فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۲ ص. ۲۶-۱۹

مقاله پژوهشی

اثر تنش کم آبی بر بیان برخی ژن‌های مرتبط با کم آبی (MYB،AP2) و میکروRNAهای مرتبط در برگ‌های گیاه نرگس هلندی *pseudonarcissus* L. *Narcissus*

مریم السادات کامی شیرازی[۱*]، گلناز تجدد[۲]

[۱] گروه تکوین، دانشکده علوم وفناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): M.shirazi@iautmu.ac.ir

DOI: 10.30495/jdb.2023.705273 https:// dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.3.7

چکیده

پیشرفت هایی که در دنیا اتفاق می‌افتد، سبب ایجاد تغییراتی در شرایط زندگی موجودات زنده از جمله گیاهان می‌گردند. گیاهان باید بتوانند با روش‌های مختلف حتی روش‌های مولکولی با شرایط تنش زای محیطی سازگارشوند. یکی از ساز و کارها، تنظیم بیان ژن‌ها بعد از رونویسی توسط miRNAs (میکروRNAها) است. میکروRNA ها، اغلب ۲۰ تا ۲۲ نوکلئوتید دارند که برخی از ژن‌های هدف آنها متعلق به عوامل رونویسی می‌باشند. بیان میکروRNAها در پاسخ به تنش کم آبی تغییر می‌کند. در پژوهش حاضر، پیازهای نرگس هلندی در شرایط متفاوت آبیاری (از یک بار در هفته تا دو ماه یک بار) کشت شدند. از برگ‌های گیاهان ۶۰ روزه برای استخراج ژن هدف میکرو RNA ۵۹ ، MYB و ژن هدف میکروRNA ۱۷۲، AP2 ، با روش qPCR استفاده شد. نتایج نشان دهنده افزایش بیان معنی‌دار ژن‌هایMYB وAP2 و عدم بیان میکروRNAهای ۱۵۹ و ۱۷۲در نمونه‌های تیمار و کنترل بود. لذا، miR172-miR159 تحت تاثیر تنش کم آبی قرار نمی‌گیرد. با توجه به اینکه بیان ژن‌های کم آبی برای اولین بار در گیاه نرگس هلندی ارزیابی شده است، به همین دلیل این پژوهش می‌تواند زمینه خوبی برای بررسی بیشتر در این مورد را فراهم کند.

کلیدواژه‌ها: miRNA159،miRNA172 ، MYB، AP2، تنش کم آبی.

مقدمه

گل نرگس،گیاهی زینتی است که در مزرعه، باغ و گلدان کشت می‌شود و در جهان بسیار محبوب است. علاوه بر زیبایی گل، دلیل علاقه به این گیاه، عطر آن است و صدها ترکیب معطری که از آن در صنایع عطرسازی استفاده می‌شود. گل نرگس از نظر خواص دارویی نیز مورد توجه است. *Narcissus* در خانواده Amaryllidaceae و متعلق به گیاهان پیازدار است و بهار شکوفه می‌کند. با توجه به تغییرات اقلیمی که ناشی از افزایش جمعیت و توسعه صنعت در جهان است، گیاهان باید بتوانند به نوعی پاسخگوی این تغییرات محیطی باشند. یکی از مهمترین تغییرات محیطی، کم آبی است. پیشرفت‌های مولکولی منجر به کشف چگونگی واکنش گیاهان به تنش‌های محیطی شده است

[۱]. در سال‌های اخیر میکروRNAهای مربوط به کم آبی در اکثر گیاهان شناسایی شده‌اند [۴-۲]. یکی از روش‌های مفید برای تحمل کم آبی در گیاهان پس از رونویسی، تنظیم بیان ژن توسط میکروRNAها است. بعضی از میکروRNAها ژن‌هایی را کنترل می‌کنند که عوامل رونویسی و ترجمه را رمزگذاری می‌کنند. این ویژگی میکروRNAها را در مرکز بررسی‌های تنظیم کننده بیان ژن‌ها قرار داده است [۵]. میکرو RNAها، در فرآیندهای مختلف زیستی از جمله پیام رسانی اکسین، جوانه زنی، تشکیل ریشه‌های جانبی، انتقال گیاه از مرحله جوانه‌زنی به مرحله رشد رویشی و سپس مرحله زایشی و همچنین تنظیم پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخیل هستند [۶]. پس از رونویسی، میکروRNAها با ژن‌های هدف و عوامل رونویسی، همکاری نزدیکی دارند. اثر متقابل این میکروRNAها، ژن‌های هدف آنها و تشکیل عوامل رونویسی مورد بررسی زیادی قرار گرفته است [۹-۷]. میکروRNAهای مرتبط با کم آبی در پاسخ به تنش کم آبی، با راه‌های مختلف عمل می‌کنند، به طور مثال در گیاه آرابیدوپسیس، میکروRNAهای ۱۶۸، ۱۷۱، ۳۹۶ (۱۰) و در گیاه ذرت، میکروRNAهای ۱۶۸، ۳۹۶، ۱۷۱ [۱۱] تنظیم بالادست(up-regulated) و در گیاه پنبه، میکروRNAهای ۱۶۴، ۱۷۲ و ۳۹۶ [۱۲] و در گیاه سیب زمینی، میکروRNA-۱۵۹ [۱۳] تنظیم پایین دست (down- regulated) داشتند، این درحالی است که در جو و یونجه هر دو نوع تنظیم (تنظیم بالادست در برگ‌ها و تنظیم پایین دست در ریشه ها) را داشتند [۱۴،۱۵].

ژن‌های هدف میکروRNAهای مرتبط با کم آبی، اغلب در گروه عوامل رونویسی (transcription factors, TF) قرار دارند [۱۶]. در پژوهش حاضر، دو ژن کاندید، AP2 و MYB متعلق به عوامل رونویسی هستند. نقش عوامل رونویسی پاسخ دهنده تنش به خوبی مشخص شده است، این ژن‌ها با عناصر مشترک در مناطق پروموتر چندین ژن مرتبط با تنش ارتباط برقرار می‌کنند و بنابراین بیان ژن‌های پایین دست را سبب می‌شوند که منجر به تحمل تنش‌های غیرزیستی می‌شوند [۱۷].

گیاه نرگس به دلیل کاربردهای فراوان زینتی، دارویی- بهداشتی در سال‌های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته و نه تنها در بازارهای داخلی کشور که صادرات آن نیز رو به گسترش و سودآوری است. با توجه به وسعت اقلیم‌های خشک و نیمه خشک در ایران بررسی هایی که در آینده بتواند در مقاوم سازی این گیاه با شرایط کم آبی موثر باشد، مفید و ضروری است. در پژوهش حاضر با توجه به موارد فوق، بیان دو ژن از ژن‌های موثر در مقاومت گیاهان به خشکی (ژن‌های AP2 و MYB) و برخی میکروRNAهای موثر در بیان آنها در گیاهان نرگس هلندی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

پیازهای گیاه نرگس، اواخر بهمن ماه ۱۳۹۶، از مرکز خرید رویش سبز در استان البرز خریداری شدند. پیازهای سالم با اندازه، شکل و وزن مشابه، انتخاب و در گلدان‌های پلاستیکی با استفاده از خاک لومی (Loam) و سبک کشت شدند (شکل ۱). دمای ۴/۵ تا ۷ درجه سانتی گراد برای مرحله رویشی و آفتاب مستقیم حدود ۸ ساعت در روز در مرحله گلدهی مورد نیاز این گیاه است، برای گیاهان منظور شد.

در این مطالعه، چهار گروه گلدان (یک گروه کنترل و سه گروه تیمار) برای دو ماه (۶۰ روز تیمار) انتخاب شدند. گیاه نرگس هلندی، به هفته ای یک بار آبیاری در شرایط معمول و بدون تنش، نیاز دارد. بر این اساس، تیمارها در سه سطح (شدید، متوسط و ضعیف) تعیین شدند. هر تیمار، سه تکرار داشت. نمونه‌های کنترل، هفته ای یک بار، نمونه‌های تیمار شامل T1، هر دو هفته یک بار، T2، هر سه هفته یک بار و T3، فقط یک بار در تمام مدت آزمایش‌ها آبیاری شدند. پس از ۶۰ روز، گلدهی در گیاهان کنترل و برخی تیمارها شروع شد (شکل ۲).

شکل ۱- کاشت پیازهای نرگس در گلدان.

شکل ۲- رشد گیاه *Narcissus pseudonarcissus* پس از ۶۰ روز. C= نمونه کنترل، T1 = تیمار اول، T2= تیمار دوم، T3=تیمار سوم.

RNA برگ‌های تازه گیاه با استفاده از کیت GeneAll® RibospinTM Plant (305-1507)، استخراج شد. برای کاهش تخریب RNA در فرآیند استخراج از ZN RNaseبرای تمیز کردن کلیه ابزارها و تجهیزات تشخیصی استفاده شد. دقت و کیفیت نمونه‌های RNA با استفاده از نانودراپ در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ تعیین شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت Easy TM cDNA Synthesis Kit (GeneAll, Korea) بر اساس پروتکل ساخت سنتز هگزامر تصادفی و سنتز oligo dT انجام شد. با استفاده از سایت بانک ژنی NCBI، لیستی از ژن‌های مرتبط با تنش خشکی در گیاهان تک لپه تهیه شد. در مجموع پنج ژن AP2، MYB، bHLH، CBFD-NFYB ، bZIP برای تنش خشکی در گونه مورد بررسی شناسایی شدند. از بین این ژن‌ها دو ژن MYB و AP2 به دلیل حضور بیشتر آنها در گیاهان مرتبط، مورد بررسی قرار گرفتند. همه این ژن‌ها در خانواده عوامل رونویسی قرار دارند. برای بررسی بیان ژن‌ها، از روش qRT-PCRبه روش سایبرگرین (SYBR Green) با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن GAPDH به عنوان ژن زفرنس، با دستگاه Rotor-Gene Q ساخت شرکت Qiagen انجام شد. پرایمرها با استفاده از Gene Runner طراحی و با استفاده از Bioneer Analyzer برای توالی‌های همولوگ cDNA مورد تأیید قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در بررسی هر نمونه، واکنش برای هر یک از ژن ها، به صورت دوتایی انجام شد. در جدول ۱ جزئیات پرایمرهای مورد استفاده در qRT-PCR نشان داده شده است. با جستجو در سایت‌های *microRNA*. *sanger.ac.uk/sequences* و *miRNA*. *imbb.forth.gr/microinspector* میکروRNAهای مرتبط با ژن‌های مورد نظر مشخص شدند. به منظور بررسی وجود میکروRNA دیگری (غیر از miRNAهای معرفی شده) در گیاه نرگس که بتواند ژن‌های کدکننده AP2 و MYB را در این گیاه به عنوان ژن هدف شناسایی کند، تمامی میکروRNAهای بالغ گیاه نرگس هلندی از آخرین نسخه پایگاه اطلاعاتی miRBase (http://www.mirbase.org)/ گرفته شد و ژن‌های هدف بالقوه آنها (AP2 و MYB) با استفاده از پایگاه psRNATarget (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget) شناسایی شدند. برای بررسی بیان میکروRNAهای ژن‌های هدف در برگ‌های گیاه، از کیت BONmiR HighSpecificitymiRNA QPCRCoreReagent Kit (Bonyakhteh, Tehran, Iran, Cat No # BON 209002) استفاده شد.cDNA های سنتز شده، در معرض QRT-PCR قرار گرفتند (جدول ۲). جهت انجام واکنش ها، از 18srRNA به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. تمام مراحل مقدماتی تا آنجایی که ممکن بود دور از نور انجام شد.

با انجام واکنش‌های PCR در ترموسیکلر qRT-PCR Rotor-Gene Q(جداول ۳ و ۴)، تغییرات بیان ژن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز داده‌های QRT-PCR به روش مقایسه ای CT (سیکل آستانه) در دو بار تکرار صورت گرفت. آنالیزهای آماری داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۹) و آزمون ANOVA در سطح $p\leq 0.05$ انجام شد.

نتایج

بیان هر دو ژن کاندیدMYB و AP2 در این پژوهش در مقایسه با نمونه کنترل افزایش یافته است (شکل ۳). بررسی‌ها در پایگاه‌های اطلاعاتی miRBase و psRNATarget نشان داد که ژن هدف میکروRNA ۱۵۹، MYB و ژن هدف

میکروRNA ۱۷۲، AP2 است. با توجه به توالی میکروRNA ۱۵۹ و ۱۷۲ در تمام نمونه‌های مورد بررسی بودیم. میکروRNAها، بعد از انجامRT-PCR، شاهد عدم بیان

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در real-time PC .

Gene	Sequence (5′-3′)	Fragment length (bp)
MYB	F: CCAGATCTACGAGAAGCACCAG R: GGTTTGAAGTTGGTGACAGCG	۱۵۰
AP2	F: ACCAAGGAGTGTCGTCGACTG R: CTGGAAGCATAAGGGTTGGG	۲۰۰
GAPDH	F: GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC R: CATGAGTCCTTCCACGATACC	۱۶۱

جدول ۲ - توالی میکروRNAهای ۱۵۹ و ۱۷۲ و آداپتور یونیورسال طراحی شده و توالی پرایمرها.

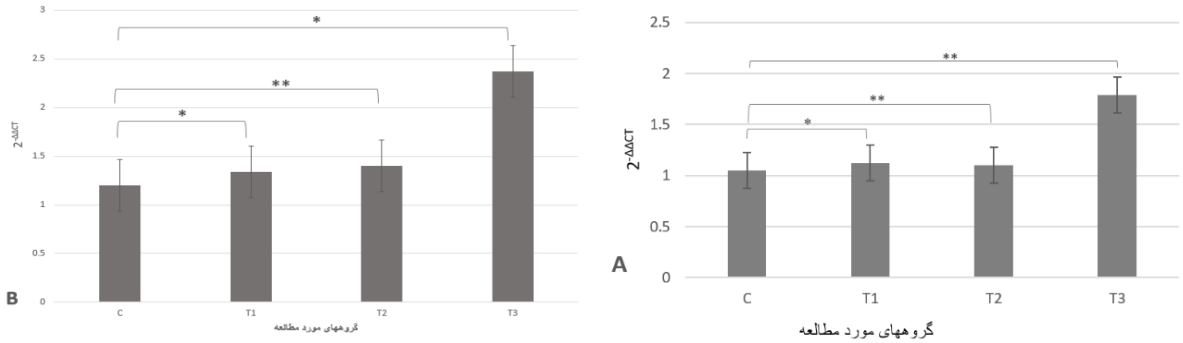
نام	توالی
Mir-159	CGGTTTGGATTGAAGGGAGCTCT
Mir-172	CGCGGAATCTTGATGATGCTGCA
Adaptor	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTT
Reverse Universal	GCGAGCACAGAATTAATACGAC

جدول ۳- مواد لازم برای انجام qRT-PCR در غلظت۲۰ میکرولیتر.

SYBR GREEN	10 میکرولیتر
رنگ ROX	0.4 میکرولیتر
پرایمر فوروارد (۱۰ pM)	1 میکرولیتر
پرایمر ریورس (۱۰ pM)	1 میکرولیتر
cDNA	1 میکرولیتر
آب استریل	6.6میکرولیتر

جدول ۴- برنامه زمانی دستگاه برای انجام qRT-PCR.

سیکل	دما (سانتی گراد)	زمان
سیکل واسرشتی	۹۵	۵ دقیقه
	۹۵	۵ ثانیه
۴۰ سیکل تکثیر	۶۰-۶۲	۲۰ ثانیه
	۷۲	۳۰ ثانیه



شکل ۳ - افزایش بیان ژنهای کاندید در برگ‌های گیاه*Narcissus pseudonarcissus* L.

*- تفاوت معنی دار نسبت به نمونه کنترل($p\leq0.05$) **- عدم معنادار بودن نسبت به نمونه کنترل ($p\geq0.05$) C- نمونه کنترل، T1- تیمار اول، T2- تیمار دوم، T3- تیمار سوم

بحث

تغییرات اقلیمی در جهان به دلیل افزایش جمعیت و توسعه صنعت در جهان، روبه افزایش است و گیاهان باید بتوانند به طرق مختلف به این تنش‌های محیطی، واکنش بدهند. در پژوهش حاضر، بررسی پاسخ ژنومی تنش خشکی در برگ *Narcissus pseudonarcissus* برای اولین بار انجام شده است. ژن‌های کاندید (AP2، MYB)، متعلق به خانواده عوامل رونویسی هستند. عوامل رونویسی، بیان ژن‌ها را تنظیم و رونویسی ژن‌های هدف را فعال یا سرکوب می‌کنند [۱۸،۱۹]. داده‌های حاصل از رونویسی نشان می‌دهند که عوامل رونویسی گیاهی در تعداد زیادی از فرآیندهای متابولیکی مرتبط با تنش‌های غیرزیستی دخیل هستند و بیان تعداد زیادی از ژن‌ها را توسط یک شبکه نظارتی پیچیده کنترل می‌کنند [۲۲-۲۰]. رابطه بین عوامل رونویسی و تنش کم آبی در بسیاری از گیاهان از جمله درآرابیدوپسیس [۲۳]، برنج [۲۴] و سویا [۲۵] با استفاده از فن ریزآرایه و تجزیه و تحلیل رونویسی مورد بررسی قرار گرفته است [۲۶]. افزایش بیانMYB ، حساسیت بهABA (اسید آبسیزیک) را افزایش می‌دهد که در پاسخ گیاهان به تنش کم آبی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند [۲۷]، از آنجایی که گیاهان تحت تیمار تنش کم آبی در پژوهش حاضر هم تا ۶۰ روز دوره آزمایش پایدار ماندند و حتی به گل رفتند و یا جوانه‌های گل در آنها پدیدار شد، تصور می‌کنیم افزایش بیان ژن‌های مورد آزمایش، همسو با این گزارش توانسته است، موجب افزایش تولید آبسزیک اسید و پایداری گیاهان به تنش کم آبی شود. اسید آبسیزیک (ABA) یکی از هورمون‌های پاسخگو به تنش در گیاهان و به خصوص مرتبط با پاسخ گیاه به کمبود آب است [۲۸].

ژن AP2 / EREBP از خانواده بزرگی است که در زندگی گیاهان نقش اساسی دارد. این ژن در انتقال مسیرهای مختلف نشانه‌دهی مرتبط با هورمون‌هایی نظیر ABA، اتیلن، سیتوکینین، جاسمونات و مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارد [۲۹] و تنش کم آبی می‌تواند بیان آن را فعال کند.

یکی از مکانیسم‌های افزایش بیان عوامل رونویسی مانند MYB وAP2 می‌تواند کاهش بیان miRNAهای کنترل کننده این ژن‌ها باشد، نتایج پژوهش با گزارش Zhang و همکاران همسویی دارد [۳۰]. مطالعات نشان داده‌اند که هر نوع خاصی از miRNA در گونه‌های گیاهی می‌تواند به طور متفاوتی به شرایط تنش کم آبی پاسخ دهد. به عنوان مثال، بیان miR398 a / b در *M.truncatula* در شرایط کم آبی افزایش یافته است، که با نتایج تحقیق حاضر متفاوت است [۳۱]. در یک بررسی دیگر در همان گیاه (*M.truncatula*)، در شرایط کم آبی، سطح بیان همانmiRNA (miR398 a/b) کاهش یافته است [۳۲]. این نتایج می‌توانند نشان دهنده تأثیر درجات مختلف خشکسالی و حساسیت بالای miRNA به این تغییرات باشند. به نظر می‌رسد که تنظیم کننده‌های مرتبط با بیانmiRNA ها، تحت شرایط مختلف تغییر می‌کنند و این تغییرات روی هدف miRNAها تأثیر می‌گذارد [۳۱] به همین دلیل، با وجود اینکه توالیmiRNAهای خاص در گیاهان مختلف ثابت است، اهداف آنها متفاوت است [۳۳]. بنابراین، لازم است، هدف miRNAها در گونه‌های مختلف گیاهی به طور جداگانه مشخص شود. اهداف شناخته شده می‌توانند شواهد علمی خوبی برای کمک به عملکرد miRNA در گونه‌های مختلف گیاهی باشند. بررسی‌ها در مورد ساز و کار miRNAها برای پاسخ به کم آبی نشان داده‌اند که miRNA-393 و 167 بطور مؤثر با بیان (ABAاسید آبسیزیک) همراه هستند [۳۴]. عناصر مسئول پاسخ(ABREs) ABA، پروموتور ژن‌های پاسخ دهندهABA ، هستند که یک بخش محافظت شده از عناصرCIS (cis elements) جهت پاسخ ABA (ABREs) را دارند که نقش مهمی در بیان پاسخ به تنش دارند [۳۵]. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که سطح بیان miRNA159 در برگ‌های گیاه تحت تیمار با کم آبی، با افزایش ABA گیاه همراه است. مشخص شده است که، miRNA159 نقش مهمی در پاسخ اسید آبسیزیک به رونوشت‌هایMYB 101 و MYB 33 دارد [۳۶]. در مطالعه ای دیگر، جایگاه‌های اتصالTF در ژن MYB آرابیدوپسیس، عناصر القاءکننده خشکسالی در پروموتور بودند [۱۰]. بنابراین، کاهش بیان miRNA ممکن است منجر به افزایش بیان این عوامل رونویسی شود که می‌تواند در کنترل برخی از ژن‌های مرتبط با کم آبی که دارای عناصر نظارتی مانند DRE در AP2 هستند، تأثیر بگذارد. بررسی تغییرات بیان این عوامل رونویسی و نیز تغییرات میزان آبسیزیک اسید، از اهداف آینده پژوهش حاضر

است. با توجه به حضور متنوع و تنظیمات متفاوت میکروRNAها در گیاهان مختلف و همچنین فعالیت‌های متفاوت آنها در اندام‌های یک گیاه، شناسایی و ارزیابی نحوه بیان آنها در شرایط مختلف اقلیمی، لازم و ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر، نقش دو میکروRNA مرتبط با خشکی (miR159, miR172) در برگ‌های گیاه نرگس هلندی *Narcissus pseudonarcissus* L. تحت تنش کم آبی، مورد ارزیابی قرار گرفت و علی رغم افزایش بیان ژن‌های هدف، شاهد عدم بیان میکروRNAهای مرتبط با آنها (miR159,miR172) بودیم. این نتیجه می‌تواند بستری برای تحقیقات مرتبط باشد.

تقدیر و تشکر

از کلیه راهنمایی‌ها و زحمات جناب پروفسور مجد، تقدیر و تشکر می‌نمایم.

منابع

[1] Singh SP, Upadhyay SK, Pandey A, Kumar S. Molecular approaches in plant biology and environmental challenges. Springer Singapore; 2019.

[2] Bhatia G, Singh A, Verma D, Sharma S, Singh K. Genome-wide investigation of regulatory roles of lncRNAs in response to heat and drought stress in Brassica juncea (Indian mustard). Environmental and Experimental Botany. 2020 Mar 1;171:103922.

[3] Fei X, Li J, Kong L, Hu H, Tian J, Liu Y, Wei A. miRNAs and their target genes regulate the antioxidant system of Zanthoxylum bungeanum under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry. 2020 May 1;150:196-203.

[4] Fei X, Li J, Kong L, Hu H, Tian J, Liu Y, Wei A. miRNAs and their target genes regulate the antioxidant system of Zanthoxylum bungeanum under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry. 2020 May 1;150:196-203.

[5] Liu J, Wang H, Chua NH. Long noncoding RNA transcriptome of plants. Plant biotechnology journal. 2015 Apr;13(3):319-28.

[6] Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 2012 Feb 1;1819(2):137-48.

[7] Willmann MR, Poethig RS. Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. Current opinion in plant biology. 2007 Oct 1;10(5):503-11.

[8] Jiang D, Zhou L, Chen W, Ye N, Xia J, Zhuang C. Overexpression of a microRNA-targeted NAC transcription factor improves drought and salt tolerance in Rice via ABA-mediated pathways. Rice. 2019 Dec;12:1-1.

[9] Zhou M, Tang W. MicroRNA156 amplifies transcription factor-associated cold stress tolerance in plant cells. Molecular Genetics and Genomics. 2019 Apr 5;294:379-93.

[10] Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. Rna. 2008 May 1;14(5):836-43.

[11] Wei L, Zhang D, Xiang F, Zhang Z. Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. International Journal of Plant Sciences. 2009 Oct;170(8):979-89.

[12] Yang J, Zhang N, Mi X, Wu L, Ma R, Zhu X, Yao L, Jin X, Si H, Wang D. Identification of miR159s and their target genes and expression analysis under drought stress in potato. Computational biology and chemistry. 2014 Dec 1;53:204-13.

[13] Hackenberg M, Gustafson P, Langridge P, Shi BJ. Differential expression of micro RNA s and other small RNA s in barley between water and drought conditions. Plant biotechnology journal. 2015 Jan;13(1):2-13.

[14] Li Y, Wan L, Bi S, Wan X, Li Z, Cao J, Tong Z, Xu H, He F, Li X. Identification of drought-responsive microRNAs from roots and leaves of alfalfa by high-throughput sequencing. Genes. 2017 Apr 13;8(4):119.

[15] Samad AF, Sajad M, Nazaruddin N, Fauzi IA, Murad AM, Zainal Z, Ismail I. MicroRNA and transcription factor: key players in plant regulatory network.

Frontiers in plant science. 2017 Apr 12;8:565.
[16] Agarwal PK, Jha B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. Biologia Plantarum. 2010 Jun;54(2):201-12.
[17] Luscombe NM, Thornton JM. Protein–DNA interactions: amino acid conservation and the effects of mutations on binding specificity. Journal of molecular biology. 2002 Jul 26;320(5):991-1009.
[18] Chiu TP, Xin B, Markarian N, Wang Y, Rohs R. TFBSshape: an expanded motif database for DNA shape features of transcription factor binding sites. Nucleic acids research. 2020 Jan 8;48(D1):D246-55.
[19] Lata C, Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. Journal of experimental botany. 2011 Oct 1;62(14):4731-48.
[20] Wang J, Wang F, Jin C, Tong Y, Wang T. A R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 from grapevine (Vitis vinifera L.) regulates flavonoids accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2020 Mar 3;95(2):147-61.
[21] Liu X, Meng P, Yang G, Zhang M, Peng S, Zhai MZ. Genome-wide identification and transcript profiles of walnut heat stress transcription factor involved in abiotic stress. BMC genomics. 2020 Dec;21:1-3.
[22] Brasileiro AC, Morgante CV, Araujo AC, Leal-Bertioli SC, Silva AK, Martins AC, Vinson CC, Santos CM, Bonfim O, Togawa RC, Saraiva MA. Transcriptome profiling of wild Arachis from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. Plant molecular biology reporter. 2015 Dec;33:1876-92.
[23] Moumeni A, Satoh K, Kondoh H, Asano T, Hosaka A, Venuprasad R, Serraj R, Kumar A, Leung H, Kikuchi S. Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought-tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress. BMC plant biology. 2011 Dec;11:1-7.
[24] Berry-Lowe SL, Mc Knight TD, Shah DM, Meagher RB. The nucleotide sequence, expression, and evolution of one member of a multigene family encoding the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase in soybean. Journal of molecular and applied genetics. 1982 Jan 1;1(6):483-98.
[25] Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. Plant physiology. 2009 Jan;149(1):88-95.
[26] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in Arabidopsis. Trends in plant science. 2010 Oct 1;15(10):573-81.
[27] Miyakawa T, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M. Structure and function of abscisic acid receptors. Trends in plant science. 2013 May 1;18(5):259-66.
[28] Xu ZS, Chen M, Li LC, Ma YZ. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement F. Journal of integrative plant biology. 2011 Jul;53(7):570-85.
[29] Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. Conservation and divergence of plant microRNA genes. The Plant Journal. 2006 Apr;46(2):243-59.
[30] Trindade I, Capitão C, Dalmay T, Fevereiro MP, Santos DM. miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in Medicago truncatula. Planta. 2010 Feb;231:705-16.
[31] Wu P, Han S, Zhao W, Chen T, Zhou J, Li L. Genome-wide identification of abiotic stress-regulated and novel microRNAs in mulberry leaf. Plant Physiology and Biochemistry. 2015 Oct 1;95:75-82.
[32] Lu S, Sun YH, Shi R, Clark C, Li L, Chiang VL. Novel and mechanical stress–responsive microRNAs in Populus trichocarpa that are absent from Arabidopsis. The Plant Cell. 2005 Aug;17(8):2186-203.
[33] Chen H, Li Z, Xiong L. A plant microRNA regulates the adaptation of

roots to drought stress. Febs Letters. 2012 Jun 12;586(12):1742-7.

[34] Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho TH, Wu R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant physiology. 1996 Jan;110(1):249-57.

The effect of dehydration stress on the expression of MYB, AP2, mir-172 and mir-159 genes in the leaves of *Narcissus pseudonarcissus* L.

Kamishirazi M. A.[1*], Tajadod G.[2]

[1*] Development Department, Faculty of Modern Sciences and Technologies, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

* (Corresponding author): M.shirazi@iautmu.ac.ir

DOI: 10.30495/jdb.2023.705273 https:// dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.3.7

Abstract

Advances in the world are causing changes in the living conditions of living things, including plants. Plants must be able to adapt to environmental stressful conditions in a variety of ways, even molecular methods. One mechanism is to regulate gene expression after transcription by miRNAs (microRNAs). MicroRNAs often have 20 to 22 nucleotides, some of whose target genes belong to transcription factors. The expression of microRNAs changes in response to dehydration stress. In the present study, *Narcissus* bulbs were grown under different irrigation conditions (from once a week to once every two months). The leaves of 60-day-old plants were used to extract miR172-miR159 by q PCR method. The results showed a significant increase in the expression of MYB and AP2 genes and no expression of 159 and 172 microRNAs in the treated and control samples. Therefore, miR172-miR159 is not affected by dehydration stress. Given that the expression of dehydration genes has been evaluated for the first time in the *Narcissus pseudonarcissus*, therefore, this study can provide a good basis for further investigation in this case.

Keywords: miRNA159, miRNA172, MYB, AP2, drought stress.