doi: 10.22124/c.2018.10943.1418

دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

دوره هشتم/ شماره سوم/ پاییز ۱۳۹۷ (۳۶۹-۳۵۹)

تأثیر تنش خشکی بر بیان دو miRNA مهم در بساک دو ژنوتیپ گندم متفاوت از نظر تحمل به خشکی

نسترن مهری[۱]، رضا فتوت[۲*] و احسان محسنی‌فرد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۳۱

چکیده

قسمت زیادی از اراضی زیر کشت گندم در جهان تحت تاثیر تنش خشکی قرار دارند. مرحله زایشی، حساس‌ترین مرحله به تنش خشکی در غلات به‌شمار می‌آید. با وجود اهمیت تنش خشکی در مرحله زایشی و نقش آن در کاهش عملکرد گندم، مکانیسم‌های مولکولی درگیر در آن کم‌تر مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، بیان miR166 و miR167 در بساک رسیده دو ژنوتیپ گندم دزفول (D-10) (متحمل به خشکی) و شیراز (حساس به خشکی) تحت شرایط تنش خشکی در مرحله زایشی مورد بررسی قرار گرفت. شاخص تحمل به تنش (STI) برای تعداد دانه در سنبله، مجموع دانه و زنده‌مانی دانه گرده در ژنوتیپ دزفول بالاتر از ژنوتیپ شیراز بود. بیان هر دو miRNA در هر دو ژنوتیپ، تحت تاثیر تنش خشکی افزایش یافت. میزان افزایش بیان miR166 در ژنوتیپ حساس شیراز (افزایش بیش از ۱۴ برابر نسبت به شرایط بدون تنش) حدود دو برابر بیش‌تر از ژنوتیپ متحمل دزفول (افزایش حدود ۸ برابر نسبت به شرایط بدون تنش) بود. تحت شرایط تنش خشکی، بیان miR167 در ژنوتیپ دزفول بیش از دو برابر و در ژنوتیپ شیراز بیش از چهار برابر نسبت به شرایط بدون تنش افزایش داشت. miR166 و miR167 هر دو در تنظیم نمو اندام‌های گل، مانند نمو میکروسپور، دخالت دارند. بنابراین، اثر تنش خشکی بر تغییر میزان بیان آن‌ها می‌تواند در نرعقیمی حاصله در گندم دخالت داشته باشد و تعدیل بیان این‌دو miRNA می‌تواند منجر به کارایی نمو دانه گرده و شکوفایی موفق بساک شود که به نوبه خود ریشه در ترارسانی دارد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، زنده‌مانی دانه گرده، میوز، نرعقیمی

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
* نویسنده مسئول: r_fotovat@znu.ac.ir

مقدمه

حدود ۲۴۴ میلیون هکتار از زمین‌های جهان زیر کشت گندم است (FAO, 2016) که از این مقدار حدود ۸۴ درصد به‌صورت دیم کشت می‌شود (Alexandratos and Bruinsma, 2012). حساس‌ترین مرحله نموی به تنش خشکی در غلات، مرحله زایشی است که اثر آن بیش‌تر بر اندام نر می‌باشد (Koonjul *et al.*, 2005; Jian-Chang *et al.*, 2008). تنش خشکی از نمو موفق دانه گرده در بساک جلوگیری می‌کند و در نهایت منجر به نرعقیمی و کاهش عملکرد می‌شود (Ji *et al.*, 2010). تصور بر این است که اثر تنش خشکی در مرحله زایشی مشابه با سایر اندام‌های گیاه با کاهش شدید پتانسیل آب برگ همراه باشد (Siddique *et al.*, 2000)، اما با توجه به پوشش سنبله گندم در مرحله زایشی، کاهش پتانسیل آب سنبلچه‌ها خیلی کم‌تر از کاهش پتانسیل آب برگ است. آزمایش‌های متعددی نشان داده است که نرعقیمی حاصل از نمو ناقص دانه‌های گرده به‌دلیل کاهش آب اندام‌های زایشی نیست (Dorion *et al.*, 1996)، بلکه به‌دلیل ترارسانی هورمونی از بخش‌های دیگر گیاه مانند برگ و ریشه صورت می‌گیرد (Liu *et al.*, 2003). بنابراین، مطالعه مکانیزم‌های مولکولی در این مرحله اهمیت پیدا می‌کند.

در سال‌های اخیر، تعدادی از این مطالعات اهمیت نقش miRNA‌ها را در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در ترارسانی هورمونی و متابولیسم روشن کرده‌اند (Yin *et al.*, 2014). miRNA‌ها گروهی از RNA های کوچک، غیر کدکننده درون ژنی با طول ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتید هستند که مانع از بیان ژن‌ها در سطح بعد از رونویسی، یا از طریق محدود کردن ترجمه و یا از طریق تخریب mRNA مربوطه (Lee *et al.*, 1993; Huntzinger and Izaurralde, 2011; Li *et al.*, 2015; Shriram *et al.*, 2016) و نیز از طریق تغییرات اپی‌ژنتیک می‌شوند. تحقیقات زیادی که در سراسر ژنوم گیاهانی مانند آرابیدوپسیس انجام گرفته است، نشان می‌دهند که تنش‌های غیرزیستی باعث تغییر بیان miRNA‌ها می‌شود (Sunkar and Zhu, 2004). تعدادی از miRNA های جدید پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در سپیدار شناسایی شده است (Li *et al.*, 2011). غربالگری ریزآرایه miRNA در برگ‌ها و ریشه‌های گندم نان تغییر بیان شدید چهارده miRNA را تحت شرایط خشکی نشان داده است (Akdogan *et al.*, 2016).

نقش miRNA‌ها در نمو اندام‌های نر نیز ثابت شده است (Ron *et al.*, 2010; Twell, 2011). در آرابیدوپسیس تغییر بیان ژن‌های miRNA در تنظیم نرعقیمی دخیل هستند (Grant-Downton *et al.*, 2009). گزارش شده است که در جهش‌یافته‌های عقیم برنج که توسط ژن *AGOMEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE1* (*MEL1*) صورت می‌گیرد، احتمالاً خاموشی ژن توسط miRNA‌ها روی می‌دهد (Nonomura *et al.*, 2007). در لاین 7B-1 گوجه‌فرنگی که یک جهش‌یافته نرعقیم حساس به فتوپریود است، miRNA‌ها مسئول نمو بساک و نرعقیمی هستند (Omidvar *et al.*, 2015). نقش و تغییر بیان شش خانواده miRNA حفاظت‌شده در نرعقیمی ژنتیکی پنبه نیز ثابت شده است (Wei *et al.*, 2013).

در لاین‌های نرعقیم ژنتیکی حساس به دما در گندم، miR167 و tasiRNA-ARF در مسیر ترارسانی اکسین دخالت دارند (Tang *et al.*, 2012). افزایش بیان miR166 در شرایط تنش گرما در گندم نیز دیده شده است (Xin *et al.*, 2010). تجمع miR166 و miR167 در برنج در مرحله دانه گرده تک‌هسته‌ای و نقش آن در نمو گامت‌های نر تأیید شده است (Fujioka *et al.*, 2008). در گوجه‌فرنگی تراریخت، افزایش بیان *MIR167* گرده‌های معیوب که قادر به جوانه‌زدن روی کلاله و یا رشد درون خامه نبودند، منجر به عقیمی شد (Liu *et al.*, 2014). در صورتی‌که بیان miR167 در بساک لاین نرعقیم 7B-1 گوجه‌فرنگی کاهش یافت (Omidvar *et al.*, 2015). این مطالعات نشان می‌دهند که miR166 و miR167 نمو اندام‌های گل مانند میکروسپور (Luo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015)، را تنظیم می‌کنند.

ژن‌های هدف miR166 و miR167 به‌ترتیب همودومین-لوسین زیپر (HD-Zip) و عامل پاسخ به اکسین (ARFs) هستند که هر دو ژن‌های عامل رونویسی هستند. پیشنهاد شده است که یک عامل رونویسی لوسین زیپر مسئول تنظیم سنتز نشاسته در دانه‌های برنج است (Wang *et al.*, 2013). از آنجایی‌که نشاسته و سایر کربوهیدرات‌ها برای زنده‌مانی دانه گرده و رشد گلچه‌های ماده ضروری هستند (Barnabás *et al.*, 2008)، و تعداد دانه در گندم را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Ji *et al.*, 2010)، مطالعه مکانیزم‌هایی که آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند، اهمیت حیاتی دارد.

بیش‌تر مطالعات انجام‌شده در مورد نقش miRNA‌ها بر چرخه زندگی گیاهان در مراحل رشد رویشی متمرکز بوده‌اند، در حالی‌که در مورد تأثیر آن‌ها در مراحل زایشی در پاسخ به تنش‌های غیرزنده اطلاعات کمی در دسترس است. از این‌رو، هدف از این تحقیق، بررسی اثر تنش خشکی در تغییر بیان miR166 و miR167 در دو رقم گندم حساس و متحمل به خشکی بود که نقش مهمی در مرحله زایشی گیاهان دارند.

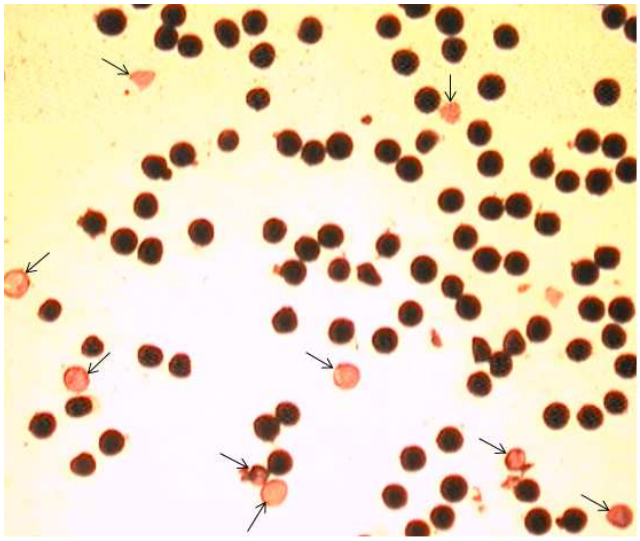
مواد و روش‌ها

در این تحقیق، تاثیر تنش خشکی در مرحله زایشی بر دو ژنوتیپ گندم نان، شامل لاین متحمل به خشکی (دزفول D-10) و رقم حساس (شیراز) که بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شدند (Zare *et al.*, 2016)، مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه انجام شد. بذرها در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۲۰cm و ارتفاع ۵۰cm کشت شدند. هر گلدان با مخلوطی از خاک، ماسه و کود دامی پوسیده به‌ترتیب به نسبت ۱:۳:۶ به‌میزان نه کیلوگرم پر شد. طی دوره رشد، سه عنصر غذایی پرمصرف نیتروژن، فسفر و پتاسیم به‌همراه عناصر کم‌مصرف با استفاده از کود مایع کامل توسط آب آبیاری (۲/۱۰۰۰) دو بار در هفته، برای رشد مناسب گیاه فراهم شد. مقدار آب آبیاری مورد نیاز بر اساس رسم منحنی مشخصات خاک تعیین شد. مقدار آب مورد نیاز برای مکش انتخابی خاک در شرایط بدون تنش به ۰/۰۵ بار و شرایط تنش به ۰/۱ بار اندازه‌گیری شد. همه گلدان‌ها تا دو هفته قبل از وارد شدن گیاهان به مرحله زایشی به‌صورت معمول آبیاری شدند. تنش خشکی دو هفته قبل از میوز آغاز شد. برای اطمینان از زمان مناسب اعمال تنش، رنگ‌آمیزی بساک‌ها به‌روش استوکارمن انجام شد (Sheehan *et al.*, 2012)، به‌این ترتیب که در مرحله میوزی، از بساک‌های گندم نمونه‌گیری و بلافاصله به ازت مایع منتقل شد. بعد از اتمام نمونه‌گیری و عبورگیاهان از مرحله زایشی، آبیاری مجدداً به‌صورت کامل تا مرحله رسیدگی دانه ادامه یافت.

بعد از رسیدن دانه‌های گرده، شاخص زنده‌مانی دانه گرده از نسبت دانه‌های گرده رنگ‌شده (شکل ۱) توسط محلول ید/یدید پتاسیم (I_2/KI) برای محتوای نشاسته بر دانه‌های گرده بدون نشاسته بر حسب درصد ارزیابی شد (Chhun *et al.*, 2007). تعداد دانه تشکیل‌شده در سنبله نیز هنگام رسیدن بوته‌ها شمارش شد و سپس شاخص تحمل به تنش (STI) (Saba *et al.*, 2010) برای تمام صفات بر اساس رابطه (۱) به‌دست آمد:

$$STI = \frac{Y_P \times Y_S}{(\overline{Y}_P)^2} \qquad (۱)$$

در این رابطه، Y_P و Y_S به‌ترتیب عملکرد یک ژنوتیپ تحت شرایط بدون تنش و تنش و $\overline{Y}_P$ میانگین عملکرد همه ژنوتیپ‌ها تحت شرایط بدون تنش است.



شکل ۱- گرده‌های رنگ شده با محلول ید/یدید پتاسیم (I_2/KI). پیکان‌ها گرده‌های فاقد نشاسته و عقیم را نشان می‌دهند

Figure 1. The wheat pollens stained by I_2/KI. The arrows indicate sterile and lacking starch pollens

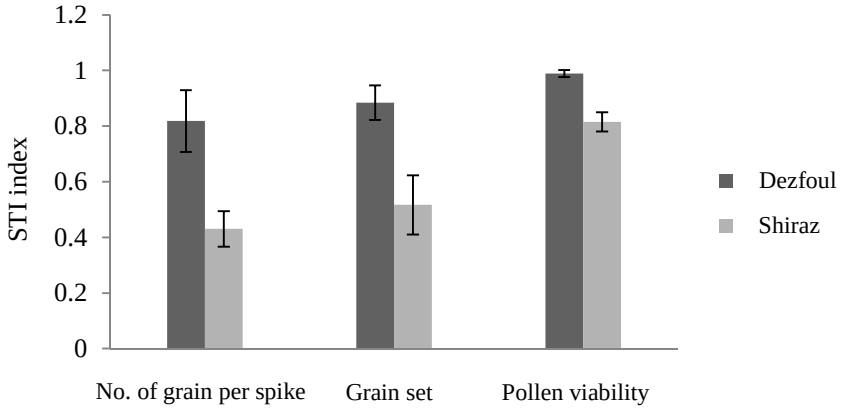
واکنش RT-PCR کمی و بررسی بیان miRNA

مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بساک‌های جوان و رسیده در ازت مایع پودر و با بافر استخراج RiboEx (GeneAll, Korea) مخلوط شد و RNA کل آن طبق دستورالعمل، استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به‌ترتیب با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتر ND-2000 (Nano Drop Thermo Scientific, USA) ارزیابی شد. آغازگرهای اختصاصی Stem-loop به‌منظور تولید cDNA از مطالعات قبلی استخراج شدند (Bakhshi *et al.*, 2017; Fard *et al.*, 2017). فرآیند سنتز cDNA توسط کیت HyperScript First strand Synthesis Kit (GeneAll, Korea) مطابق با دستورالعمل انجام شد. واکنش Real-time PCR کمی (qRT-PCR) توسط Hot FIREPolEvaGreen qPCR Mix Plus (noROX) (SoilsBioDyne, Estonia) و دستگاه Rotor-Gene (Qiagen, Germany) و با دو تکرار تکنیکی برای هر نمونه انجام شد. ۵۰ نانوگرم از cDNA و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر mi166 (Fard *et al.*, 2017) و miR167 (Bakhshi *et al.*, 2017) و ژن GAPDH به عنوان ژن داخلی مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های حاصل از qRT-PCR با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ و میزان خطای $\Delta\Delta CT \leq 0.05$ تجزیه و تحلیل شد (Schmittgen *et al.*, 2008).

نتایج و بحث

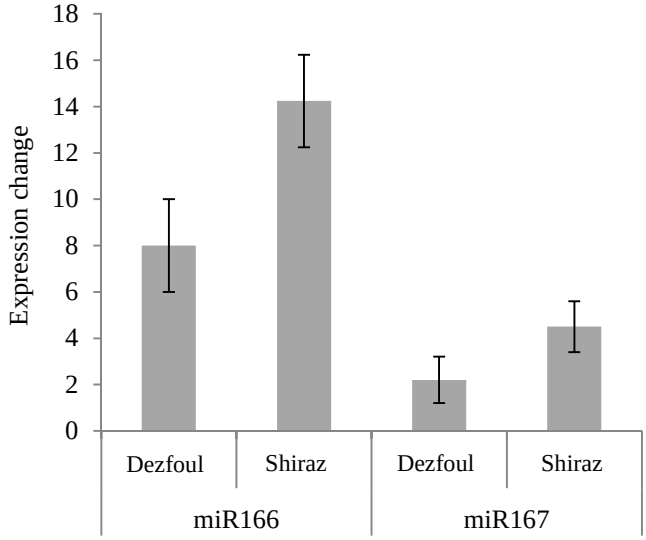
نتایج نشان داد که دو ژنوتیپ دزفول و شیراز از نظر شاخص STI مربوط به هر سه صفت مورد مطالعه دارای اختلاف آماری معنی‌داری بودند (شکل ۲). میزان STI هر سه صفت در ژنوتیپ متحمل خشکی (دزفول)، به‌صورت معنی‌داری بالاتر از ژنوتیپ حساس (شیراز) بود. میزان STI تعداد دانه در سنبله برای دو ژنوتیپ دزفول و شیراز به‌ترتیب برابر با ۰/۸۲ و ۰/۴۳ و برای مجموعه دانه در دزفول ۰/۸۸ و در شیراز ۰/۵۲ ارزیابی شد. در حالی‌که میزان این شاخص برای زنده‌مانی دانه گرده در ژنوتیپ‌های دزفول و شیراز متفاوت و به‌ترتیب برابر با ۰/۰۹۹ و ۰/۸۲ بود. مقدار شاخص تحمل به تنش (STI) در این دو ژنوتیپ نشان داد که ژنوتیپ متحمل به خشکی (دزفول) توانسته است در مقابل تنش خشکی مقاومت بیش‌تری از خود نشان دهد و تعداد دانه در سنبله، مجموعه دانه و زنده‌مانی دانه گرده بیش‌تری از ژنوتیپ حساس به خشکی (شیراز) داشته باشد.

نتایج حاصل از بیان miR166 در این تحقیق نشان داد که با اعمال تنش خشکی، میزان تغییرات بیان miR166 در دو ژنوتیپ متحمل (دزفول) و حساس به خشکی (شیراز) متفاوت و در ژنوتیپ حساس بسیار بیش‌تر بود (شکل ۳)، به‌طوری‌که ژنوتیپ حساس تحت شرایط تنش نسبت به شرایط بدون تنش (شاهد)، افزایش بیانی در حدود ۱۴/۲۴ برابر نشان داد، در صورتی‌که این افزایش بیان در ژنوتیپ متحمل در حدود هشت برابر شاهد بود (شکل ۳). این نتایج نشان‌دهنده تأثیر تنش خشکی بر بیان miR166 در هر دو ژنوتیپ است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که تغییر بیان miR166 تحت تنش خشکی در بافت‌های مختلف رویشی گندم متفاوت است (Akdogan *et al.*, 2016). بعلاوه، گزارش‌ها نشان می‌دهند که miR166 دارای نقش اساسی در نمو قسمت‌های مربوط به گل است، به‌طوری‌که افزایش بیش از حد آن رشد اندام‌های گل را کاهش می‌دهد (Luo *et al.*, 2013).



شکل ۲- شاخص تحمل به تنش (STI) سه صفت مهم در دو ژنوتیپ گندم متحمل (دزفول) و حساس به خشکی (شیراز)

Figure 2. Stress tolerance index (STI) of three important traits in two wheat tolerant (Dezfoul) and susceptible (Shiraz) genotypes



شکل ۳- تغییر بیان miRNA تحت شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های گندم متحمل (دزفول) و حساس به خشکی (شیراز)
Figure 3. Changes of miRNA expression under drought stress conditions in wheat tolerant (Dezfoul) and susceptible (Shiraz) genotypes

بر این اساس، احتمالاً ژنوتیپ متحمل، در مقایسه با شیراز، با تعدیل میزان بیان miR166 به‌نحوی که تغییرات کم‌تری نسبت به ژنوتیپ حساس داشته باشد، توانسته است آثار منفی این تغییرات را کاهش دهد و نمو اندام‌های گل و در نتیجه عملکرد را به‌میزان زیادی حفظ کند. مطالعه روی آرابیدوپسیس مشخص کرد که ژن‌های *MIR166/165* در بخش‌های مختلف اندام زایشی تغییر بیان داشتند که در بین آن‌ها رونویسی *MIR166g* در برخی بخش‌های اندام زایشی مانند پرچم گزارش شده است (Jung and Park, 2007). مطالعه ریزآرایه در پنبه نرعقیم ژنتیکی بیانگر بیان بالای سه خانواده miRNA از جمله miR166 نسبت به لاین نگهدارنده آن در سه مرحله مختلف از نمو بساک بود که بالاترین بیان در مرحله سلول مادری گرده گزارش شد. بر اساس نتایج این تحقیق این miRNA در نرعقیمی پنبه نقش مهمی ایفا می‌کند (Zhang *et al.*, 2013).

ژن هدف miR166 همودومین-لوسین زیپر (HD-ZipIII) است که یک ژن عامل رونویسی حفاظت‌شده می‌باشد (Zhang *et al.*, 2015). پروتئین مربوطه در نمو گیاه نقش بسیار مهمی دارد (Kim *et al.*, 2005). اعضایی از این خانواده با تحمل به خشکی رابطه دارند و توسط محرک‌های محیطی القا می‌شوند (Manavella *et al.*, 2008). برخی از ژن‌های HD-ZipIII طی جنین‌زایی و برخی در تشکیل مریستم گل مسئولیت دارند (Ariel *et al.*, 2007). مشخص شده است که همودومین-لوسین زیپر برای جوانه‌زنی دانه گرده آرابیدوپسیس ضروری است (Ribone *et al.*, 2015). تنظیم رونوشت‌های HD-ZipIII توسط پروتئین‌های ARGONAUTE10 (AGO10) انجام می‌شود، که به‌طور ویژه با miR166/165 در تعامل است (Zhu *et al.*, 2011). کنترل بیان *HD-ZIP* و *ARGONAUTE1* (*AGO1*) (و هومولوگ آن *AGO10*)، به‌ترتیب برای پایان دادن به سلول‌های بنیادی اندام گل و حفظ برنامه‌ریزی موقت درست سلول‌های بنیادی اندام گل ضروری است (Ji *et al.*, 2011). سرکوب *HD-ZIPIII* و افزایش بیان *FILAMENTOUSFLOWER* (*FIL*) که توسط miR165/6 و HYPONASTICLEAVES1 (HYL1) انجام می‌شود، ساختار میکروسپورانژیای داخلی و پرچم را تنظیم می‌کند (Lian *et al.*, 2013). از طرف دیگر، افزایش بیان برخی از اعضای دیگر کلاس IV پروتئین‌های HD-ZIP، مانندHDG3، دارای نقش منفی در تنظیم شکوفایی بساک هستند و در نتیجه باعث نرعقیمی می‌شوند (Li *et al.*, 2007). افزایش بیان miR166 در ژنوتیپ دزفول به‌اندازه ژنوتیپ شیراز بالا نبود که احتمالاً به‌دلیل تنظیم AGO10 منجر به عملکرد مناسب HD_ZIPIII شود. بنابراین، احتمالاً برنامه زمانی سلول‌های بنیادی اندام گل و سازماندهی ساختار این اندام‌ها به‌طور درستی انجام

گرفت و باعث شد که جوانه‌زنی دانه گرده روی اندام ماده با موفقیت بیش‌تری همراه شود.

با توجه به نتایج Real-time PCR، تنش خشکی موجب افزایش بیان miR167 در هر دو ژنوتیپ شد. تحت تنش خشکی بیان miR167 در ژنوتیپ دزفول به‌میزان ۲/۲۰ برابر القا شد، در حالی‌که میزان افزایش بیان miR167 در ژنوتیپ شیراز ۴/۵ برابر بود (شکل ۳). در مقایسه با miR166، تغییر بیان miR167 هر دو ژنوتیپ تحت شرایط تنش خشکی کم‌تر بود. تغییرات بیان miR167 در پاسخ به تنش غیرزنده گزارش شده است (Song *et al.*, 2017). نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده افزایش بیان miR167 در هر دو ژنوتیپ دزفول و شیراز تحت شرایط تنش خشکی بود که منطبق با نتایج به‌دست آمده از تأثیر تنش شوری و تنش خشکی در بیان miR167 در گیاه آرابیدوپسیس می‌باشد (Liu *et al.*, 2008).

توالی‌یابی دقیق miRNA های گیاهانی که در معرض سرما قرار گرفتند، وجود هفت miRNA از جمله miR167 را نشان دادند که با انتقال فاز و نمو گل رابطه داشت (An *et al.*, 2011). با توجه به تغییرات کم miR167 در ژنوتیپ متحمل به خشکی دزفول در مقایسه با ژنوتیپ حساس شیراز، احتمالاً ژنوتیپ متحمل توانسته است با تنش خشکی مقابله کند و تعادل بین نمو اندام گل و زنده‌مانی در تنش خشکی را تا حدودی با کنترل بیان miR167 حفظ کند. بیش‌تر miRNA ها از جمله miR167 به‌عنوان تنظیم کننده‌های بخش‌های مهمی از مسیرهای پیام‌رسانی در پاسخ به ABA (Sunkar and Zhu, 2004)، اکسین و جیبرلین (Liu *et al.*, 2016) و یا در بیوسنتز اسید جاسمونیک (Schommer *et al.*, 2008) و هورمون‌های گیاهی دیگر شناخته شده‌اند. از طرف دیگر، ABA می‌تواند بیان miR167 را کاهش و در نتیجه بیان *ARF* را افزایش دهد که این نشان‌دهنده رابطه بین ABA و پیام‌رسانی اکسین است (Ding *et al.*, 2013). همچنین، عقیده بر این است که اکسین در گل‌دهی و نمو پرچم دخالت دارد (Sundberg and Østergaard, 2009; Krizek, 2011).

در مطالعه حاضر، افزایش بیان miR167 در هر دو ژنوتیپ به‌اندازه افزایش بیان miR166 نبود. بنابراین، احتمالاً ژنوتیپ‌هایی که در این تحقیق مطالعه شدند، سنتز miR167 را از طریق تنظیم پیام‌رسانی ABA محدود کردند، اگرچه برای اطمینان از این پدیده بایستی میزان ABA در بساک اندازه‌گیری شود. ممکن است کاهش بیان miR167 در ژنوتیپ‌های مورد بررسی، پیام‌رسانی اکسین را راه‌اندازی کند و به‌دلیل اثر اکسین روی اندام‌های زایشی نر، اجزای عملکرد تغییر معنی‌داری نداشته باشد و به‌نوبه خود باعث افزایش شاخص تحمل به تنش در هر سه صفت شود. اثر اکسین بر بساک از انتهای مرحله میوز آغاز می‌شود و زمان شکوفایی بساک و رسیدگی دانه گرده را هماهنگ می‌کند (Cecchetti *et al.*, 2008).

عوامل پاسخ به اکسین (*ARF*s)، فعال‌کننده‌ها و سرکوبگران رونویسی هستند و به پروموتورهای ژن‌های پاسخ زودهنگام به اکسین (Tiwari *et al.*, 2003)، مانند *GH3* (Teotia *et al.*, 2008)، متصل می‌شوند. از بین این ژن‌ها، ژن‌های *ARF6* و *ARF8* مسئول تنظیم رشد اندام‌های زایشی و رویشی به‌ویژه در مراحلی هستند که در کارایی باروری ضروری است (Liu *et al.*, 2014). ژن‌های پاسخ‌دهنده زودهنگام *GH3*-like در سرکوب سطوح اکسین فعال نقش مهمی دارند (Teotia *et al.*, 2008). ژن‌های *ARF6* و *ARF8* ژن‌هایی هستند که دارای نواحی میانی غنی از گلوتامین (Q-rich) هستند و به‌عنوان فعال‌کننده رونویسی عمل می‌کنند (Teotia *et al.*, 2008). جهش در ژن‌هایی که این دو عامل را رمز می‌کنند، باعث تأخیر در طویل‌شدن اندام‌های گل و در نتیجه تأخیر در باز شدن جوانه‌های گل می‌شود (Tabata *et al.*, 2009). بعلاوه، *ARF6* و *ARF8* برای فعال‌کردن ژن‌های بیوسنتز اسید جاسمونیک و اثرگذاری بر فرایند نمو اندام‌های گل از طریق سرکوب ژن‌های *KNOX* کلاس یک ضروری هستند (Tabata *et al.*, 2009).

miR167 در آرابیدوپسیس، ژن *ARF8* را در سطح رونویسی سرکوب و از فعالیت *ARF6* در سطح ترجمه جلوگیری می‌کند و باعث نقصان در تمام بخش‌های اندام نر و نرعقیمی می‌شود (Ru *et al.*, 2006). با وجود این، وو و همکاران (Wu *et al.*, 2006) ادعا کردند که *miR167* نقش حیاتی در الگوی درست بیان ژن و باروری تخمک‌ها و بساک‌ها در آرابیدوپسیس دارد. بنابراین، ژنوتیپی که هم بتواند miR167 را بیان کند و هم بیان آن را در سطح قابل قبول کنترل کند، شایستگی زنده ماندن و زادآوری موفق را تحت تنش دارد. ظاهراً، تمام توانایی‌های ذکر شده، موجب نمو طبیعی می‌شود و رسیدگی دانه گرده و شکوفایی بساک به‌صورت همزمان در زمان طویل‌شدن اندام‌های گل اتفاق می‌افتد و در نتیجه منجر به باروری مناسب می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

تنش خشکی در مرحله زایشی گندم آثار مهمی بر اندام نر و به‌ویژه نمو آن گذاشت. نقصان در نمو اندام نر و به‌ویژه در رسیدگی و جوانه‌زنی دانه گرده، تعداد دانه در سنبله یعنی مهم‌ترین جزء از اجزای عملکرد گندم را تحت تأثیر قرار داد. مطالعات قبلی آشکار کردند که تنش خشکی اثر مستقیم بر بافت‌های زایشی ندارد (Fotovat *et al.*, 2017). بنابراین، مسیرهای ترارسانی تنش، از جمله تنظیم ژن‌ها توسط miRNAها، می‌توانند در تفسیر اثر تنش در مرحله زایشی گندم مؤثر باشند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بیان miR166 و miR167 در اثر تنش خشکی تغییر یافت و این تغییر در دو ژنوتیپ مورد مطالعه متفاوت بود. با توجه به اهمیت نقش miRNAها در باروری، تغییر در میزان بیان آن‌ها و نیز مکانیزم‌های عمل آن‌ها تحت شرایط تنش خشکی می‌بایستی بیش‌تر مورد توجه قرار گیرد. در مجموع، با توجه به تغییرات کم‌تر بیان این دو miRNA در ژنوتیپ متحمل به خشکی دزفول نسبت به ژنوتیپ حساس به خشکی شیراز، احتمالاً ژنوتیپ متحمل دزفول توانایی بیش‌تری در تعدیل بیان آن‌ها داشت و توانست با تأثیر مثبت روی رشد زایشی، میزان باروری را تا حدود معنی‌دار و قابل قبول حفظ کند.

References

Akdogan, G., Tufekci, E. D., Uranbey, S. and Unver, T. 2016. miRNA-based drought regulation in wheat. **Functional and Integrative Genomics** 16: 221-233.

Alexandratos, N. and Bruinsma, J. 2012. World agriculture towards 2030/2050: The 2012 revision, ESA Working Paper, FAO, Rome, Italy.

An, F. M., Hsiao, S. R. and Chan, M. T. 2011. Sequencing-based approaches reveal low ambient temperature-responsive and tissue-specific microRNAs in phalaenopsis orchid. **PLoS One** 6: e18937.

Ariel, F. D., Manavella, P. A., Dezar, C. A. and Chan, R. L. 2007. The true story of the HD-Zip family. **Trends in Plant Science** 12: 419-426.

Bakhshi, B., Fard, E. M., Gharechahi, J., Safarzadeh, M., Nikpay, N., Fotovat, R., Azimi, M. 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.

Barnabás, B., Jäger, K. and Fehér, A. 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. **Plant, Cell and Environment** 31: 11-38.

Cecchetti, V., Altamura, M. M., Falasca, G., Costantino, P. and Cardarelli, M. 2008. Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. **The Plant Cell** 20: 1760-1774.

Chhun, T., Aya, K., Asano, K., Yamamoto, E., Morinaka, Y., Watanabe, M., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. and Ueguchi-Tanaka, M. 2007. Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice**. The Plant Cell** 19: 3876-3888.

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: 3077-3086.

Dorion, S., Lalonde, S. and Saini, H. S. 1996. Induction of male sterility in wheat by meiotic-stage water deficit is preceded by a decline in invertase activity and changes in carbohydrate metabolism in anthers. **Plant Physiology** 111: 137-145.

FAO. 2016. Statistics: FAOSTAT agriculture. Food and Agriculture Organization. Retrieved September 20, 2018, from http://fao.org/crop/statistics.

Fard, E. M., Bakhshi, B., Farsi, M., Kakhki, A. M., Nikpay, N., Ebrahimi, M. A., Mardi, M. and Salekdeh, G. H. 2017. MicroRNAs regulate the main events in rice drought stress response by manipulating the water supply to shoots. **Molecular Biosystems** 13: 2289-2302.

Fotovat, R., Alikhani, M., Valizadeh, M., Mirzaei, M. and Salekdeh, G. H. 2017. A proteomics approach to discover drought tolerance proteins in wheat pollen grain at meiosis stage. **Protein and Peptide Letters** 24: 26-36.

Fujioka, T., Kaneko, F., Kazama, T., Suwabe, K., Suzuki, G., Makino, A., Mae, T., Endo, M., Kawagishi-Kobayashi, M. and Watanabe, M. 2008. Identification of small RNAs in late developmental stage of rice anthers. **Genes and Genetic Systems** 83: 281-284.

Grant-Downton, R., Hafidh, S., Twell, D. and Dickinson, H. G. 2009. Small RNA pathways are present and functional in the angiosperm male gametophyte. **Molecular Plant** 2: 500-512.

Huntzinger, E. and Izaurralde, E. 2011. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature Reviews Genetics** 12: 99-110.

Ji, L., Liu, X., Yan, J., Wang, W., Yumul, R. E., Kim, Y. J., Dinh, T. T., Liu, J., Cui, X. and Zheng, B. 2011. ARGONAUTE10 and ARGONAUTE1 regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in *Arabidopsis*. **PLoS Genetics** 7: e1001358.

Ji, X., Shiran, B., Wan, J., Lewis, D. C., Jenkins, C. L., Condon, A. G., Richards, R. A. and Dolferus, R. 2010. Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. **Plant, Cell and Environment** 33: 926-942.

Jian-Chang, Y., Kai, L., Zhang, S. F., Xue-Ming, W., Zhi-Qin, W. and Li-Jun, L. 2008. Hormones in rice spikelets in responses to water stress during meiosis. **Acta Agronomica Sinica** 34: 111-118.

Jung, J. H. and Park, C. M. 2007. MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in Arabidopsis. **Planta** 225: 1327-1338.

Kim, J., Jung, J. H., Reyes, J. L., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Chung, K. S., Kim, J. A., Lee, M., Lee, Y. and Narry Kim, V. 2005. microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. **The Plant Journal** 42: 84-94.

Koonjul, P., Minhas, J., Nunes, C., Sheoran, I. and Saini, H. 2005. Selective transcriptional down-regulation of anther invertases precedes the failure of pollen development inwater-stressed wheat. **Journal of Experimental Botany** 56: 179-190.

Krizek, B. A. 2011. Auxin regulation of Arabidopsis flower development involves members of the AINTEGUMENTA-LIKE/PLETHORA (AIL/PLT) family. **Journal of Experimental Botany** 62: 3311-3319.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. 1993. The C. elegans heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell** 75: 843-854.

Li, B., Qin, Y., Duan, H., Yin, W. and Xia, X. 2011. Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*. **Journal of Experimental Botany** 62: 3765-3779.

Li, Q. J., Xu, B., Chen, X. Y. and Wang, L. J. 2007. The effects of increased expression of an *Arabidopsis HD-ZIP* gene on leaf morphogenesis and anther dehiscence. **Plant Science** 173: 567-576.

Li, Z. F., Zhang, Y. C. and Chen, Y. Q. 2015. miRNAs and lncRNAs in reproductive development. **Plant Science** 238: 46-52.

Lian, H., Li, X., Liu, Z. and He, Y. 2013. HYL1 is required for establishment of stamen architecture with four microsporangia in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany** 64: 3397-3410.

Liu, F., Andersen, M. N. and Jensen, C. R. 2003. Loss of pod set caused by drought stress is associated with water status and ABA content of reproductive structures in soybean. **Functional Plant Biology** 30: 271-280.

Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A. and Zheng, C. C. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **RNA** 14: 836-843.

Liu, N., Wu, S., Van Houten, J., Wang, Y., Ding, B., Fei, Z., Clarke, T. H., Reed, J. W. and Van Der Knaap, E. 2014. Down-regulation of AUXIN RESPONSE FACTORS 6 and 8 by microRNA 167 leads to floral development defects and female sterility in tomato. **Journal of Experimental Botany** 65: 2507-2520.

Liu, X., Xu, T., Dong, X., Liu, Y., Liu, Z., Shi, Z., Wang, Y., Qi, M. and Li, T. 2016. The role of gibberellins and auxin on the tomato cell layers in pericarp via the expression of ARFs regulated by miRNAs in fruit set. **Acta Physiologiae Plantarum** 38: 77-88.

Luo, Y., Guo, Z. and Li, L. 2013. Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. **Developmental Biology** 380: 133-144.

Manavella, P. A., Dezar, C. A., Ariel, F. D., Drincovich, M. F. and Chan, R. L. 2008. The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up-regulated in darkness, reducing the transcription of photosynthesis-related genes. **Journal of Experimental Botany** 59: 3143-3155.

Nonomura, K. I., Morohoshi, A., Nakano, M., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H. and Kurata, N. 2007. A germ cell–specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. **The Plant Cell** 19: 2583-2594.

Omidvar, V., Mohorianu, I., Dalmay, T. and Fellner, M. 2015. Identification of miRNAs with potential roles in regulation of anther development and male sterility in 7B-1 male sterile tomato mutant. **BMC Genomics** 16: 878-894.

Ribone, P. A., Capella, M. and Chan, R. L. 2015. Functional characterization of the homeodomain leucine zipper I transcription factor AtHB13 reveals a crucial role in *Arabidopsis* development. **Journal of Experimental Botany** 66: 5929-5943.

Ron, M., Saez, M. A., Williams, L. E., Fletcher, J. C. and McCormick, S. 2010. Proper regulation of a sperm-specific cis-nat-siRNA is essential for double fertilization in *Arabidopsis*. **Genes and Development** 24: 1010-1021.

Ru, P., Xu, L., Ma, H. and Huang, H. 2006. Plant fertility defects induced by the enhanced expression of microRNA 167. **Cell Research** 16: 457-465.

Saba, J., Moghaddam, M., Ghasemi, K. and Nishabouri, M. 2010. Genetic properties of drought resistance indices. **Journal of Agricultural Science and Technology** 3: 43-49.

Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols** 3: 1101-1108.

Schommer, C., Palatnik, J. F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Nath, U. and Weigel, D. 2008. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. **PLoS Biology** 6: e230.

Sheehan, M. J. and Pawlowski, W. P. 2012. Imaging chromosome dynamics in meiosis in plants. **Methods in Enzymology** 505: 125-143.

Shriram, V., Kumar, V., Devarumath, R., Khare, T. S. and Wani, S. H. 2016. MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. **Frontiers in Plant Science** 7: 817-835.

Siddique, M., Hamid, A. and Islam, M. 2000. Drought stress effects on water relations of wheat. **Botanical Bulletin of Academia Sinica** 41: 35-39.

Song, G., Zhang, R., Zhang, S., Li, Y., Gao, J., Han, X., Chen, M., Wang, J., Li, W. and Li, G. 2017. Response of microRNAs to cold treatment in the young spikes of common wheat. **BMC Genomics** 18: 212-227.

Sundberg, E. and Østergaard, L. 2009. Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 1: a001628.

Sunkar, R. and Zhu, J. K. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 16: 2001-2019.

Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C. E., Ueno, Y., Yamamoto, K. T., Machida, Y., Nakamura, K. and Ishiguro, S. 2009. *Arabidopsis* auxin response factor 6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 *KNOX* genes. **Plant and Cell Physiology** 51: 164-175.

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 thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing. **Plant Physiology** 159: 721-738.

Teotia, P. S., Mukherjee, S. K. and Mishra, N. S. 2008. Fine tuning of auxin signaling by miRNAs. **Physiology and Molecular Biology of Plants** 14: 81-90.

Tiwari, S. B., Hagen, G. and Guilfoyle, T. 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. **The Plant Cell** 15: 533-543.

Twell, D. 2011. Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. **Sexual Plant Reproduction** 24: 149-160.

Wang, J. C., Xu, H., Zhu, Y., Liu, Q. Q. and Cai, X. L. 2013. OsbZIP58, a basic leucine zipper transcription factor, regulates starch biosynthesis in rice endosperm. **Journal of Experimental Botany** 64: 3453-3466.

Wei, M., Wei, H., Wu, M., Song, M., Zhang, J., Yu, J., Fan, S. and Yu, S. 2013. Comparative expression profiling of miRNA during anther development in genetic male sterile and wild type cotton. **BMC Plant Biology** 13: 66-80.

Wu, M. F., Tian, Q. and Reed, J. W. 2006. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. **Development** 133: 4211-4218.

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: 123-134.

Yin, F., Gao, J., Liu, M., Qin, C., Zhang, W., Yang, A., Xia, M., Zhang, Z., Shen, Y. and Lin, H. 2014. Genome-wide analysis of water-stress-responsive microRNA expression profile in tobacco roots. **Functional and Integrative Genomics** 14: 319-332.

Zare, S., Shobbar, Z. S. and Fotovat, R. 2016. Expression analysis of genes involved in the male sterility of wheat under drought stress during meiosis. **Journal of Crop Biotechnology** 13: 69-77. (In Persian with English Abstract).

Zhang, Q., Li, J., Sang, Y., Xing, S., Wu, Q. and Liu, X. 2015. Identification and characterization of microRNAs in *Ginkgo Biloba* var. Epiphylla Mak .**PLoS One** 10: e0127184.

Zhang, Y., Yin, Z., Feng, X. and Shen, F. 2013. Differential expression of microRNAs between 21A genetic male sterile line and its maintainer line in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Plant Studies** 3: 13-27.

Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S. H., Liou, L. W., Barefoot, A., Dickman, M. and Zhang, X. 2011. *Arabidopsis* Argonaute 10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. **Cell** 145: 242-256.

doi: 10.22124/c.2018.10943.1418

University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 8, No. 3, Autumn 2018 (359-369)

Effect of drought stress on expression of two important miRNAs in anther of two different wheat genotypes in term of drought stress

Nasrin Mehri[1], Reza Fotovat[2*] and Ehsan Mohsenifard[3]

Received: August 1, 2018 Accepted: September 22, 2018

Abstract

A large amount of the world lands under the cultivation of wheat is under drought stress. In cereals, the reproductive stage is the most sensitive phase to drought stress. Despite the importance of drought stress in reproductive stage and its role in wheat yield reduction, the mechanisms involved in it have been less studied. In the present study, the expression of miR166 and miR167 in mature anthers of two tolerant (Dezfoul or D-10) and susceptible (Shiraz) wheat genotypes under drought conditions in reproductive stage was investigated. Stress tolerance index (STI) for grain number per spike, grain set and pollen viability was higher in tolerant genotype, Dezfoul, compared to susceptible genotype, Shiraz. Drought stress induced expression level of both miRNAs in both genotypes. The amount of miR166 increase in the susceptible genotype, Shiraz (over 14 times compared to the non-stress conditions) was about twice more than the tolerant genotype, Dezfoul (about 8 times more than the non-stress conditions). Under drought stress conditions, expression of miR167 in Dezfoul genotype was more than two fold and in Shiraz genotype more than four times higher than the non-stress conditions. Both miR166 and miR167 regulate development of floral organs such as microspore development. In conclusion, the effect of drought stress on their expression changes can affect male sterility in wheat, and modifying the expression of these two miRNAs can lead to efficiency of pollen development and successful anther dehiscence which is rooted in signal transduction.

Keywords: Gene expression, Male sterility, Meiosis, Pollen viability

1. Ph. D. Student, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. Assoc. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3. Assist. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
* Corresponding author: r_fotovat@znu.ac.ir