ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰
صفحه ۸۳ - ۷۳

شناسایی و تأیید miRNAهای جدید مشترک در گندم نان و گونه‌های مختلف اجیلوپس با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و Real time PCR

Identification and confirmation of new common miRNAs in bread wheat and different Aegilops species by bioinformatics approach and Real time PCR

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

۱- به‌ترتیب دکتری، دانشیار، استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

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

1- PhD, Associate Professor, Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics,University of Zanjan, University of Zanjan
2- Professor, Agricultral and Natural Resourses Collage, University of Tehran

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

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۲)

چکیده

گندم نان یکی از غلات مهم است که به‌طور وسیع در جهان کشت می‌شود. miRNAها یک نوع از RNAهای کوچک تنظیمی هستند که حدود ۲۲-۱۸ نوکلئوتیدی بوده و می‌توانند به‌عنوان یک ابزار اصلاحی جدید در بهبود ژنتیکی گیاهان عمل کنند. با توجه به این‌که بسیاری از miRNAها از نظر تکاملی در بین قلمرو گیاهان و جانوران محافظت‌شده هستند، استفاده از ژنومیکس مقایسه‌ای و روش‌های محاسباتی برای شناسایی miRNAها، بسیار مورد توجه است. در این مطالعه شناسایی miRNA بالقوه جدید در گندم نان موردنظر بود و از یک روش جستجوی مبتنی بر تشابه روی EST برای این‌کار استفاده شد. بدین منظور miRNAهای شناخته شده گیاهی به‌عنوان مرجع در برابر ESTهای گندم قرار گرفته و BLASTn انجام شد. سپس توالی‌های کدکننده پروتئین توسط BLASTx شناسایی و حذف شدند. در مرحله بعد ساختار ثانویه مورد بررسی قرار گرفت و سپس miRNAهای کاندید در پایگاه اطلاعاتی Rfam بررسی شدند. در نهایت سه miRNA جدید با استفاده از این روش شناسایی شد که از نظر توالی، مشابه miRNAهای شناخته‌شده در اجیلوپس تائوشی بودند. به‌منظور تأیید وجود آن‌ها در گندم و گونه‌های اجیلوپس حاوی ژنوم D شامل تائوشی، سیلندریکا و کراسا، از Real time PCR استفاده شد و در نهایت وجود توالی myseq2 در ساقه گیاهان مورد مطالعه تأیید شد. شناسایی ژن‌های miRNA تأییدشده نشان داد که بیشتراین ژن‌ها مانند RGA، PIK و NB-ARC روی مقاومت به بیماری‌های مختلف تأثیر داشته و برخی نیز در مقاومت به تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش خشکی و شوری نقش داشتند. نتیجه تحقیق تأیید کرد که روش‌های محاسباتی ابزار مناسبی برای پیش‌بینی miRNAهای کاندید می‌تواند باشد که سبب صرفه‌جویی در وقت و هزینه شناسایی miRNAها می‌شود.

واژه‌های کلیدی

اجیلوپس
روش محاسباتی
ژنومیکس مقایسه‌ای
میکرو آر ان ا
qRT-PCR

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) با ژنوم AABBDD ($2n = 6\times = 42$)، یکی از غلات مهم است که به‌طور وسیع در جهان کشت می‌شود و پیش‌بینی می‌شود که مصرف گندم در تا سال ۲۰۲۷ نسبت به سال ۲۰۱۸، ۱۳ درصد افزایش یابد و همچنان اکثراً (حدود دو سوم مصرف کل) برای مصرف انسان مورد استفاده قرار گیرد (OECD-FAO 2018). miRNAها یک نوع از RNAهای کوچک تنظیمی هستند که حدود ۲۲-۱۸ نوکلئوتید طول داشته و از توالی‌های پیش‌ساز مشتق می‌شوند. miRNAها در کنترل بیان ژن از طریق اتصال به mRNA هدف جهت برش یا اختلال در ترجمه عمدتاً نقش مهار در سطح پس از رونویسی را ایفا می‌کنند (Zhang et al. 2006a). بسیاری از پژوهش‌های گذشته تأیید کرده‌اند که miRNAها نقش مهمی در فرآیندهای زیستی و سوخت‌وساز در گیاهان و جانوران دارند (Ambros and Chen 2007; Carrington and Ambros 2003; Zhang et al. 2007). در گیاهان، miRNAها در کنترل تمایززایی و نمو بافت‌ها (برگ، ریشه، ساقه و گل)، مرحله تغییر از رشد رویشی به زایشی، هدایت سیگنالی و پاسخ به شرایط محیطی از جمله تنش‌های زیستی (پاتوژن‌ها) و غیرزیستی (کم‌آبی، شوری و خشکی) نقش دارند (Chen 2005; Zhang et al. 2006a). در سال ۲۰۰۲، اولین miRNA در گیاهان کشف شد (Park et al. 2002)، اما در حال حاضر صدها miRNA در گیاهان به‌وسیله رویکرد محاسباتی و تجربی شناسایی شده‌اند. مطالعات گذشته سعی در شناسایی miRNAهای مرتبط با نمو و پاسخ به تنش‌ها از طریق توالی‌یابی جمعیت‌های RNA کوچک یا از طریق روش‌های محاسباتی داشتند. به‌عنوان مثال، Wei et al. (2009) خانواده‌های ۴۳ و ۴۸ miRNAها گندم را از طریق RNAهای ادغام‌شده برگ‌ها، ساقه‌ها، ریشه‌ها و سنبله شناسایی کردند. با این‌حال، شناسایی miRNAها در سطح کل ژنوم و مقایسه بیان در انواع بافت‌ها یا مراحل نموی هنوز تکمیل نشده است.

مطالعات مقایسه‌ای ژنوم در بین گونه‌های مختلف نشان می‌دهد که بسیاری از miRNAها از نظر تکاملی در بین قلمرو گیاهان و جانوران و از گونه‌ای به گونه دیگر بسیار محافظت‌شده هستند. این ویژگی miRNAها، یک رویکرد قوی برای شناسایی آن‌ها با استفاده از ژنومیکس مقایسه‌ای است. بر اساس این رویکرد، محققان یک روش توالی‌های بیان‌شده برچسب‌دار (EST[1]) و توالی ژنوم (GSS[2]) برای شناسایی miRNAها گیاهان و حتی جانوران مختلف را توسعه داده‌اند (Zhang et al. 2005). تجزیه و تحلیل EST دارای مزایای قابل‌توجهی نسبت به روش‌های دیگر دارد: (۱) miRNAهای محافظت‌شده را می‌توان در موجواتی که کل توالی ژنوم آن‌ها به‌خوبی شناخته نشده، شناسایی کرد؛ (۲) شواهد مستقیم برای بیان miRNA فراهم می‌کند که نمی‌توان از بررسی‌های ژنومی توالی به آن پی برد (۳) شناسایی miRNA را می‌توان بدون استفاده از نرم‌افزار بسیار تخصصی انجام داد. بسیاری از miRNAها در گونه‌های گیاهی مختلف مانند سویا (Chen et al. 2009; Zhang et al. 2008)، ذرت (Zhang et al. 2006b)، گوجه‌فرنگی (Yin et al. 2008)، توتون و تنباکو (Frazier et al. 2010)، سیب‌زمینی (Xie et al. 2011; Zhang et al. 2009)، گندم (Han et al. 2009; Achakzai et al. 2018)، براسیکا ناپوس[3] (Xie et al. 2007)، مرکبات (Song et al. 2009)، چمن ترکه[4] (Xie et al. 2010)، سیب (Gleave et al. 2008) و پنبه آسیایی (Wang et al. 2012) با این روش به‌طور موفقیت‌آمیز شناسایی شده‌اند.

طبق آمار miRBase (یک پایگاه داده عمومی miRNA)، در مجموع ۲۸٦٤٥ میکرو ار ان ای در این پایگاه سپرده شده است (Kozomara et al. 2019) که ۸۵۱۱ داده مربوط به miRNA گیاهی متعلق به ۵۲ گونه مختلف گیاهان است. برای گندم نان نیز ۱۱۹ توالی miRNA بالغ و ۱۱٦ توالی miRNA پیش‌ساز در قالب ۹۰ خانواده در این پایگاه داده قابل‌دسترس است. در این تحقیق، توالی‌های EST گندم موجود در پایگاه داده NCBI Genbank به‌وسیله miRNAهای شناخته شده در پایگاه miRBase جهت شناسایی miRNA گندم نان مورد جستجو قرار گرفته است. همچنین miRNAهای کاندید شناسایی‌شده مورد تأیید آزمایشگاهی قرار گرفته و ژن‌های هدف آن‌ها نیز پیش‌بینی شد.

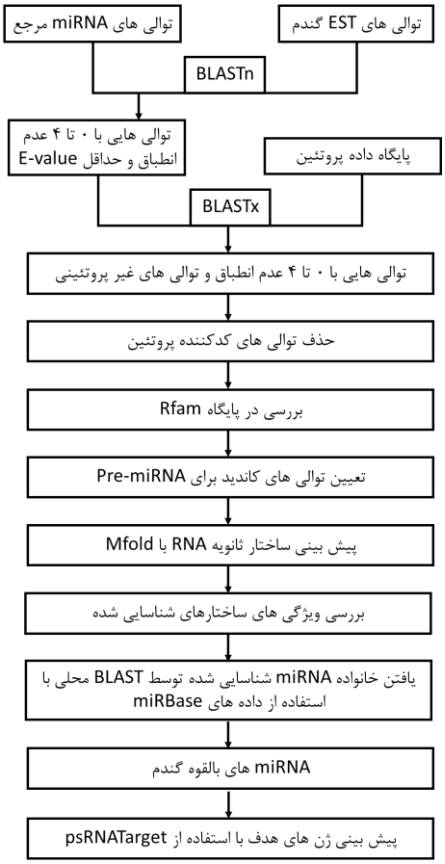
[1] Expressed Sequence Tag
[2] Genome Survey Sequence
[3] *Brassica napus*
[4] switchgrass (*Panicum virgatum*)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]

مواد و روش‌ها

توالی‌های EST گندم نان از پایگاه داده GenBank در وبگاه NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) استخراج شد. مجموع ۱،۴۰۷،۴۴۰ توالی EST گندم نان در این پایگاه قابل دسترس بود که همه آن‌ها در برابر miRNA گیاهی شناخته‌شده مورد استفاده قرار گرفتند. برای جستجوی miRNAهای بالقوه در گندم، کل miRNAهای بالغ شناخته‌شده در گیاهان (Viridiplantae) از پایگاه ثبت miRNA (miRBase Release 21) استخراج شد. این miRNAها که شامل ۸۵۱۱ داده بود، به‌عنوان توالی‌های miRNA مرجع جهت پیش‌بینی محاسباتی miRNAهای جدید گندم مورد استفاده قرار گرفتند. از نرم‌افزار BLASTN 2.2.28+ و BLASTX 2.2.28+ (Altschul at el. 1997) در سیستم عامل Bio-Linux 8 به‌ترتیب برای انجام BLAST توالی‌های نوکلئوتیدی ESTهای گندم نان و miRNAهای گیاهی و BLAST نوکلئوتیدهای حاصل از مرحله قبل در برابر پایگاه داده پروتئین UniProt استفاده شد. از نرم‌افزار برخط MFOLD 2.3 به نشانی (http://unafold.rna.albany.edu) برای تجزیه و تحلیل ساختار دوم RNAها استفاده شد (Zuker 2003). از psRNATarget[1] برای تجزیه و تحلیل اهداف miRNAهای کاندید استفاده شد (Dai et al. 2018).

از توالی miRNAهای مرجع تهیه‌شده به‌عنوان داده‌های جستجوگر برای جستجوی همولوژی در برابر پایگاه داده توالی‌های EST گندم نان استفاده شد. مطابق فرآیند معرفی‌شده (شکل ۱)، توالی‌های miRNAهای بالغ گیاهان مورد جستجو BLASTn در پایگاه داده EST گندم با الگوریتم BLASTN 2.2.28+ قرار گرفت. حد آستانه (e-value)، ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد؛ تعداد عدم تطابق قابل‌قبول برای توالی‌های هدف، ٤ مورد تعیین شد؛ تنظیمات پارامترهای BLASTn شامل این موارد بود: پیچیدگی پایین[2] به‌عنوان یک فیلتر برای توالی در نظر گرفته شد، طول عبارت تطابق[3] بین جستجوگر و داده‌های مرجع، ۷ تعیین شد. به این ترتیب، ۱۱۱۷ توالی EST به‌عنوان miRNAهای بالقوه کاندید پس از حذف موارد تکراری و دارا بودن شرایط شامل ۱) حداقل طول بین ۱۸ تا ۲۰ نوکلئوتید، ۲) عدم تطابق حداکثر تا ٤ مورد در مقایسه با miRNAهای شناخته‌شده، به‌دست آمد (Akter et al. 2014). سپس BLASTx با حد آستانه ۰/۰۰۱ روی توالی‌های کاندید با استفاده از BLASTX 2.2.28+ در برابر پایگاه داده پروتئین غیرتکراری[4] صورت گرفت و توالی‌های کدکننده پروتئین حذف و در نهایت ۳۵٤ توالی‌های غیرپروتئینی باقی ماندند. 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 ۳۰۱٦ خانواده RNA است، استفاده شد (Kalvari et al. 2017; 2018).



شکل ۱- مراحل فرآیند جستجوی miRNAهای گندم نان با استفاده از شناسایی همولوژی miRNAهای شناخته‌شده گیاهی

ساختار ثانویه توالی‌های miRNAهای پیش‌ساز (pre-miRNA) کاندید با الگوریتم تاخوردگی زوکر توسط نرم‌افزار MFOLD 2.3 پیش‌بینی شد. همه پارامترها به‌صورت پیش‌فرض انتخاب شد.

[1] Plant Small RNA Analysis Server
[2] low complexity
[3] word-match size
[4] non-redundant protein

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]

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. 2006c):

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

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

مطالعات قبلی (Zang et al. 2006c، وانگ و میشرا (Ng Kwang and Mishra 2007) نشان می‌دهد که توالی‌های miRNA پیش‌ساز به‌طور قابل‌توجهی دارای حداقل انرژی آزاد تاشدگی (MFE) و شاخص حداقل انرژی آزاد تاشدگی (MFEI) منفی‌تری نسبت به دیگر RNAهای دیگر از جمله rRNA و tRNA هستند. بنابراین برای اجتناب از انتخاب سایر RNAها به‌عنوان miRNA کاندید، این دو ویژگی به‌همراه محتوی G+C در زمان پیش‌بینی ساختار ثانویه مورد توجه قرار گرفت. به‌طور خلاصه، یک EST به‌عنوان یک miRNA بالقوه کاندید در نظر گرفته شد، اگر دارای معیارهای تشریح شده (Wang et al. (2011 به این قرار بود: ۱) miRNA بالغ پیش‌بینی شده نبایستی بیش از سه نوکلئوتید با miRNAهای شناخته‌شده مرجع اختلاف داشته باشد؛ ۲) توالیEST باید تاخوردگی مناسب داشته و ساختار ثانویه ساقه-حلقه تشکیل دهد؛ ۳) miRNA بالغ باید در یک بازوی ساختار ثانویه سنجاق‌سری واقع شود؛ ٤) بیش از ٦ عدم تطابق بین miRNA بالغ پیش‌بینی شده و توالی miRNA مقابل در ساختار ثانویه وجود نداشته باشد و ٥) ساختار ثانویه پیش‌بینی شده باید MFE و MFEI منفی بالایی داشته باشد. همچنین ساختار ثانویه نباید دارای حلقه‌های چندشاخه باشد (Akpinar and Budak 2016).

برای تأیید آزمایشگاهی miRNA کاندید رقم قدس گندم نان از از بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و سه گونه اجیلوپس بومی ایران شامل اجیلوپس تائوشی (*Aegilops tauschii*)، اجیلوپس سیلندریکا (*Aegilops cylindrica*) و اجیلوپس کراسا (*Aegilops crassa*) از بانک ژن گیاهی ملی ایران تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. بذور این گیاهان پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ده درصد به مدت یک دقیقه در پتری دیش و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس پس از جوانه‌زنی به گلدان حاوی خاک سبک انتقال داده شد.

نمونه‌برداری از گیاهان در مرحله ٤ برگی و از اندام‌های ساقه و ریشه صورت گرفت. استخراج RNA به روش CTAB تغییر یافته (Barman et al. 2017) انجام پذیرفت. برای بررسی کیفیت و کمیت RNAها از نانودراپ NanoDrop 2000 (Thermo) استفاده شد. برای ساخت cDNA پس از تیمار RNAهای کل استخراج شده با DNase، از کیت YT4500 (یکتا تجهیز آزما) و آغازگرهای ساقه- حلقه[1] اختصاصی هر miRNA استفاده شد. ژن رفرنس جهت کنترل مثبت مورد استفاده در این تحقیق مربوط به یک ژن خانه‌دار[2] اختصاصی گندم بود (Paolacci 2008) که برای سنتز cDNA آن از پرایمرهای Oligo (dT) خود کیت استفاده شد. چرخه دمایی مورد استفاده جهت ساخت cDNA برای ژن رفرنس طبق پروتکل کیت و برای miRNAها به‌ترتیب شامل ١٦ درجه سانتیگراد (۳۰ دقیقه)، ٤٢ درجه (۳۰ دقیقه)، ۸۵ درجه (۵ دقیقه) و ٤ درجه (نگهداری) بود. واکنش Real time توسط دستگاه Rotor-Gene Q (QIAGEN) و از RealQ Plus 2X Master Mix Green (Ampliqon) استفاده شد. چرخه دمایی برای ژن رفرنس طبق پروتکل Master Mix Green و برای miRNAها طبق جدول ۱ بود. در هر واکنش نیز یک کنترل منفی (آب دیونیزه به‌جای cDNA) استفاده شد. آغازگرهای مورد نیاز برای ساخت cDNA و Real time PCR توسط نرم‌افزار Oligo 7 و پروتکل مربوطه (Chen 2005; Varkonyi 2007) طراحی شدند.

جدول ۱- چرخه دمایی مورد استفاده در Real time PCR مربوط به miRNAها

تعداد چرخه	دما (سانتی‌گراد)	زمان
۱	۹۵	۱۵ دقیقه
	۹۵	۲۰ ثانیه
	۵۵ myseq1	
٤۰	۵٦ myseq2	۳۰ ثانیه
	۵٦ myseq3	
	۷۲	۳۰ ثانیه
دمای ذوب	۹۵-۵۰	

[1] Stem loop primer
[2] House kipping

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]

تجزیه و تحلیل نتایج Real time PCR با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta}$ توسط نرم‌افزار REST انجام شد (Pfaffl et al. 2002). کلیه مراحل آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجام شد. از psRNATarget برای تعیین اهداف miRNAهای پیش‌بینی شده گندم نان استفاده شد. به این ترتیب که miRNAهای کاندید به‌عنوان جستجوگر در برابر دو کتابخانه cDNA گندم نان شامل *Triticum aestivum* (wheat), cDNA, Ensemble Plants, release 43 و *Triticum aestivum* (wheat), unigene. DFCI Gene Index (TAGI), version 12, released on 2010 استفاده شد و پارمترهای 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

شناسایی miRNAs بالقوه در گندم نان

برای شناسایی miRNAهای جدید گندم، از همولوژی miRNAهای مرجع در برابر ESTهای گندم نان استفاده شد. از مجموع ۱،۴۰۷،۴۴۰ توالی EST گندم نان، طی فرآیند BLASTn و BLASTx، به‌ترتیب توالی‌های غیرهمولوگ و کدکننده پروتئین حذف شد. در نهایت ۵۶ توالی کاندید برای بررسی ساختار ثانویه انتخاب شدند. بررسی ساختار ثانویه توالی‌های ESTهای کاندید نیز طبق معیارهای بیان‌شده انجام گرفت. در نهایت سه ساختار برای miRNA کاندید مناسب تشخیص داده شد که در شکل ۲ ساختار ساقه- حلقه آن‌ها نشان داده شده است. توالی سه miRNA جدید کاندید جهت شناسایی خانواده آن‌ها و 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 غیرکدشونده شناخته شده در این پایگاه وجود ندارند. سپس توالی miRNAهای کاندید شناسایی شده در پایگاه miRBase توسط BLASTn مورد جستجو قرار گرفت تا مشخص شود متعلق به چه خانواده‌ای هستند. در جدول ۳، مشخصات miRNAهای شناسایی شده آمده است.

جدول ۲- فهرست پرایمرهای مورد استفاده در ساخت cDNA و Real time PCR

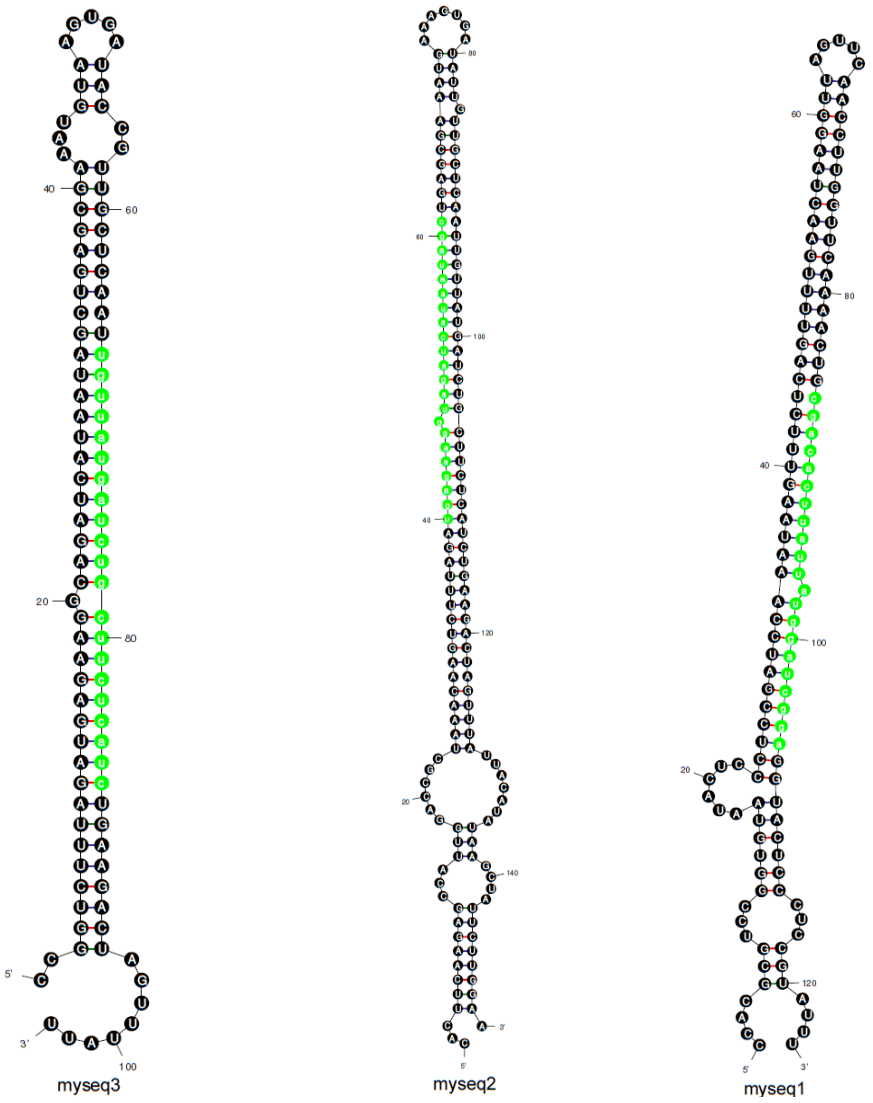
پرایمر	توالی (′3-′5)
myseq1-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCCGAT
myseq1-F	GGACTGCCCGACACTTATTATG
myseq2-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTATT
myseq2-F	ATGCCGTGAGAAGGTAGATCA
myseq3-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGATGAG
myseq3-F	GCTGTTGGTGTTATGATCTGCT
Universal	GTGCAGGGTCCGAGGT

جدول ۳- ویژگی‌های miRNAهای جدید شناسایی‌شده در گندم نان

ساختار	نام EST	طول ساقه- حلقه	توالی miRNA	طول miRNA	MFE (kcal/mol)	AMFE	MFEI	mismatch	(G+C) %	خانواده miRNA
myseq1	32691916	193	CGACACTTATTATGGATCGGA	21	-70.60	36.58	0.94	1	39	5181
myseq2	39556279	370	TGAGAAGGTAGATCATAATAGC	22	-102.06	27.58	0.75	1	37	9863
myseq3	70963288	229	TGTTATGATCTGCTTCTCATC	21	-73.77	32.21	0.81	1	40	9863

MFE (حداقل انرژی آزاد تاشدگی)، AMFE (حداقل انرژی آزاد تاخوردگی اصلاح‌شده) و MFEI (شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]



شکل ۲- ساختار ثانویه سنجاق‌سری پیش‌بینی شده برای سه miRNA گندم نان (miRNA بالغ با رنگ قرمز نشان داده شده است).

طبق جدول ۳، 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). 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. بررسی هم‌ردیفی توالی miRNAها در پایگاه miRBase نشان داد که آن‌ها به‌ترتیب متعلق به خانواده miR5181، miR9863 و miR9863 بودند که قبلاً در اجیلوپس تائوشی شناسایی شده بود. از آنجاکه اجیلوپس به‌عنوان خویشاوند نزدیک و دهنده ژنوم D گندم مطرح است، بنابراین گونه‌های اجیلوپس حاوی ژنوم D شامل تائوشی،

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]

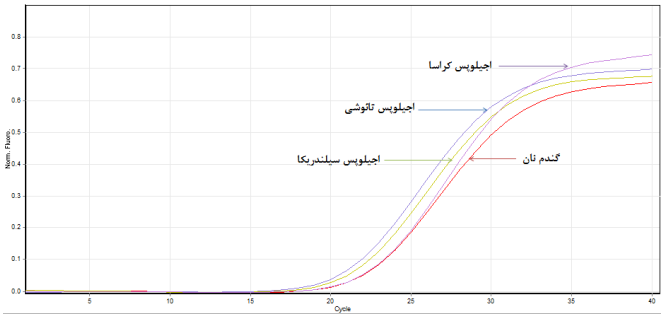
سیلندریکا و کراسا در تأیید آزمایشگاهی miRNAهای جدید به‌کار گرفته شدند.

تأیید آزمایشگاهی miRNAهای کاندید

به‌منظور تأیید حضور یا عدم حضور miRNAهای شناسایی شده در گندم نان و گونه های اجیلوپس، از Real time PCR استفاده شد و تنها وجود miRNA بالغ myseq2 در ساقه و ریشه گندم قدس و سه گونه اجیلوپس بومی ایران تأیید شد. در شکل ۳ و ٤ به‌ترتیب پیک‌ها و منحنی ذوب حاصل از تکثیر ناحیه myseq2 نشان داده شده است.

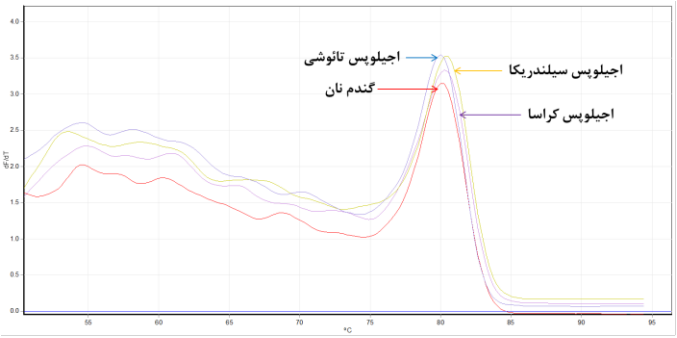
پیش‌بینی اهداف بالقوه miRNA شناسایی‌شده

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 محافظت‌شده آن‌ها را نیز در بر دارد (Zhang et al. 2006d). تعداد ۲۰٤ و ۵۷ ژن هدف به‌ترتیب در گندم نان و اجیلوپس تائوشی یافت شد. به‌طور کلی آنتولوژی ژن‌های هدف به سه دسته فرآیندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی قابل تقسیم است که در شکل ۵، به بررسی آنتولوژی ژن‌های هدف myseq2 در گندم نان و اجیلوپس تائوشی پرداخته شده است. فرآیندهای زیستی ژن‌های هدف در گندم و در اجیلوپس، بیشتر در مسیر سیگنالینگ پاسخ دفاعی به‌ویژه پاسخ فوق حساس[1] در باکتری‌ها شناسایی شدند. همچنین پاسخ سلولی به فقدان آب در گندم و فسفاتیدیلینوزول دفسفوریلاسیون، پاسخ به اشعه ماورابنفش (UV[2]) در اجیلوپس تائوشی از دیگر فرآیندهای زیستی ژن‌های هدف myseq2 بودند.



شکل ۳- منحنی تکثیر ناحیه miRNA شماره ۲ در ساقه گندم و گونه‌های مختلف اجیلوپس

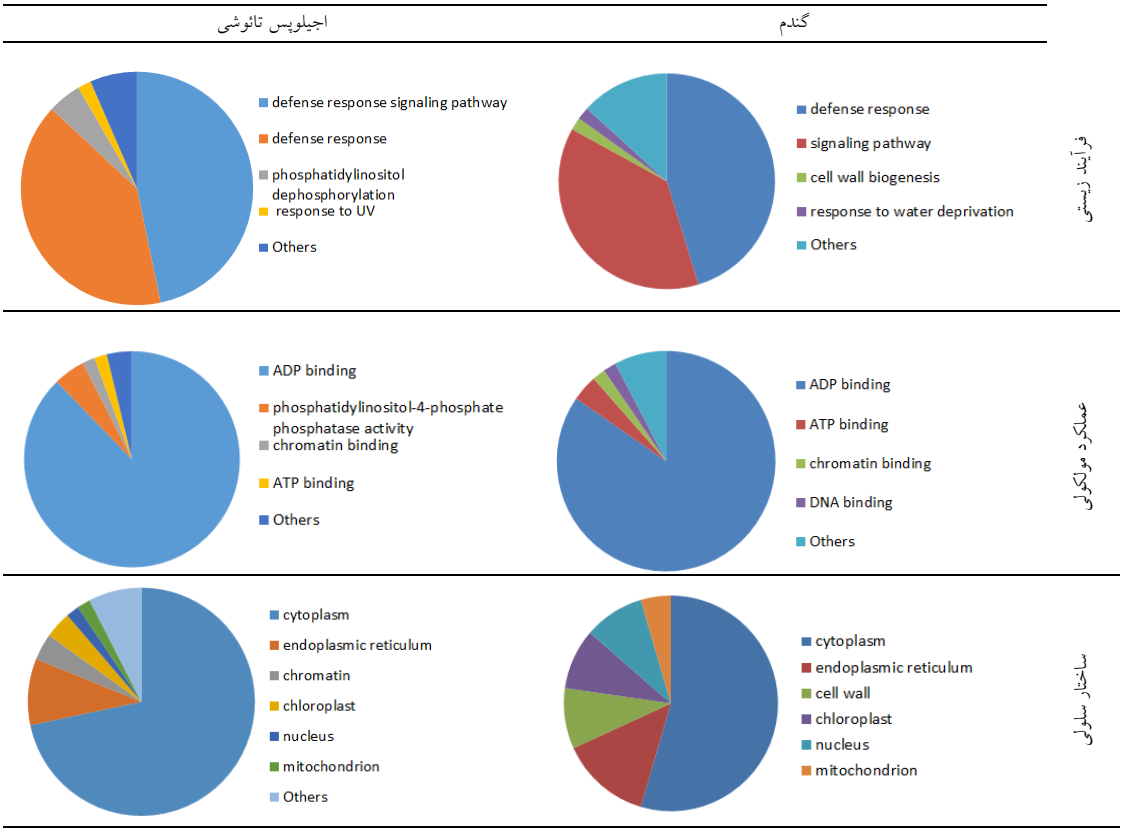
[1] hypersensitive
[2] Ultraviolent



شکل ٤- منحنی‌های ذوب حاصل از تکثیر ناحیه miRNA شماره ۲ در ساقه گندم و گونه‌های مختلف اجیلوپس

در هر دو گیاه گندم و اجیلوپس اکثر عملکرد مولکولی ژن‌های هدف معطوف به اتصال به ADP بود. فعالیت GTPase نیز از دیگر عملکرد مولکولی مشترک در گندم و اجیلوپس بود. همچنین فعالیت فسفاتیدیلینوزیتول -٤-فسفات فسفاتاز، اتصال به کروماتین، فعالیت‌های هیدرولازی و اکسیدوروکتاز نیز جزء عملکرد مولکولی ژن‌های هدف در اجیلوپس شناسایی شد. آنتولوژی ژن‌های هدف myseq2 از نظر ساختار سلولی در گندم و اجیلوپس تائوشی نشان داد که اکثراً در شبکه اندوپلاسمی، دستگاه گلژی (پوشش وزیکول) و فضای بین‌غشایی میتوکندری نقش دارند. از نظر پروتئین‌های کدشونده توسط ژن‌های هدف myseq2، اشتراک زیادی بین گندم و اجیلوپس تائوشی وجود داشت. اکثر پروتئین‌هایی که توسط ژن‌های هدف myseq2 در گندم و اجیلوپس تولید می‌شوند، مربوط به خانواده RGA از جمله RGA1، RGA2، RGA4 و RGA5 بودند که در مقاومت به پاتوژن‌های بیماری‌زا از قبیل بلایت و زنگ شناخته شده است (Periyannan et al. 2013; Césari et al. 2014). پروتئین‌های مشترک دیگر شامل PIK و دومین AAA است که اولی در مقاومت به بیماری بلاست (Ashikawa et al. 2012) و دومی که یک دومین ATPase است در فعالیت‌های مختلف سلولی مانند باز شدن تاخوردگی پروتئین‌ها دخیل است (Ogura and Wilkinsonand 2001). یکی از پروتئین‌های اصلی دیگر در گندم NB-ARC بود که دومین ATPase برای تنظیم فعالیت پروتئین R در مقاومت به پاتوژن‌ها در گیاهان است (Ooijen et al. 2008).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]



شکل ۵- آنتولوژی ژن‌های هدف myseq2 در گندم نان (A) و اجیلوپس تائوشی (B)

علاوه بر پروتئین‌های دخیل در مقاومت به بیماری، پروتئین‌هایی دیگری نیز در اجیلوپس تائوشی یافت شدند که در تنش‌های غیرزیستی نقش داشتند که از جمله آن‌ها می‌توان به فسفاتاز SAC8 اشاره کرد که در تنش‌های شوری، سرما و اسمزی در گیاهان فعال هستند (Williams et al. 2005).

بحث

در این مطالعه شناسایی miRNA بالقوه جدید در گندم نان مورد نظر بود و از یک روش جستجوی مبتنی بر تشابه روی EST برای این‌کار استفاده شد. در نهایت سه miRNA جدید از این روش شناسایی شد که یکی از آن‌ها مورد تأیید آزمایشگاهی قرار گرفت. با توجه به مواد گیاهی مورد استفاده، علت این‌که دو miRNA دیگر تأیید نشدند ممکن است به‌دلیل بیان آن‌ها در بافت‌های دیگر به‌غیر از ساقه و ریشه یا زمان پس از مرحله گیاهچه‌ای باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که miRNAها اختصاصی عمل می‌کنند و در بافت، زمان رشد و شرایط محیطی مختلف، miRNA خاصی تولید و بیان می‌شوند. تاکنون چندین miRNA گیاهی با استفاده از رویکردهای بیوانفورماتیکی یا روش آزمایشگاهی شناسایی شده است، اما در خصوص گندم نان به‌خصوص با اندازه ژنوم بزرگی که دارد، miRNA نسبتاً کمی شناسایی شده است. روش‌های بیوانفورماتیکی متعددی برای شناسایی miRNAها در گیاهان، جانوران و حتی میکروارگانیسم‌ها وجود دارد که هرکدام دارای مزایایی هستند، اما روش مبتنی بر تجزیه و تحلیل EST که در این تحقیق مورداستفاده قرار گرفت، مزیت‌های نسبی بر دیگر روش‌ها دارد (Frazier et al. 2011; Zhang et al. 2008). به‌طور عمومی، فراوانی miRNA در EST حدود ۰/۰۱ درصد (۱ در ۱۰،۰۰۰ EST) است (Zhang et al. 2006d) است، اما در مورد گندم نان حدود ۰/۰۰٤ درصد بود. دلیل این امر این می‌تواند باشد که توالی‌های EST استخراج‌شده از پایگاه داده اغلب از بافت‌های برگ، سنبله و سایر اندام‌های هوایی بوده، در حالی‌که پژوهش‌ها نشان می‌دهد miRNAها در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]

ریشه و مریستم انتهایی بیش از قسمت‌های دیگر گیاهان بیان می‌شود (Breakfield et al. 2012).

حضور توالی myseq2 علاوه بر گندم قدس، در ساقه اجیلوپس تائوشی، سیلندریکا و کراسا نیز تأیید شد. وجود miRNAهای مشترک در گندم و اجداد وحشی آن می‌تواند به نوعی تأیید کننده روابط تکاملی بین آن‌ها باشد. بدین صورت که به‌نظر می‌رسد توالی miRNAها در طول تکامل به‌صورت محافظت‌شده باقی‌مانده و در تکامل گندم نان از اجیلوپس‌های حاوی ژنوم D به ارث رسیده است. برای پی بردن به نقش miRNAها در عملکردهای مختلف سلولی، شناسایی ژن‌های هدف miRNAها، یک مرحله مهمی می‌باشد. در این تحقیق، اغلب ژن‌های هدف myseq2 بر روی مقاومت به بیماری‌های مختلف (تنش زیستی) تأثیر داشتند. با این حال برخی ژن‌های هدف نیز در مقاومت به تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش خشکی نقش داشتند. برخی از miRNAها بر عوامل رونویسی که به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم بر رشد و تکامل نقش دارند و برخی روی ژن‌های خاصی که کنترل متابولیسم گیاهان را بر عهده دارند، تأثیر می‌گذارند (Zhang et al. 2006a). در کل پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNA شناسایی شده نشان می‌دهد که بیش از یک ژن توسط هر miRNA تنظیم می‌شود که این نتیجه مشابه با تحقیقات اخیر در سایر گونه‌های گیاهی (Jones-Rhoades and Bartel 2004; Zhang et al. 2006b) است. بنابراین به‌نظر می‌رسد تحقیقات miRNA بیشتر باید بر روی شبکه‌های تنظیمی متمرکز شود. مشکلات بیان ژن مخصوصاً ژن‌های miRNA که نقش تنظیمی داشته و در بافت‌های مختلف و زمان‌های خاصی بیان می‌شوند، از چالش‌های این تحقیق بود. بنابراین تعریف موضوعاتی که بافت‌های مختلف و زمان‌های رشد و نمو گیاه را در برگیرد، به درک بهتر بیان ژن‌های miRNA کمک می‌کند. همچنین با توجه به وجود تعداد زیاد miRNAهای کاندید، استفاده همزمان از روش‌های محاسباتی مبتنی بر همولوژی توالی‌ها می‌تواند موجب صرفه‌جویی در هزینه و افزایش سرعت در شناسایی miRNAها شود. یافته‌های این تحقیق می‌تواند به غنی‌تر کردن اطلاعات miRNAهای گندم و خویشاوندان نزدیک آن کمک کرده و در طرح‌های اصلاحی مبتنی بر استفاده از miRNAها مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

منابع

Achakzai HK, Barozai MYK, Din M, Baloch IA and Achakzai AKK (2018) Identification and annotation of newly conserved microRNAs and their targets in wheat (*Triticum aestivum* L.) PLoS ONE 13: e0200033.

Akpinar BA and Budak H (2016) Dissecting miRNAs in Wheat D Genome Progenitor, *Aegilops tauschii*. Front. Plant Science 7: 606.

Akter A, Islam M, Mondal SI, Mahmud Z, Jewel NA, Ferdous S, Amin R and Rahman M (2014) Computational identification of miRNA and targets from expressed sequence tags of coffee (*Coffea arabica*) Saudi Journal of Biological Sciences 21: 3–12.

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.

Ambros V, Chen XM (2007) The regulation of genes and genomes by small RNAs. Development 134: 1635-1641.

Ashikawa I, Hayashi N, Abe F, Wu J, Matsumoto T (2012) Characterization of the rice blast resistance gene Pik cloned from Kanto51." Molecular Breeding 30: 485-494.

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.

Breakfield NW, Corcoran DL, Petricka JJ, Shen J, Sae-Seaw J, Rubio-Somoza I, Weigel D, Ohler U, Benfey PN (2012) High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in Arabidopsis. Genome research 22: 163-176.

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

Césari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, Shimamoto K, Dodds P, Terauchi R, Kroj T (2014) The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. EMBO Journal 33: 1941-59.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. Nucleic Acids Research 33: 20 e179.

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

Chen XM (2005) MicroRNA biogenesis and function in plants. FEBS Letters 579: 5923-5931.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]

Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2018) psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server. Nucleic Acids Research 46: W49–W54.
Frazier TP, Sun G, Burklew CE, Zhang B (2011) Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. Molecular Biotechnology 49: 159-165.
Frazier TP, Xie F, Freistaedter A, Burklew CE, Zhang B (2010). Identification and characterization of microRNAs 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.
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.
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, Argasinska J, Quinones-Olvera N, Nawrocki EP, Rivas E, Eddy SR, Bateman A, Finn RD, Petrov AI (2017) Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. Nucleic Acids Research. 10.1093/nar/gkx1038.
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.
Kwak PB, Wang QQ, Chen XS, Qiu CX, Yang ZM (2009) Enrichment of a set of microRNAs during the cotton fiber development. BMC Genomics 10: 457.
Ng Kwang LS, Mishra SK (2007) Unique folding of precursor microRNAs: quantitative evidence and implications for de novo identification. RNA 13: 170-187.
OECD-FAO AGRICULTURAL OUTLOOK 2018-2027 © OECD/FAO (2018) http://www.fao.org/3/i9166e/i9166e_Chapter3_Cereals.pdf
Ogura T, Wilkinson AJ (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. Genes Cells 6:575-97. Ooijen GV, Mayr G, Kasiem MMA, Albrecht M, Cornelissen BJC, Takken FLW (2008) Structure–function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins, Journal of Experimental Botany 59: 1383-1397.
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*. Current Biology 12: 1484-1495.
Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E and Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Molecular Biology 10: 11.
Periyannan S, Moore J, Ayliffe M, Bansal U, Wang X, Huang L, Deal K, Luo M, Kong X, Bariana H, Mago R, McIntosh R, Dodds P, Dvorak J, Lagudah E (2013) The gene Sr33, an ortholog of barley Mla genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99. Science 16:341:786-8.
Pfaffl MW, Horgen GW and Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 30: 9 e36.
Song C, Fang J, Li X, Liu H, Thomas CC (2009) Identification and characterization of 27 conserved microRNAs in citrus. Planta 230: 671-685.
Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant Methods 3: 12.
Wang L, Liu H, Li D, Chen H (2011) Identification and characterization of maize microRNAs involved in the very early stage of seed germination. BMC Genomics 12: 154.
Wang M, Wang Q, Wang B (2012) Identification and characterization of MicroRNAs in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.) PLoS ONE 7: e33696.
Wei B, Cai T, Zhang R, Li A, Huo N, Li S, Gu YQ, Vogel J, Jia J, Qi Y, Mao L (2009) Novel microRNAs uncovered by deep sequencing of small RNA transcriptomes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and (*Brachypodium distachyon* L.) Beauv. Functional anf Integrative Genomics, 9: 499-511.
Williams ME, Torabinejad J, Cohick E, Parker K, Drake EJ, Thompson JE, Hortter M, DeWald DB (2005) Mutations in the Arabidopsis Phosphoinositide Phosphatase Gene SAC9 Lead to Overaccumulation of PtdIns(4,5) P2 and Constitutive Expression of the Stress-Response Pathway. Cell biology and signal transduction.
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 X, Stellwag EJ (2008) Identification of soybean microRNAs and their targets. Planta 229: 161-182.
Zhang BH, Pan XP, Cobb GP, Anderson TA (2006a) Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. Developmental Biology 16: 289.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]

Zhang BH, Pan XP, Cobb GP, Anderson TA (2006b) Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. FEBS Letters 580: 3753-3762.
Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA (2006c) Evidence that miRNAs are different from other RNAs. Cellular and Molecular Life Sciences 63: 246.
Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA (2006d) Conservation and divergence of plant microRNA genes. Plant Journal 46: 243-259.
Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA, (2005) Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. Cell Research 15: 336-360.
Zhang BH, Wang Q, Pan X (2007) MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. Journal of Cellular Physiology 210: 279-289.
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 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.2.0]