



Paper Type: Original Article



The Effect of Salicylic Acid Treatment on the Expression Pattern of miR172 & miR399 Under Salt Stress Conditions & the Gene Ontology (GO) Enrichment Analysis of Their Target Genes in Pistachio (*Pistacia vera* L.)

Masoomeh Jannesar^{*1} , Seyed Mahdi Seyedi^{1,2}

¹Department of Plant Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran;

^{*}(Assistant Professor: Corresponding author: Jannesar@ut.ac.ir).

²Plant Biotechnology Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran;

^{*}(Associate Professor: Corresponding author: Seyedi@nigeb.ac.ir).

Citation:

Jannesar, M. & Seyedi, S. M. (2025). The effect of salicylic acid treatment on the expression pattern of miR172 & miR399 under salt stress conditions & the gene ontology (GO) enrichment analysis of their target genes in pistachio (*Pistacia vera* L.). *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 38 (Issue No. 1), PP. 19-34.

Received: 2024.04.20

Accepted: 2024.10.30

Abstract

Introduction: Salinity stress, as one of the important abiotic stresses, harms the yield per unit area of many pistachio orchards in Iran. Plants use various mechanisms to adapt to environmental stress conditions, including post-transcriptional gene expression regulation through miRNAs.

Methods: Target genes of selected miRNAs were identified against the genes of salt-tolerant (Ghazvini) and sensitive (Sarakhs) pistachio genotypes. The GO enrichment analysis of target genes of selected miRNAs and the expression pattern of selected miRNAs under NaCl, SA, and combined treatment of NaCl+SA were measured.

Results: Salt-responsive target gene prediction of miR172 led to the finding of 113 & 123 target genes for the Ghazvini & Sarakhs genotypes, respectively. Moreover, 93 & 77 target genes were identified for miR399 in the Ghazvini & Sarakhs genotypes. The GO enrichment analysis of the miRNA target genes shows their role in response to chemical stimuli, metabolic processes related to macromolecules, binding to nucleotides & ATP, primary metabolic processes, regulating the catalytic activity of hydrolase, transferase, & oxidoreductase enzymes.

Conclusion: The difference in the expression pattern of miR172 and miR399 in response to salt stress between the tolerant and sensitive genotypes indicates the decisive role of these miRNAs in regulating salt stress tolerance mechanisms in pistachio plants. In addition, the findings of this research improve the upstream role of the salicylic acid hormone signaling pathway in the regulation of miRNA expression.

Keywords: miR172, miR399, Pistachio, Salt Stress, Salicylic Acid

تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر بیان miR172 و miR399 تحت تنش شوری و هستی شناسی ژن های هدف آنها در گیاه پسته (*Pistacia vera* L.)

معصومه جان‌نثار^{۱*}، سیدمهدی سیدی^{۱،۲*}

^۱استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۲دانشیار، گروه زیست‌فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران.

(*نویسنده مسئول: Jannesar@ut.ac.ir- Seyedi@nigeb.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۱

چکیده

مقدمه: تنش شوری بعنوان یکی از تنش‌های غیر زیستی مهم، اثرات زیان‌باری بر عملکرد در واحد سطح بسیاری از باغات پسته کشور داشته است. گیاهان برای سازگاری با شرایط تنش زای محیطی از سازوکارهای مختلفی از جمله تنظیم بیان ژن‌ها پس از رونویسی با واسطه miRNA ها استفاده می‌کنند.

روش‌ها: شناسایی ژن‌های هدف miRNA های منتخب در مقابل ژنهای دو ژنوتیپ متحمل (قزوینی) و حساس (سرخس) به شوری پسته انجام شد. بررسی هستی شناسی ژن‌های هدف miRNA های منتخب و بررسی الگوی بیان miRNA های منتخب تحت تیمارهای NaCl و SA و تیمار ترکیبی SA+NaCl صورت گرفت.

یافته‌ها: شناسایی ژن‌های هدف پاسخگر به تنش شوری برای miR172، منجر به یافتن ۱۱۳ و ۱۲۳ ژن هدف به ترتیب برای ژنوتیپ قزوینی و سرخس شد. در ژنوتیپ قزوینی و سرخس برای miR399 به ترتیب ۹۳ و ۷۷ ژن هدف شناسایی شد. هستی شناسی ژن‌های هدف این miRNA ها نقش آنها را در پاسخ به محرک‌های شیمیایی، فرآیندهای متابولیکی مرتبط با ماکرومولکول‌ها، اتصال به نوکلئوتید و ATP، فرآیندهای متابولیکی اولیه، تنظیم فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌های هیدرولاز، ترانسفراز و اکسیدو ردوکتاز نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: تفاوت در الگوی بیان miR172 و miR399 در پاسخ به تنش شوری بین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به شوری نشان دهنده نقش تعیین‌کننده این miRNA ها در تنظیم سازوکارهای تحمل به تنش شوری در گیاه پسته است. علاوه بر این، یافته‌های این پژوهش نقش بالادستی علامت‌دهی هورمون سالیسیلیک اسید در کنترل بیان miRNA ها را مشخص می‌کند.

کلیدواژه‌ها: پسته، تنش شوری، سالیسیلیک اسید، miR172، miR399

مقدمه

تنش شوری یکی از مهمترین تنش های غیر زیستی است که عملکرد تولیدات کشاورزی را در سراسر جهان کاهش می دهد. تقریباً بیش از ۲۰ درصد زمین های کشت شده در سراسر دنیا تحت تاثیر تنش شوری هستند. این درصد احتمالاً در اواسط قرن بیست و یکم به حدود ۵۰ درصد خواهد رسید [1]. خاک های شور باعث مشکلات زراعی قابل توجهی در آسیا، آفریقا و مناطق خشک و نیمه خشک آمریکای جنوبی شده است [2]. کشاورزی در ایران ۹۱/۵ درصد (۸۶ میلیارد متر مکعب) از کل آب مصرفی (۹۴ میلیارد متر مکعب) را مورد استفاده قرار می دهد که از میانگین جهانی آن بالاتر است. میزان استخراج آب های زیر زمینی که حدود ۹۲ درصد آنها به مصرف آبیاری می رسد بالا بوده که این استخراج زیاد موجب کمبود آب و شوری خاک می شود [3]. در ایران، آبیاری با آب های شور و زه کشی نامناسب از علل اصلی شور شدن زمین های کشاورزی است. پیش بینی ها نشان می دهد که بواسطه تغییرات آب و هوایی در جهان و همچنین ادامه برخی روش های آبیاری نادرست، در آینده نزدیک شوری خاک در ایران رو به افزایش خواهد بود یافت [4].

تنش شوری با تجمع سطوح بالای نمک های محلول بویژه سطوح سمی از کلریدها و سولفات های سدیم در خاک همراه است که این امر بر رشد بهینه گیاه اثر منفی دارد [5]. تنش های یونی و اسمزی مشتق از تنش شوری، شرایط مخرب خشکی فیزیولوژیکی را بر گیاه تحمیل می کند [6]. تیمار طولانی مدت نمک منجر به تولید گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species (ROS)) شامل اکسیژن یکتایی، سوپراکسید، رادیکال های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن می شود [6]. ROS تولید شده تحت تنش شوری باعث آسیب اکسیداتیو به اجزای سلولی مانند پروتئین ها، لیپیدها و DNA می شود و فعالیت های زیستی کلیدی گیاه را مختل نموده و موجبات کندی شدن متابولیسم و رشد یا مرگ سلولی و نهایتاً مرگ گیاه را فراهم می کند [7]. گیاهان از سازوکارهای مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی برای مقابله با تنش شوری استفاده می کنند. سازوکارهای اصلی شامل حفظ هم ایستایی یونی، بیوسنتز و تجمع حفاظت کننده های اسمزی و مواد محلول سازگار، فعال کردن آنزیم های آنتی اکسیدانی و سنتز ترکیبات آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی، سنتز پلی آمین ها، تولید نیتریک اکسید (NO) و کنترل های هورمونی و همچنین تنظیم الگوی بیان ژن های رمز گذار و تنظیمی دخیل در فرآیندهای مذکور است [8]. هورمون های گیاهی رشد و نمو گیاه را تنظیم و نقش مهمی را در پاسخ به تنش های مختلف بازی می کنند. سالیسیلیک اسید (Salicylic Acid (SA)) به عنوان یکی از هورمون های گیاهی می تواند فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی را در گیاه کنترل کند. این هورمون گیاهی قادر است تاثیر قابل توجهی را بر تحمل به تنش های زیستی و غیر زیستی از طریق کنترل مولکول های عملکردی یا تنظیمی دخیل در پاسخ به تنش داشته باشد [9]. بیوسنتز SA از طریق دو مسیر شامل ایزوکوریسمات سنتاز (Isochorismate Synthase (ICS)) و فنیل آلانین آمونیا لایاز (Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL)) صورت می گیرد. مطالعه بر روی گیاه ارابیدوپسیس نشان می دهد که بخش بزرگی از بیوسنتز SA از طریق مسیر ایزوکوریسمات صورت می گیرد [10]. مطالعات زیادی نشان می دهند که کاربرد SA می تواند اثرات تنش شوری را کاهش دهد به عنوان مثال چنین تاثیری در گیاهان *Dianthus superbus* [11]، *Maize* [12] و *Soybean* [13] و پسته [14] گزارش شده است. تیمار SA در این گیاهان فرآیندهایی مانند رشد، نمو کلروپلاست، متابولیسم کربن، متابولیسم پروتئین، حفاظت آنتی اکسیدانی و بیان ژن های پاسخگر به تنش شوری را تحت تاثیر قرار می دهد [15].

MicroRNA ها (miRNAs) RNA های تنظیم کننده ۲۰-۲۲ نوکلئوتیدی هستند که توسط ژن های miR درونزا در گیاهان رمزگذاری می شوند [16]. رونوشت های اولیه آن ها RNA های پیش ساز با ساختار حلقه-ساقه ای هستند که توسط پروتئین های Dicer-like (DCL) به miRNA های بالغ تبدیل می شوند [17]. در یوکاریوت ها، miRNA ها بیان ژن ها را در سطح پس از رونویسی کنترل می کنند [18]. علاوه بر نقش miRNA ها در تنظیم رشد و فرآیندهای نمو گیاه، این مولکول ها پاسخ های گیاه به تنش های زیستی و غیرزیستی را نیز کنترل می کنند [19]، [20]، [21]. بسیاری از miRNA های پاسخگر به تنش شوری و ژن های رمز شده گذار هدف آنها در گیاهان شناسایی اند [22].

اکثر باغات پسته کشور در مناطق خشک، نیمه خشک و کویری واقع شده اند که یکی از مشکلات رو به افزایش در این مناطق، شور شدن مخازن آب های زیرزمینی است که منبع عمده تامین کننده آب مصرفی درختان پسته هستند. شور شدن خاک باعث کاهش میزان محصول پسته برداشتی در این مناطق می شود. لذا با توجه به اهمیت اقتصادی و اجتماعی صنعت پسته در ایران، مطالعات

در جهت معرفی ژنوتیپ های متحمل به تنش شوری و شناسایی عوامل موثر در تحمل این گیاه در برابر تنش ضروری است. در پژوهش قبلی، تاثیر مثبت تیمار SA بر کاهش اثرات نامطلوب تنش شوری در دو ژنوتیپ متحمل (قزوینی) و حساس (سرخس) به شوری *P. vera* (Pistacia vera L.) بررسی و گزارش شد [14]. از طرف دیگر، توالی یابی در مقیاس وسیع miRNA های پسته تحت تنش شوری (۶ ساعت) در دو ژنوتیپ پسته، متحمل (قزوینی) و حساس (سرخس) به شوری انجام شد و miRNA های پاسخگر به تنش در این دو ژنوتیپ شناسایی و معرفی گردید [23]. در پژوهش حاضر، هدف ما درک سازوکار تنظیمی miRNA های منتخب (miR172 و miR399) تحت تیمار های مختلف شوری شامل تیمارهای ۶، ۲۴ و ۱۲۰ ساعت است. علاوه بر این، نقش تنظیمی هورمون SA و تیمار توام شوری و SA بر روی بیان این miRNA ها در گیاهان متحمل و حساس به شوری پسته مورد بررسی قرار خواهد گرفت. در ادامه پیش بینی ژن های هدف این miRNA ها در مقابل رونوشت های پاسخگر به شوری پسته و رسم مسیرهای متابولیسمی درگیر در این تنظیم در ژنوتیپ های متحمل و حساس به شوری انجام می شود.

مواد و روش ها

جمع آوری داده ها

انتخاب miRNA های پاسخگر به تنش شوری جهت استفاده در این پژوهش به کمک داده های رساله دکتری Lotfi (۲۰۱۴) [23] که از تکنیک توالی یابی با توان بالا برای شناسایی و بررسی بیان miRNA ها تحت تنش شوری در گیاه پسته تحت تیمار NaCl (۲۵۰ میلی مولار) به مدت ۶ ساعت انجام شده بود و همچنین داده های مقالات مربوط به بررسی بیان miRNA ها و ژن های هدف آنها تحت تنش شوری در سایر گیاهان [22]، [24]، [25] صورت گرفت. پس از بررسی های انجام شده، از میان miRNA های پاسخگر به تنش شوری، miR172 و miR399 برای بررسی در این پژوهش انتخاب شدند.

در پژوهش قبلی [26]، ترانسکریپتوم رفرنس برای RNA های رمز گذار (۷۹۷۷۷ توالی) در گیاه پسته ساخته شد. بررسی بیان ژن ها در مقیاس وسیع نشان داد که ۹۹۰۹ و ۸۹۹۸ رونوشت رمز گذار به ترتیب در ژنوتیپ های قزوینی و سرخس تحت تیمار ۶ ساعت NaCl در مقایسه با کنترل، تفاوت بیان نشان می دهد. در این پژوهش، از رونوشت هایی که تحت تنش شوری به مدت ۶ ساعت در ژنوتیپ های متحمل (قزوینی) و حساس (سرخس) پسته تفاوت بیان نشان دادند برای یافتن ژن های هدف miRNA های پاسخگر به تنش شوری ۶ ساعته در پسته استفاده شد.

مواد گیاهی و شرایط کشت

برای تعیین ارقام حساس و متحمل به شوری در پسته، پنج ژنوتیپ *P. vera* شامل قزوینی، سرخس، اکبری، بادامی زرنده و کله قوچی انتخاب شدند. نهال های شش هفته ای این ژنوتیپ ها که بصورت هیدروپونیک کشت داده شده بودند، به مدت ۸ روز با ۲۵۰ میلی مولار NaCl از طریق اضافه نمودن نمک به محیط کشت هیدروپونیک تیمار شدند. بعنوان شاخص تحمل به تنش شوری، میزان بقاء، محتوای مالون دی آلدئید و میزان سدیم و پتاسیم این گیاهان اندازه گیری شد. از بین این پنج ژنوتیپ، ژنوتیپ سرخس و قزوینی به ترتیب به عنوان ژنوتیپ های پسته حساس و متحمل به نمک تعیین شدند [27].

بذرهای ژنوتیپ های سرخس و قزوینی از موسسه تحقیقات پسته کشور تهیه شد. بذرها پس از استریل سطحی توسط سفید کننده تجاری (۲۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه) و قارچ کش کاپتان (۰/۳ درصد به مدت ۶۰ دقیقه)، به دقت با آب مقطر شسته شدند. بذرهای سترون شده قبل از کاشت در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک ماه تحت تیمار قرار گرفتند و به صورت هیدروپونیک در محلول غذایی هوگلند (pH ۵/۸) با دوره های نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد رشد داده شدند. برای اطمینان از یک ترکیب یونی نسبتاً ثابت، محلول های غذایی هر ۳ روز یکبار تعویض شدند. پس از ۶ هفته، نهال های پسته به سه گروه تقسیم شدند و از طریق محلول غذایی با NaCl (۲۵۰ میلی مولار)، SA (۵۰ میکرومولار) و NaCl (۲۵۰ میلی مولار) + SA (۵۰ میکرومولار) به طور جداگانه تیمار شدند. غلظت SA و NaCl بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شد [15]، [27]. برای جلوگیری از شوک اسمزی، تیمار نمک به تدریج به محلول غذایی در دو مرحله اعمال شد تا غلظت نهایی ۲۵۰ میلی مولار به دست

آید. برگ ها و ریشه های دانه رست های پسته پس از ۰، ۶، ۲۴ و ۱۲۰ ساعت پس از تیمارها به طور جداگانه جمع آوری و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شدند. SA و NaCl از Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا خریداری شد. هر آزمایش در سه تکرار مجزا انجام گرفت.

پیش بینی ژن های هدف miRNA ها

توالی های مربوط به miRNA های بالغ miR172 (TGAGAATCTTGATGATGCTGC) و miR399 (TGCCAAAGGAGAGTTGCCCTG) اختصاصی پسته از پژوهش پیشین [23] استخراج شد. برای پیش بینی ژن های هدف miRNA ها از سرور آنلاین psRNA Target (نسخه ۲۰۱۷) [28] استفاده شده و توالی miRNA ها در برابر ژن هایی با بیان متفاوت تحت تنش شوری در ژنوتیپ های پسته قزوینی و سرخس بطور جداگانه هم ردیف شدند.

آنالیز هستی شناسی ژنی و شناسایی مسیرهای زیستی غنی شده در ژن هایی با بیان متفاوت

هستی شناسی ژنی (Gene Ontology (GO)) یک سیستم طبقه بندی استاندارد بین المللی است که برای توصیف و تعیین عملکرد محصولات ژن ها (پروتئین) در موجودات مورد استفاده قرار می گیرد [29]. از GO برای آنالیز عملکرد ژن های هدف استفاده شد و نتایج تقسیم بندی آن در سه گروه مجزای فرآیند های زیستی، عملکرد های مولکولی و اجزای سلولی قرار داده شد. برای شناسایی عبارات هستی شناسی و مسیرهای زیستی غنی شده در ژن هایی با بیان متفاوت که ژن های هدف miRNA های منتخب بودند، از سایت AgriGO [30] استفاده شد. با استفاده از نتایج به دست آمده، تعیین میزان اهمیت و دسته بندی مسیرهای عملکردی و متابولیسمی ژن های هدف miRNA های منتخب انجام شد.

استخراج RNA

استخراج RNA کل از ۲۰۰ میلی گرم بافت برگ گیاه پسته با استفاده از روش تغییر یافته CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) انجام شد [31]. خلوص و کمیت نمونه های RNA توسط اسپکتروفتومتر NanoDrop 2000™ micro-volume (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) و ژل الکتروفورز تعیین شد. نمونه های RNA استخراج شده از ریشه با آنزیم RNase-free DNase I تیمار شدند تا آلودگی احتمالی DNA حذف شود.

تست Real-time PCR

miRNA های miR172 و miR399 برای بررسی بیان توسط تست qRT-PCR در سه نقطه زمانی ۰، ۶، ۲۴ و ۱۲۰ ساعت پس از تیمار NaCl و هورمون SA در برگ ژنوتیپ قزوینی و سرخس انتخاب شدند. بررسی بیان miRNA های بالغ با روش stem-loop reverse transcription-qPCR انجام شد [32]، [33]، 5S rRNA [34] به عنوان ژن خانه دار برای بررسی بیان miRNA ها استفاده شد. جدول ۱ توالی پرایمرهای RT و پرایمرهای PCR اختصاصی miRNA ها را نشان می دهد.

Real-time PCR با استفاده از کیت Real-time PCR SYBR Green (Qiagen، آلمان) انجام شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر نمونه cDNA، ۰/۲ میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse (۱۰ میکرومولار)، و ۱۰ میکرولیتر از Real-time master mix بود. شرایط چرخه Real-time PCR شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه با شرایطی شامل دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه است. فرمول Pfaffl [35] برای محاسبه بیان نسبی ژن ها در نرم افزار REST (۲۰۰۹) (<http://rest.gene-quantification.info/>) استفاده شد. آنالیز هر نمونه در سه تکرار صورت گرفت.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در سنجش stem-loop RT-qPCR برای miRNA های منتخب

Table 1- Primers used in stem-loop RT-qPCR analysis for selected miRNAs

miRNA	RT primer (5'-3')	(5'-3') Forward primer	(5'-3') Reverse primer
mir172	SL37*-GATGCTGC	FW14**-TGAGAATCTT	AACTGGTGTCTGGAG***
mir399	SL37-TTGCCCTG	FW14-TGCCAAAGGA	AACTGGTGTCTGGAG***

* SL37 = 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCCGGCAATTCAGTTGAG-3'

** FW14 = 5'-ACACTCCAGCTGGG-3'

*** Identical to nt 4-19 of sequence SL37

نتایج و بحث

شناسایی ژن های هدف miRNA های منتخب

شناسایی ژن های هدف مولکولهای miRNA و فرآیندهای زیستی و متابولیسمی که این اهداف در آنها شرکت دارند می تواند نقش تنظیمی miRNA ها را هر چه بیشتر روشن نماید. miRNA ها با اتصال به نوکلئوتیدهای خاص در رونوشت های هدف، بیان این رونوشت ها را به طور منفی تنظیم می کنند. میزان جفت شدگی miRNA ها با رونوشت های هدف آنها تعیین کننده روش خاموشی بیان ژن هدف شامل مهار ترجمه یا برش رونوشت هدف و تخریب بعدی آن خواهد بود [36]. بنابراین، اتصال کامل تر موجب برش رونوشت هدف و اتصال ناقص موجب مهار ترجمه آن می شود [37]. یکی از عواملی که می تواند میزان جفت شدگی بین miRNA و رونوشت هدف را نشان دهد، سطح انتظار (Expectation) است، هر چه این عدد کوچکتر باشد نشان دهنده اتصالات بیشتر و کاملتری خواهد بود.

ژن های هدف miR172

در میان رونوشت های تغییر بیان یافته ژنوتیپ قزوینی تحت تنش شوری، ۱۱۳ ژن هدف برای miR172 شناسایی شد. از این تعداد، ۷ ژن از طریق سازوکار مهار ترجمه و ۱۰۶ ژن از طریق سازوکار برش تنظیم می شوند. کمترین سطح انتظار برای رونوشت های هدف miR172، ۰/۵ است و متعلق به ژن Floral homeotic protein APETALA2 است. گل های گیاهان دو لپه ای از چهار نوع اندام اصلی شامل کاسبرگ، گلبرگ، پرچم و مادگی تشکیل شده اند. چهار دسته اصلی از ژن های همئوتیک A، B، C و E، چهار نوع اندام گل را به صورت ترکیبی مشخص می کنند. ژن های کلاس A، APETALA1 و APETALA2 (AP1 و AP2)، همراه با ژن های کلاس E، هویت کاسبرگ را در اولین حلقه تعیین می کنند [37]. خانواده فاکتورهای پاسخ اتیلن (AP2/ERFs) از فاکتورهای های رونویسی حاوی دومین اتصال یابنده به DNA هستند. تجزیه و تحلیل عملکردی AP2/ERFs در آرابییدوپسیس و برنج ثابت کرده است که آنها تنظیم کننده های کلیدی پاسخ های گیاه به تنش و موثر در علامت دهی هورمونی هستند. گزارش شده است که AP2/ERF در گیاه ذرت در پاسخ به تنش های خشکی، شوری، غرقابی و سرما نقش دارد [39].

در میان رونوشت های تغییر بیان یافته ژنوتیپ سرخس تحت تنش شوری، ۱۲۳ ژن هدف برای miR172 شناسایی شد. از این تعداد، ۷ ژن از طریق سازوکار مهار ترجمه و ۱۱۶ ژن از طریق سازوکار برش تنظیم می شوند. بطور مشابه با ژنوتیپ قزوینی، کمترین سطح انتظار برای رونوشت های هدف miR172، ۰/۵ است و متعلق به ژن AP2 است.

ژن های هدف miR399

در میان رونوشت های تغییر بیان یافته ژنوتیپ قزوینی تحت تنش شوری، ۹۳ ژن هدف برای miR399 شناسایی شد. از این تعداد، ۱۳ ژن از طریق سازوکار مهار ترجمه و ۸۰ ژن از طریق سازوکار برش تنظیم می شوند. کمترین سطح انتظار برای رونوشت های هدف miR399، ۳/۵ است که متعلق به ژن Laccase است. لاکازها به عنوان گلیکوپروتئین های حاوی چندین مس، پلیمریزاسیون الکل های مونولیگنول را در مسیر بیوسنتز لیگنین کاتالیز می کنند. تنش های مختلف در گیاهان می تواند باعث تجمع ROS ها شود که با تجمع لیگنین همراه است. بنابراین، متابولیسم لیگنین در واکنش های گیاه در طول تنش های زیستی و غیرزیستی مانند شرایط

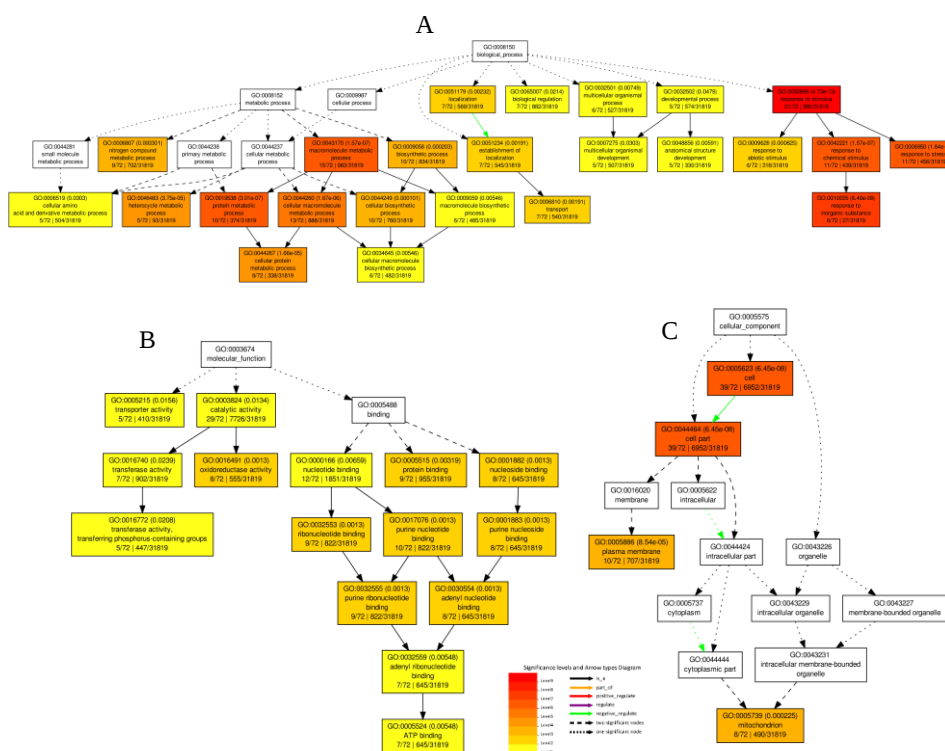
تنش خشکی و شوری مهم و ضروری است [39]. در گیاه کنگر فرنگی (*Cynara cardunculus*) نیز بطور مشابه با گیاه پسته مشخص شده است که اعضای خانواده ژن لاکاز بعنوان یکی از اهداف cca-miR399 در پاسخ به تنش شوری در این گیاه نقش دارند [41].

در میان رونوشت های تغییر بیان یافته ژنوتیپ سرخس تحت تنش شوری، ۷۷ ژن هدف برای miR399 شناسایی شد. از این تعداد، ۱۲ ژن از طریق سازوکار مهار ترجمه و ۶۵ ژن از طریق سازوکار برش تنظیم می شوند. کمترین سطح انتظار برای رونوشت های هدف miR399، ۳/۵ است و متعلق به ژن های Laccase و Glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 (G6PD2) می باشد. گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PDH یا G6PD) آنزیم تنظیم کننده کلیدی در مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات (OPPP) است. این آنزیم تحت تنش شوری رشد ریشه را در گیاه ارایدوپسیس تنظیم می کند [42].

هستی‌شناسی و مسیرهای عملکردی ژن‌های هدف miRNA های منتخب

هسته، شناسه، و مسیرهای عملکردی، ژن‌های هدف miR172

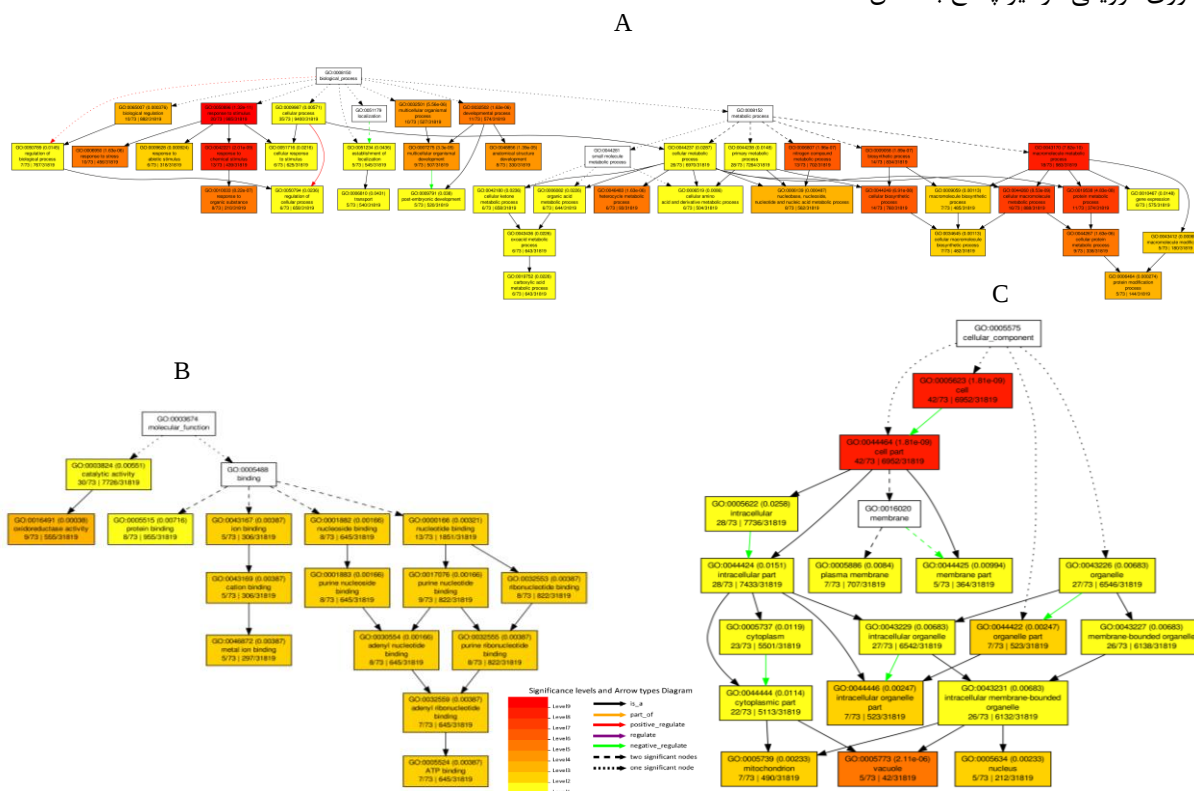
در بررسی هستی شناسی، ژن های هدف پیش بینی شده به فرآیند های زیستی، عملکرد های مولکولی و اجزای سلولی طبقه بندی شدند. بر این اساس، در ژنوتیپ قزوینی برای miR172 در فرآیند های زیستی بیشترین فراوانی عبارات هستی شناسی مربوط به تعیین عملکرد ژن ها شامل "پاسخ به محرک"، "فرآیندهای متابولیسمی مرتبط با ماکرومولکول ها" و "پاسخ به محرک های شیمیایی" بود. در عملکرد های مولکولی "فعالیت کاتالیزوری"، "اتصال به نوکلئوتید" و "اتصال به ATP" بیشترین فراوانی را داشت. در اجزای سلولی، بیشترین فراوانی مربوط به "غشای پلاسمایی" و "میتوکندری" بود (شکل ۱). در بخش فرآیندهای زیستی و عملکردهای مولکولی، پاسخ های گیاه به محرک یا در حقیقت تنش شیمیایی که در اینجا تیمار NaCl است فعال می شود. این پاسخ ها می تواند شامل تنظیم متابولیسم و آنابولیسم گیاه در ارتباط با ماکرومولکول ها باشد و یا اینکه در سطح تنظیم فعالیت یا بیان مولکول های با فعالیت کاتالیزوری، اتصال به نوکلئوتید یا اتصال به ATP باشد.



شکل ۱- عملکردهای باقیه ۱۱۳ ژن هدف miR172 که تحت تنش شوری در ژنوتیپ قزوینی تغییر بیان داشته اند. (A) نتایج گرافیکی فرآیند های زیستی، (B) نتایج گرافیکی عملکرد های مولکولی و (C) نتایج گرافیکی اجزای سلولی. نتایج گرافیکی از طریق ابزار مبتنی بر وب AgriGO تهیه شد [30].

Figure 1- Potential functions of 113 differentially expressed target genes of miR172 under salt stress in the Ghazvini genotype. (A) Graphical results of biological processes, (B) Graphical results of molecular functions, & (C) Graphical results of cellular components. Graphical results were prepared through AgriGO web- used tool [30].

در ژنوتیپ سرخس برای miR172 در فرآیند های زیستی بیشترین فراوانی عبارات هستی شناسی شامل "فرآیندهای سلولی"، "فرآیندهای متابولیکی اولیه" و "پاسخ به محرک" بود. در عملکرد های مولکولی "فعالیت کاتالیزوری"، "اتصال به نوکلئوتید" و "اتصال به ATP" بیشترین فراوانی را داشت. در اجزای سلولی، بیشترین فراوانی مربوط به "واکوئل"، "میتوکندری" و "هسته" بود (شکل ۲). به نظر می رسد که تنظیم فرآیندهای سلولی و متابولیکی اولیه در ژنوتیپ سرخس در مقایسه با تنظیم فعالیت و بیان ژن های دخیل در فرآیندهای متابولیسمی مرتبط با ماکرومولکول ها و پاسخ به محرک های شیمیایی در ژنوتیپ قزوینی تحت تنش شوری از اولویت بیشتری برخوردار است. داده های حاصل از هستی شناسی ژن های هدف پاسخگر به تنش شوری miR172 در ژنوتیپ حساس به شوری سرخس نشان می دهد که اندامک های سلولی بیشتری شامل هسته و واکوئل در مقایسه با ژنوتیپ متحمل به شوری قزوینی در گیر پاسخ به تنش هستند.



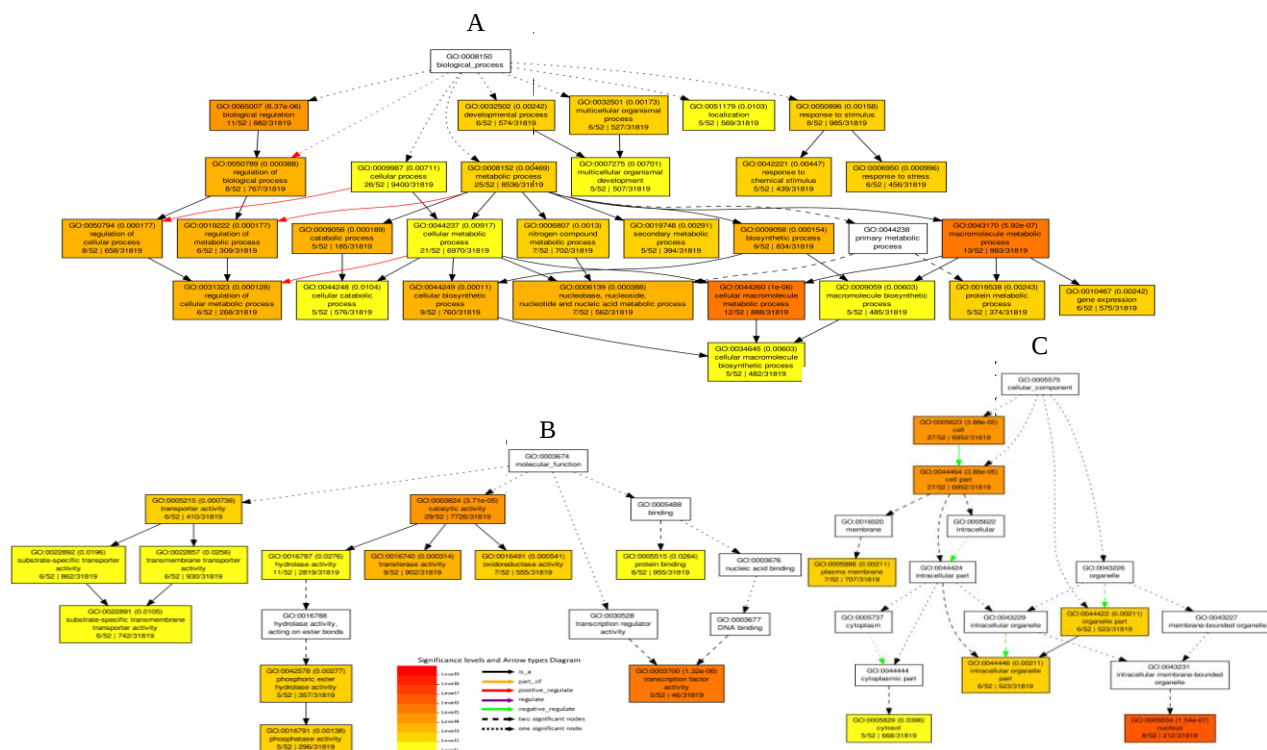
شکل ۲- عملکردهای بالقوه ۱۲۳ ژن هدف miR172 که تحت تنش شوری در ژنوتیپ سرخس تغییر بیان داشته اند. (A) نتایج گرافیکی فرآیند های زیستی، (B) نتایج گرافیکی عملکرد های مولکولی و (C) نتایج گرافیکی اجزای سلولی. نتایج گرافیکی از طریق ابزار مبتنی بر وب AgriGO تهیه شد [30].

Figure 2- Potential functions of 123 differentially expressed target genes of miR172 under salt stress in the Sarakhs genotype. (A) Graphical results of biological processes, (B) Graphical results of molecular functions, & (C) Graphical results of cellular components. Graphical results were prepared through AgriGO web- used tool [30].

هستی، شناسی، و مسیرهای عملکردی ژن های هدف miR399

در ژنوتیپ قزوینی برای miR399 در فرآیندهای زیستی بیشترین فراوانی عبارات هستی‌شناسی مربوط به تعیین عملکرد ژن‌ها شامل "فرآیندهای متابولیکی"، "فرآیندهای متابولیسمی مرتبط با ماکرومولکول‌ها" و "تنظیمات زیستی" بود. در عملکردهای مولکولی "فعالیت کاتالیزوری"، "فعالیت هیدرولازی" و "فعالیت ترانسفرازی" بیشترین فراوانی را داشت. در اجزای سلولی، بیشترین فراوانی مربوط به "هسته"، "غشای پلاسمایی" و "سیتوزول" بود (شکل ۳). تحت تنش نمک تنظیمات زیستی مختلفی در سطح

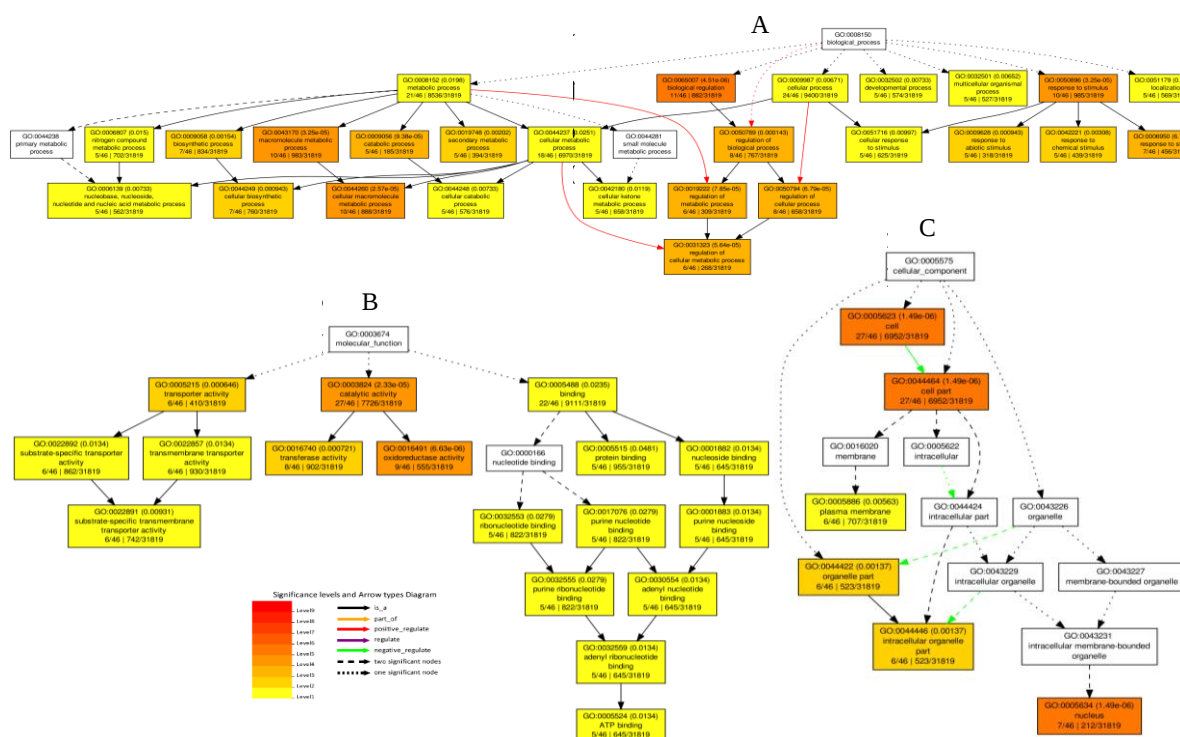
فرآیندهای متابولیکی و متابولیسمی مرتبط با ماکرومولکول ها انجام می شود که در نهایت می تواند در ژنوتیپ متحمل به شوری قزوینی صفت تحمل به تنش شوری را شکل دهد. تحت تنش شوری از طریق تنظیم فعالیت و بیان آنزیم ها، فعالیت کاتالیزوری آنها نیز تنظیم می شود. مشابه با نتایج مشاهده شده در ژنوتیپ قزوینی پسته، عبارات هستی شناسی فعالیت هیدرولازی و فعالیت ترانسفرازی در گیاه جو [43]، گندم [44] و انگور [45] نیز در ژن های تغییر بیان یافته تحت تنش شوری غنی شده اند.



شکل ۳- عملکردهای بالقوه ۹۳ ژن هدف *miR399* که تحت تنش شوری در ژنوتیپ قزوینی تغییر بیان داشته اند. (A) نتایج گرافیکی فرآیندهای زیستی، (B) نتایج گرافیکی عملکردهای مولکولی و (C) نتایج گرافیکی اجزای سلولی. نتایج گرافیکی از طریق ابزار مبتنی بر وب *AgriGO* تهیه شد [30].

Figure 3- Potential functions of 93 differentially expressed target genes of *miR399* under salt stress in Ghazvini genotype. (A) Graphical results of biological processes, (B) Graphical results of molecular functions & (C) Graphical results of cellular components. Graphical results were prepared through *AgriGO* web-ased tool [30].

در ژنوتیپ سرخس برای *miR399* در فرآیندهای زیستی بیشترین فراوانی عبارات هستی شناسی مربوط به تعیین عملکرد ژنها شامل "فرآیندهای متابولیکی"، "تنظیمات زیستی" و "پاسخ به محرک" بود. در عملکردهای مولکولی "فعالیت کاتالیزوری"، "اتصال" و "فعالیت اکسیدو ردوکتازی" بیشترین فراوانی را داشت. در اجزای سلولی، بیشترین فراوانی مربوط به "هسته"، "غشای پلاسمایی" و "اندامک های داخل سلولی" بود (شکل ۴). مطالعات بر روی گیاهان دیگر عبارات هستی شناسی مشابهی را در ژن های تغییر بیان یافته تحت تنش شوری گزارش کرده اند [43]، [45] که نشان دهنده وجود سازوکارهای تقریباً مشابه در بین گیاهان مختلف رویارویی با تنش هایی مانند تنش شوری است ولی میزان موفقیت این سازوکارها در بین ژنوتیپ های یک گیاه و گیاهان مختلف متفاوت است که این امر ارتباط مستقیم با ترکیب سازوکارهای فعال شده و نحوه تنظیم فرآیندها و عملکردهای زیستی و مولکولی است که نهایتاً موفقیت یا عدم موفقیت گیاه در مواجهه با تنش را تعیین می کند.



شکل ۴- عملکردهای بالقوه ۷۷ ژن هدف miR399 که تحت تنش شوری در ژنوتیپ سرخس تغییر بیان داشته اند. (A) نتایج گرافیکی فرآیندهای زیستی، (B) نتایج گرافیکی عملکردهای مولکولی و (C) نتایج گرافیکی اجزای سلولی. نتایج گرافیکی از طریق ابزار مبتنی بر وب AgriGO تهیه شد [30].

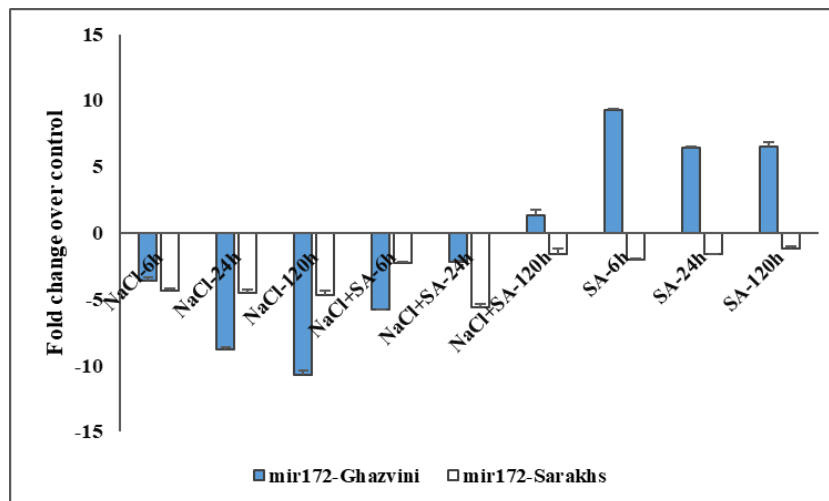
Figure 4- Potential functions of 77 differentially expressed target genes of miR399 under salt stress in Sarakhs genotype. (A) Graphical results of biological processes, (B) Graphical results of molecular functions & (C) Graphical results of cellular components. Graphical results were prepared through AgriGO web-ased tool [30].

تنظیم بیان miR172 تحت تیمار NaCl و SA

تغییرات بیانی ژن miR172 در پاسخ به تیمارهای NaCl، SA و NaCl+SA با استفاده از Real-time PCR در برگ‌های ژنوتیپ‌های قزوینی و سرخس مورد بررسی قرار گرفت. در ژنوتیپ قزوینی، ژن miR172 در تمام زمان‌ها پس از تیمار NaCl در مقایسه با شاهد کاهش بیان داشت که این کاهش بیان با افزایش زمان تیمار از ۳/۶ (۶ ساعت) تا ۱۰/۸ (۱۲۰ ساعت) برابر نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد، اما در ژنوتیپ سرخس با وجود کاهش بیان در مقایسه با شاهد، ژن miR172 الگوی بیان تقریباً مشابهی را در تمام زمان‌ها پس از تیمار شوری نشان می‌دهد (شکل ۵). گزارش شده است که بیان ژن miR172 برای انتقال از مرحله جوانی به مرحله بلوغ رشد ساقه در گیاهان که همراه با تغییراتی در مورفولوژی روبشی و افزایش پتانسیل تولیدمثلی است، مهم است [46]. گیاهان از طریق کنترل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌توانند تحمل به تنش شوری را افزایش دهند. miRNAها بعنوان مولکول‌های تنظیم‌کننده گیاهی می‌توانند اثرات بازدارنده ROSهای ناشی از تنش نمک را تعدیل کنند. برخی گزارشات نشان می‌دهند که miR172 یک تنظیم‌کننده مثبت تحمل به تنش شوری است. این miRNA تحت تنش شوری رونوشت ژن IDS1 (INDETERMINATE SPIKELET1) به عنوان یکی از ژن‌های هدف پایین‌دست خود را هدف قرار داده و اثر این بازدارنده رونویسی بر روی ژن‌های جاروب‌کننده ROSها را مهار می‌کند. نقش مهم واحد علامت‌دهی miR172-IDS1 در مهار ROSها و حفظ و تنظیم هموستاز ROSها در طی تنش نمک در گیاهان محصولی مانند برنج و گندم به اثبات رسیده است [47]، [48]. مشابه با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، miR172 در گیاهان *Gossypium raimondii* [49] و *Solanum linnaeanum* [50] به ترتیب با ژن‌های هدف AP2-like و ethylene-responsive transcription factor و APETALA2، در پاسخ به تنش شوری فروتنظیمی می‌شود. از طرف دیگر، بیان ژن این miRNA در گیاهان *Raphanus sativus* [51] و *Populus trichocarpa* [52] تحت تیمار شوری فراتنظیمی پیدا کرده است.

در ژنوتیپ قزوینی، تیمار SA در شرایط تنش شوری تجمع رونوشت *miR172* را در دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت در مقایسه با شاهد کاهش داد. این کاهش بیان در مقایسه با تیمار شوری به تنهایی، پس از ۶ ساعت تیمار، ۱/۶ برابر افزایش و پس از ۲۴ ساعت تیمار ۱/۷ برابر کاهش داشت. نتیجه جالب توجه پس از ۱۲۰ ساعت تیمار SA در شرایط تنش شوری در ژنوتیپ قزوینی به دست آمد و بیان ژن *miR172* به میزان ۱/۳ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در ژنوتیپ سرخس تحت تیمار توام SA و NaCl، در تمام زمان ها پس از تیمار میزان بیان ژن *miR172* در مقایسه با شاهد کاهش داشت که این کاهش در تیمار ۶ و ۱۲۰ ساعت کمتر از تیمار شوری به تنهایی است ولی این کاهش در تیمار ۲۴ ساعت ۱/۲ برابر بیشتر از تیمار NaCl به تنهایی است (شکل ۵).

همانطور که شکل ۵ نشان می دهد، در ژنوتیپ قزوینی تیمار SA به تنهایی اثر القایی بر بیان ژن *miR172* داشته و بیان این ژن را به میزان ۹/۳، ۶/۴ و ۶/۵ برابر در مقایسه با شاهد به ترتیب تحت تیمارهای ۶، ۲۴ و ۱۲۰ ساعت افزایش داده است. بطور کاملاً متفاوت در ژنوتیپ سرخس، تیمار SA بیان این ژن را در همه زمان های پس از تیمار در مقایسه با شاهد کاهش داده است (شکل ۵). مشابه با نتایج مشاهده شده در ژنوتیپ قزوینی پسته، گزارش شده است که تیمار SA تحت تنش خشکی اثر القایی بر بیان ژن *miR172* در گیاه گندم داشته است [53]. همانطور که miRNA ها بعنوان مولکول های تنظیم کننده بالادستی بیان ژن ها می توانند بیان ژن های بیوسنتز کننده و ژن های مسیر علامت دهی هورمون ها را تنظیم کنند [26]، هورمون ها نیز می توانند بیان ژن miRNA ها را کنترل نمایند. این اثر کاملاً وابسته به گونه و حتی ژنوتیپ گیاهی است و می تواند کاملاً متفاوت عمل نماید و قادر است تحت تنش هایی مثل تنش شوری سازوکارهای مقاومتی گیاه را تنظیم کرده و نحوه این تنظیمات تعیین کننده موفقیت یا عدم موفقیت گونه یا ژنوتیپ گیاهی است.



شکل ۵- تغییرات الگوی بیان ژن *miR172* بر اساس تغییر چند برابری نسبت به شاهد تحت تیمارهای NaCl، SA و NaCl + SA در ۶، ۲۴ و ۱۲۰ ساعت پس از تیمار در برگ های دو ژنوتیپ پسته قزوینی و سرخس (اندازه گیری شده از طریق روش Real-time PCR)

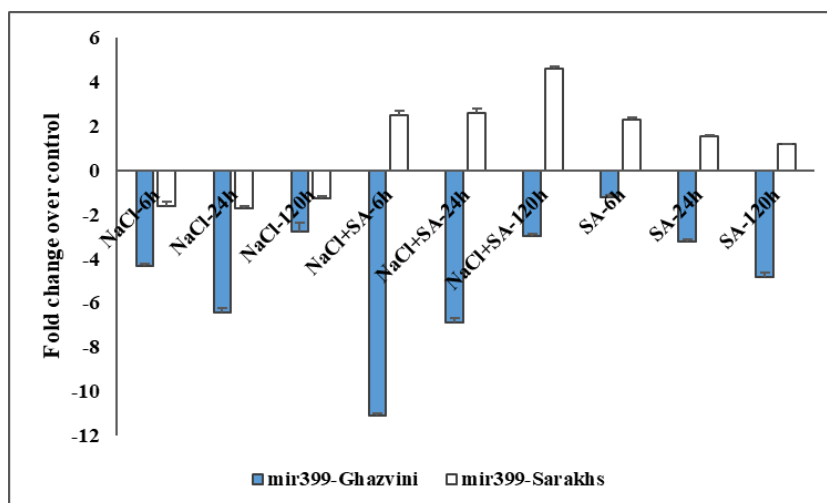
Figure 5- Changes in *miR172* gene expression pattern based on fold change over control under NaCl, SA, & NaCl + SA treatments at 6, 24, & 120 time points in the leaves of two pistachio genotypes of Ghazvini & Sarakhs (measured by Real-time PCR method)

تنظیم بیان *miR399* تحت تیمار NaCl و SA

بیان ژن *miR399* در پاسخ به تیمارهای NaCl، SA و NaCl+SA با استفاده از روش Real-time PCR در برگ های ژنوتیپ های قزوینی و سرخس مورد بررسی قرار گرفت. در ژنوتیپ قزوینی، ژن *miR399* در تمام زمان ها پس از تیمار NaCl در مقایسه با شاهد کاهش بیان داشت که بیشترین کاهش مربوط به زمان ۲۴ است که بیان این ژن به میزان ۶/۴ برابر نسبت به شاهد کاهش یافته است. در ژنوتیپ سرخس، بیان ژن *miR399* در تمام تیمار ها بطور یکنواخت در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد ولی میزان این کاهش کمتر از ژنوتیپ قزوینی است (شکل ۶). مطالعات نشان می دهد که *miR399* نقش مهمی در مسیرهای علامت دهی فسفر در گیاهان دارد [54]. و اولین miRNA شناخته شده گیاهی است که توانایی افزایش جذب فسفر (P) توسط گیاه را دارد [55]، [56].

[57]. یکی از رونوشت‌های هدف این miRNA، رونوشت ژن UBC24 است که یک آنزیم ubiquitin-conjugating E2 را رمزگذاری می‌کند که به عنوان PHOSPHATE 2 (PHO2 یا UBC24) نیز شناخته می‌شود [58]. بنابراین، miR399 احتمالاً با کاهش سطح رونوشت‌های ژن PHO2، جذب و متابولیسم فسفر را در گیاهان برنج و ارابیدوپسیس بهبود می‌بخشد [59]. در گیاه ارابیدوپسیس، واحد miR399/ PHO2 در پاسخ این گیاه به استرس فسفات (PO_4) نقش مرکزی دارد. لاین‌های تراریخت گیاه ارابیدوپسیس با بیش بیانی و کاهش بیان ژن miR399، تغییر بیان ژن هدف PHO2 را نشان دادند که این امر منجر به تغییرات قابل توجهی در سطح بیان دو ژن ناقل فسفات شامل PHOSPHATE TRANSPORTER1;4 (PHT1;4 و PHT1;9) شد. افزایش سطوح بیان ژنهای ناقل فسفات در گیاه ارابیدوپسیس تحت تنش نمک، انتقال فسفات را از ریشه به بافت شاخه افزایش می‌دهد و سطوح بیشتری از این منبع غذایی گرانبها را در اختیار اندام‌های هوایی گیاه قرار می‌دهد [60]. در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه پسته ناقل فسفات PHT1;4 بطور مستقیم یکی از اهداف miR399 است که بطور کاملاً هماهنگ با میزان فروتنظیمی بیان این miRNA تحت تنش شوری، به ترتیب به میزان $3/5$ و $1/7$ برابر نسبت به شاهد در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به شوری پسته فراتنظیمی را تحت تیمار NaCl نشان می‌دهد. سطح بیان این ژن ناقل در ژنوتیپ متحمل به شوری قزوینی در مقایسه با سرخس بالاتر است که شاید این تفاوت سطح بیان یکی از عوامل موفق عمل کردن این ژنوتیپ نسبت به ژنوتیپ حساس به شوری تحت تنش شوری نیز باشد. مشابه با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، بیان ژن miR399 در گیاه *Panicum virgatum* با ژن هدف ATP-dependent RNA helicase تحت تنش شوری فروتنظیمی را نشان می‌دهد [61]. در حالیه این miRNA با ژن هدف مشابه در گیاه *Triticum aestivum* تحت تنش شوری فراتنظیمی پیدا می‌کند [62]. درحالیکه در ژنوتیپ قزوینی پسته نیز ژن هدف ATP-dependent RNA helicase از اهداف miR399 است و هماهنگ با فروتنظیمی این miRNA تحت تنش شوری، فراتنظیمی را تحت تیمار شوری نشان می‌دهد ولی در ژنوتیپ سرخس این ژن از اهداف miR399 نیست که این امر تفاوت تنظیمات بیان ژن‌ها با واسطه miRNA‌ها را بین این دو ژنوتیپ متحمل و حساس پسته نشان می‌دهد که می‌تواند ریشه تفاوت تحمل آنها به تنش شوری نیز باشد.

در ژنوتیپ قزوینی، تیمار SA در شرایط تنش شوری تجمع رونوشت miR399 در همه زمان‌ها در مقایسه با شاهد کاهش داد و بیشترین میزان کاهش ۶ ساعت پس از تیمار و به میزان $11/1$ برابر نسبت به شاهد مشاهده شد. در واقع در ژنوتیپ قزوینی، تیمار توام SA و شوری در مقایسه با تیمار شوری به تنهایی بیان ژن miR399 را به میزان بیشتری کاهش داده است. در ژنوتیپ سرخس نتیجه کاملاً متفاوتی مشاهده شد و تیمار SA و NaCl بر خلاف تیمار شوری به تنهایی، اثر القایی بر بیان این ژن داشته و بیشترین اثر القایی در تیمار ۱۲۰ ساعت به میزان $4/6$ برابر در مقایسه با شاهد مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۶- تغییرات الگوی بیان ژن miR399 بر اساس تغییر چند برابری نسبت به شاهد تحت تیمارهای NaCl، SA، و NaCl + SA در ۶، ۲۴ و ۱۲۰ ساعت پس از تیمار در برگ‌های دو ژنوتیپ پسته قزوینی و سرخس (اندازه‌گیری شده از طریق روش Real-time PCR)

Figure 6- Changes in miR399 gene expression pattern based on fold change over control under NaCl, SA, & NaCl + SA treatments at 6, 24, & 120 time points in the leaves of two pistachio genotypes of Ghazvini & Sarakhs (measured by Real-time PCR method)

همانطور که در شکل ۶ قابل مشاهده می باشد، اثر تیمار SA بر بیان ژن miR399 در ژنوتیپ های مورد مطالعه کاملاً متفاوت بود. در ژنوتیپ قزوینی تیمار SA به تنهایی اثر بازدارنده بر بیان ژن miR399 داشته و بیان این ژن را به میزان ۱/۲، ۳/۲ و ۴/۸ برابر در مقایسه با شاهد به ترتیب تحت تیمار های ۶، ۲۴ و ۱۲۹ ساعت کاهش داده است. در حالیکه الگوی بیان این ژن در ژنوتیپ سرخس کاملاً متفاوت بوده و تیمار SA بیان این ژن را در همه زمان های پس از تیمار در مقایسه با شاهد افزایش داده است، بطوریکه بیشترین اثر القایی با افزایش بیان ۲/۳ برابری در مقایسه با شاهد، ۶ ساعت پس از تیمار SA مشاهده شده است (شکل ۶). نتایج این پژوهش نشان می دهد که اثر تیمار SA بر بیان ژن miR399 کاملاً وابسته به ژنوتیپ بوده و اگرچه در ژنوتیپ سرخس اثر القایی داشته ولی در ژنوتیپ قزوینی اثر بازدارنده دارد. این امر نشان می دهد که سازوکارهای علامت دهی هورمون SA و تنظیمات پایین دست آن از جمله بیان miRNA ها و ژن های هدف آنها در دو ژنوتیپ پسته مورد مطالعه کاملاً متفاوت بوده که این الگوی متفاوت صفات متفاوتی را نیز می تواند شکل دهد.

نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان می دهد که miR172 و miR399 در پاسخ به تنش شوری در پسته نقش دارند و تغییر الگوی بیان آنها در زمانهای مختلف پس از تیمار شوری در دو ژنوتیپ متحمل و حساس به شوری پسته متفاوت بوده که همین امر می تواند به تنظیم متفاوت فرآیندهای زیستی و متابولیسمی گیاه در زمان های مختلف پس از تیمار منجر شده و تفاوت تحمل به تنش شوری بین دو ژنوتیپ پسته مورد مطالعه را رقم بزند. شناسایی و هستی شناسی ژنهای هدف پاسخگر به تنش شوری این miRNA ها نقش آنها را در فرآیندهای زیستی و عملکردهای مولکولی شامل "پاسخ به محرک"، "فرآیندهای متابولیسمی مرتبط با ماکرومولکول ها"، "پاسخ به محرک های شیمیایی"، "اتصال به نوکلئوتید"، "اتصال به ATP"، "فرآیندهای سلولی"، "فرآیندهای متابولیکی اولیه"، "تنظیمات زیستی"، "فعالیت کاتالیزوری"، "فعالیت هیدرولازی"، "فعالیت ترانسفرازی" و "فعالیت اکسیدو ردوکتازی" نشان می دهد. تیمار هورمون SA همراه با NaCl و همچنین به تنهایی، بر روی بیان ژن های miR172 و miR399 موثر بوده و نحوه تنظیم بیان این ژن ها بصورت القا یا بازدارندگی کاملاً وابسته به ژنوتیپ پسته مورد مطالعه است. با توجه به اینکه نقش هورمون SA بعنوان کاهنده اثرات تنش شوری در گیاه پسته اثبات شده است، مطالعه سازوکارهای علامت دهی و تنظیمی این هورمون می تواند برای اهدافی در جهت افزایش سازگاری گیاهان به تنش شوری بسیار مفید باشد. علاوه براین، به نظر می رسد با توجه به اندک بودن مطالعات در جهت استفاده از تیمارهایی برای کنترل بیان miRNA ها و به دنبال آن بیان ژن های هدف آنها و تنظیم پاسخ های گیاه به شرایط محیطی، این نوع موضوعات تحقیقاتی می تواند در راستای افزایش بهره وری تولید محصولات کشاورزی بسیار ضروری باشد.

اعلام تعارض منافع

در این پژوهش هیچ یک از پژوهشگران تعارض منافع ندارند.

منابع

- [1] Mustafa, G., Akhtar, M. S., & Abdullah, R. (2019). Global concern for salinity on various agro-ecosystems. *Salt Stress, Microbes, and Plant Interactions: Causes and Solution*, 1, 1-19. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8801-9_1
- [2] Hussain, S. (2019). Climate change and agriculture. IntechOpen, Rijeka. 978-1-78985-668-2. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78427>
- [3] Faostat. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <http://www.fao.org/faostat/en/-data/QC>.
- [4] Hayat, S., Hasan, S. A., Yusuf, M., Hayat, Q., & Ahmad, A. (2010). Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environmental and Experimental Botany*, 69 (2), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.03.004>
- [5] Safdar, H., Amin, A., Shafiq, Y., Ali, A., Yasin, R., Shoukat, A., Hussain, M. U., & Sarwar, M. I. (2019). A review: Impact of salinity on plant growth. *Nat. Sci*, 17 (1), 34-40. <https://doi.org/10.7537/marsnsj170119.06>
- [6] Goyal, V., Jhanghel, D., & Mehrotra, S. (2021). Emerging warriors against salinity in plants: Nitric oxide and hydrogen sulphide. *Physiologia Plantarum*, 171 (4), 896-908. <https://doi.org/10.1111/ppl.13380>
- [7] Kamran, M., Parveen, A., Ahmar, S., Malik, Z., Hussain, S., Chattha, M. S., Saleem, M. H., Adil, M., Heidari, P., & Chen, J. T. (2019). An overview of hazardous impacts of soil salinity in crops, tolerance mechanisms, and amelioration through selenium supplementation. *Int J Mol Sci*, 21 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010148>
- [8] Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics*, 2014, 701596. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>

- [9] Loutfy, N., El-Tayeb, M. A., Hassanen, A. M., Moustafa, M. F., Sakuma, Y., & Inouhe, M. (2012). Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *J Plant Res*, 125 (1). <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0419-9>
- [10] Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal Behav*, 4 (6), 493-496. <https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8392>
- [11] Ma, X., Zheng, J., Zhang, X., Hu, Q., & Qian, R. (2017). Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress on *Dianthus superbus* (Caryophyllaceae) by activating photosynthesis, protecting morphological structure, and enhancing the antioxidant system. *Front Plant Sci*, 8, 600. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00600>
- [12] Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Cicek, N., Guneri, E., Eraslan, F., & Guzelordu, T. (2005). Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.). *Archives of agronomy and soil science*, 51 (6), 687-695. <https://doi.org/10.1080/03650340500336075>
- [13] Hamayun, M., Khan, S. A., Khan, A. L., Shin, J. H., Ahmad, B., Shin, D. H., & Lee, I. J. (2010). Exogenous gibberellic acid reprograms soybean to higher growth and salt stress tolerance. *J Agric Food Chem*, 58 (12), 7226-7232. <https://doi.org/10.1021/jf101221t>
- [14] Jannesar, M., Seyedi, S. M., Niknam, V., Ghadirzadeh Khorzoghi, E., & Ebrahimzadeh, H. (2022). Salicylic acid, as a positive regulator of isochorismate synthase, reduces the negative effect of salt stress on *Pistacia vera* L. by increasing photosynthetic pigments and inducing antioxidant activity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41 (3), 1304-1315. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10383-6>
- [15] Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z., & Shabala, S. (2013). Salicylic acid improves salinity tolerance in *Arabidopsis* by restoring membrane potential and preventing salt-induced K⁺ loss via a GORK channel. *J Exp Bot*, 64 (8), 2255-2268. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert085>
- [16] Wang, J., Mei, J., & Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. *Front Plant Sci*, 10, 360. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>
- [17] Tyagi, S., Sharma, S., Ganie, S. A., Tahir, M., Mir, R. R., & Pandey, R. (2019). Plant microRNAs: biogenesis, gene silencing, web-based analysis tools and their use as molecular markers. *3 Biotech*, 9 (11), 413. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1942-y>
- [18] Islam, W., Qasim, M., Noman, A., Adnan, M., Tayyab, M., Farooq, T. H., Wei, H., & Wang, L. (2018). Plant microRNAs: Front line players against invading pathogens. *Microb Pathog*, 118, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.008>
- [19] Islam, W., Adnan, M., Huang, Z., Lu, G.-d., & Chen, H. Y. (2019). Small RNAs from seed to mature plant. *Critical reviews in plant sciences*, 38 (2), 117-139. <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1608404>
- [20] Islam, W., Islam, S. U., Qasim, M., & Wang, L. (2017). Host-Pathogen interactions modulated by small RNAs. *RNA Biol*, 14 (7), 891-904. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1318009>
- [21] Noman, A., Sanaullah, T., Khalid, N., Islam, W., Khan, S., Irshad, M. K., & Aqeel, M. (2019). Crosstalk between plant miRNA and heavy metal toxicity. *Plant Metallomics and Functional Omics: a System-Wide Perspective*, 145-168. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19103-0_7
- [22] Islam, W., Waheed, A., Naveed, H., & Zeng, F. (2022). MicroRNAs mediated plant responses to salt stress. *Cells*, 11 (18), 2806. <https://doi.org/10.3390/cells11182806>
- [23] Lotfi, A. (2014). Study and comparing the expression pattern of microRNAs involved in response to salinity stress in pistachio plant (*Pistacia vera* L.). Ph.D. Thesis. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
- [24] Zhang, F., Yang, J., Zhang, N., Wu, J., & Si, H. (2022). Roles of microRNAs in abiotic stress response and characteristics regulation of plant. *Front Plant Sci*, 13, 919243. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.919243>
- [25] Fang, L., & Wang, Y. (2021). MicroRNAs in Woody Plants. *Front Plant Sci*, 12, 686831. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.686831>
- [26] Jannesar, M., Seyedi, S. M., Moazzam Jazi, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., & Botanga, C. (2020). A genome-wide identification, characterization and functional analysis of salt-related long non-coding RNAs in non-model plant *Pistacia vera* L. using transcriptome high throughput sequencing. *Sci Rep*, 10 (1), 5585. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62108-6>
- [27] Moazzam Jazi, M., Seyedi, S. M., Ebrahimie, E., Ebrahimi, M., De Moro, G., & Botanga, C. (2017). A genome-wide transcriptome map of pistachio (*Pistacia vera* L.) provides novel insights into salinity-related genes and marker discovery. *BMC Genomics*, 18 (1), 627. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3989-7>
- [28] Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res*, 46 (W1), W49-w54. <https://doi.org/10.1093/nar/gky316>
- [29] Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M., Foulger, R., Eilbeck, K., Lewis, S., Marshall, B., Mungall, C., Richter, J., Rubin, G. M., Blake, J. A., Bult, C., Dolan, M., Drabkin, H., Eppig, J. T., Hill, D. P., Ni, L., . . . White, R. (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*, 32 (Database issue), D258-261. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh036>
- [30] Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Xu, W., & Su, Z. (2017). agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res*, 45 (W1), W122-w129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx382>
- [31] Moazzam Jazi, M., Rajaei, S., & Seyedi, S. M. (2015). Isolation of high quality RNA from pistachio (*Pistacia vera* L.) and other woody plants high in secondary metabolites. *Physiol Mol Biol Plants*, 21 (4), 597-603. <https://doi.org/10.1007/s12298-015-0319-x>
- [32] Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 33 (20), e179. <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>

- [33] Mou, G., Wang, K., Xu, D., & Zhou, G. (2013). Evaluation of three RT-qPCR-based miRNA detection methods using seven rice miRNAs. *Biosci Biotechnol Biochem*, 77 (6), 1349-1353. <https://doi.org/10.1271/bbb.130192>
- [34] Liu, X., Liu, S., Zhang, J., Wu, Y., Wu, W., Zhang, Y., Liu, B., Tang, R., He, L., Li, R., & Jia, X. (2020). Optimization of reference genes for qRT-PCR analysis of microRNA expression under abiotic stress conditions in sweet potato. *Plant Physiol Biochem*, 154, 379-386. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.016>
- [35] Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- [36] Perron, M. P., & Provost, P. (2008). Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front Biosci*, 13, 2537-2547. <https://doi.org/10.2741/2865>
- [37] Liu, Q., Wang, F., & Axtell, M. J. (2014). Analysis of complementarity requirements for plant microRNA targeting using a *Nicotiana benthamiana* quantitative transient assay. *Plant Cell*, 26 (2), 741-753. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120972>
- [38] Dinh, T. T., Girke, T., Liu, X., Yant, L., Schmid, M., & Chen, X. (2012). The floral homeotic protein APETALA2 recognizes and acts through an AT-rich sequence element. *Development*, 139 (11), 1978-1986. <https://doi.org/10.1242/dev.077073>
- [39] Qi, H., Liang, K., Ke, Y., Wang, J., Yang, P., Yu, F., & Qiu, F. (2023). Advances of Apetala2/Ethylene Response Factors in Regulating Development and Stress Response in Maize. *Int J Mol Sci*, 24 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms24065416>
- [40] Liu, Q., Luo, L., & Zheng, L. (2018). Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants. *Int J Mol Sci*, 19 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020335>
- [41] De Paola, D., Cattonaro, F., Pignone, D., & Sonnante, G. (2012). The miRNAome of globe artichoke: conserved and novel micro RNAs and target analysis. *BMC Genomics*, 13, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-41>
- [42] Née, G., Wang, F., Châtel-Innocenti, G., Mhamdi, A., Juranville, E., Vanacker, H., Noctor, G., & Issakidis-Bourguet, E. (2023). Thioredoxins m regulate plastid glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Arabidopsis roots under salt stress. *Front Plant Sci*, 14, 1179112. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1179112>
- [43] Nefissi Ouertani, R., Arasappan, D., Abid, G., Ben Chikha, M., Jardak, R., Mahmoudi, H., Mejri, S., Ghorbel, A., Ruhlman, T. A., & Jansen, R. K. (2021). Transcriptomic analysis of salt-stress-responsive genes in barley roots and leaves. *Int J Mol Sci*, 22 (15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158155>
- [44] Peng, Z., Wang, Y., Geng, G., Yang, R., Yang, Z., Yang, C., Xu, R., Zhang, Q., Kakar, K. U., Li, Z., & Zhang, S. (2021). Comparative analysis of physiological, enzymatic, and transcriptomic responses revealed mechanisms of salt tolerance and recovery in *Triticum*. *Front Plant Sci*, 12, 800081. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.800081>
- [45] Çakır Aydemir, B., Yüksel Özmen, C., Kibar, U., Mutaf, F., Büyük, P. B., Bakır, M., & Ergül, A. (2020). Salt stress induces endoplasmic reticulum stress-responsive genes in a grapevine rootstock. *PLoS One*, 15 (7), e0236424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236424>
- [46] Chuck, G., Cigan, A. M., Saetern, K., & Hake, S. (2007). The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature genetics*, 39 (4), 544-549. <https://doi.org/10.1038/ng2001>
- [47] Cheng, X., He, Q., Tang, S., Wang, H., Zhang, X., Lv, M., Liu, H., Gao, Q., Zhou, Y., Wang, Q., Man, X., Liu, J., Huang, R., Wang, H., Chen, T., & Liu, J. (2021). The miR172/IDS1 signaling module confers salt tolerance through maintaining ROS homeostasis in cereal crops. *New Phytol*, 230 (3), 1017-1033. <https://doi.org/10.1111/nph.17211>
- [48] Cheng, X., Zhang, S., Tao, W., Zhang, X., Liu, J., Sun, J., Zhang, H., Pu, L., Huang, R., & Chen, T. (2018). INDETERMINATE SPIKELET1 recruits histone deacetylase and a transcriptional repression complex to regulate rice salt tolerance. *Plant physiology*, 178 (2), 824-837. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00324>
- [49] Xie, F., Wang, Q., Sun, R., & Zhang, B. (2015). Deep sequencing reveals important roles of microRNAs in response to drought and salinity stress in cotton. *J Exp Bot*, 66 (3), 789-804. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru437>
- [50] Zhuang, Y., Zhou, X. H., & Liu, J. (2014). Conserved miRNAs and their response to salt stress in wild eggplant *Solanum linnaeanum* roots. *Int J Mol Sci*, 15 (1), 839-849. <https://doi.org/10.3390/ijms15010839>
- [51] Sun, X., Xu, L., Wang, Y., Yu, R., Zhu, X., Luo, X., Gong, Y., Wang, R., Limera, C., Zhang, K., & Liu, L. (2015). Identification of novel and salt-responsive miRNAs to explore miRNA-mediated regulatory network of salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics*, 16 (1), 197. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1416-5>
- [52] Li, B., Duan, H., Li, J., Deng, X. W., Yin, W., & Xia, X. (2013). Global identification of miRNAs and targets in *Populus euphratica* under salt stress. *Plant Mol Biol*, 81 (6), 525-539. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0010-y>
- [53] TÜFEKÇİ, E. D., & İNAL, B. (2020). The Effects of Salicylic Acid Applications on miRNA Expression in Wheat Varieties Under Drought Stress. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 19, 189-195. <https://doi.org/10.31590/ejosat.715266>
- [54] Bari, R., Datt Pant, B., Stütt, M., & Scheible, W. R. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol*, 141 (3), 988-999. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079707>
- [55] Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Huang, Y. T., Su, C. L., & Chiou, T. J. (2006). pho2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol*, 141 (3), 1000-1011. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078063>
- [56] Chiou, T. J., Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Chiang, S. F., & Su, C. L. (2006). Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (2), 412-421. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038943>
- [57] Fujii, H., Chiou, T. J., Lin, S. I., Aung, K., & Zhu, J. K. (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 15 (22), 2038-2043. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.016>
- [58] Kuo, H. F., & Chiou, T. J. (2011). The role of microRNAs in phosphorus deficiency signaling. *Plant Physiol*, 156 (3), 1016-1024. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175265>

- [59] Wang, R., Fang, Y. N., Wu, X. M., Qing, M., Li, C. C., Xie, K. D., Deng, X. X., & Guo, W. W. (2020). The miR399-CsUBC24 module regulates reproductive development and male fertility in citrus. *Plant Physiol*, 183 (4), 1681-1695. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00129>
- [60] Pegler, J. L., Oultram, J. M. J., Grof, C. P. L., & Eamens, A. L. (2020). Molecular Manipulation of the miR399/PHO2 Expression Module Alters the Salt Stress Response of *Arabidopsis thaliana*. *Plants (Basel)*, 10 (1). <https://doi.org/10.3390/plants10010073>
- [61] Sun, G., Stewart, C. N., Jr., Xiao, P., & Zhang, B. (2012). MicroRNA expression analysis in the cellulosic biofuel crop switchgrass (*Panicum virgatum*) under abiotic stress. *PLoS One*, 7 (3), e32017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032017>
- [62] Lu, W., Li, J., Liu, F., Gu, J., Guo, C., Xu, L., Zhang, H., & Xiao, K. (2011). Expression pattern of wheat miRNAs under salinity stress and prediction of salt-inducible miRNAs targets. *Frontiers of Agriculture in China*, 5, 413-422. <https://doi.org/10.1007/s11703-011-1133-z>