مشابه این عناصر تنظیمی در ناحیه بالادست miRNAهای پاسخ‌دهنده به خشکی ذرت شناسایی شدند (Aravind *et al*., 2017). حضور عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به اسید آبسیزیک در بالادست ژن‌های miR159c و miR160 نیز بیانگر نقش احتمالی این miRNAها در سیگنالینگ هورمون اسید آبسیزیک در شرایط تنش خشکی است. درمجموع ترکیب عناصر تنظیمی شناسایی‌شده در ناحیه تنظیمی هر miRNA، اثرات متفاوتی را در شرایط محیطی یا بافت‌های مختلف ایجاد می‌کند که درنهایت تعیین‌کننده الگوی بیان آن است (Qiu, 2003).

ژن‌های هدف miRNAهای مورد بررسی: شناسایی ژن‌های هدف miRNAها برای درک عملکرد آن‌ها بسیار ضروری است. نتایج حاصل از شناسایی ژن‌های هدف بالقوه miRNAهای موردنظر با استفاده از پایگاه اطلاعاتی psRNATarget، در جدول ۳ آمده است. اکثر ژن‌های هدف پیش‌بینی‌شده از گروه فاکتورهای رونویسی هستند و در سایر گونه‌های گیاهی ازجمله آرابیدوپسیس و برنج نیز به‌عنوان اهداف حفاظت‌شده این گروه از miRNAها شناسایی شده‌اند (Adai *et al*., 2005; Wang *et al*., 2005; Lu *et al*., 2006). بر اساس این نتایج شاخص‌ترین ژن هدف پیش‌بینی‌شده برایmiR159 فاکتور رونویسی GAMYB و برای miR169 فاکتور رونویسی NFYA بود که هر دو از فاکتورهای رونویسی مرتبط با سیگنالینگ اسید آبسیزیک به‌شمار می‌روند. ژن هدف پیش‌بینی‌شده برای miR160 نیز یک فاکتور رونویسی به‌نام ARF (Auxin response factor) از خانواده فاکتورهای رونویسی مرتبط با انتقال سیگنال هورمون اکسین است.

تأثیر تنش خشکی بر بیان miRNAهای مورد ارزیابی در دو رقم انگور: آنالیز داده‌های حاصل از qRT-PCR در پژوهش حاضر، حاکی از تغییر بیان هر سه miRNA مورد بررسی تحت تأثیر تنش خشکی بود. نحوه تغییر miRNAهای مورد بررسی متأثر از نوع miRNA و نوع رقم متفاوت بود. شکل ۱ تغییر بیان نسبی miRNAهای مورد ارزیابی را نسبت به شرایط کنترل نشان می‌دهد.

1- http://plantgrn.noble.org/psRNATarget

جدول ۲- عناصر تنظیمی شناسایی‌شده در بالادست miRNAهای مورد بررسی

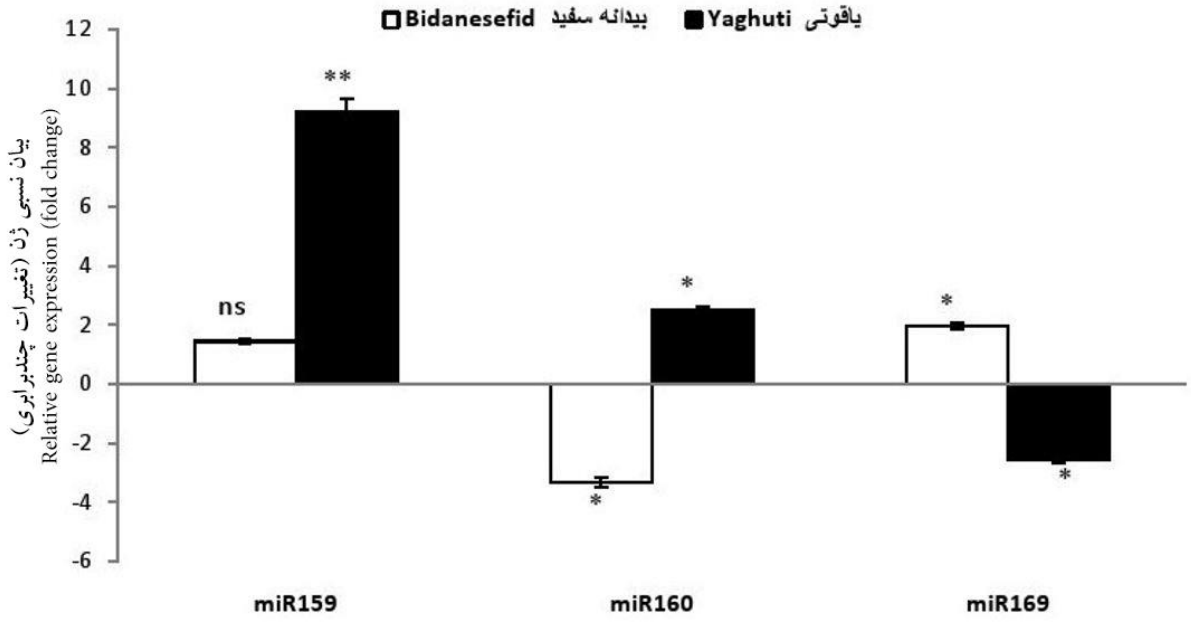
Table 2. Identified regulatory elements upstream the investigated miRNAs

عناصر تنظیمی	نام میکرو آرانآ (miRNA name)			توالی
cis-elements	miR159c	miR160ab	miR169v	sequence
ABRE	1	1	-	ACGTG
Box 4	1	1	3	ATTAAT
TATA-box		11	9	TATATA; TATA; TATAA;TATTTAAA;TATATAA
CAAT-box	4	8	8	CAAT; CCCAATTT; CCAAT; CAAAT
CAT-box	-	1	-	GCCACT
ERE	-	2	2	ATTTTAAA
G-box	1	1	-	CCACGTAA
MBS	1	1	1	CAACTG; AACCTAA; CAACCA
MYC	1	2	-	CATGTG; CAATTG; CATTTG
P-box	-	1	-	CCTTTTG
TCT-motif	-	2	-	TCTTAC
Unnamed__4	2	3	-	CTCC
Unnamed__6	-	1	-	TATAAATATCT
WRE3	1	-	-	CCACCT

جدول ۳- ژن‌های هدف پیش‌بینی‌شده برای miRNAهای مورد بررسی

Table 3. Predicted target genes for investigated miRNAs

میکرو آرانآ	شماره دسترسی ژن هدف	پروتئین هدف
miRNA	Target accession no.	Target protein
	NP9524397	U3 small nucleolar ribonucleoprotein
vvi-MIR159c	TC150220	Transcription factor GAMYB
	TC144246	CCG-binding protein 1
vvi-MIR160a-b	TC165628	Auxin response factor
vvi-MIR169v	TC151377	Nuclear transcription factor Y subunit A-



شکل ۱- بیان نسبی miRNAهای مورد ارزیابی

Figure 1. Relative expression of investigated miRNAs

ns، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and ** : Non significant, significant at 5% and 1% of probability levels, respectively

بیشترین میزان تغییر بیان در miR159 با بیش از ۹ برابر افزایش بیان نسبت به شاهد در رقم یاقوتی مشاهده شد. در رقم بیدانه‌سفید نیز بیان این miRNA افزایش یافت اما این افزایش بیان معنی‌دار نبود. در پژوهش‌های انجام‌شده بر روی گیاهان *Arabidopsis thaliana*، *Prunus persica* و *Populus tomentosa* سطح بیان miR159 تحت شرایط تنش خشکی افزایش پیدا کرد (Reyes and Chua, 2007; Eldem *et al*., 2012; Ren *et al*., 2012). در تحقیق انجام‌شده بر روی دو ژنوتیپ حساس و متحمل به خشکی ذرت، بیان miR159 در ژنوتیپ متحمل به‌طور معنی‌داری تحت تنش خشکی افزایش و در ژنوتیپ حساس کاهش یافت. این مسأله وجود الگوهای تنظیمی مختلف در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به خشکی ذرت را نشان می‌دهد (Aravind *et al*., 2017). در آرابیدوپسیس تیمار تنش خشکی و کاربرد ABA خارجی منجربه افزایش سطح miR159 در طی مرحله جوانه‌زنی بذر شد. این miRNA برش رونوشت‌های MYB101 و MYB33 که تنظیم‌کننده مثبت سیگنالینگ ABA هستند را مورد هدف قرار می‌دهد (Reyes and Chua, 2007). سوپرخانواده MYB یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی در اغلب گیاهان به‌شمار می‌آید. دسته MYB2R بزرگ‌ترین گروه این خانواده محسوب شده و نقش مهمی در بیوسنتز آنتوسیانین، شکل‌گیری اندام‌های مختلف گیاهی و پاسخ به هورمون‌های گیاهی نظیر جیبرلین، اسید سالیسیلیک و انواع تنش‌های زنده و غیرزنده ایفا می‌کند (Chen *et al*., 2005b). فن‌آوری توالی‌یابی با کارایی بالا و آنالیز Degradom، ژن GAMYB را به‌عنوان ژن هدف برای miR159 در انگور شناسایی کرده است (Pantaleo *et al*., 2010). فاکتورهای رونویسی GAMYB درواقع MYBهای مرتبط با سیگنالینگ جیبرلین و اسیدآبسیزیک هستند و در آبشارهای سیگنالینگ القاء شده در اثر تجمع ABA در شرایط تنش مشارکت می‌کنند (Reyes and Chua, 2007). نتایج به‌دست‌آمده از الگوی بیان miR159 در پژوهش حاضر در تطابق با مطالعات پیشین است (Reyes and Chua, 2007; Eldem *et al*., 2012; Ren *et al*., 2012). با توجه به این‌که miR159 ازجمله miRNAهای پاسخ‌دهنده به خشکی است که در سیگنالینگ ABA دخالت دارد، لذا افزایش بیان آن تحت شرایط تنش دور از انتظار نیست. افزایش بیان این miRNA بیان ژن‌های هدف آن را کاهش می‌دهد. فاکتورهای MYB در کنترل فرآیندهای خاص سلول مانند متابولیسم اولیه و ثانویه و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده نقشی اساسی داشته و تنظیم‌کننده منفی تقسیم‌سلولی و رشد هستند (Alonso-Peral *et al*., 2010). از سوی دیگر ثابت شده است که این فاکتورها در سیگنالینگ ABA و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نقشی مثبت ایفا می‌کنند (Alonso-Peral *et al*., 2010; Reyes and Chua, 2007)؛ بنابراین در مطالعه حاضر افزایش بیان miR159 در رقم یاقوتی تحت تأثیر تنش خشکی از طریق کاهش بیان فاکتورهای MYB، از سیگنالینگ هورمون ABA و توقف رشد در این رقم جلوگیری کرده و مرگ‌سلولی برنامه‌ریزی شده را در این رقم به‌تعویق می‌اندازد.

اکسین تنظیم‌کننده کلیدی تقریباً تمام جنبه‌های رشد و نمو گیاه از جوانه‌زنی تا پیری است. سیگنالینگ اکسین شامل فعال‌سازی یا سرکوب بیان ژن توسط گروهی از پروتئین‌ها با نام فاکتورهای پاسخ‌دهنده به اکسین (ARFs) است. این گروه از فاکتورهای رونویسی به عناصر پاسخ به اکسین (AuxRE) در پروموتور ژن‌های هدف (پاسخ‌دهنده به اکسین) متصل می‌شوند. تا به امروز، ۲۲ ژن و یک شبه‌ژن ARF از آرابیدوپسیس جداسازی شده است (Guilfoyle and Hagen, 2007). با وجود نقش تنظیمی این ژن‌ها تحقیقات متعددی نشان می‌دهد که بیان آن‌ها تحت تنظیم تعدادی از miRNAها ازجمله miR160 است. مشخص شده است که miR160 سطوح ARF10، ARF16 و ARF17 را در آرابیدوپسیس تنظیم می‌کند (Wang *et al*., 2005). در مطالعه حاضر بیان نسبی miR160 در رقم یاقوتی در شرایط تنش نسبت به شرایط

کنترل افزایش و در رقم بیدانه‌سفید کاهش معنی‌داری یافت. تغییر بیان مشاهده شده در miR160 و شناسایی فاکتورهای رونویسی ARF به‌عنوان ژن‌های هدف این میکرو RNA، احتمالاً نشان‌دهنده نقش مهم این miRNA در پاسخ به خشکی از طریق کنترل مسیر انتقال سیگنال هورمون اکسین است. افزایش بیان این miRNA در ارقام مقاوم به خشکی نخود گاوی و گندم نیز گزارش شده است (Barrera-Figueroa *et al*., 2011; Bakhshi *et al*., 2017). ARFها از مهم‌ترین ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های غیرزنده هستند و نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی درختان میوه ایفا می‌کنند. پروتئین‌های ARF در انواعی از فرآیندهای بیولوژیکی و فیزیولوژیکی مانند جنین‌زایی، توسعه و پیری برگ، توسعه ریشه‌های جانبی و رشد میوه از طریق تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به اکسین دخالت دارند (De Jong *et al*., 2009; Lim *et al*., 2010; Sagar *et al*., 2013; Wilmoth *et al*., 2005). در بررسی انجام‌شده توسط وانگ و همکاران (Wang *et al*., 2005) بیان ARF16 در برگ‌های جوان بیشتر بود، در طی رشد برگ کاهش یافت و در برگ‌های بالغ تقریباً وجود نداشت. کاهش بیان ARF16 در برگ‌های درحال‌توسعه به‌وضوح توسط miR160 صورت می‌گیرد. در تحقیق حاضر نیز ژن ARF به‌عنوان هدف بالقوه برای miR160 شناسایی شد. افزایش بیانmiR160 در بافت برگ رقم متحمل به خشکی یاقوتی احتمالاً از طریق کاهش سطح رونوشت‌های ژن هدف آن از رشد و توسعه برگ‌های این رقم در طی تنش جلوگیری کرده و منجربه حفظ انرژی گیاه در شرایط تنش خواهد شد. در مقابل کاهش بیان miR160 در رقم حساس بیدانه‌سفید منجربه افزایش بیان ARF و ادامه فرآیند رشد و توسعه برگ و اندام‌های هوایی خواهد شد. لذا به‌نظر می‌رسد miR160 از miRNAهای مهم پاسخ‌دهنده به خشکی در رقم یاقوتی باشد.

بیان نسبی miR169 در شرایط تنش در رقم یاقوتی نسبت به شرایط کنترل کاهش و در رقم بیدانه‌سفید افزایش یافت. به‌طور مشابه در ژنوتیپ‌های سویا با مقاومت به خشکی متفاوت نیز، miR169f در ژنوتیپ مقاوم کاهش بیان و در ژنوتیپ حساس افزایش بیان نشان داد (Kulcheski *et al*., 2011). تحت تنش خشکی بیان miR169 هم در ژنوتیپ حساس و هم در ژنوتیپ متحمل به خشکی نخود گاوی کاهش یافت. کاهش بیان این miRNA، بیان ژن هدف آن یعنی NF-YA (nuclear transcription factor Y subunit alpha) را القاء کرده و تحمل به خشکی از طریق افزایش بیان این فاکتور رونویسی بهبود می‌یابد. NF-Yها به‌عنوان فاکتورهای رونویسی فراگیر در گیاهان، ازجمله فاکتورهای رونویسی پاسخ‌دهنده به تنش به‌شمار می‌روند و از سه زیر واحد مجزا (NF-YB, NF-YA و NF-YC) تشکیل شده‌اند. در آرابیدوپسیس، رونوشت NF-YA5 توسط تنش خشکی در مسیر وابسته به ABA به میزان قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. بیان NF-YA5 با ژن‌های متعدد پاسخ‌دهنده به تنش خشکی مانند گلوتاتیون ترانسفراز (GT) یا پروکسیداز (POD) مرتبط می‌باشد (Li *et al*., 2008). بیش‌بیان NF-YA5 در گیاهان آرابیدوپسیس تراریخته باعث کاهش تلفات آب و مقاومت بالاتر به خشکی نسبت به گیاهان نوع وحشی می‌شود (Li *et al*., 2008). نقش NF-YA5 در کنترل دهانه روزنه‌ها و مقاومت به خشکی گیاهان اثبات شده است (Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Li *et al*., 2008). تخریب یا توقف ترجمه رونوشت‌های NF-YA5 توسط اعضاء خانواده miR169 مورد هدف قرار می‌گیرد. کاهش بیان مشاهده‌شده در miR169 در رقم یاقوتی در تحقیق حاضر، از طریق افزایش بیان ژن هدف آن (NF-YA) هم از طریق بسته شدن روزنه‌ها به کاهش تلفات آب این رقم کمک می‌کند و هم از طریق فعال‌سازی و بیان سایر ژن‌های مفید پاسخ‌دهنده به تنش خشکی به تحمل شرایط تنش کمک می‌کند. عکس این شرایط در رقم بیدانه‌سفید، حساسیت بیشتر آن به خشکی را رقم می‌زند.

آنالیز پروموتر miRNAهای مورد بررسی در این تحقیق، حضور عناصر تنظیمی مهم پاسخ‌دهنده به خشکی را در این ژن‌ها تائید کرد. هم‌چنین شناسایی ژن‌های هدف بالقوه آن‌ها نشان داد که هر سه miRNA در سیگنالینگ هورمون‌های ABA، اکسین یا جیبرلین دخیل بوده و از طریق تنظیم بیان فاکتورهای رونویسی هدف خود در پاسخ به تنش خشکی مؤثر هستند. تغییر بیان miRNAهای مورد بررسی متأثر از نوع miRNA و نوع رقم، متفاوت بود که این امر از تنوع عملکردی آن‌ها ناشی می‌شود. پروفایل بیان وابسته به ژنوتیپ (رقم) نشان داد که پاسخ miRNAها به تنش خشکی در میان ژنوتیپ‌های خیلی نزدیک با حساسیت متفاوت به تنش نیز متفاوت است. به‌طورکلی به‌نظر می‌رسد که تغییر بیان هر سه miRNA ارزیابی‌شده درنهایت به کاهش بیشتر رشد اندام‌های هوایی در رقم یاقوتی و تحمل بهتر شرایط تنشی در این رقم کمک می‌کند.

References

Adai, A., Johnson, C., Mlotshwa, S., Archer-Evans, S., Manocha, V., Vance, V. and Sundaresan, V. (2005). Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, **15(1):** 78-91.

Alonso-Peral, M.M., Li, J., Li, Y., Allen, R.S., Schnippenkoetter, W., Ohms, S., White, R.G. and Millar, A.A. (2010). The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **154:** 757-771.

Aravind, J., Rinku, S., Pooja, B., Shikha, M., Kaliyugam, S., Mallikarjuna, M.G. and Nepolean, T. (2017). Identification, characterization, and functional validation of drought-responsive microRNAs in subtropical maize inbreds. *Frontiers in Plant Science*, **8:** 941.

Bakhshi, B., Fard, E.M., Gharechahi, J., Safarzadeh, M., Nikpay, N., Fotovat, R. and Salekdeh, G.H. (2017). The contrasting microRNA content of a drought tolerant and a drought susceptible wheat cultivar. *Journal of Plant Physiology*, **216:** 35-43.

Barrera-Figueroa, B.E., Gao, L., Diop, N.N., Wu, Z., Ehlers, J.D., Roberts, P.A. and Liu, R. (2011). Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. *BMC Plant Biology*, **11(1):** 127.

Carrington, J.C. and Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, **301(5631):** 336-338.

Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T. and Lao, K.Q. (2005a). Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, **33(20):** e179-e179.

Chen, R., Ni, Z., Nie, X., Qin, Y., Dong, G. and Sun, Q. (2005b). Isolation and characterization of genes encoding Myb transcription factor in wheat (*Triticum aestivem* L.). *Plant Science*, **169(6):** 1146-1154.

Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L. (2010). Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell and Environment*, **33(4):** 481-489.

De Jong, M., Mariani, C. and Vriezen, W.H. (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany*, **60(5):** 1523-1532.

Ding, Y., Tao, Y. and Zhu, C. (2013). Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. *Journal of Experimental Botany*, **64(11):** 3077-3086.

Eldem, V., Akcay, U.C., Ozhuner, E., Bakır, Y., Uranbey, S. and Unver, T. (2012). Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing. *PloS One*, **7(12):** e50298.

Ferdous, J., Hussain, S.S. and Shi, B.J. (2015). Role of micro RNA s in plant drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, **13(3):** 293-305.

Guilfoyle, T.J. and Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, **10(5):** 453-460.

Hosseini, S.Z., Ismaili, A. and Sohrabi, S.S. (2018). Evaluation of drought tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under water deficit stress conditions. *Plant Genetic Researches*, **5(2):** 55-72 (In Persian).

Ibraheem, O., Botha, C.E. and Bradley, G. (2010). In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5′ regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational Biology and Chemistry*, **34(5-6):** 268-283.

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(6):** 787-799.

Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **57:** 19-53.

Khraiwesh, B., Zhu, J.K. and Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, **1819(2):** 137-148.

Kulcheski, F.R., de Oliveira, L.F., Molina, L.G., Almerão, M.P., Rodrigues, F.A., Marcolino, J. and Abdelnoor, R.V. (2011). Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics*, **12(1):** 307.

Kumar, R. (2014). Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **174(1):** 93-115.

Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P. and Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, **30(1):** 325-327.

Li, W.X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.J., Wu, J.M., Iida, K. and Zhu, J.K. (2008). The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and post transcriptionally to promote drought resistance. *The Plant Cell*, **20(8):** 2238-2251.

Lim, P.O., Lee, I.C., Kim, J., Kim, H.J., Ryu, J.S., Woo, H.R. and Nam, H.G. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *Journal of Experimental Botany*, **61(5):** 1419-1430.

Lu, C., Kulkarni, K., Souret, F.F., Muthu Valliappan, R., Tej, S.S., Poethig, R.S. and Meyers, B.C. (2006). MicroRNAs and other small RNAs enriched in the *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant. *Genome Research*, **16(10):** 1276-1288.

Luo, M., Gao, Z., Li, H., Li, Q., Zhang, C., Xu, W., Song, S., Ma, C. and Wang, S. (2018). Selection of reference genes for miRNA qRT-PCR under abiotic stress in grapevine. *Scientific Reports*, **8(1):** 4444.

Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D. and Maizel, A. (2010). miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their auxin response factor targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *The Plant Cell*, **22(4):** 1104-1117.

OIV. (2019). The International Organization of Vine and Wine. Statistical report on world VitViniculture. http://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitivini culture.pdf. Accessed July 13, 2019.

Pagliarani, C., Vitali, M., Ferrero, M., Vitulo, N., Incarbone, M., Lovisolo, C. and Schubert, A. (2017). Accumulation of MicroRNAs differentially modulated by drought is affected by grafting in grapevine. *Plant Physiology*, **173:** 2180-2195.

Pantaleo, V., Szittya, G., Moxon, S., Miozzi, L., Moulton, V., Dalmay, T. and Burgyan, J. (2010). Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *The Plant Journal*, **62(6):** 960-976.

Qiu, P. (2003). Computational approaches for deciphering the transcriptional regulatory network by promoter analysis. *Biosilico*, **1(4):** 125-133.

Ren, Y., Chen, L., Zhang, Y., Kang, X., Zhang, Z. and Wang, Y. (2012). Identification of novel and conserved *Populus tomentosa* microRNA as components of a response to water stress. *Functional & Integrative Genomics*, **12(2):** 327-339.

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(4):** 592-606.

Sagar, M., Chervin, C., Mila, I., Hao, Y., Roustan, J.P., Benichou, M. and Pech, J.C. (2013). Sl-ARF4, an auxin response factor involved in the control of sugar metabolism during tomato fruit development. *Plant Physiology*, **161:** 1362-1374.

Schmittgen, T.D., Lee, E.J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T.S. and Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, **44(1):** 31-38.

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **58(2):** 221-227.

Shuai, P., Liang, D., Zhang, Z., Yin, W. and Xia, X. (2013). Identification of drought-responsive and novel *Populus trichocarpa* microRNAs by high-throughput sequencing and their targets using degradome analysis. *Bmc Genomics*, **14(1):** 233.

Solovyev, V.V., Shahmuradov, I.A. and Salamov, A.A. (2010). Identification of Promoter Regions and Regulatory Sites. In: Ladunga, I., Ed., *Computational Biology of Transcription Factor Binding*, pp. 57-83. Humana Press, Lincoln, USA.

Sunkar, R., Li, Y.F. and Jagadeeswaran, G. (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, **17(4):** 196-203.

Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E.F. and Hellens, R.P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, **3(1):** 12.

Wang, C., Han, J., Liu, C., Kibet, K.N., Kayesh, E., Shangguan, L. and Fang, J. (2012). Identification of microRNAs from amur grape (*Vitis amurensis* Rupr.) by deep sequencing and analysis of microRNA variations with bioinformatics. *BMC Genomics*, **13(1):** 122.

Wang, C., Wang, X., Kibet, N.K., Song, C., Zhang, C., Li, X. and Fang, J. (2011). Deep sequencing of grapevine flower and berry short RNA library for discovery of novel microRNAs and validation of precise sequences of grapevine microRNAs deposited in miRBase. *Physiologia Plantarum*, **143(1):** 64-81.

Wang, J.W., Wang, L.J., Mao, Y.B., Cai, W.J., Xue, H.W. and Chen, X.Y. (2005). Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **17(8):** 2204-2216.

Wilmoth, J.C., Wang, S., Tiwari, S.B., Joshi, A.D., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. and Reed, J.W. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *The Plant Journal*, **43(1):** 118-130.

Zheng, J., Fu, J., Gou, M., Huai, J., Liu, Y., Jian, M., Huang, Q., Guo, X., Dong, Z., Wang, H. and Wang, G. (2010). Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant Molecular Biology*, **72(4-5):** 407-421.

Upstream Regulatory Elements, Potential Targets and Expression Patterns of Three Drought Responsive miRNAs in Two Grapevine Cultivars

Azam Moayedinezhad[1], Behrooz Mohammadparast[2,*], Ghasem Hosseini Salekdeh[3], Ehsan Mohsenifard[4] and Mohammad Ali Nejatian[5]

1- Ph.D. Student, Grape and Raisin Research Institute, Malayer University, Malayer, Iran
2. Assistant Professor, Grape and Raisin Research Institute, Malayer University, Malayer, Iran
3- Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, AREEO, Karaj, Iran
4- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
5- Associate Professor, Horticulture Crops Research Department, Qazvin Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Qazvin, Iran

(Received: March 10, 2019 – Accepted: July 18, 2019)

Abstract

MicroRNAs (miRNAs), as a group of non-coding small RNAs, play key roles in regulating the growth, development and response of plants to various stresses. In this study, the expression patterns of three drought responsive miRNAs (miR159c, miR160a,b and miR169v) were compared in both drought tolerant (Yaghuti) and drought sensitive (Bidanesefid) grapevine cultivars using qRT-PCR under drought stress conditions. For identification the potential regulatory elements in the promoter regions of investigated miRNAs, the upstream sequences of their pre-miRNAs were analyzed using PlantCARE database. Drought related motifs such as ABREs and ABSs were identified in the regulatory regions of investigated miRNAs. Three transcription factors related to Auxin and ABA signaling were identified as the most important target genes for investigated miRNAs. The expression patterns of studied miRNAs were different affected from miRNA kind and grapevine cultivar. So, the expression of miR159 remained unchanged in Bidanesefid and increased in Yaghuti cultivar under drought stress condition, but the expression of miR160 and miR169 changed reversely in both cultivars. Cultivar dependent expression showed that miRNA responses to drought stress are also different among very relative genotypes with different drought susceptibility. Generally, considering the role of the potential target genes of investigated miRNAs, it seems that the change in the expression of evaluated miRNAs ultimately leads to the better tolerate of drought stress in Yaghuti cultivar.

Keywords: Bidanesefid, Drought, Target gene, Regulatory elements, Yaghuti

* **Corresponding Author, E-mail: b.mohammadparast@malayeru.ac.ir**