تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد چهاردهم، شماره سوم، پائیز ۱۴۰۰
۵۸۵-۵۹۴
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.3099.1795

مقاله پژوهشی

شناسایی میکرو RNAهای جدید در کلزا (*Brassica napus* L.) و نقشی که در سرکوب ژن‌های هدف به‌عهده دارند

مراد چشمه نور[۱،۲*]، محمدرضا بی‌همتا[۳]، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری[۳]، علیرضا عباسی[۴]، بهرام علیزاده[۵]

۱. محقق بخش تحقیقات دانه‌های روغنی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان
۲. دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، دانشگاه تهران
۳. استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران
۴. دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران
۵. دانشیار بخش تحقیقات دانه‌های روغنی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات ،آموزش و ترویج کشاورزی،کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۰۴

چکیده

میکرو RNAها یک گروه از RNAهای کوچک غیررمزکننده پروتئین می‌باشند که دارای تقریباً ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید طول دارند. این RNAهای کوچک در تغییرات پس از رونویسی در یوکاریوت‌ها نقش سرکوب‌کننده mRNA هدف را به‌عهده دارند. میکرو RNAها به‌طور مستقیم بر فرآیندهای مانند رشد و نمو، ریخت‌شناسی، زمان گلدهی، سوخت‌وساز، متابولیسم اسیدهای چرب، گلیکولیز و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهان تأثیرگذار هستند. شناسایی میکرو RNAها به روش داده‌های زیستی انجام گرفت. توالی‌های miRAN بالغ شناخته‌شده از شمار زیادی گونه جانوری و گیاهی از پایگاه داده miRBase دانلود گردید. از توالی‌های miRNA به‌عنوان توالی شناخته‌شده برای یافتن miRNAهای حفاظت‌شده بر پایه جستجوی همسانی بین miRNAها با GSSهای گیاه کلزا استفاده شد. ابتدا توالی‌های GSS در گیاه کلزا از بانک اطلاعاتی NCBI در برابر miRNAهای شناخته‌شده BLASTn شدند. برای شناسایی رونوشت‌ها و ژن‌های هدف از تشابه مکمل معکوس بین miRNA و رونوشت هدف استفاده شد. درنهایت پنج عدد miRNA بالغ جدید شناسایی گردید. ژن‌های مانند NST1، HST، WSD1، LUC7L3، UEL1D، LBD41، CIPK26 و CNOT11 که به چندین خانواده ژنی با عملکردهای بیولوژیکی مختلف تعلق داشتند، شناسایی شد. در این تحقیق از سرورها و نرم‌افزارهای مانند Mfold، miRBase، psRNATarget و GC content استفاده شد.

واژه‌های کلیدی: **توالی GSS، روش داده‌های زیستی، یوکاریوت، کلزا، mRNA هدف**

مقدمه

کلزا گیاهی آلوتتراپلوئید با ۱۹ جفت کروموزوم و از تیره Brassicaceae است (Navabpour and Haddad, 2010). کلزا سومین گیاه روغنی در جهان به‌حساب می‌آید (Tan et al., 2017).

میکرو RNAها گروهی از RNAهای کوچک غیررمزکننده پروتئین با طول تقریباً ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که در تغییرات پس از رونویسی در یوکاریوت‌ها نقش تنظیم‌کننده ژن‌های کد کننده پروتئین را به عهده دارند. میکرو RNAها توسط RNA پلیمراز II به‌صورت مولکول‌های پیش‌ساز تاخورده (Pre-miRNA) سنتز می‌شوند (Megha et al., 2018; Noori and Alvandi, 2006; Chi et al.2011). میکرو RNAها پس از تشکیل

* نگارنده پاسخگو: مراد چشمه نور. پست الکترونیک: cheshmehmorad@ut.ac.ir

به‌سوی پروتئین‌های خانواده آرگونات[1] (AGO) به‌منظور تشکیل مجموعه پروتئینی RISC[2] بارگیری می‌شوند (Megha et al., 2018)؛ به‌عبارت‌دیگر میکرو RNA بیان ژن را یا از طریق تجزیه رونوشت هدف یا با سرکوب ترجمه mRNA هدف، کنترل می‌کند (Megha et al., 2018; Akdogan et al., 2015). این فرایند به میزان مکمل بودن توالی میکرو RNA با توالی RNA هدف بستگی دارد، اگر این اتصال به‌طور کامل صورت گیرد، RNA هدف توسط مجموعه RISC بریده و تجزیه می‌شود، اگر این دو به شکل کامل با یکدیگر متصل نشوند، نتیجه آن، خاموش کردن ترجمه و مهار بیان پروتئین ژن هدف می‌باشد (Megha et al., 2018). از زمان کشف میکروRNA در گیاهان در سال ۲۰۰۲، نشان‌داده شده است که میکروRNAها بیان ژن را از طریق القاء فاکتورهای رونویسی در طی تنش‌های زنده و غیرزنده را تنظیم می‌نمایند (Megha et al., 2018).

میکرو RNAها نقش کلیدی در انواع فرآیندهای تکاملی مانند سیگنال‌دهی اکسین، تشکیل اندام‌ها، انتقال از فاز رویشی به مرحله گلدهی، تنظیم مریستم جنینی ریشه، توسعه برگ و شبکه ریشه‌ای گیاه و کنترل صفات زراعی مهم در گیاهان را ایفا می‌کنند (Megha et al., 2018؛ Li and Zhang, 2016). نقش میکرو RNAها در پاسخ به تنش‌های غیرزنده مانند تنش خشکی در گیاهانی مانند برنج، گوجه‌فرنگی، آرابیدوپسیس، *Medicago truncatula*، هلو، جو و گندم گزارش شده است (Akdogan et al., 2015). در برنج میزان بیان میکرو RNAهای مختلف در حضور آرسنیک و بدون آرسنیک گزارش شده است (Sharma et al., 2015). در پژوهشی نقش برخی از میکرو RNAها و سرکوب ژن‌های هدف مربوطه در پاسخ به تنش Boron در جو گزارش گردیده است (Ozhuner et al., 2013). در گیاه جو بیان انواع میکروRNAها و RNAهای کوچک دیگر در شرایط آبیاری و تنش خشکی بررسی شده است (Hackenberg et al., 2015). در پژوهشی به نقشی که میکروRNAهای مختلف در لاین‌های اینبرد و هیبرید ذرت در پاسخ به تنش خشکی و شوری دارند، اشاره شده است (Kong et al., 2010). نقش‌های نوظهور و جدید برای میکروRNAها در پاسخ به تنش خشکی در گیاهان مختلف گزارش شده است (Ding et al., 2013). در تحقیقی به نقش میکروRNA به‌عنوان یک ابزار اختصاصی در توسعه و تکامل گندم اشاره شده است (Jaiswal et al., 2019). هدف از این پژوهش شناسایی میکروRNAهای جدید و بررسی نقش آن‌ها در سرکوب ژن‌های هدف مرتبط به آن‌ها در کلزا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منابع جستجوی miRNA

تعداد ۳۸۵۸۹ توالی miRAN بالغ شناخته‌شده از شمار زیادی گونه جانوری، گیاهی از پایگاه داده miRBase به آدرس اینترنتی www.mirbase.org//:http دانلود شد. توالی‌های miRNA به‌عنوان توالی شناخته‌شده[3] برای یافتن miRNAهای حفاظت‌شده بر پایه جستجوی همسانی[4] بین miRNAها با ESTها[5] و GSSهای گیاه کلزا استفاده شد.

منابع ESTها و GSSها برای جستجوی همسانی بین آن‌ها با miRNAها در کلزا

درمجموع، ۶۵۳۶۴۸ EST و ۱۰۳۳۶۹ GSS برای گیاه کلزا از بانک اطلاعاتی NCBI به آدرس اینترنتی https://www.ncbi.nlm.nih.gov دانلود شد. توالی‌های بالغ miRNA گیاهی در الگوریتم BLASTn برای جستجوی همولوژی در برابر ESTها و GSSهای گیاه کلزا در سیستم‌عامل لینوکس آپلود شدند. تنظیم‌های BLASTn با در نظر گرفتن میزان مورد انتظار[6] ۰/۰۰۶ تنظیم گردید (Karimi et al., 2017). توالی‌های miRNA به‌عنوان توالی شناخته‌شده و توالی‌های EST و GSS به‌عنوان توالی‌های تردیدی[7] با یکدیگر برای جستجوی همسانی مقایسه شدند. سپس ESTها و GSSهای که با توالی‌های بالغ miRNA حداکثر تا چهار عدم جفت‌شدگی[8] داشتند به‌عنوان نامزد انتخاب شدند (Zhang, 2005).

BLASTx برای شناسایی miRNAهای غیر رمزکننده

1. Argonaute family proteins
2. RNA-induced silencing complex
1. Subject
2. Homology

3. Expressed sequence tags
4. E-value
5. Query
6. Mismatch

در این مرحله BLASTx انجام شد، با توجه به اینکه بین توالی‌های EST با توالی‌های miRNA همسانی وجود داشت اما به دلیل تعداد کم ESTها، توالی‌های miRNA غیر رمزکننده برای آن‌ها پیدا نشد. از طرفی چون miRNAها علاوه بر توالی‌های EST می‌توانند از توالی‌های GSS[9] به وجود آیند؛ بنابراین، بجای توالی‌های EST از توالی‌های GSS استفاده شد. در ادامه توالی‌های GSS رمزکننده حذف شدند و فقط توالی‌های غیررمزکننده GSS باقی ماندند (Altschul, 1997; Karimi et al., 2017).

تعیین ساختار ثانویه miRNAهای متمایز به‌وسیله نرم‌افزار Mfold

برای پیش‌بینی ساختار ثانویه miRNAهای نامزد از نرم‌افزار Mfold استفاده شد. این نرم‌افزار محاسباتی تحت وب در آدرس اینترنتی http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi قابل‌دسترس است (Zuker, 2003). خروجی‌های Mfold براساس شاخص کمترین انرژی آزاد فولدینگ (MFE)، تعداد بازوها در هر ساختار، شمار نوکلئوتیدهای (C, G, A و T)، اندازه و تقارن داخلی حلقه‌ها در بازوها، اندازه مارپیچ در بازوها، جایگاه ناحیه‌های جفت شده و درصد محتوای (A + T) و (G + C) انتخاب شدند. همچنین AMFE و MFEI به روش زیر محاسبه شدند (Vivek, 2018؛ Zhang et al., 2006).

AMFE=(MFE÷length of pre-miRNA sequence)×100

MFEI = [AMFE / (G+C)]% [۱]

که باید در آن شمار بازهای غیر همسان بین miRNAهای بالغ و پیش‌ساز حداکثر تا شش نوکلئوتید باشد. شاخص کمترین انرژی فولدینگ (MFEI) بالاتر از انواع دیگر RNAهای دیگر باشد. کمترین انرژی منفی فولدینگ (MFE) برای پیش‌ساز miRNA، باید از بقیه RNAها کمتر باشد. در توالی miRNA بالغ شکاف‌بزرگ وجود نداشته باشد و قسمت بالغ آن روی حلقه پیش‌ساز miRNA قرار گیرد. طول miRNA بالغ باید دامنه ۱۷تا ۲۴ باز باشد. محتوای بازهای A + U پیش‌ساز miRNA باید بین ۳۰ تا ۷۰ درصد باشد.

پیش‌بینی ژن هدف برای miRNAهای نامزد در کلزا

برای شناسایی رونوشت‌ها و ژن‌های هدف آن‌ها از تشابه مکمل معکوس بین miRNA و رونوشت هدف استفاده شد. با توجه به اینکه کلزا به خانواده براسیکاسه تعلق دارد، بنابراین، ژن‌های هدف miRNAهای جدید از بین گونه‌های مختلف خانواده براسیکاسه در وب‌سایت psRNATATget انتخاب گردیدند. میکرو RNAهای جدید شناسایی‌شده مانند ath-miR5021 و ath-miR8175 در آرابیدوپسیس، bol-miR9410 و bol-miR9411 در کلم وحشی و cas-miR11592 در گیاه *Camelina sativa* از وب‌سایت psRNATATget به آدرس اینترنتی https://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis انتخاب شدند. برای پی بردن به عملکرد ژن‌های هدف منتخب، روی میکرو RNAهای جدید با توجه به پارامترهای در نظر گرفته‌شده، شامل: بیشترین ارزش مورد انتظار برابر ۵، تعداد جایگاه‌های مورد هدف برابر با ۲، محدوده نداشتن تشابه بازهای مرکزی بین ۱۱-۱۰ نوکلئوتید، بیشترین عدم تشابه برابر ۲ و بدون هیچ‌گونه فاصله، BLASTn انجام شد (Karimi et al., 2017; Dai and Zhao, 2011).

نتایج و بحث

شناسایی miRNAهای نامزد در کلزا

برای شناسایی miRNAهای جدید روش‌های مانند microarray، توالی یابی کتابخانه‌ای RNAهای کوچک و روش بیوانفورماتیک وجود دارد که در این تحقیق از روش محاسبات بیوانفورماتیک به دلیل کم‌هزینه و آسان بودن استفاده شد (جدول۱). مطالعات نشان می‌دهد که اغلب miRNAهای بالغ شناخته‌شده به‌صورت تکاملی در گونه‌های مختلف گیاهی حفاظت‌شده می‌باشند (Zhang et al., 2006). پس از انجام BLASTn بین توالی‌های GSS در گیاه کلزا و miRNAهای به‌دست‌آمده از سایت miRBase، 93 توالی همسان به دست آمد. با توجه به اینکه جستجوی BLAST با E-value پایین‌تر می‌تواند ناحیه همانندی قابل‌اطمینان‌تری را میان GSS ها و miRNAهای بالغ به وجود آورد، درنتیجه، توالی‌های با صد درصد همسانی و کمترین میزان عدم تشابه به دست آمد. پس از انجام BLASTx به‌منظور حذف توالی‌های رمزکننده پروتئین و

[1] Genome survey sequence

باقی ماندن توالی‌های غیر رمز کننده پروتئین، درمجموع تعداد یک‌صد و هفتاد و دو miRNA غیررمزکننده گیاهی، جانوری، قارچی و ویروسی شناسایی شد، از بین این مجموعه تعداد پنجاه و هفت عدد از آن‌ها توالی‌های miRNA بالغی بودند که به گیاهان تعلق داشتند. چون هدف بررسی توالی‌های miRNA بالغ متعلق به خانواده براسیکا بود؛ بنابراین، از بین آن‌ها فقط سی‌ویک توالیmiRNA بالغ که به خانواده براسیکا تعلق داشت، انتخاب و سایر توالی‌های گیاهی حذف شدند. با بررسی منابع و مقالات علمی در این زمینه مشخص شد که از بین این تعداد miRNA بالغ فقط پنج عدد از آن‌ها، miRNA های بالغ جدیدی بودند که قبلاً در کلزا شناسایی نشده بودند و در این مطالعه به کمک محاسبات بیوانفورماتیک شناسایی شدند. توالی‌های GSS به وجود آورنده miRNAهای بالغ غیررمزکننده پروتئین برای تعیین ساختار ثانویه به سرور Mfold منتقل شدند، نتایج به‌دست‌آمده از Mfold به‌صورت دستی برای تعیین توالی پیش‌ساز miRNA و ساختار ساقه - حلقه مناسب با استفاده از معیارهای موردنظر بررسی شد. کمترین انرژی آزاد فولدینگ (MFE) که یک شاخص مهم برای تعیین ساختار ثانویه اسیدهای نوکلئیک مانند RNA و DNA است محاسبه گردید، MFE پایین‌تر ازنظر ترمودینامیکی برای ساختار ثانویه توالی‌های RNA یا DNA مربوطه پایدارتر است. توالی پیش‌ساز miRNA به‌طور معنی‌داری ارزش MFEI بالاتری نسبت به RNAهای غیررمزکننده پروتئین مانند tRNA و rRNA یا RNAهای رمزکننده پروتئین دارند (Bonnet et al., 2004).

جدول۱. میکروRNAهای جدید بر اساس توالی‌های GSS در گیاه کلزا

Table 1. New miRNAs based on GSS sequences in *Brassica napus*

miRNA	نوع میکروRNA	Accession اکسشن	Identity (%) یکسانی	L-miRNA (nt)	mismatch عدم تطابق	Gap
miR5021	**میکروRNA ۵۰۲۱**	DU105547	100	18	0	0
miR11592	**میکروRNA ۱۱۵۹۲**	DU099375	100	19	0	0
miR8175	**میکروRNA ۸۱۷۵**	DU099594	100	18	0	0
miR9410	**میکروRNA ۹۴۱۰**	DU103199	100	19	0	0
miR9411	**میکروRNA ۹۴۱۱**	DU107859	95.45	22	0	0

جدول ۱. ادامه

Table 1. Continued

start-miRNA(nt) ابتدا	End-miRNA(nt) انتهای	Start-GSS Seq	End-GSS Seq	E-value	bite score
1	18	367	384	8×10^{-4}	36
1	19	745	763	2×10^{-4}	38
3	20	547	564	8×10^{-4}	36
2	20	143	161	3×10^{-4}	38
1	22	175	199	1×10^{-4}	36

برای جلوگیری از پیش‌بینی نادرست miRNAها از دیگر RNAهای کوچک از MFEI که به‌عنوان یک شاخص بسیار مناسب و مطلوب برای شناسایی miRNAها از دیگر RNAهای کوچک به‌حساب می‌آید، استفاده شد. شاخص MFEI به روش ویوک محاسبه شد (Vivek, 2018). به‌عنوان‌مثال طول miR5021پیش‌ساز حدود ۱۷۱ نوکلئوتید و شاخص MFEI برای آن حدود ۷۷/۳۳- به دست آمد (جدول۲). همچنین نوع و میزان درصد بازهای آلی تشکیل‌دهنده هر یک از میکروRNAهای پیش‌ساز مشخص گردید، به‌عنوان نمونه، برای میکرو RNA پیش‌ساز با کد miR11592 مقدار T/U برابر ۳۰ درصد است (جدول ۳).

پیش‌بینی ژن‌های هدف برای میکرو RNAهای جدید

miR5021: برای خانواده miR5021 چندین ژن هدف شناسایی شد که از بین آن‌ها دو ژن هدف NST1 و CNOT11 با کارکردهای متفاوت انتخاب شدند (جدول۴). ژن هدف NST1 نوعی پروتئین بنام Stress response protein NST1 کد می‌کند، این ژن در تنظیم ضخامت

دیواره ثانویه در گیاهان و جلوگیری از انهدام آن در مقابل انواع تنش‌ها نقش دارد (Mitsuda et al., 2005). ژن هدف CNOT11 نوعی مجتمع پروتئینی بزرگ بنام CCR4-NOT transcription complex subunit 11 را کد می‌کند، این مجتمع پروتئینی بزرگ معمولاً به‌عنوان عملگر و تنظیم‌کننده سطوح بیان پروتئین را در سلول کنترل می‌کند. این مجموعه بزرگ پروتئینی در تنظیم خیلی از مراحل متابولیسم mRNA از ساخت تا تجزیه مشارکت فعال دارد، محل تولید آن در هسته و سیتوپلاسم سلول است. بیشترین اطلاعات ما برای این مجتمع از مطالعه مخمر، دروزوفیلا و انسان به‌دست‌آمده است (Ukleja et al., 2016).

miR8175: ژن CIPK26 به‌عنوان ژن هدف برای خانواده miR8175 انتخاب گردید (جدول۴). این ژن نوعی پروتئین بنام CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 26 کد می‌کند که در انتقال سیگنال خاص در سلول، تنظیم پیشرفت چرخه سلول و رونویسی فرآیندهای فعال‌سازی سیگنال سلولی نقش ایفاء می‌کند Miranda et al., 2017).

جدول۲. ویژگی‌های miRNAهای جدید شناسایی‌شده در کلزا

Table 2. Characteristics of newly identified miRNA in Brassica napus

GSS ID شماره اکسشن در توالی GSS	Pre-miRNA میکروRNA پیش ساز	LS (5′ – 3′) طول توالی میکرو RNA از ۵′ به ۳′	LP	LM	(A+U) %	(G+C) %	MFE	AMFI
DU105547 اکسشن ۱۰۵۵۴۷	miR5021 میکروRNA ۵۰۲۱	UGAGAAGAAGAAGAAGAAAA	171	20	63.74	36.26	-47.6	-77.23
DU099375 اکسشن ۰۹۹۳۷۵	miR11592 میکرو NA ۱۱۵۹۲	GAACCGAACCGAACCGAAA	84	19	65.48	34.54	-16.6	-58.12
DU099594 اکسشن ۰۹۹۵۹۴	miR8175 میکروRNA ۸۱۷۵	GAUCCCCGGCAACGGCGCCA	189	20	49.74	50.26	-127.6	-135.02
DU103199 اکسشن ۱۰۳۱۹۹	miR9410 میکروRNA ۹۴۱۰	UACUUAAUUAUAAGUCGUCUGG	98	22	60.2	39.8	-45.4	-118.79
DU107859 اکسشن ۱۰۷۸۵۹	miR9411 میکروRNA ۹۴۱۱	UACUGGACGACUUACACGGAAG	94	22	62.77	37.23	-49.9	-143.49

MFE: کمترین انرژی آزاد فولدینگ برحسب کیلوکالری در مول؛ LP: طول میکروRNA پیش‌ساز؛ LM: طول میکروRNAهای بالغ؛ MFEI: شاخص کمترین انرژی آزاد فولدینگ؛ GSS ID: بررسی توالی‌های ژنومی؛ LS: طول توالی میکروRNA؛ % (A+U): مجموع دو باز آلی آدنین و اوراسیل به درصد؛ % (G+C): مجموع دو باز آلی گوانین و سیتوزین به درصد

MFEs: minimal folding free energies (kcal mol-1). LP: length of pre-miRNA. LM: length of mature miRNAs. MFEIs: minimal folding free energy indices. GSS ID: Genome Survey Sequences. LS: Length of miRNA Sequence

جدول ۳. نوع و درصد بازهای آلی موجود در miRNAهای جدید برای کلزا

Table 3. Type and Percentage of organic Bases in miRNAs Precursor for *Brassica napus*

GSS Accession	miRNA Precursor (میکرو RNAپیش‌ساز)	LP-miRNA Precursor طول miRNA پیش‌ساز	Type and Percentage of Organic Bases (نوع و درصد بازهای آلی) A	T/U	G	C	GC%	AU%
DU105547.1	**miR5021**	171	45	64	46	16	36.26	63.74
DU099375.1	**miR11592**	84	25	30	14	15	34.52	65.48
DU099594.1	**miR8175**	189	49	45	44	51	50.26	49.74
DU103199.1	**miR9410**	98	28	31	19	20	39.8	60.2
DU107859.1	**miR5021**	171	29	30	17	18	37.23	62.77

LP: طول میکروRNA پیش‌ساز؛ GSS: بررسی توالی‌های ژنومی

LP: length of miRNA precursor. GSS ID: Genome Survey Sequences.

miR9410: برای خانواده miR9410 دو ژن هدف HST و LBD41 به همراه عملکردهای آن‌ها موردبررسی و پژوهش قرار گرفت، این ژن‌های هدف در فرآیندهای زیستی ازجمله بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها و تنظیم رونویسی ژن نقش دارند (جدول۴). ژن HST یکی از ژن‌های هدفی است که آنزیمی بنام Shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase را در گیاهان کد می‌کند، این آنزیم در بیوسنتز فنیل‌پروپانوئید و کنترل تنش گرما در گیاهان مشارکت دارد، پروپانوئیدها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در طی مراحل نموی گیاه در پاسخ به شرایط تنش سنتز می‌شوند (Lukasik et al., 2013). ژن هدف LBD41 نوعی پروتئین بنام LOB domain-containing protein 41 را کد می‌کند که در تنظیم رونویسی ژن از رشته الگو DNA و در تنظیمات پس از ترجمه و رونویسی مشارکت و نقش دارد (Mohanpuria et al., 2018). *miR9411*: برای خانواده miR9411 ژن WSD1 انتخاب گردید (جدول۴). این ژن پروتئینی بنام O-acyltransferase WSD1 را کد می‌کند که در فرآیندهای مانند بیوسنتز گلیسرولیپید و بیوسنتز واکس کوتیکولی در گیاهان نقش دارد (Li et al., 2008).

miR11592: برای خانواده miR11592 دو ژن هدف به همراه عملکردهای آن‌ها موردبررسی قرار گرفت (جدول۴). ژن UEV1D پروتئین Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1D را کد می‌کند، این پروتئین در فرآیند چرخه سلولی و تمایز آن، تعمیر رشته DNA در هنگام اشتباه رونویسی و بقاء سلول‌ها بعد از آسیب رسیدن به DNA نقش دارد (Wen et al., 2008). ژن LUC7L3 یک نوع پروتئین بنام Luc7-like protein 3 را کد می‌نماید که به cAMP متصل می‌شود و به‌عنوان یک عنصر تنظیمی برای توالی DNA نقش ایفاء می‌کند و در پیرایش RNA، mRNA و پروسه تولید mRNA نیز مشارکت دارد (Shipman et al., 2006).

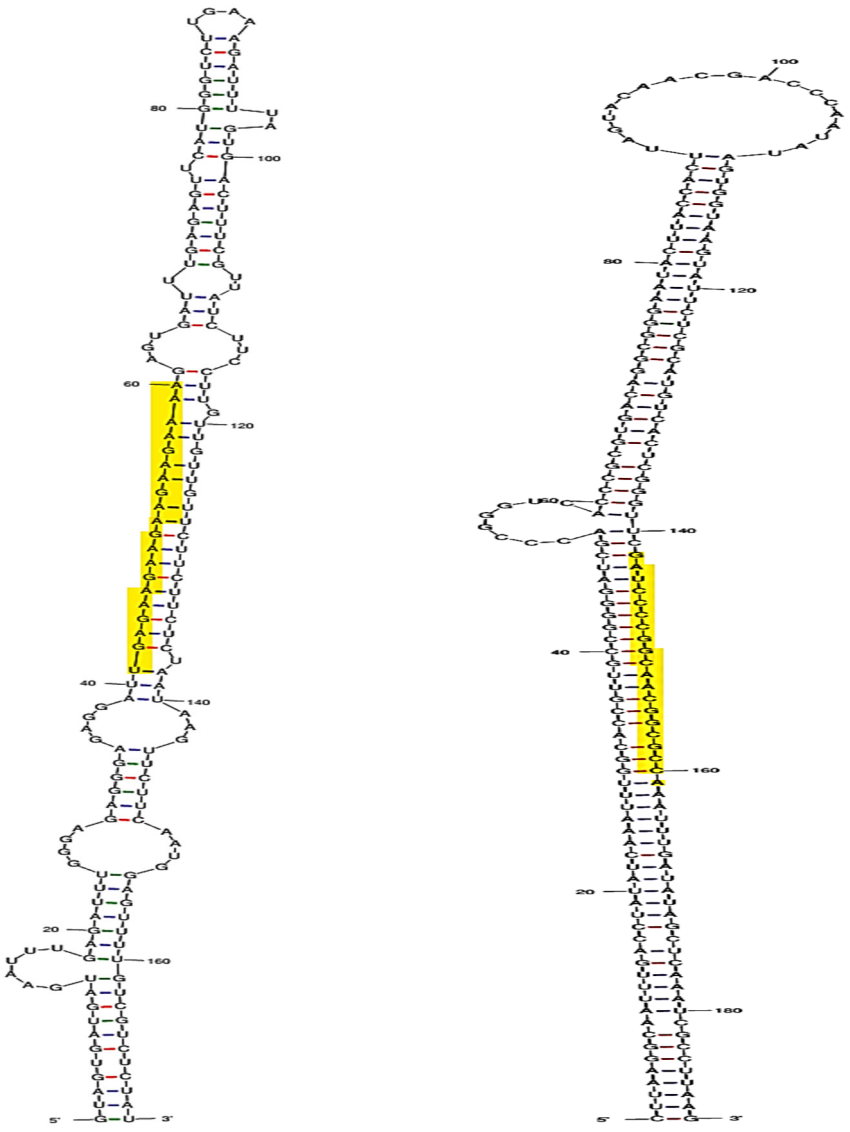
جدول ۴. هدف‌های ژنی پیش‌بینی‌شده برای miRNA های نامزد در کلزا

Table 4. Predicted gene targets for candidate miRNAs in Brassica napus

miRNA	Target protein (پروتئین هدف)	Biological function (عملکرد زیستی)	Target gene (ژن هدف)	Target accession (اکسشن هدف)
ath-miR5021	CCR4-NOT transcription complex subunit 11	Organize the protein-protein interactions platform, total scaffolding, the evolution of sexual organs in plants, RNA degradation and gene expression regulation.	CNOT11	BnaC09g39370D
	Stress response protein NST1	Adjustment of secondary wall thickness and prevent it's destruction against all kinds of living and non-living stresses in plants.	NST1	BnaA09g32160D
ath-miR8175	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 26	Specific signal transmission in cells, Regulating cell cycle progression and transcriptional activation processes of cellular signaling.	CIPK26	BnaC09g36730D
bol-miR9410	Shikimate O-Hydroxycinnamoyltransferase	Participate in the biosynthesis of phenylpropanoids.	HST	BnaC01g42010D
	LOB domain-containing protein 41	Regulation of gene transcription from DNA template strands, Contribute to post-translation and transcription settings.	LBD41	BnaC08g26570D
bol-miR9411	: O-acyltransferase (WSD1-like) family protein	In processes such as glycerol lipid biosynthesis and cuticular wax biosynthesis is involved.	WSD1	BnaA05g02390D
cas-miR11592	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1D	Cell cycle process and its differentiation, DNA repair when transcription errors, Cell survival after DNA damage.	UEV1D	BnaC08g23790D
	Luc7-like protein 3	Binds to cAMP and acts as a regulatory element for DNA sequencing, It is involved in RNA splicing, mRNA and mRNA production processes.	LUC7L3	BnaA10g08020D

ساختار ثانویه پیش‌ساز ساقه-حلقه برای پنج miRNA متمایز در کلزا

ساختار ثانویه پیش‌ساز ساختار ساقه-حلقه برای پنج خانواده میکروRNA متمایز در کلزا با استفاده از سرور Mfold ترسیم گردید. میکروRNAهای بالغ جدید در ساختار ثانویه پیش‌ساز (Pre-miRNA) قرار داشته و در شکل مشخص می‌باشند (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱. ساختارهای ثانویه ساقه-حلقه پیش‌ساز miRNAهای جدید شناسایی‌شده در کلزا، قسمت بالغ miRNA با رنگ زرد مشخص-شده است

Fig. 1. Secondary stem-loop precursor structures of new miRNAs identified in rapeseed, the mature part of miRNA highlighted in yellow

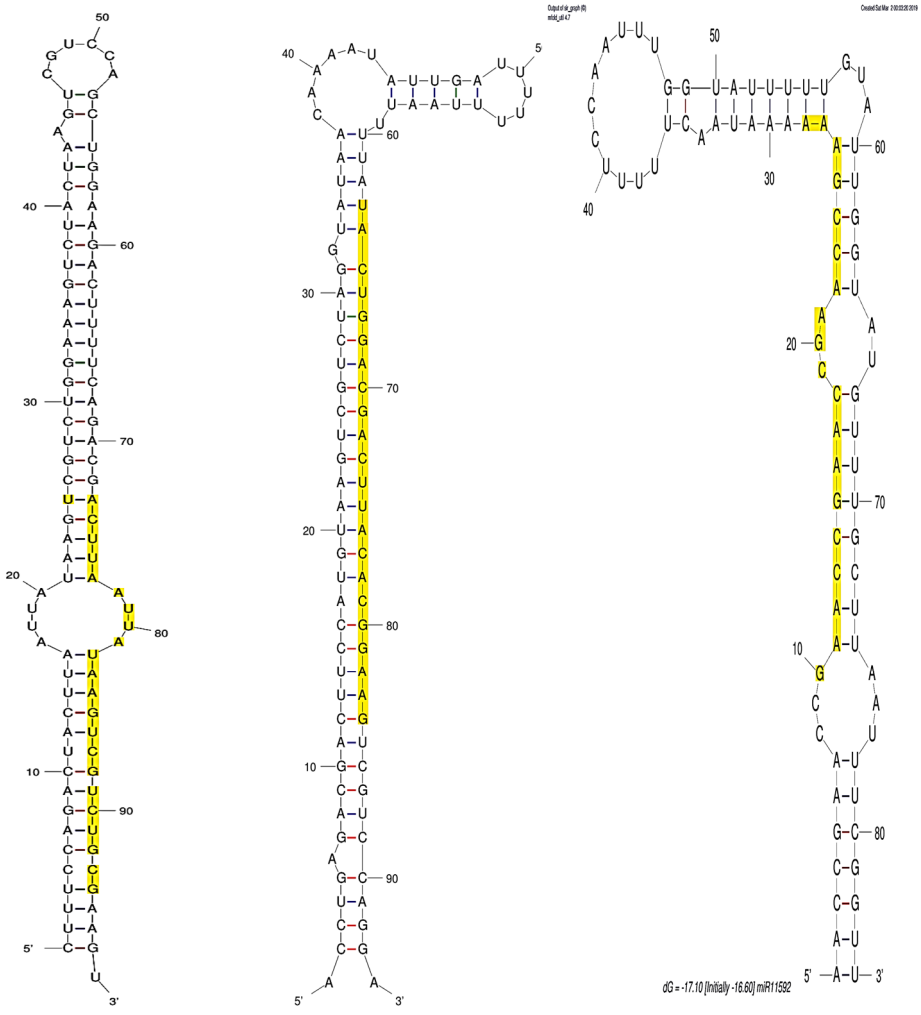
انواع میکروRNAها و نقش آن‌ها در سرکوب ژن‌های هدف در هنگام بروز تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهانی مانند جو (Ozhuner et al., 2013)، گندم (Jaiswal et al., 2019)، سویا (Li et al., 2011)، خیار (Mao et al., 2012)، یونجه (Wang et al., 2011)، زیتون (Donaire et al., 2011) و برنج (Xin et al., 2010) گزارش شده است. در این پژوهش سعی شده که انواع میکروRNAهای جدید و نقش آن‌ها در سرکوب ژن‌های هدف برای اولین بار در گیاه کلزا شناسایی شود. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که از بین میکروRNAهای جدید شناسایی‌شده، خانواده‌های miR5021 و miR9410 به ترتیب با نقشی که در سرکوب

ژن‌های هدف NST1 و HST بخصوص در هنگام بروز تنش در گیاه کلزا بازی می‌کنند، اهمیت بیشتری دارند.

بنابراین، شناسایی مکانیسم مولکولی این میکروRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها می‌تواند در انتخاب ارقام مقاوم به تنش خشکی و گرما برای کلزا به ما کمک نماید. مطالعه میکروRNAها برای تحمل به تنش boron در برگ‌ها و ریشه جو نشان داد که از بین چهار میکروRNA جدید شناسایی‌شده، miR408 بیشتر از سه میکروRNA دیگر در تنظیم سیگنال‌دهی سلولی در برگ‌ها نقش داشته است (Ozhuner et al., 2013). همچنین در لاین‌های هیبرید و اینبرد ذرت برای miR172 در شرایط تنش خشکی و نمک پاسخی گزارش نشده است (Kong et al., 2010)؛ بنابراین، شناخت مکانیسم تنظیم سلولی برای میکروRNAهای جدید ازجمله چگونگی تنظیم مسیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسیددیسموتاز در اندام‌های مانند برگ، ریشه و ساقه گیاه کلزا در هنگام تنش مستلزم تحقیقات بیشتری در این زمینه است.

نتیجه‌گیری نهایی

از مطالعه و شناخت میکروRNAها می‌توان به‌عنوان نوعی ابزار جدید مولکولی در کنار روش‌های اصلاحی کلاسیک موجود برای بهبود وضعیت ژنتیکی گیاهان در جهت ارتقاء تحمل به انواع تنش‌های زنده و غیرزنده در اصلاح گیاهان استفاده نمود.



شکل ۲. ساختارهای ثانویه ساقه–حلقه پیش‌ساز miRNAهای جدید شناسایی‌شده در کلزا، قسمت بالغ miRNA با رنگ زرد مشخص شده است

T Fig. 2. Secondary stem-loop precursor structures of new miRNAs identified in rapeseed, the mature part of miRNA highlighted in yellow

منابع

Akdogan, G., Tufekci, E.D., Uranbey, S., Unver, T., 2015. miRNA-based drought regulation in wheat. Functional and Integrative Genomics. 16, 221-223.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 25, 3389–3402.

Chi, X., Yang, Q., Chen, X., Wang, J., Pan, L. 2011. Identification and characterization of microRNAs from peanut (*Arachis hypogaea* L.) by high-throughput sequencing. PLoS ONE 6(11) e27530.

Dai, X., Zhao, P.X., 2018. PsRNATarget: a plant small RNA target analysis erver. Nucleic Acids Research. 46, 49-54.

Ding Y., Tao Y., Zhu C., 2013. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. Journal of Experimental Botany. 64, 3077-3086.

Donaire, L., Pedrola, L., de la Rosa, R., Llave, C., 2011. High-throughput sequencing of RNA silencing-associated small RNAs in olive (*Olea europaea* L.). PLoS ONE 6(11). e27916.

Hackenberg, M., Gustafson, P., Langridge, P., Shi, B.J., 2015. Differential expression of micro RNAs and other small RNA s in barley between water and drought conditions. Plant Biotechnology. 13, 2-13.

Jaiswal, S., Iquebal, M.A., Arora, V., Sheoran, S., Sharma, P., Angadi, U.B., Dahiya, V., Singh, R., Tiwari, R., Singh, G.P., Rai, A., 2019. Development of species specific putative miRNA and its target prediction tool in wheat (*Triticum aestivum* L.). Scientific Reports.9,3790.1038/s41598-019-40333-y

Karimi, A. A., Naghavi, M. R., Nasiri, J., 2017. Identification of miRNAs and their related target genes in Papaver somniferum. Iranian Journal of Field Crop Science. 4, 1161-1170. [In Persian].

Li, B., Qin, Y., Duan, H., Yin, W., Xia, X., 2011. Genome-wide characterization of new and drought stres responsive microRNAs in *Populus euphratica*. Journal of Experimental Botany. 62, 3765–3779.

Li, C., Zhang, B., 2016. MicroRNAs in control of plant development. Journal of Cellular Physiology. 231, 303–313.

Li, H., Dong, Y., Yin, H., Wang, N., Yang, J., 2011. Characterization of the stress associated microRNAs in Glycine max by deep sequencing. BMC Plant Biology. 170, 1471-2229.

Li, Y.F., Zheng, Y., Addo Quaye, C., Zhang, L., Sain, A., 2010. Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. The Plant Journal. 62(5), 742-759.

Mao, W., Li, Z., Xia, X., Li, Y., Yu, J., 2012. A combined approach of high-throughput sequencing and degradome analysis reveals tissue specific expression of microRNAs and their targets in cucumber. PLoS ONE. 7(3) e33040.

Megha, S., Basu, U., Joshi, R.K., Kav, N.N.V., 2018. Physiological studies and genome-wide microRNA profiling of cold-stressed Brassica napus. Plant Physiology and Biochemistry. 132, 1–17.

Miranda, R.S., Alvarez-Pizarro, J.C., Costa, J.H., Paula, S.O., Prisco, J.T., Gomes-Filho, E., 2017. Putative role of glutamine in the activation of CBL/CIPK signalling pathways during salt stress in sorghum. Plant Signaling and Behavior. 12:8, e1361075, DOI: 10.1080/15592324.2017.1361075

Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., Ohme-Takagia, M., 2005. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of arabidopsis regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. The Plant Cell. 17(11), 2993–3006.

Mohanpuria, P., Duhan, N., Sarao, N.K., Kaur, M., Kaur, M., 2018. In silico identification and validation of potential microRNAs in kinnow Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). 10, 762–770.

Navabpour, S., Haddad, R., 2010. Evaluation of glutamine syntetase gene role in growth stage of *Brassica Napus* and drought stress condition. Journal of Crop Breeding. 2(6), 26-36. [In Persian with English summary].

Noori daloii, M.R., Alvandi, A., 2006. MicroRNA (miRNA): Small but strategic and mysterious. Tehran University Medical Journal. 64(6), 5-18. [In Persian with English summary].

Ozhuner, E., Eldem, V., Ipek, A., Okay, S., Sakcali, S., Zhang, B., Boke, H., Unver, T., 2013. Boron stress responsive microRNAs and their targets in barley. PLoS ONE 8(3). e59543.

Sharma, D., Tiwari, M., Lakhwani, D., Tripathi, R.D., Trivedi, P.K., 2015. Differential expression of microRNAs by arsenate and arsenite stress in natural accessions of rice. Metallomics. 7, 174-187.

Shipman, K.L., Robinson, P.J., King, B.R., Smith, R., Nicholson, R.C., 2006. Identification of a family of DNA-binding proteins with homology to RNA splicing factors. Biochemistry and Cell Biology. 84, 9-19.

Tan, M.F., Liao, L., Hou, J., Wang, L., Wei, H., Jian, X., Li, J., 2017. Genome-wide association analysis of seed germination percentage and germination index in *Brassica napus* L. under salt and drought stresses. Euphytica. 213, 40. https://doi.org/10.1007/s10681-016-1832-x

Ukleja, M., Cuellar, J., Siwaszek, A., Kasprzak, J.M., Czarnocki-Cieciura, M., Bujnicki, M.J., Ukleja, M., Cuelar, J., Siwaszek, A., Kasprzak, J.M., Czarnocki-Cieciura, M., Bujnicki, J.M., Dziembowski, A., Valpuesta, J.M., 2016. The architecture of the Schizosaccharomyces pombe CCR4-NOT complex. Nature Communications. 7, 10433.

Vivek, A.T., 2018. In silico identification and characterization of miRNAs based on EST and GSS in Orphan legume crop, *Lens culinaris* medik, (lentil). Agri Gene. 8, 45-56.

Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Qiuying Tian, Q., Hao Zhang, W. 2011. Identification of drought-responsive microRNAs in Medicago truncatula by genome-wide high-throughput sequencing. BMC Genomics. 12, 367. Doi: 10.1186/1471-2164-12-367.

Wen, R., Torres-Acosta, J.A., Pastushok, L., Lai, X., Pelzer, L., Wang, H., Xiao, W., 2008. Arabidopsis UEV1D promotes lysine-63-linked polyubiquitination and is involved in DNA damage response. The Plant Cell. 20, 213-227.

Zhang, B., Pan, X., Wang, Q., Cobb, G. P., Anderson, T.A. 2006. Computational identification of microRNAs and their targets. Computational Biology and Chemistry. 30(6), 395-407.

Zhang, Y. 2005. miRU: an automated plant miRNA target prediction server. Nucleic Acids Research. 33(2), 701-704.

Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research. 31(13), 3406-3415.