

## نقش microRNA399 و سوکروز در پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) نسبت به کمبود فسفر

مجید مهدیه\* و فرزانه محمدصالح

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، کد پستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶، اراک، ایران

### چکیده

میکروRNAها مولکول‌هایی با زنجیره کوتاه و غیر قابل ترجمه است که بیان ژن‌های مختلف را در سطح پس از رونویسی تنظیم می‌کنند. تعداد زیادی از میکروRNAها در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی نقش دارند. برای نمونه، miR399 در پاسخ گیاه به کمبود فسفات اهمیت دارد. پژوهش حاضر با هدف درک نقش متقابل miR399 و سوکروز در پاسخ گیاه آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) به کمبود فسفات انجام گرفت. برای این منظور، از گیاه تراریخته آراییدوپسیس که در آن بیان ژن miR399 افزایش یافته (OXmiR399) همراه با گیاه نوع خودرو استفاده شد. بذر گیاهان در چهار محیط کشت مختلف: محیط کشت با فسفر کافی همراه سوکروز (S+P+)، با کمبود فسفر همراه سوکروز (S+P-)، فسفر کافی بدون سوکروز (S-P+) و کمبود فسفر بدون سوکروز (S-P-) کشت شدند. P+ و P- به ترتیب اشاره به سطوح ۱/۲ میلی مولار و ۱۰ میکرومولار فسفات دارد و S+ محیط حاوی سوکروز ۱ درصد و S- محیط فاقد سوکروز است. نتایج نشان داد که در گیاهان تراریخت طول ریشه اولیه و انشعابات آن در محیط‌های فاقد سوکروز و دارای فسفات کافی (S+P-) نسبت به گیاهان نوع خودرو به شدت کاهش یافت. بالاترین میزان تجمع آنتوسیانین و نشاسته در محیط‌های S+P- در هر دو نوع مشاهده شد. به هر حال، در محیط‌های S-P- بیان بالای miR399 موجب افزایش معنی داری در تجمع آنتوسیانین گیاه شد. miR399 موجب افزایش معنی داری در سطح فسفر آزاد گیاه در تمام انواع محیط‌ها نیز شد. از سوی دیگر، در محیط‌های حاوی فسفات کافی حذف سوکروز موجب افزایش معنی دار میزان فسفر آزاد در هر دو نوع گیاهی شد. احتمالاً سوکروز و miR399 به طور همزمان در مسیر سیگنال‌دهی کمبود فسفات در گیاه آراییدوپسیس نقش مهمی دارند.

**واژه‌های کلیدی:** آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، سوکروز، کمبود فسفات، میکروRNA

### مقدمه

کوتاه زنجیر، غیر قابل ترجمه و دارای بیان داخلی هستند.

اغلب ژن‌های میکروRNA به عنوان واحدهای مستقل

میکروRNAها (microRNA) مولکول‌های rRNA

که تعداد زیادی از میکروRNAها در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند و حتی نقش برخی از آنها نیز به صورت تجربی در پاسخ به تنش‌های زیستی (Zhang *et al.*, 2005) و غیر زیستی (Sunkar and Zhu, 2004) Zhang *et al.*, 2005) از جمله تنش اکسیداتیو (Sunkar *et al.*, 2006)، تنش‌های مکانیکی در گونه‌های درختی (Lu *et al.*, 2005)، تنش‌های تغذیه‌ای (Fujii *et al.*, 2005) و سایر تنش‌های محیطی به اثبات رسیده است. یکی از انواع تنش‌های غیر زیستی کمبود فسفر است که از محدود کننده‌ترین مواد غذایی برای بازده محصولات زراعی است (Raghothama, 1999). سلول‌های در حال رشد برای سنتز نوکلئیک اسیدها و فسفولیپیدها به فسفات نیازمندند، همچنین فسفات نقش مهمی در انتقال انرژی (ATP)، تنظیم واکنش‌های آنزیمی و هدایت پیام ایفا می‌کند (Raghothama, 2000؛ Tiessen, 2008).

از جمله میکروRNAهایی که در پاسخ به کمبود فسفات افزایش می‌یابد، miRNA399 است که با تأثیر بر mRNA آنزیم E2 ubiquitin-conjugating باعث تعادل فسفات در گیاه می‌شود به طوری که در شرایط کمبود فسفات میزان فسفات گیاهان تراریخته‌ای که بیان ژن miRNA399 در آنها زیاد شده (OXmiR399) در بخش هوایی افزایش می‌یابد (Chiou *et al.*, 2006؛ Yuan and Liu, 2008؛ Rouached *et al.*, 2010؛ Kuo and Chiou, 2011). در سال‌های اخیر، مشخص شده است که miR399 می‌تواند از بخش هوایی گیاه به ریشه منتقل شود و به عنوان یک پیام‌رسان برای برقراری ارتباط بین بخش هوایی و ریشه از نظر وضعیت فسفات عمل کند، بنابراین میزان جذب و انتقال فسفات

وجود دارند و توسط RNA پلیمراز II (PolIII) رونویسی می‌شوند. این رونوشت‌ها در ابتدا به صورت رشته‌های بلند زنجیر هستند (Kim, 2005؛ Yang *et al.*, 2007) سپس، توسط پروتئین‌های شبه دایسر (Dicer-like) از نواحی حلقه-ساقه (stem-loop) برش می‌خورند و در نهایت، به میکروRNA بالغ تبدیل می‌شوند (Bartel, 2004؛ Voinnet, 2009). این مولکول‌های RNA تنظیم کننده، در گیاهان تقریباً دارای ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند (Yang *et al.*, 2007؛ Voinnet, 2009). سازوکار سنتز و عملکرد میکروRNAها در گیاهان و جانوران تقریباً مشابه است. این RNAهای کوچک از جمله عواملی هستند که به صورت پس از رونویسی بیان ژن‌های مختلف را تنظیم می‌کنند و نحوه عملکرد آنها به گونه‌ای است که mRNAهای هدف خود را شناسایی کرده، بر آن تأثیر می‌گذارند (Sunkar *et al.*, 2007؛ Sunkar *et al.*, 2012). اگرچه میکروRNAها از نظر تعداد اندک هستند اما نقش تنظیم کنندگی آنها در بیان ژن‌های گیاهان را نمی‌توان نادیده گرفت زیرا اغلب mRNAهای هدف، عوامل رونویسی هستند (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). این عوامل رونویسی نقش‌های بالقوه‌ای در اغلب فرآیندهای تکوینی، از جوانه‌زنی دانه تا بلوغ دارند. همچنین، ارتباط مستقیمی بین میکروRNAها و پاسخ به تنش‌های محیطی نیز شناخته شده است (Sunkar and Zhu, 2004؛ Allen *et al.*, 2005).

گیاهان موجوداتی بی‌حرکت هستند بنابراین، باید بر شرایط نامساعد محیطی غلبه کنند. آنها سازوکارهای پیچیده‌ای را برای سازش به تنش‌های محیطی به کار می‌گیرند (Yang *et al.*, 2007). پیش‌بینی شده است

درون پلیت‌های استریل با قطر ۱۰ سانتی‌متر کشت داده شدند. محیط کشت استفاده شده در این مطالعه شامل نمک‌های MS با آگار ۱/۲ درصد بود. برای بررسی تأثیر متقابل فسفات و miRNA399 از چهار تیمار متفاوت شامل P+S+ (۱/۲ میلی‌مولار فسفات و ۱ درصد سوکروز)، P+S- (۱/۲ میلی‌مولار فسفات و فاقد سوکروز)، P+S+ (۱۰ میکرومولار فسفات و ۱ درصد سوکروز) و P-S- (۱۰ میکرومولار فسفات و فاقد سوکروز) استفاده شد. در محیط‌های فاقد فسفات برای تأمین پتاسیم از  $K_2SO_4$  ۰/۶ میلی‌مولار استفاده شد. به منظور تسریع و یکنواختی در جوانه‌زنی بذرها، پلیت‌های کشت شده به مدت دو روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد و در پایان، به اتاقک کشت با دمای ۲۴ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی ۱۶ ساعت نور منتقل شدند.

#### روش سنجش کلروفیل: کلروفیل از بخش هوایی

گیاهان ۹ روزه رشد یافته در محیط‌های کشت با استون ۸۰ درصد استخراج شد، سپس میزان کلروفیل‌های a، b و کل از روش Arnon (۱۹۴۹) اندازه‌گیری شد.

#### روش سنجش آنتوسیانین: آنتوسیانین با استفاده از

کلریدریک اسید ۱ درصد در متانول از بخش‌های هوایی گیاهان ۹ روزه رشد یافته استخراج شد و میزان آن از روش Mita و همکاران (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. **آنالیز نشاسته:** برای سنجش نشاسته، نشاهای ۹ روزه به مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۹۶ درصد غوطه‌ور شد تا رنگدانه‌های آنها از بین برود و گیاهان کاملاً سفید شوند. سپس گیاهان فاقد رنگدانه به مدت ۳۰ دقیقه در محلول یک درصد ید قرار گرفت. پس از اتمام این مدت زمان، گیاهان از محلول ید خارج شده و پس از

را تنظیم و در نهایت، تعادل فسفات گیاهان را حفظ می‌کند (Lin et al., 2008).

سوکروز نیز به عنوان مولکول پیام‌رسان سیستمیک از بخش هوایی به ریشه منتقل شده، از طریق آوند آبکش برای تنظیم پاسخ‌های مختلف در ریشه انتقال می‌یابد که از جمله این پاسخ‌ها می‌توان به افزایش جذب فسفات و تغییر معماری ریشه اشاره کرد (Liu and Vance, 2010).

بررسی‌ها نشان داده است گیاهان جهش یافته‌ای که به کمبود فسفات بسیار حساس هستند (*hps1*) فوتیپ مشابه با گیاهان تراریخته‌ای دارند که در آنها ژن ترانسپورتر سوکروز (*SUC2*) به شدت بیان شده است. مشاهده شده که در این گیاهان میزان miRNA399 افزایش قابل توجهی داشته است (Lei et al., 2011) که این امر اثبات‌کننده وجود یک ارتباط منطقی بین سوکروز و miRNA399 در شرایط کمبود فسفات است. هدف از تحقیق حاضر، بررسی نقش همزمان سوکروز و miRNA399 بر پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه آرابیدوپسیس به ویژه در جذب فسفات است.

## مواد و روش‌ها

### کشت و تیمار گیاهان: در بررسی حاضر، از بذر

گیاهان آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) رقم Columbia از دو نوع خودرو و تراریخته (OXmiR399) با بیان بالای miR399 استفاده شد. بذره‌های تراریخته از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی تایوان تهیه شد. سطح بذرها توسط هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (v/v) ضدعفونی شد، سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو و در پایان

گیاهان نوع خودرو شد. حذف سوکروز در محیط‌های حاوی فسفات کافی نیز تأثیر متفاوتی بر دو نوع گیاهی داشت به طوری که در گیاهان تراریخت طول ریشه اولیه و انشعابات آن در محیط‌های فاقد سوکروز و دارای فسفات کافی (S-P+) نسبت به گیاهان نوع خودرو به شدت کاهش یافت (شکل‌های ۱ و ۲). تا زمانی که در محیط کشت گیاه (خودرو و تراریخته) سوکروز وجود داشته باشد، تراکم ریشه‌های جانبی در گیاهان تحت کمبود فسفات به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، اما تفاوت قابل ملاحظه‌ای میان گیاهان نوع خودرو و تراریخته مشاهده نشد (شکل ۳).

از دیگر مشخصات پاسخ گیاهان به کمبود فسفات تجمع آنتوسیانین و نشاسته در بافت‌های گیاه است. در این مطالعه مشاهده شد میزان آنتوسیانین گیاهانی که در شرایط کمبود فسفات به ویژه در محیط کشت S-P+ رشد یافته‌اند به طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل ۴). این تغییرات هم در گیاهان تراریخته و هم گیاهان نوع خودرو مشاهده شد. کمترین میزان تجمع آنتوسیانین در گیاهان نوع خودرو در محیط‌های فاقد سوکروز صرف نظر از غلظت فسفات محیط کشت مشاهده شد (شکل ۴). در حالی که بیان بالای miR399 موجب افزایش معنی‌دار آنتوسیانین در مقایسه با محیط‌های دارای سوکروز می‌شود (شکل ۴).

همچنین در این مطالعه مشاهده شده که نشاسته نیز در شرایط کمبود فسفات و به ویژه در حضور سوکروز (S+P-) تجمع بیشتری را در بخش هوایی نشاهای آراییدوپسیس داشته است (شکل ۵) اما تفاوت معنی‌داری بین دو گروه گیاهان خودرو و تراریخته آراییدوپسیس مشاهده نشد (شکل ۵).

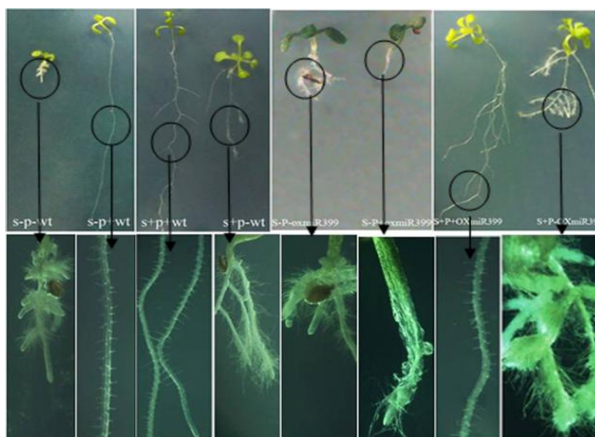
شستشو با آب مقطر برای نگهداری به اتانول ۹۶ درصد منتقل شدند. در پایان، تجمع نشاسته در گیاه به وسیله استریومیکروسکوپ بررسی شد (Lei et al., 2011).

### سنجش فسفات آزاد در بخش هوایی و ریشه:

فسفات آزاد با روش Ames (۱۹۶۶) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، بافت ریشه و بخش هوایی با کمک نیتروژن مایع پودر شد. سپس، ۵۰ میلی‌گرم پودر در دو برابر حجم، از محلول ۵۰ میلی‌مولار سدیم استات با اسیدیتته ۵/۶ همگن شد. پس از سانتریفیوژ (میکروسانتریفیوژ، مدل ۵۷۰۲، اپندروف، آمریکا) به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه ۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با آب مقطر به حجم ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس، به آن ۷۰۰ میکرولیتر از مخلوط متشکل از یک حجم محلول ۱۰ درصد آسکوربیک اسید و ۶ حجم از محلول ۰/۴۲ درصد آمونیوم مولیبدات تهیه شده در سولفوریک اسید یک نرمال افزوده شد. پس از ۲۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد در طول موج ۸۲۰ نانومتر خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد مقدار فسفات آزاد در نمونه محاسبه شد.

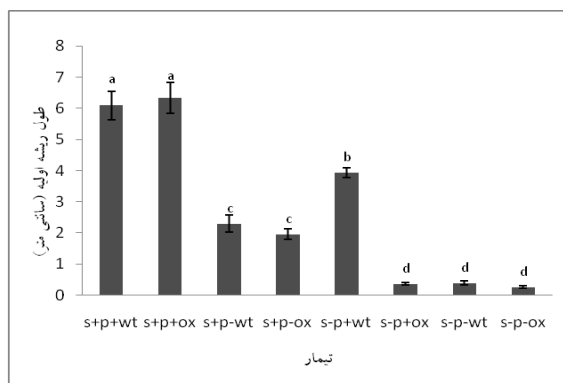
### نتایج

نتایج نشان داد که در دسترس بودن هر دو عامل فسفات و کربن برای رشد و مورفولوژی طبیعی ریشه‌های آراییدوپسیس ضروری است. حذف فسفات از محیط رشد گیاه باعث مهار رشد ریشه اولیه در هر دو نوع خودرو و تراریخته آراییدوپسیس شد. در این شرایط، بیان بالای miR399 در گیاهان تراریخته موجب افزایش تعداد انشعابات درجه ۲ و ۳ نسبت به

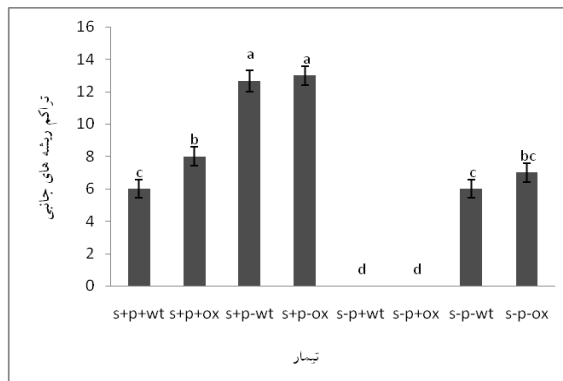


شکل ۱- مورفولوژی گیاهان آرابیدوپسیس نوع خودرو (wt) و تراریخته (oxmiR399) در محیط‌های کشت در حضور یا عدم حضور سوکروز و فسفات. معماری ریشه تحت تأثیر فسفات، سوکروز و بیان miR399 متفاوت است.

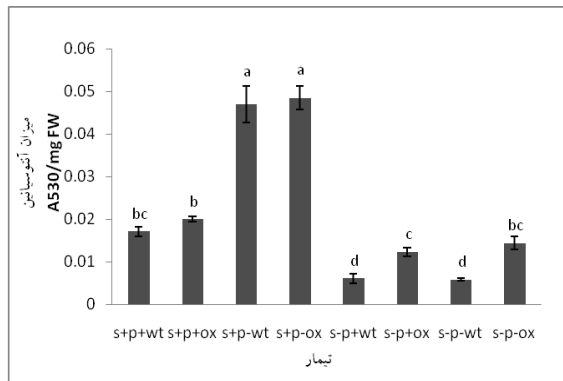
شکل ۲- تغییرات ایجاد شده در طول ریشه‌های اولیه در گیاهان ۹ روزه نوع خودرو (wt) و تراریخته (oxmiR399) آرابیدوپسیس که تحت تیمارهای متفاوت شامل حضور یا عدم حضور سوکروز و فسفات در محیط کشت و بر محیط‌های جامد رشد یافتند (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار). حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن میانگین‌ها ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۳- تغییر در تعداد انشعابات ریشه‌های جانبی در گیاهان ۹ روزه نوع خودرو (wt) و تراریخته (oxmiR399) آرابیدوپسیس که تحت تیمارهای متفاوت؛ شامل حضور یا عدم حضور سوکروز و فسفات در محیط کشت و بر محیط‌های جامد رشد یافتند (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار). حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن میانگین‌ها ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۴- تجمع آنتوسیانین در گیاهان ۹ روزه نوع خودرو (wt) و تراریخته (oxmiR399) آرابیدوپسیس رشد یافته بر محیط‌های جامد و تحت تیمارهای مختلف (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار). حروف غیر مشترک بیانگر معنی دار بودن میانگین‌ها ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون دانکن است.





شکل ۵- تجمع نشاسته در نشاهای آراییدوپسیس. ردیف نخست مربوط به گیاهان نوع خودرو (wt) و ردیف دوم مربوط به گیاهان تراریخته (oxmiR399) است. نشاسته با ید به رنگ قهوه‌ای قابل مشاهده است.

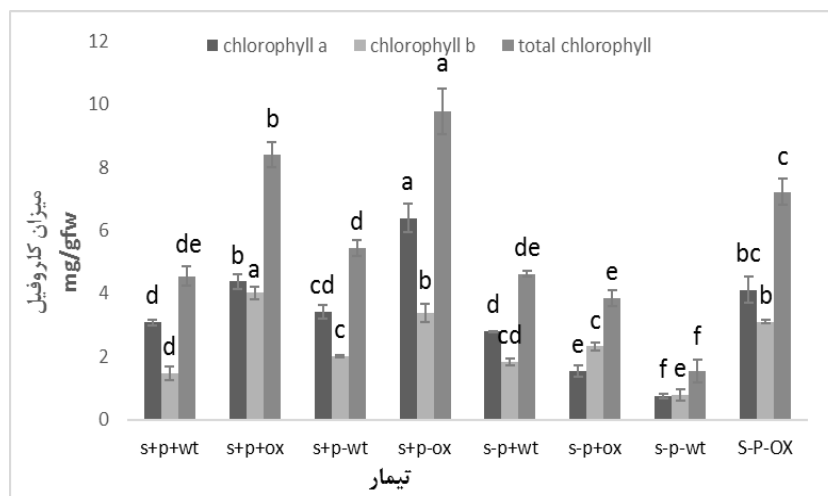
پاسخ گیاهان تراریخته در عدم حضور سوکروز و کمبود فسفات، افزایش میزان هر دو نوع کلروفیل بود (شکل ۶).

**میزان فسفر آزاد در گیاه:** در گیاهان نوع خودرو بیشترین میزان فسفر آزاد گیاه در تیمار S-P+ مشاهده شد. در همین شرایط، گیاهان تراریخته نیز بیشترین میزان فسفر آزاد را نسبت به سایر تیمارها داشتند. از طرفی، مطالعات نشان داد که بیان بالای miR399 در گیاهان تراریخته موجب افزایش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) فسفر آزاد گیاه نسبت به گیاهان نوع خودرو در تمام تیمارها شد (شکل ۷). از سوی دیگر، حذف سوکروز از محیط کشت موجب افزایش معنی‌دار فسفر آزاد گیاه در هر دو گیاهان نوع خودرو و تراریخته شد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۷).

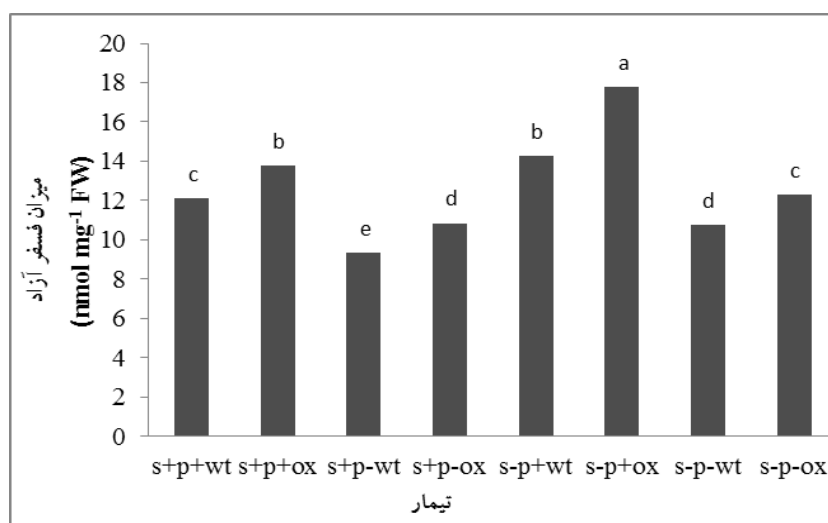
#### تغییر در میزان کلروفیل: نتایج بررسی حاضر نشان

داد که گیاهان آراییدوپسیس نوع خودرو و تراریخته در حضور سوکروز در محیط حاوی سوکروز پاسخ‌های متفاوتی نشان دادند به طوری که میزان کلروفیل در گیاهان تراریخته نسبت به نوع اصلی بسیار بالاتر بود. به هر حال، در گیاهان نوع خودرو میزان کلروفیل‌های a و b در پاسخ به کمبود فسفات روند افزایشی را نشان دادند اما در شرایط فقدان سوکروز میزان کلروفیل‌های a و b در پاسخ به کمبود فسفات کاهش یافت.

در گیاهان تراریخته این روند به گونه‌ای بود که کلروفیل a بیشترین مقدار را در تیمار S+P- و کلروفیل b در تیمار S+P+ داشت. به عبارتی، میزان کلروفیل a در حضور سوکروز در پاسخ به کمبود فسفات افزایش یافت، در حالی که میزان کلروفیل b کاهش یافت و



شکل ۶- تغییرات میزان کلروفیل‌های a، b و کلروفیل کل در گیاهان ۹ روزه نوع خودرو (wt) و تراریخته (oxmiR399) آرابیدوپسیس رشد یافته بر روی محیط‌های جامد و تحت تیمارهای مختلف (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار). حروف غیر مشترک بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۷- تغییرات میزان جذب فسفر در گیاهان ۹ روزه نوع خودرو (wt) و جهش یافته (oxmiR399) آرابیدوپسیس رشد یافته روی محیط‌های جامد و تحت تیمارهای مختلف (میانگین سه تکرار + انحراف معیار) حروف غیر مشترک بیانگر معنی‌دار بودن ( $P < 0.01$ ) بر اساس آزمون دانکن است.

(López-Bucio *et al.*, 2003). نخستین رویداد قابل

مشاهده در کمبود فسفات کاهش طول ریشه اولیه است که به سرعت پس از انتقال به محیط دارای فسفات کم اتفاق می‌افتد و به دنبال آن کاهش تقسیم سلولی رخ می‌دهد که توسط نشانگرهای چرخه سلولی نظیر

## بحث

**معماری ریشه:** تغییر نسبت رشد ریشه به بخش هوایی یکی از پاسخ‌های سازشی گیاهان به تغییرات ایجاد شده در میزان دسترسی آنها به مواد مغذی مورد نیاز خود در محیط اطرافشان است (Ericsson, 1995)؛

ریشه جانبی در نشاهای رشد یافته در محیط‌های S-P+ و S-P- کاملاً مشهود است (شکل ۱) که این امر را می‌توان به استفاده فسفات سلولی برای فسفریلاسیون قندها در شرایط نبود سوکروز نسبت داد (نشاهای رشد یافته در (S-P-)) (Sadka *et al.*, 1994). همچنین، شواهد تجربی نشان داده است که سوکروز ممکن است به منظور افزایش حساسیت گیاه به اکسین، به عنوان یک میانجی مهم در تکوین ریشه‌های جانبی عمل کند (Casimiro *et al.*, 2001).

PHR1 یک عامل رونویسی متعلق به خانواده MYB است (Rubio *et al.*, 2001) که به محل اتصال PHR در پروموتور اغلب ژن‌هایی که در شرایط کمبود فسفات تحت تأثیر قرار می‌گیرند، متصل می‌شود (Bustos *et al.*, 2010). به نظر می‌رسد ژن miR399 تا حدودی توسط عامل رونویسی PHR1 تنظیم می‌شود به طوری که در پروموتور ژن miR399 محل‌های اتصال مشخصی برای PHR1 وجود دارد و همچنین رونوشت‌های اولیه miR399 در گیاهان جهش یافته *phr1* (گیاهانی که ژن PHR1 در آنها بیان نمی‌شوند) به صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (Bari *et al.*, 2006).

با وجود نقش محوری PHR1 در تنظیم بیان ژن‌های متعدد مربوط به کمبود فسفات، جهش یافته‌های *phr1* به غیر از کاهش اندکی در نسبت ریشه به ساقه و القای ریشه‌های موین، هیچ نقص عمده‌ای در تکوین ریشه نشان نمی‌دهد (Rubio *et al.*, 2001). بنابراین می‌توان گفت که افزایش بیان ژن miR399 بر تغییرات معماری ریشه که در پاسخ به فقر فسفات ایجاد می‌شود تأثیری ندارد.

سیکلین B گزارش شده است (Sanchez-Calderon *et al.*, 2005) پیشنهاد شده است که فعالیت مریستم رأسی ریشه (RAM) شدت پاسخ به کمبود فسفات را تعیین می‌کند. افزایش فعالیت RAM در نتیجه به کار بردن سوکروز خارجی، پاسخ‌های گیاه به کمبود فسفات را افزایش می‌دهد (Lai *et al.*, 2007). تأثیر محتوای فسفات بخش هوایی در پاسخ رشد ریشه اولیه بررسی شده است (Williamson *et al.*, 2001). کاهش میزان رشد ریشه اولیه در شرایط کمبود فسفات در ابتدا به عنوان یک آسیب تغذیه‌ای به نظر می‌رسد؛ اما برخی از مطالعات اخیر نشان داده است که در حقیقت تغییرات ایجاد شده یک پاسخ سلولی فعال است که با کمبود فسفات القا می‌شود و نتیجه آن برنامه‌ریزی مجدد سلول از یک رشد نامحدود به یک رشد محدود است. این برنامه محدود شدن رشد القا شده توسط کمبود فسفات، با کاهش طویل شدن سلولی آغاز می‌شود و به دنبال آن، از دست دادن تدریجی سلول‌های مریستمی اتفاق می‌افتد. در مرحله آخر، تکثیر سلولی متوقف و تمایز سلولی در محل طویل شدن سلولی مناطق مریستمی ریشه اولیه طولانی‌تر می‌شود. این از کار افتادگی مریستم نه تنها در ریشه‌های اولیه بلکه در ریشه‌های جانبی نیز رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد که از کار افتادن مریستم ریشه اولیه، مریستم ثانویه را فعال می‌کند، سپس از کار افتادگی مریستم ثانویه، مریستم سوم را فعال می‌کند و به همین ترتیب، ادامه می‌یابد و در نتیجه خوشه‌هایی از ریشه‌های جانبی در آراییدوپسیس ناشی از کمبود فسفات ایجاد می‌شود (Sanchez-Calderon *et al.*, 2005).

در مطالعه انجام شده اثر فقدان سوکروز در تشکیل



شرایط کمبود فسفات، ممکن است میزان فتوسنتز و تخصیص محصولات حاصل از فتوسنتز در گیاهان دچار تغییر شوند (Duff *et al.*, 1989). بنابراین، کاهش بیان ژن‌های مربوط به مسیر احیای کربن و آنزیم‌های تثبیت کننده نترات انرژی بیشتری را در شرایط کمبود فسفات برای سلول حفظ می‌کند (Wu *et al.*, 2003).

#### افزایش بیان miR399 و تجمع بیش از حد

**فسفات:** بر اساس مطالعات انجام شده، در اغلب موارد زمانی که گیاهان تحت شرایط کمبود فسفات قرار می‌گیرند میزان تجمع فسفات در بخش‌های هوایی آنها کاهش می‌یابد (Jacob and Lawlor, 1991) که نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نیز در همین راستاست، میزان فسفات چه در آرابیدوپسیس نوع خودرو و چه در تراریخته‌ها صرف نظر از وضعیت سوکروز، در شرایط کمبود فسفات روندی کاهش را نشان داده است. علاوه بر این، آنالیزهای مربوط به این پژوهش نشان داد که محتوای فسفات محلول در نشاهای آرابیدوپسیس رشد یافته در تیمار S-P- نسبت به نشاهای رشد یافته در تیمار S+P- به طور معنی‌داری بیشتر است، این امر می‌تواند به استفاده کمتر نشاهای رشد یافته در تیمار S-P- (فاقد سوکروز) از فسفات سلولی در جهت فسفریلاسیون قندها منسوب باشد (Sadka *et al.*, 1994). همچنین، در پژوهش حاضر بیشترین مقدار جذب فسفات هم در نوع خودرو هم جهش یافته در گیاهان تحت تیمار S-P+ مشاهده شد که به نظر می‌رسد به علت وجود فسفات کافی در محیط است، همچنین فقدان سوکروز باعث کاهش مصرف فسفات سلولی در جهت فسفریلاسیون قندها می‌شود. از طرفی، در هر چهار تیمار: S+P+، S+P-، S-P+ و S-P-، میزان تجمع فسفات در گیاهان

#### آنتوسیانین، نشاسته و کلروفیل: آنتوسیانین‌ها

گروهی از رنگدانه‌های فلاونوئیدی با رنگ‌های قرمز-ارغوانی هستند می‌توانند نور ماورای بنفش را جذب کرده، نوکلئیک اسیدها و کلروپلاست‌ها را از آسیب‌های ناشی از کمبود فسفات محافظت کنند (Ticconi and Abel, 2004). در پژوهش حاضر مشاهده شد که نبود سوکروز در محیط کشت گیاهان تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر تجمع آنتوسیانین دارد که این نتیجه با نتایج قبلی به دست آمده (Liu *et al.*, 2005؛ Karthikeyan *et al.*, 2007) همچنین تنظیمات ژن‌های کد کننده آنزیم‌های بیوسنتز کننده آنتوسیانین هماهنگ است (Solfanelli *et al.*, 2006).

گیاهانی که تحت شرایط کمبود فسفات قرار می‌گیرند نشاسته و سایر متابولیت‌های ثانویه را که به بازیافت فسفات معدنی از پیش سازهای فسفریله شده کمک می‌نمایند در درون اندامک‌های خود انباشته می‌کنند (Ticconi and Abel, 2004). تجمع نشاسته توسط سلول‌های گیاه در شرایط کمبود فسفات تا حدود زیادی ممکن است به علت آزاد شدن آنزیم Gluc-ADP پیروفسفریلاز از مهار آلوستریکن خود توسط فسفات معدنی باشد که به دلیل کاهش زیاد (تا ۵۰ برابر) در ذخایر فسفات سیتوپلاسمی به هنگام فقدان طولانی مدت فسفات اتفاق می‌افتد (Duff *et al.*, 1989؛ Vance *et al.*, 2003). در مجموع، بیان ۲۹ ژن درگیر در فتوسیستم I (PSI)، فتوسیستم II (PSII)، چرخه کالوین و پروتئین‌های متصل شونده به کلروفیل‌های a و b پس از ۴۸ ساعت از زمان انتقال گیاهان به شرایط کمبود فسفات در برگ‌ها حدود دو تا هفت برابر سرکوب می‌شوند. گزارش شده است که در

### سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک با شماره قرارداد ۹۱/۱۰۲۴۰ انجام شد. نگارندگان از این معاونت تشکر و قدردانی می‌نمایند.

آراییدوپسیس تراریخته نسبت به گیاهان آراییدوپسیس نوع خودرو افزایش معنی‌داری نشان داد که این امر مؤید نقش miR399 در افزایش جذب فسفات تحت شرایط کمبود فسفات است. این مشاهدات با نتایج به دست آمده در مطالعات پیشین نیز مطابقت دارد (Bari et al., 2006؛ Chiou et al., 2006).

### منابع

- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. and Mand Carrington, J. C. (2005) MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221.
- Ames, B. N. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in Enzymology* 8: 115-118.
- Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- Bari, R., Pant, B. D., Stütt, M. and Scheible, W. R. (2006) PHO<sub>2</sub>, microRNA399 and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology* 141: 988-999.
- Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116: 281-297.
- Bustos, R., Castrillo, G., Linhares, F., Puga, M. I., Rubio, V., Pérez-Pérez, J., Solano, R. and Leyva, A. (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 6(9) e1001102.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G. and Casero, P. J. (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* 13: 843-852.
- Chiou, T. J., Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Chiang, S. F. and Su, C. L. (2006) Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 412-421.
- Duff, S. M. G., Moorhead, G. B., Lefebvre, D. D. and Plaxton, W. C. (1989) Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology* 90: 1275-1278.
- Ericsson, T. (1995) Growth and shoot: root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant and Soil* 168: 205-214.
- Fujii, H., Chiou, T. J., Lin, S. I., Aung, K. and Zhu, J. K. (2005) A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Current in Biology* 15: 2038-2043.
- Jacob, J. and Lawlor, D. W. (1991) Stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in phosphate deficient sunflower, maize and wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 42: 1003-1011.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. and Bartel, B. (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Review in Plant Biology* 57: 19-53.
- Karthikeyan, A. S., Varadarajan, D. K., Jain, A., Held, M. A., Carpita, N. C. and Raghothama K. G. (2007) Phosphate starvation responses are mediated by sugar signalling in *Arabidopsis*. *Planta* 225: 907-918.

- Kim, V. N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 376-385.
- Kuo, H. F. and Chiou, T. J. (2011) The Role of MicroRNA in phosphorus deficiency signalling. *American Society of Plant Biologist* 156: 1016-1024.
- Lai, F., Thacker, J., Li, Y. and Doerner, P. (2007) Cell division activity determines the magnitude of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 50: 545-556.
- Lei, M., Liu, Y., Zhang, B., Zhao, Y., Wang, X., Zhou, Y., Raghothama, K. G. and Liu, D. (2011) Genetic and genomic evidence that sucrose is a global regulator of plant responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *American Society of Plant Biologists* 156: 1116-1130.
- Lin, S. I., Chiang, S. F., Lin, W. Y., Chen, J. W., Tseng, C. Y., Wu, P. C. and Chiou, T. J. (2008) Regulatory network of MicroRNA399 and PHO<sub>2</sub> by systemic signalling. *Plant Physiology* 147: 732-746.
- Liu, J. and Vance, C. P. (2010) Crucial roles of sucrose and microRNA399 in systemic signalling of P deficiency: A tale of two team players? *Plant Signalling and Behaviour* 5(12): 1-5.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. and Herrera-Estrella, L. (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6(3): 280-287.
- Lu, S., Sun, Y. H., Shi, R., Clark, C., Li, L. and Chiang, V. L. (2005) Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 2186-2203.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M. and Nakamura, K. (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *The Plant Journal* 11: 841-851.
- Raghothama, K. G. (1999) Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 665-693.
- Raghothama, K. G. (2000) Phosphate transport and signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 182-187.
- Rouached, H., Arpat, A. B. and Poirier, Y. (2010) Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. *Molecular Plant* 3(2): 288-299.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A. C., Iglesias, J., Leyva, A. and Paz-Ares, J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signalling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes and Development* 15: 2122-2133.
- Sadka, A. D., Wald, D. B., May, G. D., Park, W. D. and Mullet, J. E. (1994) Phosphate modulates transcription of soybean VspB and other sugar-inducible genes. *The Plant Cell* 6: 737-749.
- Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Cruz-Ramirez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J. and Herrera-Estrella, L. (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Physiology* 46: 174-184.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A. and Perata, P. (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 140: 637-646.
- Sunkar, R. and Zhu, J-K. (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 2001-2019.
- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J. K. (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science* 12(7): 301-309.

- Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J. K. (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by down regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell* 18: 2051-2065.
- Sunkar, R., Li, Y. F. and Jagadeeswaran, G. (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science* 17: 196-203.
- Ticconi, C. A. and Abel, S. (2004) Short on phosphate: plant surveillance and counter measures. *Trends in Plant Science* 9: 548-555.
- Tiessen, H. (2008) Phosphorus in the global environment. In: *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions* (Eds. White, P. J. and Hammond, J. P.) 1-7. Springer, New York.
- Vance, C. P., Uhde-Stone, C. and Allan, D. L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non renewable resource. *New Phytologist* 157: 427-447.
- Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669-687.
- Williamson, L. C., Ribrioux, S., Fitter, A. H. and Leyser, O. (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 875-882.
- Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F. and Wang Deng, X. (2003) Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology* 132: 1260-1271.
- Yang, T., Xue, L. and An, L. (2007) Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science* 172: 423-432.
- Yuan, H. and Liu, D. (2008) Signalling components involved in plant responses to phosphate starvation. *Plant Biology* 50: 849-859.
- Zhang, B. H., Pan, X. P., Wang, Q. L., Cobb, G. P. and Anderson, T. A. (2005) Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Research* 15: 336-360.

## The role of microRNA399 and sucrose in physiological responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis thaliana* plant

Majid Mahdiyeh \* and Farzaneh Mohammadsaleh

Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

### Abstract

microRNAs (miRNAs) are noncoding small RNAs that generally function as posttranscriptional negative regulators. The miRNAs play a direct role in plant responses to many types of environmental stresses. For example miR399 had a role in response to Pi deficiency. The aim of this study was to investigate the role of miR399 and sucrose in some physiological responses of *Arabidopsis thaliana* plants to phosphate deficiency. Therefore, miR399-overexpressing transgenic and wild type *Arabidopsis* plants were used. The plant seeds were cultured on the Suc+Pi+ (S+P+), Suc-Pi+ (S-P+), Suc+Pi- (S+P-) and Suc-Pi- (S-P-) media. Pi+ and Pi- refer to 1.2 mM and 10  $\mu$ M Pi, respectively and Suc+ or Suc- are media culture with 1% sucrose or without. The results showed that sucrose and miR399 had a dramatic effect on root architecture so that primary root length and its branches on S-P+ medium were significantly reduced in over expressed as compared with wild type plants. The highest anthocyanin and starch accumulation was achieved in S+P- media in both plant types. However, miR399 over expression was resulted in significant rise in anthocyanin accumulation on S-P- medium in transgenic relative to wild type plants. In addition, miR399 was resulted in significant rise in free phosphorous level in all types' media. compared to wild type. These results were probably due to the role of sucrose and miR399 in signalling pathway during phosphate starvation in *Arabidopsis* plant.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, Sucrose, Phosphate deficiency, MicroRNA