ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰
صفحه

مطالعه رابطه تکاملی گندم نان و اجیلوپس تائوشی از طریق بررسی miRNAهای مشترک و ژن‌های هدف آن‌ها

Study of evolutionary relationship between bread wheat and *Aegilops tauschii* by analysis of common miRNAs and their target genes

مرتضی براتی[۱]، محمدرضا عظیمی*[۱]، محمدرضا نقوی[۲]، احسان محسنی‌فرد[۱]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری، دانشیار، استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

Barati M[1], Azimi MR[1*], Naghavi MR[2], Mohseni Fard E[1]

1- Graduated PhD Student, Associate Professor, Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, University of Zanjan,University of Zanjan
2- Professors, College of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:azimi@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۲/۱۹)

چکیده

گندم (*Triticum aestivum*) یکی از گیاهان مهم زراعی کشور و دنیاست که اهمیت استراتژیک در تأمین غذای انسان دارد. گندم نان یک آلوهگزاپلوئید (AABBDD) است که طی دو هیبریداسیون از اجداد وحشی خود به وجود آمده که در آن اجیلوپس تائوشی به‌عنوان دهنده ژنوم D گندم مطرح است. در این تحقیق با استفاده از بررسی miRNAهای مشترک آن‌ها و ژن‌های هدف به رابطه تکاملی گندم نان و اجیلوپس تائوشی بیشتر پرداخته شده است. بررسی کروموزوم‌های گندم نان و اجیلوپس تائوشی نشان می‌دهد تا حدود زیادی کروموزوم‌های متناظر از لحاظ طول و تعداد ژن‌ها یکسان هستند. در این مطالعه پنج miRNA رونوشت‌شده از ژنوم D گندم و مشترک با اجیلوپس تائوشی و همچنین سه miRNA جدید شناسایی‌شده از RNA Seq به روش بیوانفورماتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. همردیفی و بررسی توالی‌های miRNA موردنظر در گیاهان تک‌لپه نشان داد که این miRNAها در گندم و اجیلوپس بیشترین تشابه را دارند و به‌نظر می‌رسد در طول تکامل، این توالی‌ها از اجیلوپس تائوشی به‌صورت حفاظت‌شده به گندم رسیده است. بررسی آنتولوژی ژن‌های هدف miRNAهای مشترک گندم نان و اجیلوپس تائوشی نشان از تشابه بالای آن‌ها داشت. بنابراین به‌نظر می‌رسد miRNAهای مشترک بین گندم نان و اجیلوپس تائوشی تا حدود زیادی نقش و عملکرد مشابهی در این گیاهان خویشاوند دارند. یافته‌های این تحقیق می‌تواند در شناخت بهتر مکانیسم و عملکرد miRNAهای گندم و اجیلوپس تائوشی و استفاده از آن‌ها در طرح‌های اصلاحی گندم از طریق خویشاوند وحشی خود مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

اجیلوپس
روش محاسباتی
همردیفی
RNA Seq

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]

مقدمه

گندم گیاهی از خانواده غلات (Gramineae) و جنس تریتیکوم (Triticum)، با نام علمی *Triticum aestivum* L. می‌باشد. گندم از اولین گیاهان تغذیه‌ای بوده که توسط انسان بومی شده است و از حدود هشت هزار سال پیش، به‌عنوان یک غذای مهم در اغلب تمدن‌های دنیا از جمله اروپا، غرب آسیا و شمال آفریقا وجود داشته است (Curtis et al. 2002). سطح زیر کشت گندم در دنیا در سال ۲۰۱۷، حدود ۲۱۹ میلیون هکتار و تولید کل آن در جهان بیش از ۷۷۰ میلیون تن گزارش شده است. همچنین متوسط عملکرد آن در جهان در هر هکتار در سال ۲۰۱۷ به بیش از ۳۵۰۰ کیلوگرم رسید (FAO 2020). اجداد وحشی گندم برای یافتن ژن‌های جدید جهت بهره‌برداری آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی مورد توجه بسیار قرار دارد (Saeidi et al. 2006). به‌عنوان مثال، اجیلوپس تائوشی مقاوم به آفت‌های مختلف و پاتوژن‌های مهم زراعی است (Malik et al. 2003). همچنین گزارشاتی از صفات فیزیولوژیکی مفید مانند مقاومت به شوری (Shah et al. 1987) و عملکرد خوب در محیط‌هایی با تنش خشکی (Gororo et al. 2002) نیز گزارش شده است. منشأ تولید *T.eastivum* از اجیلوپس تائوشی به‌صورت گسترده‌ای پذیرفته شده است. با این‌حال چند سوال از جمله هیبریداسیون طبیعی *T. turgidum*– *Ae. tauschii*، رشد نرمال هیبریدهای F_1 تتراپلوئید بارور و تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در ژنوم‌های الوپلوئیدی نسل‌های F_2 و بعدی هنوز باقی مانده است (Matsuoka 2011). از این‌رو مقایسه توالی ژنوم گندم با اجداد خویشاوند در شناخت بهتر تکامل گندم از اهمیت زیادی برخوردار است. در گیاهان، miRNAها و ژن‌های هدف از جد مشترک بریوفیت‌ها و گیاهان دانه‌دار، بیش از ۴۰۰ میلیون سال به‌صورت محافظت‌شده باقی مانده‌اند (Tarver et al. 2012). از این ویژگی miRNAها می‌تواند در شناخت بهتر روابط تکاملی گیاهان بهره برد. miRNAها گروهی از RNAهای کوچک، غیرکدکننده با طول ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتیدی هستند که از طریق ممانعت از ترجمه و یا از طریق تخریب mRNA مربوطه مانع از بیان ژن‌ها در سطح بعد از رونویسی می‌شوند (Li et al. 2015; Shriram et al. 2016). طبق آمار miRBase (یک پایگاه داده عمومی miRNA)، در مجموع ۲۸٦٤٥ miRNA در این پایگاه موجود است (Kozomara et al. 2019) که ۸۵۱۱ داده مربوط به miRNA گیاهی متعلق به ۵۲ گونه مختلف گیاهان است. برای گندم نان نیز ۱۲۵ توالی miRNA بالغ در این پایگاه داده قابل‌دسترس است. از آنجایی‌که به‌نظر می‌رسد miRNAهای زیادی از گندم نان هنوز شناسایی نشده است، شناسایی miRNAهای جدید گندم، جهت درک بهتر ژنوم آن از اهمیت زیادی برخوردار است. شناسایی miRNAهای جدید از مجموعه بزرگ توالی‌های RNA کوچک و تجزیه و تحلیل آن‌ها با روش محاسباتی بیوانفورماتیکی در گونه‌های گیاهی مختلف با موفقیت انجام شده است (Chen et al. 2009; Zhang et al. 2008; Wang et al. 2012; Xie et al. 2010). در این تحقیق با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی و سایر ویژگی‌های miRNAهای مشترک گندم نان و اجیلوپس تائوشی که توسط بهره‌گیری از روش محاسباتی روی داده‌های RNA Seq به‌دست آمده یا در پایگاه‌های اطلاعاتی قابل دسترس بوده، به بررسی بیشتر رابطه تکاملی گندم و اجیلوپس تائوشی پرداخته شده است. همچنین ژن‌های هدف miRNAهای مورد نظر نیز جهت شناخت نقش و عملکرد آن‌ها در گندم و اجیلوپس تائوشی مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی miRNAهای مشترک گندم و اجیلوپس تائوشی، توالی‌های miRNA گندم و اجیلوپس تائوشی موجود در پایگاه miRBase 21 (http://www.mirbase.org) مورد استفاده قرار گرفت. توالی‌های RNA Seq گندم نان نیز به شماره دسترسی SRX7950232 از پایگاه داده SRA[1] در وبگاه NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) استخراج شد. مجموع ۹/۵۳۸/۹۳ توالی RNA Seq گندم نان در این پایگاه قابل‌دسترس بود که همه آن‌ها در برابر miRNA اجیلوپس تائوشی شناخته‌شده مورداستفاده قرار گرفتند.

از نرم‌افزار BLASTN 2.2.28+ و BLASTX 2.2.28+ (Altschul et al. 1997) به‌ترتیب برای انجام BLAST[2] توالی‌های

[1] Sequence Read Archive
[2] Basic Local Alignment Search Tool

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]

نوکلئوتیدی RNA Seqهای گندم نان و miRNAهای اجیلوپس تائوشی و BLAST نوکلئوتیدهای حاصل از مرحله قبل در برابر پایگاه داده پروتئین UniProt استفاده شد. از نرم‌افزار برخط MFOLD 2.3 (http://unafold.rna.albany.edu) برای تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه توالی‌های ساقه–حلقه (pre-miRNA[1]) کاندید با الگوریتم تاخوردگی زوکر استفاده شد و همه پارامترها به‌صورت پیش‌فرض انتخاب شد (Zuker 2003). طول توالی‌ها، موقعیت ناحیه تطابق، درصد محتوی (G+C) و حداقل انرژی آزاد تاشدگی (MFE, DG in kcal/mol) محاسبه شد. سپس حداقل انرژی آزاد تاخوردگی اصلاح‌شده (AMFE) و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) طبق فرمول زیر به‌دست آمد (Zhang et al. 2006a):

AMFE= (MFE/(طول میکرو ار ان ای پیش‌ساز))*100

MFEI = ((100 × MFE)/ طول میکرو ار ان ای پیش‌ساز /(G+C))%

به‌منظور بررسی خانواده miRNAهای کاندید از پایگاه داده Rfam (https://rfam.xfam.org) استفاده شد. در این تحقیق از نسخه Rfam 14.1 که حاوی ۳۰۱۶ خانواده RNA است، استفاده شد (Kalvari et al. 2017; 2018).

برای نشان دادن روابط تکاملی miRNA مشترک گندم و اجیلوپس تائوشی، از نرم‌افزار MEGA X استفاده شد. برای تعیین اهداف miRNAهای پیش‌بینی شده گندم، برنامه برخط psRNATarget[2] مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که miRNAهای کاندید به‌عنوان جستجوگر در برابر کتابخانه cDNA گندم نان (Ensemble Plants, release 43) استفاده شد و پارامترهای جستجو به‌صورت پیش‌فرض انتخاب شد. این نرم‌افزار به‌طور خاص برای شناسایی رونوشت‌های هدف از RNAهای کوچک از طریق الف) تجزیه و تحلیل تطابق مکمل بین RNA و هدف با استفاده از طرح پیش‌بینی شده و ب) ارزیابی جایگاه دسترسی هدف با محاسبه انرژی جفت‌نشده (UPE) لازم برای باز شدن ساختار ثانویه در اطراف ناحیه هدف RNA طراحی شده است (Dai et al. 2018).

نتایج و بحث

در گندم نان سه سری کروموزوم ۷ تایی (در مجموع ۲۱ کروموزوم) به نام‌های A، B و D وجود دارد. در اجیلوپس تائوشی، ۷ کروموزوم موجود است که طبق تحقیقات گذشته به‌عنوان دهنده ژنوم D گندم شناخته می‌شود. مقایسه ۷ کروموزوم اجیلوپس تائوشی با ۷ کروموزوم متناظر در گندم نان از نظر طول کروموزوم، تعداد ژن و نواحی کد کننده پروتئین نشان می‌دهد تا حدود زیادی کروموزوم‌های متناظر از لحاظ طول و تعداد ژن‌ها یکسان هستند (پیوست ۱). در مجموع ۱۳۸ خانواده miRNAها در گندم و اجیلوپس تائوشی شناسایی شده است که از این تعداد، ۱۳ خانواده اختصاصی اجیلوپس تائوشی، ۷۰ خانواده اختصاصی گندم نان و ۲۳ خانواده نیز مشترک بین گندم نان و اجیلوپس تائوشی هستند (پیوست ۲). اطلاعات بیشتر از جمله اعضای خانواده‌ها و شماره کروموزوم‌های حاوی ژن‌های miRNA (MIR) مشترک در گندم نان و اجیلوپس تائوشی در پیوست ۳ آمده است. بررسی جایگاه MIRهای گندم نان نشان می‌دهد که جایگاه حدود نیمی از MIRها روی کروموزوم‌های مختلف شناسایی شده است بدین ترتیب که از ۱۲۲ ژن، ۱۸ ژن روی کروموزوم‌های سری A، ۲٤ ژن روی کروموزوم‌های سری B، ۲۰ ژن روی کروموزوم‌های سری D و جایگاه نیمی دیگر نیز نامشخص است. ۳٦ miRNA بالغ در رشته منفی و ۸٦ توالی دیگر در رشته مثبت DNA مستقر هستند. در اجیلوپس تائوشی بیش از ۹۰ درصد جایگاه‌های MIRها روی کروموزوم‌ها شناسایی شده است، بدین ترتیب که از ۸۸ ژن، ٦ توالی در کروموزوم شماره ۱، ۱۸ ژن روی کروموزوم شماره ۲، ۹ ژن روی کروموزم شماره ۳، ۱۰ ژن روی کروموزوم شماره ٤، ۲۱ ژن روی کروموزوم شماره ۵، ۸ ژن روی کروموزوم شماره ٦ و ۹ ژن نیز روی کروموزوم شماره ۷ قرار دارد. همچنین جایگاه ۷ ژن نیز نامشخص گزارش شده است. در ٤۵ مورد، توالی miRNA بالغ در رشته منفی و در ٤۳ مورد دیگر در رشته مثبت DNA مستقر

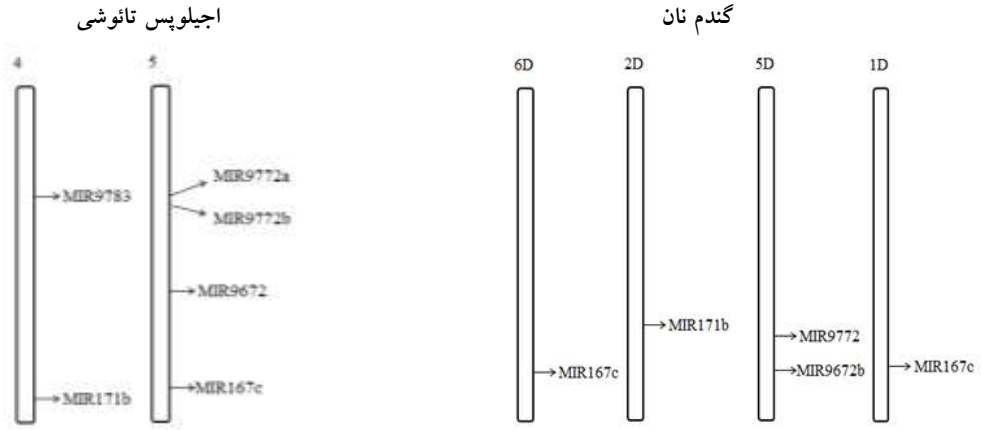
[1] Precursor
[2] Plant Small RNA Analysis Server

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]

هستند. از بین MIRهای شناخته شده گندم، ۲۰ MIR روی کروموزوم‌های سری D قرار داشتند که از این تعداد ٦ MIR در ژنوم اجیلوپس تائوشی مشترک بود. بنابراین در این تحقیق از miRNAهای رونوشت از MIRهای مستقر در ژنوم D گندم و مشترک با اجیلوپس تائوشی جهت بررسی روابط تکاملی بین گندم نان و گونه‌های اجیلوپس تائوشی استفاده شد (جدول ۱). طبق جدول ۱، تعداد ۵ توالی miRNA رونوشت از MIRهای مستقر در ژنوم D گندم وجود دارد که مشترک با اجیلوپس تائوشی نیز می‌باشد. اکثر این miRNA روی رشته مثبت DNA قرار دارند. ژن‌های مربوط به miRNAهای مشترک، به‌ترتیب در ٤ و ۲ کروموزوم از ژنوم D گندم نان و اجیلوپس تائوشی پراکنده شده (شکل ۱). برای بررسی وجود و تأیید رابطه تکاملی بین گندم نان و اجیلوپس تائوشی، توالی miRNAهای موردمطالعه در گندم و سایر گیاهان تک‌لپه‌ای دیگر مقایسه شد (شکل ۲). همردیفی توالی‌ها نشان می‌دهد که miR167c علاوه بر گندم (tae) و اجیلوپس تائوشی (ata)، در برنج (osa)، سورگوم (sbi)، نیشکر (sbi)، ذرت (zma)، چمن جاروی جنگلی (bdi)، گیاه زینتی کارناتا (vca) و مارچوبه (aof) نیز یافت شد. اما همردیفی کامل (۲۲ نوکلئوتید) تنها در گندم و اجیلوپس تائوشی مشاهده است. miR167c در گیاهان دیگر دارای ۲۰ یا ۲۱ نوکلئوتید بودند و در مواردی بیش از یک miRNA بالغ (که با حروف کوچک a، b، c و غیره نشان داده شده است)، متعلق به یک گیاه با توالی miR167c همردیف شدند (شکل a۲). miR171b نیز در مارچوبه، ذرت و چمن شناسایی شد، اما توالی آن تنها در گندم و اجیلوپس تائوشی ۱۰۰ درصد مشابه بود (شکل b۲).

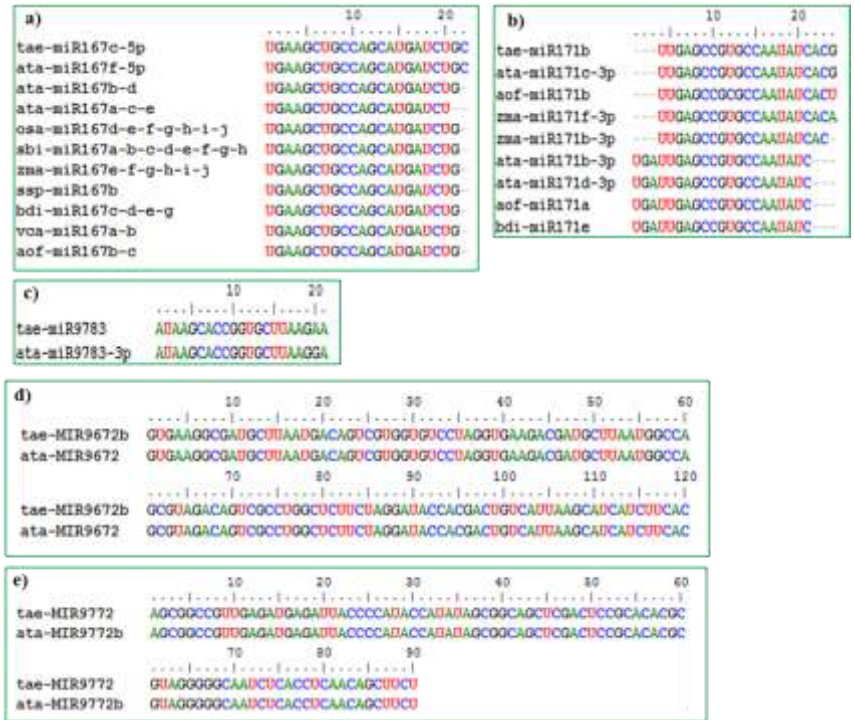
جدول ۱- مشخصات miRNAهای رونوشت از MIRهای مستقر در ژنوم D گندم و مشترک با اجیلوپس تائوشی

ردیف	miRNA	گیاه	کروموزوم	طول	رشته
۱	167c	گندم	6D	22	+
		اجیلوپس	5	22	-
۲	171b	گندم	2D	21	-
		اجیلوپس	4	21	+
۳	9672b	گندم	5D	21	-
		اجیلوپس	5	21	-
٤	9772	گندم	5D	21	-
		اجیلوپس	5	21	-
٥	9783	گندم	1D	21	-
		اجیلوپس	4	21	+



شکل ۱- نمایش شماتیک جایگاه‌های miRNA مشترک مستقر روی کروموزوم‌های D گندم و اجیلوپس تائوشی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]



شکل ۲- همردیفی توالی‌های miRNA بالغ و ساقه–حلقه مربوط به ژنوم D گندم با سایر گیاهان تک‌لپه‌ای

در خصوص miR9783، بررسی‌ها نشان داد که این توالی فقط در گندم و اجیلوپس شناسایی شده و توالی آن‌ها در این دو گیاه تنها یک نوکلئوتید با همدیگر اختلاف دارد (شکل c۲). دو توالی miR9672b و miR9772 که فقط در گندم و اجیلوپس یافت شده‌اند، نه تنها در توالی miRNA بالغ، بلکه در توالی ساقه–حلقه (که به‌ترتیب ۱۲۰ و ۹۰ نوکلئوتید طول دارند) نیز دارای نوکلئوتیدهای کاملاً یکسان بودند (شکل d,e۲). بنابراین نتایج همردیفی توالی‌های miRNA مورد مطالعه نشان می‌دهد که این miRNAها در گندم و اجیلوپس تائوشی بیشترین همانندی ژنتیکی و روابط تکاملی را نسبت به سایر گیاهان تک‌لپه‌ای دارند.

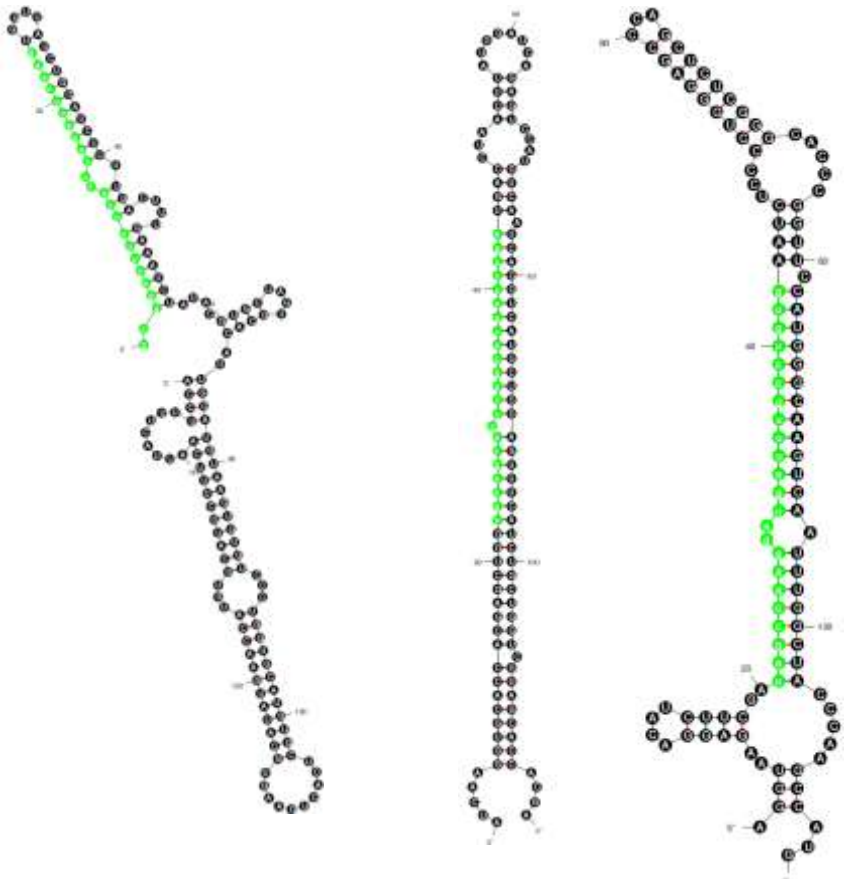
شناسایی miRNAهای بالقوه در گندم نان

برای شناسایی miRNAهای جدید گندم از همولوژی miRNAهای اجیلوپس تائوشی به‌عنوان توالی‌های مرجع در برابر RNA Seqهای گندم نان استفاده شد. از مجموع ۹/۵۳۸/۹۰۳ توالی RNA Seq گندم نان، طی فرآیند BLASTn و BLASTx، به‌ترتیب توالی‌های غیرهمولوگ و کدکننده پروتئین حذف شد. در نهایت ۱۴ توالی کاندید برای بررسی ساختار ثانویه انتخاب شدند. بررسی ساختار ثانویه توالی‌های RNA Seq کاندید نیز طبق معیارهای بیان‌شده انجام گرفت. در نهایت سه ساختار برای miRNA کاندید مناسب تشخیص داده شد که در شکل ۳ ساختار ساقه–حلقه آن‌ها نشان داده شده است.

در ادامه توالی miRNAهای کاندید شناسایی شده در پایگاه miRBase توسط BLASTn مورد جستجو قرار گرفت تا مشخص شود متعلق به چه خانواده‌ای هستند. در جدول ۲، مشخصات miRNAهای شناسایی شده آمده است.

طبق جدول ۲، هر سه توالی شناسایی شده فاقد عدم تطابق بودند و کمترین انرژی آزاد فولدینگ (MFE) آن‌ها منفی بودند. MFE یکی از شاخص‌های تعیین ساختار ثانویه اسیدهای نوکلئیک است و هرچه این شاخص پایین‌تر باشد، نشان‌دهنده پایداری بیشتر توالی ساقه–حلقه از نظر ترمودینامیکی است. همچنین توالی ساقه–حلقه miRNA دارای ارزش MFEI بالاتری نسبت به RNAهای دیگر مانند tRNA و rRNA و mRNA هستند (Bonnet et al. 2004). در گزارشی شاخص مطلوب MFEI برای miRNA را ۰/۹۷ برآورد کرده که به‌طور معنی‌داری بالاتر از این شاخص در سایر RNAها (کمتر از ۰/۶۵) بود (Zhang et al. 2006b).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]



NEWmiR3 *NEWmiR2* *NEWmiR1*

شکل ۳- ساختار ثانویه سنجاق‌سری پیش‌بینی شده برای سه miRNA گندم نان (miRNA بالغ با رنگ سبز نشان داده شده است)

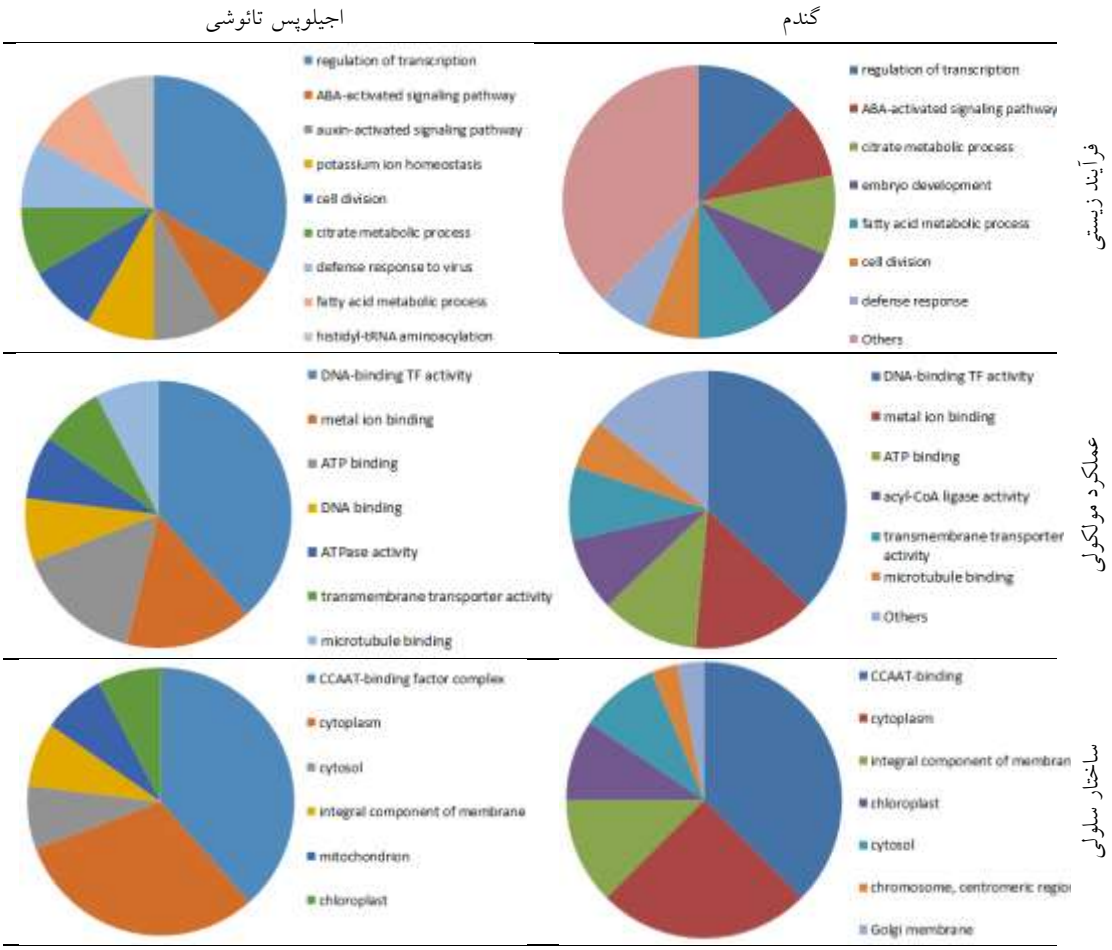
جدول ۲- ویژگی‌های miRNAهای جدید شناسایی‌شده در گندم نان

ساختار	نام RNA Seq	طول Pre-miRNA	توالی miRNA	طول miRNA	MFE (kcal/mol)	AMFE	MFEI	mismatch	(G+C) %	خانواده miRNA
NEWmiR1	SRR11348256.206636.1	115	UAGCCAAGGAUGAUUUGCCUGUG	23	-51.8	45.04	0.82	0	55	169
NEWmiR2	SRR11348256.1160962.1	120	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUGA	22	-66.4	55.33	1.06	0	52	167
NEWmiR3	SRR11348256.109902.2	152	GCGGAUUUUUCACCAAGAUUCAAG	24	-41.0	26.97	0.66	0	41	5062

با توجه به نتایج این شاخص‌ها به‌همراه دیگر معیارها از جمله موقعیت قرارگیری miRNA بالغ در ساختار ساقه–حلقه و حداقل بودن تعداد عدم تطابق‌ها، تا حدود زیادی می‌توان از شناسایی صحیح miRNAها اطمینان حاصل کرد. همچنین توالی سه miRNA جدید کاندید جهت اطمینان از اینکه متعلق به سایر RNAها از قبیل tRNA، rRNA و غیره نباشند، در پایگاه داده Rfam مورد بررسی قرار گرفت. جستجوی توالی سه miRNA در پایگاه موردنظر نتیجه‌ای در برنداشت. بدین معنی که توالی‌های مورد نظر به‌عنوان یک tRNA، rRNA یا RNA غیر کدشونده شناخته شده در این پایگاه وجود ندارند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]

پیش‌بینی اهداف بالقوه miRNA شناسایی شده و مشترک برای درک نقش miRNAها در عملکرد سلولی مختلف و شبکه‌های تنظیم ژن، شناسایی ژن هدف miRNA گام مهمی است. ماهیت حفظ‌شدگی miRNAها در موجودات مختلف، احتمالاً عملکرد محافظت شده آن‌ها را نیز در بر دارد (Zhang et al. 2006a). به‌طور کلی آنتولوژی ژن‌های هدف به سه دسته فرآیندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی قابل تقسیم است که در ادامه به بررسی آنتولوژی ژن‌های هدف miRNAهای شناسایی شده در گندم نان و اجیلوپس تائوشی پرداخته شده است. برای *NEWmiR1* به‌ترتیب ۳۸ و ۱۳ ژن هدف در گندم و اجیلوپس تائوشی شناسایی شد. فرآیندهای زیستی ژن‌های هدف *NEWmiR1* در گندم و اجیلوپس تائوشی تا حدود زیادی مشابه بود که شامل تنظیم رونویسی، مسیر سیگنالینگ فعال شونده توسط اسید آبسیزیک (ABA)، فرآیند متابولیک سیترات و اسید چرب، تقسیم سلولی و پاسخ دفاعی بود (شکل ٤). فعالیت به‌عنوان فاکتور رونویسی از طریق اتصال به DNA، فعالیت هدایت تراغشایی و اتصال به یون فلزی، ATP و میکروتیوبول از عملکردهای مولکولی مشترک بین ژن هدف *NEWmiR1* در گندم و اجیلوپس تائوشی بود. از نظر ساختار سلولی، ژن‌های هدف عمدتاً در کمپلکس فاکتور اتصال به جعبه CCAAT (یک توالی تنظیمی مهم پروموتر)، سیتوپلاسم، سیتوزول و ساختار غشا شرکت داشتند. از نظر پروتئین‌های کدشونده توسط ژن‌های هدف *NEWmiR1*، اشتراک زیادی بین گندم و اجیلوپس تائوشی وجود داشت.



شکل ٤- آنتولوژی ژن‌های هدف *NEWmiR1* در گندم نان و اجیلوپس تائوشی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]

اکثر پروتئین‌هایی که توسط ژن‌های هدف *NEWmiR1* در گندم و اجیلوپس تولید می‌شوند، مربوط به یکی از زیرواحدهای فاکتور رونویسی هسته‌ای (AtNF-YA-1) بود که از طریق شناسایی و اتصال به موتیف CCAAT در پروموترها، سبب تحریک رونویسی ژن‌های مختلفی می‌شود. پروتئین کلروپلاستی اسیل کوآنزیم A از دیگر پروتئین‌های عمده بود که در متابولیسم اسید چرب و گلیسرولیپید (shockey et al. 2002) و خروج اسید چرب از کلروپلاست نقش دارد (Schnur et al. 2002). پروتئین NAT2 که در غشای پلاسمایی قرار دارد و در فعالیت نقل و انتقال بین غشایی نقش دارد. نیز در بین پروتئین‌های ژن‌های هدف یافت شد. آکونیتات هیدراتاز نیز که ایزومریزاسیون سیترات به ایزوسیترات را کاتالیز می‌کند، در تحمل به تنش اکسیداتیو نقش دارد (Maurino et al. 2006). زیرواحد ۸ کمپلکس پروتئینی AUGMIN نیز نقش مهمی در مدل رشد هیپوکتیل دارد (Cao et al. 2013). همچنین پروتئین MOB کیناز نقش کلیدی در تنظیم رشد و تقسیم سلولی دارد و برای نمو مناسب گیاه و الگوی صحیح مریستم ریشه و کنترل رشد ریشه مورد نیاز است (Pinosa et al. 2013).

برای *NEWmiR2* به‌ترتیب ٦٠ و ٢٣ ژن هدف در گندم و اجیلوپس تائوشی شناسایی شد. ژن‌های هدف *NEWmiR2* در گندم و اجیلوپس تائوشی عمدتاً در فرآیندهایی زیستی شامل مسیر سیگنالینگ فعال‌شونده توسط اکسین، پروتئین جعبه CAAX و تنظیم رونویسی (پس از رونویسی) دخیل هستند (پیوست ٤). فعالیت‌های دیگری از جمله انتقال یون، یوبیکیوتینه کردن پروتئین و بیوسنتز فلانوئید از دیگر فرآیندهای زیستی شناسایی شده بود. اتصال به DNA، ATP و mRNA، فعالیت اندوپپتیدازی سستئین، فعالیت ترانسفرازی یوبیکئوتین و هدایت فسفات غیرارگانیک از عملکرد مولکولی ژن‌های هدف *NEWmiR2* در گندم نان و اجیلوپس تائوشی بود. ژن‌های هدف همچنین به‌طور عمده در ساختار هسته، سیتوپلاسم، غشا، سیتوزول و غشای اندوپلاسمی گیاهان مورد مطالعه حضور دارند. عمده‌ترین پروتئین‌های کدشونده توسط ژن‌های هدف *NEWmiR2* شامل پروتئین کیناز اختصاصی سرین/ترئونین شبه‌گیرنده‌ای LRR[1] و پروتئین ARF8[2] بود. که اولی در غشای پلاسمایی مستقر شده و در مسیر سیگنالینگ نقش دارد و دومی در پاسخ به اکسین دخالت دارد. پروتئین هومولوگ Pumilio، اختصاصی نوکلئوتید و با اتصال به RNA در تنظیم رونویسی و پایداری mRNA نقش دارد (Francischini and Quaggio 2009). پروتئین‌های F-box فرآیندهای سلولی متعددی از جمله مرحله چرخه سلولی، تنظیم رونویسی و هدایت سیگنال را تنظیم می‌کند (Kuroda et al. 2002). دومین حاوی پروتئین غنی از گلیسین (GRDP2) نیز در نمو و پاسخ به تنش از طریق یک مکانیسم وابسته به اکسین دخالت دارد (Ortega-Amaro et al. 2014). در خصوص *NEWmiR3*، در گندم سه ژن هدف شناسایی شد که از نظر آنتولوژی به‌طور عمده در فرآیند ترجمه، اتصال به یون روی (عملکرد مولکولی) و زیرواحد کوچک ریبوزوم (ساختار سلولی) نقش داشته و همچنین پروتئین ریبوزومی از این ژن‌ها تولید می‌شود. اما برای اجیلوپس تائوشی هیچ ژن هدفی یافت نشد.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی کروموزوم‌های گندم نان و اجیلوپس تائوشی نشان می‌دهد تا حدود زیادی کروموزوم‌های متناظر از لحاظ طول و تعداد ژن‌ها یکسان هستند. بررسی توالی خانواده‌های miRNA موجود در اجیلوپس تائوشی نشان می‌دهد که هر یک از آن‌ها دارای اعضای بیشتری نسبت به خانواده miRNA گندم هستند. به‌عبارت دیگر اگر توالی‌های متعددی در یک خانواده miRNA در اجیلوپس وجود دارد که فقط یک یا دو نوکلئوتید با توالی miRNA کـه قبلاً شناسایی شده اختلاف دارد. به‌عنوان مثال، 156 miRNA دارای ٥ توالی مختلف با نام‌های a، b، c، d و e است که تنها در یک یا نوکلئوتید با همدیگر تفاوت دارند، در حالی‌که در گندم تنها یک توالی برای 156 miRNA وجود دارد.

برای اکثر توالی‌های ساقه–حلقه در اجیلوپس تائوشی دو miRNA بالغ در دو بازوی ′3 و ′5 هر ساختار ساقه –حلقه معرفی شده، در حالی‌که در گندم تنها یک miRNA بالغ برای اکثر توالی‌های ساقه–حلقه معرفی شده است. با توجه به ارتباط خویشاندی این

[1] Leucine-rich repeat
[2] Auxin response factor

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]

دو گیاه، دانش حاصل از بررسی داده‌های اجیلوپس تائوشی می‌تواند در مورد گندم نیز مورد توجه قرار بگیرد و امکان معرفی و شناسی miRNA بالغ دیگری برای هر ساختار ساقه–حلقه را فراهم کند.

در این تحقیق از یک روش محاسباتی مبتنی بر همردیفی توالی‌های شناخته شده miRNA با توالی‌های RNA موجود استفاده شد که در نتیجه آن سه توالی miRNA جدید گندم شناسایی شد. جستجو برای یافتن miRNAهای موجود مربوط به گندم نشان داد که هنوز miRNAهای زیادی در گندم و اجداد وحشی آن وجود دارند که شناسایی نشده‌اند. در این تحقیق فرض بر این بود که miRNAهایی که از MIRهای مستقر روی کروموزوم‌های سری D گندم قرار دارند، با miRNAهای اجیلوپس تائوشی یکسان هستند. این نتیجه تا حدود زیادی تأیید شد، چراکه از بین ۵ miRNA مورد مطالعه، ٤ توالی دارای نوکلئوتیدهای کاملاً یکسان و یک miRNA نیز تنها دارای یک اختلاف در نوکلئوتید بود. همچنین اکثر این miRNAها تنها در گندم و اجیلوپس شناسایی شده و در دیگر گیاهان تک‌لپه یافت نشد. همچنین دو miRNA نه تنها در توالی‌های miRNA بالغ بلکه در توالی‌ها ساقه–حلقه نیز مشابهت ۱۰۰ درصدی در گندم و اجیلوپس تائوشی داشتند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که در طول تکامل، این توالی‌ها از اجیلوپس تائوشی به‌صورت حفاظت‌شده به گندم رسیده است. بررسی ژن‌های هدف miRNAهای مشترک گندم نان و اجیلوپس تائوشی نشان داد که از نظر آنتولوژی ژن و همچنین پروتئین‌های تولیدشده از آن‌ها تشابه زیادی داشتند. بنابراین به‌نظر می‌رسد miRNAهای مشترک بین گندم نان و اجیلوپس تائوشی تا حدود زیادی نقش و عملکرد مشابهی در این گیاهان خویشاوند دارند. در کل پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNA شناسایی‌شده نشان می‌دهد که ممکن است ژن‌های متعددی توسط یک miRNA تنظیم شود که این نتیجه مشابه با تحقیقات اخیر در سایر گونه‌های گیاهی است (Jones-Rhoades and Bartel 2004; Zhang et al. 2006c). بنابراین در تحقیقات miRNA پیشنهاد می‌گردد که علاوه بر ارتباطات بین miRNA و ژن‌های اهدف، بیشتر بر روی شبکه‌های تنظیمی متمرکز شود. روش محاسباتی مورداستفاده در این تحقیق می‌تواند برای شناسایی miRNAهای جدید از سایر گونه‌های گیاهی که ژنوم هنوز کاملاً شناخته نشده، مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه حاضر از تعداد معدودی miRNA برای بررسی رابطه تکاملی استفاده شد، لذا برای دستیابی به نتایج بهتر و جامع‌تر در خصوص رابطه تکاملی گندم نان و اجیلوپس تائوشی پیشنهاد می‌شود در قالب یک طرح کلان از همه miRNAهای شناخته‌شده و قابل‌شناسایی برای تجزیه و تحلیل استفاده شود. یافته‌های این تحقیق علاوه بر شناخت بهتر رابطه تکاملی بین گندم نان و اجیلوپس تائوشی می‌تواند در درک بیشتر مکانیزم‌های تنظیم بیان ژن‌ها توسط miRNAها و استفاده از پتانسیل اجداد وحشی گندم در طرح‌های اصلاحی مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

منابع

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 25:3389-3402.

Bonnet E, Wuyts J, Rouze P and Peer YV (2004) Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. Bioinformatics 20:2911-2917.

Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. Science Journal 218:443-448.

Cao L, Wang L, Zheng M, Cao H, Ding L, Zhang X, Fu Y (2013) Arabidopsis AUGMIN subunit8 is a microtubule plus-end binding protein that promotes microtubule reorientation in hypocotyls. Plant Cell 25:2187-2201.

Chen R, Hu Z, Zhang H (2009) Identification of MicroRNAs in Wild Soybean (*Glycine soja*). Journal of Integrative Plant Biology 51:1071-1079.

Curtis BC, Rajaram S and Macpherson HG (2002) Bread wheat: Improvement and Production. FAO Plant production and protection series. 30:12-15.

Dai X, Zhao PX (2011) PsRNATarget: a plant small RNA target analysis server. Nucleic Acids Res 39: W155.W159.

Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2018) psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server. Nucleic Acids Research 46:W1:W49–W54.

Frazier TP, Xie F, Freistaedter A, Burklew CE, Zhang B (2010) Identification and characterization of microRNAs

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]

and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). Planta 232:1289-1308.
Gleave AP, Ampomah-Dwamena C, Berthold S, Dejnoprat S, Karunairetnam S, Nain B, Wang YY, Crowhurst RN, MacDiarmid RM (2008) Identification and characterisation of primary microRNAs from apple (*Malus domestica* cv. Royal Gala) expressed sequence tags. Tree Genetics and Genomes 4:343-358.
Gororo NN, Eagles HA, Eastwood RF, Nicolas ME and Flood RG (2002) Use of Triticum tauschii to improve yield of wheat in low-yielding environments. Euphytica 123:241-254.
Han Y, Luan F, Zhu H, Shao Y, Chen A, Lu C, Luo Y, Zhu B (2009) Computational identification of microRNAs and their targets in wheat (*Triticum aestivum* L.). Science China Life Sciences 52: 1091-1100.
http://www.fao.org/faostat/en/#compare. 2020
Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress induced miRNA. Molecular Cell 14: 787-799.
Kalvari I, Nawrocki EP, Argasinska J, Quinones-Olvera N, Finn RD, Bateman A, Petrov AI (2018) Non-coding RNA analysis using the Rfam database. Current Protocols in Bioinformatics. 10.1002/cpbi.51.
Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. Nucleic Acids Research, 47:D155-D162.
Kuroda H, Takahashi N, Shimada H, Seki M, Shinozaki K and Matsui M (2002) Classification and Expression Analysis of Arabidopsis F-Box-Containing Protein Genes. Plant and Cell Physiology 43:1073–1085. https://doi.org/10.1093/pcp/pcf151
Li ZF, Zhang YC and Chen YQ (2015) miRNAs and lncRNAs in reproductive development. Plant Science 238: 46-52.
Malik R, Smith CM, Brown-Guedira GL, Harvey TL and Gill BS (2003) Assessment of Aegilops tauschii for resistance to biotypes of wheat Curl Mite (Acari: Eriophydae). Journal of Economic Entomology 96:1329-1333.
Maurino VG, Grube E, Zielinski J, Schild A, Fischer K, Flügge U (2006) Identification and Expression Analysis of Twelve Members of the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) Gene Family in Arabidopsis Thaliana. Plant Cell Physiology 47:1381-93.
Ortega-Amaro MA, Rodriguez-Hernandez AA, Rodriguez-Kessler M, Hernandez-Lucero E, Rosales-Mendoza S, Ibanez-Salazar A, Delgado-Sanchez P, Jimenez-Bremont JF (2014) Overexpression of AtGRDP2, a novel glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance. Front. Plant Science 5:782-782.
Pinosa F, Begheldo M, Pasternak T, Zermiani M, Paponov IA, Dovzhenko A, Barcaccia G, Ruperti B, Palme K (2013) The Arabidopsis thaliana Mob1A gene is required for organ growth and correct tissue patterning of the root tip. Annals of Botany 112:1803-1814.
Francischini CW, Quaggio RB (2009) Molecular characterization of Arabidopsis thaliana PUF proteins binding specificity and target candidates. FEBS Journal 276:5456-5470.
Saeidi H, rahiminejad M, Vallian S and Heslop-Harrison jS (2006) Biodiversity of diploid D-genome *Aegilops tauschii* Coss. in Iran measured using microsatellites. Genetic Resources and Crop Evolution 53:1477-1484.
Schnurr JA, Shockey JM, de Boer GJ, Browse JA (2002) Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from Arabidopsis. Plant Physiology 129:1700-1709.
Shah SH, Gorham J, Forster BP and Wyn Jones RG (1987) Salt tolerance in the Triticeae: The contribution of the D genome to cation selectivity in hexaploid wheat. Journal of Experimental Botany 38:254-269.
Shockey JM, Fulda MS, Browse JA (2002) Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. Plant Physiology 129:1710-1722.
Shriram V, Kumar V, Devarumath R, Khare TS and Wani SH (2016) MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. Frontiers in Plant Science 7:817-835.
Song C, Fang J, Li X, Liu H, Thomas CC (2009) Identification and characterization of 27 conserved microRNAs in citrus. Planta 230:685-671.
Tarver JE, Donoghue, PCJ and Peterson KJ (2012) Do miRNAs have a deep evolutionary history? Bioessays 34:857-866.
Triticum aestivum Assembly and Gene Annotation (2020). Available at: http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Annotation.
Wang M, Wang Q, Wang B (2012) Identification and characterization of MicroRNAs in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.) PLoS ONE 7:e33696.
Wolfgang M, Olga DP, Duroy AN, Gregory BM, Daniel FK (2007) Aconitase Plays a Role in Regulating Resistance to Oxidative Stress and Cell Death in Arabidopsis and *Nicotiana Benthamiana*. Plant Molecular Biology 63:273-87.
Xie F, Frazier TP, Zhang B (2010) Identification and characterization of microRNAs and their targets in the bioenergy plant switchgrass (*Panicum virgatum*). Planta 232:417-434.
Xie F, Frazier TP, Zhang B (2011) Identification, characterization and expression analysis of MicroRNAs and their targets in the potato (*Solanum tuberosum*). Gene 473:8-22.
Xie F, Huang SQ, Guo K, Xiang AL, Zhu YY, Nie L, Yang ZM (2007) Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. FEBS Letters. 581:1464-1474.
Yin Z, Li C, Han X, Shen F (2008) Identification of conserved microRNAs and their target genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Gene 414:60-66.
Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA (2006a) Conservation and divergence of plant microRNA genes. Plant Journal 46:243-259.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]

Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA (2006b) Evidence that miRNAs are different from other RNAs. Cellular and Molecular Life Sciences 63:246-54.
Zhang BH, Pan XP, Cobb GP, Anderson TA (2006c) Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. FEBS Letters 580:3753-3762.
Zhang BH, Pan XP, Stellwag EJ (2008) Identification of soybean microRNAs and their targets. Planta 229:161-182.
Zhang W, Luo Y, Gong X, Zeng W, Li S (2009) Computational identification of 48 potato microRNAs and their targets. Computational Biology and Chemistry 33:84-93.
Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research 31:3406-3415.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-18]