

Identification of miRNAs and their targets in *Phaseolus vulgaris* L. under drought stress and PGPR

Elham Soltani¹, Alireza Abbasi², Manijeh Sabokdast Noudehi^{3*}, Abdol Hadi Hosseinzadeh⁴,
Hossein Besharati⁵

1,2,3,4. Agronomy and Plant Breeding Department, Agricultural and Natural Resources Colledge,
University of Tehran, Iran. 5. Department of Soil Biology, Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran.

(Received: January 23, 2022 - Accepted: April 7, 2022)

ABSTRACT

To study the effect of miRNA and PGPR on drought tolerance, Sadri and Yas bean genotypes were subjected to drought conditions (FC = 90%, 60% and 30%) and bacterial treatments (no bacteria, isolates B1, B2 and mixture 2 bacterial isolates), using CRD design with three replications in a factorial arrangement, Drought stress was applied five weeks after planting (for 10 days) and second trifoliolate and root were used for sampling. The results showed that PGPRs lead to membrane stability, root development, etc. To identify the potential miRNAs involved in drought stress, the publicly available EST sequences of the plant were obtained from NCBI and blasted against the previously known Plant miRNAs. Ultimately, five distinguished potential miRNAs were acquired in the plant (belonging to four families: miR408, miR5021, miR5565e and miR9559). Candidate miRNAs were involved in growth, stress tolerance, etc. miR9559-3P expression decreased in drought and bacterial inoculation conditions in drought sensitive and tolerant plants. However, in the absence of bacterial inoculation, the expression of miR9559-3P was higher in sensitive plants. miR9559-3P might increase sensitivity to drought stress by negatively regulating role and targeting a higher percentage of target genes in sensitive plants. However, the tolerant plant with a special regulatory display and reduced expression of miR9559-3P reduced the degradation of miR9559-3P transcripts, increased the expression of the target gene and improved stress tolerance. Since PGPR modulate miRNA expression and lead to drought tolerance and increase plant yield, using these bacteria as biofertilizer can be a suitable alternative method of chemical fertilizer.

Keywords: Drought stress, EST, miRNA, PGPR, *Phaseolus vulgaris* L.

شناسایی miRNAها و ژنهای هدف آنها در *Phaseolus vulgaris* L. تحت تنش خشکی و PGPR

الهام سلطانی^۱، علیرضا عباسی^۲، منیژه سبکدست نودهی^{۳*}، عبدالهادی حسینزاده^۴، حسین بشارتی^۵

۱، ۲، ۳، ۴ - دانشجوی، دانشیار، استادیار و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۵ - استاد،
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۱۸)

چکیده

باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) با تعدیل بیان miRNA، بهبود ریشه و باعث تحمل خشکی می‌شوند. جهت بررسی اثر توأم miRNA و PGPR بر تحمل به خشکی لوبیای معمولی در یک آزمایش فاکتوریل کاملاً تصادفی در سه تکرار، ژنوتیپ‌های صدری و یاس در شرایط خشکی 30% و FC = 60% و PGPR (تلقیح با جدایه اول، دوم و مخلوط دو جدایه) به‌همراه شاهد بررسی شدند. تنش خشکی پنج هفته پس از کاشت اعمال (به مدت ۱۰ روز) شد و سپس از سه برگچه دوم و ریشه نمونه‌گیری شد. نتایج نشان داد که PGPRها منجر به پایداری غشا، بهبود ریشه و... می‌شوند. miRNAهای دخیل در خشکی بر اساس همولوژی بین ESTهای NCBI و miRNAهای miRBase با BLASTn شناسایی شدند. miRNAها متعلق به خانواده‌های miR408، miR5021، miR5565e و miR9559 هستند و در رشد، تحمل به تنش و... نقش دارند. مشاهده شد که میزان بیان miR9559-3P در شرایط خشکی و تلقیح باکتری در گیاه حساس و متحمل به خشکی کاهش یافت. در حالت عدم تلقیح باکتری، میزان بیان miR9559-3P در گیاه حساس بیشتر بود. احتمالاً در گیاه حساس، miR9559-3P با نقش تنظیم‌کنندگی منفی و هدف قرار دادن درصد بیشتری از ژنهای هدف، باعث افزایش حساسیت به تنش شد، اما گیاه متحمل با یک نمایش تنظیمی خاص و کاهش بیان miR9559-3P باعث کاهش تخریب رونوشت‌های miR9559-3P. بیان بیشتر ژن هدف و بهبود تحمل به تنش شد. با توجه به این‌که PGPRها با تعدیل بیان miRNA منجر به تحمل خشکی و افزایش تولید گیاه می‌شوند، استفاده از آنها به‌عنوان کود زیستی یک روش جایگزین مناسب کود شیمیایی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، EST، miRNA، PGPR، *Phaseolus vulgaris* L.

مقدمه

اطلاعاتی miRNAs تحت عنوان database miRBase (Release 21: July 2014) شامل ۳۵۸۲۸ محصول miRNA می‌باشد. در این پایگاه داده، ۲۴٫۶ درصد از کل miRNAها متعلق به ۷۳ گونه گیاهی می‌باشد. در سال ۲۰۰۲ برای نخستین بار miRNAها در گیاهان کشف شدند (Park *et al.*, 2002). این ترکیبات نقش کلیدی در کنترل صفات زراعی مهم گیاهان، انتقال سیگنال و پاسخ به شرایط محیطی مانند تنش‌های زنده و غیرزنده و ... ایفا می‌کنند (Candar- *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2015; Cakir *et al.*, 2016; Li & Zhang, 2016). اخیرا بر اساس high-throughput sequencing، miRNAها در گیاهان مختلف مانند نیشکر، گندم، لوبیای معمولی و سیب زمینی شناسایی شده‌اند (Formey *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2014; و به‌طور خاص در پاسخ به تنش خشکی در برنج و نخود و یونجه و... مورد توجه قرار گرفته‌اند (Barrera-Figueroa *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

باتوجه به خشک بودن ایران از نظر اقلیمی، اهمیت گیاه لوبیای معمولی و حساس بودن آن به تنش خشکی، تاثیر PGPRها بر تنظیم بیان miRNAها و نقش مهمی که miRNAها در پاسخ به تنش خشکی دارند، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر PGPRها بر بیان miRNA و تاثیر توام باکتری و miRNA بر تحمل به تنش خشکی در دو بخش انجام پذیرفت:

۱) کاشت گلخانه‌ای شامل اعمال تنش خشکی و بررسی تاثیر PGPR بر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه لوبیای معمولی در پاسخ به تنش خشکی و
 ۲) بخش بیوانفورماتیک و مولکولی شامل شناسایی miRNAهای دخیل در تنش خشکی در گیاه لوبیای معمولی با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک مبتنی بر همولوژی بین ESTهای گیاه لوبیا موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و miRNAهای سایت miRBase با انجام BLASTn و بررسی تاثیر PGPRها بر بیان این miRNAها

در بین حبوبات، لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) به جهت دارا بودن بیشترین سطح زیر کشت و تولید (۲۸۷/۳۰۱ تن معادل ۴۸/۸۲ درصد از تولید کل حبوبات کشور) اهمیت ویژه‌ای دارد (FAO, 2017). تولید و عملکرد این محصول در بسیاری از نقاط جهان به دلیل تنش خشکی مورد تهدید قرار می‌گیرد (Singh, 2007; Akbari *et al.*, 2016). یکی از راهکارهای افزایش عملکرد گیاهان در راستای کشاورزی پایدار، بهره‌گیری از توان باکتری‌های محرک رشد گیاه یا PGPRها (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) در شرایط کمبود آب می‌باشد (Hungria *et al.*, 2013). PGPRها گروه وسیعی از باکتری‌های مفید خاک و محرک رشد گیاه میزبان خود هستند که رشد گیاه را از طریق مکانیزم‌های مختلف (انحلال فسفات، تشکیل گره‌های تثبیت کننده ازت، تولید هورمون و...) افزایش می‌دهند (Saharan & Nehra, 2011). گزارش شده است که تلقیح با باکتری‌های PGPR باعث افزایش گره‌زایی و افزایش عملکرد در لوبیای معمولی می‌شود (Hungria *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2013). همچنین کاهش اثرات ناشی از تنش خشکی توسط باکتری‌های PGPR از طریق تولید گلیسین بتائین، کاهش تولید اتیلن و حفظ سطح طبیعی آبسزیک اسید و افزایش بیان فنیل آلانین (تیروزین) و آمونیاک در گیاهان مختلف از جمله ماش و لوبیای معمولی گزارش شده است (Kasim *et al.*, 2013; Da Piedade Melo *et al.*, 2017; Maryani *et al.*, 2018).

اخیرا بسیاری از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی در لوبیای معمولی یافت شده است (Wu *et al.*, 2014) که در فرآیندهای متابولیکی پاسخ به تنش خشکی، فرآیندهای بیوسنتز کربوهیدرات و ... دخیل هستند (Wu *et al.*, 2014)؛ با این حال، گزارش‌های کمی از miRNAهای پاسخ دهنده خشکی در لوبیای معمولی وجود دارد. miRNAها، RNAهای کوچک، تک‌رشته‌ای و غیرکد شونده هستند که تقریبا ۲۱ جفت باز طول دارند و بیان ژن را تنظیم می‌کنند (Li *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2015; Samad *et al.*, 2017).

مواد و روش‌ها کاشت گلخانه‌ای

آزمایش گلخانه‌ای به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۷ در گلخانه‌ی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. سطوح آبیاری شامل آبیاری معمولی (FC = 90%)، FC = 60% و FC = 30% به عنوان فاکتور اول، ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی شامل ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی (صدری) و حساس به خشکی (یاس) به عنوان فاکتور دوم و باکتری‌های ریزوبیوم تثبیت کننده ازت شامل چهار سطح شاهد (عدم تلقیح با باکتری)، تلقیح با جدایه باکتریایی اول (B1)، تلقیح با جدایه باکتریایی دوم (B2) و تلقیح با مخلوط دو جدایه باکتریایی به عنوان فاکتور سوم در نظر گرفته شدند. ابتدا خاک موجود در گلخانه از الک عبور داده شد و به نسبت ۳:۲ با ماسه بادی مخلوط شد. ظرفیت زراعی (FC) خاک نیز با استفاده از دستگاه دیسک صفحه فشاری^۱ اندازه‌گیری شد که مقدار آن ۱۸ درصد بود. از گلدان‌های پلاستیکی دو کیلوگرمی برای کاشت استفاده شد. آلوده سازی بذرها با باکتری، همزمان با کاشت و به صورت بذر مال انجام شد و سپس تعداد سه عدد بذر آلوده با باکتری از هر ژنوتیپ در گلدان‌ها کاشته شد. شرایط نوری و دمایی رشد گیاهان شامل ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. ابتدا آبیاری به اندازه ظرفیت زراعی خاک صورت گرفت و پس از پنج هفته از کاشت گیاهان، تیمارهای مختلف آزمایشی اعمال شد. نحوه اعمال تنش خشکی بدین صورت بود که ابتدا وزن گلدان‌هایی که در آن‌ها خاک ریخته شده بود مشخص شد و سپس هر روز گلدان‌ها را وزن شدند و بر اساس سطح تنش مربوط به آن‌ها و با توجه به مقدار آبی که خاک از دست داده بود، آبیاری انجام پذیرفت. در نهایت ۱۰ روز پس از اعمال تنش خشکی و برای انجام آزمایشات فیزیولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی، از ریشه و سه برگچه دوم گیاهان، نمونه‌هایی از سه تکرار گرفته شد.

اندازه‌گیری نشت یونی (EL)

اندازه‌گیری نشت یونی به روش Lutts *et al.* (1996) انجام شد و با استفاده از رابطه زیر مقدار آن محاسبه شد:

$$EL = (EC_1/EC_2) \times 100$$

که در آن، EC₁: هدایت الکترولیتی اول و EC₂: هدایت الکترولیتی دوم بود.

اندازه‌گیری محتوای پرولین

اندازه‌گیری محتوای پرولین به روش Bates *et al.* (1973) انجام و غلظت پرولین با توجه به منحنی استاندارد پرولین در دستگاه طیف سنج نوری (اسپکتروفتومتر Shimadzu uv-160) در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد.

۲) بخش بیوانفورماتیک و مولکولی

شناسایی miRNAهای دخیل در تنش خشکی

در گیاه لوبیای معمولی

توالی‌های miRNA و EST

تمام توالی‌های بالغ miRNA اعتبار سنجی شده از تمام گونه‌های گیاهی و جانوری، به عنوان miRNAهای مرجع جهت پیشگویی miRNAهای حفاظت شده در گیاه لوبیای معمولی از بانک اطلاعاتی miRBase دانلود شدند (Xie *et al.*, 2007). تمام ESTهای گیاه لوبیای معمولی نیز که شامل EST۱۱۸۵۴ مربوط به تنش خشکی بودند، از پایگاه اطلاعاتی^۳ NCBI دانلود شدند (Xie *et al.*, 2007).

جستجوی همولوژی

از نرم افزار C-mii جهت پیشگویی miRNAها بر مبنای جستجوی همولوژی بین کانتینگ‌ها و ESTها در برابر miRNAهای حفاظت شده^۴ در گیاه لوبیای معمولی مورد استفاده قرار گرفت (Nummark *et al.*, 2012). این نرم افزار با استفاده از ابزار BLASTn و با در نظر گرفتن دو پارامتر E-value ≤ 10 و mismatch ≤ 4 شناسایی رونوشت‌هایی که بیشترین شباهت را با توالی‌های miRNAهای بالغ دارند انجام می‌دهد. در طی

³ National Center for Biotechnology Information

⁴ Conserve

¹ Field Capacity

² pressure plate

افزار C-mii با جستجوی همولوژی بین miRNAهای شناسایی شده کاندید گیاه لوبیای معمولی با کانتینگها و ESTهای همان گیاه بر اساس پارامترهای زیر صورت گرفت:

بیش از چهار باز غیر مشابه بین miRNA و ژن هدف آن وجود نداشته باشد؛ محدوده‌ی عدم جفت شدگی^۲ مرکزی برای مهار ترجمه بین ۹-۱۱ نوکلئوتید باشد؛ حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE) باید دارای یک مقدار منفی باشد و هرچه این مقدار منفی تر باشد، اتصال بین miRNA و ژن هدف آن پایدارتر می‌باشد و تعداد جایگاه‌های هدف برابر دو؛ حداکثر جفت شدگی در جایگاه‌های مکمل کمتر از چهار و بدون هیچگونه فاصله^۳ باشند (Singh et al., 2016; Devi et al., 2016b).

در نهایت طراحی آغازگرهای miRNAهای کاندید به صورت دستی (Varkonyi-Gasica et al., 2007) و با استفاده از نرم افزار اینترنتی primer 3 و Oligo Analysis Tool صورت پذیرفت (جدول ۱).

تایید آزمایشگاهی miRNAها

استخراج RNA به روش بابوزول انجام شد و به منظور اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت؛ همچنین کیفیت RNA توسط الکتروفورز بررسی شد. تیمار RNA با DNase بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز و ساخت cDNA از miRNAها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ساقه - حلقه (-Stem loop RT primer) انجام شد (Varkonyi-Gasic et al., 2007). در نهایت سنجش میزان نسبی بیان miR9559-3P به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (-Real Time PCR) در دستگاه icycler شرکت BioRad انجام پذیرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس و آزمون مقایسه میانگین صفات به روش دانکن در سطح احتمال یک درصد با نرم افزار SAS 9.4

این BLAST، ESTها به‌عنوان توالی‌های شناخته شده^۱ و miRNAها نیز به‌عنوان query در نظر گرفته شدند (Akter et al., 2014).

تعیین کارکرد توالی‌ها با استفاده از BLASTx

miRNAها کد کننده پروتئینی نیستند (Catalanotto et al., 2016)، بنابراین توالی‌های کد کننده پروتئینی باید حذف شوند. بدین منظور، مستند سازی و تفسیر عملکردی رونوشت‌های هدف miRNAها در نرم افزار C-mii با استفاده از ابزار BLASTx در برابر پایگاه TrEMBL Uniprot صورت گرفت. در طی این فرآیند، ESTهای غربال شده به‌عنوان کاندیدهای miRNA با فرمت FASTA در برابر تمام توالی‌های کد کننده پروتئینی BLASTx شدند (Zhou et al., 2008).

تعیین ساختار ثانویه پیش‌ساز miRNA (pre-miRNA)

در این مرحله، ساختار ثانویه آن دسته از پیش‌سازهای miRNA که پتانسیل تبدیل شدن به miRNA را دارند، با استفاده از سرور MFOLD، پیش بینی شد. بنابراین ۱۰۰-۲۰۰ نوکلئوتید بالادست و پایین دست ناحیه جفت شده بین EST و miRNA انتخاب شدند و ساختار ثانویه حاصل شد (Perez-Quintero et al., 2012). در نهایت توالی‌هایی که ساختار ثانویه‌ای با شرایط زیر داشتند به‌عنوان miRNAهای کاندید انتخاب شدند: حداکثر تعداد بازهای جفت نشده بین توالی miRNA و توالی پیش‌ساز آن بیشتر از چهار نوکلئوتید نباشد؛ حداقل انرژی آزاد pre-miRNA folding بیشترین مقدار باشد؛ MFEI شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy index) کمترین مقدار باشد؛ توالی miRNA بالغ باید روی حلقه پیش-ساز قرار گیرد؛ حلقه یا شکاف بزرگ در توالی miRNA بالغ وجود نداشته باشد و محتوای A+U توالی پیش‌ساز باید بین ۳۰ تا ۷۰٪ باشد (Zhang et al., 2006a).

تعیین ژن‌های هدف miRNA کاندید

شناسایی ژن‌های هدف احتمالی miRNAهای پیشگویی شده برای لوبیای معمولی با استفاده از نرم

³ gap

¹ Subject

² mismatch

انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel 2013 استفاده شد. آغازگرهای ژنهای مورد بررسی با استفاده از نرم افزار اینترنتی 3 Primer طراحی و داده-های حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی جهت بررسی بیان miR9559-3p در لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) در سه سطح تنش خشکی (FC = 90%, 60%, 30%) و دو سطح باکتری (عدم تلقیح باکتری (شاهد) و تلقیح با مخلوط دو جدایه باکتری).

Table 1. Primers designed for Real-Time PCR to evaluate the expression of miR9559-3p in *Phaseolus vulgaris* L. at three levels of drought stress (FC = 90%, 60%, 30%) and bacterial treatments (including control (no bacteria) and mixture of 2 bacterial isolates).

ID	Oligo sequences 5'→3'
miR9559-3p stem-loop primer Forward	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACAATTG GGCGAAATCAACAAAATGAACAAAATC
miR1514a* stem-loop primer Forward	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCAATGC TTCATTTGAAAATAGGCATTG
Universal Revers	GTGCAGGGTCCGAGGT

*از miRNA1514a به عنوان شاهد جهت تایید مراحل کار استفاده شد. این miRNA یکی از miRNAهای حبوبات می باشد که در پاسخ به تنش خشکی در لوبیای معمولی برانگیخته می شود (Sosa-Valencia et al., 2017).

بین ژنوتیپ‌ها، باکتری‌ها، سطوح تنش خشکی، اثر متقابل ژنوتیپ و باکتری، اثر متقابل ژنوتیپ و تنش، اثر متقابل باکتری و تنش و اثر متقابل سه گانه ژنوتیپ، باکتری و تنش در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی داری وجود داشت (جدول ۲).

نتایج و بحث

کاشت گلخانه‌ای

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که از نظر صفات محتوای پرولین، نشت یونی (EL) و وزن خشک ریشه

جدول ۲- تجزیه واریانس وزن خشک ریشه، نشت یونی و محتوای پرولین ژنوتیپ‌های صدری و یاس در سه سطح تنش خشکی (FC = 90%, 60%, 30%) و چهار سطح باکتری (عدم تلقیح باکتری (شاهد)، تلقیح با جدایه باکتریایی اول (B1)، تلقیح با جدایه باکتریایی دوم (B2) و تلقیح با مخلوط دو جدایه باکتریایی).

Table 2. Variance analysis of root dry weight, EL and prolin in Sadri, and Yas bean genotypes in response to drought stress (FC = 90%, 60% and 30%) and bacterial treatments (including control (no bacteria), first bacterial isolate (B1), second bacterial isolate (B2) and mixture of 2 bacterial isolates).

ANOVA	df	Mean squares		
		Root dry weight	EL	Prolin
Genotype	1	0.079**	2351.06**	0.169**
Bacteria	3	0.019**	722.90**	0.069**
Stress	2	0.015**	4840.02**	0.767**
Genotype × Bacteria	3	0.003**	28.12**	0.003**
Genotype × Stress	2	0.002**	567.35**	0.040**
Bacteria × Stress	6	0.0002**	119.76**	0.025**
Genotype × Bacteria × Stress	6	0.0002**	7.58**	0.001**
Error	48	0.00003	2.23	0.0001
CV (%)		5.03	5.61	3.68

**معنی دار در سطح احتمال یک درصد

CV: ضریب تغییرات

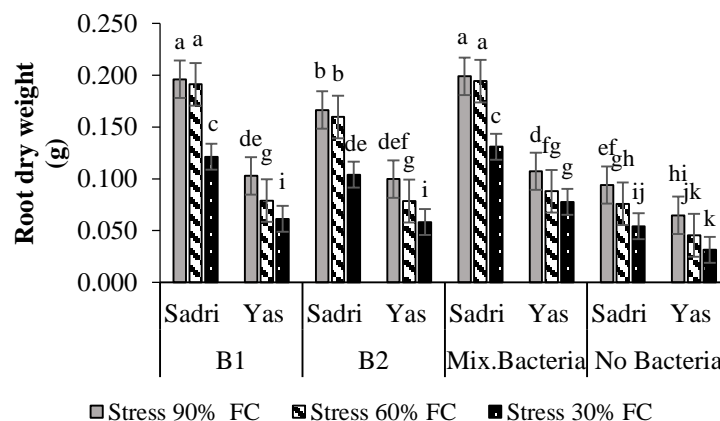
** Significant (P≤0.01).

CV: Coefficient of Variation

وزن خشک ریشه

نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که در سطح احتمال یک درصد، بیشترین میزان وزن خشک ریشه در سطح تنش خشکی $FC = 90\%$ و $FC = 60\%$ در شرایط تلقیح با جدایه باکتریایی اول و مخلوط دو جدایه باکتریایی در ژنوتیپ صدری (۰/۱۹ گرم) و کمترین میزان وزن خشک ریشه در سطح تنش خشکی $FC = 30\%$ و $FC = 60\%$ در شرایط عدم تلقیح با باکتری در ژنوتیپ یاس (به ترتیب ۰/۳۱ و ۰/۴۶ گرم) مشاهده شد (شکل ۱). در سطح تنش خشکی $FC = 60\%$ و $FC = 30\%$ ، بیشترین میزان کاهش وزن خشک ریشه نسبت به سطح شاهد تنش خشکی در شرایط عدم تلقیح با باکتری در ژنوتیپ یاس (به ترتیب با ۳۰ درصد و ۵۲ درصد کاهش وزن نسبت به سطح شاهد تنش خشکی) و کمترین آن در شرایط تلقیح با مخلوط دو

جدایه باکتریایی در ژنوتیپ صدری (به ترتیب با دو درصد و ۲۶ درصد کاهش وزن نسبت به سطح شاهد تنش خشکی) مشاهده شد (شکل ۱). گزارش‌های متعددی با این نتایج هم‌راستا هستند و بهبود ویژگی‌های رشد گیاه را در حضور PGPRها تایید می‌کنند (Kooky *et al.*, 2017; Khan & Bano, 2019). شده است که ریشه‌های گیاهان، مجموعه‌ای از ترکیبات آلی را تولید و ترشح می‌کنند که منبع کارآمد کربن در داخل خاک هستند (Bechtold *et al.*, 2019). میکروبه‌های خاک از جمله PGPR این ترکیبات را جذب می‌کنند (Saikia *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017) و از طریق بهبود رشد ریشه، گره‌زایی و افزایش دسترسی ریز مغذی‌ها به ریشه‌های گیاه، بودجه آبی گیاهان را در شرایط دیم حفظ می‌کنند و باعث تحمل گیاه به تنش خشکی می‌شوند (Strack *et al.*, 2019).



شکل ۱- میانگین وزن خشک ریشه ژنوتیپ‌های صدری و یاس در سه سطح تنش خشکی ($FC = 90\%$, 60% , 30%) و چهار سطح باکتری عدم تلقیح باکتری (شاهد)، تلقیح با جدایه باکتریایی اول (B1)، تلقیح با جدایه باکتریایی دوم (B2) و تلقیح با مخلوط دو جدایه باکتریایی (ستون‌های دارای حرف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند).

Figure 1. Change in the root dry weight in Sadri, and Yas bean genotypes in response to drought stress ($FC = 90\%$, 60% and 30%) and bacterial treatments (including control (no bacteria), first bacterial isolate (B1), second bacterial isolate (B2) and mixture of 2 bacterial isolates). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test ($P \leq 0.01$).

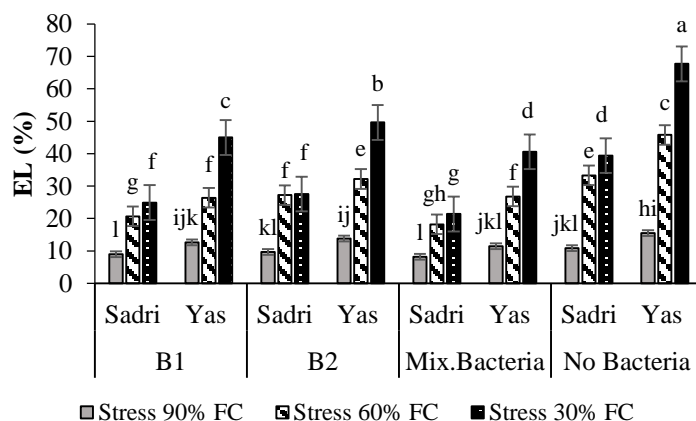
یونی در سطح تنش خشکی $FC = 30\%$ و در شرایط عدم تلقیح با باکتری در ژنوتیپ یاس (۶۷/۷۰ درصد نشت یونی) و کمترین آن در سطح تنش خشکی شاهد ($FC = 90\%$) و در ژنوتیپ یاس تلقیح شده با مخلوط

نشت یونی (EL)

مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی، افزایش شدیدی در نشت یونی در سطح احتمال یک درصد رخ داد، به‌طوری‌که بیشترین میزان نشت

و فرآیند نفوذپذیری باشد (Senaratna & McKersie, 1983). برعکس، در گیاهان تحت تنش که بذر آن‌ها با جدایه‌های باکتریایی تیمار شده بود، درصد نشت یونی به طور قابل توجهی کاهش یافت. این اثرات ارزشمند تیمار جدایه‌های باکتریایی، به نقش مثبت آن‌ها بر پایداری غشا و بهبود نفوذپذیری انتخابی غشای پلاسمایی سلولی نسبت داده می‌شود. گزارش‌های متعددی با نتایج ما مطابقت دارند و تأیید می‌کنند که تیمار PGPRs به طور قابل توجهی نشت یونی را در گیاهان کاهش می‌دهد که ممکن است به دلیل کاهش تجمع اتیلن باشد (Abdelal et al., 2020; Zafar et al., 2020).

دو جدایه باکتریایی و ژنوتیپ صدری در هر دو شرایط تلقیح و عدم تلقیح با باکتری (به ترتیب ۱۱ و ۸ درصد نشت یونی) مشاهده شد (شکل ۲). در سطح تنش خشکی $FC = 60\%$ و $FC = 30\%$ بیشترین افزایش نشت یونی نسبت به سطح شاهد تنش خشکی در شرایط عدم تلقیح با باکتری در ژنوتیپ یاس (به ترتیب با ۳/۴۸ و ۴/۳۶ برابر افزایش نشت یونی نسبت به شاهد) و کمترین افزایش آن در شرایط تلقیح با مخلوط دو جدایه باکتریایی در ژنوتیپ صدری (به ترتیب با ۲/۰۹ و ۲/۶۱ برابر افزایش نشت یونی نسبت به شاهد) مشاهده شد (شکل ۲). اثر منفی خشکی بر نشت یونی ممکن است به دلیل تأثیرات مخرب آن بر غشای سیتوپلاسمی



شکل ۲- میزان نشت یونی ژنوتیپ‌های صدری و یاس در سه سطح تنش خشکی ($FC = 90\%$, 60% , 30%) و چهار سطح باکتری عدم تلقیح باکتری (شاهد)، تلقیح با جدایه باکتریایی اول (B1)، تلقیح با جدایه باکتریایی دوم (B2) و تلقیح با مخلوط دو جدایه باکتری (ستون‌های دارای حرف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند). Figure 2. EL in Sadri, and Yas bean genotypes in response to drought stress ($FC = 90\%$, 60% and 30%) and bacterial treatments (including control (no bacteria), first bacterial isolate (B1), second bacterial isolate (B2) and mixture of 2 bacterial isolates). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test ($P \leq 0.01$).

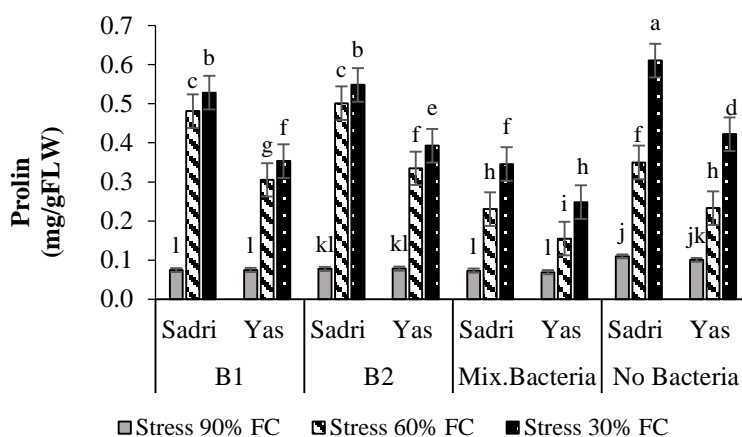
محتوای پرولین نسبت به سطح شاهد تنش خشکی در ژنوتیپ صدری تلقیح شده با جدایه باکتریایی اول و جدایه باکتریایی دوم (به ترتیب با ۶/۵ و ۷/۱ برابر افزایش نسبت به سطح شاهد) و کمترین آن در ژنوتیپ یاس تلقیح شده با مخلوط دو جدایه باکتریایی (به ترتیب با ۲/۲ و ۳/۶ برابر افزایش نسبت به سطح شاهد) مشاهده شد (شکل ۳). نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی (در هر دو سطح تنش خشکی $FC = 30\%$, 60%) به‌طور معنی‌داری

پرولین

با افزایش سطح تنش خشکی، افزایش پیوسته‌ای در محتوای پرولین در سطح احتمال یک درصد رخ داد (شکل ۳)، به‌طوری‌که بیشترین میزان محتوای پرولین در تنش خشکی $FC = 30\%$ و در شرایط عدم تلقیح با باکتری در ژنوتیپ صدری و کمترین آن در تنش خشکی $FC = 90\%$ در شرایط تلقیح با باکتری در هر دو ژنوتیپ مشاهده شد (شکل ۳). در سطح تنش خشکی $FC = 60\%$ و $FC = 30\%$ بیشترین افزایش

محدوده طبیعی قرار می‌دهد که این به نوبه خود از آسیب اکسیداتیو در گیاهان جلوگیری می‌کند (Abdelaal *et al.*, 2020). گزارش شده است که تلقیح بذر با جدایه‌های باکتریایی در شرایط تنش، باعث تنظیم مثبت محتوای پرولین می‌شود و این گونه تعادل اسمزی را در شرایط خشکی تنظیم می‌کند. گزارش‌های متعددی با این نتایج مطابقت دارند و تأیید می‌کنند که تولید پرولین به طور قابل توجهی در گیاهان رشد کرده در شرایط خشکی افزایش می‌یابد. با این حال، استفاده از PGPRها به گیاهان کمک می‌کند تا با تنش اسمزی کنار بیایند و انرژی زیستی سلول‌های گیاهی تحت تنش حفظ شود؛ بنابراین در حضور PGPRها، افزایش قابل توجهی در تولید پرولین ایجاد نمی‌شود، زیرا نیازی به پرولین اضافی نمی‌باشد (Khan *et al.*, 2019; Abdelaal *et al.*, 2020).

افزایش یافت؛ این تاثیر خشکی ممکن است به دلیل نقش آن در کاهش اکسیداسیون پرولین به گلوتامات و در نتیجه افزایش محتوای پرولین باشد (Khan *et al.*, 2019). همبستگی مثبتی بین تجمع پرولین و گیاهان در معرض تنش‌های مختلف وجود دارد. تجمع پرولین به‌طور معمول در سیتوپلاسم اتفاق می‌افتد، جایی که به عنوان یک چارپون مولکولی عمل می‌کند و ساختار پروتئین‌ها را تثبیت می‌کند. علاوه بر این، تجمع آن، PH سیتوزولی را تنظیم می‌کند (Khan *et al.*, 2013; Jha & Subramanian, 2014). پرولین یکی از مهم‌ترین محافظ‌های اسمزی است که نقش مهمی در تنظیم اسمزی ایفا می‌کند و از گیاهان تحت تنش محافظت می‌کند. در گیاهان پرولین با حفظ تورگر سلولی یا تعادل اسمزی و تثبیت غشاها، باعث افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود؛ در نتیجه از نشت یونی جلوگیری می‌کند و غلظت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را در



شکل ۳- تغییرپذیری محتوای پرولین ژنوتیپ‌های صدری و یاس در سه سطح تنش خشکی (FC = 90%, 60%, 30%) و چهار سطح باکتری عدم تلقیح باکتری (شاهد)، تلقیح با جدایه باکتریایی اول (B1)، تلقیح با جدایه باکتریایی دوم (B2) و تلقیح با مخلوط دو جدایه باکتری (ستون‌های دارای حرف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند).

Figure 3. Prolin content changes in Sadri, and Yas bean genotypes in response to drought stress (FC = 90%, 60% and 30%) and bacterial treatments (including control (no bacteria), first bacterial isolate (B1), second bacterial isolate (B2) and mixture of 2 bacterial isolates). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test ($P \leq 0.01$).

شناسایی miRNAها بر مبنای جستجوی همولوژی بین miRNAها، ESTها و کانتینگ‌ها با استفاده از نرم افزار C-mii صورت گرفت. MFE یک شاخص برجسته برای

بخش بیوانفورماتیک و مولکولی
شناسایی miRNAهای کاندید در گیاه لوبیای معمولی

miRNA دخیل در تنش خشکی متعلق به چهار خانواده miR9559 و miR5565e، miR5021، miR408 شناسایی شدند.

پیشگویی ژن‌های هدف

شناسایی ژن‌های هدف miRNA جهت پی بردن به نقش miRNAها در عملکردهای مختلف سلولی، یک مرحله مهم می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که miRNA بیان ژن را از طریق جفت شدن کامل یا تقریباً کامل با ژن‌های هدفشان و تخریب یا سرکوب کردن آن‌ها انجام می‌دهند. در این مطالعه، ژن‌های هدف مختلفی برای bra-miR9559-3p به دست آمد که متعلق به چندین خانواده ژنی با عملکردهای بیولوژیکی مختلف بودند (جدول ۳).

تعیین ساختار ثانویه اسیدهای نوکلئیک مانند RNA و DNA می‌باشد. MFE پایین‌تر از نظر ترمودینامیکی برای ساختار ثانویه توالی‌های RNA یا DNA مربوطه پایدارتر است. توالی پیش‌ساز miRNA نسبت به rRNA، tRNA و mRNA به‌طور معنی‌داری ارزش MFEI بالاتری دارد (Bonnet *et al.*, 2004). برای جلوگیری از پیش‌بینی نادرست miRNAها از دیگر RNAهای کوچک، MFEI شاخص بسیار مطلوبی محسوب می‌شود؛ بنابراین با جستجو در بین کانتیگ‌ها و با در نظر گرفتن شاخص MFEI مساوی یا بزرگتر از ۰/۶ کیلو کلری بر مول، E-value برابر با ۱۰، تعداد نوکلئوتید اشتباه حداکثر دو و با استفاده از داده‌های EST (شامل EST11854 مربوط به تنش خشکی در گیاه لوبیای معمولی) و بر مبنای درصد AU پنج

جدول ۳- فهرست اهداف ژنی پیش‌بینی شده bra-miR9559-3p در گیاه لوبیای معمولی.

Table 3. List of computer-based predicted targets of bra-miR9559-3p in *Phaseolus vulgaris* L.

miRNA	Genes	Function
bra-miR9559-3p	A7PK36	Pipl-protein, Pyridoxal 5'-phosphate, Protein transport, Sugar phosphate/phosphate translocator
	A7Q0V9	
	A7QN02	
	Q10LE2	
	Q39822	

2013). همچنین تحت تنش خشکی اکثر رونوشت‌های pip بجز AtPIP1:4 و AtPIP2:5 کاهش بیان نشان می‌دهند و برخی دیگر از این pipها تحت تاثیر تنش خشکی قرار نمی‌گیرند (He *et al.*, 2018). بر اساس نتایج می‌توان گفت که miRNAهای شناسایی شده همانند مطالعات قبلی در اغلب فرآیندهای متابولیکی مانند رشد و نمو، تمایز، انتقال پیام و پاسخ به انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی دخیل می‌باشند (Jung *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2013; Baldrich *et al.*, 2018).

ساختار ثانویه پیش‌ساز ساقه - حلقه miRNAهای شناسایی شده

بعد از انجام Blastx جهت حذف توالی‌های کدکننده پروتئینی، با در نظر گرفتن پارامترهایی مانند دمای تاخوردگی در ۳۷ درجه و شرایط یونی، یک مولار NaCl برای پیشگویی ساختارهای ثانویه از نرم افزار MFOLD در C-mii استفاده شد (Xie *et al.*, 2010) و ساختار

مطالعات بیوانفورماتیک در این تحقیق نشان داد که bra-miR9559-3p در تنظیم ترابری غشا از دستگاه گلژی به سمت ناحیه‌ی اندوپلاسمی (ER) و اتصال GDP به GTP نقش دارد و دارای فعالیت GTPase ذاتی می‌باشد (جدول ۳). در سایت Uniprot برای کلاستر A7Q0V9 عملکردی مشخص نشده است؛ احتمالاً این پروتئین در انتقال قند فسفات / فسفات نقش دارد. محتمل‌ترین هدف برای miR9559-3P مربوط به کلاستر Q39822 (Pip1 protein) در گیاه سویا (*Glycin max*) می‌باشد. این پروتئین در فعالیت کانال نقش دارد و انرژی مستقل برای انتشار تسهیل شده را فراهم می‌کند (جدول ۳). Pipها در انتقال آب، H₂O₂، گلیسرول، CO₂ و اوره نقش دارند و عمدتاً در ریشه یافت می‌شوند (Forrest & Bhave, 2007; Recchia *et al.*, 2013). گزارش شده است که افزایش بیان ژن کوپورین در ریشه با افزایش تراوایی غشای پلاسمایی و غشای واکوئل به آب سبب بازگشت آماس می‌شود (Recchia

بیشتری از ژن‌های هدف را هدف قرار می‌دهد و این امر می‌تواند حساسیت گیاه را نسبت به تنش خشکی شدید افزایش دهد. از سوی دیگر در گیاه متحمل به خشکی در مقایسه با حالت نرمال، میزان بیان miR9559-3P اندکی افزایش پیدا کرد (شکل ۴)، اما پس از اعمال تنش خشکی شدید و در مقایسه با تنش ملایم میزان بیان کاهش یافت (شکل ۴). احتمالاً این امر به این دلیل می‌باشد که گیاه توانسته خود را برای شرایط تنش شدید آماده نماید و بنابراین با یک نمایش تنظیمی خاص، میزان بیان miR9559-3P را کاهش داده و به کاهش اثرات تخریبی آن منجر شده است. که نتیجه این امر، کاهش میزان تخریب رونوشت‌های miR9559-3P، بیان بیشتر ژن هدف و در نهایت بهبود تحمل گیاه تحت شرایط اعمال تنش شدید می‌باشد.

همچنین نتایج نشان داد که در حالت تلقیح باکتری نسبت به حالت عدم تلقیح باکتری در هر دو گیاه حساس و متحمل و در هر دو سطح تنش خشکی، میزان بیان miR9559-3P کاهش می‌یابد (شکل ۴). گزارش شده است که در گیاهان، PGPRها از طریق تنظیم ژن-های سیگنالینگ وابسته به ABA، تعدیل سطوح هورمونی، مسیر سیگنالینگ اتیلن و فاکتور رونویسی بیان miRNA را تعدیل کرده و منجر به تحمل به خشکی می‌شوند (Akpınar *et al.*, 2015; Barnawal *et al.*, 2017). استفاده از PGPRها به گیاهان کمک می‌کند تا با تنش اسمزی کنار بیایند و انرژی زیستی سلول‌های گیاهی تحت تنش حفظ شود که این امر نشان دهنده دخالت PGPRها در بهبود تنش خشکی با تعدیل بیان miRNA می‌باشد؛ بنابراین در حضور PGPRها، بیان miR9559-3P تعدیل می‌شود. نتایج محققان دیگر نیز با این نتایج مطابقت دارد (Barnawal *et al.*, 2017; Jatan *et al.*, 2019).

گزارش شده است که miRNAها نقش مهمی در تعدیل بیان ژن در طول تنش‌های محیطی مختلف ایفا می‌کنند (Jatan *et al.*, 2019). ژن‌های هدف miRNAها طیف وسیعی از پروتئین‌ها از جمله فاکتورهای رونویسی، انتقال دهنده‌ها، پروتئین‌های مرتبط با دفاع، کینازها و ... را رمزگذاری می‌کنند (Jeong *et al.*,

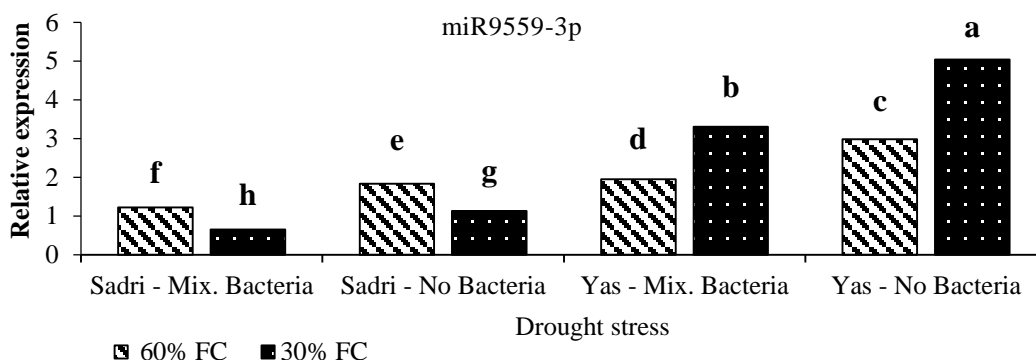
ثانویه پیش‌ساز ساقه - حلقه miRNAهای متمایز کاندید در گیاه لوبیا معمولی در MFOLD ترسیم شد. در ساختار ثانویه مشاهده شد که قسمت بالغ miRNA در قسمت حلقه ساختار ثانویه پیش‌ساز miRNA قرار دارد که یکی از شروط اساسی در ترسیم ساختار ثانویه در MFOLD است می‌باشد (Zhang *et al.*, 2006a). نتایج نشان داد که باز یوراسیل (U) به عنوان باز غالب در موقعیت 5' قسمت بالغ miRNAها بود که با مطالعات دیگر نیز مطابقت دارد (Yin *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Frazier *et al.*, 2010). در همه miRNAهای پیشگویی شده، درصد A+U بیشتر از ۵۰ درصد بود و از آن‌جا که بازهای A+U غنی از پیوند هیدروژنی هستند، باعث پایداری و ثبات ساختارهای پیش‌ساز miRNAها می‌شوند (Zhang *et al.*, 2006a,b). همچنین یک دامنه وسیع از طول پیش‌ساز miRNAها مشاهده شد که این تنوع در طول پیش‌ساز miRNAها در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Zhu & Luo, 2013).

میزان نسبی بیان miR9559-3P

نتایج حاصل از بیان miR9559-3P نشان داد که میزان بیان miR9559-3P در گیاه حساس به تنش خشکی (یاس) در مقایسه با گیاه متحمل به تنش خشکی (صدری) بیشتر بود (شکل ۴). این امر نشان می‌دهد که این miRNA دارای پتانسیل بیان و کارکرد در جهت تنظیم فعالیت بیان ژن در گیاه لوبیای معمولی است و احتمالاً miR9559-3P در گیاه حساس، نقش تنظیم‌کنندگی منفی در میزان تحمل به خشکی را دارا می‌باشد. در گیاه حساس پس از اعمال تنش خشکی ملایم (FC = 60%) نسبت به شرایط نرمال (FC = 90%)، میزان بیان افزایش یافت که این امر بر نقش تنظیم‌کنندگی این miRNA در میزان حساسیت گیاه نسبت به تنش خشکی اشاره دارد. همچنین پس از اعمال تنش شدید (FC = 30%)، میزان بیان این miRNA حتی در مقایسه با تنش خشکی ملایم هم بیشتر شد (شکل ۴) که این امر نشان می‌دهد که احتمالاً تحت شرایط تنش خشکی شدید، گیاه حساس پتانسیل تنظیمی ضعیفی اعمال می‌کند، به‌گونه‌ای که miR9559-3P درصد

سیگنال دهی هورمونی و پاسخ به تنش خشکی دارند (Baldoni *et al.*, 2015). همچنین گزارش شده است که بیان فاکتورهای رونویسی bZIP در شرایط کم آبی افزایش می‌یابد. این فاکتورها در تنظیم شبکه‌های سیگنالینگ وابسته به تنش و تنظیم بیان ژن‌های متعدد پاسخ دهنده به تنش دخیل هستند و تنظیم کننده مهم سیگنالینگ ABA می‌باشند (Shen & Zhang, 1996; Finkelstein & Lynch, 2000; Lopez-Molina *et al.*, 2001; Barnawal *et al.*, 2017).

اغلب فاکتورهای رونویسی در پاسخ و تحمل به تنش غیرزیستی توسط miRNAهای حفاظت شده مورد هدف قرار می‌گیرند (Samad *et al.*, 2017). فاکتورهای رونویسی، تنظیم کننده‌های اصلی بیان ژن هستند که به توالی‌های تنظیمی متصل می‌شوند و می‌توانند سرعت رونویسی ژن‌ها را تحریک یا سرکوب کنند. بیان شده است که ژن‌های هدف miRNAها نقش مهمی در



شکل ۴- میزان نسبی بیان miR9559-3P در ژنوتیپ صدی و یاس در دو سطح تنش خشکی FC = 60% و FC = 30% و دو سطح باکتری (عدم تلقیح باکتری (شاهد) و تلقیح با مخلوط دو جدایه باکتری (ستون‌های دارای حرف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند).

Figure 4. Relative expression of miR9559-3P in Sadri, and Yas bean genotypes in response to drought stress (FC = 60% and 30%) and bacterial treatments (including control (no bacteria) and mixture of 2 bacterial isolates). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test ($P \leq 0.01$).

نتیجه‌گیری کلی
miRNAها به صورت تکاملی در قلمرو گیاهی حفاظت شده هستند و از طریق تجزیه‌ی mRNA یا مهار ترجمه بیان ژن را تنظیم کرده و در پاسخ به تنش نقش کلیدی دارند. با استفاده از ابزارها و روش‌های مقایسه‌ای می‌توان miRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها را پیشگویی کرد و از آن‌ها به عنوان ابزار اصلاحی جدید در جهت بهبود ژنتیکی و تنظیم صفات عمده زراعی گیاهان استفاده کرد. در تحقیق حاضر، شناسایی miRNAهای دخیل در تنش خشکی در لوبیای معمولی با روش‌های بیوانفورماتیکی مبتنی بر همولوژی بین ESTهای موجود در NCBI و miRNAهای miRBase با BLASTn انجام پذیرفت و پنج miRNA دخیل در تنش خشکی متعلق به چهار خانواده miR408، miR5021، miR5565e و miR9559 شناسایی شدند.

miR9559-3p در تنظیم ترابری غشا و اتصال GDP به GTP نقش دارد و دارای فعالیت GTPase ذاتی بوده و احتمالاً ترین هدف برای miR9559-3P مربوط به کلاستر Q39822 (Pip1 protein) می‌باشد. نتایج نشان داد که در شرایط خشکی و تلقیح باکتری در گیاه حساس و متحمل به خشکی، میزان بیان miR9559-3P کاهش یافت، اما در حالت عدم تلقیح باکتری، میزان بیان miR9559-3P در گیاه حساس بیشتر بود. احتمالاً در گیاه حساس miR9559-3P با نقش تنظیم کننده‌ی منفی و هدف قرار دادن درصد بیشتری از ژن‌های هدف، باعث افزایش حساسیت به تنش خشکی شده است، اما گیاه متحمل با یک نمایش تنظیمی خاص و کاهش بیان miR9559-3P باعث کاهش تخریب

نتیجه‌گیری کلی
miRNAها به صورت تکاملی در قلمرو گیاهی حفاظت شده هستند و از طریق تجزیه‌ی mRNA یا مهار ترجمه بیان ژن را تنظیم کرده و در پاسخ به تنش نقش کلیدی دارند. با استفاده از ابزارها و روش‌های مقایسه‌ای می‌توان miRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها را پیشگویی کرد و از آن‌ها به عنوان ابزار اصلاحی جدید در جهت بهبود ژنتیکی و تنظیم صفات عمده زراعی گیاهان استفاده کرد. در تحقیق حاضر، شناسایی miRNAهای دخیل در تنش خشکی در لوبیای معمولی با روش‌های بیوانفورماتیکی مبتنی بر همولوژی بین ESTهای موجود در NCBI و miRNAهای miRBase با BLASTn انجام پذیرفت و پنج miRNA دخیل در تنش خشکی متعلق به چهار خانواده miR408، miR5021، miR5565e و miR9559 شناسایی شدند.

miRNAها به منظور دست‌ورزی ژن‌هایی که در افزایش تحمل به تنش خشکی نقش دارند استفاده نمود. همچنین به‌عنوان ژن‌های کاندید در مبحث مهندسی ژنتیک و با هدف افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و ارتقا متابولیت‌های ثانویه در گیاه لوبیای معمولی کاربرد دارند و از آن‌جا که باکتری‌های PGPR بیان miRNA را تعدیل کرده و منجر به تحمل به خشکی، افزایش رشد و تولید گیاه می‌شوند، بنابراین استفاده از این باکتری‌ها به عنوان کود زیستی می‌تواند یک روش جایگزین مناسب کود شیمیایی باشد.

سپاسگزاری

از موسسه تحقیقات خاک و آب کشور بابت حمایت مالی و همکاری در جهت اجرای هرچه بهتر این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

رونوشت‌های miR9559-3P، بیان بیشتر ژن هدف و بهبود تحمل به تنش شده است. بنابراین miRNAها یکی از مهم‌ترین اجزای شبکه‌های تنظیمی در گیاهان است و نقش مهمی در کنترل ژن‌های مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه و عوامل رونویسی ایفا می‌کنند. miRNAهای شناسایی شده در اغلب فرآیندهای زیستی و متابولیکی همچون رشد و نمو، تمایز، انتقال پیام و پاسخ به تنش نقش داشتند. به‌دلیل نقش تنظیمی miRNAهای شناسایی شده بر طیف وسیعی از عوامل رونویسی و تاثیر بالقوه آن‌ها بر ژن‌های پایین دستی شبکه‌های ژنی، miRNAها یکی از مهم‌ترین ابزارهای ایجاد تحمل به تنش خشکی محسوب می‌شوند و شناسایی miRNAهای دخیل در پاسخ به تنش خشکی و ژن‌های هدف آن‌ها، اولین مرحله در انتخاب ابزار برای ایجاد تحمل به تنش‌های محیطی با استفاده از روش‌های کنترل بیان ژن می‌باشد و می‌توان از این

REFERENCES

1. Abdelaal, K. A. A., EL-Maghraby, L. M., Elansary, H., Hafez, Y. M., Ibrahim, E. I., El-Banna, M., El-Esawi, M. & Elkesh, A. (2020). Treatment of sweet pepper with stress tolerance inducing compounds alleviates salinity stress oxidative damage by mediating the physio-biochemical activities and antioxidant systems. *Journal of Agronomy*, 10, 26.
2. Akbari, S., Kafi, M. & Rezvan Beidokhti, S. (2016). The effects of drought stress on yield, yield components and antioxidant of two garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes with different planting densities. *Journal of Agroecology*, 8(1), 95-106. (In Persian with English Summary)
3. Akpınar, B. A., Kantar, M. & Budak, H. (2015). Root precursors of microRNAs in wild emmer and modern wheat show major differences in response to drought stress. *Journal of Functional and Integrative Genomics*, 15(5), 587-598.
4. Akter, A., Islam, M. M., Mondal, S. I., Mahmud, Z., Jewel, N. A., Ferdous, S. & Rahman, M. M. (2014). Computational identification of miRNA and targets from expressed sequence tags of coffee (*Coffea arabica*). *Saudi Journal of Biological Science*, 21(1), 3-12.
5. Baldoni, E., Genga, A. & Cominelli, E. (2015). Plant MYB transcription factors: their role in drought response mechanisms. *Journal of molecular sciences*, 16, 15811-15851.
6. Baldrich, P., Beric, A. & Meyers, B. C. (2018). Despacito: the slow evolutionary changes in plant microRNAs. *Journal of Current opinion in plant biology*, 42, 16-22.
7. Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S. S., Pandey, A., Chanotiya, C. S. & Kalra, A. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. *Journal of Physiologia plantarum*, 161(4), 502-514.
8. Barrera-Figueroa, B. E., Gao, L., Diop, N. N., Wu, Z., Ehlers, J. D., Roberts, P. A., Close, T. J., Zhu, J.-K. & Liu, R. (2011). Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. *Journal of BMC Plant Biology*, 11, 127.
9. Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, L. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Journal of Plant and Soil*, 39, 205-208.
10. Bechtold, M., De Lannoy, G., Koster, R., Reichle, R., Mahanama, S., Bleuten, W., Bourgault, M., Brümmer, C., Burdun, I. & Desai, A. (2019). PEAT-CLSM: A specific treatment of peatland hydrology in the NASA catchment land surface model. *J. Adv. Model. Journal of Earth System Science*, 11(7), 2130-2162.

11. Bonnet, E., Wuyts, J., Rouze, P. & Peer, Y. V. (2004). Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Journal of Bioinformatics*, 20, 2911-2917.
12. Candar-Cakir, B., Arican, E. & Zhang, B. (2016). Small RNA and degradome deep sequencing reveals drought-and tissue-specific micrornas and their important roles in drought sensitive and drought tolerant tomato genotypes. *Journal of Plant Biotechnology*, 14, 1727-1746.
13. Catalanotto, C., Cogoni, C. & Zardo, G. (2016). MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1712.
14. Da Piedade Melo, A., Olivares, F., Oliveira Médici, L., Torres Neto, A., Barros Dobbss, L. & Pasqualoto Canellas, L. (2017). Mixed rhizobia and *Herbaspirillum seropedicae* inoculations with humic acid like substances improve water stress recovery in common beans. *Journal of Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4, 6.
15. Devi, K. J., Chakraborty, S., Deb, B. & Rajwanshi, R. (2016). Computational identification and functional annotation of micro RNAs and their targets from expressed sequences tags (ESTs) and genome survey sequences (GSSs) of coffee (*Coffa Arabica* L.). *Journal of Plan Gene*, 6, 30-42.
16. FAO Statistical. (2017). World Food and Agriculture.
17. Finkelstein, R. R. & Lynch, T. J. (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Journal of Plant Cell*, 12, 599-609.
18. Formey, D., Martin Rodriguez, J. A., Leija, A., Santana, O., Quinto, C., Cardenas, L. & Hernandez, G. (2016). Regulation of small RNAs and corresponding targets in nod factor-induced *Phaseolus Vulgaris* root hair cells. *International. Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 887.
19. Forrest, K. L. & Bhave, M. (2007). Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Journal of Functional and integrative Genomics*, 7(4), 263-289.
20. Frazier, T. P., Xie, F., Freistaedter, A., Burklew, C. E. & Zhang, B. (2010). Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Journal of Planta*, 232, 1289-1308.
21. He, M., Lan, M., Zhang, B., Zhou, Y., Wang, Y., Zhu, L. & Fu, Y. (2018). Rab-H1b Is Essential for Trafficking of Cellulose Synthase and for Hypocotyl Growth in Arabidopsis thaliana: Rab-H1b is essential for CESA trafficking. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60 (11), 1051-1069.
22. Hungria, M., Nogueira, M. A. & Araujo, R. S. (2013). Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Journal of Biology Fertility Soils*, 49, 791-801.
23. Hwang, D. G., Park, J. H., Lim, J. Y., Kim, D., Choi, Y., Kim, S., Reeves, G., Yeom, S. I., Lee, J. S., Park, M., Choi, I. Y., Choi, D. & Shin, C. (2013). The hot pepper (*Capsicum annuum*) microRNA transcriptome reveals novel and conserved targets: a foundation for understanding MicroRNA functional roles in hot pepper. *Journal of Plos One*, 30, 8(5), e64238.
24. Jatan, R., Singh Chauhan, P. & Lata, C. (2019). Pseudomonas putida modulates the expression of miRNAs and their target genes in response to drought and salt stresses in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Genomics*, 111, 509-519.
25. Jeong, D. H., Park, S., Zhai, J., Gurazada, S. G., Paoli, E. De., Meyers, B. C. & Green, P. J. (2011). Green, Massive analysis of rice small RNAs: mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage. *Journal of Plant Cell*, 23, 4185-4207.
26. Jha, Y. & Subramanian, R. B. (2014). PGPR regulate caspase like activity, programmed cell death, and antioxidant enzyme activity in paddy under salinity. *Journal of. Physiology Molecular Biology of Plants*, 20, 201-7.
27. Jung, H. J., Park, S. J. & Kang, H. (2013). Regulation of RNA metabolism in plant development and stress responses. *Journal of Plant Biology*, 56, 123-129.
28. Jung, J. H., Seo, P. J. & Park, C. M. (2009). MicroRNA biogenesis and function in higher plants. *Journal of Plant Biotechnology Reports*, 3, 111-126.
29. Kasim, W. A., Osman, M. E., Omar, M. N., Abd El Daim, I. A., Bejai, S. & Meijer, J. (2013). Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth- Promoting Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 122-130.
30. Khan, M. I., Iqbal, N., Masood, A. & Per, T. S. (2013). Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Journal of Signaling & Behavior*, 8, 263-274.
31. Khan, N., Bano, A., Rahman, M. A., Rathinasabapathi, B. & Babar, M. A. (2019). UPLC-HRMS-based untargeted metabolic profiling reveals changes in chickpea (*Cicer arietinum*) metabolome following long term drought stress. *Journal of Plant Cell & Environment*, 42, 115-132.

32. Kooky, G. W., Mburu, S. M., Njeru, E. M., Kimiti, J., Ombori, O. & Maingi, J. (2017). Potential of native rhizobia in enhancing nitrogen fixation and yields of climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in contrasting environments of Eastern Kenya. *Journal of Frontiers Plant Science*, 8,443.
33. Li, L., Xu, J., Yang, D., Tan, X. & Wang, H. (2010). Computational approaches for microRNA studies: a review. *Journal of Mammalian Genome*, 21, 1-12.
34. Li, C. & Zhang, B. (2016). MicroRNAs in control of plant development. *Journal of Cellular Physiology*, 231(2), 303-313.
35. Lopez Molina, L., Mongrand, S. & Chua, N. H. (2001). A post germination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Journal of Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 4782-4787.
36. Lutts, S., Kinet, J. M. & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Journal of Annals of Botany*, 78, 389-398.
37. Maryani, Y., Sudadi, W., Dewi, S. & Yunus, A. (2018). Study on osmoprotectant rhizobacteria to improve mung bean growth under drought stress. *Journal of Earth and Environmental Science*, 129(1), 012014.
38. Numnark, S., Mhuanong, W., Ingsriswang, S. & Wichadakul, D. (2012). C-mii: a tool for plant miRNA and target identification, BMC genomics. *Journal of Springer*, pp, S16.
39. Oliveira, S. M., Marra, L. M. & Moreira, F. M. S. (2013). Evaluation of plant growth promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 948-59.
40. Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. & Chen, X. (2002). Carpel Factory, a dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Current Biology*, 12(17), 1484-1495.
41. Perez-Quintero, A. L., Sablok, G., Tatarinova, T. V., Conesa, A., Kuo, J. & Lopez, C. (2012). Mining of miRNA and potential targets from gene oriented clusters of transcripts sequences of the anti-malarial plant, *Artemisia annua*. *Journal of Biotechnology Letters*, 34(4), 737-745.
42. Recchia, G. H., Caldas, D. G. G., Beraldo, A. L. A., da Silva, M. J. & Tsai, S. M. (2013). Transcriptional analysis of drought-induced genes in the roots of a tolerant genotype of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7155-7179.
43. Saharan, B. S. & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Life Sciences and Medicine Research*, 2011, 1- 30.
44. Saikia, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R. & Gupta, V. K. (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Journal of Sciences*, 8, 3560.
45. Samad, A. F., Sajad, M., Nazaruiddin, N., Fauzi, I. A., Murad, A., Zainal, Z. & Ismail, I. (2017). MicroRNA and transcription factor: key players in plant regulatory network. *Journal of Frontiers in Plant Science*, 8, 565.
46. Senaratna, T. & Mckersie, B. (1983). Dehydration injury in germinating soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds. *Journal of Plant Physiology*, 72, 620-624.
47. Shen, Q., Zhang, P. & Ho, T. H. (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Journal of Plant Cell*, 8, 1107-1119.
48. Singh, S. P. (2007). Drought resistant in race Durango dry bean landraces and cultivars. *Journal of Agronomy*, 99, 1219-1225.
49. Singh, N., Srivastava, S., Shasany, A. K. & Sharma, A. (2016). Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of *Mentha* spp. *Journal of Computational Biology and Chemistry*, 64, 154-162.
50. Sosa-Valencia, G., Palomar, M., Covarrubias, A. A. & Reyes, J. L. (2017). The legume miRNA1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 68 (8), 2013-2026.
51. Strack, M., Munir, T. M. & Khadka, B. (2019). Shrub abundance contributes to shifts in dissolved organic carbon concentration and chemistry in a continental bog exposed to drainage and warming. *Journal of Ecohydrology*, 12(5).
52. Sun, F., Guo, G., Du, J., Guo, W., Peng, H., Ni, Z., Sun, Q. & Yao, Y. (2014). Whole genome discovery of mirnas and their targets in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of BMC Plant Biology*, 14(1), 142.
53. Tian, T., Wang, J. & Zhou, X. (2015). A review: microRNA detection methods. *Journal of Organic & Biomolecular Chemistry*, 13, 2226-2238.

54. Varkonyi Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F. & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Journal of Plant Methods*, 3(1), 1-12.
55. Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q. & Zhang, W. H. (2011). Identification of drought responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome wide high-throughput sequencing. *Journal of BMC Genomics*, 12, 367.
56. Wu, J., Wang, L., Li, L. & Wang, S. (2014). De novo assembly of the common bean transcriptome using short reads for the discovery of drought responsive genes. *Journal of Plos One*, 9, e109262.
57. Xie, F. L., Huang, S. Q., Guo, k., Xiang, A. L., Zhu, Y. Y., Nie, L. & Yang, Z. M. (2007). Computational identification of novel micro RNAs and targets in *Brassica napus*. *Journal of Febs Letters*, 581(7), 1464-1474.
58. Xie, F., Frazier, T. P. & Zhang, B. (2010). Identification and characterization of microRNAs and their targets in the bioenergy plant switchgrass (*Panicum virgatum*). *Journal of Planta*, 232, 417-434.
59. 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. *Journal of Experimental Botany*. 66, 789-804.
60. Yin, Z., Li, C., Han, X. & Shen, F. (2008). Identification of conserved microRNAs and their target genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Gene*, 414, 60-66.
61. Zafar-ul-Hye, M., Mahmood, F., Danish, S., Hussain, S., Gul, M., Yaseen, R. & Shaaban, M. (2020). Evaluating efficacy of plant growth promoting rhizobacteria and potassium fertilizer on spinach growth under salt stress. *Journal of Botany*, 52(4).
62. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. (2006a). Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Journal of Developmental Biology*, 289 (1), 3-16.
63. Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. (2006b). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Journal of Plant*, 46, 243-259.
64. Zhang, B., Pan, X. & Stellwag, E. J. (2008). Identification of soybean microRNAs and their targets. *Journal of Planta*, 229, 161-182.
65. Zhang, S., Kang, H. & Yang, W. (2017). Climate change induced water stress suppresses the regeneration of the critically endangered forest tree *nyssa yunnanensis*. *Journal of Plos One*, 12, e0182012.
66. Zhou, Z. S., Wang, S.J. & Yang, Z. M. (2008). Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Journal of Chemosphere*, 70(8), 1500-1509.
67. Zhu, Q. w. & Luo, Y. P. (2013). Identification of miRNAs and their targets in tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Zhejiang University Science*, B 14, 916-923.