

Study the Expression Changes of *Pdu-miR319a*, *Pdu-miR398a-3p* and Their Target Genes in Reproductive Tissues of Almond under Cold Stress

Marzieh Karimi 

Graduated PhD Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: mr.karimi83@gmail.com

Behrouz Shiran 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: beshiran45@gmail.com

Mohammad Rabiei 

Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: rabiei@sku.ac.ir

Hossein Fallahi 

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran. Email: fallahi.raziuni@gmail.com

Abstract

Objective

Due to the low chilling requirement of almond, this plant encounters yearly with irreparable damages by late spring frost. The introduction of tolerant cultivars using genetic engineering methods, depends on the identification of molecular mechanisms involved in cold stress response. In recent studies the important role of small RNAs especially miRNAs have been confirmed in the response and adaptation of plants to biotic and abiotic stresses. Therefore, based on the sRNA sequencing results of almond, among identified cold-responsive miRNAs, in this study, the expression pattern of *Pdu-miR319a* and *Pdu-miR398a-3p* along with their targets were compared between two cold tolerant and sensitive genotypes of almond.

Materials and methods

The reproductive tissues of almond (anther and ovary) from H as tolerant genotype and Sh12 as sensitive variety were treated under 0 and -2 °C. After RNA extraction and cDNA synthesis Real Time PCR was performed and expression data were analyzed by $2^{-\Delta\Delta ct}$ method.

Results

MiR319a was identified with a positive regulatory effect in response to both cold stress levels in two genotypes. The downregulation of *GAMYB-like* was observed in both tissues of H under 0°C and also in the ovary of Sh12 under 0 and -2 °C. The expression of *TCP4* was significantly increased in H under both stress levels. MiR398a-3p was detected with a negative regulatory effect in the H but the induction of *CTR6* was observed in both tissues under -2°C. In Sh12 the upregulation of miR398a-3p and the downregulation of *CTR6* was observed.

Conclusions

Regarding to the differential expression of studied genes between two genotypes, in order to complete the molecular information about their function, it is recommended to examine their expression among other tolerant and sensitive varieties under different cold stress treatments, and followed by their function should be assessed using methods such as over expression, amiRNA technology and target mimicry.

Keywords: Almond, Cold stress, Reproductive tissue, Expression pattern, MiRNA.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Karimi M, Shiran B, Rabiei M, Fallahi H (2021) Study the expression changes of *Pdu-miR319a*, *Pdu-miR398a-3p* and their target genes in reproductive tissues of almond under cold stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 13(1), 93-114.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (1), 93-114.

DOI: 10.22103/jab.2021.15888.1236

Received: January 20, 2021.

Accepted: February 24, 2021.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مطالعه تغییرات بیان *Pdu-miR319a* و *Pdu-miR398a* و ژن‌های هدف آن‌ها در اندام‌های

زایشی بادام تحت تنش سرما

مرضیه کریمی

دانش آموخته دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. رایانامه: mr.karimi83@gmail.com

بهروز شیران

*نویسنده مسئول: استاد تمام، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. رایانامه: beshiran45@gmail.com

محمد ربیعی

استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. رایانامه: rabiei@sku.ac.ir

حسین فلاحی

استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کد پستی: ۶۷۱۴۴۱۴۹۷۱، کرمانشاه، ایران. رایانامه: fallahi.raziuni@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۱

چکیده

هدف: درخت بادام به دلیل نیاز سرمایی کم، به سرمای دیررس بهاره حساس بوده و همه ساله متحمل خسارات جبران‌ناپذیری توسط این تنش می‌شود. لازمه توسعه ارقام متحمل با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، شناخت مکانیسم‌های مولکولی دخیل در پاسخ گیاه به تنش سرما می‌باشد. در مطالعات اخیر نقش مهم RNAهای کوچک به ویژه میکروRNAها در پاسخ و سازگاری گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی اثبات شده است. از این‌رو بر اساس نتایج توالی‌یابی sRNAهای بادام از میان میکروRNAهای پاسخ دهنده به تنش سرما، در این مطالعه *Pdu-miR319a* و *Pdu-miR398a-3p* انتخاب و الگوی بیان آن‌ها به همراه ژن هدفشان در بین دو ژنوتیپ متحمل و حساس به سرمای بادام تحت تنش سرما مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش بافت‌های زایشی ب‌ساک و تخمدان ژنوتیپ متحمل H و رقم حساس به سرمای Sh12 تحت تیمارهای صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، واکنش Real time PCR انجام و تجزیه و تحلیل داده‌های بیان نیز با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ صورت گرفت.

نتایج: ژن miR319a با اثر تنظیمی مثبت در پاسخ به هر دو سطح تنش سرما در هر دو ژنوتیپ شناسایی گردید. کاهش بیان *GAMYB-like* در هر دو بافت زایشی ژنوتیپ H در پاسخ به تنش صفر درجه سانتی‌گراد و نیز در بافت تخمدان Sh12 در پاسخ به هر دو سطح تنش مشاهده شد. ژن *TCP4* در ژنوتیپ H در پاسخ به هر دو سطح تنش افزایش معنی‌داری را نشان داد. MiR398a-3p با اثر تنظیمی منفی در ژنوتیپ H شناسایی شد. اما افزایش بیان ژن *CTR6* در هر دو بافت در پاسخ به تنش ۲- درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. در رقم Sh12 افزایش بیان miR398a-3p و کاهش بیان *CTR6* در بافت تخمدان Sh12 در پاسخ به تنش ۲- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به مشاهده افتراق بیان ژن‌های مورد مطالعه در بین دو ژنوتیپ متحمل و حساس، به منظور تکمیل اطلاعات مولکولی در رابطه با عملکرد آن‌ها، توصیه می‌شود بیان آن‌ها در سایر ارقام متحمل و حساس و تحت تیمارهای مختلف تنش سرمایی نیز سنجیده شود و به دنبال آن عملکرد آن‌ها با استفاده از روش‌هایی نظیر بیش بیان کردن ژن‌ها، تکنولوژی amiRNA و روش target mimicry بررسی گردد.

کلیدواژه‌ها: بادام، تنش سرما، بافت زایشی، بیان ژن، میکروRNA.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: کریمی مرضیه، شیران بهروز، ربیعی محمد، فلاحی حسین (۱۴۰۰) مطالعه تغییرات بیان *Pdu-miR319a*، *Pdu-miR398a* و ژن‌های هدف آن‌ها در اندام‌های زایشی بادام تحت تنش سرما. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۱)، ۹۳-۱۱۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

تنش‌های غیرزیستی به شکل منفی، رشد، تولید و بقای گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند و از این‌رو به عنوان عوامل تعیین کننده و کلیدی در کاهش محصولات در سراسر جهان به حساب می‌آیند. تنش سرما بیشترین تهدید را برای رشد و نمو محصولات کشاورزی در میان سایر تنش‌های غیرزیستی دارد و از این‌رو سبب کاهش پراکنش گونه‌های گیاهی می‌شود. تنش سرما بر اساس شدت به دو دسته کلی تنش سرما و یخ‌زدگی تقسیم می‌شود. تنش سرما در دامنه دمایی صفر تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد اتفاق می‌افتد،

در حالی که تنش یخ‌زدگی در دماهای کمتر از صفر درجه سانتی‌گراد به وقوع می‌پیوندد (Sinha et al. 2015). علایم صدمه ناشی از تنش سرما شامل جوانه‌زنی ضعیف، باز ماندن گیاهچه از رشد، آسیب‌های سطحی، ظاهر آبکی، خشکی، تغییر رنگ، تجزیه بافت و تسریع پیری می‌باشد. تنش سرما از طریق عقیم شدن گل، به شکل منفی بر رشد زایشی گیاه اثر می‌گذارد. خسارت‌های اصلی که توسط تنش سرما ایجاد می‌شود، شامل تغییرات غشای سلولی، نشت یونی و تغییر در فعالیت آنزیمی می‌باشد (Dhanapal & Crisosto 2013). هر چند بسیاری از درختان میوه به منظور توسعه جوانه‌های گل دهنده نیاز به گذراندن دوره مشخصی از سرما در فصل زمستان را دارند، اما وقوع سرمای اواخر زمستان و اوایل بهار سبب آسیب زدن به جوانه‌ها، گل‌ها و میوه‌های در حال نمو و در نتیجه کاهش میزان باروری آن‌ها می‌گردد. در میان خانواده‌های گوناگون گیاهی، جنس‌های مختلف خانواده گل سرخیان^۱ به ویژه میوه‌های هسته‌دار نظیر هلو، بادام، آلو و زردآلو به دلیل جوانه‌زنی زود هنگام دچار خسارت سرمای بهاره بیشتری می‌گردند. در ایران در طی سالیان متمادی کشت و توسعه ارقام مختلف بادام از جایگاه ویژه‌ای برخوردار شده است و باغ‌داران با تجربه با کاشت، داشت و برداشت این محصول آشنا شده‌اند و با شناخت ویژگی‌های این درخت از قبیل تحمل‌پذیری آن به تنش‌های محیطی (کم‌آبی)، مقاومت به خاک‌های آهکی (کلوروز آهن) و زمین‌های سنگلاخی، کاشت آن را توسعه داده‌اند (Sorkhe 2011). خاصیت انباری بسیار بالا، سهولت نگهداری و حمل و نقل، ضایعات کم، قابلیت بالای صادرات و ارزآوری و نیز ظرفیت قابل توجه کشت بادام در کشور سبب شد که سیاست افزایش سطح زیر کشت آن در طول برنامه‌های توسعه جزء اصلی‌ترین اهداف زیربخش باغبانی قرار گیرد (Imani 2000). با وجود سازگاری بالای این محصول با اقلیم ایران، هر ساله سرما و یخ‌زدگی بهاره در مراحل فنولوژیکی مختلف گل‌دهی در بادام خسارت جبران‌ناپذیری را وارد نموده و سبب کاهش محصول به میزان ۶۰ تا ۱۰۰ درصد شده است (Afshari & Parvane 2013). در استان چهارمحال و بختیاری نیز که رتبه اول تولید بادام را در ایران به خود اختصاص داده است، خسارت سرما در برخی از سال‌ها، سبب از بین رفتن ۷۰ درصد محصولات شده است. تکنیک‌های متداول و مرسوم نظیر آب‌پاشی، کاهش میزان کودهای نیتروژن، سیستم‌های نگهداری خاک و تجهیزاتی گرمایشی اغلب در باغ‌های تجاری به منظور محدود ساختن اثرات زیان‌بار سرمای دیررس بهاره استفاده می‌شود (Imani & Mahamadkhani 2011). در کنار استفاده از روش‌های سنتی و مرسوم، استفاده از دانش مبتنی بر ژنتیک مولکولی می‌تواند به بهبود و توسعه گیاهان متحمل به تنش سرما کمک شایانی کند. لازمه کاربردی شدن روش‌های نوین مولکولی در راستای این اهداف، بدست آوردن اطلاعات در زمینه مکانیسم‌های تنظیمی گیاه در مواجهه با تنش‌های مختلف به ویژه تنش سرماست. به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی^۲ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص

¹Rosacea

² DNA

فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن تو سط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016). در زمانی که گیاهان با تنش‌های مختلف به ویژه تنش سرما روبرو می‌شوند، مکانیسم‌های تنظیمی تکامل یافته در سه سطح بعد از رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه القا شده و به دنبال آن سرماسازگاری و تحمل به یخ‌زدگی در این گیاهان بروز می‌یابد. تاکنون شناسایی برخی از مکانیسم‌های پس از رونویسی تحت تنش سرما از طریق شناسایی و نمایش الگوی بیان میکروRNAها^۳ با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی با توان بالا فراهم شده است و نقش اجزای مولکولی مختلف در درک تنش سرما، انتقال سیگنال سرما و نیز تنظیم بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش سرما مشخص شده است (Alisoltani et al. 2019; Yang et al. 2017; Ablat et al. 2019; Zhou et al. 2019). MirRNAها به عنوان مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های ژن در سطح پس از رونویسی محسوب می‌شوند و عملکرد اکثر آن‌ها از طریق افزایش و یا کاهش بیان شان آشکار شده است (Zhang et al. 2006). این مولکول‌های ۲۱-۲۴ نوکلئوتیدی فرایندهای نمو و فیزیولوژیکی مختلفی را کنترل می‌کنند و کشف آن‌ها رویکرد جدیدی را به سمت درک شبکه‌های تنظیمی پیچیده ژنی ایجاد کرده است (He & Hannon 2004). در مطالعه Karimi et al. (2016) تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی داده‌های مربوط به توالی‌یابی sRNAهای بادام، miRNAهای پاسخ‌دهنده و ژن هدفشان را در اندام‌های زایشی تحت تنش سرما مشخص نمود. با توجه به نتایج بدست آمده، دو ژن *Pdu-miR319a* و *Pdu-miR398a-3p* به عنوان miRNAهای پاسخ‌دهنده به تنش سرما معرفی شدند. از طرف دیگر در مطالعات متعددی نقش تنظیمی این دو miRNA در پاسخ سازگاری به تنش سرما آشکار شده است (Thiebaut et al. 2019; Wang et al. 2014; Song et al. 2017; Ablat et al., 2012). از این‌رو در این مطالعه به منظور تأیید نتایج مطالعه پیشین، الگوی بیان دو ژن *Pdu-miR319a* و *Pdu-miR398a-3p* در بین دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تیمارهای مختلف تنش سرما با استفاده از روش Real time PCR^۴ مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین اثر تنظیمی بیان این دو

³ miRNAs⁴ RT-qPCR

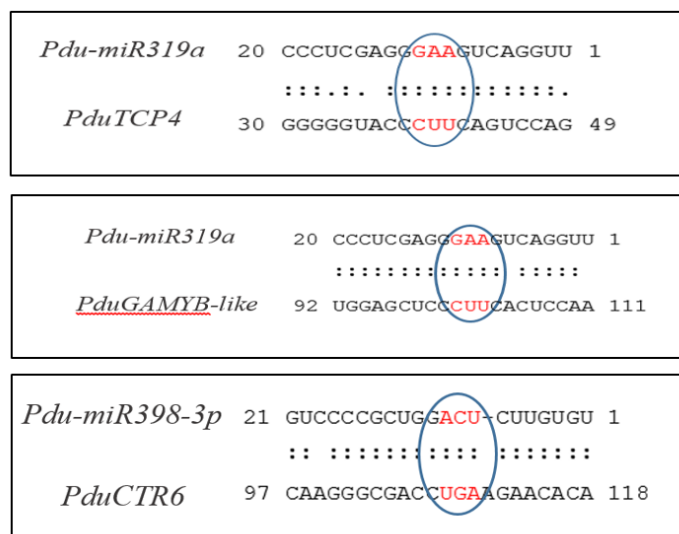
ژن بر روی ژن‌های هدفشان نیز بررسی گردید. این مطالعه که با هدف شناسایی و تأیید miRNAهای پاسخ دهنده به تنش سرما صورت گرفته است، تنها مقدمه‌ای در راستای بهبود هدف‌های صلاحی افزایش تحمل در بادام از طریق به کارگیری استراتژی‌های جدید از جمله مهندسی miRNAهای پاسخ دهنده به تنش با هدف افزایش بیان یا سرکوب ژن‌های هدف مرتبط با شبکه‌های تنظیمی تنش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ژنوتیپ نسبتاً متحمل به سرما و دیرگل H و رقم حساس به سرمای و دیرگل Sh12 استفاده گردید. در مرحله غنچه‌صورتی^۵، بر اساس تکنیک شاخه بریده (Imani et al. 2012)، شاخه‌های یکساله نمونه‌برداری و بعد از جداسازی، به مدت ۲۴ ساعت در آب حاوی ساکارز ۵٪ در صد قرار داده شدند. برنامه اعمال تنش سرما بر اساس مطالعه Mousavi et al. (2014) طراحی گردید و دو دمای ۰ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۳ ساعت) و ۲- درجه سانتی‌گراد (به مدت ۲ ساعت) به عنوان تیمارهای تنش در نظر گرفته شد. نمونه‌های شاهد نیز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نمونه‌برداری شدند. پس از اعمال تیمار دما، بافت‌های بساک و تخمدان در حداقل سه تکرار بیولوژیکی نمونه‌برداری و بلافاصله به نیتروژن مایع منتقل و در نهایت در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. استخراج RNA کل توسط روش تغییر یافته Rubio-Piña & Zapata-Pérez (2011) انجام پذیرفت. به منظور حذف آلودگی DNA، نمونه‌های RNA استخراج شده، با آنزیم DNaseI RNase Free تیمار شدند. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (ساخت شرکت اپندورف آلمان) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر اندازه‌گیری شد. کیفیت RNA استخراج شده نیز توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ در صد (رنگ‌آمیزی شده با safe stain) مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ژن‌های هدف miRNAهای مورد مطالعه توسط سایت psRNATarget (Dai & Zhao 2011) و با استفاده از کانتیگ‌های حاصل از توالی‌یابی RNA بادام در مطالعه Mousavi et al. (2014) پیش‌بینی شدند (شکل ۱). انتخاب توالی‌های پیش‌بینی شده با در نظر گرفتن پارامترهای، حداکثر انتظار (Maximum expectation)، طول ناحیه برای امتیازدهی جفت شدگی (hspsize)، تعداد بهترین ژن‌های هدف برای هر sRNA، د ستر سی ژن هدف، حداکثر انرژی لازم به منظور د ستر سی به محل جفت شدن ژن هدف با sRNA (UPE)، طول ناحیه مجاور با ناحیه هدف به منظور آنالیز میزان دسترسی، دامنه ناجور جفت باز مرکزی که منجر به بازدارندگی در مرحله ترجمه می‌شود و نیز تعدد در ناحیه هدف (multiplicity) تعیین شد. ژن‌های هدف انتخاب شده بر اساس پارامترهای ذکر شده دارای بالاترین امتیاز بودند. به منظور بررسی بیان هر miRNA cDNA آن با استفاده از روش stem-loop RT PCR مطابق با پروتکل Chen et al. (2005) و Varkonyi-Gasic et al. (2007) سنتز شد. آغازگر اختصاصی stem-loop RT به منظور

⁵ pop corn

سنتز cDNA و نیز آغازگرهای اختصاصی رفت (Forward) و عمومی برگشت (Universal/ Reverse primer) توسط نرم افزار MirNA Primer Designer طراحی شدند. به منظور بررسی بیان ژن‌های هدف نیز cDNA هر نمونه با استفاده از آغازگر عمومی الیگو dT سنتز گردید. آغازگرهای اختصاصی هر ژن هدف نیز با استفاده از ابزار primer blast طراحی گردید. لیست آغازگرهای طراحی شده به منظور بررسی بیان miRNAها و ژن‌های هدف پیش‌بینی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. پس از اطمینان از تکثیر صحیح cDNA و طراحی آغازگرها توسط واکنش End point PCR، واکنش RT-qPCR با استفاده از ۲ μL cDNA، ۶ μL مخلوط واکنش Takara (Cat. #RR820A) حاوی SYBR Green و ۱۰ μM آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن در حجم نهایی ۱۲ μL با برنامه دمایی ۹۵ °C (۳۰ ثانیه) به دنبال چرخه دمایی دو مرحله‌ای ۹۵ °C (۵ ثانیه) و ۶۰ °C (۳۰ ثانیه) با ۴۰ سیکل صورت پذیرفت. دو ژن 18S rRNA (Mallory et al. 2004) و اکتین (Gao et al. 2009) نیز به عنوان ژن کنترل داخلی به ترتیب برای miRNA و ژن هدف استفاده شدند. واکنش برای هر نمونه با سه تکرار تکنیکی انجام شد. میزان cycling threshold برای هر نمونه توسط نرم‌افزار Rotor-Gene Q Series Software به دست آمد و مقایسه نتایج با ژن کنترل داخلی، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001) انجام شد. برای مقایسه میزان بیان نمونه کنترل و تنش از آزمون t با در نظر گرفتن حداقل سطح معنی‌دار ۰/۰۵ استفاده گردید.



شکل ۱. نتایج پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNAهای مورد مطالعه توسط سایت psRNATarget. محل جفت‌شدگی مرکزی در بین بازهای ۹ تا ۱۱ در شکل نشان داده شده است.

Figure1. The prediction results of studied miRNA's target genes by psRNATarget. The central base pairing is shown between the nucleotides of 9-11.

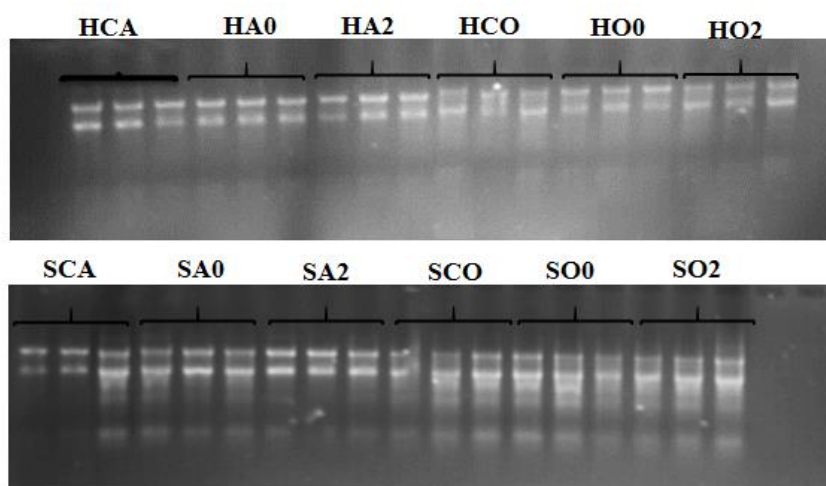
جدول ۱. لیست آغازگرهای طراحی شده مربوط به miRNAها و ژنهای هدف مورد مطالعه

Table1. Designed primers list of studied miRNAs and target genes

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	TM(°C)
Primer	Primer sequence	
<i>Pdu-miR319a-RT</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATA CGACGGGAGC	87.1
<i>Pdu-miR319a-F</i>	GCGGCGGTTGGACTGAAGGGAG	69.6
<i>Pdu-miR398a-3p-RT</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATA CGACCAGGGG	87.1
<i>Pdu-miR398a-3p-F</i>	GCGGCGGTTGTGTTCTCAGGTCG	69.6
Universal	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	64.6
<i>PduGAMYB-like-F</i>	TTCTAAGCCCACCTCAAGGG	60.5
<i>PduGAMYB-like -R</i>	TGGGGGAGATTGGATAAAAAGCA	60.3
<i>PduTCP4-F</i>	TCATATGCTCATGCTCAGGGG	57.3
<i>PduTCP4-R</i>	AGCGGGTGCCAAAGATTGA	57.3
<i>PduCTR6-F</i>	TGTCTATGACTCCCCCTGC	59.5
<i>PduCTR6-R</i>	AGACGTACATGGGAACGCT	58.0

نتایج و بحث

کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده از طریق برر سی الگوی الکتروفورزی آن‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۲ در صد تأیید شد (شکل ۲). نسبت جذب نوری نمونه RNA در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای اغلب نمونه‌های مورد مطالعه در محدوده اعداد ۱/۸ تا ۲ بود که این میزان نشان دهنده خلوص و کیفیت مناسب آن‌ها می‌باشد. واکنش End point PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت برای miRNAها و ژنهای هدف، صحت تکثیر آن‌ها را در تمام نمونه‌ها نشان داد (شکل ۳).

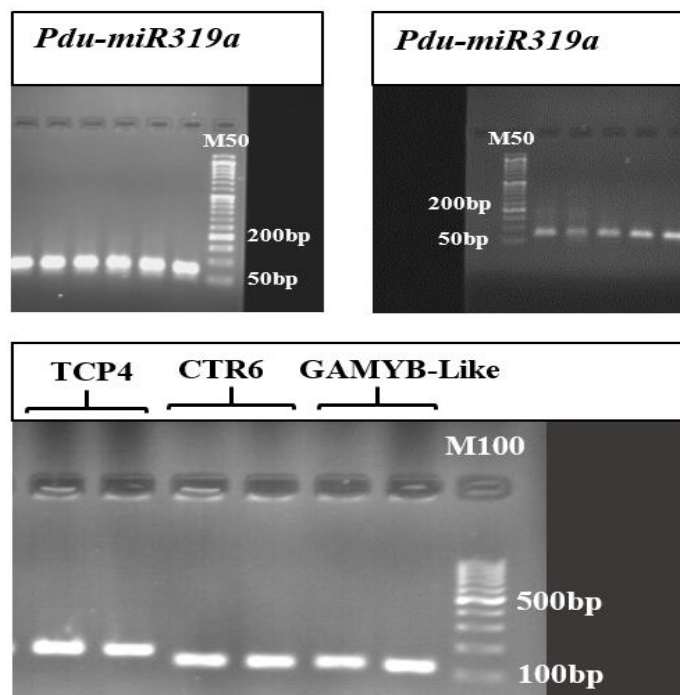


شکل ۲. الگوی الکتروفورزی RNAهای استخراج شده از بافت‌های زایشی بادام بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. شکل بالا مربوط به نمونه‌های RNA استخراج شده در ژنوتیپ H و شکل پایین رقم Sh12 می‌باشد. علائم اختصاری: H ژنوتیپ H، S رقم Sh12، C کنترل، 0 تنش صفر درجه سانتی‌گراد، 2 تنش ۲- درجه سانتی‌گراد، A بافت بساک و O بافت تخمدان.

Figure 2. The electrophoresis pattern of extracted RNAs from reproductive tissue cultures on 1.2% agarose gel. The figure above is related to the extracted RNA samples in the H genotype and the figure below is for the Sh12. Abbreviations: H: H Genotype, S: Sh12, C: control, 0: 0 °C, 2: -2°C, A: Anther tissue and O: ovary tissue.

بررسی الگوی بیان *Pdu-miR319a* و ژن‌های هدف *PduGAMYB-like* و *PduTCP4* تحت تنش

سرما در بادام: به منظور بررسی و مقایسه الگوی بیان miRNA های *Pdu-miR319a* و *Pdu-miR398a-3p* به همراه ژن‌های هدفشان بیان آن‌ها در بافت‌های زایشی (بساک و تخمدان) ژنوتیپ دیرگل و متحمل H و نیز رقم دیرگل و حساس Sh12 بادام تحت شرایط تنش و کنترل از طریق RT-qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی دو ژن هدف *GAMYB-like* و *TCP4* برای *miR319a* پیش‌بینی گردید که بیان هر کدام در شرایط تنش و کنترل در بافت‌های زایشی ژنوتیپ H و رقم Sh12 مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه بر روی الگوی بیان *miR319a* در ژنوتیپ متحمل H، تغییر بیان معنی‌داری را در پاسخ به تنش سرما نشان نداد، در حالی که ژن هدف *PduGAMYB-like* تنها کاهش بیان معنی‌دار را در پاسخ به تنش صفر درجه سانتی‌گراد در بافت بساک ژنوتیپ متحمل H نشان داد.

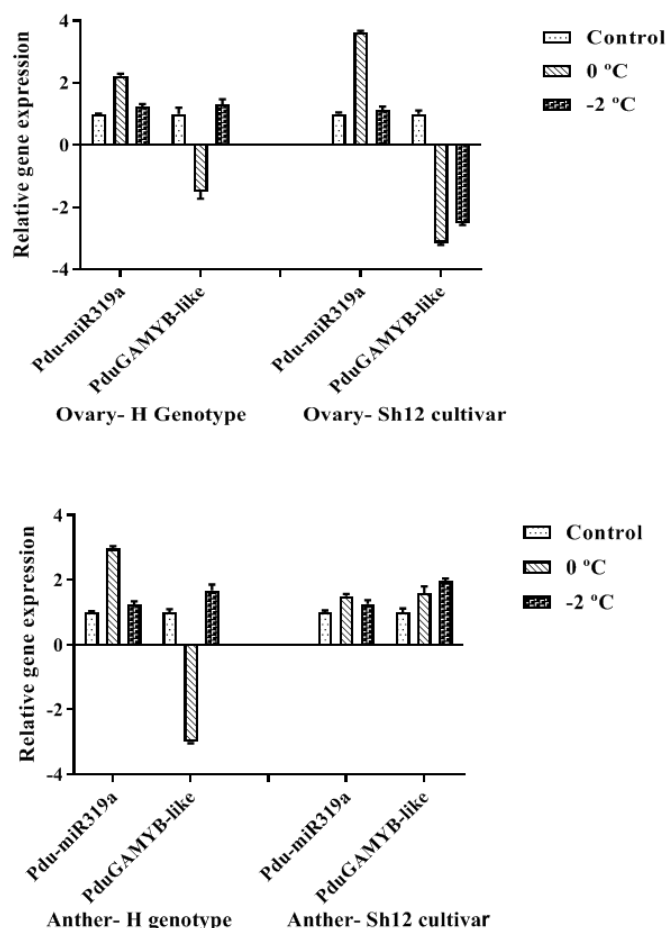


شکل ۳. شکل بالا الکتروفورز فراورده end point PCR مربوط به نمونه‌ای از miRNAهای *Pdu-miR319a* و *Pdu-miR398a-3p* بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد می‌باشد. نوار تکثیر شده در محدوده ۶۰ bp تا ۷۰ bp را نشان می‌دهد. شکل پایین، الکتروفورز فراورده های End point PCR مربوط به ژن های هدف *PduGAMYB-like* (۱۳۶bp)، *PduTCP4* (۱۵۷bp) و *PduCTR6* (۱۳۸bp) بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد می‌باشد.

Figure 3. The figure above is related to the electrophoresis of some end point PCR products of *Pdu-miR319a*, *Pdu-miR398a-3p* on 1.2% agarose gel. The amplified band is around 60-70bp. The figure below is related to the electrophoresis of end point PCR products of *PduGAMYB-like* (136bp), *PduTCP4* (157bp) and *PduCTR6* (138bp) on 1.2% agarose gel.

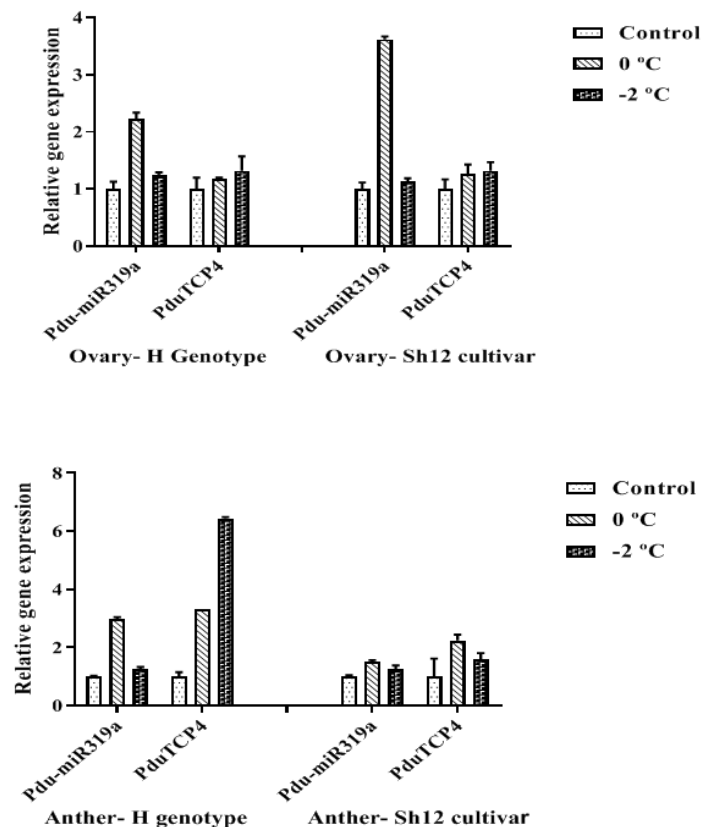
بررسی الگوی تغییر بیان این miRNA و ژن *PduGAMYB-like*، در رقم حساس به سرمای Sh12 نتایج متفاوتی را نسبت به پاسخ ژنوتیپ H در پاسخ به تنش سرما نشان داد. بر خلاف ژنوتیپ H که تغییرات معنی‌داری در بیان miR319a مشاهده نشد، اما در رقم Sh12 در مراحل اولیه تنش (تنش صفر درجه سانتی‌گراد) افزایش بیان معنی‌دار (FC= ۱/۵) این miRNA در بافت بساک مشاهده گردید. همچنین در رقم Sh12، ژن *PduGAMYB-like* کاهش بیان معنی‌دار ۳/۱۵- برابری (در سطح ۵ درصد) و ۲/۵۱- برابری (در سطح ۱ درصد) را به ترتیب در دو سطح تنش صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد در بافت تخمدان نشان داد (شکل ۴). تغییر الگوی بیان ژن *PduTCP4* به عنوان ژن هدف دوم *Pdu-miR319a* در برابر تنش سرما نیز

مورد مطالعه قرار گرفت. بر خلاف ژن هدف اول یعنی ژن *PduGAMYB-like* که در پاسخ به مراحل اولیه تنش در بافت بساک ژنوتیپ متحمل H کاهش بیان معنی داری را نشان داد، ژن *PduTCP4* افزایش بیان معنی دار را در پاسخ به تنش صفر درجه سانتی گراد (FC= ۳/۳۳) و هم تنش ۲- درجه سانتی گراد (FC= ۶/۴۳) نشان داد. بررسی الگوی بیان ژن *PduTCP4* در بافت تخمدان ژنوتیپ H و نیز در هر دو بافت زایشی رقم Sh12، تغییر بیان معنی داری را نسبت به شاهد نشان نداد (شکل ۵).



شکل ۴. مقایسه الگوی بیان *Pdu-miR319a* و ژن هدف آن *PduGAMYB-like* در بافت بساک و تخمدان بادام دو ژنوتیپ H و Sh12 تحت دو سطح تنش صفر و ۲- درجه سانتی گراد.

Figure 4. The comparison of *Pdu-miR319a* expression pattern and its target gene *PduGAMYB-like* in anther and ovary tissues of two H and Sh12 genotypes under 0 and -2 °C.



شکل ۵. مقایسه الگوی بیان *Pdu-miR319a* و ژن هدف آن *PduTCP4* در بافت بساک و تخمدان دو ژنوتیپ H و Sh12 تحت دو سطح تنش صفر و -۲ درجه سانتی‌گراد

Figure 5. The comparison of *Pdu-miR319a* expression pattern and its target gene *PduTCP4* in anther and ovary tissues of two H and Sh12 genotypes under 0 and -2 °C

MiR319 به عنوان اولین miRNA شناخته شده با نام miR319 در آرابتیدوپسیس می‌باشد. نقش این miRNA در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی نظیر تنظیم بیوسنتز هورمون اتیلن، سیگنالینگ ABA و GA، ریخت‌زایی برگ، تشکیل گامت، انتقال از فاز رویشی به مرحله گل‌دهی و نیز پاسخ به تنش شوری و سرما مشاهده شده است (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Sunkar & zhu 2004; Reyes et al. 2005; Schwab et al. 2005; Liu et al. 2008). چندین مطالعه نقش تنظیمی miR319 را در پاسخ به تنش سرما نشان داده‌اند. برای مثال در نیشکر افزایش بیان این miRNA در هر دو اندام هوایی و ریشه (Thiebaut et al. 2012) و یا افزایش بیان آن در آرابتیدوپسیس تحت تنش چهار درجه سانتی‌گراد (Liu et al. 2008) گزارش شده است. این در حالی است که در مطالعه بر روی برنج (Lv et al. 2010) و نیز شلغم روغنی (Zeng et al. 2018) نتایج متفاوتی ارائه گردید و کاهش بیان این miRNA تحت تنش سرما گزارش شد. در برنج دیگر بر روی برنج بیش بیان miR319b و سرکوب *OsPCF5* و *OsPCF8* منجر به افزایش تحمل به سرما در برنج شده

است (Yang et al. 2013). در مطالعه دیگر نیز بیش بیان miR319 منجر به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با تنش سرما و در نتیجه افزایش تحمل به سرما گردیده است (Wang et al. 2014). در مطالعه حاضر الگوی بیان miR319 بسته به ژنوتیپ، بافت و نیز تیمار سرمایی متغیر بود. افزایش بیان مشاهده شده در بافت بساک رقم Sh12 تحت تنش صفر درجه سانتی‌گراد با نتایج Thiebaut et al. (2014) و Liu et al. (2008) مطابقت داشته است.

ژن *GAMYB-like* متعلق به خانواده فاکتورهای رونویسی MYBها می‌باشند. از جمله عملکردهای ذکر شده برای فاکتورهای رونویسی *GAMYB* می‌توان به نمو پرچم، طولیل شدن ساقه، گل‌دهی زود هنگام و نمو بذر اشاره نمود (Thiebaut et al. 2012). این دسته از ژن‌ها به عنوان ژن‌های هدف miR159 محسوب می‌شوند (Millar et al. 2019)، اما به دلیل شباهت بسیار زیاد با miR319، برخی از آن‌ها می‌توانند مورد برش و تنظیم miR319 نیز قرار بگیرند. در مطالعه Gubler et al. (1995) برای اولین بار، نقش تنظیم‌کنندگی مثبت *HvGAMYB*، در انتقال سیگنال GA در لایه آلورون جو و فعال نمودن آنزیم آلفا آمیلاز مشخص گردید. این نقش محدود به جو و سایر غلات نشده و در سایر گیاهان نقش همه جانبه ژن‌های *GAMYB* در آبخار سیگنالینگ GA که منتهی به حرکت ذخایر آندوسپرم به سمت گیاهچه در حال رشد می‌گردد، مشخص شده است (Millar & Gubler 2005). در بررسی انجام شده توسط Achard et al. (2008) شواهد نشان داد که یکی مکانیسم‌های تنظیمی گیاه در پاسخ به تنش سرما محدود کردن رشد از طریق جلوگیری از القای GA است. بنابراین کاهش القای GA منجر به فعال نشدن رونویسی از ژن‌های *GAMYB* و بازدارندگی رشد می‌گردد. Thiebaut et al. (2012) نیز همین نتیجه را تأیید کرده و بیان داشتند که کاهش در میزان *GAMYB* در گیاه نیشکر تحت تنش سرما منجر به بازدارندگی رشد و نمو می‌شود. از آنجایی که تغییر بیان معنی‌داری در miR319 در ژنوتیپ H و نیز در تنش ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم Sh12 مشاهده نشد، می‌توان کاهش بیان *PduGAMYB-like* را در بساک ژنوتیپ H (در مراحل اولیه تنش) و نیز کاهش بیان آن در تخمدان رقم Sh12 را بیشتر از آن که به دلیل اثر تنظیمی منفی miR319 بر *PduGAMYB-like* دانست، به دلیل کاهش القای GA و در نتیجه فعال نشدن رونویسی از این ژن تحت تنش سرما قلمداد نمود.

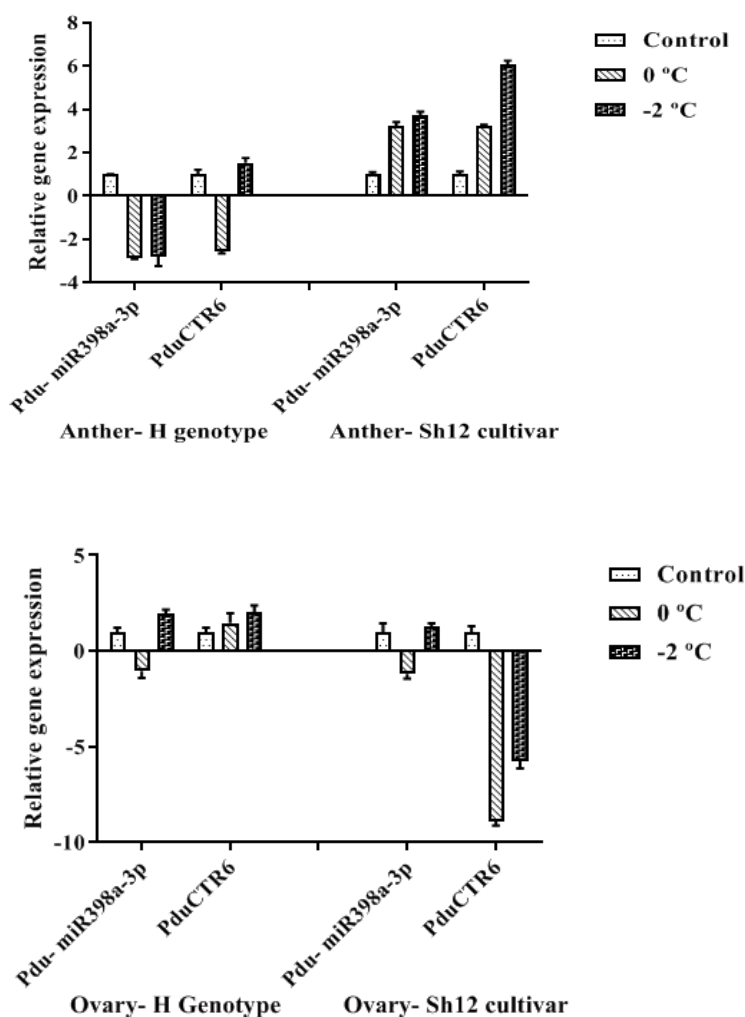
^۶TCPها از جمله فاکتورهای رونویسی مخصوص گیاهان هستند که در عملکردهای مختلفی نقش دارند، که می‌توان به کنترل تقسیم سلولی، گسترش، تمایز و نمو برگ، کنترل شاخه‌دهی، بیوزنز میتوکندریایی، پیر شدن برگ، نمو گامتوفیت نر و ماده و دخالت در سیگنالینگ اکسین‌ها و جاسمونیک اسید (GA) اشاره نمود (Wang et al. 2014). نقش فاکتورهای رونویسی TCP به تنظیم شاخص‌های رشد و نمو محدود نمی‌شود و این فاکتورها در پاسخ گیاه به تنش‌های مختلف اعم از زیستی (Wang et al. 2015) و غیرزیستی (Danisman 2016; Mukhopadhyay & Tyagi 2015) از طریق اثر متقابل با شبکه‌های سیگنالینگ مختلف نیز نقش دارد. به عنوان مثال در مطالعه Wang et al. (2014) بر روی برنج به نقش تنظیمی مثبت ژن

⁶ TEOSINTE BRANCHED CYCLOIDEA/PCF

TCP2 در تنش سرما اشاره شده است. در این بررسی مشخص شد این ژن به صورت منفی تولید ROSها را تنظیم کرده و در سمزدایی آن‌ها تأثیر دارد. به طور کلی می‌توان گفت فاکتورهای رونویسی TCP، به عنوان ابزار مفیدی در بهینه‌سازی ساختار گیاه و سازگار کردن گیاه نسبت به تنش‌های محیطی می‌باشند. TCP4 به عنوان اصلی‌ترین ژن هدف miR319 شناخته شده است. در تحقیق جدیدی مشخص شده است که TCP4 تنظیم شده توسط miR319، تشکیل دیواره سلولی را از طریق فعال کردن بیان شبکه رونویسی VND7 در آراییدوپسیس کنترل می‌کند. افزایش بیان TCP4، سبب افزایش معنی‌دار ضخامت دیواره سلولی، افزایش رسوب سلولز و لیگنین و ارتقای تشکیل آوند چوبی می‌شود. افزایش ضخامت سلولی و لیگنینی شدن آن می‌تواند تحمل به سرما در آراییدوپسیس را افزایش دهد (Zeng et al. 2018). افزایش بیان TCP4 تحت تنش سرما در آراییدوپسیس با نتایج این بررسی از نظر افزایش بیان ژن TCP4 در بافت بساک ژنوتیپ H تحت هر دو تیمار تنش صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد مطابقت دارد. بر خلاف ژنوتیپ H که افزایش معنی‌دار بیان ژن TCP4 را نشان داد، در رقم Sh12 تغییرات بیان معنی‌داری مشاهده نشد. از این رو می‌توان به شکل فرضیه چنین استنباط نمود که یکی از دلایل تفاوت در میزان تحمل به سرمای این دو ژنوتیپ، مربوط به عملکرد این فاکتور رونویسی مهم باشد که افزایش بیان آن سبب افزایش ضخامت دیواره سلولی و لیگنینی شدن و در نهایت افزایش تحمل به تنش سرما می‌شود.

بررسی الگوی بیان *Pdu-miR398a-3p* و ژن هدف آن *PduCTR6* تحت تنش سرما در بادام: نتایج

حاصل از بررسی الگوی بیان *Pdu-miR398a-3p* در بافت بساک و تخمدان ژنوتیپ H، کاهش بیان معنی‌دار ($FC=1/0.4$) این ژن را در بافت تخمدان در پاسخ به تنش صفر درجه سانتی‌گراد نشان داد (شکل ۶ و ۷). بر خلاف ژنوتیپ H، رقم Sh12 تغییر بیان معنی‌داری را در پاسخ به تنش سرما در دمای صفر درجه سانتی‌گراد ($FC=3/2.4$) در بافت بساک نشان داد. در بافت تخمدان این رقم نیز افزایش معنی‌دار ($FC=1/2.5$) در پاسخ به تنش ۲- درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. تغییر بیان ژن هدف این miRNA در پاسخ به تنش سرما در هر دو ژنوتیپ H و Sh12 مورد مطالعه قرار گرفت. در دو بافت زایشی ژنوتیپ H، تغییر بیان معنی‌داری در هر دو سطح تنش سرما مشاهده نشد، اما در رقم Sh12 این ژن پاسخ متفاوتی را نشان داد و در بافت بساک افزایش بیان ۶/۰۸ برابری (معنی‌دار در سطح یک درصد) را در سطح تنش ۲- درجه سانتی‌گراد و کاهش معنی‌دار ۸/۸۹- و ۵/۷۶- برابری (در سطح یک درصد) را به ترتیب در پاسخ به هر دو سطح تنش صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد در بافت تخمدان این ژنوتیپ نشان داد. همچنین الگوی ارتباطی بیان این miRNA و ژن هدفش، اثر تنظیمی منفی را در تیمار ۲- درجه سانتی‌گراد در بافت بساک و تیمار صفر درجه سانتی‌گراد در تخمدان ژنوتیپ H و نیز در تیمار ۲- درجه سانتی‌گراد بافت تخمدان رقم Sh12 نشان داد (شکل ۶).



شکل ۶. مقایسه بیان نسبی *Pdu-miR398a-3p* و ژن هدف آن *PduCTR6* در بافت بساک و تخمدان بادام دو ژنوتیپ H و Sh12 تحت دو سطح تنش صفر و -۲ درجه سانتی گراد

Figure 6. The comparison of *Pdu-miR398a-3p* expression pattern and its target gene *PduCTR6* in anther and ovary tissues of two H and Sh12 genotypes under 0 and -2 °C

MiR398 به عنوان یک miRNA حفاظت شده است که از طریق پیش بینی بیوانفورماتیکی و آنالیز توالی های کتابخانه sRNA در آرکیدوپسیس تحت تنش سرما شناسایی شده است (Jones-Rhoades & Bartel 2004; Sunkar & Zhu 2004). این miRNA در پاسخ به تنش های مختلف زیستی و غیرزیستی نظیر تنش اکسیداتیو، همئوستازی مس، فسفات و کلسیم، تنش UV، شوری، ABA، کمبود آب، تنش ازن و پاتوژن های گیاهی نقش دارد (Zhu et al. 2011). مطالعات مختلف نشان داده اند که تعدادی از miRNAها تحت شرایط تنش، افزایش بیان و کاهش بیان نشان می دهند و پاسخ این miRNAها به

تنش‌های غیرزیستی، متغیر و پویا ست. برای مثال در این مطالعه نیز تغییرات بیان مختلفی از miR398 در دو ژنوتیپ متحمل H و رقم حساس Sh12 تحت تنش سرما مشاهده گردید. این متغیر بودن و یکنواخت نبودن بیان miR398 تحت تنش سرما در مطالعات مختلف نظیر Sunkar & Zhu (2004)، Zhou et al. (2008) و Wang et al. (2014) نیز مشاهده شده است. تفاوت در بیان miR398 در میان مطالعات مختلف ممکن است به علت تفاوت در گونه، ژنوتیپ، دوره و مدت تنش سرما در مطالعات مختلف باشد (Zeng et al. 2018). کاهش بیان miR398 به تغییرات دمای محیط در مطالعات مختلفی گزارش شده است (Chen et al. 2013; Jia et al. 2009; Yu et al. 2012). گزارش شده است. مکانیسم مولکولی کاهش بیان miR398 در تنش سرما در مطالعه Chen et al. (2013) در گیاه *Chrysanthemum dichrum* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، بررسی توالی پروموتور miR398b/c وجود عناصر سیس MYB، WRKY و bHLH را آشکار نمود که هر سه توسط ژن کلیدی پاسخ دهنده به تنش سرما، یعنی ICE1 کنترل می‌شوند. از این رو مشخص گردید، بیان miR398b/c در هنگام تنش سرما از طریق ژن ICE1 صورت می‌گیرد. در این بررسی، در گیاهان تراریخت شده که ژن ICE1 بیش‌بیان شده بود، کاهش بیان ژن miR398 و افزایش بیان ژن‌های CSD1 و CSD2 و در نهایت افزایش تحمل به سرما مشاهده شد. در این گیاهان افزایش محتوای ROS در مراحل ابتدایی تنش به عنوان سیگنالی برای کاهش بیان miR398 و در نتیجه افزایش ژن‌های CSD به منظور پایش و سم‌زدایی ROS‌های تولید شده بوده است. سوپراکسید دسموتازها از طریق تبدیل O₂- به H₂O₂ در سم‌زدایی ROS نقش دارند (Yamasaki 2007). به طور کلی در این بررسی مشخص شد تحمل به سرما به شکل منفی توسط miR398 و به شکل مثبت توسط CSDها تنظیم می‌شود. کمپلکس پروتئین CTR6^V در غشای اندامک واکوئل سلول واقع شده است و نقش مهمی را در تنظیم میزان مس در سلول دارد. این پروتئین به شکل هوموتریمر⁸ است و مس ذخیره شده در واکوئل را به سیتوپلاسم و هسته انتقال می‌دهد. در زمانی که میزان یون مس افزایش یافته است، به منظور سم‌زدایی در ابتدا درون خود واکوئل یون‌های اضافه از طریق پلی‌فسفات‌ها و سایر مولکول‌ها به فرم غیرفعال زیستی در آمده و سپس حامل یون مس یعنی CTR6 آن را به سیتوپلاسم و هسته انتقال داده و سبب غیرفعال شدن فاکتور رونویسی CUF1 و در نتیجه عدم بیان ژن‌های CTR4 و CTR5 که انتقال دهنده‌های یون مس به داخل سلول هستند می‌گردد. همچنین در زمان کمبود مس در سلول، این یون را به آنزیم‌های وابسته به مس نظیر SOD1 می‌رساند (Bellemare et al. 2002). از آنجایی که در مطالعه Chen et al. (2013) افزایش بیان ژن‌های CSD در زمان تنش سرما گزارش شده است و با توجه به نقش CTR6 در انتقال یون مس به چپرون‌های مس نظیر CCS1 (به عنوان رساننده کوفاکتور مس به Cu/Zn-SODs ها (CSD1، CSD2 و CSD3))، می‌توان به صورت یک فرضیه چنین نتیجه‌گیری نمود، همبستگی نزدیکی بین ژن CTR6 و ژن‌های CSD در تنش سرما و انتظار افزایش بیان ژن‌های CTR6 به منظور انتقال بیشتر یون‌های مس به چپرون مس برای سوپراکسیددسموتاز و در نهایت

⁷ Copper Transporter 6

⁸ Homotrimer

انتقال به CSD ها وجود دارد، در این مطالعه همانند miR398 الگوی بیانی یکنواخت افزایش و یا کاهش مشاهده نشد و بسته به ژنوتیپ، بافت، میزان و مدت تنش سرما نتایج متغیری مشاهده گردید.

نتیجه گیری: با توجه به نقش مهم تنظیمی miRNAها در مواجهه با تنش سرما در بادام، در این مطالعه دو miRNA

پاسخ دهنده به تنش سرما انتخاب و تغییرات الگوی بیان آنها در بین دو ژنوتیپ متحمل و حساس و نیز اثر تنظیمی منفی آنها بر روی ژنهای هدفشان مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی الگوی بیان ژنهای مورد نظر از طریق روش RT-qPCR در دو سطح تنش صفر و ۲- درجه سانتیگراد و نیز شرایط کنترل در بافت‌های زایشی بساک و تخمدان ژنوتیپ متحمل به سرمای H و نیز رقم حساس به سرمای Sh12، مورد مقایسه قرار گرفت و الگوی بیان متفاوت miRNAها و ژنهای هدف بین دو رقم متحمل و حساس به سرما بدست آمد و این مقایسه امکان شناسایی miRNAهای پاسخ دهنده به تنش سرما را فراهم کرد. با توجه به مشاهده افتراق بیان آنها در بین دو ژنوتیپ متحمل و حساس به منظور تکمیل اطلاعات مولکولی در رابطه با عملکرد آنها و نیز امکان به کارگیری آنها در توسعه ارقام متحمل با استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک، پیشنهاد می‌گردد بیان آنها در سایر ارقام متحمل و حساس و تحت دامنه گسترده‌تری از تیمارهای مختلف تنش سرمایی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری: بدینوسیله نگارندگان بر خود لازم می‌دارند از حمایت‌های مادی و معنوی دانشکده کشاورزی دانشگاه

شهرکرد و نیز از مؤسسه نهال و بذر کرج و همچنین دکتر علی ایمانی که در تهیه مواد گیاهی همکاری و مساعدت لازم را فراهم آوردند، کمال تشکر را بجا آورند.

منابع

- احسنی محمدرضا؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.
- ایمانی علی (۱۳۷۹). اصلاح بادام (ترجمه). نشر آموزش کشاورزی. ۱۲۸ صفحه.
- توحیدی نژاد فاطمه؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسمعیلی زاده کشکوئی علی؛ نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن *Rheb* در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.
- جعفری دره در امیر حسین؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسمعیلی زاده کشکوئی علی؛ ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن *CIB4* در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.
- سرخه کریم (۱۳۹۰) بررسی فیزیوشیمیایی و مولکولی گونه‌های وحشی و ژنوتیپ‌های اهلی بادام ایران. پایان‌نامه دکتری اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی. دانشگاه شهرکرد. ایران.

محمدآبادی محمدرضا؛ کرد محبوبه؛ نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گو سفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۱۱-۱۲۲.

موسوی صادق؛ شیران بهروز؛ ایمانی علی؛ هوشمند سعداله؛ ابراهیمی اسماعیل (۱۳۹۳). بررسی برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی مرتبط با سرمازدگی در ارقام بادام با زمان گل‌دهی متفاوت. مجله تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی ۱۲: ۲۳۵-۲۴۶.

References

- Abla M, Sun H, Li Z et al. (2019) Identification of miRNAs and their response to cold stress in *Astragalus membranaceus*. *Biomolecule* 9, 182.
- Achard P, Gong F, Cheminant S et al. (2008) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* 20, 2117-2129.
- Afshari H, Parvane T (2013) Study the effect of cold treatments on some physiological parameters of 3 cold resistance Almond cultivars. *Life Sci* 10, 4-16.
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. *Iran J Appl Anim Sci* 9, 635-642.
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 11, 135-150 (In Persian).
- Alisoltani A, Shiran B, Fallahi H, Ebrahimie E (2015) Gene regulatory network in almond (*Prunus dulcis* Mill.) in response to frost stress. *Tree Genet Genomes* 11, 100.
- Bellemare DR, Shaner L, Morano et al. (2002) Ctr6, a Vacuolar Membrane Copper Transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277, 46676-46686.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acid Res* 33, e179.
- Chen Y, Jiang J, Song A et al. (2013) Ambient temperature enhanced freezing tolerance of *Chrysanthemum dichrum* CdICE1 Arabidopsis via miR398. *BMC Biol* 11, 121.
- Dai X, Zhao, PX (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acid Res* 39, W155-W159
- Danisman S (2016) TCP transcription factors at the interface between environmental challenges and the plant's growth responses. *Front Plant Sci* 7,1930.
- Dhanapal AP, Crisosto CH (2013) Association genetics of chilling injury susceptibility in peach (*Prunus persica* L. Batsch) across multiple years. *Biotechnol J* 3, 481-490.

- Gao X, Wan F, Mateo K et al. (2009) Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF-kappaB function. PLoS Pathog 5, e1000708.
- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. The Plant Cell 7, 1879-1891.
- He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet 5, 522-53.
- Imani A, Mahamadkhani Y (2011) Characteristics of almond selections in relation to late frost spring. IJNRS 2, 31–34.
- Imani A, Ezaddost M, Asgari F, Masoumi S, Raeisi I (2012). Evaluation the resistance of almond to frost in controlled and field conditions. IJNRS 3, 29–36.
- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4, 119-132 (In Persian).
- Jia X, Wang WX, Ren L et al. (2009) Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol Rep 71, 51-59.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Mol Cell 14, 787-799.
- Karimi M, Ghazanfari F, Fadaei A et al. (2016) The Small-RNA Profiles of Almond (*Prunus dulcis* Mill.) Reproductive Tissues in Response to Cold Stress. PLoS ONE 11, e0156519.
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. RNA 14, 836–843.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time PCR and the 2(- Delta Delta C(T)) Method. Method 25, 402-408.
- Lv DK, Bai X, Li Y et al. (2010) Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. Gene 459, 39-47.
- Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, Bartel B (2004) MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. Curr Biol 14, 1035-1046.
- Millar AA, Gubler F (2005) The Arabidopsis GAMBYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. The Plant Cell 17, 705-721.
- Millar AA, Lohe A, Wong G (2019) Biology and Function of miR159 in Plants. Plants 8, 255.

- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 289-295.
- Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. *Brazil J Med Biol Res* 50, e6177.
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).
- Mousavi S, Alisoltani A, Shiran B, et al. (2014) De novo transcriptome assembly and comparative analysis of differentially expressed genes in *Prunus dulcis* Mill. in response to freezing stress. *PloS ONE* 9, e104541.
- Mukhopadhyay P, Tyagi AK (2015) *OsTCP19* influences developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4-mediated pathways. *Sci Rep* 5, 9998.
- Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ (2004) The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* 134, 1718-1732.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP et al. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110, 513–520.
- Rubio-Piña JA, Zapata-Pérez O (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electron J Biotechnol* 14, 11-18.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M et al. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell* 18, 1121-1133.
- Sinha S, Kukreja B, Arora P et al. (2015) The omics of cold stress responses in plants. In: *Functional Genomics Perspectives. Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants.* Pandey GK (ed). Springer New York. pp. 143-194.
- Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell* 16, 2001–2019.
- Thiebaut F, Rojas CA, Almeida KL, et al (2012) Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. *Plant Cell Environ* 35, 502–512.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M et al (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Method* 3, 12.
- Wang B, Duan CG, Wang X et al. (2015). HOS1 regulates Argonaute1 by promoting transcription of the microRNA gene MIR168b in Arabidopsis. *Plant J* 81, 861-870.

- Wang T, Pan H, Wang J, Yang W, Cheng T, Zhang Q (2014) Identification and profiling of novel and conserved microRNAs during the flower opening process in *Prunus mume* via deep sequencing. *Mol. Genet. Genom* 289, 169-183.
- Yamasaki H Abdel-Ghany SE, Cohu CM (2007) Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *J Biol Chem* 282, 16369-16378.
- Yang Y, Zhang X, Su Y, (2017) miRNA alteration is an important mechanism in sugarcane response to low-temperature environment. *BMC Genomic* 18, 833.
- Yang C, Li D, Mao D, Liu (2013) Overexpression of micro RNA 319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Environ* 36, 2207-2218.
- Yu X, Wang H, Lu Y et al. (2012) Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in *Brassica rapa*. *J Exp Bot* 63, 1025-1038.
- Zeng X, Xu Y, Jiang J et al. (2018) Identification of cold stress responsive microRNAs in two winter turnip rape (*Brassica rapa* L.) by high throughput sequencing. *BMC Plant Biol* 18, 52.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP (2006) Anderson TA. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol* 289, 3-16.
- Zhou B, Kang Y, Leng J, Xu Q (2019) Genome-Wide Analysis of the miRNA–mRNAs Network Involved in Cold Tolerance in *Populus simonii*× *P. nigra*. *Gene* 10, 430
- Zhou X, Wang G, Sutoh K, et al. (2008) Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochem Biophys Acta Gene Regul Mech* 1779, 780-788.
- Zhu C, Ding Y, Liu H (2011) MiR398 and plant stress responses. *Physiol Plant* 143, 1-9.