

Study of miRNAs involved in drought and salt stress stresses and ontology of target genes in Brassica species

Neda Zolfaghari Khutbehsera

M.Sc, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: zolfaghari.neda744@gmail.com

Mohammad Mohsenzadeh Golfazani 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

Mohammad Mehdi Taghvaei 

Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: mahdi.taghvaei@gmail.com

Habibollah Samizadeh Lahiji 

Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: hsamizadeh@guilan.ac.ir

Abstract

Objective

Abiotic stresses such as drought and salinity significantly affect plant growth and performance. Plants use strategies to adapt and tolerate drought and salt stress that may threaten their survival during their life cycle, one of which is miRNA-mediated post-transcriptional regulation.

Materials and methods

In the current research, miRNAs that showed significant expression during salt and drought stress were selected by checking the references to investigate this phenomenon in rapeseed plants. The phylogenetic tree was constructed to analyze and compare the evolutionary relationships and conservation of MicroRNA effective in drought and salinity stress in *Brassica napus*, *Brassica rapa*, and *Brassica oleracea* species. Target genes for selected miRNAs were identified using psRNATarget online software. Categorization and gene ontology of target genes and identification of biological pathways were accomplished; also, proteins were classified based on molecular function

and biological processes. The Protein-protein interaction was analyzed to comprehensively interpret the relationships between the target genes. In the present study, 225 target genes for miRNAs were identified.

Results

After examining the protein interaction network, it was found that there were the most interactions between ribosomal, proteasome subunits and the ubiquitin-proteasome system. This result determined that drought and salinity stress leads to the activation of various biological systems and pathways and changes in gene expression along with the activation of the protein synthesis machine and alterations in protein content. By activating post-transcriptional gene regulation (PTGR) and post-translational modifications (PTMs), the plant regulates the abundance, activities, intracellular distribution, and transport of regulatory proteins involved in various growth processes as well as stress response.

Conclusion

The results of this study will lead to a broader perspective regarding stress and its effect on the pathways involved in cellular processes and will reveal the wide dimensions of the stress response.

Keywords: Abiotic stress, Post-transcriptional gene regulation, Post-translational modifications, Protein-protein interaction, psRNATarget, STRING.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Zolfaghari Khutbehsera N, Mohsenzadeh Golfazani M, Taghvaei MM, Samizadeh H (2022) Study of miRNAs involved in drought and salt stress stresses and ontology of target genes in Brassica species. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (4), 103-132.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (4), 103-132. DOI: 10.22103/jab.2022.20206.1429

Received: August 23, 2022.

Received in revised form: November 06, 2022.

Accepted: November 07, 2022.

Published online: November 15, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors


مطالعه miRNA های درگیر در تنش های شوری و خشکی و هستی شناسی ژن های هدف در گونه های *Brassica*

ندا ذوالفقاری خطبه سرا


دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: zolfghari.neda744@gmail.com

محمد محسن زاده گلفزانی 

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

محمد مهدی تقوایی 

دکتری تخصصی بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: mahdi.taghvaei@gmail.com

حبیب ... سمیع زاده لاهیجی 

استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: hsamizadeh@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۶

چکیده

هدف: رشد و عملکرد گیاه به طور چشمگیری تحت تاثیر تنش های غیر زیستی مانند خشکی و شوری قرار می گیرد. گیاهان برای انطباق و تحمل تنش شوری و خشکی که ممکن است بقای آن ها را در طول چرخه زندگی آن ها تهدید کند، راهکارهایی را بکار می برند که یکی از آن ها تنظیمات پس از رونویسی با واسطه miRNA است.

مواد و روش ها: بدین منظور در تحقیق حاضر، برای بررسی این پدیده در گیاه کلزا ابتدا با بررسی منابع miRNA هایی که در طی تنش های شوری و خشکی بیان معنی داری از خود نشان داده بودند انتخاب شدند. به منظور بررسی و مقایسه روابط تکاملی و حفاظت شدگی MicroRNA مؤثر در تنش خشکی و شوری در سه گونه *Brassica napus*، *Brassica rapa* و *Brassica oleracea* درخت فیلوژنتیکی برای آن ها رسم شد. به کمک نرم افزار آنلاین psRNATarget شناسایی ژن های هدف برای miRNA های انتخاب شده صورت گرفت. دسته بندی و بررسی هستی شناسی ژن های هدف انجام شد. به منظور انجام تفسیر و

تحلیل جامعی از روابط بین ژن‌های هدف، شبکه میانکشی پروتئین‌ها ترسیم شد. در پژوهش حاضر ۲۲۵ ژن هدف برای miRNAها شناسایی شد.

نتایج: پس از بررسی شبکه میانکشی پروتئین‌ها مشخص شد که بیشترین تعاملات بین زیر واحدهای ریبوزومی، پروتازومی و سیستم یوبیکوئیتین-پروتازوم وجود داشت. این نتیجه گویای این است که، تنش خشکی و شوری منجر به فعال شدن سیستم‌ها و مسیرهای مختلف بیولوژیکی و تغییر در بیان ژن‌ها همراه با فعال شدن ماشین پروتئین‌سازی و تغییر در محتوای پروتئینی می‌شود و گیاه از طریق فعال کردن تنظیم ژن پس از رونویسی و تغییرات پس از ترجمه، فراوانی، فعالیت‌ها، تقسیم‌بندی درون سلولی و انتقال پروتئین‌های تنظیم‌کننده درگیر در فرآیندهای مختلف رشد و همچنین پاسخ‌دهی به تنش را تنظیم می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی دید وسیع‌تری در ارتباط با تنش‌ها و اثر آن بر مسیرهای درگیر در فرآیندهای سلولی خواهد شد و ابعاد گسترده پاسخ به تنش‌ها را آشکار خواهد کرد.

کلیدواژه‌ها: تنش غیرزیستی، تنظیم ژن پس از رونویسی، تغییرات پس از ترجمه، میانکشی پروتئین‌ها، psRNATarget،

STRING

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ندا ذوالفقاری خطبه سرا نداء، محسن زاده گلفزانی محمد، تقوایی محمدمهدی، سمیع زاده لاهیجی حبیب ا... (۱۴۰۱) مطالعه miRNAهای درگیر در تنش‌های شوری و خشکی و هستی‌شناسی ژن‌های هدف در گونه‌های *Brassica*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۴(۴)، ۱-۲۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian

Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

گیاهان با تنش‌های غیر زیستی و زیستی متعدد از جمله گرما، نور، سرما، هیپوکسی، خشکی، شوری و عفونت‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی روبرو هستند. تنش می‌تواند منجر به تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی شود تغییراتی که ظرفیت فتوسنتز را کاهش می‌دهد و در نتیجه بهره‌وری و رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Hirayama & Shinozaki 2010). تحمل گیاه یا سازگاری با تنش شوری و خشکی شامل شبکه‌های مولکولی یا ژنی، مسیرهای متابولیکی پیچیده و صفات فیزیولوژیکی است. به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره

مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمتمل بر همانندسازی ماده ژنتیکی^۱، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Arabpour et al. 2021). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Mohammadabadi et al. 2021). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Shahsavari et al. 2021). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). گیاهان به کمبود مواد مغذی، شوری و خشکی عمدتاً از طریق تنظیم رونویسی پاسخ می‌دهند، اما تنظیمات پس از رونویسی با واسطه miRNA نیز در این پاسخ دخیل است (Zhang et al. 2020). تحت تنش خشکی ژن‌های بسیاری در گیاهان القا می‌شود و اندامک‌های مختلفی تحت تأثیر آن قرار می‌گیرد. تنش خشکی در گیاهان منجر به مهار فتوسنتز و تنفس در اندامک‌های مانند کلروپلاست و میتوکندری و تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) و برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن می‌شود (Meng et al. 2020; Liu et al. 2021; Razi & Muneer 2021). تنش شوری به وجود مقادیر اضافی یون‌های Na^+ و Cl^- در خاک یا محیطی که گیاه در آن رشد می‌کند اشاره دارد (Moin et al. 2021). به دلیل تجمع بالای یون سدیم در طول تنش شوری، جذب آب توسط ریشه کاهش می‌یابد و سرعت ترقق از طریق روزه‌ها افزایش می‌یابد که منجر به آسیب غشا، اختلال در سم‌زدایی ردوکس و کاهش کلی فعالیت فتوسنتزی می‌شود. بنابراین، یک سرکوب اولیه رشد گیاهان به دلیل اثرات هیپراسموتیک^۲ اتفاق می‌افتد و توقف رشد بعدی را می‌توان به سطوح سمی یون‌ها نسبت داد. استراتژی‌ها متعددی در گیاهان برای انطباق و تحمل تنش شوری که ممکن است بقای آن‌ها را در طول چرخه زندگی آن‌ها تهدید کند، تکامل یافته‌اند. ژن‌های ناشی از تنش به سرعت از طریق انتقال سیگنال شوری فعال می‌شوند، از جمله فاکتورهای رونویسی پاسخ اولیه^۳، مانند ژن‌های خانواده *MYBs*، *CBF/DREB* و *ABF/AREBs*، و در نتیجه ژن‌های پایین‌دستی پاسخ با تأخیر^۴ را در سطح رونویسی برای درک و سازگاری با تنش محیطی تنظیم می‌کند (Li et al. 2021). به دلیل پتانسیل microRNA ها در هدف قرار دادن تعداد زیادی از mRNA ها، این دسته

¹ DNA

² hyperosmotic

³ early-response transcription factors

⁴ delayed-response genes

اولیگونوکلئوتیدهای ۲۱-۲۲ تایی تقریباً در تمام پدیده‌های بیولوژیکی شامل تنظیم چرخه سلولی، رشد سلولی، آپوپتوزیس، تمایز سلولی، انتقال علامت، تجزیه پروتئین و همچنین تنظیم بیوتنز خود و پاسخ به تنش نقش دارند (Zhang et al. 2006). گیاهان جنس براسیکا معمولاً به دلیل تغییرات فصلی و تغییرات جغرافیایی با تنش‌هایی مواجه می‌شوند که در رشد و نمو گیاه اختلال ایجاد می‌کند. با این حال، گیاهان می‌توانند با تعدیل بیان ژن هدف، خود را با این شرایط سازگار کنند. در مطالعه‌ای (Yu et al. 2012) در *Brassica rapa*، ۲۱ miRNA جدید از ۱۹ خانواده miRNA را شناسایی کردند که از این میان چهار miRNA به ویژه bra-miR5718 و bra-miR1885b.3 در پاسخ به گرما نقش داشتند (Yu et al. 2012). علاوه بر این، توالی یابی با کارایی بالا^۵ ۱۲۵ miRNA جدید و ۲۲۱ miRNA حفظ‌شده را شناسایی کرد که نقش مهمی در پاسخ به تنش، متابولیسم، رشد و توسعه *B. rapa* داشتند (Wang et al. 2012a). همچنین با استفاده از یک رویکرد مبتنی بر ژنومیک مقایسه‌ای، ۱۲۶ miRNA جدید در *Brassica juncea* شناسایی شد که در انواع مختلف فرآیندهای بیولوژیکی شامل دمای بالا، خشکی و شوری نقش دارند (Bhardwaj et al. 2014). به همین ترتیب، در مطالعات دیگری با کمک توالی‌یابی نسل جدید miRNA های جدیدی را شناسایی کردند که ژن‌های متعلق به فاکتور رونویسی خانواده *TCP*، فاکتور رونویسی خانواده *GRAS*، فاکتور پاسخ اکسین، فاکتور رونویسی *AP2*، فاکتور رونویسی *NAC* و فاکتور رونویسی *MYB* در *B. juncea* را مورد هدف قرار می‌دهند (Yang et al. 2013). در گونه *oleracea*، نتایج نشان داد miR157a، miR166، miR167 و miR168c به‌عنوان فراوان‌ترین مولکول‌ها و miR166، miR167 و miR169 به‌عنوان بزرگ‌ترین خانواده miRNA شناسایی شدند و پیش‌بینی شد که این miRNAها ممکن است mRNAهایی را که چندین پروتئین بالقوه درگیر در تنظیم عملکردهای مختلف مانند پاسخ تنش غیر زیستی، فسفریلاسیون اکسیداتیو، ارتباط سلولی و محرک‌های هورمونی را کد می‌کنند، مورد هدف قرار دهند (Lukasik et al. 2013). به‌طور مشابه، تجزیه و تحلیل محاسباتی مبتنی بر ژنومیک مقایسه‌ای در *B. oleracea*، ۱۹۳ miRNA بالقوه را شناسایی کرد. همچنین miR158، miR156، miRNA169 و miR5021 به‌عنوان بزرگ‌ترین خانواده‌های miRNA شناسایی شدند که در عملکردهای مختلفی از جمله رشد گیاه، انتقال سیگنال و پاسخ به تنش شرکت می‌کنند (Wang et al. 2012b). شوری و خشکی دو تنش مهم غیر زیستی هستند که به‌طور قابل‌توجهی جوانه‌زنی، نمو و بهره‌وری بذر گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. گیاهان مکانیسم‌های دفاعی سازمان‌یافته‌ای از طریق تعدیل بیان ژن در سطوح رونویسی و پس از رونویسی برای مقابله با چنین تغییرات محیطی سختی دارند. علاوه بر بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش، مشخص شده است چندین خانواده miRNA توسط این دو تنش غیرزیستی تنظیم می‌شود. تعداد زیادی miRNA مربوط به تنش خشکی در گیاهان به کمک توالی یابی small RNA شناسایی شدند. در ذرت، ۶۵ miRNA مرتبط با خشکی متعلق به ۱۳ خانواده با استفاده از داده‌های ریزآرایه شناسایی شدند (Aravind et al. 2017). با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید چندین miRNA که نقش مهمی در تعدیل بیان ژن برای مقابله با تنش شوری و

⁵ Next-generation sequencing

خشکی در جنس براسیکا دارند، شناسایی شده‌اند. به‌عنوان مثال، در *B. juncea* از ۱۲۶ miRNA جدید شناسایی شده، miR164، miR160، و miR156 صورت تجربی تأیید شدند (Bhardwaj et al. 2014). در مطالعه دیگری، (Jian et al. 2016) miRNAهای جدید و حفاظت‌شده را در *B. napus* تحت تنش خشکی و شوری شناسایی کرد. آن‌ها ۸۸۲ miRNA جدید و ۸۵ miRNA شناخته‌شده متعلق به ۳۱ خانواده را شناسایی کردند که از این میان miR172 افزایش بیان داشت، اما miR395، miR156، miR399، miR169، miR171، و miR860 کاهش بیان یافتند (Jian et al. 2016). در *B. oleracea*، Tian et al. (2014) miRNA کاندید احتمالی و ۴۲ miRNA شناخته‌شده احتمالی را در پاسخ به تنش شوری شناسایی کردند. از این میان تحت تنش شوری، miR855، miR393، miR34، miR3، و miR34 کاهش قابل توجهی از خود نشان دادند. درحالی‌که miR37 و miR396a افزایش قابل توجهی را نشان دادند (Tian et al. 2014). microRNAها به‌طور تکاملی در گونه‌های گیاهی حفظ می‌شوند و معمولاً به خانواده‌های تکاملی حفاظت‌شده تعلق دارند. بنابراین، microRNAهای شناسایی‌شده در سایر گونه‌های گیاهی را می‌توان برای مطالعات اولیه و بیوانفورماتیک استفاده کرد (Taghvaei et al. 2022). طی سال‌های اخیر با پیشرفت علم بیوانفورماتیک، ابزارهای متعدد محاسباتی پیشگویی‌کننده هدف برای مولکول‌های microRNA معرفی شده است که با استفاده از الگوریتم‌های خاص خود و بررسی چندین ویژگی، ژن‌های هدف متعددی بر اساس امتیاز در نظر گرفته برای مجموعه مولکول‌های microRNA معرفی می‌کنند (Akhtar et al. 2015). برخی از این ویژگی‌ها شامل الگوی جفت‌شدگی، پایداری ترمودینامیکی هیبرید miRNA-mRNA بر اساس حداقل انرژی آزاد، بررسی حفاظت‌شدگی توالی موردنظر و بررسی حضور چندین جایگاه مکمل در هدف است (Min & Yoon 2010). اطلاعات زیادی در مورد تنظیم بیان ژن در پاسخ به تنش‌های شوری و خشکی در سطح رونویسی وجود دارد. با این حال، اطلاعات کمی در مورد این فرآیند در سطح پس از رونویسی وجود دارد. تنوع و پیچیدگی تنظیم miRNA نشان‌دهنده اهمیت آن‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی است و بسیاری از مازول‌های تنظیم miRNA می‌توانند یک شبکه تنظیمی پیچیده miRNA-mRNA را تشکیل دهند. بنابراین، تحقیق روی شبکه‌های تنظیم‌کننده-miRNA mRNA می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای درک فرآیندهای بیولوژیکی پیچیده ارائه دهد، که برای مطالعه بیشتر مکانیسم‌های تحمل خشکی و شوری در گیاه از اهمیت بالایی برخوردار است.

مواد و روش‌ها

انتخاب miRNAهای مؤثر در تنش خشکی و شوری: با استفاده از مرور مقالات و پژوهش‌هایی که عمدتاً به کمک تکنیک توالی‌یابی با کارایی بالا انجام گرفته بود، انتخاب microRNAهای مؤثر در تنش خشکی و شوری انجام گرفت (جدول ۱) و پس از آن به کمک پایگاه داده miRBase (<http://mirbase.org/>) توالی‌های آن‌ها دریافت و موردبررسی قرار

⁶ Minimum free energy (MFE)

گرفت (جدول ۲). بر این اساس مولکول‌های microRNA با اسامی bna-miR169, bna-miR171, bna-miR156, bna-miR172, bna-miR399, bna-miR396, bna-miR395, bna-miR393, bna-miR860 به منظور بررسی انتخاب شدند.

جدول ۱. لیست مولکول‌های microRNA انتخابی مرتبط با تنش خشکی و شوری به همراه منابع مورد بررسی قرار گرفته شده

Table 1. The list of selected microRNAs related to drought and salinity stress and their references

| miRNAs | گیاهان بررسی شده Plant | نوع تنش stress | منابع references |
|--------|---|---------------------------------|---|
| miR156 | <i>Brassica napus</i> <i>Brassica juncea</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Saccharum ssp</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> | خشکی و شوری Drought and salt | Barrera-Figueroa et al. 2012; Khraiwesh et al. 2012; Carnavale Bottino et al. 2013; (Bhardwaj et al. 2014; Jian et al. 2016 |
| miR169 | <i>Brassica napus</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Saccharum ssp</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> | خشکی و شوری Drought and salt | Barrera-Figueroa et al. 2012; Khraiwesh et al. 2012; Gentile et al. 2015; Akdogan et al. (2016; Jian et al. 2016 |
| miR171 | <i>Brassica napus</i> <i>Saccharum ssp</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> | خشکی و شوری Drought and salt | Zhou et al. 2010b; Khraiwesh et al. 2012;) (Gentile et al. 2015; Jian et al. 2016 |
| miR172 | <i>Brassica napus</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Saccharum ssp</i> | خشکی Drought | Zhou et al. 2010b; Gentile et al. 2015; Jian) (et al. 2016 |
| miR395 | <i>Brassica napus</i> <i>Triticum aestivum</i> | خشکی Drought | (Akdogan et al. 2016; Jian et al. 2016) |
| miR393 | <i>Brassica oleracea</i> <i>Brassica napus</i> | شوری salt | (Tian et al. 2014; Jian et al. 2016) |
| miR396 | <i>Brassica oleracea</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> | شوری salt | Khraiwesh et al. 2012; Tian et al. 2014;) (Pegler et al. 2021 |
| miR399 | <i>Brassica napus</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> | خشکی و شوری Drought and salt | (Baek et al. 2016; Jian et al. 2016) |
| miR860 | <i>Brassica napus</i> | خشکی و شوری Drought and salt | (Jian et al. 2016) |

بررسی روابط تکاملی و حفاظت شدگی microRNA مؤثر در تنش خشکی و شوری: به منظور بررسی روابط تکاملی و حفاظت شدگی microRNA مؤثر در تنش خشکی و شوری در سه گونه *Brassica rapa*، *Brassica napus* و *Brassica oleracea* توالی‌های اولیه و بالغ miRNAهای *Brassica napus* از پایگاه داده miRBase دریافت شد (جدول ۲). به منظور بررسی و شناسایی آن‌ها در دو گونه *Brassica oleracea*، *Brassica rapa* با BLASTn در پایگاه miRBase با استفاده از توالی miRNAهای بالغ دریافتی انجام شد و توالی‌های مشابه یافت شده برای بررسی روابط تکاملی استفاده شد. سپس هم‌ردیفی چند گانه^۷ توالی‌های اولیه miRNAها با استفاده از نرم‌افزار Unipro UGENE v. 40.1 انجام شد (Okonechnikov et al. 2012) و برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی نرم‌افزار MEGAX (Kumar et al. 2018) با روش اتصال-همسایگی (NJ) و آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار مورد استفاده قرار گرفت (Gupta et al. 2019; Taghvaei et al. 2019).

پیش‌بینی ژن‌های هدف: با استفاده از توالی‌های مربوط به miRNAهای بالغ و به کمک نرم‌افزار آنالین psRNATarget، نسخه ۲۰۱۷ با استفاده از (DFCI Gene Index (BNGI, version 5) مربوط به گیاه کلزا، شناسایی ژن‌های هدف با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض، انجام شد (Dai et al. 2018; Mohsenzadeh Golfazani et al. 2022b).

بررسی هستی‌شناسی^۸ و مسیر عملکردی ژن‌های هدف: دسته‌بندی و بررسی هستی‌شناسی ژن‌های هدف با کمک سایت KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) طبق پارامترهای پیش‌فرض انجام گرفت (Huang et al. 2009; Mi et al. 2018).

بررسی برهم‌کنش پروتئین‌ها: به منظور انجام تفسیر و تحلیل جامعی از روابط بین ژن‌های هدف، اطلاعات و شناسه ژنی اهداف پیش‌بینی شده با کمک پایگاه UniProt (<https://www.uniprot.org>) به دست آمده و از این داده‌ها برای بررسی میانکنش‌های ژن‌های هدف و همچنین ترسیم شبکه میانکنش پروتئین‌ها^۹ (PPIs) به کمک پایگاه داده STRING استفاده شد. در این پایگاه به هر تعامل نمرات صفر تا یک داده می‌شود، شاخص حداقل امتیاز متقابل مورد نیاز^{۱۰} به صورت پیش‌فرض روی ۰/۴ تنظیم شد (Szkarczyk et al. 2018; Taghvaei et al. 2022). برای مشخص کردن ژن‌هایی که بیشترین تعامل و برهم‌کنش را با یکدیگر دارند، از ابزار CytoHubba (روش MCC^{۱۱}) در نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳/۸ استفاده شد (Shannon et al. 2003; Mohsenzadeh Golfazani et al. 2022a).

⁷ Multiple Alignment

⁸ Gene Ontology (GO)

⁹ Protein-protein interaction networks

¹⁰ Minimum required interaction score

¹¹ Maximal clique centrality

جدول ۲. توالی‌های اولیه و بالغ microRNAهای *Brassica napus* مرتبط با تنش خشکی و شوری

Table 2. Primary and mature sequences of *Brassica napus* microRNAs associated with drought and salinity stress

| miRNAs | توالی اولیه Primary sequences | توالی بالغ Mature sequences |
|--------|--|---|
| miR156 | <p>bna-MIR156c MI0006484 GGGAGUGAUGCAGGUUGUACAGAAGAUAGAGAGCACUAAGGAUGAC AUGCAAGUACAAGGAUUAAGGAAAUUCAAGAAAAGAGAGGAAAAAAGA GCCUGCAUCUUACUCUUUUGUCUCUCUAUACUUCUGUCAAUACCAU AUUUAUUCU bna-MIR156b MI0006481 UAGGUUUGAGAGUGAUGCUGGUUGUUGACAGAAGAUAGAGAGCACUAA GGAUGACAUGCAAGUACAUUGUAUGUAUCAUCACACCCGCUUGGAU GAUUAACAAAAUAAAACCAAUUCAAAGAGAGAGAGAGAGAGCCUGCA UGUCUACUCUUUCGUCUCUCUAUCUUCUGCACACCACAUUUUUUCU CUUCUUUCUUAACUA bna-MIR156g MI0020263 CGUUGAUAGUGUUGACAGAAGAUAGAGAGCACAGAUAGAGAUGCAA UUUGGAGCAGCUUGUAUGCAUCGUACUCCUUUGUCUCUCUAGUCUUC UGUCAUCACUCGUUACUUG</p> | <p>bna-miR156c MIMAT0005639 UUGACAGAAGAUAG AGAGCAC bna-miR156b MIMAT0005636 UUGACAGAAGAUAG AGAGCAC bna-miR156g MIMAT0023616 UUGACAGAAGAUAG AGAGCAC</p> |
| miR169 | <p>bna-MIR169k MI0006467 AAACGGUGACAUGAAGAAGUAGAGAAGUUGUGUGGUAGCCAAGGAUGACU UGCCUGCGUCUUACACCAUUAUCACAGACUUUAUCGAUAGUCUCUGAGU UGGUUAGGCUGUAGGCAGUCUCCUCGGCUAUUCAGACACUCCUUCUUUC CCUCAUUUC bna-MIR169g MI0006463 GAGAAACGGUGACAUGAAGAAGUAGAGAAGUUGUGUGGUAGCCAAGGAUG ACUUGCCUGCGUCUUUAACACCAUUAUCAAAGACUUUAUCGAUAGUCUCU GAGUUGGUUAGGCUGUAGGCAGUCUCCUUGGCUAUUCAGACACUCCUC UUUCUCCUCAUUUCACAUUUUC bna-MIR169h MI0006464 GAGAAUUGGUGACAUGAAGAAGUAGAGAAGUUGUGUGGUAGCCAAGGAUG ACUUGCCUGCGUCUUAGACCAUUAUCUUAUCAAAGACUAAAAGAUUGAUA GUCUUCGAUGAAUUGGUUAAUCGGUAGGCAGUCUCCUCGGCUAUUCAG ACAGUUCUCUUUCUCCUCAUUUCACAUUUUC bna-MIR169e MI0006461 GUUUCAGGCAGUCUCCUUGGCUAUCUUGACAUCUUUUUCUUCUCCAU UUAUACUUUCUUUCUUUGUAUUUUUCGAAUCCAAAUAAUUUUUUUC UAUAAAUUUACUACGAAAUCUUUAACAACUUCUUAACAAAGUAUGU UAUUAGAAAACUACCACUUUUUGCAUUUAUUACAACUUGCAUGACGUG GUGAGUGUAUGCAUUCUUUAGAAGGAAUUGUCAAAAGGUGAAUAGAAGA AUCAUUUUGGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUAAUUUCU bna-MIR169a MI0006457 UGUGACCAAGUAGUGUGCAGCCAAGGAUGACUUGCCGAUUUAAAAUA UCUGAUAAGUAUUUUUAUUUCGUUUUUAAAGAAAAAAUUAUGAUCGG CAAGUUGCCUUGGCUAUACGUUUUCUUUGUGUCGCG bna-MIR169i MI0006465 AGAGUCAUGUUUAGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUGCUCUUUUUACCU CCAUGAUUCAUUUUUAGUACAGUUUUGGAUUUACUAGCUUCUAAAGA GUAUAGUAAUUCAAAAUCUUGUUAUCUUUGAGGGUAAACAGUUUCAG CGAGUCUCCUUGGCUAUCUUGACAUCUU bna-MIR169f MI0006462 GUCAAAGAUAGAAUAGGAGAAUUCUAAUUUGGUAGCCAAGGAUGACUUGC CUACUUCUUUGCGAAGGAAAUGGUCACGGUGUCAUGUUUGAAAGUGA AUUAUAUUUAUAAAGAGUAUAUCAUUUAGUGACCAUUUUUGCUAUAUA AAGAUUUUAGGCAGUCUCCUUGGCUAUCUUUAUAUGUUCUUUCUUC AUCUCAGAC bna-MIR169c MI0006459 AGAUGAAUAGAAGAAUCAUAAUUUGGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUAAU UCUUGAGAGUAAAAUUGGCAUGGUUGUCAUGUUAAAAAGUUACUGUAGGU AGUUUCAUUUUGACCAUUUUUCUUAACAAUAGAUAAUAGGCAGUCUCCU UGGCUAUCUUUAUUGUUCUUCUCUCUCAUCU bna-MIR169n MI0020276 AGAAUUGCAUGAAGUGGAGUAGAGUAUAAUGCAGCCAAGGAUGACUUG CCGGAGGGUCGUUCAUCAUGCAUAAUAAUAAUUGGUGAUGAACAUAAU CUGGCAAGUUGCCUUCGCUACAUUUUGCUCUCUUCUACUCAUGCAAA CUCUC <bna-MIR169d MI0006460 GAAGGAGAUUGCAAGAUGAAUAGGAGAUUUUCUAAUUUGGUAGCCAAGG AUGACUUGCCUACUUCUUUGCGAAGGAAAUGGUCACGGUGUCAUGUU UGAAAGUGAAUUAACAUUUUUAAGAGUAUAUCAUUUAGUGACCAUUUU GCGUAUAAAAGAUAAUAGGCAGUCUCCUUGGCUAUCUUUAUAUGUUC UUCUUUCUCAUCUCAGACAUUUACCUUC bna-MIR169m MI0006469 UAUAUGUAUCAGAGAGUCAUGCAUGGGAUUAUAGAGAAUAGUAUAAUGAG CCAAAGAGACUUGCCGAUUUUACCAAAAGAAUUUAAAACUGAUAAUUGG UGACUGGCAAGUCGACUUUGGCUUCUUCUUUCUUCUUUUUCGAUG UAAGACUCUAGAUACUUAU bna-MIR169j MI0006466 GUGUUUAGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUGCUCUUGUUCACCUCCACGAU UCAACUUUAACGUUGAAGGGUUUUGGAUUAUUGUGCAUUCACAUGU AUAAUAAUUUGAAUUAUGUUAUUCUUUGGCUUAGGUUUAGGUUUUCAGGCA GUCUCCUUGGCUAUUUUGACAU</p> | <p>bna-miR169n MIMAT0023629 CAGCCAAGGAUGAC UUGCCGG bna-miR169b MIMAT0005613 CAGCCAAGGAUGAC UUGCCGA bna-miR169i MIMAT0005620 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169g MIMAT0005618 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169j MIMAT0005621 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169f MIMAT0005617 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUA bna-miR169k MIMAT0005622 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169d MIMAT0005615 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUA bna-miR169e MIMAT0005616 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUA bna-miR169h MIMAT0005619 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169a MIMAT0005612 CAGCCAAGGAUGAC UUGCCGA</p> |

| | | |
|--------|---|--|
| | <p>bna-MIR169b MI0006458 GUGACCAAGUAGUGGCAGCCAAGGAUGACUUGCCGAUUUGAAUUAU AUUUUUAAUACUUUACUAAGACAUCUUUUCAGUUUCAAUUUUGUCUUG GAGAGGCUAGGAAGAAAUAACAUUUUAUUUCGUAUUUAAAAGAAAAA UAUGAUCGGCAAGUUUUCUUGGCUACAUGUUUUUUGUCGUC</p> <p>bna-MIR169i MI0006468 CAUGGCGAAAAGAGUCGUGUUUAGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUGCUC UUGUUCACCCUCCAGAUUCAUUUUAACGUUGAAGGGUUUUGGAUUA UUGUGCAUUCAACUAGUAUAAUAAUUUGAAAUCAUGUUGAAUCUUUGU GGUUUAGGUUUUCAGGCAGUCUCCUUGGCUAUUUUGACAUAUUUUUC AUCCAUG</p> | |
| miR171 | <p>bna-MIR171a MI0006450 UGGUCACAGCGAGAUUUAGUGCGGUUCAAUCAAUAGUCUCACUCUUA GUUGAUAGAGAUUGAUUUUGUUCGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACGCA UAUAACCA</p> <p>bna-MIR171e MI0006454 CAAUACGAGAUUUUGGUGGUUCAAUACAGAAAACCACACUCUUUUGU UGUAGAGAUCCGUUUUGUUUGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACGAG</p> <p>bna-MIR171d MI0006453 ACAAUGCGAGAUUUUGGUGCGGUUCAAUACAGAAAUCCACACUCUUUUG UUGUAGAGAUCCGUUUUGUUUGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACGAGUGU</p> <p>bna-MIR171b MI0006451 GGUAACGCGAGAUUUAGUGCGGUUCAAUCAAUAGUCGUGUUCUCAC UUGAUAGAGAUCCGUUUUGUUCGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACGCGU CAACC</p> | <p>bna-miR171c MIMAT0005607 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG</p> <p>bna-miR171a MIMAT0005605 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG</p> <p>bna-miR171e MIMAT0005609 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG</p> <p>bna-miR171b MIMAT0005606 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG</p> <p>bna-miR171d MIMAT0005608 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG</p> |
| miR172 | <p>bna-MIR172d MI0020277 UUUUUGCUAUUGCAUCAUCAAGAUUCAGAAAUCAUUAUCCUUGAU GGUUCUCCUUCGAGCCUGUCUUUUUUGGUUUUGAGAAUCUUGAUGAU CUGCAGCGGCGAUUAAA</p> | <p>bna-miR172d MIMAT0023630 AGAAUCUUGAUGAU GCUGCAG</p> |
| miR395 | <p>bna-MIR395f MI0020288 GUCCUCUUGAGUUCUUUUAACGCUUCAUUGUUCAGACUUGGUUGUCU AAUAUCUACCGAUACAACAACGUAAUGAACACUGAAGUGUUUGGGGGG ACUCUAGGUGGC</p> <p>bna-MIR395d MI0020286 GCCCCAUAGAUUCUUUUAACGCUUCAUUGUAGUUACUCCAGUCACAU UUUUUUUUUUAAAUGUUUGGUGCAUUUUUGUAUACAACACUGAAGUG UUUGGGGGGACUCGUGGUGC</p> <p>bna-MIR395e MI0020287 CCCCUUGAGUUCUUUGAAACGCUUCAUUGUUCAUUACGUAGAUGUUUA GUAAAUCAAUCAAUGAACACUGAAGUGUUUGGGGGGACUCUAGGUGG</p> | <p>bna-miR395d MIMAT0023639 CUGAAGUGUUUGGG GGGACUC</p> <p>bna-miR395f MIMAT0023641 CUGAAGUGUUUGGG GGGACUC</p> <p>bna-miR395e MIMAT0023640 CUGAAGUGUUUGGG GGGACUC</p> |
| miR399 | <p>bna-MIR399a MI0005774 ACAGGGCAAGAUCUCUAUUGGCAGAAAACCAUUAUAGAUUUUGCA UCUCUUUCUGCAUUGAUUUUGUAGUGAGUUCUCUGCCAAAGGAGAUUU CCCGGU</p> <p>bna-MIR399b MI0020289 AUUACAGGGCAAGAUCUCUAUUGGCAGGAAACCAUUAUACUUGACCUUUG CAUCUCUUUAGCAUUGUUUUGUAGUGAGUUCUCUGCCAAAGGAGAUU UGCCCGUAUU</p> <p>bna-MIR399c MI0020290 AUUACAGGGCAAGAUCUUUUGGCAGGAAUCCAUAUACUUCAGUCUUA CAUAGCAUAUAUUGUUUGGUGAGCUCUCUGCCAAAGGAGAUUUUGC CGGUAUU</p> | <p>bna-miR399b MIMAT0023642 UGCCAAAGGAGAUU UGCCCGG</p> <p>bna-miR399a MIMAT0004449 UGCCAAAGGAGAUU UGCCCGG</p> <p>bna-miR399c MIMAT0023643 UGCCAAAGGAGAUU UGCCCGG</p> |
| miR396 | <p>bna-MIR396a MI0005773 UCCACAGCUUUUCUUGAACUUUCUUUUUCAUUUCCUUUAUUUASAGCG AAAUUUAAUAACUAAAAAUCUCUAAACAUUUAAACACUCUASAAAAAAA AGCUCAASAAAGCUGUGGA</p> | <p>bna-miR396a MIMAT0004448 UCCACAGCUUUUCU UGAACUU</p> |
| miR393 | <p>bna-MIR393 MI0005772 UCCAAAGGGCAUGCAUUGAUCCUAAUUAAGCUGAGUUUUAUCCCGAAUA AUUAAUUUUUUUUUUUCUAAUGGAAAGAUAGAAAAAUAUUUUUUUGC UUCGUUUUCCGGAUCAUGCAUCUCUUCGGA</p> | <p>bna-miR393 MIMAT0004447 UCCAAAGGGCAUGC AUUGAUC</p> |
| miR860 | <p>bna-MIR860 MI0020292 UGGUCACAGUGUAAUUGUAGUCCAAUCUAUUGAAGUACUAGCACAC CAUCUCUAGUGAGAUUGUUGGUGAGUAGUCAAUACAUUGGACUAC AUAAUUACUUUUGAUCAA</p> | <p>bna-miR860 MIMAT0023645 UCAAUACAUGGAC UACAUAU</p> |

نتایج و بحث

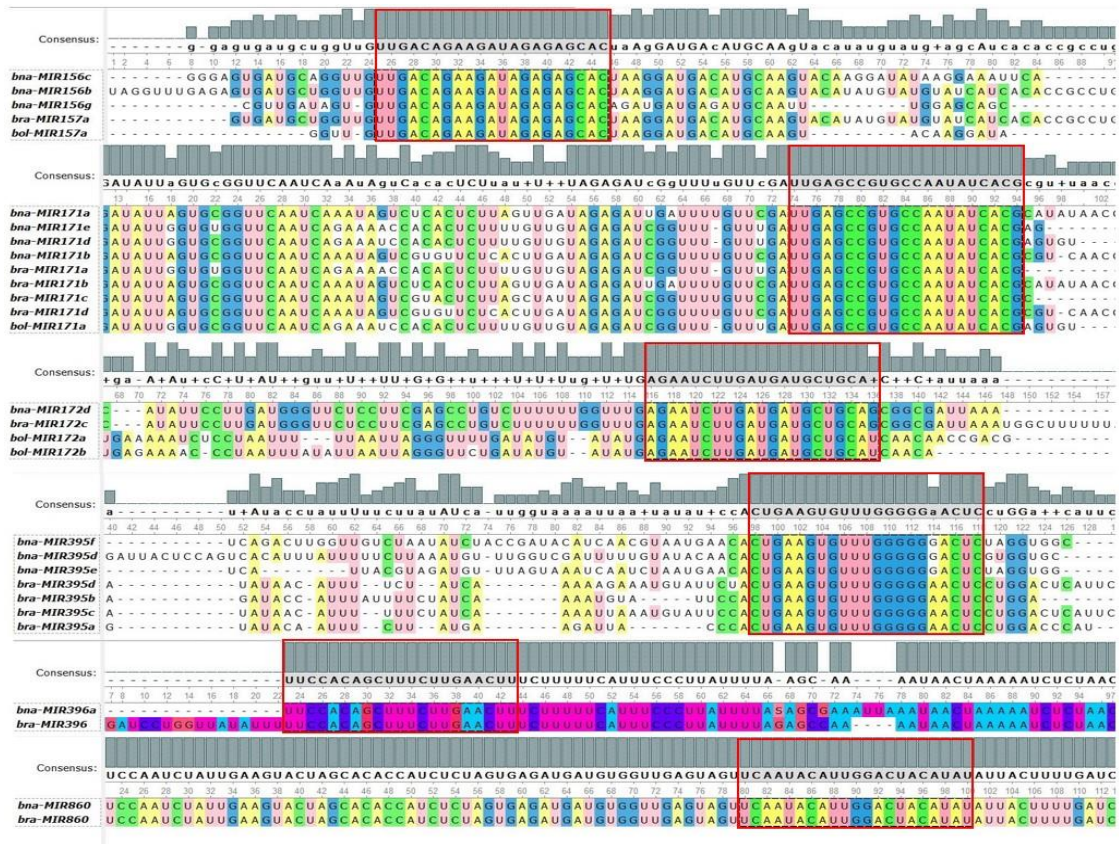
انتخاب، بررسی حفاظت‌شدگی و رسم درخت فیلوژنی **miRNA**ها: در این بخش مولکول‌های microRNA

با اسامی bna-miR156, bna-miR171, bna-miR169, bna-miR860, bna-miR393, bna-miR395, bna-

miR396، bna-miR399، bna-miR172 در گیاه *Brassica napus* مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی‌های تکاملی و کامل‌تر آن دسته از miRNAهای انتخاب شدند که علاوه بر تأثیر در تنش خشکی و شوری در کلزا، دارای همولوگ در گونه‌های اجدادی *Brassica oleracea*، *Brassica rapa* موجود در پایگاه miRBase بودند. بر این اساس BLASTn توالی miRNAهای بالغ در پایگاه miRBase در بین گونه‌های انتخابی صورت گرفت. نتایج نشان داد که برای برخی از miRNAهای بالغ *B. Napus* هیچ توالی مشابهی در دو گونه *B. rapa* و *B. oleracea* وجود نداشت، این miRNAها شامل bna-miR169، bna-miR399، bna-miR393 بود. با این وجود مطالعات گذشته نشان داد که bna-miR393 در تنش شوری در گیاه *Brassica oleracea* دیده شد (Tian et al. 2014) لذا این miRNA از لیست کنار گذاشته نشد. با این حال توالی مختص آن در پایگاه miRBase وجود نداشت. با وجود اینکه خانواده miR156 در گونه *B. rapa* شناسایی شده بود، اما BLASTn توالی بالغ bna-miR156 کلزا تشابه کامل آن را با bra-miR157a و bol-miR157a متعلق به خانواده miR157 در دو گونه *B. rapa* و *B. oleracea* نشان داد. برای خانواده miR171 (miR171a/b/c/d/e) در گونه *B. rapa* bra-miR171a/b/c/d شناسایی شد و در گونه *B. oleracea* فقط نوع bol-miR171a شناسایی شد. بررسی bna-miR395d/e/f نشان‌دهنده تشابه بالایی با bra-miR395a/b/c/d در *B. rapa* بود، ولی هیچ توالی مشابهی در *B. oleracea* یافت نشد. همچنین bna-miR396a با bra-miR396-5p در *B. rapa* تشابه داشت و در *B. oleracea* مشابهتی یافت نشد. با این وجود با توجه به مطالعه گذشته bna-miR396 در تنش شوری در گیاه *Brassica oleracea* دیده شد (Tian et al. 2014). هم‌ردیفی bna-miR172d کلزا با miRNAهای بالغ دو گونه *B. rapa*، *B. oleracea* به ترتیب نشان‌دهنده تشابه با bra-miR172c، bol-miR172a و bol-miR172b بود. بررسی مشابهت bna-miR860 کلزا نیز نشان داد که این miRNA فقط در *B. rapa* دارای توالی مشابه bra-miR860 بود. هم‌ردیفی توالی‌های اولیه miRNAهای مشترک نشان داد که این توالی‌ها در ساختار اولیه خود در برخی موارد بین گونه‌های مورد بررسی دارای تفاوت در نوکلئوتیدهای سازنده بودند، این تفاوت بخصوص در miR393 نمود بیشتری داشت (شکل ۱) و با این وجود نتایج هم‌ردیفی حاکی از حفاظت شدگی بالای ناحیه مؤثر miRNAها داشت. این بخش از توالی در نهایت به صورت miRNA بالغ وارد ساختار کمپلکس RISC^{۱۲} شده و نقش عملکردی برای مهار یا تخریب mRNA هدف خواهد داشت. بنابراین با توجه به نقش عملکردی این بخش از توالی miRNA، حفاظت شدگی بالایی در این ناحیه دیده شد بخصوص در miRNAهای خانواده miR156، miR171، miR396 و miR860 که کاملاً منطبق بر یکدیگر بودند. با این حال در خانواده‌های miR172 و miR395 به ترتیب تفاوت تک نوکلئوتید G با U و G با A مشاهده شد. نکته حائز اهمیت هم‌ردیفی کامل توالی اولیه miR860 در دو گونه

¹² RNA-induced silencing complex

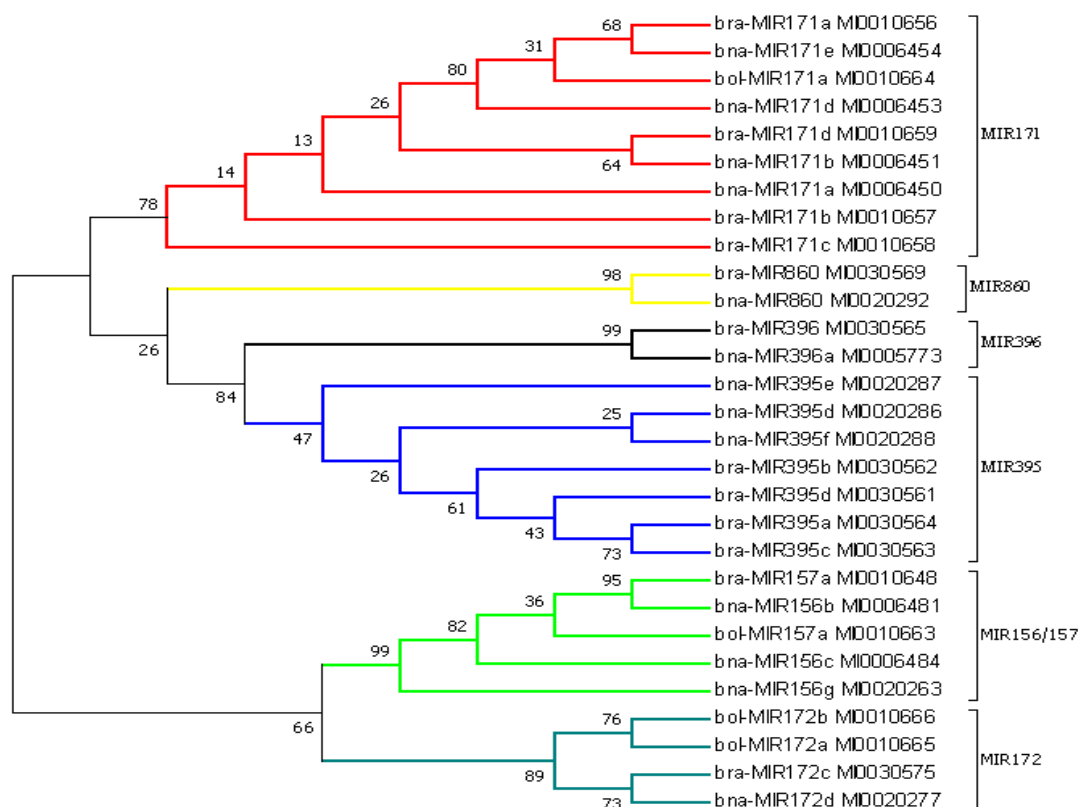
B. napus و *B. rapa* بود که نشان داد حتی در این توالی اولیه نیز حفاظت شدگی به میزان بالای حفظ شده است. برر سی درخت فیلوژنی هم قرابت و حفاظت شدگی این خانواده‌های miRNA را به وضوح نشان داد (شکل ۲).



شکل ۱. هم ردیفی چند گانه توالی های اولیه miRNA در گیاهان *B. napus*، *B. rapa* و *B. oleracea* با استفاده از افزونه ClustalW در نرم افزار Unipro UGENE انجام شد، کادر قرمز نشان دهنده توالی حفاظت شده و بخش عملکردی در miRNAهای مورد بررسی است

Figure 1. The multiple alignments of the primary sequence of miRNAs in *B. napus*, *B. rapa*, and *B. oleracea* plants were performed using the ClustalW plugin in Unipro UGENE software. The red box indicates the conserved and functional sequence in the studied miRNAs

با توجه به اینکه کلزا در واقع هر دو دسته کروموزومهای *B. rapa* و *B. oleracea* را در خود جای داده این میزان از حفاظت شدگی در توالی های miRNA دور از انتظار نبود. همانطور که اشاره شد نقش miRNAهای مورد بررسی در تنش های خشکی و شوری در کلزا مشخص شد، از طرفی نقش miR393 و miR396 نیز در گیاه *B. oleracea* مشخص شده بود (Tian et al. 2014). با این وجود، بررسی برای نقش این دسته از miRNAهای مؤثر در تنش خشکی و شوری در گیاه *B. rapa* صورت نگرفته است به احتمال زیاد بررسی این miRNAها می تواند آشکار کننده نقش برخی از آنها در تنش خشکی و شوری در گیاه *B. rapa* باشد. این گونه تحقیقات می تواند راه های سریعتری را برای دستیابی به عناصر مؤثر در تنش ها فراهم آورد و از صرف هزینه و وقت زیاد جلوگیری کند.



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی توالی‌های اولیه miRNAهای در گیاهان *B. napus*، *B. rapa* و *B. oleracea* با استفاده از نرم‌افزار MEGAX با روش اتصال-همسایگی و آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار رسم شد

Figure 2. The phylogenetic tree of primary sequences of miRNAs in *B. napus*, *B. rapa*, and *B. oleracea* plants was constructed using MEGAX software with the neighbor-joining method and bootstrap test with 1000 replications

شناسایی ژن‌های هدف: شناسایی اهداف مولکول‌های microRNA و فرآیندهای بیولوژیکی که این اهداف در آن‌ها

شرکت دارد می‌تواند هر چه بیشتر آشکار کننده نقش تنظیمی miRNAها باشد. لذا به‌عنوان اولین قدم شناسایی این اهداف و دسته بندی و بررسی مسیر عملکردی آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. اتصال بین miRNA و mRNA هدف، نوع عملکرد آن را تعیین می‌کند بنابراین؛ امکان شناسایی این ژن‌ها با استفاده از جستجوی مبتنی بر همولوژی وجود دارد (Jones-Rhoades & Bartel 2007; Sunkar & Zhu 2004). در واقع، اتصال کامل‌تر منجر به برش^{۱۳} mRNA هدف و اتصال ناقص باعث مهار ترجمه^{۱۴} می‌شود (Liu et al. 2014). یکی از عواملی که می‌تواند میزان جفت شدگی بین miRNA و mRNA هدف را نشان دهد سطح انتظار^{۱۵} است، هر چه این مقدار عدد کمتری باشد نشان‌دهنده اتصالات بیشتر و کاملتری خواهد بود.

¹³ Cleavage

¹⁴ Translation

¹⁵ Expectation

bna-miR156: در نتیجه این بررسی ۴۸ ژن هدف برای bna-miR156 شناسایی شد (جدول ۳)، که از این تعداد

پنج ژن از طریق مکانیزم مهار ترجمه و ۴۳ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR156 کمترین سطح انتظار

با مقدار ۱/۵٪ متعلق به ژن‌های (SPL10) squamosa promoter binding protein-like 10، squamosa promoter

(SPL2) binding protein-like 2، (SPL15) squamosa promoter binding protein-like 15، بود.

جدول ۳. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR156 به کمک نرم‌افزار psRNATarget

Table 3. Target gene identified for bna-miR156 using psRNATarget

| miRNA_Acc | Target_Acc. | Expectation | Target_start | Target_end | Inhibition | Gene names |
|-------------|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|
| bna-miR156c | TC200337 | 1.5 | 1168 | 1188 | Cleavage | SPL10 |
| bna-miR156c | TC210178 | 1.5 | 1108 | 1128 | Cleavage | SPL2 |
| bna-miR156c | CX189447 | 1.5 | 290 | 310 | Cleavage | SPL15 |
| bna-miR156c | TC197337 | 2.5 | 429 | 449 | Cleavage | SPL13B |
| bna-miR156c | TC163178 | 2.5 | 84 | 104 | Cleavage | aap1 |
| bna-miR156c | TC201789 | 2.5 | 51 | 71 | Translation | PSB28 |
| bna-miR156c | TC173904 | 3 | 687 | 707 | Cleavage | SC35 |
| bna-miR156c | TC177533 | 3 | 505 | 525 | Cleavage | SPL3 |
| bna-miR156c | TC209054 | 3 | 118 | 138 | Cleavage | VPS28-1 |
| bna-miR156c | TC198942 | 3.5 | 274 | 294 | Cleavage | ATJ8 |
| bna-miR156c | TC182301 | 3.5 | 1029 | 1049 | Cleavage | AL4 |
| bna-miR156c | GR444442 | 3.5 | 16 | 36 | Cleavage | MSH2 |
| bna-miR156c | TC178093 | 3.5 | 554 | 574 | Cleavage | RPPIC |
| bna-miR156c | TC209692 | 3.5 | 10 | 30 | Cleavage | CCX3 |
| bna-miR156c | TC169034 | 3.5 | 634 | 654 | Cleavage | SPL3 |
| bna-miR156c | DW999514 | 3.5 | 44 | 64 | Cleavage | At1g48330 |
| bna-miR156c | TC193647 | 3.5 | 1000 | 1020 | Cleavage | RPN11 |
| bna-miR156c | TC175666 | 3.5 | 879 | 899 | Cleavage | SGPP |
| bna-miR156c | TC176166 | 3.5 | 98 | 118 | Cleavage | At2g45990 |
| bna-miR156c | TC166520 | 3.5 | 692 | 712 | Cleavage | MCD7.8 |
| bna-miR156c | TC193661 | 3.5 | 1182 | 1202 | Cleavage | NEK3 |
| bna-miR156c | DW998491 | 3.5 | 651 | 671 | Translation | At5g43440 |
| bna-miR156c | TC165577 | 4 | 1237 | 1257 | Cleavage | ADH2 |
| bna-miR156c | TC171289 | 4 | 787 | 807 | Cleavage | RH26 |
| bna-miR156c | TC195178 | 4 | 289 | 309 | Cleavage | RH25 |
| bna-miR156c | TC163889 | 4 | 751 | 771 | Cleavage | VHA-c5 |
| bna-miR156c | TC183113 | 4 | 1345 | 1365 | Cleavage | RPS17D |
| bna-miR156c | TC189091 | 4 | 430 | 450 | Cleavage | At3g18410 |
| bna-miR156c | CX188322 | 4 | 594 | 614 | Cleavage | IP5P6 |
| bna-miR156c | TC179878 | 4 | 436 | 456 | Cleavage | At3g18410 |
| bna-miR156c | TC162866 | 4 | 2103 | 2123 | Cleavage | HSP70-1 |
| bna-miR156c | TC213502 | 4 | 842 | 862 | Translation | PES |
| bna-miR156c | TC172623 | 4 | 91 | 111 | Translation | NCER2 |
| bna-miR156c | TC180759 | 4 | 65 | 85 | Cleavage | CID9 |
| bna-miR156c | TC171695 | 4 | 37 | 57 | Cleavage | SSL12 |
| bna-miR156c | TC195611 | 4 | 52 | 72 | Cleavage | PYD1 |
| bna-miR156c | TC166315 | 4 | 995 | 1015 | Cleavage | CWLP |
| bna-miR156c | TC172188 | 4 | 54 | 74 | Cleavage | ATL52 |
| bna-miR156c | TC194111 | 4 | 460 | 480 | Translation | At5g44005 |
| bna-miR156c | TC211365 | 4 | 207 | 227 | Cleavage | TOPP4 |
| bna-miR156c | TC183876 | 4 | 1376 | 1396 | Cleavage | ABI1 |
| bna-miR156c | TC167642 | 4 | 870 | 890 | Cleavage | SGPP |
| bna-miR156c | TC196356 | 4 | 25 | 45 | Cleavage | GATA18 |
| bna-miR156c | TC191133 | 4 | 151 | 171 | Cleavage | RABA1C |
| bna-miR156c | ES998325 | 4 | 163 | 183 | Cleavage | At1g49180 |
| bna-miR156c | ES905761 | 4 | 121 | 141 | Cleavage | FBL3 |
| bna-miR156c | TC175661 | 4 | 513 | 533 | Cleavage | POLD4 |
| bna-miR156c | TC178589 | 4 | 405 | 425 | Cleavage | At5g07960 |

بررسی منابع نشان داد که ژن هدف SPL10 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: شکل دهی برگ^{۱۶}، تنظیم منفی فرآیند متابولیک اکسین^{۱۷}، تنظیم زمان گذار از مرحله رویشی به زایشی، تنظیم رونویسی نقش داشت. همچنین ژن هدف SPL2 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: نمو بساک^{۱۸}، تنظیم منفی فرآیند متابولیک اکسین، تنظیم زمان گذار از مرحله رویشی به زایشی، تنظیم رونویسی نقش داشت. ژن هدف SPL15 نیز در فرآیندهای نمو بساک، تنظیم تکثیر جمعیت سلولی^{۱۹}، تنظیم اندازه سلول، تنظیم رونویسی، اثرگذار بود (Riechmann et al. 2000; Shikata et al. 2009; Xing et al. 2010; Ye et al. 2020).

bna-miR171: ۱۵ ژن هدف برای bna-miR171 شناسایی شد (جدول ۴)، که از این تعداد چهار ژن از طریق مکانیزم

مهار ترجمه و ۱۱ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR171 کمترین سطح انتظار با مقدار دو متعلق به ژن‌های Scarecrow-like protein 15 (SCL15)، Scarecrow-like protein 6 (SCL6) بود. ژن هدف SCL15 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: تمایز سلولی^{۲۰}، تنظیم رونویسی و ژن هدف SCL6 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: تمایز سلولی، تقسیم سلولی، ریتم شبانه روز، تنظیم رونویسی اثرگذار بودند (Engstrom et al. 2011; Gaudet et al. 2011; Li et al. 2011).

جدول ۴. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR171 به کمک نرم افزار psRNATarget

Table 4. Target gene identified for bna-miR171 using psRNATarget

| miRNA_Acc. | Target_Acc. | Expectation | Target_start | Target_end | Inhibition | Gene names |
|-------------|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|
| bna-miR171c | TC191279 | 2 | 598 | 618 | Translation | SCL15 |
| bna-miR171c | TC195562 | 2 | 831 | 851 | Cleavage | SCL6 |
| bna-miR171c | TC194761 | 4 | 563 | 583 | Cleavage | CIPK5 |
| bna-miR171c | TC167577 | 4 | 810 | 830 | Cleavage | CDKG1 |
| bna-miR171c | TC179460 | 4 | 465 | 485 | Cleavage | GTE5 |
| bna-miR171c | TC197116 | 4 | 223 | 243 | Translation | DALL4 |
| bna-miR171c | CN829556 | 4 | 123 | 143 | Translation | MRF3 |
| bna-miR171c | TC172757 | 4 | 247 | 267 | Translation | MCD1 |
| bna-miR171c | TC199491 | 4 | 541 | 561 | Cleavage | POT4 |
| bna-miR171c | EE409212 | 4 | 211 | 231 | Cleavage | At2g15560 |
| bna-miR171c | EV083949 | 4 | 151 | 171 | Cleavage | LPAT3 |
| bna-miR171c | TC202894 | 4 | 405 | 425 | Cleavage | MAB16.4 |
| bna-miR171c | TC168689 | 4 | 686 | 706 | Cleavage | NIFS1 |
| bna-miR171c | TC201185 | 4 | 1418 | 1438 | Cleavage | At3g06270 |
| bna-miR171c | TC197122 | 4 | 1070 | 1090 | Cleavage | At5g54780 |

bna-miR172: در نتیجه این بررسی ۴۰ ژن هدف برای bna-miR172 شناسایی شد (جدول ۵)، که از این تعداد دو

ژن از طریق مکانیزم مهار ترجمه و ۳۸ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR172 کمترین سطح انتظار با

¹⁶ leaf shaping

¹⁷ Negative regulation of auxin metabolic process

¹⁸ Anther development

¹⁹ Regulation of cell population proliferation

²⁰ Cell differentiation

مقدار ۵/۰ متعلق به ژن‌های (TOE2) AP2-like ethylene-responsive transcription factor. Floral homeotic protein. AP2 (AP2) APETALA 2 (AP2)، Ethylene-responsive transcription factor (RAP2-7) بود. بررسی منابع نشان داد که ژن هدف AP2 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: تمایز سلولی، رشد گل، نگهداری مریستم، نمو تخمک گیاهی، نمو بذر، تعیین هویت اندام گل شرکت دارد. همچنین ژن‌های TOE2 و RAP2-7 در مسیر سیگنالینگ فعال شده با اتیلن^{۲۱} دخیل هستند (Kunst et al. 1989; Jofuku et al. 1994; Jofuku et al. 2005; Würschum et al. 2006; Huang et al. 2013).

جدول ۵. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR172 به کمک نرم افزار psRNATarget

Table 5. Target gene identified for bna-miR172 using psRNATarget

| miRNA_Acc. | Target_Acc. | Expectation | Target_start | Target_end | Inhibition | Gene names |
|-------------|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|
| bna-miR172d | TC195815 | 0.5 | 314 | 334 | Cleavage | AP2 |
| bna-miR172d | DY020927 | 0.5 | 440 | 460 | Cleavage | TOE2 |
| bna-miR172d | TC192206 | 0.5 | 618 | 638 | Cleavage | RAP2-7 |
| bna-miR172d | TC184340 | 1.5 | 833 | 853 | Cleavage | SMZ |
| bna-miR172d | TC206341 | 1.5 | 156 | 176 | Cleavage | RCA |
| bna-miR172d | GR450692 | 2 | 205 | 225 | Cleavage | SULTR1;3 |
| bna-miR172d | TC178706 | 2.5 | 591 | 611 | Cleavage | HSD3 |
| bna-miR172d | EE481041 | 2.5 | 285 | 305 | Cleavage | TRF-like 5 |
| bna-miR172d | TC171490 | 3 | 90 | 110 | Cleavage | LIP1 |
| bna-miR172d | ES903597 | 3 | 671 | 691 | Translation | SMXL3 |
| bna-miR172d | TC161981 | 3.5 | 167 | 187 | Cleavage | CNGC1 |
| bna-miR172d | TC185148 | 3.5 | 117 | 137 | Cleavage | RKS1 |
| bna-miR172d | TC206849 | 3.5 | 501 | 521 | Cleavage | CRK24 |
| bna-miR172d | TC205639 | 3.5 | 293 | 313 | Cleavage | SPA3 |
| bna-miR172d | EV163824 | 3.5 | 260 | 280 | Cleavage | ABC6 |
| bna-miR172d | FG564604 | 3.5 | 222 | 242 | Cleavage | At5g25330 |
| bna-miR172d | TC199033 | 3.5 | 1253 | 1273 | Translation | At2g03510 |
| bna-miR172d | TC168318 | 3.5 | 720 | 740 | Cleavage | TA1 |
| bna-miR172d | TC172909 | 3.5 | 1007 | 1027 | Cleavage | RPT1A |
| bna-miR172d | CN730332 | 3.5 | 82 | 102 | Cleavage | At2g33847 |
| bna-miR172d | EV188001 | 3.5 | 561 | 581 | Cleavage | COL13 |
| bna-miR172d | TC176478 | 3.5 | 139 | 159 | Cleavage | RPL9D |
| bna-miR172d | DY025345 | 3.5 | 522 | 542 | Cleavage | VAT1 |
| bna-miR172d | EL626840 | 3.5 | 118 | 138 | Cleavage | LIP1 |
| bna-miR172d | TC212778 | 3.5 | 277 | 297 | Cleavage | XBAT31 |
| bna-miR172d | CN729904 | 4 | 248 | 268 | Cleavage | ACA2 |
| bna-miR172d | TC204762 | 4 | 628 | 648 | Cleavage | SHA1 |
| bna-miR172d | TC163985 | 4 | 1062 | 1082 | Cleavage | HO1 |
| bna-miR172d | TC201376 | 4 | 356 | 376 | Cleavage | CYTB5-E |
| bna-miR172d | EE436169 | 4 | 601 | 621 | Cleavage | DTX19 |
| bna-miR172d | TC176438 | 4 | 949 | 969 | Cleavage | At5g43190 |
| bna-miR172d | TC173017 | 4 | 205 | 225 | Cleavage | CKA2 |
| bna-miR172d | TC193129 | 4 | 68 | 88 | Cleavage | At5g60615 |
| bna-miR172d | TC162435 | 4 | 750 | 770 | Cleavage | At2g30170 |
| bna-miR172d | EE508972 | 4 | 281 | 301 | Cleavage | At3g13882 |
| bna-miR172d | TC190823 | 4 | 282 | 302 | Cleavage | PILS5 |
| bna-miR172d | ES900502 | 4 | 483 | 503 | Cleavage | PUB6 |
| bna-miR172d | TC190716 | 4 | 249 | 269 | Cleavage | At3g02880 |
| bna-miR172d | TC190395 | 4 | 702 | 722 | Cleavage | TFIIIA |

²¹ Ethylene-activated signaling pathway

bna-miR393: برای bna-miR393، ۲۱ ژن هدف شناسایی شد (جدول ۶)، که از این تعداد دو ژن از طریق مکانیزم

مهار ترجمه و ۱۹ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR393 کمترین سطح انتظار با مقدار یک متعلق به ژن هدف 3 Auxin signaling F-box 3 (AFB3) بود. این ژن در فرآیندهای بیولوژیکی زیادی از جمله: مسیر سیگنالینگ فعال شده با اکسین، پاسخ سلولی به نیترات، پاسخ دفاعی، توسعه ریشه جانبی، بلوغ گرده، نمو ریشه اولیه، یوبی کوئیتیناسیون پروتئین^{۲۲}، نمو پرچم دخیل است (Cecchetti et al. 2008; Vidal et al. 2010).

جدول ۶. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR393 به کمک نرم افزار psRNA Target

Table 6. Target gene identified for bna-miR393 using psRNA Target

| miRNA_Acc. | Target_Acc. | Expectation | Target_start | Target_end | Inhibition | Gene names |
|------------|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|
| bna-miR393 | TC175423 | 1 | 1093 | 1113 | Cleavage | AFB3 |
| bna-miR393 | TC180163 | 1.5 | 762 | 782 | Cleavage | TIR1 |
| bna-miR393 | TC176250 | 2.5 | 236 | 256 | Cleavage | BHLH77 |
| bna-miR393 | TC181533 | 2.5 | 920 | 940 | Cleavage | GRHI |
| bna-miR393 | TC178553 | 3 | 877 | 897 | Cleavage | PBL7 |
| bna-miR393 | GR448850 | 3 | 279 | 299 | Cleavage | At4g27130 |
| bna-miR393 | TC189968 | 3.5 | 1299 | 1319 | Cleavage | PSAT1 |
| bna-miR393 | CD825577 | 3.5 | 133 | 153 | Cleavage | CDS1 |
| bna-miR393 | TC169101 | 3.5 | 729 | 749 | Cleavage | THI1 |
| bna-miR393 | ES922859 | 3.5 | 117 | 137 | Cleavage | At1g30440 |
| bna-miR393 | CD836704 | 3.5 | 205 | 225 | Cleavage | DXPS3 |
| bna-miR393 | TC193588 | 4 | 1217 | 1238 | Cleavage | A36 |
| bna-miR393 | TC177542 | 4 | 331 | 351 | Translation | CYCA3-2 |
| bna-miR393 | DY013027 | 4 | 587 | 607 | Cleavage | SGS3 |
| bna-miR393 | TC208184 | 4 | 198 | 220 | Cleavage | At4g31790 |
| bna-miR393 | TC189722 | 4 | 198 | 218 | Cleavage | PGD2 |
| bna-miR393 | TC167611 | 4 | 657 | 677 | Cleavage | LHCB5 |
| bna-miR393 | TC203655 | 4 | 432 | 452 | Cleavage | At3g25545 |
| bna-miR393 | EL623319 | 4 | 56 | 76 | Cleavage | At1g20430 |
| bna-miR393 | TC213130 | 4 | 1231 | 1251 | Translation | PYD3 |
| bna-miR393 | EE468726 | 4 | 57 | 77 | Cleavage | RPS15AA |

bna-miR395: ۳۵ ژن هدف برای bna-miR156 شناسایی شد (جدول ۷)، که از این تعداد دو ژن از طریق مکانیزم

مهار ترجمه و ۳۳ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR395 کمترین سطح انتظار با مقدار دو متعلق به ژن‌های ATP sulfurylase 4 (APS4)، Sulfate transporter 2.1 (SULTR2;1)، Sm-like protein LSM2 (LSM2) بود. از لحاظ فرآیندهای بیولوژیکی ژن APS4 در فرآیند بیوسنتز سولفید هیدروژن، اسمیلاسیون سولفات مؤثر است (Gaudet et al. 2011). ژن SULTR2;1 نیز در انتقال غشایی سولفات و ژن LSM2 در اسپیلیسینگ mRNA نقش دارند (Takahashi et al. 2000; Gaudet et al. 2011).

²² Protein ubiquitination

جدول ۷. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR395 به کمک نرم افزار psRNA Target

Table 7. Target gene identified for bna-miR395 using psRNA Target

| miRNA_Acc. | Target_Acc. | Expectation | Target_start | Target_end | Inhibition | Gene names |
|-------------|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|
| bna-miR395d | TC161837 | 2 | 395 | 415 | Cleavage | APS4 |
| bna-miR395d | TC196344 | 2 | 110 | 130 | Cleavage | SULTR2;1 |
| bna-miR395d | TC194625 | 2 | 153 | 173 | Cleavage | LSM2 |
| bna-miR395d | EE505105 | 3 | 26 | 46 | Cleavage | ERF5 |
| bna-miR395d | TC164712 | 3 | 161 | 181 | Cleavage | AOC1 |
| bna-miR395d | TC210033 | 3 | 29 | 49 | Cleavage | IAA16 |
| bna-miR395d | TC167317 | 4 | 358 | 378 | Cleavage | APS1 |
| bna-miR395d | TC212796 | 4 | 76 | 96 | Cleavage | HSFA1A |
| bna-miR395d | TC166732 | 4 | 731 | 751 | Cleavage | DAN1 |
| bna-miR395d | TC170860 | 4 | 381 | 401 | Cleavage | UBP14 |
| bna-miR395d | TC181206 | 4 | 451 | 471 | Cleavage | At5g07670 |
| bna-miR395d | TC163140 | 4 | 13 | 33 | Cleavage | At5g45880 |
| bna-miR395d | TC164950 | 4 | 1062 | 1082 | Cleavage | FRO5 |
| bna-miR395d | EL622706 | 4 | 327 | 347 | Cleavage | PER66 |
| bna-miR395d | TC195097 | 4 | 419 | 439 | Cleavage | APS3 |
| bna-miR395d | TC174114 | 4 | 13 | 33 | Cleavage | GWD1 |
| bna-miR395d | FG578632 | 4 | 282 | 302 | Cleavage | HSFA1E |
| bna-miR395d | EE432116 | 4 | 252 | 272 | Cleavage | SULTR1;2 |
| bna-miR395d | FG562207 | 4 | 428 | 448 | Cleavage | At1g27030 |
| bna-miR395d | EV196300 | 4 | 400 | 420 | Cleavage | At5g39980 |
| bna-miR395d | TC207631 | 4 | 580 | 600 | Cleavage | SUR1 |
| bna-miR395d | EV158747 | 4 | 9 | 29 | Cleavage | SPL |
| bna-miR395d | EE463322 | 4 | 593 | 613 | Cleavage | PBL7 |
| bna-miR395d | TC193450 | 4 | 325 | 345 | Cleavage | At3g43583 |
| bna-miR395d | TC169359 | 4 | 415 | 435 | Cleavage | LTPG5 |
| bna-miR395d | TC214178 | 4 | 895 | 915 | Translation | HHO2 |
| bna-miR395d | TC178967 | 4 | 433 | 453 | Cleavage | HSFB1 |
| bna-miR395d | TC170043 | 4 | 861 | 881 | Cleavage | BHLH128 |
| bna-miR395d | TC177707 | 4 | 857 | 877 | Translation | HHO2 |
| bna-miR395d | TC173035 | 4 | 580 | 600 | Cleavage | HSFB2B |
| bna-miR395d | TC206782 | 4 | 1644 | 1664 | Cleavage | At5g44680 |
| bna-miR395d | EL590625 | 4 | 396 | 416 | Cleavage | ILL3 |
| bna-miR395d | TC210886 | 4 | 209 | 229 | Cleavage | WOX9 |
| bna-miR395d | TC212205 | 4 | 429 | 449 | Cleavage | G6PD2 |
| bna-miR395d | TC201952 | 4 | 332 | 352 | Cleavage | At1g19860 |

bna-miR396: بر اساس نتایج ۶۱ ژن هدف برای bna-miR396 شناسایی شد (جدول ۸)، که از این تعداد سه ژن

از طریق مکانیزم مهار ترجمه و ۵۸ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR396 کمترین سطح انتظار با مقدار دو متعلق به ژن‌های *Atypical CYS HIS rich thioredoxin 5 (Acht5)* و *Malate synthase (MLS)* بود. این طور به نظر می‌رسد دو ژن *MLS* و *Acht5* در فرآیندهای نظیر انتقال الکترون، چرخه گلی اکسیلات، چرخه تری کربوکسیلیک اسید نقش داشته باشند (Gaudet et al. 2011).

bna-miR860: برای bna-miR860، ۱۵ ژن هدف شناسایی شد (جدول ۹)، که از این تعداد دو ژن از طریق مکانیزم

مهار ترجمه و ۱۳ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای این microRNA کمترین سطح انتظار با مقدار ۱/۵ متعلق به ژن *Ferrochelatase-1 (FC1)* بود. این ژن در فرآیندهای بیولوژیکی از جمله فرآیند بیوسنتز هم، پاسخ به تنش اکسیداتیو، نقش دارد (Nagai et al. 2007).

جدول ۸. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR396 به کمک نرم افزار psRNA Target

Table 8. Target gene identified for bna-miR396 using psRNA Target

| miRNA_Acc. | Target_Acc. | Expectation | Target_start | Target_end | Inhibition | Gene names |
|-------------|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|
| bna-miR396a | TC187500 | 2 | 513 | 533 | Cleavage | ACHT5 |
| bna-miR396a | EV034616 | 2 | 81 | 101 | Cleavage | MLS |
| bna-miR396a | TC170340 | 2.5 | 643 | 663 | Cleavage | At2g29340 |
| bna-miR396a | TC177516 | 2.5 | 900 | 920 | Cleavage | At1g75510 |
| bna-miR396a | TC183331 | 2.5 | 522 | 542 | Cleavage | ATG10 |
| bna-miR396a | TC189970 | 2.5 | 931 | 951 | Cleavage | RH3 |
| bna-miR396a | TC177014 | 2.5 | 1457 | 1477 | Cleavage | DEGP1 |
| bna-miR396a | TC181583 | 2.5 | 675 | 695 | Cleavage | CAC3 |
| bna-miR396a | TC200332 | 2.5 | 699 | 719 | Cleavage | AGL24 |
| bna-miR396a | TC171496 | 3 | 719 | 739 | Translation | FLU |
| bna-miR396a | TC187395 | 3 | 545 | 566 | Cleavage | GRF9 |
| bna-miR396a | EL588114 | 3 | 508 | 528 | Cleavage | SRM1 |
| bna-miR396a | EE557600 | 3 | 252 | 273 | Cleavage | GRF4 |
| bna-miR396a | CX278866 | 3 | 511 | 531 | Cleavage | TIM50 |
| bna-miR396a | TC196487 | 3 | 785 | 806 | Cleavage | GRF2 |
| bna-miR396a | TC181676 | 3 | 483 | 503 | Cleavage | HEMA1 |
| bna-miR396a | TC179132 | 3 | 635 | 656 | Cleavage | GRF7 |
| bna-miR396a | TC177807 | 3 | 610 | 631 | Cleavage | GRF4 |
| bna-miR396a | DV643325 | 3 | 158 | 178 | Cleavage | CEP14 |
| bna-miR396a | TC173822 | 3 | 334 | 354 | Cleavage | At4g32590 |
| bna-miR396a | GR463390 | 3 | 387 | 407 | Cleavage | UBC25 |
| bna-miR396a | DW997496 | 3 | 543 | 563 | Cleavage | HSP90-4 |
| bna-miR396a | EL625432 | 3 | 203 | 223 | Cleavage | UBP5 |
| bna-miR396a | TC188123 | 3 | 425 | 445 | Cleavage | HSP90-2 |
| bna-miR396a | TC213959 | 3 | 994 | 1014 | Cleavage | At1g07310 |
| bna-miR396a | TC198128 | 3 | 845 | 865 | Cleavage | At1g07990 |
| bna-miR396a | TC213531 | 3 | 387 | 407 | Cleavage | MNJ7.25 |
| bna-miR396a | TC191005 | 3.5 | 769 | 789 | Cleavage | STR7 |
| bna-miR396a | EL623951 | 3.5 | 653 | 673 | Cleavage | LAP3 |
| bna-miR396a | TC189021 | 3.5 | 474 | 494 | Cleavage | XBPC3 |
| bna-miR396a | EE553181 | 3.5 | 181 | 201 | Cleavage | SINAT2 |
| bna-miR396a | TC188333 | 3.5 | 740 | 760 | Cleavage | 4CL4 |
| bna-miR396a | TC209102 | 3.5 | 770 | 790 | Cleavage | NPF8.3 |
| bna-miR396a | EV078031 | 3.5 | 279 | 299 | Cleavage | BIO1 |
| bna-miR396a | TC165833 | 3.5 | 691 | 711 | Cleavage | BAG4 |
| bna-miR396a | TC195066 | 3.5 | 599 | 619 | Cleavage | AT4g29040 |
| bna-miR396a | EE426459 | 3.5 | 145 | 165 | Cleavage | BHLH74 |
| bna-miR396a | TC162813 | 3.5 | 523 | 543 | Cleavage | RD21C |
| bna-miR396a | TC171464 | 3.5 | 22 | 42 | Cleavage | RPT4A |
| bna-miR396a | TC164713 | 3.5 | 411 | 431 | Cleavage | RAP2-2 |
| bna-miR396a | TC169703 | 3.5 | 39 | 59 | Cleavage | LUP1 |
| bna-miR396a | TC167449 | 3.5 | 1387 | 1407 | Cleavage | BGLU44 |
| bna-miR396a | FG572766 | 3.5 | 15 | 35 | Cleavage | RS31 |
| bna-miR396a | TC168895 | 4 | 676 | 696 | Cleavage | At5g61440 |
| bna-miR396a | EE425761 | 4 | 202 | 222 | Cleavage | ASA2 |
| bna-miR396a | EE430620 | 4 | 430 | 450 | Cleavage | SR34A |
| bna-miR396a | TC169694 | 4 | 353 | 373 | Cleavage | BGAL4 |
| bna-miR396a | EE463642 | 4 | 498 | 518 | Cleavage | At3g19370 |
| bna-miR396a | TC181006 | 4 | 785 | 805 | Translation | SBE2.1 |
| bna-miR396a | FG574661 | 4 | 413 | 433 | Cleavage | CPI |
| bna-miR396a | TC176910 | 4 | 406 | 426 | Cleavage | At3g01660 |
| bna-miR396a | TC170128 | 4 | 497 | 517 | Cleavage | RD21A |
| bna-miR396a | TC168631 | 4 | 247 | 267 | Cleavage | MFP1 |
| bna-miR396a | TC199637 | 4 | 134 | 153 | Translation | RABG3B |
| bna-miR396a | TC209595 | 4 | 496 | 516 | Cleavage | RD21B |
| bna-miR396a | EV120573 | 4 | 445 | 465 | Cleavage | MS1 |
| bna-miR396a | EE428719 | 4 | 374 | 394 | Cleavage | RPL18C |
| bna-miR396a | TC203440 | 4 | 581 | 601 | Cleavage | At5g27330 |
| bna-miR396a | FG557805 | 4 | 362 | 382 | Cleavage | TPR14 |
| bna-miR396a | TC174733 | 4 | 305 | 325 | Cleavage | F24G24.70 |
| bna-miR396a | TC190025 | 4 | 561 | 581 | Cleavage | CHI3 |

جدول ۹. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR860 به کمک نرم افزار psRNATarget

Table 9. Target gene identified for bna-miR156 using psRNATarget

| miRNA_Acc. | Target_Acc. | Expectation | Target_start | Target_end | Inhibition | Gene names |
|------------|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|
| bna-miR860 | TC167118 | 1.5 | 1642 | 1662 | Cleavage | FC1 |
| bna-miR860 | TC188635 | 3 | 1143 | 1163 | Cleavage | ENO1 |
| bna-miR860 | TC172219 | 3 | 1199 | 1219 | Cleavage | RPS11C |
| bna-miR860 | TC212133 | 3 | 392 | 412 | Cleavage | At5g06400 |
| bna-miR860 | TC191881 | 3 | 631 | 651 | Cleavage | IQD22 |
| bna-miR860 | CX279675 | 3 | 452 | 472 | Cleavage | UGE1 |
| bna-miR860 | TC197230 | 3 | 462 | 482 | Translation | CML28 |
| bna-miR860 | TC175260 | 3.5 | 534 | 553 | Cleavage | At5g03795 |
| bna-miR860 | TC211326 | 3.5 | 758 | 778 | Cleavage | At5g55840 |
| bna-miR860 | TC190350 | 4 | 1288 | 1308 | Cleavage | At4g11680 |
| bna-miR860 | GR438961 | 4 | 491 | 511 | Translation | T20H2.24 |
| bna-miR860 | TC205632 | 4 | 824 | 844 | Cleavage | UBC37 |
| bna-miR860 | TC177133 | 4 | 1176 | 1196 | Cleavage | MPA22.8 |
| bna-miR860 | TC202599 | 4 | 470 | 490 | Cleavage | At5g08670 |
| bna-miR860 | TC188682 | 4 | 539 | 559 | Cleavage | SUVH3 |

هستی شناسی ژن های هدف: در بررسی هستی شناسی ژن های هدف پیش بینی شده را به اجزای سلولی، فرآیندهای

بیولوژیکی و عملکرد مولکولی طبقه بندی می کنند (Balakrishnan et al. 2013). بر این اساس، در فرآیندهای بیولوژیکی

بیشترین فراوانی شامل «فرآیندهای سلولی»، «فرآیندهای متابولیک»، «تنظیم بیولوژیکی» و «پاسخ به محرکها» بود. در میان

اجزای سلولی، بیشترین فراوانی مرتبط با «آناتومیک سلول»، «درون سلولی» و «کمپلکس پروتئینی» بود. همچنین در مورد

عملکردهای مولکولی، «فعالیت کاتالیزوری»، «اتصال» و «تنظیم کننده عملکرد مولکولی»، بیشترین فراوانی را داشتند. در جدول

یک جزئیات مربوط به بررسی هستی شناسی ژن های هدف به همراه شماره دسترسی GO آن ها آورده شده است و نمودار دایره

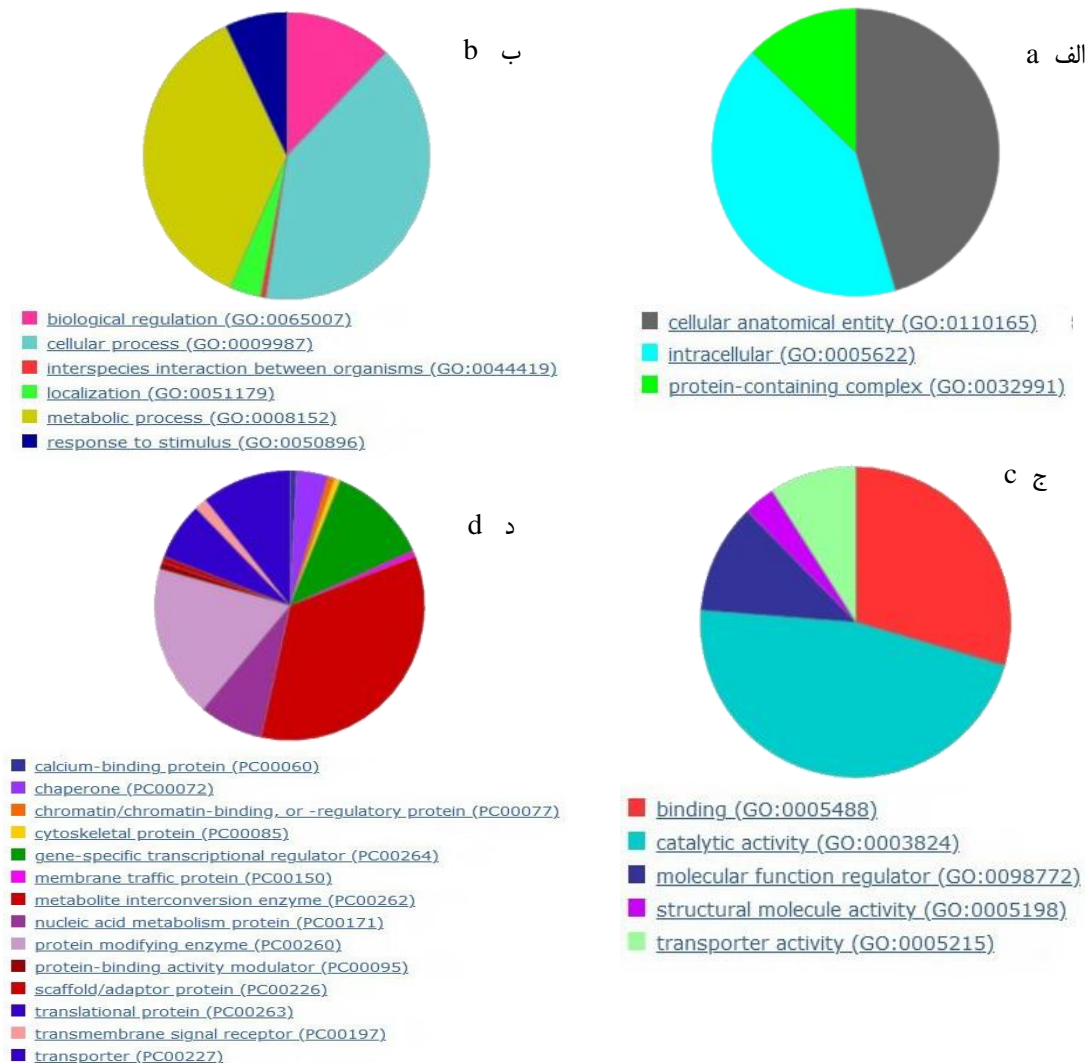
آن ها در شکل سه رسم شده است (شکل ۳، جدول ۱۰).

جدول ۱۰. هستی شناسی ژن های هدف با استفاده از سیستم PANTHER (p-value < 0.05 FDR)

Table 10. Ontology of target genes using PANTHER system (p-value < 0.05 FDR)

| Category name (Accession) | Genes Count | Percentage |
|---|-------------|------------|
| فرآیندهای بیولوژیکی (Biological Process) | | |
| cellular process (GO:0009987) | 69 | 40.10% |
| metabolic process (GO:0008152) | 63 | 36.60% |
| biological regulation (GO:0065007) | 21 | 12.20% |
| response to stimulus (GO:0050896) | 12 | 7.00% |
| localization (GO:0051179) | 6 | 3.50% |
| interspecies interaction between organisms (GO:0044419) | 1 | 0.60% |
| اجزای سلولی (Cellular Component) | | |
| cellular anatomical entity (GO:0110165) | 86 | 45.50% |
| intracellular (GO:0005622) | 79 | 41.80% |
| protein-containing complex (GO:0032991) | 24 | 12.70% |
| عملکرد مولکولی (Molecular Function) | | |
| catalytic activity (GO:0003824) | 57 | 46.70% |
| binding (GO:0005488) | 36 | 29.50% |
| molecular function regulator (GO:0098772) | 14 | 11.50% |
| transporter activity (GO:0005215) | 11 | 9.00% |
| structural molecule activity (GO:0005198) | 4 | 3.30% |

همچنین طبقه بندی ژن‌های هدف بر اساس نوع پروتئین نیز صورت گرفت، براساس آن، بیش‌ترین دسته از پروتئین‌ها مربوط به «آنزیم‌های تبدیل‌کننده متابولیت‌ها»^{۲۳}، «آنزیم اصلاح‌کننده پروتئین»^{۲۴} و «تنظیم‌کننده رونویسی مختص ژن»^{۲۵} بود. در جدول ۱۱ جزئیات مربوط به طبقه‌بندی ژن‌های هدف بر اساس نوع پروتئین به همراه شماره دسترسی آن‌ها آورده شده است و نمودار دایره آن‌ها در شکل ۳ آمده است.



شکل ۳. نمودار دایره‌ای هستی‌شناسی و طبقه‌بندی پروتئینی ژن‌های هدف با استفاده از سیستم PANTHER: (الف) اجزای سلولی، (ب) فرآیندهای بیولوژیکی، (ج) عملکرد مولکولی، (د) طبقه‌بندی پروتئینی

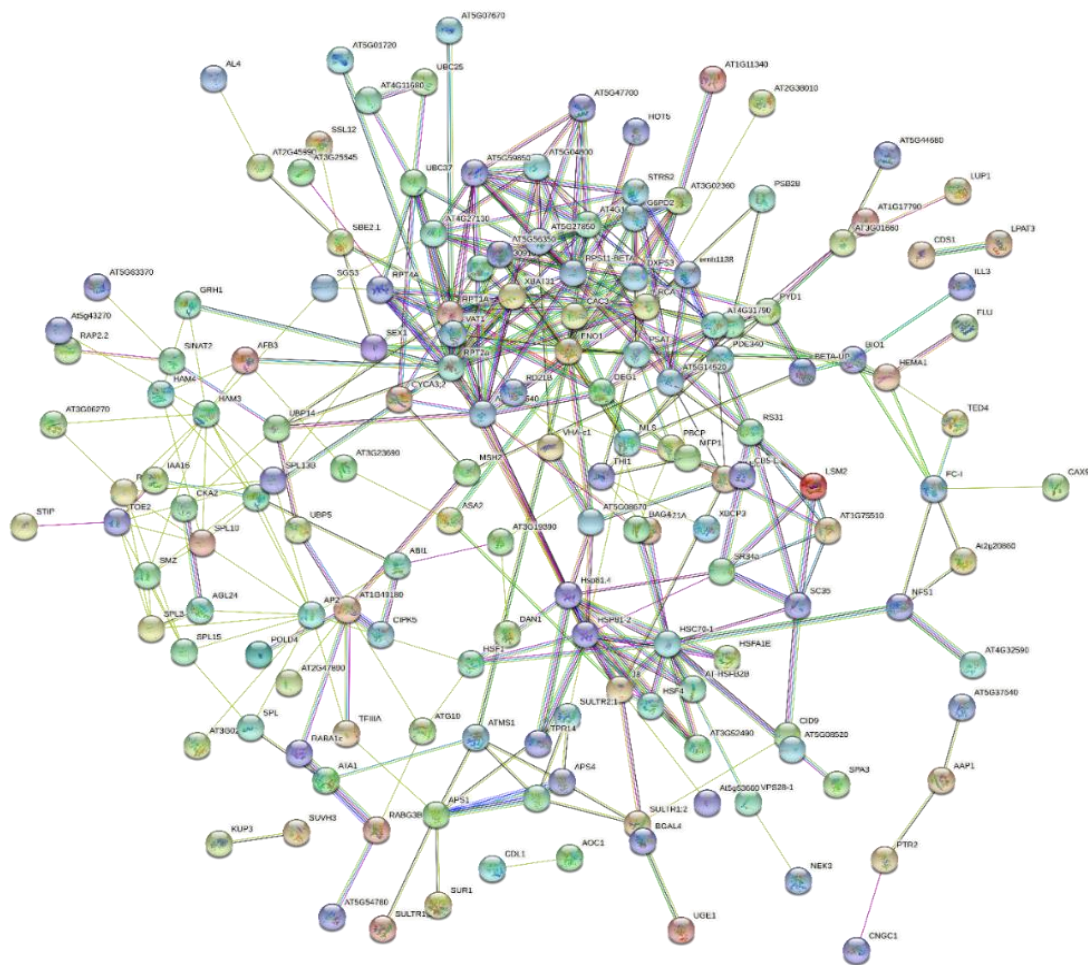
Figure 3. Circular diagram of GO and protein classification of target genes using PANTHER: a) cellular components, b) biological processes, c) molecular function, d) protein classification

²³ Metabolite interconversion enzyme

²⁴ Protein modifying enzyme

²⁵ Gene-specific transcriptional regulator

برهم کنش‌های پروتئینی: برای بررسی برهم کنش‌های پروتئینی از پلات فرم STRING استفاده شد که در آن گره‌ها^{۲۶} نمایانگر پروتئین‌ها هستند و اتصالات (لبه^{۲۷}) تعاملات شناخته شده یا پیش‌بینی شده، مستقیم و غیرمستقیم آن‌ها را نشان می‌دهند. در واقع، ارتباط بین گره‌های پروتئینی مبتنی بر اطلاعات موجود استخراج شده از پایگاه داده‌های مربوطه و مقالات است. حداقل امتیاز متقابل مورد نیاز برای برقراری اتصالات به صورت پیش فرض ۰/۴ قرار گرفته شد. بر این اساس شناسه‌های ژنی که به این پلت فرم داده شد، مشخص گردید که ژن‌های هدف شامل ۲۲۶ گره و ۳۳۶ لبه بود و از این تعداد ۶۹ ژن در شبکه قرار نگرفته و تعاملی با یکدیگر نداشتند (شکل ۴).



شکل ۴. شبکه تعامل پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING. گره‌های رنگی نشان‌دهنده پروتئین‌ها هستند و خطوط رنگی نشان‌دهنده تعامل آن‌ها با یکدیگر

Figure 4. Protein-protein interaction network using STRING database. Colored nodes represent proteins, and colored lines represent their interaction with each other

²⁶ Nods

²⁷ Edges

آنالیز این شبکه پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape و افزونه CytoHubba مشخص کرد که برخی از این ژن‌های هدف دارای تعاملات بالایی با هستند. بر این اساس ۲۰ عدد از آن‌هایی که بیشترین تعامل را در شبکه داشتند با روش MMC شناسایی شدند که در شکل پنج مشخص گردید. همانطور که پیش‌تر در آنالیز مسیر KEGG مشخص شده بود، در این قسمت نیز بخش عمده‌ای از ژن‌های هدف مرتبط با زیر واحدهای ریبوزومی و پروتئازومی هستند. می‌دهد. در این میان ژن‌های ریبوزومی که بیشترین تعامل را داشتند به ترتیب: *RPS11C* توسط *miR860* *RPS15AA* توسط *mir393* *RPL9D* توسط *miR396* *RPL18C* توسط *miR172* *RPP1C* و *RPS17D*، توسط *miR156* مورد هدف قرار گرفتند و ژن‌های پروتئازومی نیز به ترتیب: *RPT2a* توسط *miR396* و *RPT1a* توسط *miR172* و *RPN11*، توسط *miR156* تنظیم می‌شوند. در بخش‌های قبل به نقش این ژن‌ها در فرآیند پاسخ به تنش اشاره شد. از طرف دیگر مشاهده شد یکی دیگر از ژن‌هایی که دارای تعاملات بالایی با این مجموعه بود ژن پروتئین ناقل یوبیکوئیتین^{۲۸۳۷} بود که توسط *miR860* تنظیم می‌شود.

جدول ۱۱. طبقه بندی ژن‌های هدف بر اساس نوع پروتئین با استفاده از سیستم PANTHER (FDR) (p-value < 0.05)

Table 11. Classification of target genes based on protein type using PANTHER system (p-value < 0.05 FDR)

| Category name (Accession) | Genes Count | Percentage |
|---|-------------|------------|
| metabolite interconversion enzyme (PC00262) | 45 | 34.40% |
| protein modifying enzyme (PC00260) | 24 | 18.30% |
| gene-specific transcriptional regulator (PC00264) | 16 | 12.20% |
| transporter (PC00227) | 14 | 10.70% |
| nucleic acid metabolism protein (PC00171) | 10 | 7.60% |
| translational protein (PC00263) | 9 | 6.90% |
| chaperone (PC00072) | 5 | 3.80% |
| transmembrane signal receptor (PC00197) | 2 | 1.50% |
| scaffold/adaptor protein (PC00226) | 1 | 0.80% |
| membrane traffic protein (PC00150) | 1 | 0.80% |
| protein-binding activity modulator (PC00095) | 1 | 0.80% |
| calcium-binding protein (PC00060) | 1 | 0.80% |
| cytoskeletal protein (PC00085) | 1 | 0.80% |
| chromatin/chromatin-binding, or -regulatory protein (PC00077) | 1 | 0.80% |

در تمام یوکاریوت‌ها، سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم^{۲۹} (UPS) یکی از مسیرهای اصلی کنترل کیفیت پروتئین است که برای

تخریب پروتئین‌های نادرست یا اضافی برای حفظ هموستاز پروتئوم گیاهی استفاده می‌شود (Su et al. 2020). در UPS،

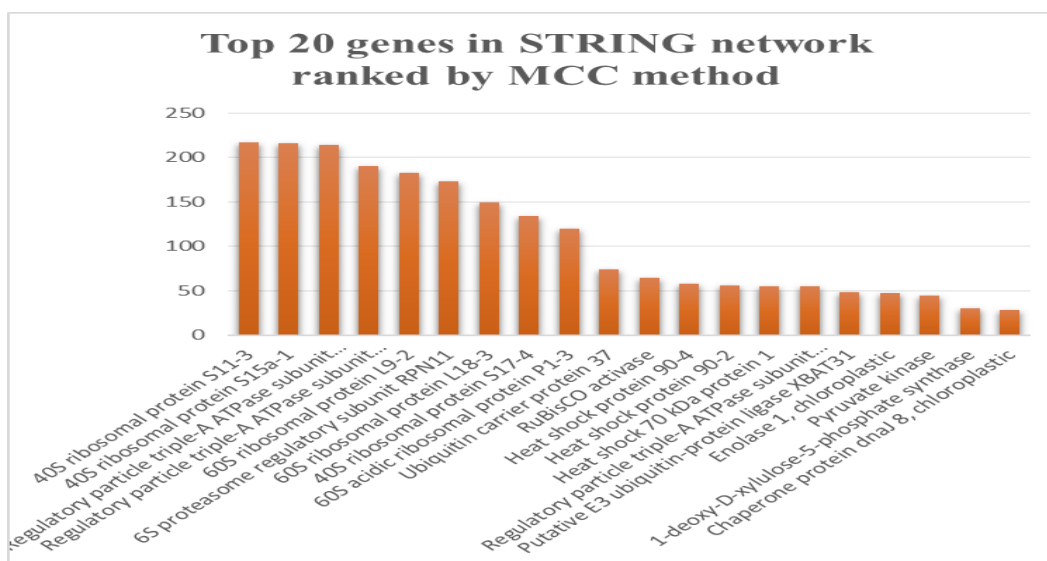
پروتئین‌هایی که باید تجزیه شوند با مولکول‌های یوبیکوئیتین برچسب‌گذاری می‌شوند. این فرآیند جفت‌شدگی^{۳۰} یوبیکوئیتین به سه

²⁸ Ubiquitin carrier protein 37 (UBC37)

²⁹ Ubiquitin-proteasome system

³⁰ Conjugation process

نوع آنزیم یوبیکوئیتین نیاز دارد: E1 (آنزیم فعال کننده یوبیکوئیتین^{۳۱})، E2 (آنزیم جفت کننده یوبیکوئیتین^{۳۲})، و E3 (پروتئین لیگاز یوبیکوئیتین^{۳۳}). متعاقباً، پروتئین‌های پلی یوبی کوئیتینه در پروتئازوم‌ها که از انواع زیر واحدها و پروتئین‌های تنظیم کننده تشکیل شده‌اند، تجزیه می‌شوند (Su et al. 2020). UPS یک تنظیم کننده کلیدی هموستاز پروتئوم گیاهی است. در پاسخ به تنش محیطی، UPS می‌تواند بیان ژن و پاسخ‌های سلولی را از طریق یوبی کوئیتیناسیون^{۳۴} پروتئین‌های تنظیم کننده مانند فاکتورهای رونویسی دخیل در پاسخ‌های تنش محیطی تنظیم کند. بسیاری از ژن‌های کد کننده اجزای درگیر در UPS توسط تنش غیر زیستی القا می‌شوند (Xu & Xue 2019). نقش‌های مرتبط با تنش برای تعدادی از آنزیم‌های یوبیکوئیتین نشان داده شده است. بسیاری از ژن‌های کد کننده E2 القاء کننده تنش هستند. سطوح رونوشت *Glycine max UBC2* (*GmUBC2*; سویا)، *Arachis hypogaea UBC2* (*AhUBC2*; بادام زمینی) و *Arabidopsis UBC32* (*AtUBC32*) در پاسخ به تنش خشکی و/یا شوری تنظیم می‌شود (Zhou et al. 2010a; Cui et al. 2012). فرا بیان *AtUBC32* گیاهان را به تنش شوری حساس کرد (Cui et al. 2012). برعکس، گیاهان جهش یافته *AtUBC32* تحمل بیشتری نسبت به تنش شوری دارند. همچنین گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس با فرایان *Vigna radiata UBC1* (*VrUBC1*; ماش)، *AhUBC2* یا *GmUBC2* نسبت به تنش خشکی تحمل بیشتری نشان دادند (Chung et al. 2013).



شکل ۵. نمودار ژن‌های دارای بیشترین تعامل و برهم کنش با یکدیگر که به کمک ابزار CytoHubba با استفاده از روش MCC به دست آمد

Figure 5. The graph of genes with the most interaction was obtained using the CytoHubba tool and the MCC method

³¹ Ubiquitin activating enzyme; UBA

³² Ubiquitin conjugating enzyme; UBC

³³ Ubiquitin ligase; UBL

³⁴ Ubiquitination

نتیجه گیری: در پژوهش حاضر سعی شد تا ارتباط مولکول‌های microRNA دخیل در تنش شوری و خشکی با تغییراتی که در فرآیندهای بیولوژیکی در طی این تنش رخ می‌دهد، بررسی شود. با توجه به نتایج یافته‌های ما اینطور به نظر می‌رسد تنش منجر به فعال شدن سیستم‌ها و مسیرهای مختلف بیولوژیکی و تغییر در بیان ژن‌ها همراه با فعال شدن ماشین پروتئین‌سازی و تغییر در محتوای پروتئینی می‌شود و در نتیجه گیاه برای محافظت از خود و تحمل و یا ایجاد سازگاری به شرایط موجود و حفظ همونستاز پروتئینی از طریق فعال کردن تنظیم ژن پس از رونویسی^{۳۵} (PTGR) مانند فرآیند پیرایش و استفاده از microRNA مکانیزم‌های و تغییرات پس از ترجمه^{۳۶} (PTMs) مانند یوبی کوئیتیناسیون، فسفوریلاسیون، متیلاسیون و استیلاسیون، فراوانی، فعالیت‌ها، تقسیم‌بندی درون سلولی و انتقال پروتئین‌های تنظیم‌کننده درگیر در فرآیندهای مختلف رشد و همچنین پاسخ‌دهی به تنش را تنظیم می‌کند. به همین دلیل تعاملات گسترده و درهم‌تنیده بین این سیستم‌ها مورد انتظار است. بنابراین بررسی نقش microRNA و ژن‌های هدف مربوط به آن‌ها و همچنین سیستم‌هایی که منجر به تغییرات پس از ترجمه می‌شوند منجر به ایجاد به افق دید وسیع‌تری در ارتباط با تنش‌ها و اثر آن بر مسیرهای درگیر در فرآیندهای سلولی خواهد شد و ابعاد گسترده پاسخ به تنش‌ها را آشکار خواهد کرد.

سپاسگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات هیات محترم تحریریه مجله بیوتکنولوژی کشاورزی و همچنین دقت نظر داوران ارجمند به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری نمایند.

منابع

- عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.
- محسن زاده گلفزانی محمد، پسندیده ارجمند مریم، سمیع زاده لاهیجی حبیب ا... (۱۴۰۰) شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌های کلیدی دخیل در تنش اسمزی گیاه آرابیدوپسیس. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۱)، ۱-۲۲.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۴-۱۶۹.
- محمدآبادی محمدرضا، سفلی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

³⁵ Post-transcriptional gene regulation

³⁶ Post-translational modifications

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳): ۱۱۱-۱۲۲.

References

- Akdogan G, Tufekci ED, Uranbey S et al. (2016) miRNA-based drought regulation in wheat. *Funct Integr Genomics* 16, 221-233.
- Akhtar MM, Micolucci L, Islam MS et al. (2015) Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res* 44, 24-44.
- Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 13 (4), 183-200 (In Persian).
- Aravind J, Rinku S, Pooja B et al. (2017) Identification, Characterization, and Functional Validation of Drought-responsive MicroRNAs in Subtropical Maize Inbreds. *Front Plant Sci* 8, 941.
- Baek D, Chun HJ, Kang S et al. (2016) A Role for Arabidopsis miR399f in Salt, Drought, and ABA Signaling. *Mol Cells* 39, 111-118.
- Balakrishnan R, Harris MA, Huntley R et al. (2013) A guide to best practices for Gene Ontology (GO) manual annotation. Database bat054.
- Barrera-Figueroa BE, Gao L, Wu Z et al. (2012) High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress-regulated microRNAs in the inflorescences of rice. *Plant Biol* 12, 132.
- Bhardwaj AR, Joshi G, Pandey R et al. (2014) A Genome-Wide Perspective of miRNAome in Response to High Temperature, Salinity and Drought Stresses in *Brassica juncea* (Czern) L. *PLOS ONE* 9, e92456.
- Carnavale Bottino M, Rosario S, Grativol C et al. (2013) High-Throughput Sequencing of Small RNA Transcriptome Reveals Salt Stress Regulated MicroRNAs in Sugarcane. *PLOS ONE* 8, e59423.
- Cecchetti V, Altamura MM, Falasca G et al. (2008) Auxin regulates Arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20, 1760-1774.
- Chung E, Cho C-W, So H-A et al. (2013) Overexpression of VrUBC1, a Mung Bean E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme, Enhances Osmotic Stress Tolerance in Arabidopsis. *PLOS ONE* 8, e66056.
- Cui F, Liu L, Zhao Q et al. (2012) Arabidopsis Ubiquitin Conjugase UBC32 Is an ERAD Component That Functions in Brassinosteroid-Mediated Salt Stress Tolerance. *Plant Cell* 24, 233-244.
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res* 46, 49-54.
- Engstrom EM, Andersen CM, Gumulak-Smith J et al. (2011) Arabidopsis homologs of the petunia hairy meristem gene are required for maintenance of shoot and root indeterminacy. *Plant Physiol* 155, 735-750.
- Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE et al. (2011) Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief Bioinform* 12, 449-462.
- Gentile A, Dias LI, Mattos RS et al. (2015) microRNAs and drought responses in sugarcane. *Front Plant Sci* 6, 58.
- Gupta S, Dong Y, Dijkwel PP et al. (2019) Genome-wide analysis of ROS antioxidant genes in resurrection species suggest an involvement of distinct ROS detoxification systems during desiccation. *Int J Mol Sci* 20, 3101.
- Hirayama T, Shinozaki K (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* 61, 1041-1052.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44.
- Huang H-Y, Jiang W-B, Hu Y-W et al. (2013) BR signal influences Arabidopsis ovule and seed number through regulating related genes expression by *BZRI*. *Mol Plant* 6, 456-469.

- Jian H, Wang J, Wang T et al. (2016) Identification of Rapeseed microRNAs Involved in Early Stage Seed Germination under Salt and Drought Stresses. *Front Plant Sci* 7, 658.
- Jofuku KD, den Boer BG, Van Montagu M et al. (1994) Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* 6, 1211-1225.
- Jofuku KD, Omidyar PK, Gee Z et al. (2005) Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene APETALA2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3117-3122.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14, 787-799.
- Khraiwesh B, Zhu J-K, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta* 1819, 137-148.
- Kumar S, Stecher G, Li M et al. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547-1549.
- Kunst L, Klenz JE, Martinez-Zapater J et al. (1989) AP2 Gene Determines the Identity of Perianth Organs in Flowers of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 1, 1195-1208.
- Li G, Siddiqui H, Teng Y et al. (2011) Coordinated transcriptional regulation underlying the circadian clock in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* 13, 616-622.
- Li Y, Guo Q, Liu P et al. (2021) Dual roles of the serine/arginine-rich splicing factor SR45a in promoting and interacting with nuclear cap-binding complex to modulate the salt-stress response in Arabidopsis. *New Phytol* 230, 641-655.
- Liu D, Liu H, Du H et al. (2021) Relationship between polyamines conjugated to mitochondrion membrane and mitochondrion conformation from developing wheat embryos under drought stress. *J Biosci* 46, 1-11.
- Liu Q, Wang F, Axtell MJ (2014) Analysis of complementarity requirements for plant microRNA targeting using a Nicotiana benthamiana quantitative transient assay. *Plant Cell* 26, 741-753.
- Lukasik A, Pietrykowska H, Paczek L et al. (2013) High-throughput sequencing identification of novel and conserved miRNAs in the Brassica oleracea leaves. *BMC Genomics* 14, 801.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Meng C, Yang M, Wang Y et al. (2020) SIWHY2 interacts with SIRECA2 to maintain mitochondrial function under drought stress in tomato. *Plant Sci* 301, 110674.
- Mi H, Muruganujan A, Ebert D et al. (2018) PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res* 47, 419-426.
- Min H, Yoon S (2010) Got target?: computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Exp Mol Med* 42, 233.
- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542.
- Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12, 191-208 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).

- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.
- Mohsenzadeh Golfazani M, Pasandideh Arjmand M, Samizadeh Lahiji HJABJ (2022a) Bioinformatics identification of hub genes involved in osmotic stress of Arabidopsis. Agric Biotechnol J 14, 155-174. (In Persian).
- Mohsenzadeh Golfazani M, Taghvaei MM, Samizadeh Lahiji H et al. (2022b) Investigation of proteins' interaction network and the expression pattern of genes involved in the ABA biogenesis and antioxidant system under methanol spray in drought-stressed rapeseed. 3 Biotech 12, 217.
- Moin M, Saha A, Bakshi A et al. (2021) Constitutive expression of Ribosomal Protein L6 modulates salt tolerance in rice transgenic plants. Gene 789, 145670.
- Nagai S, Koide M, Takahashi S et al. (2007) Induction of isoforms of tetrapyrrole biosynthetic enzymes, AtHEMA2 and AtFC1, under stress conditions and their physiological functions in Arabidopsis. Plant Physiol 144, 1039-1051.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M et al. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics 28, 1166-1167.
- Pegler JL, Nguyen DQ, Oultram JM et al. (2021) Molecular Manipulation of the MiR396/GRF Expression Module Alters the Salt Stress Response of Arabidopsis thaliana. Agron 11, 1751.
- Razi K, Muneer SJCRiB (2021) Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. Crit Rev Biotechnol 41 (5), 669-691.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G et al. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Sci 290, 2105-2110.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. Anim Biotechnol 33, 1-11.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O et al. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res 13 (11), 2498-2504.
- Shikata M, Koyama T, Mitsuda N et al. (2009) Arabidopsis SBP-box genes SPL10, SPL11 and SPL2 control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase. Plant Cell Physiol 50, 2133-2145.
- Su T, Yang M, Wang P et al. (2020) Interplay between the Ubiquitin Proteasome System and Ubiquitin-Mediated Autophagy in Plants. Cells 9 (10), 2219.
- Sunkar R, Zhu JK (2007) microRNAs and short-interfering RNAs in plants. J Integr Plant Biol 49, 817-826.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D et al. (2018) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res 47, 607-613.
- Taghvaei MM, Lahiji HS, Golfazani MM (2022) Evaluation of expression changes, proteins interaction network, and microRNAs targeting catalase and superoxide dismutase genes under cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.). OCL 29 (3),
- Taghvaei MM, Samizadeh Lahiji H, Bakhtiarzadeh MR et al. (2019) Bioinformatics analysis of microRNAs related to cold Stress and their effects on proteins associated with fatty acids metabolism in rapeseed (*Brassica napus* L.). J Crop Biotech 9, 41-58.
- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW et al. (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 23(2), 171-182.
- Tian Y, Tian Y, Luo X et al. (2014) Identification and characterization of microRNAs related to salt stress in broccoli, using high-throughput sequencing and bioinformatics analysis. BMC Plant Biol 14, 226.

- Vidal EA, Araus V, Lu C et al. (2010) Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 4477-4482.
- Wang F, Li L, Liu L et al. (2012a) High-throughput sequencing discovery of conserved and novel microRNAs in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Mol Genet Genomics* 287, 555-563.
- Wang J, Yang X, Xu H et al. (2012b) Identification and characterization of microRNAs and their target genes in *Brassica oleracea*. *Gene* 505, 300-308.
- Wang R, Zou J, Meng J et al. (2018) Integrative analysis of genome-wide lncRNA and mRNA expression in newly synthesized Brassica hexaploids. *Ecol Evol* 8, 6034-6052.
- Würschum T, Gross-Hardt R, Laux T (2006) *APETALA2* regulates the stem cell niche in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell* 18, 295-307.
- Xing S, Salinas M, Höhmann S et al. (2010) miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 3935-3950.
- Xu F-Q, Xue H-W (2019) The ubiquitin-proteasome system in plant responses to environments. *Plant, Cell Environ* 42, 2931-2944.
- Yang J, Liu X, Xu B et al. (2013) Identification of miRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile and its maintainer fertile lines of *Brassica juncea*. *Genomics* 14 (9).
- Ye B-B, Shang G-D, Pan Y et al. (2020) AP2/ERF Transcription Factors Integrate Age and Wound Signals for Root Regeneration. *Plant Cell* 32, 226-241.
- Yu X, Wang H, Lu Y et al. (2012) Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in *Brassica rapa*. *J Exp Bot* 63, 1025-1038.
- Zhang B, Pan X, Cannon CH et al. (2006) Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J* 46, 243-259.
- Zhang Y, Zhang A, Li X et al. (2020) The Role of Chloroplast Gene Expression in Plant Responses to Environmental Stress. *Int J Mol Sci* 21 (17), 6082.
- Zhou G-A, Chang R-Z, Qiu L-J (2010a) Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 72, 357-367.
- Zhou L, Liu Y, Liu Z et al. (2010b) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *J Exp Bot* 61, 4157-4168.