ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۳،پاییز ۱۳۹۷
صفحه ۳۷۹ - ۳۶۳

شناسایی miRNAها و ژن‌های هدف بالقوه آن‌ها در گلرنگ زراعی (*Carthamus tinctorius* L)

Identification of conserved miRNAs and their putative target genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L)

فرشید کوهی[۱]، کریم سرخه*[۲]، سزای ایرسیزلی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

۲- استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

۳- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه آتاتورک ترکیه

Kouhi F[1], Sorkheh K[*2], Ercisli S[2]

1- MSc Student, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz

2- Assisstant Professor, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

3- Professor, Agricultural Faculty, Ataturk University, Turkey

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: karimsorkheh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

microRNAها (miRNA) گروهی از RNAهای غیر کدکننده و کوتاه (~۲۱ نوکلئوتید) هستند که از طریق تنظیم بیان ژن‌ها در سطح پس از رونویسی نقش کلیدی را در توسعه و فیزیولوژی گیاه ایفا می‌کنند. ازآنجایی‌که تاکنون مطالعه جامعی در رابطه با شناسایی miRNAهای گلرنگ به روش *in silico* انجام نشده است، در این پژوهش با آنالیز توالی‌های ژنومی، ۱۲٤ miRNA بالقوه متعلق به ۲٦ خانواده حفاظت‌شده، شناسایی و حضور ۲ مورد از آن‌ها در ژنوم گلرنگ با استفاده از RT-qPCR تأیید شد. این ۲۹ خانواده miRNA به‌طور چشم‌گیری در اندازه متفاوت هستند. آنالیز توالی‌های pre- miRNA نشان داد که طول این پیش‌سازها در گلرنگ از ۵۷ تا ۳۱۷ با میانگین ٤۰/۱ ± ۹۵/۸۸ نوکلئوتید متغیر است. دیگر نتیجه مهم به‌دست‌آمده در این مطالعه، موفقیت در تعیین کلاسترهای miR169، miR395 و miR397 در ژنوم گلرنگ بود. در مطالعه پیش رو برای نخستین بار اعضای خانواده‌های miR393، miR477، miR530، miR6111، miR6113 و miR6114 در ژنوم گلرنگ شناسایی شد. با استفاده از پروتکل‌های ارائه‌شده در مطالعات پیشین، درمجموع ۸٤ ژن هدف بالقوه برای miRNAهای گلرنگ شناسایی شد. ژن‌های هدف این قبیل از ژن‌ها، فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های دخیل در همانندسازی DNA و آنزیم‌های متابولیکی را شامل می‌شوند. نتایج این مطالعه نشان داد که miRNAهای حفاظت شده در گلرنگ وجود دارند و می‌توانند عملکرد مؤثری در پاسخ به تنش‌های محیطی نیز داشته باشند.

واژه‌های کلیدی

کلاستر
Carthamus tinctorius
in silico
miRNA
RT-qPCR

مقدمه

گلرنگ زراعی (*Carthamus tinctorius* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات دانه روغنی با عملکردی حدود ۴۰-۳۰ درصد روغن است که به‌عنوان منبعی برای تولید روغن‌های صنعتی، علوفه دام، عصاره‌های دارویی و رنگ‌های خوراکی در نظر گرفته می‌شود (Goodman 1964; Weiss 1971). باوجود اهمیت گلرنگ در بین محصولات زراعی، دانش اندکی در مورد سازمان‌دهی این گونه در سطح مولکولی به‌ویژه در ارتباط با کنترل بیان ژن‌ها وجود دارد. miRNAها گروهی از RNAهای کوتاه تنظیمی هستند که به‌طور منفی بیان ژن‌ها را در سطوح پس از رونویسی و از طریق اتصال به توالی mRNA هدف به‌صورت ایجاد برش و یا ممانعت از ترجمه تنظیم می‌کنند (Zhang et al. 2006a). در گیاهان، miRNAها اغلب با ایجاد برش در رونوشت‌های mRNA عمل تنظیم بیان ژن‌ها را انجام می‌دهند (Rhoades et al. 2002; Bartel 2004). با توجه به نوع فعالیت miRNAها در سلول، دخالت این RNAهای کوتاه در بسیاری از فرایندهای متابولیکی و بیولوژیکی گیاهان از جمله نمو برگ‌ها (Palatnik et al. 2003)، رشد ریشه و ساقه (Guo et al. 2005; Williams et al. 2005)، هدایت سیگنال (Achard et al. 2004) و تحمل به تنش‌های محیطی (Zhao et al. 2009; Sunkar et al. 2010) به‌خوبی روشن شده‌است.

از زمان کشف اولین miRNAها در گیاهان (Park 2002; Reinhart et al. 2002)، درمجموع ۸۳۷۵ miRNA بالغ در ۷۲ گونه گیاهی گزارش و در پایگاه‌های اطلاعاتی miRNAها ثبت شده‌است (miRBase 21.0; http://www.mirbase.org). تعداد این miRNAها به‌عنوان نتایج حاصل از مطالعات شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده و جدید از طریق روش‌های محاسباتی (*in silico*) و روش‌های آزمایشگاهی از قبیل کلونینگ[1] مستقیم و توالی‌یابی عمیق[2] در حال افزایش است. با این وجود تنها بخشی از miRNAهای گیاهی شناسایی شده‌است و به‌دلیل محدودیت روش‌های تجربی، عملکرد بسیاری از آن‌ها تاکنون مشخص نشده است. در سال‌های اخیر پروژه‌های آزمایشگاهی به‌منظور شناسایی miRNAهای گلرنگ زراعی نیز صورت گرفته است (Li et al. 2011; Cao et al. 2013) با این‌حال تاکنون هیچ توالی از miRNAهای این گونه در پایگاه‌های اطلاعاتی miRNA ثبت نشده است.

درحالی‌که کلونینگ و توالی‌یابی عمیق مستقیم‌ترین راه برای شناسایی miRNAها هستند، به‌دلیل این‌که بسیاری از خانواده‌های miRNA تکامل حفاظت‌شده‌ای دارند، روش‌های محاسباتی استراتژی‌های مفیدی را برای شناسایی غیرمستقیم miRNAها ارائه می‌دهند. Zang et al. (2005) رویکرد جامعی را برای شناسایی miRNAها با استفاده از توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی EST معرفی کردند که می‌توان از این روش به‌منظور شناسایی miRNAها در سایر توالی‌های ژنومیک، ازجمله توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی WGS و GSS نیز استفاده کرد (Sunkar and Jagadeeswaran 2008). اخیراً، ۴۶۳۹۰۶ کانتیگ از یک پروژه توالی‌یابی ژنوم (Whole Genome Shotgun Sequencing یا WGS) مربوط به گیاه گلرنگ زراعی در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شده‌است (بر اساس اطلاعات جمع‌آوری شده در ۲۷ آوریل ۲۰۱۶). این توالی‌ها می‌توانند منبع با ارزشی برای شناسایی miRNAهای بالقوه در گلرنگ باشند. در مطالعه پیش رو، براساس الگوریتم BLASTn، همولوژی miRNAهای ثبت‌شده در mirBase در برابر تمام توالی‌های WGS به‌منظور یافتن توالی‌های همولوگ بررسی شده‌است. همچنین با استفاده از یک روش مشابه اقدام به شناسایی ژن‌های هدف شد که نتیجه آن به‌دست آمدن توالی‌هایی بالقوه به‌عنوان هدف هر خانواده miRNA بود.

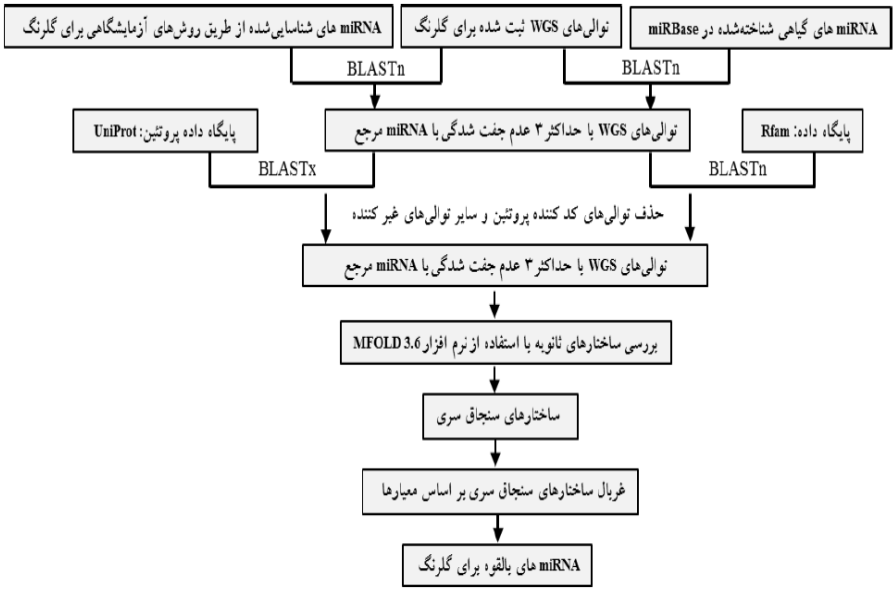
مواد و روش‌ها

به‌منظور شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده در گلرنگ زراعی، مجموعاً ۸۳۷۵ miRNA بالغ از ۷۲ گونه گیاهی از پایگاه اطلاعاتی miRNA (miRBase 21.0) دانلود شد. پس از حذف توالی‌های تکراری، ۴۱۶۵ توالی منحصر به فرد برای آنالیز براساس همولوژی به‌دست آمد. در کنار miRNAهای ثبت شده، از miRNAهای شناسایی‌شده در مطالعات پیشین بر روی گلرنگ زراعی نیز به‌عنوان miRNA مرجع استفاده شد (Li et al. 2011;

[1] Direct Cloning
[2] Deep Sequencing

Cao et al. 2013). با توجه به محدود بودن تعداد توالی‌های ثبت‌شده از ترنسکریپتوم گلرنگ (تقریباً ٤١٥٨٦ توالی در پایگاه اطلاعاتی EST)، در این مطالعه تصمیم گرفته شد از توالی‌های ژنومیک گلرنگ قابل دسترس در پایگاه اطلاعاتی GenBank برای این هدف استفاده شود. نتایج حاصل از توالی‌یابی ژنوم گلرنگ زراعی شامل ٤٦٣٩٠٦ کانتیگ ثبت شده توسط Bowers et al. (2016) به این منظور استفاده شد.

miRNAهای بالقوه مطابق با رویکردهای محاسباتی استفاده‌شده در مطالعات گذشته (Zang et al. 2005) با تغییراتی مختصر شناسایی شد. به‌طور خلاصه، ابتدا توالی miRNAهای مرجع به‌منظور شناسایی توالی‌های همولوگ در برابر تمام کانتیگ‌های WGS گلرنگ با استفاده از الگوریتم BLASTn (ورژن: 2.3.0) جستجو شد. از بین توالی‌های یافت شده، توالی‌هایی دارای حداکثر ۳ عدم جفت‌شدگی با miRNA مرجع برای اجرای مراحل بعد گزینش شدند. با استفاده از جستجو مبتنی بر BLASTx و BLASTn، همولوژی توالی‌های منحصر به فرد به‌دست آمده در برابر پایگاه‌های اطلاعاتی پروتئین (Uni Prot) و پایگاه اطلاعاتی RNAهای غیر کدکننده (Rfam:13.0) به‌ترتیب باهدف شناسایی و حذف توالی‌های کد کننده پروتئین و سایر توالی‌های غیر کدکننده بررسی شد. در ادامه با کمک نرم‌افزار مبتنی بر وب mfold (Zuker 2003) ساختار ثانویه Pre- miRNA توالی‌های باقی‌مانده بررسی شد. در شناسایی ساختارهای ساقه–حلقه پارامترهای پیش‌فرض mfold در نظر گرفته شد. از نتایج به‌دست آمده، توالی‌هایی به‌عنوان کاندید برای کد کردن miRNA در نظر گرفته شد که با معیارهای زیر مطابقت داشتند: ۱. تاخوردگی مناسب در ساختار ساقه–حلقه ۲. توالی miRNA باید تنها بر روی یک بازوی ساختار ساقه–حلقه قرار داشته باشد ۳. هیچ نوع شکستگی و یا برآمدگی در توالی miRNA و *miRNA نباید وجود داشته باشد ٤. نباید بیش از ٦ عدم جفت‌شدگی و بیش از ٥ جفت‌شدگی G:U بین miRNA بالغ و توالی مکمل آن (miRNA*/ miRNA) وجود داشته باشد ٥. ساختار ثانویه شناسایی‌شده باید پایین‌ترین مقدار MFE و بالاترین مقدار MFEI را داشته باشد (شکل ۱). اتصال کامل و از طرفی حفاظت‌شده بودن محل اتصال miRNAها، شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌های هدف را امکان‌پذیر می‌کند. در پژوهش حاضر، علاوه بر توالی‌های WGS از توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعاتی EST گلرنگ نیز برای شناسایی ژن‌های هدف استفاده شد.



شکل ۱- سلسله مراتب شناسایی miRNAها در گلرنگ زراعی

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برایmiRNAها و ژن کنترل

	Primer	Sequence (5′->3′)	Length	Tm	GC%
miR398	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGGGG			
	Forward	GCAGTGTGTTCTCAGGTCG	18	62.3	57.9
	miRNA	TGTGTTCTCAGGTCGCCCCTG			
miR408	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCCAG			
	Forward	CGTTGCACTGCCTCTTCC	18	62.8	61.1
	miRNA	TGCACTGCCTCTTCCCTGGCT			
	Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	16	63.1	68.8
	Primer	Sequence (5'->3') Gene ID	Length	Tm	GC%
Actin	Forward	TGGAATGGAAGCGGCTGGTA KJ634809.1	182	62	55
	Reverse	CTTGATCTTCATACTGCTTGG		60	52

برای شناسایی محل اتصال miRNAها به ژن هدف با استفاده از نرم‌افزار آنلاین psRNATarget و مطابق ضوابط زیر عمل شد: ۱. بیش از ٤ عدم جفت‌شدگی در محل اتصال مجاز نیست ۲. جفت نشدن بازها در موقعیت ۱۰ و ۱۱ محل برش mRNA قابل‌قبول نیست ۳. حداکثر ٤ جفت‌شدگی G:U در محل اتصال مجاز است ٤. بر اساس رویکرد تعریف‌شده توسط Lu et al. (2005)، امتیاز ≥٤ برای الگوهای جفت نشدگی در محل دوبلکس miRNA*/mRNA در نظر گرفته شد. هم‌چنین، به‌منظور درک بهتر عملکرد اهداف miRNAها از نرم‌افزار Blast2GO (ورژن 4.1) برای بررسی Gene Ontology آن‌ها استفاده شد (Conesa et al. 2005).

نمونه‌های برگ و ریشه از گیاهچه‌های گلرنگ (رقم سینا: PI-537598) پس از رشد در گلخانه دانشگاه شهید چمران اهواز جمع‌آوری و در نیتروژن مایع فریز شدند. استخراج RNA کل از دو تکرار بیولوژیک با استفاده از کیت تجاری بایوبیسیک[1] کانادا و مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (اپندورف، آلمان) و هم‌چنین بر روی ژل آگارز ۰/۸درصد بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای ساقه–حلقه برای دو miRNA مطابق با روش توصیف شده توسط Varkony et al. (2007) با تغییراتی جزئی صورت گرفت (جدول ۱). به این منظور از کیت تجاری primescript RT reagent محصول شرکت تاکارا ژاپن استفاده شد. به‌طور خلاصه برای سنتز cDNA، ۱ میکرولیتر از هر نمونه RNA (۲۰۰ نانوگرم) به همراه ۱ میکرولیتر آغازگر ساقه–حلقه (۱ میکرومولار) و ۵/۵ میکرو لیتر از آب عاری از نوکلئاز به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦٥C° انکوبه گردید و سپس به ظرف حاوی یخ به مدت ۲ دقیقه منتقل شد. در ادامه به مخلوط به‌دست‌آمده به ترتیب ۲ میکرو لیتر بافر واکنش (۵x) و ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس اضافه شد. واکنش رونویسی معکوس به ترتیب در دمای ١٦ C° به مدت ۳۰ دقیقه برای ۱ سیکل؛ ۳۰ C°، ۳۰ ثانیه؛ ٤۲ C°، ۳۰ ثانیه، ۵۰ C°، ۱ ثانیه برای ٦۰ سیکل انجام گرفت و با انکوباسیون در دمای ۸۵C° به مدت ۵ دقیقه پایان یافت.

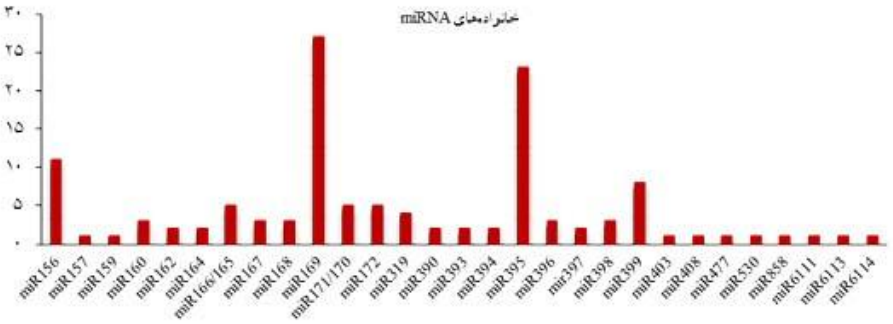
واکنش qPCR با استفاده از مخلوط واکنش تاکارا، حاوی SYBR Green و آغازگر رفت اختصاصی و برگشت عمومی در حجم ۱۰ میکرولیتر توسط دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus انجام شد. پس از اجرای واکنش qPCR تفاوت در سطوح بیان miRNAها از طریق مقایسه میانگین C_Tها بررسی شد و به‌منظور مقایسه نسبی بیان آن‌ها، نرمال‌سازی نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از ژن اکتین صورت گرفت و به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ عمل شد (Schmittgen and Livak 2008). مقایسه بین نمونه‌ها با استفاده از آزمون T-test دوتایی انجام شد.

نتایج

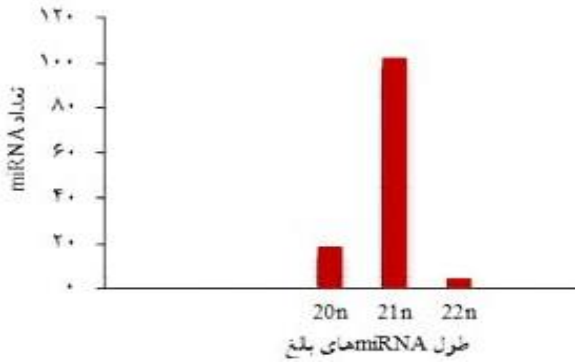
به‌منظور شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده، جستجو بر مبنای همولوژی در توالی‌های WGS موجود در پایگاه اطلاعاتی GenBank با استفاده از ٤١٦٥ توالی miRNA بالغ از گونه‌های

[1] Bio Basic

مختلف گیاهی به‌عنوان الگو و سپس غربال براساس آنالیز ساختار ثانویه pre- miRNAها، منتج به شناسایی ۱۰۷ توالی منحصر به‌فرد به‌عنوان ژن‌های کد کننده ۱۲٦ miRNA در بین ٤٦۳۹۰٦ کانتیگ ثبت شده از ژنوم گلرنگ شد. miRNAهای شناسایی‌شده گلرنگ در ۲۹ خانواده حفاظت شده دسته‌بندی شدند (شکل ۲). از بین این خانواده‌ها سه خانواده شناسایی شده‌است که ۱۰ و یا بیش از ۱۰ عضو دارند. سه خانواده miR156، miR169 و miR395 به‌ترتیب دارای ۱۰، ۲۷ و ۲۳ عضو هستند. تعداد اعضای سایر خانواده‌های miRNA کمتر از ۱۰ است و بیشتر آن‌ها تنها یک و یا دو عضو دارند. خصوصیات miRNAهای شناسایی‌شده در بین خانواده‌های مختلف متفاوت است (جدول ۲). اکثر miRNAهای شناسایی‌شده برای گلرنگ ۲۱ نوکلئوتید طول دارند (۸۳/٦٪) و سایر آن‌ها به‌ترتیب دارای ۲۰ نوکلئوتید (۱٦/۳٪) و ۲۲ نوکلئوتید (۳/۲۲٪) طول هستند (شکل ۳). در مجموع از بین این miRNAها ٦٤ miRNA (۵۰/۸۱٪) بر روی بازوی ′۳ و ٦۲ miRNA (٤۹/۱۹٪) بر روی بازوی ′۵ ساختار ساقه–حلقه قرار دارند. توالی‌های pre- miRNA در طول با هم متفاوت هستند. pre- miRNAها بین ۵۷ تا ۳۱۷ با میانگین ٤۰/۱ ± ۹۵/۸۸ نوکلئوتید طول دارند و طول اکثر آن‌ها بین ۵۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید است (شکل ٤). cti-mir172c با ۵۷ نوکلئوتید کوتاه‌ترین و cti-miR169b با ۳۱۷ نوکلئوتید بلندترین توالی pre- miRNA را در بین miRNAها دارند. به‌طور متوسط ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌های pre- miRNA دارای ۵/٤۳ ± ٤٤٪ بازهای A و U است که این مقدار از ۳۱/۵٤٪ تا ۵۹/۰۱٪ درصد متغیر است. همچنین ٦۷/۲٤٪ miRNAهای شناسایی‌شده دارای نوکلئوتید U در انتهای ′۵ خود هستند (شکل ۵). حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE) برای توالی‌های pre- miRNA گلرنگ معادل ۱۲ ± ۳۸/٤– کیلوکالری بر مول است. یافته‌ها در این مطالعه نشان می‌دهند که miRNAهای بالقوه شناسایی‌شده در گلرنگ دامنه وسیعی از مقادیر MFEI را دارند، به‌طوری‌که از ۰/۵۱ تا ۱/۳۸ کیلوکالری بر مول قابل‌مشاهده است. میانگین مقادیر MFEI برای miRNAهای بالقوه گلرنگ ۰/۱۷ ± ۰/۹٤ کیلوکالری بر مول است.



شکل۲- miRNAهای شناسایی‌شده در گلرنگ زراعی



شکل ۳- اختلاف طول miRNAهای بالغ شناسایی شده

جدول۲- خصوصیات miRNAهای شناسایی‌شده در گلرنگ زراعی

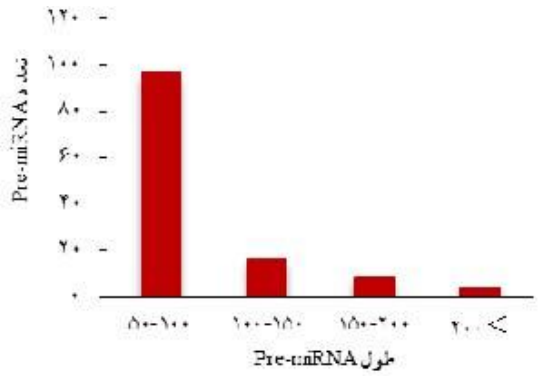
miRNA	gene ID	location	Strand	Pre-miRNA length	GC (%)	MFE	MFEI	Predicted miRNA sequence	Length
cti-miR156k	LUCG01214823.1	3′	+	124	47.58	41.6	0.705	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAC:3'	20
cti-miR156b	LUCG01229481.1	5′	+	110	46.01	39.6	0.776	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAC:3'	20
cti-miR156c	LUCG01205847.1	5′	-	95	41.83	40.7	1.043	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAC:3'	20
cti-miR156d	LUCG01107459.1	5′	+	95	40.62	40.7	1.043	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAC:3'	20
cti-miR156e	LUCG01252703.1	5′	-	87	43.67	35.2	0.926	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAC:3'	20
cti-miR156f	LUCG01301028.1	5′	+	86	37.2	32.6	1.018	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAC:3'	20
cti-miR156a	LUCG01123221.1	5′	+	83	45.78	43.2	1.136	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAC:3'	20
cti-miR156h	LUCG01157180.1	5′	-	83	45.78	36.3	0.955	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAC:3'	20
cti-miR156j	LUCG01223920.1	5′	+	93	38.7	43.2	1.2	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAU:3'	20
cti-miR156g	LUCG01141361.1	5′	-	83	35.55	37.2	1.162	5'UGACAGAAGAGAGUGAGCAU:3'	20
cti-miR156i	LUCG01204475.1	5′	-	85	44.18	41.1	1.081	5'UGACAGAAGAUAGAGAGCAC:3'	20
cti-miR157	LUCG01147638.1	5′	-	90	34.48	37	1.233	5'UGACAGAAGAUAGAGAGCAC:3'	20
cti-miR159	LUCG01179314.1	3′	+	166	41.56	62	0.898	5'UUUGGAUUGAAGGAGCUCUA:3'	21
cti-miR160c	LUCG01076414.1	5′	+	82	58.53	45.8	0.954	5'UGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA:3'	21
cti-miR160a	LUCG01085771.1	5′	+	85	45.88	40.9	1.048	5'UGCCUGGCUCCCUGGAUGCCA:3'	21
cti-miR160b	LUCG01460997.1	5′	+	81	56.25	41	0.911	5'UGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA:3'	21
cti-miR162b	LUCG01462186.1	3′	-	119	42.01	38.4	0.768	5'UCGAUAAACCUCUGCAUCCAG:3'	21
cti-miR162a	LUCG01304413.1	3′	+	92	47.82	31.5	0.715	5'UCGAUAAACCUCUGCAUCCAG:3'	21
cti-miR164a	LUCG01111945.1	5′	+	99	45.45	31.1	0.691	5'UGGAGAAGCAGGGUACGUGCA:3'	21
cti-miR164b	LUCG01285418.1	5′	-	84	33.4	33.4	0.814	5'UGGAGAAGCAGGGUACGUGCA:3'	21
cti-miR165/166e	LUCG01052069.1	3′	-	68	47.05	32.2	1.006	5'UCGGACCAGGCUUCAUUCCCU:3'	21
cti-miR165/166b	LUCG01305111.1	3′	-	120	40.83	36.7	0.748	5'UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC:3'	21
cti-miR165/166a	LUCG01238108.1	3′	+	80	45.67	30.9	0.835	5'UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC:3'	21
cti-miR165/166d	LUCG01446387.1	3′	-	247	39.26	92.1	0.939	5'UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC:3'	21
cti-miR165/166c	LUCG01301651.1	3′	-	204	40.48	73.5	0.885	5'UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC:3'	21
cti-miR167a	LUCG01005689.1	5′	+	89	42.69	35.9	0.944	5'UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA:3'	21
cti-miR167b	LUCG01009152.1	5′	-	96	35.78	28.8	0.848	5'UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA:3'	21
cti-miR167c	LUCG01202037.1	5′	+	72	44.44	29.2	0.912	5'UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA:3'	21
cti-miR168b	LUCG01272159.1	5′	+	77	48.08	30	0.81	5'UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA:3'	21
cti-miR168a	LUCG01260940.1	5′	+	59	57.62	30.7	0.902	5'UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA:3'	21
cti-miR168c	LUCG01292857.1	5′	+	103	49.51	37.5	0.735	5'UCGCUUGGUACAGGUCGGGAA:3'	21
cti-miR169a	LUCG01007750.1	5′	+	81	45.67	35.8	0.967	5'CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG:3'	21
cti-miR169b	LUCG01280546.1	5′	-	317	31.54	62.5	0.625	5'CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG:3'	21
cti-miR169c	LUCG01191289.1	5	+	103	47.57	31.6	0.644	5'UAGCCAAGGAUGACUUGCCAG:3'	21
cti-miR169d	LUCG01159517.1	5	+	104	49.03	38.5	0.754	5'UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG:3'	21
cti-miR169e	LUCG01462435.1	5′	+	61	57.37	33.2	0.948	5'CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA:3'	21
cti-miR169f	LUCG01044789.1	5	+	113	35.39	37.6	0.94	5'UAGCCAAGGAUGACUUGCCUA:3'	21
cti-miR169g	LUCG01265785.1	5	-	98	41.83	34	0.829	5'UAGCCAAGGAUGACUUGCCUA:3'	21
cti-miR169h	LUCG01457271.1	5′	+	93	45.74	32.9	0.765	5'UAGCCAAGGAUGACUUGCCGA:3'	21
cti-miR169aj	LUCG01094534.1	5	+	92	43.47	38.4	0.96	5'UAGCCAAGGAUGACUUGCCUU:3'	21
cti-miR169ak	LUCG01094534.1	5	+	89	49.43	40.6	0.922	5'UAGCCAAGGAUGACUUGCCAC:3'	21
cti-miR169al	LUCG01094534.1	5	+	92	45.65	36.4	0.866	5'UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'	21

جدول ۲ – ادامه

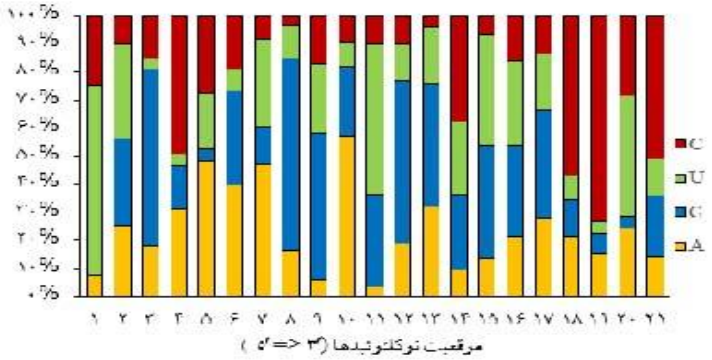
miRNA	gene ID	location	Strand	Pre-miRNA length	GC (%)	MFE	MFEI	Predicted miRNA sequence	Length
cti-miR169ao	LUCG01094534.1	5	+	91	52.84	38.8	0.808	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCA:3'	20
cti-miR169ai	LUCG01094534.1	5	+	89	49.43	40.6	0.922	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCAC:3'	21
cti-miR169am	LUCG01094534.1	5	+	89	48.31	38.1	0.886	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCAA:3'	21
cti-miR169an	LUCG01094534.1	5	+	92	45.65	31.7	0.754	5':UAGCCAAGGAUGAUUUGCCUC:3'	21
cti-miR169bp	LUCG01255108.1	5	+	89	47.16	42.1	1.002	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCAC:3'	21
cti-miR169bq	LUCG01255108.1	5	+	92	43.47	34.6	0.865	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'	21
cti-miR169br	LUCG01255108.1	5	+	89	49.43	40.6	0.922	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCAC:3'	21
cti-miR169bs	LUCG01255108.1	5	+	89	45.27	101.5	0.73	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'	21
cti-miR169ct	LUCG01300483.1	5	+	89	47.19	33.5	0.797	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCAC:3'	21
cti-miR169cu	LUCG01300483.1	5	+	92	41.3	35.7	0.939	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'	21
cti-miR169dv	LUCG01099248.1	5	-	88	48.31	40.6	0.944	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCAC:3'	21
cti-miR169dw	LUCG01099248.1	5	-	91	46.15	33.9	0.807	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'	21
cti-miR169ex	LUCG01068728.1	5	-	89	48.31	33.5	0.779	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCAC:3'	21
cti-miR169ey	LUCG01068728.1	5	-	92	46.73	34.5	0.802	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'	21
cti-miR169fz1	LUCG01206195.1	5	-	89	49.43	38.3	0.87	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCCC:3'	21
cti-miR169fz2	LUCG01206195.1	5	-	89	47.19	36.2	0.861	5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCCC:3'	21
cti-miR171/170a	LUCG01037829.1	3´	-	78	47.43	35.5	0.959	5':UGAUUGAGCCGCACCAAUAUC:3'	21
cti-miR171/170b	LUCG01013443.1	3´	-	79	37.97	33.2	1.106	5':UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC:3'	21
cti-miR171/170d	LUCG01063334.1	3´	+	75	40	24.7	0.823	5':AGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC:3'	21
cti-miR171/170e	LUCG01185673.1	3´	+	78	46.91	29.7	0.802	5':UUGAGCCGCGCCAAUAUCAC:3'	20
cti-miR171/170c	LUCG01263343.1	3´	-	78	38.46	34.3	1.143	5':UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC:3'	21
cti-miR172a	LUCG01461380.1	3´	-	90	31.86	39.5	1.362	5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU:3'	21
cti-miR172b	LUCG01181992.1	3´	+	140	40	47	0.839	5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU:3'	21
cti-mir172c	LUCG01258195.1	3´	-	57	45.75	27.8	1.112	5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU:3'	21
cti-mir172d	LUCG01278387.1	3´	+	139	35.97	45.2	0.904	5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG:3'	21
cti-mir172e	LUCG01183085.1	3´	+	167	36.52	49.4	0.809	5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG:3'	21
cti-miR319a	LUCG01257360.1	3´	+	170	47.33	69.7	0.86	5':UUGGACUGAAGGGAGCUCCCU:3'	21
cti-miR319b	LUCG01454010.1	3´	-	175	43.93	67.6	0.866	5':UUGGACUGAAGGGAGCUCCCU:3'	21
cti-mir319c	LUCG01187119.1	3´	-	165	41.81	57.4	0.831	5':UUGGACUGAAGGGAGCUCCCU:3'	21
cti-mir319d	LUCG01300110.1	3´	-	170	41.17	63	0.9	5':UUGGACUGAAGGGAGCUCCCU:3'	21
cti-miR390a	LUCG01426686.1	5´	-	100	41.58	38.1	0.907	5':AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC:3'	21
cti-miR390b	LUCG01298544.1	5´	-	88	38.63	39.4	1.158	5':AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC:3'	21
cti-miR393a	LUCG01129628.1	5´	+	92	39.5	40.9	1.202	5':UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUCC:3'	22
cti-miR393b	LUCG01275921.1	5´	-	97	36.08	37.6	1.074	5':UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUCC:3'	22
cti-miR394a	LUCG01460485.1	5´	+	71	47.22	23.5	0.691	5':UUGGCAUUCUGUCCACCUCC:3'	20
cti-miR394b	LUCG01304757.1	5´	-	191	35.68	47.1	0.702	5':UUGGCAUUCUGUCCACCUCC:3'	20
cti-miR395a	LUCG01021757.1	3´	+	66	45.45	32.6	1.086	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395b	LUCG01035990.1	3´	+	66	45.45	32.9	1.096	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395c	LUCG01273550.1	3´	-	65	46.96	35.3	1.138	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395d	LUCG01450286.1	3´	+	65	38.64	33.8	1.126	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395e	LUCG01137156.1	3´	-	65	42.42	30.7	1.096	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395f	LUCG01300411.1	3´	-	66	43.93	35	1.206	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21

جدول۲- ادامه

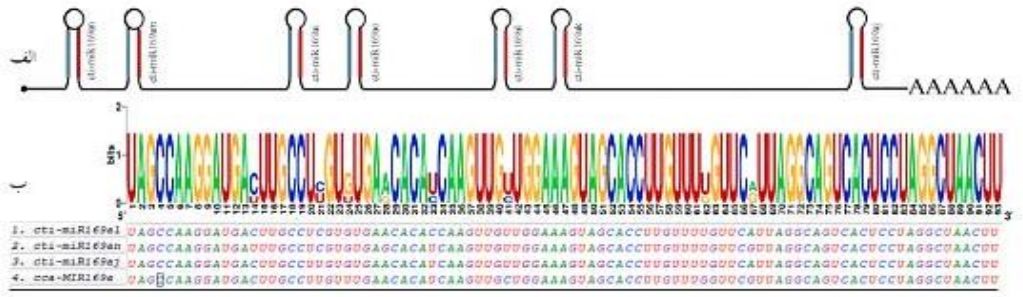
miRNA	gene ID	location	Strand	Pre-miRNA length	GC (%)	MFE	MFEI	Predicted miRNA sequence	Length
cti-miR395g	LUCG01109206.1	3′	+	65	46.15	35.6	1.186	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395h	LUCG01147001.1	3′	-	71	31.6	31.6	1.089	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395ai	LUCG01102706.1	3′	+	66	42.42	30.7	1.096	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395aj	LUCG01102706.1	3′	+	65	44.64	36.6	1.262	5':CUGAAGUGUUUGGAGGAACUC:3'	21
cti-miR395bk	LUCG01215548.1	3′	-	66	45.45	34.2	1.14	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395bl	LUCG01215548.1	3′	-	70	41.42	33.3	1.148	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395cm	LUCG01197122.1	3′	-	66	43.93	34.6	1.193	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395do	LUCG01303497.1	3′	+	69	43.39	29	0.966	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395dp	LUCG01303497.1	3′	+	65	42.87	36.6	1.062	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395cn	LUCG01197122.1	3′	-	65	44.93	34.6	1.193	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395eq	LUCG01242803.1	3′	+	66	46.96	32.8	1.058	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395er	LUCG01242803.1	3′	+	65	46.15	34.7	1.156	5':CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC:3'	21
cti-miR395s	LUCG01297117.1	3′	-	65	42.42	35.1	1.253	5':CUGAAGUGUUUGGAGGAACUU:3'	21
cti-miR395t	LUCG01297507.1	3′	-	65	45.45	37.1	1.236	5':CUGAAGUGUUUGGAGGAACUC:3'	21
cti-miR395u	LUCG01362548.1	3′	+	65	44.11	35.2	1.173	5':CUGAAGUGUUUGGAGGAACUC:3'	21
cti-miR395v	LUCG01446129.1	3′	-	68	42.02	28.7	0.989	5':CUGAAGUGUUUGGGGGGAACU:3'	21
cti-miR395w	LUCG01449834.1	3′	-	82	37.34	23.2	0.748	5':UGAGGUGUUUGAGGGAACUC:3'	20
cti-miR396a	LUCG01260106.1	5′	+	113	38.39	62.2	1.382	5':UUCCACAGCUUUCUUGAACUU:3'	21
cti-miR396b	LUCG01209959.1	5′	-	99	39.39	37.9	0.971	5':UUCCACAGCUUUCUUGAACUG:3'	21
cti-miR396c	LUCG01144649.1	5′	+	86	38.37	36.4	1.103	5':UUCCACAGCUUUCUUGAACUG:3'	21
cti-miR396e	LUCG01277585.1	5	-	108	35.18	42.3	1.11	5':UUCCACGGCUUUCUUGAACUG:3'	21
cti-miR397aa	LUCG01297574.1	3'	-	64	39.2	35	1.2	5':UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG:3'	21
cti-miR397ab	LUCG01297574.1	3'	-	68	44.6	37	1.1	5':UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG:3'	21
cti-miR398c	LUCG01455851.1	3′	-	80	44.44	24.8	0.688	5':CGUGUUCUCAGUCCGGCCCUG:3'	21
cti-miR398a	LUCG01220105.1	3′	+	70	42.85	32.9	1.096	5':UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG:3'	21
cti-miR398b	LUCG01250810.1	3′	+	107	38.31	40.8	0.995	5':UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU:3'	21
cti-miR399a	LUCG01184375.1	3′	-	82	50	29.7	0.724	5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCAG:3'	21
cti-miR399b	LUCG01392727.1	3′	-	81	51.21	34.9	0.83	5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCAG:3'	21
cti-miR399c	LUCG01270833.1	3′	-	62	47.76	23.3	0.728	5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCCG:3'	21
cti-miR399d	LUCG01304411.1	3′	-	61	59.01	35.5	0.986	5':UGCCAAGGGAGAUUUGCCCAG:3'	21
cti-miR399e	LUCG01270272.1	3′	+	88	37.64	32.4	0.925	5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCUAG:3'	21
cti-miR399f	LUCG01415348.1	3′	-	82	49.39	30.5	0.743	5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCAG:3'	21
cti-miR399g	LUCG01455070.1	3′	-	67	42.18	27.1	0.903	5':UGCCAAGGGAGAUUUGCCCUG:3'	21
cti-miR399h	LUCG01150230.1	3′	-	67	42.44	25.9	0.893	5':CGCCAAGGGAGAUUUGCCCUG:3'	21
cti-miR403	LUCG01151710.1	3′	-	137	39.41	48.3	0.89	5':UUAGAUUCACGCACAAAACUCG:3'	21
cti-miR408	LUCG01461387.1	3′	-	83	51.16	25.6	0.581	5':UGCACUGCCUCUUCCCUGGCU:3'	21
cti-miR477	LUCG01296802.1	5′	-	97	42.85	40.6	0.966	5':CUCUCCCUCAAGGGCUUCUA:3'	20
cti-miR530	LUCG01298258.1	5′	-	156	43.76	55.5	0.76	5':UGCAUUUGCACCUGCACCUUU:3'	21
cti-miR858	LUCG01306454.1	3′	+	111	52.29	29.1	0.51	5':UUCGUUGUCUGUUCGACCUUG:3'	21
cti-miR6113	LUCG01014363.1	5'	+	79	35.33	43.7	0.987	5':UCUCGAAACUCAAGAACACGUUG:3'	22
cti-miR6114	LUCG01108316.1	3'	-	125	45.6	42.29	1.08	5':UGAAAGGAAUCAUGAACGUGA:3'	21
cti-miR6111	LUCG01274879.1	5′	+	253	40.31	51.6	1.13	5':UCUUUAUGUCACGAUGUAUGAC:3'	22



شکل ٤- اختلاف طول Pre-miRNAها



شکل۵- موقعیت نوکلئوتیدها در طول miRNAهای بالغ

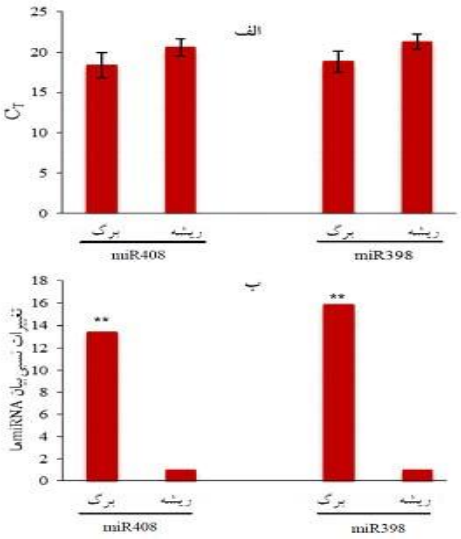


شکل٦- کلاستر miR169a در توالی LUCG01094534.1: الف) موقعیت هر miRNA بر روی رونوشت کلاستر ج) حفاظت‌شده بودن توالی‌های pre-miRNA در کلاستر miR169a و در گونه‌های نزدیک (cca: Cynara cardunculus L.).

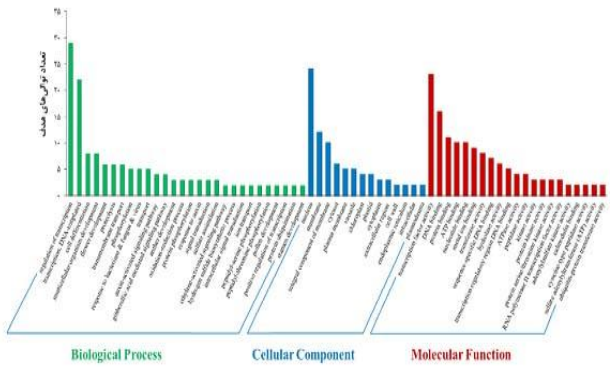
در این مطالعه، ۱۱ کلاستر miRNA بالقوه متعلق به سه خانواده متفاوت در گلرنگ شناسایی شد. خانواده cti-miR169 دارای پنج کلاستر شامل miR169a (i, j, k, l, m, n, o)، miR169b (p, q, r, s)، miR169c (t, u, v, w) و miR169e (x, y) و miR169f (z1,z2) است (شکل ۵). به‌طور مشابه خانواده cti-miR395 نیز دارای پنج کلاستر شامل cti-miR395a (i, j)، miR395b (k, l)، miR395c (m, n)، miR395d (o, p)، miR395e (q, r) است امّا خانواده cti-miR397 تنها دارای یک کلاستر می‌باشد، miR397a(a, b). نتایج هم‌ردیفی برای pre- miRNAهای کلاستر miR169a حاکی از حفاظت‌شدگی بالای آن‌ها در این کلاستر و در سایر گونه‌های گیاهی است (شکل ٦).

Stem-loop RT-PCR یک روش معتبر و دقیق برای تعیین سطح بیان miRNAهای بالغ است به‌طوری‌که قادر است توالی miRNAهایی را که تنها در یک نوکلئوتید اختلاف دارند از هم تفکیک کند (Chen et al. 2005). در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و به روش سایبرگرین احتمال حضور

miRNAهای شناسایی‌شده از طریق آنالیز توالی‌های WGS در ژنوم گلرنگ بررسی شد. miR398 و miR408 دو خانواده مورد بررسی در این مطالعه هستند که نتایج qPCR بیان آن‌ها را در هر دو اندام ریشه و برگ گیاهچه‌های گلرنگ تائید کرد (شکل ۷). miR398 و miR408 الگوی بیان نسبتاً مشابهی نشان دادند به‌طوری‌که بیان هر دو در برگ نسبت به ریشه بالاتر است. این اختلاف بیان برای miR398 نسبت به miR408 بیشتر است (شکل ۷).



شکل۷- نتایج بررسی بیان miR398 و miR408: الف) سطح بیان miR398 و miR408 در دو اندام برگ و ریشه. ب) اختلاف بیان miR398 و miR408 در برگ نسبت به ریشه. ** نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال یک‌درصد



شکل۸- کلاس‌بندی نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز GO برای ژن‌های هدف: عملکرد مولکولی (Molecular Function)، اجزاء سلولی (Cellular Component) و فرآیندهای بیولوژی (Biological Process) سه کلاسی هستند که وضعیت ژن‌های هدف را در سلول توصیف می‌کنند.

شناسایی ژن‌های هدف یکی از مراحل مهم در مطالعه بر روی miRNAها است. با توجه به حفاظت‌شده بودن محل اتصال بین miRNA و mRNA هدف، امکان شناسایی این ژن‌ها با استفاده از جستجوی مبتنی بر همولوژی وجود دارد. در این مطالعه جستجو در توالی‌های EST و WGS منجر به شناسایی ۸٤ توالی کاندید به‌عنوان ژن هدف شد. برای اکثر خانواده‌های miRNA بیش از یک ژن به‌دست آمد (جدول ۳). miRNAهای بالقوه گلرنگ اتصال کامل و یا تقریباً کاملی را با ژن‌های هدف خود نشان دادند (جدول ۳). نتایج حاصل از بررسی Gene Ontology نشان داد که توالی‌های هدف، متعلق به خانواده‌های ژنی مختلف و دارای عملکردهای بیولوژیکی و فیزیولوژیکی متفاوتی هستند. ازجمله این ژن‌ها فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های دخیل در همانندسازی DNA، ژن‌های درگیر در متابولیسم سلولی و ژن‌های درگیر در پاسخ‌دهی گیاه به تنش‌های محیطی است؛ هم‌چنین یافته‌ها نشان داد غالباً فعالیت این ژن‌ها درون هسته می‌باشد (شکل ۸ و جدول ۳).

بحث

روش‌های محاسباتی به‌عنوان یک رویکرد کارآمد تاکنون سبب پیش‌بینی صدها miRNA در بسیاری از گونه‌های گیاهی شده‌است. miRNAهای بالقوه شناخته‌شده در این مطالعه دامنه وسیعی از خصوصیات را در بین خانواده‌های مختلف و حتی در میان اعضای یک خانواده نشان می‌دهند. برای مثال، درحالی‌که تنها یک عضو برای اکثر خانواده‌های miRNA شناسایی شده‌است، miRNA ۲۷ بالقوه برای خانواده miR169 و miRNA ۲۳ برای خانواده miR395 شناسایی شده‌است. تعداد اعضای برخی از خانواده‌های miRNA در گلرنگ بیشتر از تعداد miRNAها در خانواده‌های مشابه در سایر گونه‌های گیاهی است. miR169، با ۱٤ عضو، بزرگ‌ترین خانواده miRNA در آرابیدوپسیس است (Li et al. 2010). هم‌چنین خانواده miR156، با ۷ عضو، یکی از خانواده‌های قابل‌توجه در آرابیدوپسیس است (Griffiths et al. 2007) که به‌عنوان مهم‌ترین miRNAهای دخیل در تغییر فاز رویشی به فاز زایشی شناخته می‌شوند (Wu and Poethig 2007).

جدول۳- ژن‌های هدف بالقوه برای miRNAهای گلرنگ

miRNA family	Target_Acc.	Target gene	Target function	Expectation	Inhibition
miR156	LUCG01112023.1	SPL12	Transcription factor	1	Cleavage
	LUCG01115084.1	SPL6		1	Cleavage
miR156/57	LUCG01298205.1	SPL13A		1	Cleavage
	LUCG01224167.1	RGL1	transcriptional regulator	1	Cleavage
	LUCG01243028.1	SPL3	Transcription factor	1	Cleavage
	LUCG01107968.1	SBP1		1	Cleavage
miR157	LUCG01246162.1	ABP19A	Auxin receptor	3	Cleavage
miR159	LUCG01056444.1	EXPA	cell wall organization- sexual reproduction	2.5	Cleavage
	LUCG01143063.1	MYB	Transcription factor	2	Cleavage
	LUCG01254949.1	GAMYB		1	Cleavage
	EL374787	ACT3	ATP binding	2.5	Translation
	EL378219			2.5	Translation
miR160	LUCG01282242.1	ARFR	transcription factor activity- auxin-activated signaling pathway- response to auxin	1	Cleavage
	LUCG01300668.1			3.5	Cleavage
	LUCG01303928.1			0.5	Cleavage
	LUCG01462221.1			0.5	Cleavage
	LUCG01462439.1			0	Cleavage
miR162	LUCG01307169.1	CNGC9	Acts as cyclic nucleotide	2.5	Translation
	LUCG01084634.1	RD19B	cysteine-type peptidase activity	2	Cleavage
	EL372961	HSP70	Interacts with newly imported chloroplast proteins to assist in their maturation.	3	Cleavage
	EL386787.1	A0A103XSZ1	uncharacterized protein	3.5	Cleavage
miR164	LUCG01279392.1	NAC	Transcription factor	1.5	Cleavage
	LUCG01015665.1	AB19B	auxin efflux	0.5	Cleavage
miR166	EL378923	UBP7	Involved in the processing of poly-ubiquitin precursors as well as that of ubiquitinated proteins	2.5	Cleavage
	EL390889	REV	transcription factor	3	Cleavage
miR167	LUCG01205011.1	A0A118K6Q9	auxin-activated signaling pathway	4	Cleavage
	LUCG01241175.1	A0A103XEX9		4	Cleavage
miR168	LUCG01301997.1	A0A103XFL7	carotene catabolic process	2.5	Cleavage
	LUCG01204103.1	A0A103Y950	gene silencing by RNA	3.5	Cleavage
miR169	LUCG01293037.1	2A5A	brassinosteroid mediated signaling pathway	3.5	Cleavage
	LUCG01261417.1	CIPKP	intracellular signal transduction	3.5	Cleavage
	LUCG01463496.1	CCAAT-binding	transcription factor activity	1	Cleavage
miR171	LUCG01254007.1	SCL15	transcription factor activity	1	Cleavage
	LUCG01112597.1	SCL6		0.5	Cleavage
	LUCG01294608.1			1	Cleavage
	LUCG01069633.1			1	Cleavage
	LUCG01249264.1			1	Cleavage
	LUCG01084527.1			1	Cleavage
miR172	EL403681	A0A103Y529	transcription factor	1.5	Cleavage
	LUCG01281567.1	AP2		1.5	Cleavage
	LUCG01304181.1			1.5	Cleavage
	LUCG01291350.1	RAP2-7		1.5	Cleavage
	LUCG01260705.1			0.5	Cleavage
				0.5	Cleavage
	LUCG01463844.1			0.5	Cleavage
	LUCG01083051.1			0.5	Cleavage
miR390	EL385383	At1g47380	negative regulation of defense response to bacterium	2.5	Cleavage
miR319	LUCG01179939.1	TFCC	Regulates microtubule function in seed development	2.5	Cleavage
miR393	LUCG01294804.1	TIR1	Auxin receptor	3	Cleavage
	LUCG01295536.1			3.5	Cleavage
	LUCG01297882.1			2	Cleavage
miR394	LUCG01273264.1	FBX6	photoreceptor activity	1	Cleavage
	LUCG01288514.1	CIPKP	intracellular signal transduction	2	Cleavage
	EL381257	At2g39750	methylation	2.5	Cleavage

جدول۳- ادامه

miRNA family	Target_Acc.	Target gene	Target function	Expectation	Inhibition
miR395	LUCG01272954.1	CAX3	calcium:proton antiporter activity	3	Cleavage
	LUCG01293261.1	APS1	response to cadmium ion	2	Cleavage
	LUCG01268932.1	AB5C	cellular potassium ion homeostasis- response to salt stress	2.5	Cleavage
	LUCG01048975.1	DES6	fatty acid biosynthetic process	2	Cleavage
	EL373143	APS	response to cadmium ion	2.5	Cleavage
	LUCG01290817.1	SUT3	carbohydrate transport	2	Cleavage
	LUCG01059029.1			1.5	Cleavage
miR396	LUCG01074652.1	SCP45	Involved in plants secondary metabolism.	3.5	Cleavage
	EL376169	GRF	Transcription activator	3	Cleavage
	EL378674	TUN	pollen tube development	1.5	Cleavage
	EL393087	RD21B	response to salt stress	3	Cleavage
miR397	EL394134.1	LAC13	copper ion binding	1.5	Cleavage
	EL398108.1	LAC3		1	Cleavage
	EL391150.1	LAC3		1.5	Cleavage
	EL390754.1	IRX12		1.5	Cleavage
	EL386866.1	LAC7		2	Cleavage
	EL383646.1	LAC16		1.5	Cleavage
miR398	EL410611	SODCC	superoxide dismutase activity	2.5	Cleavage
	EL406119			2.5	Cleavage
	EL510881			2.5	Cleavage
miR399	EL377818	TULP	response to fungus	1.5	Cleavage
miR403	LUCG01174959.1	AGO2	Involved in RNA-mediated post-transcriptional gene silencing	1	Cleavage
	LUCG01263368.1	At1g80870	protein phosphorylation	2.5	Cleavage
miR408	EL406272	Cupredoxin	electron transfer activity	3	Cleavage
	EL411506	Cupredoxin		3	Cleavage
miR477	LUCG01301932.1	GAI1	gibberellic acid mediated signaling pathway	1	Cleavage
	LUCG01025259.1	RGA2	transcriptional regulator	1	Cleavage
miR530	LUCG01462342.1	PUB34	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase binding	3.5	Cleavage
miR858	EL409419	MYB	Transcription factor	2.5	Cleavage
miR6111	LUCG01268040.1	A0A118JTA6	protein kinase activity	1.5	Cleavage
miR6113	LUCG01026540.1	Z195D10.16	zinc ion binding	1.5	Cleavage
miR6114	LUCG01061254.1	Z195.17	Metal-binding, Zinc	2	Cleavage

بیشتر miRNAهای گلرنگ (۸۳/۶٪) ۲۱ نوکلئوتید طول دارند که یکی از ویژگی‌های بارز برای miRNAهای شناسایی‌شده در سویا (Zhang et al. 2008)، ذرت (Zhang et al. 2006b) و گراس (Unver and Budak 2009) بوده است. برخلاف طول miRNAها، طول توالی‌های pre- miRNA تنوع بیشتری نشان می‌دهند. غالباً pre- miRNAهای جانوری ۷۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید طول دارند (Ambros 2004)؛ اما طول این توالی‌ها در گیاهان بسیار متغیر است به‌طوری‌که تا چند صد نوکلئوتید نیز می‌رسد (Zhang et al. 2006c). این مقدار برای توالی‌های pre- miRNA گلرنگ به‌طور متوسط ۴۰/۱ ± ۹۵/۸۸ نوکلئوتید است. بیشتر توالی‌های pre- miRNA گلرنگ (۸۵/۷۵٪) طولی بین ۵۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید دارند و این مشاهده با سایر مطالعات در این زمینه برای آرابیدوپسیس، برنج، کتان، ذرت، سویا و تنباکو سازگار است (Sunkar et al. 2005; Zhang et al. 2006b; Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2008; Frazier et al. 2010). نکته قابل‌توجهی که در مورد طول pre- miRNA وجود دارد این است که طول این توالی‌ها حتی برای miRNAهای یک خانواده نیز متفاوت است، این مسئله می‌تواند بر روی بیان آن‌ها مؤثر باشد و بسته به شرایط مکان- زمان سبب تفاوت در بیان آن‌ها شود (Zhang et al. 2008). یکی دیگر از ویژگی‌های miRNAهای شناسایی‌شده حضور عمده باز U در انتهای ′۵ آن‌ها است. تصور بر این است که قرار داشتن باز U در انتهای ′۵ miRNAهای بالغ در شناسایی آن‌ها از سوی پروتئین آرگونات۱ مؤثر است (Zhang et al. 2006d).

دیگر دستاورد این مطالعه، شناسایی miRNAهایی است که در مطالعات پیشین در گلرنگ گزارش نشده‌اند (Li et al. 2011; Cao et al. 2013). این miRNAها اعضای خانواده‌های miR393، miR477، miR530، miR6111، miR6113 و miR6114 هستند. با توجه به این که در مطالعات پیشین، شناسایی miRNAهای گلرنگ مبتنی بر روش‌های توالی‌یابی عمیق بوده است، شش خانواده miRNA ذکرشده یا به‌دلیل عدم بیان و یا بیان محدود، شناسایی نشده‌اند. از این‌رو با وارد شدن روش‌های بیوانفورماتیک

نظریه حضور آن‌ها در ژنوم گلرنگ مطرح شده است که نیاز به اعتبارسنجی دارند.

توالی miRNAها باید بر روی یکی از بازوهای ساختار ساقه-حلقه باشد. در گلرنگ miRNAها تقریباً به یک نسبت بر روی بازوی ′۳ و ′۵ قرار دارد که نشان می‌دهد موقعیت آن‌ها در ساختار ساقه-حلقه تحت تأثیر یک حالت خاص نیست (Frazier et al. 2010). در شکل ۹، نمونه‌هایی از توالی‌های pre-miRNA گلرنگ همراه با موقعیت توالی miRNA بر روی آن‌ها ارائه شده‌است.

توالی‌های pre- miRNA به دلیل داشتن یک ساختار ثانویه پایدار، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE) آن‌ها در مقایسه با سایر RNA پایین‌تر است (Bonnet et al. 2004). با این‌حال سایر RNA، از قبیل tRNA و rRNAها نیز می‌توانند ساختار سنجاق سری تشکیل دهند؛ بنابراین پیش‌بینی miRNAها نمی‌تواند تنها بر اساس MFE باشد. شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) می‌تواند miRNAها را از سایر RNAها به‌خوبی تفکیک کند، که مقدار آن برابر و یا بالاتر از ۰/۸۵ باشد (Zhang et al. 2006c). نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که مقادیر MFEI برای miRNAهای بالقوه گلرنگ به‌طور میانگین ۰/۱۷ ± kcal/mol ۰/۹٤ است. این مقدار به‌طور معنی‌داری بسیار بالاتر از مقادیر MFEI سایر RNA از قبیل tRNAها (۰/٦٤)، rRNAها (۰/۵۹) و mRNAها (۰/٦۲ تا ۰/٦٦) است (Zhang et al. 2006c). بنابراین miRNAهای بالقوه گلرنگ بیش از هر RNA دیگری به توالی یک miRNA شباهت دارند.

کلاسترهای miRNA اغلب در جانوران یافت می‌شوند و به‌طور هم‌زمان به‌عنوان یک پلی سیسترون رونویسی می‌شوند (Altuvia et al. 2005). با این که حضور کلاسترهای miRNA در گیاهان متداول نیست، امّا تعداد کمی از خانواده‌های miRNA (از قبیل خانواده‌های miR395، miR399، miR169 و miR156) به‌صورت پلی سیسترون در ژنوم آن‌ها یافت شده‌است (Jones-Rhoades and Bartel 2004; Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2008). در ژنوم گلرنگ نیز مشابه با سایر گونه‌های گیاهی برخی از miRNAهای سه خانواده miR169، miR395 و miR397 به‌صورت پلی سیسترون و تحت کنترل یک پروموتر هستند. miRNAهای کلاستر شده تقریباً ۲۵٪ درصد از miRNAهای شناسایی‌شده در گلرنگ را شامل می‌شوند که این مسئله نشان می‌دهد این سه خانواده miRNA می‌توانند عملکردهای وسیع‌تری را نسبت به سایر خانواده‌های miRNA در گلرنگ داشته باشند. نکته قابل‌توجه در مورد کلاسترهای گلرنگ حفاظت شده بودن توالی pre- miRNA در ژنوم این گونه است، به‌طوری‌که می‌توان برخی از کلاسترها را کلاستر pre- miRNA نامید (شکل ۵). نتایج جستجوی همولوژی در توالی‌های ژنومی ثبت شده برای سایر گونه‌های خانواده آستراسه از قبیل *C. carduncul*us نشان داد که توالی‌های pre- miR169 در بین گونه‌های این خانواده می‌تواند کاملاً حفاظت شده باشد (شکل ۵). با توجه به دانش ما در این زمینه، گلرنگ اولین گونه خانواده آستراسه است که این کلاسترها در آن شناسایی‌شده‌است، ازاین‌رو می‌توان از روش حاضر برای شناسایی این کلاسترها در سایر گونه‌های این خانواده بهره برد.

شکل ۹- نمونه‌هایی از توالی‌های pre- miRNA گلرنگ همراه با موقعیت توالی miRNA بر روی آن‌ها: توالی miRNA بالغ با رنگ قرمز مشخص شده‌است.

miR169 نشان داده است که در تحمل به تنش‌های محیطی نقش دارد (Zhao et al. 2009) و کلاسترهایی از این miRNA قبلاً در گیاهانی مثل کتان (Zhang et al. 2007) و برنج (Zhou et al. 2009) شناسایی شده‌است. بنابراین، این کلاسترهای شناخته شده از miR169 در گلرنگ ممکن است منشأ تکاملی مشابهی را با سایر گونه‌های گیاهی داشته باشند و احتمالاً در مسیر تکاملی گونه‌های گیاهی مختلف نقش مشابهی داشته است.

عملکرد miRNAها در کنترل بیان ژن‌ها پس از رونوشت برداری از آن‌ها به این صورت است که miRNها از طریق اتصال کامل و یا تقریباً کامل به mRNA هدف، سبب برش و یا سرکوب ترجمه آن می‌شوند (Bartel 2004). برخلاف جانوران، miRNAها در گیاهان جفت‌شدگی کامل‌تری با توالی هدف خود دارند و اغلب در گیاهان تنظیم بیان بر مبنای خرد کردن توالی هدف انجام می‌گیرد (Bartel 2004)؛ با این حال مشاهداتی نیز از تنظیم بیان ژن‌ها از طریق سرکوب ترجمه نیز وجود دارد (Aukerman and Sakai 2003). این میزان از مکمل بودن miRNAها با ژن هدف امکان جستجو براساس همولوژی توالی‌ها را فراهم می‌کند. بر مبنای این اصل ما علاوه بر شناسایی miRNAها، با توجه به ناشناخته بودن ژنوم و پروتئوم گلرنگ موفق به شناسایی ژن‌های هدف و پروتئین‌های کدکننده آن‌ها نیز شدیم. با توجه به سطح بالای حفاظت‌شدگی در miRNAهای بالغ و محل اتصال آن‌ها به‌توالی هدف در میان قلمرو گیاهان (Zhang et al. 2006b)، این نتایج با مشاهدات صورت گرفته در سایر گیاهان سازگار است (Jones-Rhoades et al. 2006; Nie et al. 2015).

miRNAها به‌طورمعمول فاکتورهای رونویسی را که مهم‌ترین ابزارهای تنظیم‌کننده رشد و نمو در گیاهان هستند را هدف قرار می‌دهند (Jones-Rhoades and Bartel 2004). یافته‌ها نشان داد که خانواده miR156 در گلرنگ ژن‌های کد کننده خانواده فاکتور رونویسی Squamosa Promoter Binding Protein-Like (SPL) را که نقش مهمی در تنظیم نمو ایفا می‌کنند هدف قرار می‌دهند. گزارش‌هایی در ارتباط با سرکوب بیان SPL در آرابیدوپسیس (Jones-Rhoades et al. 2006) و همچنین در سایر گونه‌های گیاهی (Zhang et al. 2006e) توسط miR156 منتشر شده‌است. miR166با هدف قرار دادن فاکتورهای رونویسی HD-ZIP III، در شکل‌گیری قطبیت در برگ‌ها نقش ایفا می‌کنند (Emery et al. 2003). مطابق نتایج به‌دست‌آمده از شناسایی ژن‌های هدف در گلرنگ، خانواده miR166 فاکتورهای رونویسی HD-ZIP را هدف قرار می‌دهند، بنابراین می‌توان ادعا کرد که در گلرنگ نیز تنظیم نمو برگ‌ها توسط این خانواده کنترل می‌شود. براساس بررسی صورت گرفته پیش‌بینی می‌شود که miR172 گلرنگ پروتئین‌های APETALA2-like (AP2) را هدف قرار می‌دهد. این مشابه سایر گزارش‌هایی است که نشان می‌دهند miR172 ژن‌های AP2 و AP2-like را هدف قرار می‌دهند و درنهایت منجر به تسریع در بلوغ و گلدهی می‌شوند (Aukerman and Sakai 2003).

اکثر خانواده‌های miRNA پیش‌بینی‌شده برای گلرنگ بیش از یک ژن را هدف قرار می‌دهند. براساس گزارش‌های منتشر شده از یک مطالعه، miRNAها حدود ۱۰۰ سایت هدف را در میان ژن‌های کد کننده پروتئین دارند (Brennecke et al. 2005)؛ اضافه بر این چنین تصور می‌شود که miRNAها با توجه به این‌که اتصال کاملی را با ژن‌های هدف در سلول‌های جانوری ندارند بیان بیش از ۳۰٪ از ژن‌های کدکننده پروتئین در انسان را تنظیم می‌کنند و این عدد با وجود کشف miRNAهای جدید نیز افزایش پیدا خواهد کرد (Lewis et al. 2005)؛ امّا در گیاهان اتصال کامل بین miRNA و ژن هدف تا حدودی این عمل را اختصاصی کرده است. بااین‌وجود miRNAهای گیاهی نیز بیان تعداد قابل‌توجهی از ژن‌ها را کنترل می‌کنند و با تنظیم بیان چندین ژن می‌توانند در طیف وسیعی از فرایندهای بیولوژیکی و متابولیکی دخیل باشند. استفاده از روش RT-qPCR علاوه بر تائید نتایج به‌دست آمده از شناسایی miRNAهای گلرنگ، سطوح متفاوتی از بیان را برای miR398 و miR408 نشان داد که می‌تواند حاکی از عملکرد مؤثر آن‌ها در رشد و نمو گیاهچه‌های گلرنگ باشد. یکی از دستاوردهای مهم در زمینه مطالعات بر روی miRNAها، شناسایی دو ژن همولوگ سوپراکسید دیسموتاز (CSD1 و CSD2) به‌عنوان اهداف miR398 است که به‌وضوح تأثیر miRNAها را در تحمل گیاه به تنش‌های اکسیداتیو نشان داد (Sunkar et al. 2006). یکی از اثرات ثانویه در پی تنش‌های غیرزنده در گیاهان، تجمع سریع گونه‌های اکسیژن فعال از قبیل سوپر اکسید ($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید

هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) است (Bartels and Sunkar 2005). گونه‌های اکسیژن فعال تولیدشده در طول متابولیسم‌های درون‌سلولی، به‌وسیله آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (سیتوزولی و کلرپلاستی) به پراکسید هیدروژن که سمیت کمتری دارند تبدیل می‌شوند و به‌این‌ترتیب یک تعادل بین تولید و حذف آن‌ها همیشه برقرار می‌شود، درحالی‌که وقوع تنش‌های غیرزنده منجر به تولید و انباشت گونه‌های اکسیژن فعال در سطوح سمی می‌شود (Apel and Hirt 2004). کاهش بیان miR398 در زمان وقوع تنش شرایط را برای تحریک بیان ژن‌های CSD1 و CSD2 فراهم می‌کند که منجر به حذف رادیکال‌های آزاد می‌شود. در شرایط نرمال نیز miR398 در سطوح متوسط بیان می‌شود (اگرچه این سطوح در بافت‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد) و فراوانی رونوشت‌های CSD1 و CSD2 را تنظیم می‌کند (Sunkar et al. 2012). با توجه به حفاظت‌شده بودن محل اتصال miRNAها به ژن هدف، مشابه با سایر گونه‌های گیاهی برای گلرنگ زراعی نیز توالی‌های کدکننده آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان مهم‌ترین اهداف برای miR398 شناسایی شدند.

miR408 یکی از خانواده‌های بسیار حفاظت‌شده به شمار می‌آید و تا به امروز در بیش از ۳۰ گونه گیاهی گزارش شده‌است (Kozomara and Griffiths-Jones 2011)، این ویژگی می‌تواند نشان‌دهنده نقش حیاتی miR408 در تکامل گیاهان باشد. در گونه‌های مختلف گیاهی گزارش شده‌است که miR408 در پاسخ به انواع فاکتورهای محیطی، ازجمله مس، نور، تنش‌های شوری، کم‌آبی، سرما و گونه‌های اکسیژن فعال دارای الگوهای بیانی مشخصی است (Abdel-Ghany et al. 2009; Kantar et al. 2010; Zhang et al. 2014; Ma et al. 2015). مطالعات پیشین نشان داده است که miR408 بیان چندین ژن متعلق به خانواده Cupredoxin را تنظیم می‌کند. اعضای خانواده Cupredoxin پروتئین‌های مس آبی هستند که دارای یک دمین برای اتصال به یون‌های مس می‌باشند و به‌عنوان یک حامل الکترون عمل می‌کنند (Nersissian and Shipp 2002; Gough and Chothia 2004). مس در رشد و تکامل گیاه نقش مهمی ایفا می‌کند، زیرا به‌عنوان کوفاکتور بسیاری از پروتئین‌ها و آنزیم‌های دخیل در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، تولید بذر، توزیع کربوهیدرات، تثبیت نیتروژن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیسم دیواره سلولی عمل می‌کند (Pilon et al. 2006). Cu-microRNAها مسئول توزیع مس هستند و بیان پروتئین‌های وابسته به مس را در گیاهان هماهنگ می‌کنند (Pilon 2017). مطالعات پیشین نشان داده است که انباشت miR408 باعث رشد رویشی، افزایش بیوماس و عملکرد دانه و همچنین بیوسنتز رنگدانه‌ها در آرابیدوپسیس می‌شود (Zhang et al. 2011, 2014 ; Zhang and Li 2013; Song et al. 2017). بنابراین شناسایی توالی مرتبط با Cupredoxin به‌عنوان هدف miR408 و الگوی بیان آن در گلرنگ زراعی می‌تواند گویای نقش مؤثر miR408 در هموستازی مس و بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی در این گونه باشد.

به‌طور کلی، با توجه به نقش حیاتی miRNAها در توسعه گیاهان و سازگاری آن‌ها به تنش‌های محیطی، امروزه مطالعه در زمینه شناسایی و شناخت عملکرد این RNAهای کنترل‌کننده در گونه‌های مختلف گیاهی به روش‌های مختلف به‌سرعت گسترش یافته است. این تحقیق نیز با شناسایی miRNAهای گلرنگ زراعی علاوه بر تائید بخشی از نتایج مطالعات پیشین زمینه انجام مطالعات بعدی را با هدف شناخت عملکرد آن‌ها فراهم می‌کند.

منابع

Abdel-Ghany SE (2009) Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. Planta 229:767-779.

Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. Development 131:3357-3365.

Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. Nucleic Acids Research 33:2697-2706

Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. Nature 431:350-355.

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55:373-399.
Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. The Plant Cell 15:2730-2741.
Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116: 281-297.
Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 24:23-58.
Bonnet E, Wuyts J, Rouzé: and Van de Peer Y (2004) Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. Bioinformatics 20:2911-2917.
Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. PLOS Biology 3:e85.
Cao S, Zhu QH, Shen W, Jiao X, Zhao X, Wang MB, Liu Q (2013) Comparative profiling of miRNA expression in developing seeds of high linoleic and high oleic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) plants. Frontiers in Plant Science 4:489.
Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Lao KQ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. Nucleic Acids Research 33:e179-e179.
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.
Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. Current Biology 13:1768-1774.
Frazier TP, Xie F, Freistaedter A, Burklew CE, Zhang B (2010) Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). Planta 232:1289-1308.
Goodman DH (1964) Safflower: utilization and significance in nutrition and allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology 35:38-42.
Gough J, Chothia C (2004) The linked conservation of structure and function in a family of high diversity: the monomeric cupredoxins. Structure 12:917-925.
Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2007) miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Research 36:D154-D158.
Guo HS, Xie Q, Fei JF, Chua NH (2005) MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. The Plant Cell 17:1376-1386.
Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Molecular Cell 14:787-799.
Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annu. Annual Review of Plant Biology 57:19-53
Kantar M, Unver T, Budak H (2010) Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. Functional and Integrative Genomics 10:493-507.
Kozomara A, Griffiths-Jones S (2010) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids Research 39:D152-D157.
Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell 120:15-20.
Li H, Dong Y, Sun Y, Zhu E, Yang J, Liu X,... Li X (2011). Investigation of the microRNAs in safflower seed, leaf, and petal by high-throughput sequencing. Planta 233:611-619.
Li YF, Zheng Y, Addo-Quaye C, Zhang L, Saini A, Jagadeeswaran G, Sunkar R (2010) Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. The Plant Journal 62:742-759.
Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ (2005) Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. Science 309:1567-1569.
Ma C, Burd S, Lers A (2015) miR408 is involved in abiotic stress responses in Arabidopsis. The Plant Journal 84:169-187.
Nersissian AM, Shipp EL (2002) Blue copper-binding domains. Advances in Protein Chemistry 60:271-340.
Nie S, Xu L, Wang Y, Huang D, Muleke EM, Sun X, Liu L (2015) Identification of bolting-related microRNAs and their targets reveals complex miRNA-mediated flowering-time regulatory networks in radish (*Raphanus sativus* L.). Scientific Reports 5:14034.
Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. Nature 425: 257–263.
Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Current Biology 12:1484-1495.
Pilon M (2017) The copper microRNAs. New Phytologist 213:1030-1035.
Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. Current Opinion in Plant Biology 9:256-263.
Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. Genes and Development 16:1616-1626.
Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. Cell 110:513-520.
Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature protocols 3:1101-1108.
Song Z, Zhang L, Wang Y, Li H, Li S, Zhang H (2017) Constitutive Expression of miR408 Improves Biomass and Seed Yield in Arabidopsis. Frontiers in Plant Science 8:2114.
Sunkar R (2010) MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. In Seminars in Cell and Developmental Biology 21:805-811.

Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK (2005) Cloning and characterization of microRNAs from rice. The Plant Cell 17:1397-1411.
Sunkar R, Jagadeeswaran G (2008) In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. BMC Plant Biology 8:37.
Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. The Plant Cell 18:2051-2065.
Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. Trends in Plant Science 17:196-203.
Unver T, Budak H (2009) Conserved microRNAs and their targets in model grass species Brachypodium distachyon. Planta 230:659-669.
Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant Methods 3:12.
Weiss EA (1971) Castor, Sesame and Safflower. Leonard Hill, London. Micropropagation of Castor 145:0-9.
Williams L, Grigg SP, Xie M, Christensen S, Fletcher JC (2005) Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. Development 132:3657–3668.
Wu G, Poethig RS (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. Development 133:3539-3547.
Zhang B H, Pan XP, Wang QL, George, P, Anderson TA (2005) Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. Cell Research 15:336.
Zhang B, Pan X, Anderson TA (2006b) Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. FEBS Letters 580:3753-3762.
Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA (2006d) Conservation and divergence of plant microRNA genes. The Plant Journal 46:243-259.
Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2006a) Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. Developmental Biology 289:3-16.
Zhang B, Pan X, Stellwag EJ (2008) Identification of soybean microRNAs and their targets. Planta 229:161-182.
Zhang B, Pan X, Wang Q, Cobb GP, Anderson TA (2006e) Computational identification of microRNAs and their targets. Computational Biology and Chemistry 30:395-407.
Zhang B, Wang Q, Wang K, Pan X, Liu F, Guo T, Cobb GP, Anderson TA (2007) Identification of cotton microRNAs and their targets. Gene 397:26-37.
Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA (2006c) Evidence that miRNAs are different from other RNAs. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 63:246-254.
Zhang H, He H, Wang X, Wang X, Yang X, Li L, Deng XW (2011) Genome-wide mapping of the HY5-mediated genenetworks in Arabidopsis that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation. The Plant Journal 65:346-358.
Zhang H, Li L (2013) SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in Arabidopsis. The Plant Journal 74:98-109.
Zhang H, Zhao X, Li J, Cai H, Deng XW, Li L (2014) MicroRNA 408 is critical for the HY5-SPL7 gene network that mediates the coordinated response to light and copper. The Plant Cell 26:4933-4953.
Zhao B, Ge L, Liang R, Li W, Ruan K, Lin H, Jin Y (2009) Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. BMC Molecular Biology 10:29.
Zhou X, Sunkar R, Jin H, Zhu JK, Zhang W (2009) Genome-wide identification and analysis of small RNAs originated from natural antisense transcripts in Oryza sativa. Genome Research 19: 70-78.
Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research 31:3406-3415.