مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۱، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۱
صفحه ۵۳-۴۲

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0

DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1
2022

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

شناسایی ریزRNAهای نامزد دخیل در تحمل سرما در نخود زراعی

Identification of candidate microRNAs involved in cold tolerance of Chickpea

علیرضا اکبری[۱]، احمد اسماعیلی*[۱]، زهرا سادات شبر*[۲]، نازنین امیربختیار[۳]، معصومه پوراسماعیل[۳]

Alireza Akbari[1], Ahmad Ismaili [1*], Zahra-Sadat Shobbar[2*], Nazanin Amirbakhtiar[3], Masoumeh Pouresmael[3]

۱- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۲- گروه پژوهشی زیست‌شناسی سیستمها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

1. Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran.
2. Dept. of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
3. Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : *Corresponding Author, Email
shobbar@abrii.ac.ir and ismaili.a@lu.ac.ir
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲)

چکیده

نخود (*Cicer arietinum*) یکی از مهمترین حبوبات است که حساس به سرما بوده و هر ساله کاهش ناگهانی دما منجر به افت عملکرد قابل توجه آن می‌شود. ریزRNAها، RNAهای کوچک غیررمزکننده بسیار محافظت‌شده‌ای هستند که بیان ژن را با تخریب mRNAهای هدف پس از رونویسی یا سرکوب ترجمه آنها تنظیم می‌کنند و نقش آن‌ها در پاسخ به سرما در گیاهان مختلف به اثبات رسیده است. در این مطالعه، به منظور شناسایی ریزRNAهای پاسخ دهنده به سرما، پس از توالی‌یابی ترانسکریپتوم در یک رقم متحمل (سارال) و یک لاین حساس به تنش سرما (ILC533)، توالی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش سرما در نخود با استفاده ازنرم‌افزار c-mii مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سپس، ژن‌های هدف تعدادی از ریزRNAهای مهم با استفاده از نرم‌افزار psRNA Target تعیین شدند. نتایج نشان داد که ۳۰ ریزRNA در ژنوتیپ متحمل و ۲۰ ریزRNA در ژنوتیپ حساس نخود به تنش سرما پاسخ دادند. با مقایسه پاسخ ریزRNAها در دو ژنوتیپ مورد بررسی، ریزRNAهای miR159، miR319، miR393 و miR394 به عنوان ریزRNAهای نامزد دخیل در تحمل سرما در نخود تعیین و نقش آنها مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفت. امید است نتایج به دست آمده در راستای ایجاد ارقام نخود متحمل به سرما مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی

نخود زراعی،
پاسخ دهنده به سرما،
RNAهای کوچک غیررمزکننده،
ژن‌های هدف

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1, 2022

Abstract

Chickpea (*Cicer arietinum*) is one of the most important legumes, classified as a cold-sensitive species, and each year, the sudden drop in temperature leads to a significant loss of chickpea yield. miRNAs are highly conserved small noncoding RNAs that regulate expression of their target genes by degradation of their mRNAs or suppressing their translation, and their roles have been proved in cold stress response in various plants. In the current study, in order to identify cold stress responsive miRNAs in chickpeas, following transcriptome sequencing of a cold stress tolerant cultivar (Saral) and a cold stress sensitive line (ILC533) in response to cold stress, the sequences of the cold responsive genes were analyzed by c-mii software to identify possible miRNAs. Then, the target genes of a number of important miRNAs were identified using psRNA target software. The results showed that 30 and 20 miRNAs responded to cold stress in the tolerant and sensitive genotypes, respectively. Through comparative analysis of cold responsive miRNAs in the contrasting genotypes, miR319, miR393, miR394 and miR159 were demonstrated as candidate miRNAs involved in cold tolerance and their roles was further inspected. It is hoped that the obtained results will be useful for development of cold tolerant chickpea cultivars.

Keywords: *Cicer arietinum*, Small noncoding RNAs, Cold responsive, Target genes

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum*) از نظر سطح زیر کشت با تخصیص ۱۵/۳ درصد از سطح زیر کشت حبوبات در رتبه دوم و از نظر تولید با تخصیص ۱۵/۴۲ درصد از تولید کل حبوبات در جهان رتبه سوم را دارد و در ۵۶ کشور جهان با سطحی معادل ۱۷/۸ میلیون هکتار و تولید ۱۷/۱ میلیون تن کشت می‌شود (FAO. 2019). نخود، گیاهی یک‌ساله، خودگرده‌افشان و دیپلوئید (2n = 2x = 16) با اندازه ژنوم 740 Mbps است (Jain et al. 2013). دانه نخود منبع پروتئین، اسیدهای‌آمینه ضروری، کربوهیدرات، نشاسته و چربی است (Gil et al. 1996). به‌علاوه، نخود با تثبیت نیتروژن منجر به افزایش حاصلخیزی خاک می‌شود که برای قرار گرفتن در سیستم-های مختلف کشت بسیار مناسب است (Yousefi et al. 2018). دو تیپ اصلی برای نخود زراعی تعریف شده است، تیپ کابلی و تیپ دسی، که بر اساس اندازه و رنگ دانه، رنگ گل و رنگدانه گیاه قابل تشخیص هستند؛ نوع کابلی دارای بذور درشت‌تر با پوشش نرم و به رنگ بژ بوده و نوع دسی دارای بذور کوچک‌تر، با پوسته ضخیم و تیره با طیف رنگی متنوع از رنگ‌های زرد، سبز، قهوه‌ای تا سیاه دارد (Ibrihci et al. 2003). تنش‌های غیرزیستی مختلف شامل خشکی، سرما و گرما بر روی عملکرد نخود تاثیر گذارند (Garg et al. 2015). تنش سرما یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که باعث کاهش تولید و گستردگی کشت گیاهان زراعی در سراسر جهان می‌شود (Ding et al. 2019). عامل اصلی و محدودکننده در تولید نخود پائیزه تنش دمای پایین است، بنابراین ایجاد رقم نخود متحمل به سرما برای کشت پاییزه در مناطق آب و هوایی سرد ایران ضروری است. نخود به عنوان یک گونه حساس به سرما تقسیم بندی می‌شود (Yousefi et al. 2018) و هر ساله کاهش ناگهانی دما در پاییز، دمای انجماد در زمستان و سرمای بهاره منجر به آسیب شدید تولید این گیاه می‌شود (Kiran et al. 2019). تحت تنش سرما، فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌ها در گیاهان دچار تغییر می‌شوند (Xiong et al. 2002). گیاهان دارای سازوکارهای ظریفی برای سازگاری با تنش سرما از طریق درک سیگنال تنش، انتقال آن از طریق مسیرهای مختلف انتقال سیگنال و در نهایت تنظیم فرآیندهای متابولیکی خود می‌باشند (Xin et al. 2007). بنابراین شناسایی ژن‌ها، عوامل تنظیمی، شبکه‌ها و مسیرهای ژنی دخیل در پاسخ به تنش سرما می‌تواند راهگشایی برای ایجاد ژنوتیپ‌های متحمل به سرما از طریق مهندسی ژنتیک و روش‌های اصلاح مولکولی باشد. RNAهای کوچک (sRNAs) تنظیم کننده‌های مهم پس از رونویسی در گیاهان و حیوانات هستند. دو گروه مهم RNAکوچک درون‌زاد در گیاهان وجود دارد:

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]

RNAهای کوچک مداخله‌گر (siRNAها) وریزRNAها (miRNA-ها). ریزRNAها، RNAهای کوچک تک رشته‌ای ۲۴-۱۹ نوکلوتیدی هستند که دارای ساختار منحصر به فرد ساقه – حلقه هستند (Sing et al. 2020). ریزRNAها، RNAهای کوچک غیر رمزکننده بسیار محافظت شده‌ای هستند که بیان ژن را با تخریب در سطوح پس از رونویسی یا سرکوب ترجمه mRNAهای هدف تنظیم می‌کنند (Bartel et al. 2004). همچنین گزارش شده است که ریزRNAها با ایجاد تغییرات اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA و هیستون‌ها، بیان ژن را تنظیم می‌کند. در مقایسه با siRNAها، ریزRNAها عملکرد وسیع‌تری دارند و تقریباً در هر مرحله ای از رشد و نمو گیاه مانند مورفوژنز اندام‌های گیاهی، سیگنال‌دهی هورمون‌ها و پاسخ به تنش‌های محیطی مانند سرما، شوری، گرما، خشکی و تنش اکسیداتیو نقش دارند (Teotia et al. 2017). ریزRNAها در پاسخ به تنش دمای پایین با تنظیم ژن‌های هدف خود به تنش سرما پاسخ می‌دهند. دسته‌ای از ریزRNAها، ژن‌های خاصی را تنظیم می‌کنند که به طور مستقیم به تنش‌ها و محرک‌های خارجی پاسخ می‌دهند. گروه دیگری از ریزRNAها، ژن‌هایی را تنظیم می‌کنند که به طور غیرمستقیم و از طریق تنظیم رونویسی دیگر ژن‌ها، در پاسخ به تنش سرما نقش دارند و ریزRNAهای دسته سوم به تنش‌های متعددی پاسخ می‌دهند و ژن‌های هدف آنها هیدرولازها یا اکسیدوروکتازها هستند (liu et al. 2017). مطالعات پیشین در مورد ریزRNAهای گیاهی نشان می‌دهد که ریزRNAها نقش امیدوارکننده‌ای برای افزایش تحمل تنش در گیاهان دارند، زیرا آنها می‌توانند چندین ژن را هدف قرار دهند و بیشتر آنها عوامل رونویسی هستند که نامزدهای مناسبی برای مهندسی ژنتیک گیاهان هستند (Sohrabi et al. 2020). علاوه بر این، ریزRNAها سایر واسطه‌های مرتبط با تنش مانند پیام‌رسان‌ها، پروتئین کینازها، اجزای سیگنال‌دهی فیتوهورمون‌ها وآنزیم‌های از بین برنده انواع اکسیژن فعال (ROS) را نیز تنظیم می‌کنند (Cheshmehnoor et al. 2021). با پیشرفت‌های اخیر در فن‌آوری‌های تعیین توالی با توان بالا، ریزRNAهای درگیر در پاسخ به تنش‌های دمایی در بسیاری از گونه‌های گیاهی شناسایی شده‌اند (Liu et al. 2017). استفاده از توالی‌یابی ترانسکریپتوم (RNA-sequencing) می‌تواند به کشف تنظیم‌کننده‌های اصلی پاسخ به تنش سرما در نخود منجر شود. درک فرآیندهای پاسخ گیاه به تنش به عنوان پیش‌زمینه کارهای اصلاحی معرفی شده است، بنابراین با توجه به اهمیت ریزRNAها در مواجهه با تنش سرما در نخود و عدم انتشار گزارشی در این زمینه تاکنون، این تحقیق با استفاده از توالی‌یابی ترانسکریپتوم به منظور شناسایی ریزRNAها موثر در رشد و نمو و تنظیم فرآیندهای حیاتی در نخود در شرایط تنش سرما انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و اعمال تنش :در این آزمایش دو ژنوتیپ نخود کابلی شامل رقم متحمل به سرمای سارال و لاین حساس به سرمای ILC533 از موسسه تحقیقات دیم کشور تهیه شد. بذر ژنوتیپ‌های مورد نظر پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد در پتری‌دیش بر روی کاغذ صافی رشد داده شد و پس از ۳ روز، بذوری که به طور یکنواخت جوانه زده بودند به سینی‌های کشت منتقل شد. سینی‌های کشت در اتاقک رشد در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶/۸ (شب/ روز) نگهداری شده و در مواقع نیاز اقدام به آبیاری آن‌ها شد. پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشدی ۶-۵ برگی، دسته‌ای از نمونه‌ها به منظور اعمال تنش سرما به اتاقک رشد با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و دسته‌ای دیگر که به‌عنوان کنترل محسوب می‌شدند، در اتاقک رشد با دمای ۲۲ درجه باقی ماندند. ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش سرما، اقدام به تهیه نمونه برگی از گیاهان تحت تنش سرما و گیاهان شاهد شد. تعداد تکرار مربوط به هر ژنوتیپ در هر شرایط رشدی (نرمال یا تنش سرما)، ۲ تکرار بود و هر تکرار، برگهای کاملا توسعه یافته ۱۰ گیاه را شامل می‌شد. نمونه‌های برگی تهیه شده بلافاصله به ازت مایع منتقل شد و پس از آن تا زمان استخراج در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و توالی‌یابی ترانسکریپتوم: جهت استخراج RNA از کیت استخراج RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. نمونه‌های RNA استخراج شده پس از بررسی کمی و کیفی با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل آگارز، به منظور توالی‌یابی به شرکت (Beijing, China) Novogene Bioinformatics Institute ارسال

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]

شدند. درجه یکپارچگی نمونه‌های RNA (RNA Integrity Number, RIN) با استفاده از دستگاه Bioanalyzer تعیین شد و نمونه‌های RNA با عدد یکپارچگی بالای ۵/۷ برای ساخت کتابخانه cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. توالی‌یابی با استفاده از پلتفرم Illumina Hiseq 2500 به صورت قطعات ۱۵۰ جفت بازی و به صورت دو طرفه انجام شد. کنترل کیفیت داده‌های حاصل از توالی یابی RNA که دارای فرمت fastq بودند، با استفاده از نرم افزار FastQC انجام شد. پس از آن به منظور نقشه‌یابی خوانش‌های با کیفیت بالا بر روی ژنوم مرجع نخود (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2992) از نرم‌افزار Tophat، برای ایجاد سرهم‌بندی (assembly) مربوط به هر نمونه از نرم‌افزار Cufflinks، ایجاد سرهم‌بندی نهایی از نرم افزار Cuffmerge و در نهایت به منظور شناسایی ژن‌های افتراقی در پاسخ به تنش سرما در هر ژنوتیپ از نرم‌افزار Cuffdiff استفاده شد.

شناسایی ریزRNAهای پاسخ‌دهنده به تنش سرما: توالی ژن‌های دارای بیان افتراقی (Differentially Expressed Genes) با استفاده از نرم‌افزار bedtools از ژنوم مرجع استخراج و به منظور شناسایی ریزRNAهای احتمالی موجود در میان ژن‌های افتراقی، فایل FASTA مربوطه به عنوان ورودی به نرم‌افزار (Numnark et al. 2012) C-mii داده شد. فایل FASTA مربوط به ژن‌های دارای بیان افتراقی هر ژنوتیپ به طور جداگانه با استفاده از نرم‌افزار C-mii مورد بررسی قرار گرفتند تا ریزRNAهای احتمالی در بین آنها شناسایی گردد. پیش بینی ریزRNAها توسط C-mii با استفاده از رویکرد جستجوی همولوژی با استفاده از BlastN با آستانه e-value = 10 و حداکثر تعداد mismatch برابر با ٤ در برابر ریزRNAهای شناخته شده موجود در پایگاه داده miRBase (http://www.mirbase.org) انجام شد. به منظور حذف توالی‌های رمزکننده پروتئین‌ها، BlastX با $e\text{-value} \leq 1e^{-5}$ در مقابل پایگاه‌های UniProtKB و TrEMBL و به منظور حذف دیگر RNAهای غیر رمزکننده، BlastN با آستانه $e\text{-value} \leq 1e^{-8}$ در مقابل پایگاه داده Rfam انجام شد. سپس، UNAFold موجود در C-mii با پارامترهای پیش‌فرض برای ایجاد تاخوردگی در ریزRNAهای اولیه و پیش‌ساز مورد استفاده قرار گرفت (Numnark, et al. 2012) و در نهایت، توالی‌هایی که موفق به تاخوردگی با شرایط پیش‌فرض شدند و دارای شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) مساوی یا کوچکتر از ۰/٦ کیلوکالری برمول برای ساختار ثانویه ریزRNAهای پیش‌ساز بودند به عنوان ریزRNA نامزد انتخاب شدند.

پیش‌بینی ژن‌های هدف ریزRNAها: برای این منظور از نرم‌افزار آنلاین psRNA Target (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget) استفاده شد. در این فرآیند، توالی ریزRNAهای شناسایی شده علیه تمام mRNAهای ثبت شده مربوط به گیاه نخود مورد تحلیل قرار گرفت. پارامترهای پیش‌فرض این وب سایت برای شناسایی ژن-های هدف استفاده شد. به منظور مقایسه نحوه بیان ریزRNAها تحت تنش سرما در دو ژنوتیپ متحمل و حساس تحت بررسی از نرم افزار Venn diagram (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn) استفاده شد.

طبقه‌بندی KEGG برای تشخیص عملکرد ژن‌های هدف: به منظور درک بهتر از مسیرهای زیستی مرتبط با ژن‌های هدف ریزRNAها که تحت تنش سرما فعال هستند، از سرور KASS (HYPERLINK "https://www.genome.jp/kegg/kaas") برای بلاست (BLAST) توالی‌ها علیه پایگاه داده KEGG که روشی مبتنی بر طبقه‌بندی عملکرد ژن‌ها با تاکید بر روی مسیرهای زیستی است، استفاده شد. در نهایت، شبکه بر هم کنش ریزRNAها، و ژن‌های هدف آنها با استفاده از Cytoscape_3.7.2 بررسی شد.

نتایج

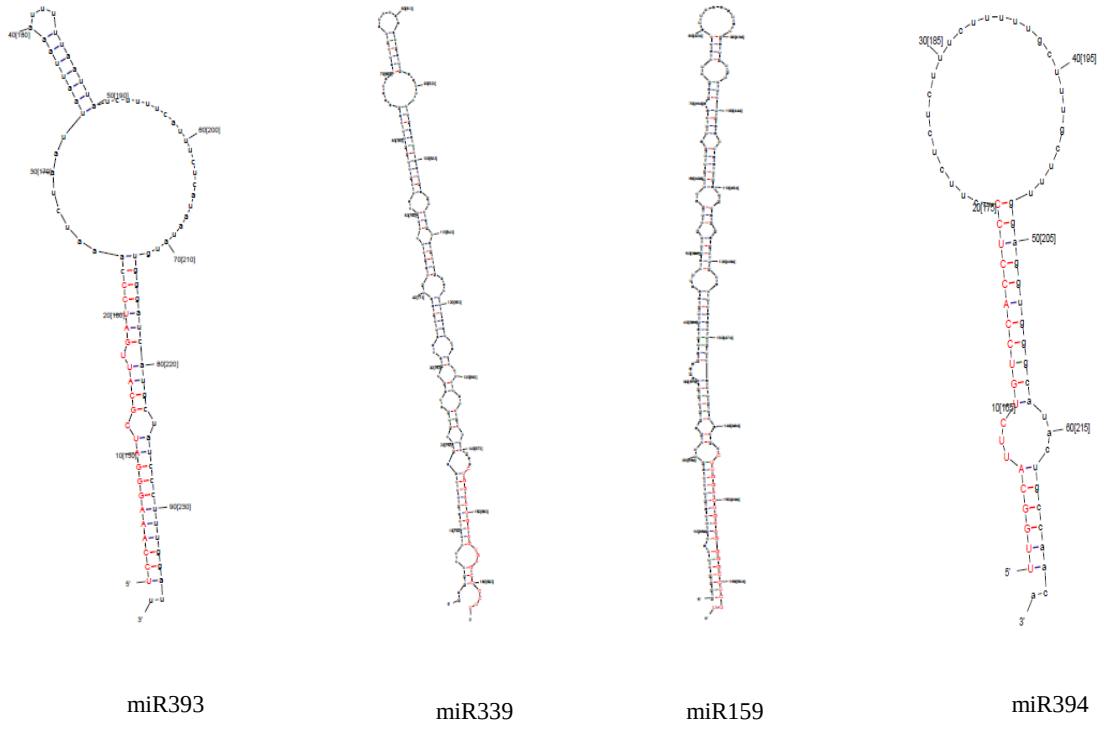
ریزRNAهای پاسخ‌دهنده به تنش سرما در ارقام نخود مورد مطالعه

در این مطالعه، تعداد ۳۰ ریزRNA بالغ افتراقی برای رقم سارال و تعداد ۲۰ ریزRNAی بالغ افتراقی برای لاین ILC533 شناسایی شد. ساختار ثانویه تعدادی از ریزRNAها در شکل ۱ نمایش داده شده است. رسم ون‌دیاگرام مربوط به ریزRNAهای افتراقی در دو ژنوتیپ (شکل۲) نشان داد که ۸ ریزRNA به طور منحصر به فرد در رقم سارال و یک ریزRNA به طور منحصر به فرد در لاین ILC533 تحت تنش نسبت به شاهد افزایش بیان داشتند و ١٤

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]

ریزRNA به طور انحصاری در رقم سارال و ۱۱ ریزRNA به طور انحصاری در لاین ILC533 در نمونه تحت تنش نسبت به شاهد کاهش بیان داشتند. همچنین، ۵ ریزRNA در هر دو ژنوتیپ بیان کاهشی و ۳ ریزRNA در هر دو ژنوتیپ بیان افزایشی داشتند (شکل ۲). در میان ریزRNAهای شناسایی شده پاسخ‌دهنده به تنش سرما در این مطالعه، ریزRNAهایی از قبیل miR319، miR159، miR162، miR165، miR166، miR168، miR170، miR172، miR393، miR394 و miR2111 وجود دارند که بر اساس مطالعات پیشین در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارند (Song et al. 2017; Xuefeng, et al. 2008). در میان این ریزRNAهای شناخته شده دخیل در پاسخ به تنش‌ها، ۳ ریزRNA به صورت انحصاری در رقم سارال (miR319, miR159 و miR393) و یک ریزRNA (miR394) نیز به طور انحصاری در رقم ILC533 کاهش بیان داشت. ٤ ریزRNAی اخیر که بر اساس مطالعات پیشین در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند، برای شناسایی ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفتند.

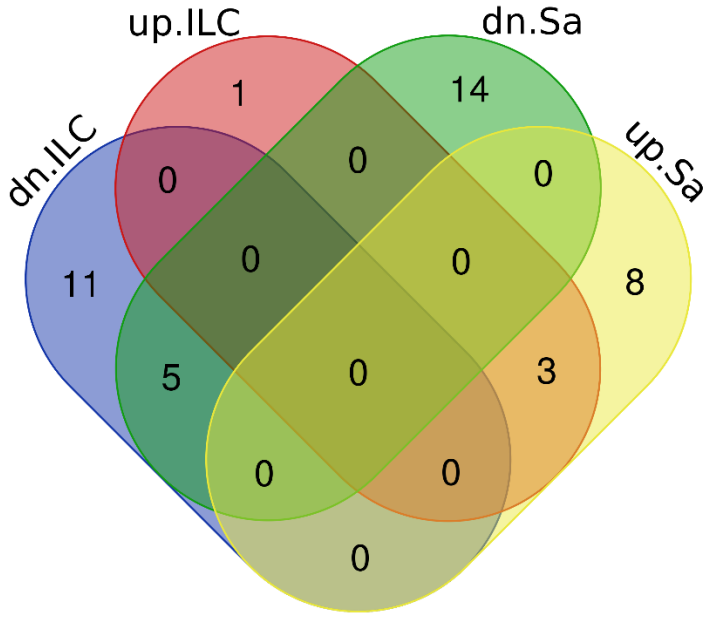
ژن‌های هدف ریزRNAهای مورد بررسی: شناسایی ژن‌های هدف ریزRNAها برای درک عملکرد آنها بسیار ضروری است. نتایج حاصل از شناسایی ژن‌های هدف ریزRNAها با استفاده از پایگاه اطلاعاتی psRNATarget در جدول ۱ آمده است. بیشتر ژن‌های هدف پیش‌بینی شده از گروه عوامل رونویسی هستند که در سایر گونه‌های گیاهی از جمله آرابیدوپسیس و برنج به عنوان اهداف حفاظت شده این گروه از ریزRNAها شناسایی شده‌اند. بر اساس این نتایج، شاخص‌ترین ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای miR159 عوامل رونویسی *MYB*، *TCP4* و *EREBP* هستند که مرتبط با سیگنال‌دهی سلولی می‌باشند. ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای miR319، *PP2c* و عوامل رونویسی *GMYB* و *TCP4* هستند که باز هم مرتبط با انتقال سیگنال هستند. همچنین ژن‌های هدف پیش-بینی شده برای miR393، عامل رونویسی *AP2* و AUXIN SIGNALING F-BOX 2-like protein هستند. ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای miR394 عامل رونویسی *MYB98* و glycine-rich cell wall structural protein هستند (جدول ۱). شبکه برهم‌کنش ریزRNAها و ژن‌های هدف آنها در شکل ۳ نمایش داده شده است.



شکل ۱- ساختار ثانویه.پیش‌بینی شده برای چهار ریزRNAی بالغ با استفاده از نرم‌افزار c-mii.

Figure 1. Predicted secondary structure for 4 mature miRNAs using c-mii software.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]



شکل ۲- مقایسه ریزRNAهای پاسخ‌دهنده به تنش سرما در ژنوتیپ‌های متحمل (سارال) و حساس (ILC533) نخود.

up.ILC: ریزRNAهای با افزایش بیان معنی‌دار در لاین ILC533 در تنش سرما، dn.ILC : ریزRNAهای با کاهش بیان معنی‌دار در لاین ILC533 در تنش سرما، up.Sa: ریزRNAهای با افزایش بیان معنی‌دار در رقم سارال در تنش سرما، dn.Sa: ریزRNAهای با کاهش بیان معنی‌دار در رقم سارال در تنش سرما.

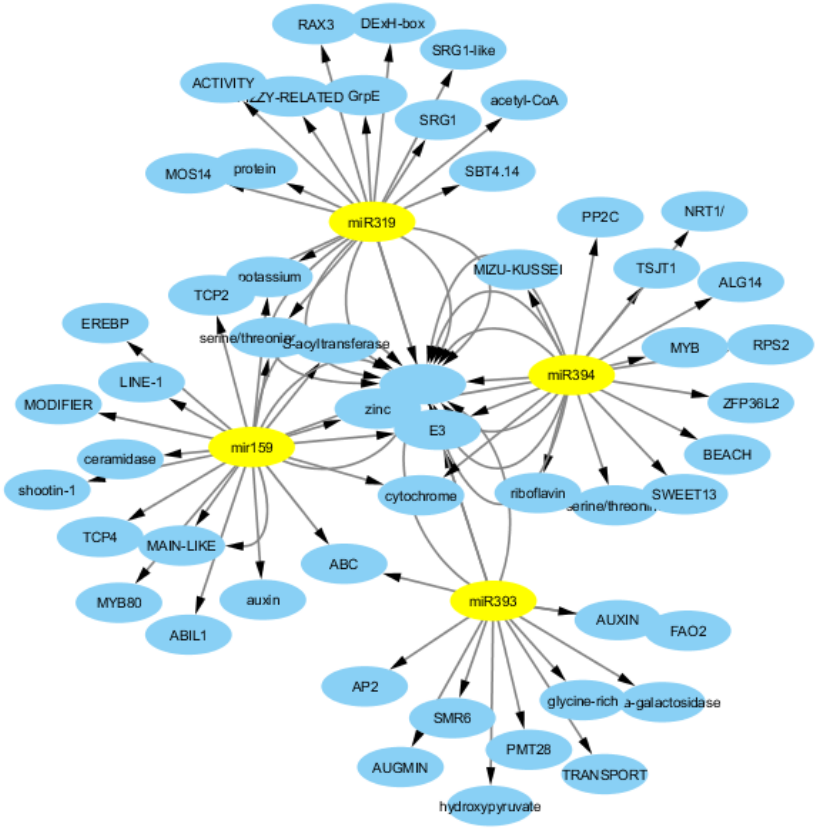
Figure 2. Comparison of cold stress-responsive miRNAs in tolerant (Saral) and susceptible (ILC533) genotypes of chickpea.
up.ILC: miRNAs with significant up-regulation in ILC533 line under cold stress, dn.ILC: miRNAs with significant down-regulation in ILC533 under cold stress, up.Sa: miRNAs with significant up-regulation in Saral cultivar under cold stress, dn.Sa: miRNAs with down-regulation expression in Saral cultivar under cold stress.

جدول ۱- شماره دسترسی ژن‌های هدف ریزRNAهای منتخب و پروتئین رمزشده توسط آنها

Table 1. Accession numbers of the selected miRNAs' target genes and their encoded proteins

miRNA	**Target gene accession number** شماره دسترسی ژن هدف	**Encoded protein by the target gene** پروتئین کد شده توسط ژن هدف
miR159	XM_004488994.3	transcription factor TCP4
	XM_027336301.1	transcription factor EREBP-like protein
	XM_004500116.3	transcription factor MYB80
miR319	XM_012718183.2	transcription factor GAMYB-like
	NM_001309716.1	F-box protein PP2
	XM_004485950.3	transcription factor TCP2
miR393	XM_004508995.3	AP2-like ethylene-responsive transcription factor
	XM_004504907.3	protein AUXIN SIGNALING F-BOX 2-like
	XM_004504937.3	glycine-rich cell wall structural protein 2-like
miR394	XM_004491693.2	transcription factor MYB98
	XM_004508089.3	glycine-rich cell wall structural protein

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]



شکل ۳- شبکه برهمکنش بین ریزRNAها و ژن‌های هدف شناسایی شده با psRNA Target.

Figure 3. Interactions network between miRNAs and their target genes identified by psRNA Target

مسیرهای KEGG ژن‌های هدف ریزRNAها

۵ گروه اصلی KEGG شامل متابولیسم، پردازش اطلاعات محیطی، پردازش اطلاعات ژنتیکی، سیستم‌های موجود زنده و فرآیندهای سلولی بود (شکل ٤). نتایج نشان داد که ژن‌های هدف ریزRNAها در هر دو رقم در مسیرهایی مثل سیگنال‌دهی هورمون‌های گیاهی، متابولیسم نشاسته و ساکارز و تجزیه RNA ایفای نقش می‌کنند، اما در رقم سارال مسیرهایی از جمله متابولیسم گلیسروفسفولیپید و تریپتوفان و در لاین ILC533 مسیر سیگنال‌دهی MAPK در گیاهان و متابولیسم فنیل پروپانوئید نیز معنی‌دار شدند (شکل ٤).

بحث

RNAهای غیررمزکننده (miRNAها و siRNAها) از زمان کشف آنها در *Caenorhabditis elegans* به‌عنوان تنظیم کننده‌های مهم بیان ژن معرفی شده‌اند. طی سال‌های گذشته، به خوبی ثابت شده است که ریزRNAها با تخریب یا سرکوب ترجمه mRNAهای هدف، نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای زیستی مختلف در سطح پس از رونویسی دارند. همسانه‌سازی موفق، توانایی توالی‌یابی RNAهای کوچک و توسعه ابزارهای پیش‌بینی ریزRNAها منجر به کشف و رمزگشایی نقش ریزRNAها در گیاهان و حیوانات شد (Prakash et al. 2015). ریزRNAها به عنوان تنظیم کننده‌های بالادستی نه تنها به طور مستقیم بر روی اهداف تأثیر می‌گذارند بلکه به صورت غیرمستقیم از طریق تاثیر بر سایر ژن‌های هدف نیز تأثیر می‌گذارد (Lee et al. 1993).

در مطالعه حاضر، بیان miR319b-a به طور اختصاصی تحت تنش سرما در رقم سارال کاهش و بیان ژن‌های هدف آن یعنی *TCP4* و *MYB* به طور اختصاصی افزایش یافتند. miR319 یکی از مهمترین ریزRNAهای حفاظت شده در گیاهان است. گزارش شده است که ژن‌های هدف miR319، اعضای خانواده عوامل رونویسی *GAMYB* و *TCP* هستند (Wu et al. 2017). چن و

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]

همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که بیان pto-miR319a – c تحت تنش سرما در صنوبر کاهش یافته است. یکی از ژن‌های هدف miR319 پاسخ دهنده به سرما، عامل رونویسی *MYB* است که به طور گسترده‌ای در پاسخ به تنش‌های مختلف نقش دارد. کاهش بیان pto-miR319a – c منجر به تجمع *MYB* تحت تنش سرما در صنوبر شد (Chen et al. 2012). همچنین مطالعه دیگری نشان داده است که بیش بیان عامل رونویسی *MYB4* برنج سبب افزایش تحمل به انجماد در آرابیدوپسیس شده است (Vannini et al. 2004). در مطالعه‌ی دیگری گزارش شده است که یکی از ژن‌های هدف miR319a در آرابیدوپسیس *TCP4* است که متعلق به زیرخانواده کلاس II عوامل رونویسی *TCP* است. همچنین نشان داده شده است که در درخت آلوی چینی، Pm-miR319a تنظیم کننده منفی بیان Pm-TCP4 است (Wang et al. 2018). بر اساس مطالعه انجام شده توسط چنگ و همکاران (۲۰۱۹)، بیش بیان *MeTCP4* کاساوا تحمل به تنش سرما را در آرابیدوپسیس افزایش داد. زیرا بیش بیان *MeTCP4* باعث تجمع پرولین و کاهش آسیب غشای سلولی تحت تنش سرما می‌شود. علاوه بر این، بیش بیان *MeTCP4* باعث افزایش سطح بیان *GST*ها می‌شود که در ایجاد تحمل به تنش‌های غیر زیستی مختلف نقش دارند.



شکل٤– طبقه‌بندی KEGG برای ژن‌های هدف ریزRNA **های شناسایی شده** در دو ژنوتیپ Saral و ILC533

Figure 4. KEGG classification for the target genes of the identified miRNAs in Saral and ILC533 genotypes.

گزارش‌های متعددی مبنی بر نقش miR159 در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری، تنش هیپوکسی و ABA وجود دارد (Wu et al. 2008; Zhou et al. 2008). miR159 می‌تواند بیان عوامل رونویسی *MYB* را تنظیم کند (Allen et al. 2010). همچنین نشان داده شده است که بیش بیان miR159 منجر به کاهش بیان عوامل رونویسی *MYB* و به دنبال آن افزایش حساسیت گیاه می‌شود (Singh et al. 2020). لوپز و همکاران (2019) نشان دادند که بیان sly-miR159 به طور قابل توجهی تحت خشکی در گیاه گوجه فرنگی کاهش یافته است. آنها نشان دادند که نقش تنظیمی sly-miR159 در پاسخ گیاه گوجه‌فرنگی به تنش خشکی از طریق هدف قرار دادن عامل رونویسی *MYB* انجام می‌شود. در واقع تحت تنش خشکی، بیان sly-miR159 کاهش و بیان ژن هدف آن یعنی *SlMYB33* افزایش می‌یابد که با تجمع ترکیبات حفاظت کننده اسمزی مانند پرولین و پوترسین که سبب افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شوند، همراه است. گین و همکاران (۲۰۱۲) نیز پیشنهاد کردند که عامل رونویسی *MYB33* ممکن است تحمل به خشکی را با کمک تعدیل فشار اسمزی و مهار انواع اکسیژن فعال (ROS) افزایش دهد، زیرا بیش بیان ژن

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]

MYB33 گندم در Arabidopsis بیان ژن‌های *AtP5CS* و *AtZAT12* را که به ترتیب در سنتز پرولین و سنتز پراکسیداز آسکوربات نقش دارند، افزایش می‌دهد. در گیاه گوجه‌فرنگی نیز افزایش بیان ژن *SlP5CS* و افزایش قابل توجه سطح پرولین در گیاهان گوجه‌فرنگی رشد یافته در شرایط کم آبی در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که sly-miR159 ممکن است در پاسخ تطبیقی گیاهان گوجه‌فرنگی به تنش خشکی از طریق القای بیان ژن عامل رونویسی *SlMYB33* شرکت کند (López- et al. 2019; Qin et al. 2012). لذا کاهش mir159 در رقم متحمل به سرمای سارال از طریق افزایش تحمل به تنش اسمزی ناشی از سرما می‌تواند در افزایش تحمل به سرما نیز موثر باشد.

بیان miR393 در رقم سارال در پاسخ به تنش سرما کاهش نشان داد که می‌تواند با تحمل بیشتر این ژنوتیپ به تنش سرما در ارتباط باشد. miR393 در رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های چندگانه در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس و برنج نقش دارد. بیش بیان miR393 در گیاه برنج منجر به کاهش حساسیت به اکسین و کاهش تحمل به تنش‌های خشکی و شوری به دلیل کاهش بیان mRNAهای هدف آن *OsTIR1* و *OsAFB2* شد (Xia et al. 2012). یوآن و همکاران نیز نشان دادند که خاموش کردن miR393 در گیاه جو سبب افزایش مقاومت به تنش خشکی و بیش بیان آن سبب افزایش حساسیت به تنش خشکی می‌شود. همچنین بیش بیان miR393 با تجمع مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن نسبت به گونه وحشی و خاموش کردن miR393 با کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن همراه بوده است (Yuan et al. 2019).

در پژوهش حاضر لاین حساس به سرمای ILC533، برای miR394 کاهش بیان نشان داد. miR394 یکی از ریزRNAهای بسیار محافظت شده است که در بسیاری از گونه‌های گیاهی تک-لپه و دولپه وجود دارد (Tian et al. 2018). گزارش شده است که miR394 و ژن هدف آن LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR) در تنظیم نمو مورفولوژیکی برگ و ویژگی سلول‌های مریستمی در آرابیدوپسیس نقش دارند. سونگ و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که بیش بیان miR394a و از دست رفتن عملکرد LCR (جهش‌های lcr) در آرابیدوپسیس به تحمل بیشتری به تنش دمای پایین (٤ تا ١١ درجه سانتی‌گراد) منجر شد. در مطالعه مذکور مشخص شد که بیان *CBF1*، *CBF2* و *CBF3* در گیاهان با بیش بیان miR394a و جهش lcr در مقایسه با نوع وحشی افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد تحمل سرما با واسطه miR394 در آرابیدوپسیس احتمالاً به بیان CBF بستگی دارد (Song et al. 2016). پروتئین‌های *CBF1/2/3* متعلق به خانواده عوامل رونویسی پاسخ دهنده به اتیلن APETALA2 هستند که رونویسی بسیاری از ژن‌های القا شونده با تنش سرما را فعال می‌کنند و منجر به افزایش تحمل به تنش می‌شوند (Akhtar et al. 2012). علاوه براین، miR394 در تنظیم واکنش گیاهان به تنش‌های خشکی و شوری نقش دارد. بیش بیان miR394 منجر به افزایش مقاومت به تنش شوری و خشکی می‌شود، در حالی که گیاهان با بیش بیان LCR فنوتیپ‌های حساس به تنش را نشان می‌دهند (Song et al. 2013). کاهش بیان miR394 در لاین حساس به سرمای ILC533، در پژوهش حاضر می‌تواند دلیلی بر حساسیت این لاین به تنش سرما باشد.

همانطور که در نتایج تجزیه و تحلیل KEGG مشاهده شد، سیگنال‌دهی هورمون‌های گیاهی یکی از مسیرهایی بود که بیشترین معنی‌داری را در بین دو رقم داشت. فیتوهورمون‌ها مولکول‌های پیام‌رسان مهمی هستند که تقریباً در تمام فرآیندهای زیستی و چرخه زندگی گیاه دخیل هستند. مطالعات گذشته نقش ریزRNAها را در تنش زیستی و غیرزیستی با تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی هورمون گیاهی و همچنین هدف قرار دادن تعدادی از عوامل رونویسی (TFs) و ژن‌های مرتبط با تنش نشان داده است (Singh et al. 2021) از بین هورمون‌های گیاهی، آبسزیک اسید (ABA)، اتیلن، اسید سالیسیلیک (SA) و اسید جاسمونیک (JA) به عنوان هورمون‌های پاسخ به تنش در نظر گرفته می‌شوند. برخی دیگر از جمله اکسین (AUX)، جیبرلین(GA)، سیتوکینین‌ها و براسینوستروئیدها (BR) در گروه هورمون‌های محرک رشد قرار می‌گیرند (Blázquez et al. 2020). سطح بیان miR159 در تیمار با هورمون‌های BR، GA و ABA در گونه‌های مختلف تغیر می-کند (Gao et al. 2018). در پژوهشی که توسط لی و همکاران (۲۰۲۰) صورت گرفت، نشان داده شد که miR159 در کنترل

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]

حداقل چهار مسیر هورمونی نقش دارد. miR159 بیوسنتز GA و BR را افزایش می‌دهد و بیوسنتز هورمون سیتوکنین را مهار می‌کند. فعالیت miR159 با هدف قرار دادن عوامل رونویسی خانواده *MYB* یا *MYB-LIKE* ، انجام می‌شود (Li et al. 2020).

miR319به عنوان تنظیم کننده مثبت مورفوژنز برگ با سرکوب غیرمستقیم بیان *SHY2 (AtIAA3)* و دو ارتولوگ ژن *SMALL AUXIN UP RNA39 (SAUR39)* برنج شناخته می‌شود. *SHY2* و *SAUR39* هر دو از بازدارنده‌های اولیه سنتز هورمون AUX (سرکوب سنتز AUX) هستند؛ بنابراین miR319 به‌عنوان تنظیم کننده مثبت هورمون اکسین شناخته می‌شود (Curaba et al. 2014). علاوه بر این، بیش بیان miR319 در آرابیدوپسیس و برگ‌های گوجه فرنگی با مهار غیرمستقیم بیوسنتز GA بر تمایز سلولی برگ تأثیر می‌گذارد (Yanai et al. 2011).

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه، ریزRNAهای پاسخ دهنده به سرما در نخود زراعی شناسایی و اثرات مستقیم و غیرمستقیم این ریزRNAها بر روی ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش سرما مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی ژن‌های هدف ریزRNAهای پیش‌بینی شده، عمدتاً در فرآیندهای پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش دارند. مهمترین ژن‌های هدف شناسایی شده برای این ریزRNAها، عوامل رونویسی (*MYB*،*TCP4*، *EREBP*) می‌باشد که خود در واکنش گیاه به تغییر شرایط رشدی و محیطی نقش کلیدی دارند. لازم به ذکر است که بیان ریزRNAها نه تنها در شرایط تنش، بلکه در دو رقم حساس و متحمل نیز اختلاف داشت. در نهایت، بیان اختصاصی ریزRNAها در پاسخ به تنش سرما و نقش آنها در کنترل عوامل رونویسی می‌تواند باعث افزایش پویایی و انعطاف-پذیری شبکه تنظیمی ژن‌ها شده و آزادی عمل بیشتری را در نحوه پاسخ به تنش سرما موجب می شود.

سپاسگزاری

این مقاله از بخشی از نتایج پروژه مصوب شماره ۹۷۱۱۳۵-۲۵۹-۰۳-۰۳-۰٤ که با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور پیرو قرارداد شماره ۹٦۰۰۷۹۸۵ در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به اجرا در آمد مستخرج شده است. از اینرو نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب سپاس خود را از دو سازمان مذکور و همچنین از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به منظور فراهم سازی امکانات لازم برای انجام این پژوهش اعلام نمایند.

منابع

Akhtar M, Jaiswal A, Taj G, Jaiswal JP, Qureshi MI, Singh NK. 2012. DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. Journal of Genetics 91(3): 385-395.

Allen RS, Li J, Alonso P, Maria MW, Rosemary G, Gubler F, Anthony A. 2010. MicroR159 regulation of most conserved targets in Arabidopsis has negligible phenotypic effects. Silence 1(1): 1-18.

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. cell 116(2)**:** 281-297.

Blázquez MA, Nelson. DC, Weijers D. 2020. Evolution of plant hormone response pathways. Annual Review of Plant Biology 71: 327-353.

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

Chen L. 2012. Genome-wide identification of cold-responsive and new microRNAs in Populus tomentosa by high-throughput sequencing. Biochemical and Biophysical Research Communications 417(2): 892-896.

Cheng Z, Lei N, Li S, Liao W, Shen J, Peng M. 2019. The regulatory effects of MeTCP4 on cold stress tolerance in Arabidopsis thaliana: a transcriptome analysis. Plant Physiology and Biochemistry 138*:* 9-16.

Cheshmehnoor M, Behamta MR, Shahnejat AA, Abbasi R, Alizadeh B (2021). Identification of new miRNAs in rapeseed (Brassica napus L.) and their role in suppressing target genes. Environmental Stresses in Crop Sciences 14(3): 585-594.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]

Curaba J, Singh.MB, Bhalla.PL. 2014. miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. Journal of experimental botany 65(6): 1425-1438.

Ding Y, Shi Y, Yang S. 2019. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. New Phytologist 222(4): 1690-1704.

Gao J, H. Chen, H. Yang, He. Y, Tian.Z, Li J. 2018. A brassinosteroid responsive miRNA-target module regulates gibberellin biosynthesis and plant development. New Phytologist 220(2): 488-50.

Garg R, Bhattacharjee A, Jain M. 2015. Genome-scale transcriptomic insights into molecular aspects of abiotic stress responses in chickpea. Plant Molecular Biology Reporter 3(3): 388-400.

Gil J, Nadal S, Luna D, Moreno MT, Haro A. 1996. Variability of some physico-chemical characters in Desi and Kabuli chickpea types. Journal of the Science of Food and Agriculture 71(2): 179-184.

Ibrikci H, Sharon JB, Michael AG. 2003. Chickpea leaves as a vegetable green for humans: evaluation of mineral composition. Journal of the Science of Food and Agriculture 83(9): 945-950.

Jain M, Misra G, Patel K, Priya P, Jhanwar S, Khan AW, Jeena G. 2013. A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (Cicer arietinum L.). The Plant Journal 74(5): 715-729.

Kiran A, Kumar S, Nayyar H, Sharma KD. 2019. Low temperature-induced aberrations in male and female reproductive organ development cause flower abortion in chickpea. Plant, cell & environment 42(7): 2075-2089.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. cell 75(5): 843-854.

Li T, Gonzalez N, Inzé D, Dubois M. 2020. Emerging connections between small RNAs and phytohormones. Trends in Plant Science 25(9): 912-929.

Liu Q, Yan S, Yang T, Zhang S, Chen YQ, Liu B. 2017. Small RNAs in regulating temperature stress response in plants. Journal of integrative plant biology 59(11): 774-791.

López G, María J, García R, Inmaculada GH, Ana I, Camañes G, Vicedo B, Real M, Rausell C. 2019. Expression of miR159 is altered in tomato plants undergoing drought stress. Plants 8(7): 201.

Numnark S, Mhuantong W, Ingsriswang S, Wichadakul D. 2012. *C-mii: a tool for plant miRNA and target identification.* BMC Genomics 13, S16.

Prakash P, Ghosliya D, Gupta V. 2015. Identification of conserved and novel microRNAs in Catharanthus roseus by deep sequencing and computational prediction of their potential targets. Gene 554(2): 181-195.

Qin Y, Wang M, Tian Y, He W, Han L, Xia G. 2012. Over-expression of TaMYB33 encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in Arabidopsis. Molecular Biology Reports 39(6): 7183-7192.

Reyes JL, Chua NH. 2007. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. The Plant Journal 49(4): 592-606.

Singh D, Sinha V, Kumar A, Teotia S. 2020. Small RNAs and cold stress tolerance Plant Small RNA Elsevier (pp. 209-230).

Singh P, Dutta.P, Chakrabarty.D. 2021. miRNAs play critical roles in response to abiotic stress by modulating cross-talk of phytohormone signaling. Plant Cell Reports 40(9): 1617-1630.

Sohrabi SS, Ismaili A, Nazarian F, F Hossein (2020). Identification and characterization of conserved miRNAs in lentil. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 32(4): 606-616.

Song G, Zhang R, Zhang S, Li Y, Gao J, Han X, Li G. 2017. Response of microRNAs to cold treatment in the young spikes of common wheat. BMC genomics 18(1): 1-15.

Song J, Bo G, Shuai W, Ye L, Bo WZ, Yong L, Yang ZM. 2016. miR394 and its target gene LCR are involved in cold stress response in Arabidopsis. Plant Gene 5: 56-64.

Teotia S, Singh D, Tang G. 2017. DNA Methylation in plants by microRNAs Plant epigenetics Springer (pp. 247-262).

Tian X, Song L, Wang Y, Jin W, Tong F, Wu F. 2018. miR394 acts as a negative regulator of Arabidopsis resistance to B. cinerea infection by targeting LCR. Frontiers in plant science 9: 903.

Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, Coraggio I. 2004. Overexpression of the rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of Arabidopsis thaliana plants. The Plant Journal 37(1): 115-127.

Wang W, Shi T, Ni X, Xu Y, Qu S, Gao Z. 2018. The role of miR319a and its target gene TCP4 in the regulation of pistil development in Prunus mume. Genome 61(1): 43-48.

Wu ZJ, Wang WL, Zhuang J. 2017. TCP family genes control leaf development and its responses to hormonal stimuli in tea plant [*Camellia sinensis*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]

(L.) O. Kuntze]. Plant Growth Regulation 83(1): 43-53.

Xia K, Wang R, Ou X, Fang Z, Tian C, Duan J, Zhang M. 2012. OsTIR1 and OsAFB2 downregulation via OsmiR393 overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. PloS one 7(1): e30039.

Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. The plant cell, 14(suppl 1) S165-S183.

Yanai O, Shani E, Russ D. Ori N. 2011. Gibberellin partly mediates LANCEOLATE activity in tomato. The Plant Journal 68(4): 571-582.

Yousefi V, Ahmadi J, Sadeghzadeh AD, Esfandiari E. 2018. Influence of long-term cold stress on enzymatic antioxidative defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Acta Agrobotanica 71.3

Yuan W, Suo J, Shi B, Zhou C, Bai B, Bian H, Han N. 2019. The barley miR393 has multiple roles in regulation of seedling growth, stomatal density, and drought stress tolerance. Plant Physiology and Biochemistry 142: 303-311.

Zhou X, He F, Liu F, Zheng X, Di C, Zhou S, Su Z. 2007. Integration of cold signal transduction pathway related to ABA 8'-hydroxylase in Arabidopsis Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond Springer pp. 471-474.

Zhou X, Wang G, Sutoh K, Zhu JK, Zhang W. 2008. Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms 1779(11): 780-788.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.3.0]