

شناصایی و تعیین خصوصیات میکروRNAهای حفاظت شده در ریشه گیاه ریواس (*Rheum ribes*)

Identification and characterization of conserved microRNAs in Rheum ribes root (*Rheum ribes*)

سید اسعد تفسیری^۱، احمد اسماعیلی^{*}^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۱، محمد مجדי^۲

۱- بهترتبه دانشجوی دکتری، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Tafsiri SA¹, Ismaili A^{*1}, Nazarian Firouzabadi F¹, Majdi M²

۱- PhD Student, Professor, Professor, Department of Plant Production and Genetics,
Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

۲- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of
Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱)

چکیده

ما (میرناها) دسته‌ای از مولکول‌های RNA کوتاه غیر کدکننده، با طولی حدود ۲۴-۱۸ نوکلئوتید هستند که ژن‌های هدف را در سطح پس از رونویسی کنترل می‌کنند. هیچ‌گونه گزارشی از شناصایی میرناها در گیاه ریواس ثبت نشده است. لذا در مطالعه حاضر به منظور پیش‌بینی میرناهای حفاظت شده بالقوه و ژن‌های هدفشان در ریشه گیاه ریواس، RNA کل از بافت ریشه استخراج شد و مورد توالی‌بایی قرار گرفت. سپس رونوشت‌های غیرکننده پروتئین شناصایی شدند و به عنوان توالی‌های نامزد پیش‌ساز میرنا در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ۴۷۰۲ رونوشت از گیاه ریواس به روش سرهمندی نوپدید ایجاد شد. با جستجوی همولوژی این رونوشت‌ها با پایگاه داده mirbas و پیش‌بینی ساختار ثانویه، ۴ میرنا محافظت شده متعلق به خانواده‌های mir396، mir164، mir168 و mir319 شناصایی شدند. ۵۷۴ رونوشت از ترانسکریپتوں ریشه ریواس توسط این میرناها مورد هدف قرار گرفتند. در مجموع با توجه به نقش تنظیمی میرناهای شناصایی شده بر طیف وسیعی از ژن‌ها، می‌توان از این میرناها در شناصایی ژن‌های مرتبط با متابولیت‌های ثانویه بهره برد.

واژه‌های کلیدی

ریواس

ساختار ثانویه

میرنا

هستی شناصایی ژن

Rheum ribes

مقدمه

با ورود ساختار دو رشته‌ای به سیتوپلاسم و تشکیل کمپلکس خاموشی القا شده (RISC)، ساختار تک رشته و بالغ میرنا ایجاد می‌شود (Du and Zamore 2005). تاکنون تعداد زیادی میرنا به همراه ژن‌های هدف‌شان در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده است (Gleave et al. 2008; Payriz et al. 2022; Sohrabi et al. 2012; Wang et al. 2012; Wang et al. 2020; al. 2020). روش‌های بیوانفورماتیکی که از ویژگی حفاظت‌شدگی بالای میرناها در گونه‌های گیاهی استفاده می‌کنند، روش مناسبی برای شناسایی میرناها می‌باشند. در این روش، بهمنظور شناسایی میرناهای حفاظت شده بالقوه، از بلاست پایگاه داده میرناهای شناسایی شده (<http://www.mirbase.org>) در مقابل پایگاه داده‌های موجود برای گیاه مورد نظر استفاده می‌شود (Gleave et al. 2008; Wang et al. 2012).

تاکنون هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد میرنا برای گیاه ریواس ثبت نشده است. از این‌رو هدف تحقیق حاضر توسعه داده‌های ترسیکریپتومی ریواس و شناسایی میرناهای حفاظت شده برای اولین بار از طریق تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ریشه‌های گیاه ریواس که هیچ گونه عالیم بیماری نداشتند از کوههای تیتور ($46^{\circ}52'41''_E$, $35^{\circ}24'42''_N$) واقع در ارتفاعات اطراف شهر ستندج در استان کردستان در اوایل فصل تابستان جمع‌آوری شدند. بعد از برداشت، نمونه‌ها تمیز و شسته شدند و به قطعات کوچک‌تری تقسیم و با ازت مایع فریز شدند و تا قبل از استفاده در دمای -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA کل از دو تکرار ریشه گیاه ریواس بر طبق پروتکل گزارش شده توسط Morante-Carriel و همکاران با اندکی تغییرات استخراج شد (Morante-Carriel et al. 2014). برای استخراج RNA، از روش CTAB و رسوب‌دهی با لیتیم کلراید به مدت ۲ شبانه‌روز استفاده شد که به‌طور مطلوبی باعث جداسازی RNA از DNA شد. پس از مراحل جداسازی و شستشو، RNA رسوب یافته در ۴۰-۳۰ میکرولیتر آب دپس (Diethyl pyrocarbonate, DEPC) حل شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز ۱ درصد و با تعیین نسبت جذب نور با نسبت‌های

ریواس (*Rheum ribes*) گیاهی گلدار متعلق به خانواده پلی‌گوناسه (*Polygonaceae*) می‌باشد (Cullen 1966). مطالعات داروشناسی نشان داده است که بیشتر قسمت‌های گیاه ریواس در طب سنتی به کار می‌رود. خواص دارویی ریشه گیاه ریواس بیشتر از دیگر اندام‌های گیاه می‌باشد که برای درمان دیابت به کار می‌رود (Al-Shammari et al. 2020; Çınar Ayan et al. 2021) همراه با خواص سیتو توکسی و آنتی‌اکسیدان (Hamzeh et al. 2014; Naqishbandi et al. 2009; ÖzTÜRK et al. 2007; Raafat et al. 2021; Uyar et al. 2014) مطالعات قبلی اثبات کرده است که ریواس متابولیت‌های ثانویه فراوانی شامل استیبلین‌ها، ترپن‌وئیدها، فلاونوئیدها و آنتراکینون‌ها را تولید می‌کند (Amiri et al. 2015; Çınar Ayan et al. 2021; Morozova et al. 2009; Shendure and Ji) (ÖzTÜRK et al. 2007 2008). مطالعات پیشین بیشتر روی ترکیبات شیمیایی و خواص دارویی گیاه ریواس متمرکر بوده‌اند و در سطح مولکولی پیشرفت‌های اندکی حاصل شده است.

توالی‌یابی نسل جدید تکنیک بسیار ارزشمندی جهت تسريع شناسایی ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی در گیاهان غیرمدل و بدون توالی ژنوم مرجع می‌باشد. در سال‌های اخیر، همزمان با پیشرفت‌های چشمگیر در فنون توالی‌یابی، استفاده از روش‌های محاسباتی برای دستورالعمل داده‌های با مقیاس وسیع ضروری می‌باشد (Jacob et al. 2016). یکی از مهم‌ترین ژن‌های کلیدی مؤثر در اغلب شبکه‌های ژنی، میرناها هستند (Jagadeeswaran et al. 2009). این کلام از RNAهای غیرکدکننده از طریق فرآیند تداخل RNA، بیان بسیاری از ژن‌ها را در سطوح مختلف از جمله رونویسی، پردازش، پایداری RNA و ترجمه، از طریق جفت شدن با نواحی مکمل خود در mRNA هدف، تنظیم می‌کنند (Jung et al. 2009). یک ژن میرنای اولیه (pri-miRNA) گیاهی، معمولاً دارای یک ساختار ساقه - حلقه می‌باشد که در اولین مرحله از پردازش درون هسته‌ای، ساختار ساقه توسط آنزیم RNase III بریده شده و ساختار pre-miRNAs ایجاد می‌شود. در دومین مرحله از پردازش، حلقه انتهایی بریده شده و توالی دو رشته‌ای با طول متوسط ۱۸-۲۴ نوکلئوتید ایجاد می‌شود. در انتها

پایگاه داده پروتئین‌های غیر تکراری (NCBI) None Redundant (protein database, NR X) با پارامتر $\leq e^{-5}$, بلاست شدن و رونوشت‌هایی که در این پایگاه رکورد داشتند، حذف شدند.

شباهت بالای رونوشت‌های نامزد با توالی‌های میرنای بالغ به تنهایی برای اعتبارسنجی میرنای شناختی شده کافی نمی‌باشد. بنابراین نحوه تاخورده‌گی و میزان انرژی آزاد ساختار میرنای اولیه CLC Genomic Workbench ver.21 رونوشت‌های کاندید با استفاده از نرم‌افزار Roonoشت‌های Workbech ver.21 مورد بررسی قرار گرفت. به منظور اطمینان از قرارگیری توالی میرنای بالغ در محل صحیح احتمالی خود در ساختار پیش‌ساز میرنا، محدوده ۱۰۰ نوکلئوتید در بالادست و پایین‌دست مختصات میرنای شناختی شده از توالی رونوشت‌های Quinlan and Hall 2010 استخراج شد (Bedtools). توالی‌های استخراج شده به عنوان ورودی برای نرم‌افزار CLC مورد استفاده قرار گرفتند. توالی‌هایی که دارای ساختار ساقه-حلقه مناسب و همچنین در یکی از بازوها شامل توالی میرنای بالغ بودند، به عنوان میرنای احتمالی شناخته شده و مورد بررسی قرار گرفتند. از پارامترهای: ۱- ساختار دوم با تاخورده‌گی مناسب و شامل ساختار ساقه حلقه، ۲- وجود توالی میرنای بالغ در یک بازو در ناحیه ساقه، ۳- عدم شکستگی در حلقه ساختار میرنا، ۴- حداقل ۶ جفت نوکلئوتید غیر منطبق در ساختار میرنا و ۵- حداقل اندازه گپ در ساختار میرنا نوکلئوتید، به منظور فیلتر کردن و شناختی میرناها استفاده شد (Li et al. 2014; Mehta et al. 2016; Zhang et al. 2006).

تعیین صحت ساختار میرنای احتمالی از پارامترهای درصد GC/AU، حداقل انرژی آزاد تاخورده‌گی (MFE)، حداقل انرژی آزاد تاخورده‌گی تصحیح شده (AMFE)، و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخورده‌گی (MFEI) استفاده شد (روابط ۱، ۲ و ۳).

$$\text{MFE} = -\Delta G(\text{kcal/mol}) \quad \text{رابطه ۱}$$

$$\text{AMFE} = \frac{1}{100} \times (\text{طول میرنای پیش ساز} \div \text{MFE}) \quad \text{رابطه ۲}$$

$$\text{MFEI} = (\text{AMFE} \div (\text{GC}\%)) \quad \text{رابطه ۳}$$

شناختی ژن‌های هدف میرناهای شناختی شده با استفاده از ابزار psRNATarget با پارامترهای پیش‌فرض صورت گرفت (Dai and Zhao 2011). تفسیر عملکردی رونوشت‌های هدف میرناهای

A260/280 و A260/230 با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودرایپ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) ارزیابی شد. سپس RNAهای با کیفیت بالا برای توالی‌بایی به شرکت Novogene-Advancing Genomics, Improving Life, (Beijing, China) فرستاده شدند.

برای ساخت کتابخانه cDNA از هر نمونه ۳ میکروگرم RNA تام با درجه یکپارچگی (RNA Integrity Number, RIN) بیشتر از ۷ مورد استفاده قرار گرفت. کتابخانه‌های cDNA با استفاده از Illumina TruSeq™ RNA (Illumina, San Diego, CA, USA) طبق پروتکل شرکت سازنده ایجاد شدند، و در نهایت کتابخانه‌ی رونوشت برای هر نمونه با استفاده از Novogene-Advancing Illumina NovaSeq 6000 (Genomics Improving Life, Beijing, China) پلاتفورم و خوانش‌های خوانده شده از هر دو انتهای با طول ۱۵۰ جفت باز ایجاد شدند.

خوانش‌های کم کیفیت با تعداد بازهای N زیاد و خوانش‌هایی با نمره کیفیت باز کمتر از Q30 با استفاده از برنامه Trimmomatic (Bolger et al. 2014) حذف شدند و خوانش‌های باکیفیت با استفاده از برنامه Trinity سرهم‌بندی شدند (Grabherr et al. 2011; Haas et al. 2013) به منظور حذف توالی‌های سرهم‌بندی شده تکراری با آستانه شباهت ۹۰ درصد، از نرم‌افزار (v4.6.8) Li and Godzik 2006 استفاده شد (CD-HIT-EST).

رونوشت‌های حاصل از سرهم‌بندی نوپدید به عنوان منبعی برای شناختی میرناهای محافظت شده مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور همه توالی میرناهای ثبت شده گیاهی که شامل ۱۰۴۱۱ توالی میرنای بالغ بود از پایگاه mirbase به آدرس http://www.mirbase.org دانلود شدند. به منظور حذف توالی‌های تکراری میرنا از نرم‌افزار (v4.6.8) CD-HIT-EST با آستانه شباهت ۱۰۰ درصد استفاده شد (Li and Godzik 2006). سپس برای شناختی رونوشت‌هایی که بیشترین شباهت را با توالی‌های میرنای بالغ دارند از ابزار Blastn با پارامترهای $\leq e^{-5}$ و E-value < 4 استفاده شد. از توالی میرناهای بالغ دانلود شده به عنوان ورودی (Query) و از توالی‌های رونوشت به عنوان پایگاه مورد جستجو استفاده شد. سپس همه رونوشت‌های نامزد بر علیه

رونوشت‌ها علیه این پایگاه داده استفاده شد. از رونوشت‌های نامزد، برای ۳۴ رونوشت در پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری NCBI رکوردي یافت نشد. مطالعه مشابهی که با هدف شناسایی میرناهای محافظت‌شده در گیاه گشنیز صورت گرفته بود، کارایی بالای داده‌های RNA-Seq و سرهم‌بندی نوپدید آن‌ها برای شناسایی میرناهای محافظت‌شده را تایید کرده است (Mir 2019 Drikvand et al.). انتخاب میرناهای محافظت‌شده تنها بر اساس معیار همولوژی نتایج مطلوبی به همراه نخواهد داشت، بنابراین ساختار ثانویه رونوشت‌های شامل میرناهای احتمالی (Hammond 2015; Xie et al. 2010). ساختار ثانویه توالي‌های نامزد از نظر تناسب ساختار ساقه-حلقه و محل قرارگیری توالي میرنای بالغ در ساختار ثانویه پیش‌بینی شده، در مرحله نخست کنترل شد. در مرحله بعدی توالي‌های حذف شدنده که از نظر مقدار حداقل فاصله و تعداد نوکلئوتید غیر منطبق در ساختار، نامطلوب شناسایی شدند. از مجموع توالي‌های مورد بررسی و بر اساس پارامترهای AU و MFEI، ۴ میرنا محافظت شده متعلق به خانواده‌های mir396 و mir164، mir319 و mir168 شناسایی شدند (جدول ۱، شکل ۱). مطالعه‌ای که جهت شناسایی میرنا روی گیاه ذرت صورت گرفته بود، نشان داد که خانواده‌های mir396، mir164 و mir 168 در بافت ریشه‌های جوان بیشتر بیان شده است (Zhang et al. 2009) که با نتایج مطالعه ما در شناسایی این میرناها در ریشه مطابقت دارد. مطالعه دیگری روی شبدر نشان داد که فوق بیان mir396 باعث سرکوب ژن‌های سیکل سلولی و در نتیجه کاهش رشد ریشه می‌شود (Bazin et al. 2013). مطالعه دیگری در گیاه آراییدوپسیس نشان داد که mir396 در پاسخ به تنش خشکی نقش دارد (Lelandais-Brière et al. 2009). در مطالعه‌ای که روی گیاه برنج انجام گرفت، دریک موتانت حساس به اکسین، افزایش بیان میرناهای وابسته به اکسین مانند mir164 منجر به کاهش ریشه‌های نابجا و جانبی و نقص کلاهک ریشه شد (Meng et al. 2009). مطالعه‌ای روی گندم نشان داد که mir164 با هدف‌گیری فاکتور رونویسی NAC باعث تنظیم نمو ریشه و تحمل به تنش‌های زنده می‌شود (Qing et al.

شناسایی شده با استفاده از ابزار بلاست X علیه پایگاه None Redundant protein (NCBI) (database, NR E-value < 1.0E⁻⁵) با در نظر گرفتن حد آستانه^۵ (Altschul et al. 1997). تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های هدف میرناهای شناسایی شده با استفاده از ابزار Conesa et al. 2005 (Blast2Go) انجام گرفت (Kanehisa and Goto 2000) (http://www.genome.jp/kegg/kaas/) با استفاده از سرور KEGG orthology (KO) و نقشه‌بازی رونوشت‌ها به مسیرهای KEGG با روش (Moriya et al. 2007) (bidirectional best hit) BBH

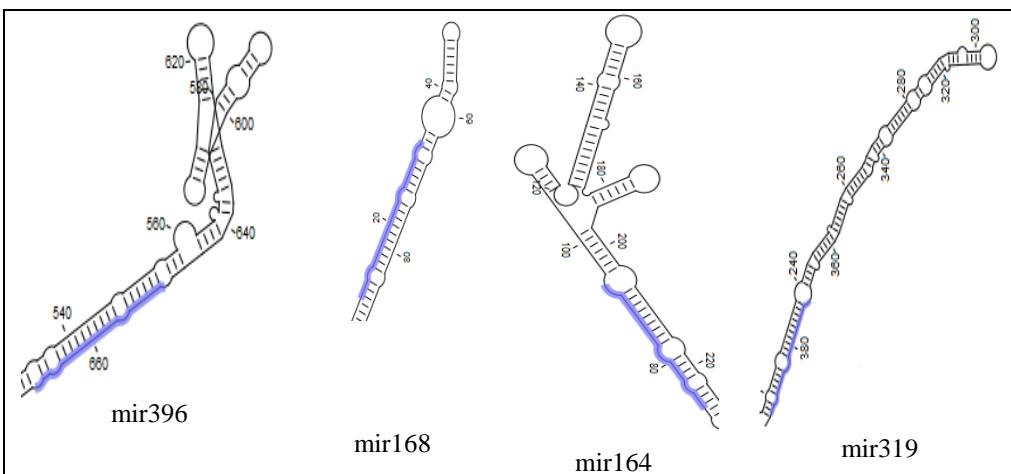
نتایج و بحث

توالی‌بازی رونوشت و سرهم‌بندی نوپدید: دو کتابخانه cDNA از RNA کل ریشه‌های گیاه ریواس ایجاد شد. کتابخانه‌ها با استفاده از پلتفرم Illumina NovaSeq 6000 توالی‌بازی شدند. تقریباً ۸۳/۶۴ گیگابایت داده (تقریباً ۲۷۸ میلیون خوانش) از خوانش‌های جفتی ۱۵۰ جفت بازی ایجاد شد. بیش از ۹۴ درصد از خوانش‌ها کیفیت بیشتر از Q30 داشتند. پس از حذف آداتورها و خوانش‌های کم کیفیت، ۱۶۴۸۷۸۹۶۸ و ۱۱۳۹۳۹۰۶ خوانش Trinity ایجاد شد. همه این خوانش‌ها با استفاده از برنامه سرهم‌بندی نوپدید شدند. در مجموع ۱۰۹۲۹۷ رونوشت ایجاد شد که طول آن‌ها از ۳۰۰ تا ۱۷۳۵۷ جفت باز متغیر بود. پس از حذف توالی‌های تکراری با آستانه همسانی ۹۰٪ با استفاده از نرمافزار CD-HIT، ۸۲۰۴۷ رونوشت باقی ماند که از این رونوشت‌ها برای شناسایی میرناها استفاده شد.

شناسایی میرناهای حفاظت شده: نتایج بلاست نشان داد که از ۸۲۰۴۷ رونوشت مورد جستجو علیه همه میرناهای گیاهی موجود در پایگاه mirBase ۱۴۲ رونوشت منحصر به فرد با میرناهای گیاهی مطابقت داشتند. برای حذف رونوشت‌هایی که دارای رکورد در پایگاه پروتئین‌های غیر تکراری None (NCBI) بودند از بلاست X (Redundant protein database, NR

غیر مستقیم با تأثیر بر بیان میرناهای دیگر، سازگاری به تنفس شوری در گیاهان را تنظیم می‌کند.

(2022). Mir168 که یک میرنای حفاظت شده در بین گونه‌های مختلف گیاهی می‌باشد، با هدف‌گیری آرگونات (AGO1) به طور



شکل ۱- ساختار پیش‌ساز برای ۴ میرنای شناصایی شده در ترانسکریپtom ریشه ریواس. قسمت‌های آبی رنگ مربوط به توالی‌های میرنای بالغ می‌باشد.

جدول ۱- ویژگی‌های میرنای شناصایی شده در ریشه گیاه ریواس

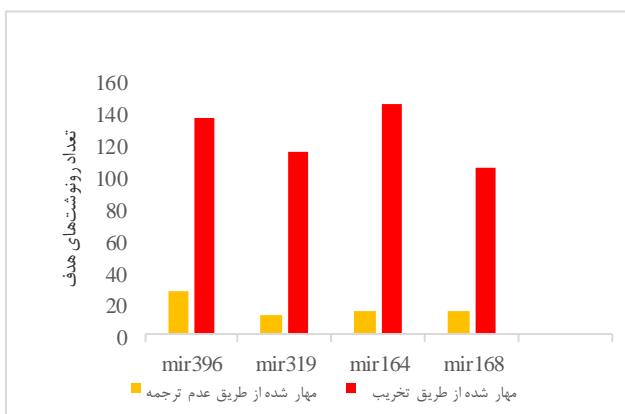
نام میرنای شناصایی شده	Mir168	Mir164
طول رونوشت پیش‌ساز	۳۹۷	۴۴۶
محل قرار گرفتن میرنا روی رونوشت	۱۰-۳۱	۷۳-۹۳
پیش‌ساز		
طول توالی پیش‌ساز میرنا	۷۸	۱۵۳
توالی میرنای شناصایی شده	UCGCUUGGUGCAGGUCCGGAAC	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA
طول میرنای شناصایی شده	۲۲	۲۱
GC درصد	۶۳/۶	۶۱/۹
AU درصد	۳۶/۴	۳۸/۰۹
MFE(kcal/mol)	۳۷/۵	۵۲/۹
AMFE	۴۸/۰۷	۳۴/۰۷
MFEI	۰/۷۵	۰/۵۶
نام میرنای شناصایی شده	Mir319	Mir396
طول رونوشت پیش‌ساز	۱۰۹۰	۹۲۷
محل قرار گرفتن میرنا روی رونوشت	۳۷۲-۳۹۲	۶۷۰-۱۸۴
پیش‌ساز		
طول توالی پیش‌ساز میرنا	۱۷۷	۱۳۷
توالی میرنای شناصایی شده	UGGACUGAAGGGAGCUCCCUC	GUUCAAGAAAGCUGUGGAAAA
طول میرنای شناصایی شده	۲۱	۲۱
GC درصد	۶۱/۹	۳۸/۰۹
AU درصد	۳۸/۰۹	۶۱/۹
MFE(kcal/mol)	۸۷/۷	۴۳/۸
AMFE	۴۹/۵	۳۱/۹۷
MFEI	۰/۸	۰/۸۴

کربوهیدرات" به ترتیب با تعداد ۲۱، ۲۱، ۱۹ و ۸ رونوشت بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (شکل ۳-ب). و در زمینه اجزای سلولی (Cellular Component)، گروههای "کلروپلاست"، "غشاء پلاسمایی"، "سیتوپلاسم" و "اجزای غشاء داخلی" به ترتیب با تعداد ۴۲، ۴۳، ۲۱ و ۱۰ رونوشت بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (شکل ۳-ج).

KEGG یک پایگاه داده مرتبط با مسیرهای بیوشیمیایی است که اطلاعات عملکردهای ژنومیک، شیمیایی و سیستمیک را با همدیگر ادغام می‌کند. KEGG حاوی آنالیز سیستماتیک مسیرهای متابولیکی و عملکردهای محصولات ژن می‌باشد که به مطالعه Gao et al. (2013; Kanehisa et al. 2012) رفتارهای بیولوژیکی ژن‌ها کمک شایانی کرده است (Gao et al. 2013; Kanehisa et al. 2012). آنالیز مبتنی بر مسیر به درک عملکرد ژن‌ها و شناسایی رونوشت‌های مختلف در گیر در مسیرهای بیوسنتزی گوناگون کمک خواهد کرد. در این مطالعه آنالیز مسیر KEGG روی رونوشت‌های هدف میرناهای شناسایی شده اجرا شد. در کل در بین ۵۷۴ رونوشت، ۱۱۹ رونوشت در پایگاه داده KEGG تفسیر شدند، که پنج دسته اولی شامل: فرایندهای سلولی (۲۱ رونوشت)، فرایندهای اطلاعاتی محیطی (۲۰ رونوشت)، فرایندهای اطلاعاتی ژنتیکی (۳۷ رونوشت)، سیستم‌های ارگانیسمی (۳۲ رونوشت) و متابولیسم (۴۸ رونوشت) می‌باشند (شکل ۴). ما همچنین رونوشت‌های مرتبط با متابولیت‌های ثانویه را بررسی کردیم. در مسیر مربوط به بیوسنتز ترپنوتئیدها و پلی‌کنیدها، ۴ رونوشت شناسایی شد، که ۱ رونوشت مربوط به بیوسنتز زنجریه ترپنوتئیدی و یک رونوشت مربوط به بیوسنتز کاروتونوئید بود. همچنین در مسیر مربوط به بیوسنتز دیگر متابولیت‌های ثانویه ۳ رونوشت شناسایی شد، که ۱ رونوشت مربوط به بیوسنتز فنیل‌پروپانوئید و ۲ رونوشت مربوط به بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گوناگون گیاهی بودند. مطالعه‌ی اثر ممانعت mir168 در تحمل به تنش شوری در گیاه برنج، نشان داد که بعضی از ژن‌های هدف این میرنا، مربوط به بیوسنتز زنجریه ترپنوتئیدی بود (Wan et al. 2022).

در مطالعه‌ی دیگری در گیاه *Persicaria minor* که جهت بررسی تنظیم بیوسنتز ترپنوتئیدها به وسیله میرناها تحت تلقیح قارچ

مطالعه‌ای روی برنج نشان داد که غیر فعال‌سازی mir168 باعث افزایش مقاومت به شوری می‌شود (Wan et al. 2022). شناسایی ژن‌های هدف میرنا و تعیین نقش کارکردی آن‌ها: نتایج بررسی ژن‌های هدف میرناهای شناسایی شده در این مطالعه که با استفاده از ابزار psRNATarget صورت گرفت، نشان داد که در مجموع ۵۷۴ رونوشت از ترانسکریپتوم ریشه ریواس توسط این میرناها مورد هدف قرار می‌گیرند. تعداد رونوشت‌های مورد هدف برای میرناهای mir319، mir396، mir168 و mir164 به ترتیب ۱۶۵، ۱۲۸، ۱۲۱ و ۱۶۰ بودند. با انطباق توالی میرنا بالغ موجود در کمپلکس خاموشی با توالی mRNA ژن هدف، تخریب mRNA یا عدم ترجمه به پروتئین رخ خواهد داد. از ۵۷۴ رونوشت مورد هدف این میرناها، ۷۱ رونوشت با عدم ترجمه شدن و ۵۰۳ رونوشت با تخریب شدن توسط ۴ میرنا شناسایی شده تنظیم می‌شوند (شکل ۲).

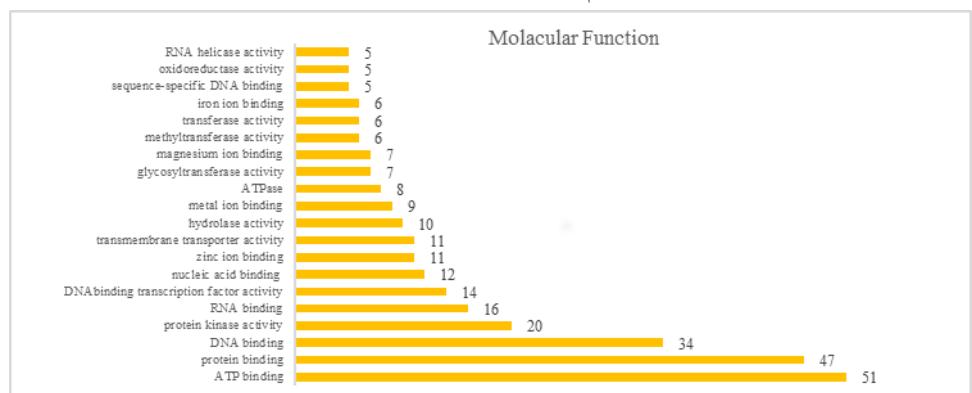


شکل ۲- فراوانی رونوشت‌های هدف میرناهای شناسایی شده و نحوه کترول بیان آن‌ها. ستون قرمز و نارنجی به ترتیب تعداد رونوشت‌های تنظیم شده توسط میرناها از طریق تخریب mRNA و مهار ترجمه را نشان می‌دهد.

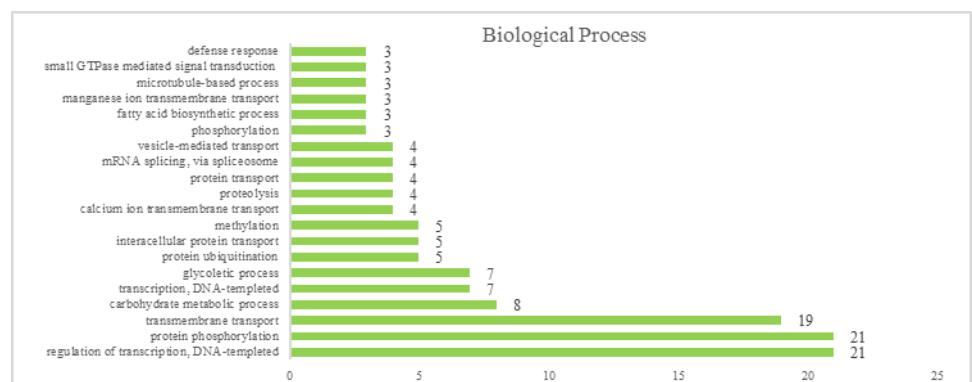
نتایج هستی شناسی رونوشت‌های هدف میرنا با استفاده از نرم‌افزار Blast2GO نشان داد که در زمینه عملکرد مولکولی (Molecular Function) گروه "اتصال ATP"، "اتصال پروتئین"، "اتصال DNA" و "فعالیت پروتئین کیناز" به ترتیب با ۵۱، ۴۷، ۳۴ و ۲۰ رونوشت بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (شکل ۳-الف). در حالی که در زمینه فرایند زیستی (Biological Process)، گروههای "تنظیم رونویسی، الگوی DNA"، "فسفوریلاسیون پروتئین"، "انتقال ترانس‌میبران" و "فرایند متابولیکی

ژن‌ها بر عهده دارند. میرناهای شناسایی شده با تأثیر بر این گروه از پروتئین‌ها، به طور غیرمستقیم بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند.(Mandhan et al. 2012; Phookaew et al. 2014)

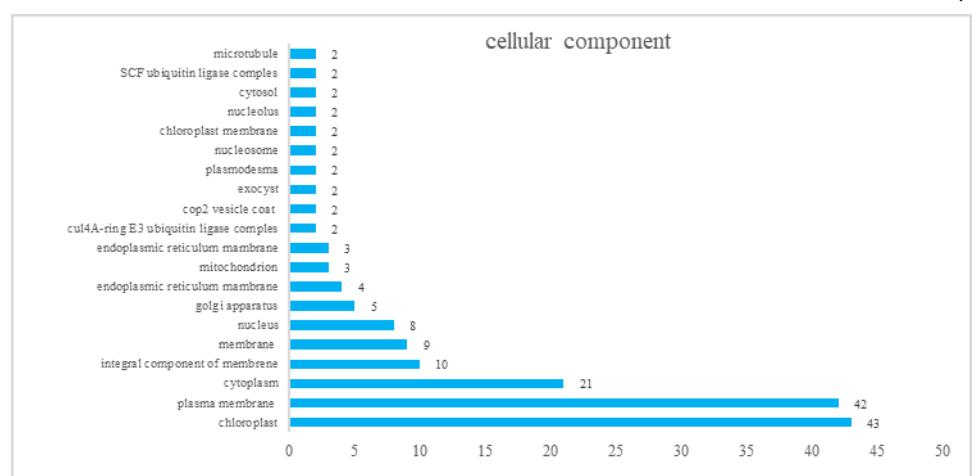
انجام گرفت، آنزیم‌های مسیر بیوستزی زنجیره ترپنئیدی بهوسیله mir396 مورد هدف قرار گرفتند (Samad et al. 2019). عوامل رونویسی از دیگر اهداف میرنا بوده که با کنترل و تنظیم فرآیند رونویسی نقش کلیدی در تنظیم بیان



الف

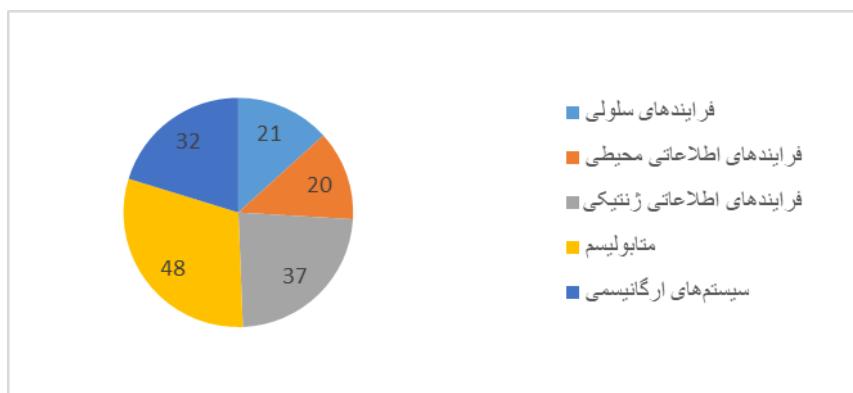


ب.



ج

شکل ۳- تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای میرناهای شناسایی شده در ریواس با استفاده از نرم‌افزار Blast2GO. الف: عملکرد مولکولی، ب: فرآیندهای زیستی و ج: اجزای سلولی



شکل ۴- طبقه‌بندی عملکردی KEGG با استفاده از سرور آنلاین KAAST روی ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای میرناهای شناسایی شده در ریواس

هورمونی (آپسزیک اسید، اتیلن و اکسین) و رشد و نمو گیاه دخالت دارند (Ariel et al. 2007; Sessa et al. 2018). با هدف‌گیری فاکتور رونویسی TCP نقش حیاتی در تنظیم شبکه بیان ژن و فرایندهای بیولوژیکی در طول زندگی گیاه بر عهده دارد، که نه تنها روی تکثیر سلولی، شکل‌دهی گل و برگ و شاخه‌زایی تأثیر می‌گذارد، بلکه در بیوستتر و انتقال فیتوهورمون‌ها مانند جاسمونیک اسید و اکسین و پاسخ به تنش‌های غیر زنده نیز دخالت دارد (Fang et al. 2021; Xu et al. 2017). به طور کلی، با توجه به نتایج می‌توان گفت اگر عوامل رونویسی را به عنوان کلیدهای راهانداز شبکه‌های ژنی در نظر بگیریم، میرناهای دخیل در کنترل آن‌ها را می‌توان به عنوان شاهکلیدهایی شناخت که با فعالیت‌شان طیف وسیعی از تغییرات در حوزه بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند. تقاضای جهانی برای داروهای گیاهی روزبه روز در حال افزایش است در نتیجه در سال‌های اخیر پژوهشگران با تمرکز بر گیاهان دارویی و محصولات ارزشمند آن‌ها در پی ارائه روشی مناسب برای افزایش بهره‌برداری صنعتی از این گیاهان می‌باشند (Gutiérrez-García et al. 2021; Lu et al. 2018) به طور کلی به دلیل ناشناخته ماندن جزئیات مسیر بیوستتری اغلب متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی تغییر و دستورزی این مسیرها محققان را با چالش‌های جدی روبرو ساخته است. میرناها یکی از مهم‌ترین اجزای تنظیمی در بیوستتر متابولیت‌های ثانویه در اغلب گیاهان به شمار می‌روند که می‌توانند با مهار بیان برخی از ژن‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه را دستخوش تغییرات معنی‌داری نمایند.

نتایج تاثیر میرناهای شناسایی شده در ریواس بر عوامل رونویسی نشان داد که ۵ خانواده از عوامل رونویسی به اسم خانواده‌های TCP، ERF، HD-ZIP، GRAS، G2-like، آرگلکی (AtGLK1)، آراید و پسیس (Bolle 2004; Hirsch and Oldroyd 2009; Tian et al. 2004) و دومین ERF بوده و در پاسخ به تنش کم‌آبی همراه ERF به ناحیه‌ای از DNA به نام عناصر پاسخ دهنده به اتیلن متصل شده و مجموعه‌ای از ژن‌ها را تنظیم می‌کند که در مکانیسم دفاعی گیاه نقش دارند (Mizoi et al. 2012). خانواده G-like در رشد و توسعه گیاه و همچنین پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاه ایفا می‌کنند. تا کنون ۵۵ ژن از این خانواده در گیاه آراید و پسیس شناسایی شده است، که در شرایط و بافت‌های گوناگون بیان می‌شوند. در ریشه‌های مسن و نوک ریشه بیشتر بیان می‌شود (Alam et al. 2022). خانواده GRAS نقش مهمی در رشد ریشه و شاخساره، سیگنانلینگ جیبرلیک اسید و سیگنانلینگ سیتوکروم A ایفا می‌کنند. (Rouard 2017). خانواده HD-ZIP که دارای یک دومین زیپ-لوسین در انتهای کربوکسیل خود می‌باشد در بسیاری از گیاهان شناسایی شده‌اند. این خانواده در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی شرکت می‌کند و در پاسخ به تنش‌های غیر زنده، انتقال پیام

منابع

- Al-Shammari AM, Jalil RDA, Hussein MF (2020) Combined therapy of oncolytic Newcastle disease virus and rhizomes extract of *Rheum ribes* enhances cancer virotherapy in vitro and in vivo. *Molecular Biology Reports* 47:1691-1702.
- Alam I, Wu X, Yu Q, Ge L (2022) Comprehensive genomic analysis of G2-like transcription factor genes and their role in development and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Diversity* 14:228.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer 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.
- Amiri N, Shafaghat A, Salimi F (2015) Screening of the Essential Oil, Hexane Extract, Chemical Composition, Antioxidant Activity, andAntimicrobial Acitivity of the Flower *Rheum ribes* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 18:1108-1115.
- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends in plant science*, 12:419-426.
- Bazin J, Khan GA, Combier JP, Bustos-Sanmamed P, Debernardi JM, Rodriguez R, Sorin C, Palatnik J, Hartmann C, Crespi M (2013) miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 74:920-934.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-2120.
- Bolle C (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218:683-692.
- Cenci A, Rouard M (2017) Evolutionary analyses of GRAS transcription factors in angiosperms. *Frontiers in plant science* 8:273.
- Çınar Ayan İ, Çetinkaya S, Dursun HG, Süntar İ (2021) Bioactive compounds of *Rheum ribes* L. and its anticancerogenic effect via induction of apoptosis and miR-200 family expression in human colorectal cancer cells. *Nutrition and Cancer* 73:1228-1243.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676.
- Cullen J (1966) *Rheum L. Flora of Turkey and the east Aegean Islands* 2:268-269.
- Dai X, Zhao PX (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids research* 39:W155-W159.
- Du T, Zamore PD (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA.
- Fang Y, Zheng Y, Lu W, Li J, Duan Y, Zhang S, Wang Y (2021) Roles of miR319-regulated TCPs in plant development and response to abiotic stress. *The Crop Journal* 9:17-28.
- Gao Y, Xu H, Shen Y, Wang J (2013) Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) endosperm using the RNA-Seq technique. *Plant molecular biology* 81:363-378.
- 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.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng, Q (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology* 29:644-652.
- Gutiérrez-García C, Ahmed SS, Ramalingam S, Selvaraj D, Srivastava A, Paul S, Sharma A (2021) Identification of microRNAs from medicinal plant *Murraya koenigii* by high-throughput sequencing and their functional implications in secondary metabolite biosynthesis. *Plants* 11:46.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood, PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols* 8:1494-1512.
- Hammond SM (2015) An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews* 87:3-14.
- Hamzeh S, Farokhi F, Heydari R, Manaffar R (2014) Renoprotective effect of hydroalcoholic extract of *Rheum ribes* root in diabetic female rats. *Avicenna journal of phytomedicine* 4:392.
- Hirsch S, Oldroyd GE (2009) GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant signaling and behavior* 4:698-700.
- Jacob C, Carrasco B, Schwember AR (2016) Advances in breeding and biotechnology of legume crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 127:561-584.
- Jagadeeswaran G, Zheng Y, Li YF, Shukla LI, Matts J, Hoyt P, Macmil SL, Wiley GB, Roe BA, Zhang W (2009) Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families. *New Phytologist* 184:85-98.
- Jung JH, Seo PJ, Park CM (2009) MicroRNA biogenesis and function in higher plants. *Plant Biotechnology Reports* 3:111-126.
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28:27-30.
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M (2012) KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic acids research* 40: D109-D114.
- Lelandais-Brière C, Naya L, Sallet E, Calenge F, Frugier F, Hartmann C, Gouzy J, Crespi M (2009) Genome-wide small RNA analysis revealed differentially regulated miRNA isoforms in *Medicago truncatula* roots and nodules. *Plant Cell* 21:2780-2796.
- Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658-1659.
- Li X, Hou Y, Zhang L, Zhang W, Quan C, Cui Y, Bian S (2014) Computational identification of conserved

microRNAs and their targets from expression sequence tags of blueberry (*Vaccinium corybosum*). Plant signaling and behavior 9:e29462.

Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Rna* 14:836-843.

Lu Y, Gao W, Huang LQ (2018) Synthesis and regulation of secondary metabolites by microRNA in medicinal plants. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica 43:1806-1811.

Mandhan V, Kaur J, Singh K (2012) smRNAome profiling to identify conserved and novel microRNAs in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC plant biology* 12:1-15.

Mehta A, Gupta H, Rawal R, Mankad A, Tiwari T, Patel M, Ghosh A (2016) In silico microRNA identification from *stevia rebaudiana* transcriptome assembly. *European Journal of Medicinal Plants* 15:1-14.

Meng Y, Huang F, Shi Q, Cao J, Chen D, Zhang J, Ni J, Wu P, Chen M (2009) Genome-wide survey of rice microRNAs and microRNA-target pairs in the root of a novel auxin-resistant mutant. *Planta* 230:883-898.

Mir Drikvand R, Sohrabi SS, Sohrabi SM, Samiei K (2019) Identification and characterization of conserved miRNAs of *Coriandrum sativum* L. using next-generation sequencing data. *Crop Biotechnology* 9:59-74.

Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1819:86-96.

Morante-Carriel J, Sellés-Marchart S, Martínez-Márquez A, Martínez-Esteso MJ, Luque I, Bru-Martínez R (2014) RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. *Analytical Biochemistry* 452:46-53.

Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M (2007) KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic acids research* 35:W182-W185.

Morozova O, Hirst M, Marra MA (2009) Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annual review of genomics and human genetics* 10:135-151.

Naqishbandi AM, Josefsen K, Pedersen ME, Jäger AK (2009) Hypoglycemic activity of Iraqi *Rheum ribes* root extract. *Pharmaceutical biology* 47:380-383.

Öztürk M, Aydoğmuş-Öztürk F, Duru ME, Topçu G (2007) Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food chemistry* 10:623-630.

Payriz A, Nejadsadeghi L, Nabati Ahmadi D (2022) Identification of miRNAs and their target genes in *Trachyspermum ammi*. *Crop Biotechnology* 11:1-15.

Phookaew P, Netrphan S, Sojikul P, Narangajavana J (2014) Involvement of miR164-and miR167-mediated target gene expressions in responses to water deficit in cassava. *Biologia plantarum* 58:469-478.

Qing C, DU Ly, Wen M, NIU Ry, WU Bw, GUO Lj, Meng M, LIU XI, ZHAO Hx (2022) MiR164-TaNAC14 module regulates root development and abiotic-stress tolerance of wheat seedlings. *Journal of Integrative Agriculture*.

Quinlan AR, Hall IM (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26:841-842.

Raafat K, Aboul-Ela M, El-Lakany A (2021) Alloxan-induced diabetic thermal hyperalgesia, prophylaxis and phytotherapeutic effects of *Rheum ribes* L. in mouse model. *Archives of pharmacal research* 44:1-10.

Samad AFA, Rahnamaie-Tajadod R, Sajad M, Jani J, Murad AMA, Noor NM, Ismail I (2019) Regulation of terpenoid biosynthesis by miRNA in *Persicaria minor* induced by *Fusarium oxysporum*. *BMC genomics* 20:1-22.

Sessa G, Carabelli M, Possenti M, Morelli G, Ruberti I (2018) Multiple links between HD-Zip proteins and hormone networks. *International Journal of Molecular Sciences* 19:4047.

Shendure J, Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 26:1135.

Sohrabi SS, Ismaili A, Nazarian F, Hossein F (2020) Identification and characterization of conserved miRNAs in lentil. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)* 32:606-616.

Tian C, Wan P, Sun S, Li J, Chen M (2004) Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* 54:519-532.

Uyar P, Coruh N, Iscan M (2014) Evaluation of in vitro antioxidative, cytotoxic and apoptotic activities of *Rheum ribes* ethyl acetate extracts. *Journal of Plant Sciences* 2:339-346.

Wan J, Meng S, Wang Q, Zhao J, Qiu X, Wang L, Li J, Lin Y, Mu L, Dang K (2022) Suppression of microRNA168 enhances salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC plant biology* 22:1-11.

Wang M, Wang Q, Wang B (2012) Identification and characterization of microRNAs in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.). *PLoS One* 7:e33696.

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.

Xu R, Gao H, Zhang S, Liu P, Wang X, Hao Y (2017) Genome-wide identification and phylogenetic, comparative genomic, alternative splicing, and expression analyses of TCP genes in plants. *Plant Gene* 12:23-32.

Zhang B, Pan X, Anderson TA (2006) Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS letters* 580:3753-3762.

Zhang L, Chia JM, Kumari S, Stein JC, Liu Z, Narechania A, Maher CA, Guill K, McMullen MD, Ware D (2009) A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS genetics* 5:e1000716.