

شناسایی و تعیین خصوصیات میکرو RNAهای حفاظت شده در عدس

سید سجاد سهرابی^۱، احمد اسماعیلی^{۱*}، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۱ و حسین فلاحی^۲

^۱ ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

^۲ ایران، کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲



چکیده

میکرو RNAها (miRNAs) دسته‌ای از مولکول‌های ریز RNA، غیر کد کننده درون‌زا، با طولی حدود ۲۴-۱۸ نوکلئوتید محسوب می‌شوند که ژن‌های هدف را در سطح پس از رونویسی در گیاهان کنترل می‌کنند. همچنین این گروه از RNAها نقش مهمی در رشد و نمو، فرآیندهای زیستی، تکثیر سلولی و پاسخ به تنش‌ها در گیاهان ایفا می‌کنند. تا به امروز، هیچ‌گونه گزارشی از شناسایی miRNA برای عدس ثبت نشده است، این در حالی است که چندین گزارش از وجود miRNA در سایر گونه‌های حبوبات وجود دارد. لذا در مطالعه حاضر به منظور پیش‌بینی و تحلیل miRNAهای حفاظت شده بالقوه و ژن‌های هدفشان در عدس، RNA کل از بافت برگ با استفاده از روش ترایزول استخراج شد و مورد توالی‌یابی قرار گرفت. ابتدا یونی‌ژن‌های غیرکننده به پروتئین شناسایی شدند و به‌عنوان توالی‌های کاندید پیش‌ساز miRNA در نظر گرفته شدند. در نهایت از بین آن‌ها پنج miRNA با عناوین miR156، miR166، miR167، miR171 و miR391 متعلق به ۵ خانواده حفاظت شده miRNA پس از یکسری فیلترهای سخت‌گیرانه شناسایی شد. علاوه بر این، mRNA ژن‌های هدف با استفاده از نواحی جفت شده با miRNAها پیش‌بینی شدند. در مجموع با توجه به نقش تنظیمی میرناهای شناسایی شده بر طیف وسیعی از ژن‌های پایین‌دستی شبکه‌های ژنی، می‌توان از این میرناها به‌عنوان ژن‌های کاندید در برنامه‌های به‌نژادی عدس با هدف بهبود عملکرد کمی و کیفی بهره برد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه محاسباتی، ریز RNA، ساختار ثانویه، عدس، miRBase

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۶۶۱-۴۲۰۰۰۱۲، پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

مقدمه

گیاه در بهبود ساختمان خاک، کاهش مصرف کودهای شیمیایی و افزایش محصولات زراعی در تناوب زراعی با این گیاه تأثیر بسزایی دارد (۳۶). با این حال در اغلب نقاط کشت این محصول، تنش‌های زیستی و غیرزیستی به شدت عملکرد عدس را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۴). کشور ما نیز با داشتن اقلیم خشک و نیمه‌خشک و همچنین دامنه نوسانات دمایی بالا، از شرایط کاملاً مطلوب و بهینه جهت کشت عدس برخوردار نبوده و میانگین عملکرد این محصول در مناطق کشت عدس که غالباً دیم می‌باشند، پایین‌تر از میانگین جهانی است (۳۵).

عدس زراعی (*Lens culinaris ssp. culinaris* Medikus) گیاهی دیپلوئید ($2n=2X=14$)، خودگردانه‌افشان و با اندازه ژنومی معادل ۴ گیگا باز (۵)، یکی از اصلی‌ترین اعضای خانواده حبوبات دانه‌ای به شمار می‌رود (۲۱). این گیاه چه از نظر تغذیه‌ای و چه از منظر به‌زراعی از اهمیت ویژه‌ای در بین محصولات زراعی برخوردار است، به طوری که درصد بالای پروتئین (۲۲ تا ۳۵ درصد)، مواد معدنی، فیبر و کربوهیدرات دانه عدس نقش مهمی در کاهش سوءتغذیه و کمبود مواد مغذی در کشورهای در حال توسعه ایفا می‌کند. از سوی دیگر قابلیت تثبیت نیتروژن توسط این

با توجه به اینکه صفات کمی مانند عملکرد دانه و تحمل به تنش‌های محیطی از طریق شبکه پیچیده‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شود، استفاده از روش‌های اصلاحی کلاسیک، به‌تنهایی انتخاب مناسبی برای مواجهه با چالش‌های افزایش عملکرد محصولات زراعی نمی‌باشند. از این‌رو در سال‌های اخیر، هم‌زمان با پیشرفت‌های چشم‌گیر در روش‌های ژنتیکی به‌ویژه فنون توالی‌یابی با کارایی بالا (High throughput)، استفاده از راه‌کارهای مبتنی بر روش‌های محاسباتی که بتواند از داده‌های با مقیاس وسیع در جهت شناسایی ژن‌های کاندید و بازسازی شبکه‌های ژنی استفاده نماید، رو به افزایش است (۱۸).

یکی از مهم‌ترین کلیدهای زیستی مؤثر در اغلب شبکه‌های ژنی میکرو RNAها هستند (۱۹). این کلاس از RNAهای غیرکدکننده از طریق فرآیند تداخل RNA (RNA interference)، بیان بسیاری از ژن‌ها را در سطوح مختلف از جمله، رونویسی، پردازش، پایداری RNA و ترجمه، از طریق جفت شدن با نواحی مکمل خود در mRNA هدف، تنظیم می‌کنند (۲۰). به‌طورکلی، یک ژن میرنای اولیه (pri-miRNA) گیاهی، معمولاً دارای یک ساختار ساقه - حلقه می‌باشد که در اولین مرحله از پردازش درون هسته‌ای، توسط آنزیم RNase III (DCL1) ساختار ساقه بریده شده و ساختار pre-miRNAs ایجاد می‌گردد. در دومین مرحله از پردازش، حلقه انتهایی بریده شده و توالی دو رشته‌ای (miRNA/miRNA* duplex) با طول متوسط ۲۴ - ۱۸ نوکلئوتید ایجاد می‌گردد. در انتها با ورود ساختار دو رشته به سیتوپلاسم و تشکیل کمپلکس خاموشی القا شده (RNA-induced silencing complex یا RISC)، ساختار تک رشته و بالغ میرنا (Mature miRNA) ایجاد می‌گردد (۱۲).

پس از شناسایی اولین میرنای گیاهی در آرابیدوپسیس (۳۱) تاکنون تعداد زیادی میرنا به همراه ژن‌های هدفشان در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده است (۱۵، ۳۶ و

۳۸). در پژوهش‌های مختلف از سه روش عمده شامل همسانه سازی مستقیم، ژنتیک پیشرو و روش‌های بیوانفورماتیکی برای شناسایی میرناها و از سه روش بیوانفورماتیکی، بیوشیمیایی و روش‌های مبتنی بر امیکس (Omics base) برای شناسایی ژن‌های هدف آن‌ها استفاده شده است (۱۶). روش‌های بیوانفورماتیکی که از ویژگی حفاظت‌شدگی بالای میرناها در گونه‌های گیاهی استفاده می‌کنند، سریع‌تر و مقرون به‌صرفه‌تر از سایر روش‌ها می‌باشند. در رهیافت بیوانفورماتیکی مبتنی بر همولوژی، از پایگاه داده‌های میرناهای شناسایی شده (<http://www.mirbase.org>) به‌منظور شناسایی میرناهای حفاظت شده بالقوه، در مقابل پایگاه داده‌های موجود برای گیاه مورد گیاه نظر (مانند پایگاه داده‌های EST) استفاده می‌شود (۱۵، ۳۶ و ۳۸).

با توجه به اندازه ژنوم بزرگ، مقادیر بالای DNA تکراری، خزانه ژنتیکی کوچک، فقدان ژن‌های کاندید و نبود نقشه‌های ژنتیکی برای عدس (۳۷)، این گیاه نسبت به سایر حبوبات هم‌خانواده خود دارای اطلاعات کمی در پایگاه‌های ژنتیکی می‌باشد، به‌طوری که تاکنون هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد میرنا برای این گیاه ثبت نشده است. از این‌رو هدف تحقیق حاضر توسعه داده‌های ترنسکرپتومی عدس و شناسایی میرناهای حفاظت شده برای اولین بار در دنیا با استفاده از فناوری RNA-seq می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: پس از تهیه بذر عدس (رقم گچساران) از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور (ایستگاه گچساران)، بذور با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و پس از سه مرتبه آیشویی با آب مقطر بذور به گلدان‌های حاوی ورمیکولیت، پیت موس و شن (نسبت ۱:۱:۱) منتقل شدند. سپس گلدان‌ها به اتاق کشت با شرایط شدت نوری ۱۲۰۰-۱۴۰۰ لوکسی، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

آمده‌اند از مجموعه نرم‌افزاری (V2013.07.27) EvidentialGene (<http://arthropods.eugenenes.org/Evidenti>) استفاده شد.

شناسایی miRNAهای حفاظت شده: یونی‌ژن‌های حاصل از سرهم‌بندی نوپدید به‌عنوان منبعی برای شناسایی میرناهای محافظت‌شده مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور توالی‌های میرناهای ثبت شده برای ۸۸ گونه گیاهی که شامل ۱۰۴۱۱ توالی میرنای بالغ بود از پایگاه mirbase به آدرس <http://www.mirbase.org> دانلود شد. به‌منظور حذف توالی‌های تکراری میرنا از نرم‌افزار CD- (v4.6.8) HIT-EST استفاده شد (۲۳). سپس برای شناسایی یونی‌ژن‌هایی که بیشترین شباهت را با توالی‌های میرنای بالغ دارند از ابزار Blastn با پارامترهای $E\text{-value} \leq 10$ و $mismatch < 4$ استفاده شد. از توالی میرناهای بالغ دانلود شده به‌عنوان ورودی (Query) و از توالی‌های یونی‌ژن به‌عنوان پایگاه مورد جستجو (Subject) استفاده شد. آستانه طول میرناهای بالقوه شناسایی شده بین ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید تعیین شد. سپس توالی‌های کاندید علیه پایگاه داده‌های پروتئین‌های غیرتکراری (Non-Redundant proteins, NR) با استفاده از ابزار Blastx با $E\text{-value} \leq 0.001$ بلاست شده و در نهایت توالی‌هایی که دارای رکورد در این پایگاه داده بودند، حذف شدند.

پیش‌بینی ساختار دوم RNA: شباهت بالای یونی‌ژن‌های کاندید با توالی‌های میرنای بالغ به‌تنهایی برای اعتبارسنجی میرنای شناسایی شده کافی نمی‌باشد. از این‌رو نحوه تاخوردگی و میزان انرژی آزاد ساختار میرنای اولیه یونی‌ژن‌های کاندید از طریق وب سرور mfold به آدرس <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form> با پارامترهای پیش‌فرض مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور اطمینان از قرارگیری توالی میرنای بالغ در محل صحیح احتمالی خود در ساختار پیش‌ساز میرنا، محدوده ۱۰۰ نوکلئوتید در بالادست و پایین‌دست مختصات میرنای شناسایی شده از توالی یونی‌ژن‌های

منتقل شد و تا برداشت نمونه با محلول نیم هوگلدن آبیاری شدند. پس از سه هفته، از بافت برگ گیاهچه‌های ۲۱ روزه به‌منظور استخراج RNA تام، نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار داده شده و تا زمان توالی‌یابی در یخچال ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA، تهیه کتابخانه cDNA و توالی‌یابی: استخراج RNA کل با استفاده از محلول ترایزول (Trizol reagent) طبق پروتکل شرکت سازنده (Invitrogen, life technology) برای همه نمونه‌ها انجام شد. در این روش به ازای ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم بافت برگ پودر شده در هر نمونه، ۱ میلی‌لیتر محلول ترایزول به واکنش استخراج اضافه شد. پس از مراحل همگن‌سازی، جداسازی فاز و شستشو، RNA رسوب یافته در ۲۵ تا ۵۰ میکرولیتر آب دیپس (Diethyl pyrocarbonate, DEPC) حل شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه پیکودراپ و ژل (۱ درصد) الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. برای ساخت کتابخانه cDNA از هر نمونه ۳ میکروگرم RNA تام با درجه یکپارچگی (RNA Integrity Number, RIN) بیشتر از ۷ مورد استفاده قرار گرفت. کتابخانه‌های cDNA توسط کیت Illumina TruSeq™ RNA Sample Preparation طبق پروتکل شرکت سازنده ساخته شدند؛ و در نهایت از پلتفرم Illumina HiSeq2500 برای فرآیند توالی‌یابی کتابخانه‌ها استفاده شد. قطعات از دو طرف (Paired-end) و با طول ۱۵۰ جفت باز خوانش شدند.

سرهم‌بندی نوپدید (De novo assembly) خوانش‌های کوتاه: پس از کیفیت‌سنجی خوانش‌های کوتاه (Short Reads) و حذف توالی‌های با کیفیت پایین، سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (v7.5.0) (طبق پارامترهای پیش‌فرض) انجام شد (۹). به‌منظور حذف کانتیگ‌های تکراری یا معیوبی که از فرآیند اسمبلی ناقص به‌دست

پارامترهای حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy, MFE)، پارامترهای حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده (Adjusted minimal free energy, AMFE) و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy index, MFEI) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شدند (۳۰ و ۴۳).

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

$$\text{AMFE} = (\text{MFE} \div \text{طول میرنای پیش‌ساز}) \times 100$$

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

رابطه ۱

رابطه ۲

رابطه ۳

نرم‌افزار NCBI Blast+ (v2.6.0) استفاده شد (۴). یونی‌ژن‌های هدف در مقابل پایگاه‌های داده‌های پروتئینی غیر تکراری (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db) NR و داده‌های پروتئینی عوامل رونویسی گیاهی با در نظر گرفتن حد آستانه معادل $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ مورد برهم‌نهی محلی (Local BlastX) قرار گرفت. به منظور هستی‌شناسی (Gene ontology, GO) ژن‌های هدف میرنا از نرم‌افزار Blast2GO استفاده شد.

نتایج و بحث

توالی‌یابی و سرهم‌بندی نوپدید: در مجموع از تمام نمونه‌های توالی‌یابی شده پس از تعیین کیفیت اولیه و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین، ۱۷۱۵۰۶۱۵۲ خوانش کوتاه با کیفیت بالا حاصل شد که از این توالی‌ها در فرآیند اسمبلی استفاده شد. از سرهم‌بندی خوانش‌های کوتاه با طول ۶۵۹۹۳، ۱۵۰bp، رونوشت حاصل شد و پس از حذف رونوشت‌های تکراری و ناقص توسط بسته نرم‌افزاری EvidentialGene، ۴۸۰۲۱ رونوشت منحصربه‌فرد حاصل شد. مقایسه پارامترهای کیفی اسمبلی نهایی و اولیه نشان داد که EvidentialGene موجب افزایش محسوس پارامتر N50 از ۱۳۵۹ به ۱۷۴۱ و همچنین افزایش درصد فراوانی توالی‌های بلندتر از ۱۰۰۰ جفت باز از ۲۸ به ۴۱ درصد

کاندید با استفاده از ابزار Bedtools استخراج شد (۳۳). توالی‌های استخراج شده به‌عنوان ورودی برای وب سرور mfold مورد استفاده قرار گرفتند. طول توالی‌هایی که دارای ساختار ساقه-حلقه مناسب و شامل توالی میرنای بالغ نیز بودند به اندازه ساختار پیش‌ساز میرنا برش خورده و مجدداً مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تعیین درصد GC/AU،

در نهایت از پارامترهای: ۱- ساختار دوم با تاخوردگی مناسب و شامل ساختار ساقه حلقه، ۲- وجود توالی میرنای بالغ در یک بازوی در ناحیه ساقه، ۳- عدم شکستگی در حلقه ساختار میرنا، ۴- حداکثر ۶ جفت نوکلئوتید غیر منطبق در ساختار میرنا، ۵- محتوای ۳۰ تا ۷۰ درصدی AU ۶- حداکثر اندازه گپ در ساختار میرنا ۳ نوکلئوتید و ۷- حداقل انرژی آزاد تاخوردگی، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده و میزان شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی بیشتر از ۸۵ کیلوکالری بر مول (kcal.mol^{-1}) (۷، ۴۳)، به منظور فیلتر کردن و شناسایی میرناهای با پتانسیل بالا استفاده شد (۲۴ و ۲۷).

پیش‌بینی و مستندسازی ژن‌های هدف میرناهای کاندید: به منظور پیش‌بینی ژن‌های هدف میرناهای کاندید از وبسایت psRNATarget به آدرس <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget> استفاده شد (۱۰). در این فرآیند توالی میرناهای شناسایی شده علیه تمام یونی‌ژن‌های موجود مورد تحلیل قرار گرفت. پارامترهای پیش‌فرض نسخه ۲۰۱۷ این وبسایت برای شناسایی ژن‌های هدف استفاده شد.

به منظور مستندسازی و تفسیر کارکرد (Functional annotation) ژن‌های هدف میرنا، از ابزار BLASTX

کандید از نظر تناسب ساختار ساقه - حلقه و محل قرارگیری توالی میرنای بالغ در ساختار ثانویه پیش‌بینی شده، کنترل شد. در این گام تنها ۱۷۱ توالی حائز شرایط لازم بود، و مابقی توالی‌ها حذف شدند. در گام دوم ۲۶ توالی دیگر که از نظر مقدار حداکثر گپ و تعداد نوکلئوتید غیرمنطبق در ساختار، نامطلوب شناسایی شده بودند، حذف شدند. از ۱۴۵ توالی باقی‌مانده تنها به ۲۰ توالی دارای MFE کمتر از -20 اکتفا شد و از مابقی توالی‌ها در مراحل بعد چشم‌پوشی شد. پس از استخراج مقطعی از توالی که ساختار پیش‌ساز میرنا را تشکیل می‌داد، پارامترهای کمی تعیین کننده صحت ساختار محاسبه شد. در نهایت بر اساس پارامتر درصد AU و MFEI (جدول ۱)، ۵ میرنای حفاظت شده با پتانسیل بسیار بالا متعلق به خانواده‌های miR156، miR167، miR171، miR391 و miR166 شناسایی شدند (شکل ۱). میانگین پارامتر MFEI برای ۵ میرنای شناسایی شده $1/0.2$ کیلوکالری بر مول محاسبه شد که این میزان صحت ساختار ثانویه توالی شناسایی شده را تأیید می‌نماید. در مطالعات مشابه نیز پارامتر MFEI معیار مناسبی برای شناسایی میرنا گزارش شده است (۱۵، ۲۶، ۲۹ و ۳۷). در مطالعه‌ای مقدار MFEI برای تشخیص و تمایز بین tRNA، rRNA، mRNA و microRNA به ترتیب بیشتر از $0/59$ ، $0/64$ ، $0/66$ - $0/62$ و $0/85$ گزارش شده است (۴۳). نتایج مطالعه دیگری نشان داد که احتمال شناسایی میرنای حفاظت شده در توالی‌های EST، یک‌صدم درصد می‌باشد (۴۲)؛ از این رو می‌توان گفت که در مطالعه حاضر قرابت بالایی بین تعداد میرنای شناسایی شده (۵ میرنا) با تعداد مورد انتظار ($5 \sim 4/82 = 0/001$) وجود دارد. $48021 \times$

miR166 یک خانواده بسیار حفاظت شده در گیاهان محسوب می‌شود که در ۵۲ گونه گیاهی شناسایی شده است (پایگاه mirbasr نسخه ۲۱ تاریخ ۲۰۱۸) و در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی دخیل هستند (۴۱).

شد. مقدار ترنسکرپتوم کل عدس در حدود $56/7$ Mb بود که این مقدار با محدوده ترنسکرپتوم گیاهان زراعی دیپلوئید ($80 - 50$ Mb) مطابقت دارد (۳۷).

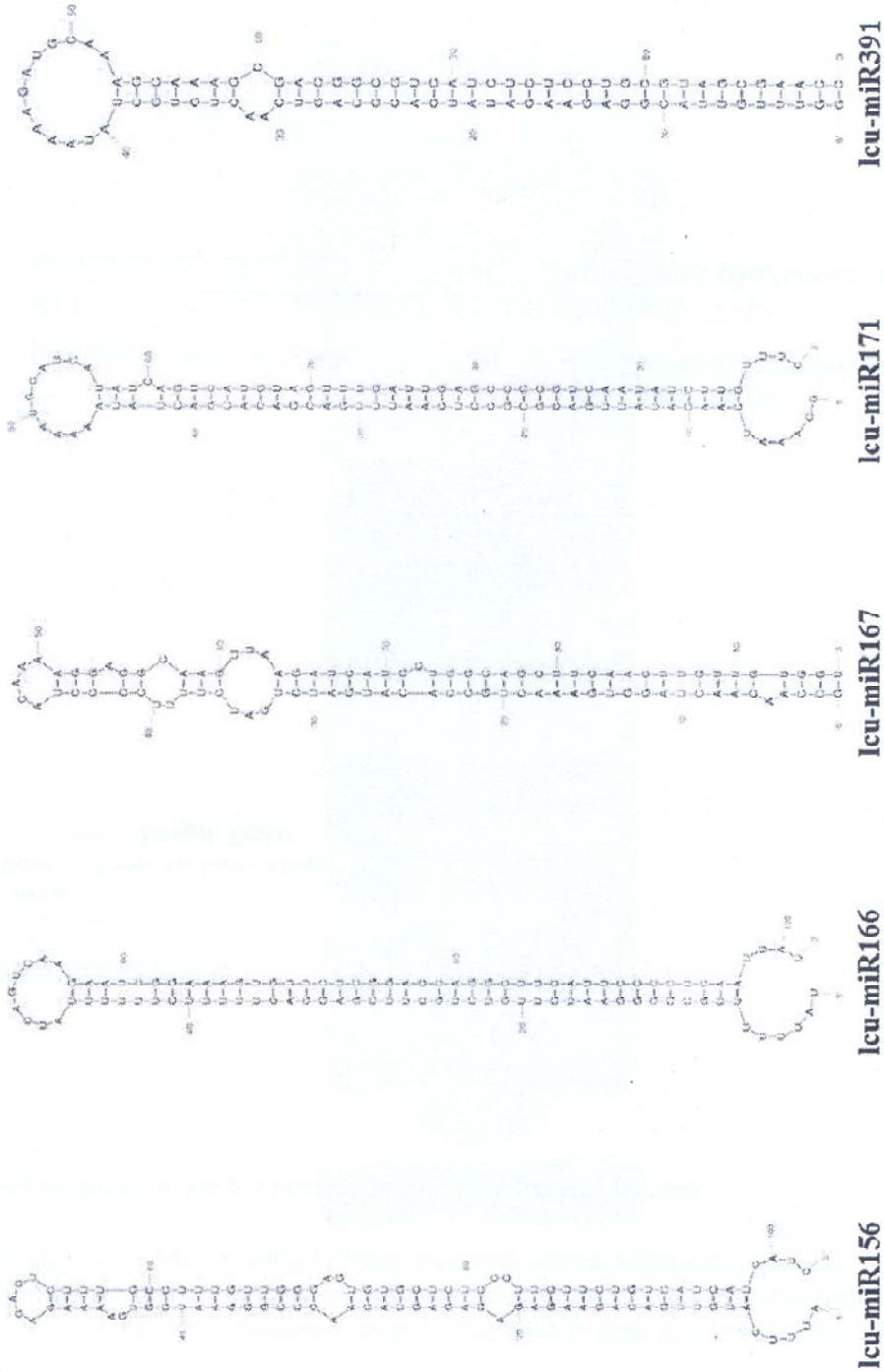
شناسایی miRNAهای حفاظت شده: نتایج بلاست نشان داد که از ۴۸۰۲۱ یونی‌ژن مورد جستجو ۴۶۷۷ یونی‌ژن به صورت منحصر به فرد با میرناهای گیاهی مطابقت داشتند. برای حذف یونی‌ژن‌هایی که دارای رکورد مشابه با پایگاه پروتئین‌های غیر تکراری (NR) بودند، از نتایج بلاست x یونی‌ژن‌ها علیه این پایگاه استفاده شد. از یونی‌ژن‌های کاندید، برای ۱۰۳۶ یونی‌ژن در پایگاه داده‌های پروتئین‌های غیر تکراری رکوردی یافت نشد.

Mehta و همکاران (۲۷) در مطالعه‌ای که با هدف شناسایی میرناهای حفاظت شده در استویا (*Stevia rebaudiana*) صورت گرفته بود، چنین اظهار نمودند که استفاده از سرهم‌بندی نوپدید برای گیاهانی که داده‌های ژنتیکی کمی برای آن‌ها وجود دارد، کارایی بالایی برای شناسایی میرناهای حفاظت شده دارد. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که از ۱۴۱۸۵۸ یونی‌ژن ایجاد شده توسط فرآیند سرهم‌بندی نوپدید، ۴۶۱۶ یونی‌ژن با میرناهای بالغ تطابق یافته که از این بین ۳۸۱ مورد به توالی‌های غیرکدکننده مربوط بودند. این در حالی بود که کل توالی‌های EST ثبت شده برای استویا ۵۶۴۶ عدد بود (۲۷).

انتخاب میرناهای حفاظت شده تنها با معیار همولوژی نتایج مطلوبی به همراه نخواهد داشت (۱۶ و ۳۹)؛ از این رو نتایج بررسی ساختار ثانویه یونی‌ژن‌های باقی‌مانده (۱۰۳۶ یونی‌ژن) توسط وب‌سایت mfold به‌عنوان معیار تکمیل‌کننده شناسایی میرناهای حفاظت شده بالقوه مورد استفاده قرار گرفت. مختصات ناحیه تطابق یافته یونی‌ژن‌ها با میرناهای گیاهی با در نظر گرفتن ± 100 نوکلئوتید (۲۷)، به‌منظور قرارگیری تقریبی ناحیه تطابق یافته درون ساختار پیش‌ساز میرنا، استخراج شد. در مرحله نخست از شناسایی میرناهای حفاظت شده، ساختار ثانویه توالی‌های

جدول ۱- ویژگی‌های میرناهای شناسایی شده در عدس

ویژگی‌ها	leu-miR156 contig_14329	leu-miR166 contig_18377	leu-miR167 contig_15547	leu-miR171 contig_32144	leu-miR391 contig_37118
نام بیرونی ژن					
طول بیرونی ژن (bp)	792	1502	1508	441	451
تعداد رونوشت‌ها در هر میلیون	1.45	6.77	1.05	1.50	0.29
کیلو باز (TPM)					
مختصات نوآلی میرنای بالغ بر روی بیرونی ژن	424..445	240..261	1255..1278	230..250	407..427
تعداد نوکلئوتیدهای غیر متطابق	0	1	0	0	0
ارزش مورد انتظار	0.00004	0.007	0.00004	0.0001	0.0001
طول نوآلی پیش ساز میرنا (bp)	102	101	95	100	90
مختصات نوآلی میرنای بالغ روی پیش ساز میرنا	9..30	73..94	66..89	73..93	63-83
نوآلی میرنای شناسایی شده (bp)	5'- UUGACAGAAGAGA GAGAGACA-3'	5'- UCGGACCAGGUUCAUU CCCCU-3'	5'- AUCAUGCUGGCAGC UUCAAUUUGU-3'	5'- UGAUUGAGCCGGGUGCA AUAUC-3'	5'- CGGGUGCAUCUUCUCCUGC GUA-3'
طول میرنای شناسایی شده (bp)	22	22	24	21	21
درصد GC	46.10	40.60	45.30	38	48.80
درصد AU	53.9	59.40	54.70	62	51.20
MFE (kcal/mol)	-46.40	-41.30	-42.1	-45	-40.10
AMFE	-45.49	-40.89	-44.32	-45.50	-44.56
MFEI	0.99	1.01	0.98	1.20	0.91



شکل ۱- ساختار ثانویه ۵ پیش ساز میزبان شناسایی شده در عدس. توالی میرنای بالغ با رنگ زرد مشخص شده است.

تأیید قرار گرفته است. استفاده بهینه از روش‌های محاسباتی مستلزم افزایش کمیت و کیفیت داده‌های ورودی است؛ از این رو می‌توان گفت رهیافت مبتنی بر توالی‌یابی با کارایی بالا، با تولید حجم وسیعی از داده‌ها (۲)، مسیر را برای استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی را هموارتر می‌سازد.

درک نقش میرناها در فرآیندهای سلولی با بررسی ژن‌های هدف آن‌ها میسر است (۳). در بررسی ژن‌های هدف چهار میرنای شناسایی شده با استفاده از وبسایت psRNATarget نشان داد که در مجموع ۴۷۳ ژن توسط این میرناهای بالقوه، تنظیم می‌شوند. نتایج نشان داد که تعداد ژن‌های هدف برای توالی‌های lcu-miR156، lcu-miR166، lcu-miR17، lcu-miR167، lcu-miR391 و lcu-miR166 ترتیب با ۱۴۲، ۷۶، ۷۷، ۹۳ و ۸۵ یونی‌ژن بود (شکل ۲). در جریان تداخل، با انطباق توالی میرنای بالغ موجود در کمپلکس خاموشی با توالی mRNA ژن هدف، تخریب mRNA یا عدم ترجمه به پروتئین رخ خواهد داد. از ۴۷۳ ژن هدف، ۳۸۶ ژن با تخریب شدن و ۸۷ ژن با عدم ترجمه شدن توسط ۵ میرنای شناسایی شده تنظیم می‌شوند. گروه‌های کارکردی ژن‌های هدف با استفاده نرم‌افزار Blast2GO نشان داد که در زمینه عملکرد مولکولی (Molecular Function, MF) (شکل ۲-الف) گروه "اتصال" و "فعالیت فروکافتی" بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. این در حالی بود که در زمینه فرآیند زیستی (Biological Processes, BP) (شکل ۲-ب) دسته "فرآیند سلولی" و "فرآیند متابولیکی" به ترتیب با فراوانی ۷۶ و ۶۱ بیشتر از سایر گروه‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. "غشا"، "سلول" و "بخش‌های سلول" به ترتیب با فراوانی ۵۴، ۵۳ و ۵۲ بیشترین اهداف میرناهای شناسایی شده در زمینه اجزای سلولی (Cellular Components, CC) (شکل ۲-ج) را به خود اختصاص دادند.

خانواده miR166 در توسعه مریستم‌های انتهایی، قطبیت اندام‌ها، توسعه بذر، رشد ریشه و جذب یون‌ها دخیل می‌باشند و همچنین در بسیاری از مطالعات نقش این خانواده در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تأکید شده است (۲۵). تعداد رونوشت‌ها در هر میلیون کیلو باز (Transcripts Per Kilo base Million, TPM) برای miR166 نسبت به سایر میرناهای شناسایی بیشتر بود که این موضوع احتمالاً به حوزه وسیع فعالیت و میزان بالای بیان این میرنا اشاره دارد (جدول ۱). در بسیاری از مطالعات نقش miR167 در گیاهان گل‌دار، تنظیم بیان ژن‌های دخیل در گلدهی و باروری تخمدان و پرچم ذکر شده است، هرچند در برخی مطالعات شواهدی مبنی بر افزایش بیان این خانواده از میرنا در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله کم‌آبی گزارش شده است (۳۲). در بین میرناهای شناسایی شده، miR390 کمترین میزان TPM را به خود اختصاص داد. این خانواده از میرنا در هر دو گیاهان جنگلی و گل‌دار شناسایی شده است و نقش آن در تنظیم بیان ژن عوامل رونویسی، شکل‌گیری مریستم‌ها، انتقال از مرحله رویشی به زایشی و تعیین زمان گلدهی به اثبات رسیده است (۱۷). اعضای خانواده miR391 بیشترین شباهت را با خانواده miR390 دارند (۴۰)، با این حال حضور این خانواده از میرنا تنها در ۱۲ گونه گیاهی گزارش شده است. خانواده miR156 یکی از محافظت‌شده‌ترین میرناهای گیاهی محسوب می‌شوند که در سطح نوکلئوتید شباهت بالایی با miR529 دارند، با این حال خانواده miR529 در برخی از گونه‌های گیاهی گزارش نشده است. این خانواده از میرنا با سرکوب بیان عوامل رونویسی مانند شبه پروتئین‌های متصل شونده به پرموتر squamosal promoter binding (Squamosa promoter binding protein-like, SBP/SPL) در تغییر فاز رویشی به زایشی مؤثرند (۴۴).

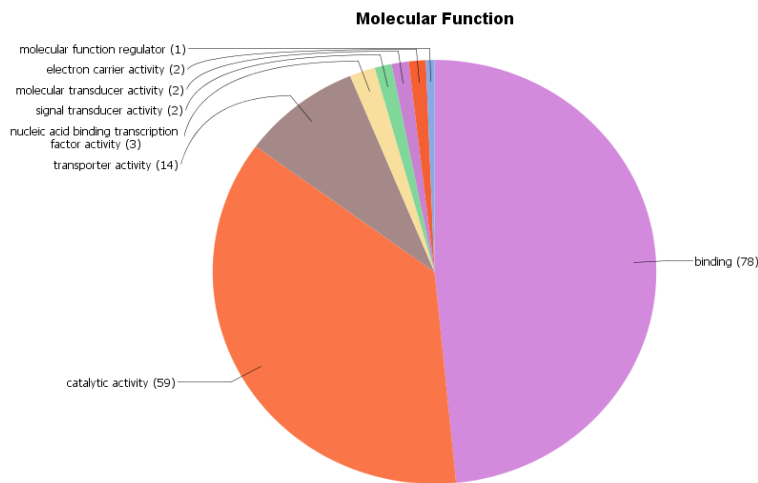
کارایی استفاده از روش‌های محاسباتی برای شناسایی میرناهای محافظت‌شده در سایر مطالعات مشابه نیز مورد

که به‌طور کلی به زیر خانواده‌ها AP2، ERF و RAV تقسیم می‌شوند. AP2 دارای دو دمین AP2/ERF بوده و در پاسخ به تنش کم‌آبی به همراه ERF به ناحیه‌ای از DNA به نام عناصر پاسخ‌دهنده به اتیلن (ethylene-responsive element, ERE) متصل شده و مجموعه‌ای از ژن‌ها را که در مکانیسم دفاعی گیاه نقش دارند را تنظیم می‌کنند (۲۸). زیرخانواده RAV به‌طور حفاظت شده در ژنوم گیاهی گزارش شده است. بیشترین نقش این خانواده از عوامل رونویسی در مرحله گلدهی گزارش شده است (۲۹). عوامل MYB یکی از وسیع‌ترین خانواده عوامل رونویسی می‌باشند که در اغلب یوکاریوت‌ها وجود دارند و یکی از کلیدی‌ترین عوامل در کنترل بیان ژن‌های دخیل در رشد، توسعه اندام‌ها و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی محسوب می‌شوند (۱۳ و ۱).

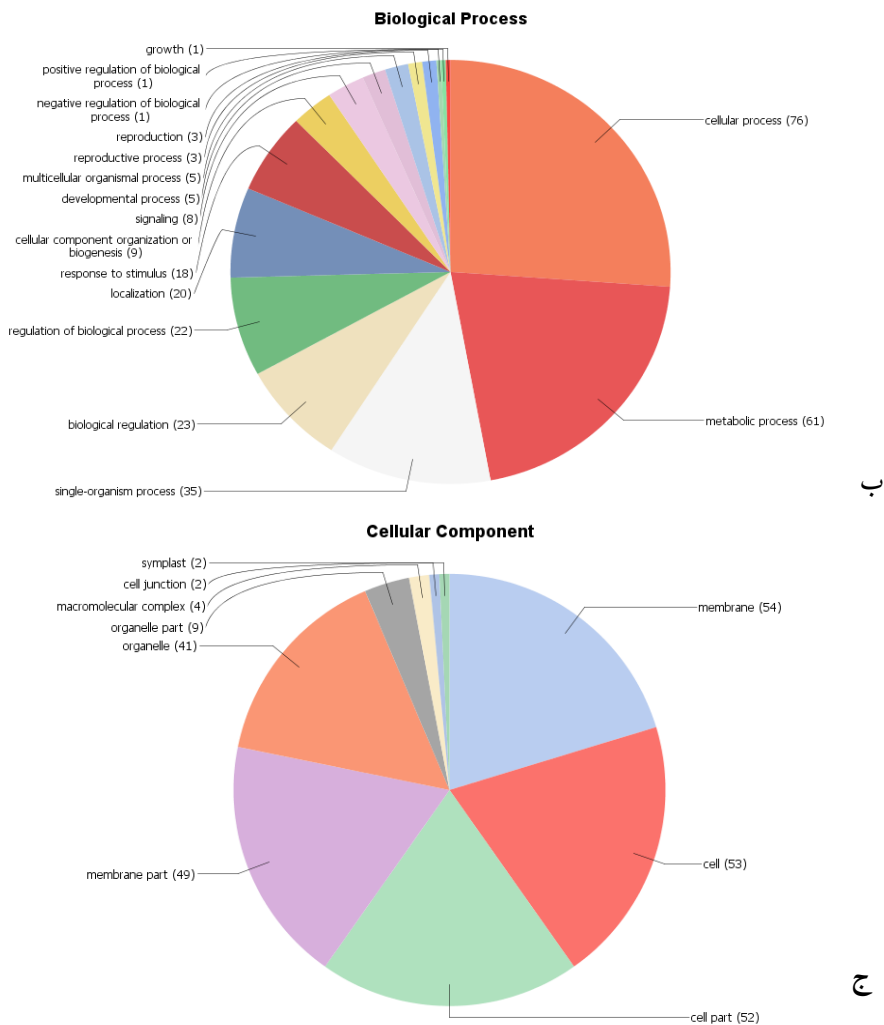
به‌طور کلی، با توجه به نتایج می‌توان گفت اگر عوامل رونویسی را به‌عنوان کلیدهای راه‌انداز شبکه‌های ژنی در نظر بگیریم، میرناهای دخیل در کنترل آن‌ها را می‌توان به‌عنوان شاه‌کلیدهایی شناخت، که با فعالیتشان طیف وسیعی از تغییرات را در حوزه بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند.

با توجه به نتایج هستی‌شناسی ژن‌های هدف می‌توان گفت، میرناهای گیاهی در اغلب فرآیندهای زیستی و متابولیکی همچون تمایز، رشد و نمو، انتقال از مرحله رویشی به زایشی، انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نقش مهمی ایفا می‌کنند (۶، ۸، ۱۱، ۳۴ و ۲۰).

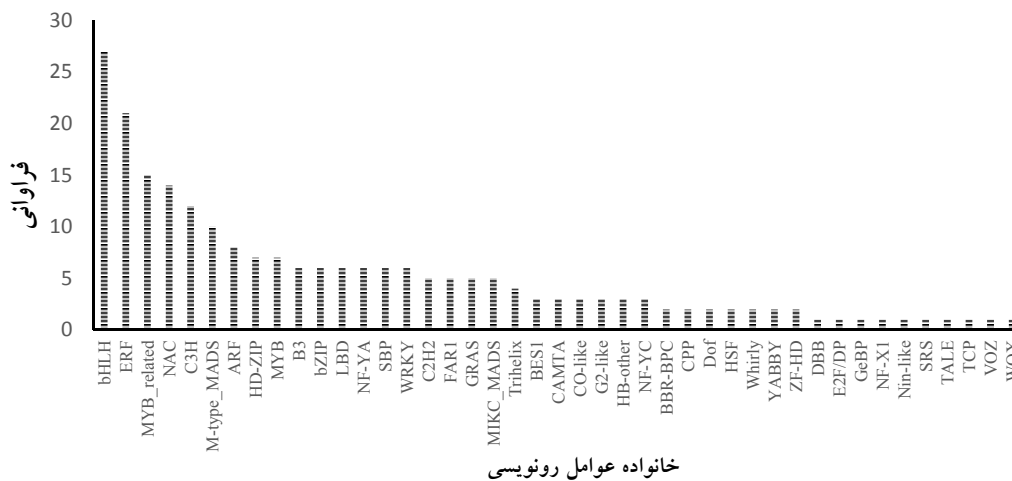
عوامل رونویسی از دیگر اهداف میرنا بوده که با کنترل تنظیم فرآیند رونویسی نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن‌ها بر عهده دارند. میرناهای شناسایی شده با تأثیر بر این گروه از پروتئین‌ها، به‌طور غیرمستقیم بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند (۲۶ و ۳۲). نتایج بررسی تأثیر میرناهای شناسایی شده در عدس بر عوامل رونویسی نشان داد که ۲۱ خانواده از عوامل رونویسی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (شکل ۳). بیشترین تأثیر میرناهای شناسایی شده بر خانواده bHLH، ERF و MYB صورت گرفت به صورتی که به ترتیب ۲۰، ۱۳ و ۱۲ عضو از این خانواده‌ها توسط چهار میرنای شناسایی شده تنظیم می‌شوند. خانواده bHLH اغلب در انتقال از فاز رویشی به زایشی در گیاهان مؤثر بوده، هرچند گزارش‌هایی از دخالت برخی از اعضای این خانواده در سیگنالینگ آبسزیک اسید ثبت شده است (۲۲). ERFها خانواده‌ای از عوامل رونویسی با ۶۰ تا ۷۰ اسیدآمینو هستند



الف



شکل ۲- تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای میرنا‌های شناسایی شده در عدس
الف: عملکرد مولکولی؛ ب: فرآیندهای زیستی و ج: اجزای سلولی



شکل ۳- توزیع فراوانی عوامل رونویسی هدف میرنا‌های شناسایی شده در عدس

نتیجه‌گیری

بود. پیش‌بینی ژن‌های هدف برای توالی‌های شناسایی شده، نشان داد که این میرناها نیز همچون سایر اعضای این خانواده از RNAهای تنظیمی در اغلب فرآیندهای زیستی از جمله رشد و نمو، انتقال از مرحله رویشی به زایشی و تحمل به تنش‌ها نقش ایفا می‌کنند. همچنین با توجه به نقش تنظیمی میرناهای شناسایی شده بر گروه وسیعی از عوامل رونویسی و تأثیر بالقوه آن‌ها در تغییر طیف وسیعی از ژن‌ها پایین‌دستی شبکه‌های ژنی، می‌توان از میرناهای شناسایی شده به‌عنوان ژن‌های کاندید در مبحث مهندسی ژنتیک با هدف افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و همچنین ارتقا صفات کمی و کیفی محصول عدس استفاده نمود.

میزان اطلاعات ژنتیکی مفیدی که بتوان از آن‌ها برای بهبود عملکرد این محصول یا تحمل بیشتر به تنش‌های زیستی و غیرزیستی کاهش دهنده عملکرد عدس استفاده نمود، نسبت به سایر حبوبات بسیار اندک می‌باشد. از این‌رو تولید محتوای ژنتیکی برای گیاه عدس، راه‌کاری توسعه محور برای برنامه‌های اصلاحی این گیاه محسوب می‌شود. نتایج مطالعه حاضر ۴۸۰۲۱ توالی سرهم‌بندی شده با طول متوسط ۱۱۶۸ نوکلئوتید به داده‌های ترنسکرپتومی عدس اضافه نمود. در همین راستا از میان توالی‌های ایجاد شده چهار میرنای حفاظت شده شناسایی شد. این در حالی بود که تا کنون هیچ گزارشی از میرنا برای عدس ثبت نشده

منابع

- ۱- زیتی، ز. شاملو دشت پاگردی، ر. ۱۳۹۶. بررسی مقایسه‌های پروموتورهای ژنهای *Catalase2* و *Thioredoxin H5* در آرابیدوپسیس به منظور تعیین نحوه کارکرد آنها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). دوره ۳۰ شماره ۴. صفحه ۴۸۸-۴۹۸.
- ۲- میرزایی، س. ۱۳۹۶. پروفایل ترانسکرپتوم نوک شاخه و ریشه گیاه سویا. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). دوره ۳۰ شماره ۴. صفحه ۴۹۹-۵۱۱.
- 3- Akter A, Islam, MM, Mondal SI, Mahmud Z, Jewel NA, Ferdous S, Amin MR, Rahman MM (2014). Computational identification of miRNA and targets from expressed sequence tags of coffee (*Coffea arabica*). Saudi Journal of Biological Sciences, 21: 3-12
- 4- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman, DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25: 3389-3402.
- 5- Arumuganathan K, Earle ED (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter, 9: 208-218.
- 6- Baldrich P, Beric A, Meyers BC (2018). Despacito: the slow evolutionary changes in plant microRNAs. Current Opinion in Plant Biology, 42: 16-22.
- 7- Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P, 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.
- 8- Chen X. (2005). microRNA biogenesis and function in plants. FEBS Letters, 579: 5923-5931.
- 9- CLC-bio (2015). *CLC Genomics Workbench User Manual*. QIAGEN Company, Aarhus, DE.
- 10- Dai X, Zhao PX (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. Nucleic Acids Research, 39: 155-159.
- 11- de Vries S, Kukuk A, von Dahlen JK, Schnake A, Kloesges T, Rose LE (2018). Expression profiling across wild and cultivated tomatoes supports the relevance of early miR482/2118 suppression for Phytophthora resistance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285: 20172560.
- 12- Du T, Zamore PD (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Development, 132: 4645-4652.
- 13- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. Trends in Plant Science, 15: 573-581.

- 14- Erskine, W. (2009) *The Lentil: Botany, Production and Uses*, CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- 15- Gleave AP, Ampomah-Dwamena C, Berthold S, Dejnopratt S, Karunairetnam S, Nain B, Wang YY, Crowhurst RN, MacDiarmid RM (2008). Identification and characterisation of primary microRNAs from apple (*Malus domestica* cv. Royal Gala) expressed sequence tags. *Tree Genetics & Genomes*, 4: 343-358.
- 16- Hammond SM (2015). An overview of microRNAs. *Advanced drug Delivery Reviews*, 87: 3-14.
- 17- Huang W, Peng S, Xian Z, Lin D, Hu G, Yang L, Ren M, Li Z (2017). Overexpression of a tomato miR171 target gene SIGRAS24 impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 472-488.
- 18- Jacob C, Carrasco B, Schwember AR (2016). Advances in breeding and biotechnology of legume crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127: 561-584.
- 19- Jagadeeswaran G, Zheng Y, Li YF, Shukla LI, Matts J, Hoyt P, Macmil SL, Wiley GB, Roe BA, Zhang W, Sunkar R (2009). Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families. *New Phytologist*, 184: 85-98.
- 20- Jung J H, Seo PJ, Park CM (2009). MicroRNA biogenesis and function in higher plants. *Plant Biotechnology Reports*, 3: 111-126.
- 21- Khazaei H, Caron, CT, Fedoruk M, Diapari M, Vandenberg A, Coyne, C.J., McGee, R. and Bett, K.E. (2016). Genetic Diversity of Cultivated Lentil (*Lens culinaris* Medik.) and Its Relation to the World's Agro-ecological Zones. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1093.
- 22- Li H, Sun J, Xu Y, Jiang H, Wu X, Li C (2007). The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 65: 655-665.
- 23- Li W, Jaroszewski L, Godzik A (2001). Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. *Bioinformatics*, 17: 282-283.
- 24- Li X, Hou Y, Zhang L, Zhang W, Quan C, Cui Y, Bian S (2014). Computational identification of conserved microRNAs and their targets from expression sequence tags of blueberry (*Vaccinium corybosum*). *Plant Signaling & Behavior*, 9: e29462.
- 25- Li X, Xie X, Li J, Cui Y, Hou Y, Zhai L, Wang X, Fu Y, Liu R, Bian S (2017). Conservation and diversification of the miR166 family in soybean and potential roles of newly identified miR166s. *BMC Plant Biology*, 17: 32.
- 26- Mandhan V, Kaur J, Singh K (2012). smRNAome profiling to identify conserved and novel microRNAs in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC Plant Biology*, 12: 197.
- 27- Mehta A, Gupta H, Rawal R, Mankad A, Tiwari T, Patel M, Ghosh A (2016). In Silico MicroRNA Identification from *Stevia rebaudiana* Transcriptome Assembly. *European Journal of Medicinal Plants*, 15(2): 1-14.
- 28- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012). Ap2/Erf Family Transcription Factors in Plant Abiotic Stress Responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2): 86-96.
- 29- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006). Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiology*, 140: 411-432.
- 30- Padmashree D, Ramachandraswamy N (2016). Identification and characterization of conserved miRNAs with its targets mRNA in *Trichinella Spiralis*. *Bioinformatics*, 12: 279-284.
- 31- 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.
- 32- Phookaew P, Netrphan S, Sojikul P, Narangajavana J (2014). Involvement of Mir164-and Mir167-Mediated Target Gene Expressions in Responses to Water Deficit in Cassava. *Biologia Plantarum*, 58(3): 469-478.
- 33- Quinlan AR, Hall I. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26: 841-842.
- 34- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell*, 110: 513-520.
- 35- Sabaghpour S, Seyedi F, Mahmoodi A, Safikhani M, Pezeshkpour P, Rostemi B, Kamel M, Ferayedi Y, Alahyari N, Poursiabidi M (2013). Cultivar release: kimiya, a new high yielding lentil cultivar for moderate cold and semi warm climate of iran. *Seed and Plant Improvement Journal*, 29: 397-399.

- 36- Srivastava R, Vasishtha H (2012). Saponins and lectins of Indian chickpeas (*Cicer arietinum*) and lentils (*Lens culinaris*). *Indian J Agric Biochem*, 25: 44-47.
- 37- Sudheesh S, Verma P, Forster JW, Cogan NOI, Kaur, S (2016). Generation and Characterisation of a Reference Transcriptome for Lentil (*Lens culinaris* Medik.). *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 1887.
- 38- Wang M, Wang Q, Wang B (2012). Identification and Characterization of MicroRNAs in Asiatic Cotton (*Gossypium arboreum* L.). *PLoS ONE*, 7: e33696.
- 39- Xie F, Frazier TP, Zhang B (2010a). Identification and characterization of microRNAs and their targets in the bioenergy plant switchgrass (*Panicum virgatum*). *Planta*, 232: 417-434.
- 40- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC (2005). Expression of Arabidopsis MIRNA Genes. *Plant Physiology*, 138: 2145-2154.
- 41- Xie Z, Khanna K, Ruan S (2010b). Expression of MicroRNAs and Its Regulation in Plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21: 790-797.
- 42- Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA (2006a). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*, 46: 243-259.
- 43- Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA (2006b). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 246-254.
- 44- Zhang X, Zhe Z, Junhong Z, Yuyang Z, Qinqin H, Tixu H, Xiaoguang X, Hui L, Hanxia L, Zhibiao Y (2011). Over-Expression of Sly-Mir156a in Tomato Results in Multiple Vegetative and Reproductive Trait Alterations and Partial Phenocopy of the Sft Mutant. *FEBS letters*, 585(2): 435-439.

Identification and characterization of conserved miRNAs in lentil

Sohrabi S.S.¹, Ismaili A.¹, Nazarian Firouz-Abadi F.¹ and Fallahi H.²

¹ Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

² Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous, noncoding, small RNA molecules consisting of 18-24 nucleotides (nts) that regulate target genes at the post-transcriptional level in plants. Also, this group of RNAs play a crucial role in development of plant, biological processes, cell proliferation and stress response. To date, no miRNAs have been identified in the lentil species although there are several reports on miRNAs in other legume species. Therefore, in this study, in order to identify and analysis of potential miRNAs and their target genes in lentil, total RNA from leaf tissue was extracted using with TRIzol method and was sequenced. Non-protein coding unigenes were identified and considered for candidates of miRNA precursor. Finally five miRNAs belonging to 5 highly conserved families were identified following a range of strict filtering criteria, designated as, lcu-miR156, lcu-miR166, lcu-miR167, lcu-miR171 and lcu-miR391. In addition, we predicted target mRNA genes form complementary base pair in seed region of miRNAs. Totally, due to the regulatory role of the identified miRNA on changing the range of downstream genes in the gene networks, it may be possible to use the identified microRNA as candidate genes in breeding programs aimed at improving the quality and quantity of lentil.

Key words: Computational analysis, MicroRNA, Secondary structure, Lentil, miRBase