Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 48, No 4, Winter 2017 (1161-1170)
DOI: 10.22059/ijfcs.2017.230802.654301

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۶ (ص ۱۱۷۰-۱۱۶۱)

شناسایی miRNAها و ژن‌های هدف مرتبط با آن‌ها در گیاه خشخاش (*Papaver somniferum*)

علی اکبر کریمی[۱]، محمدرضا نقوی[۲*] و جابر نصیری[۳]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲ . استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. پژوهشگر پسادکتری، مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۶۹/۰۱/۱۹- تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۰۱)

چکیده

miRNAها یک رده از **RNA**های تنظیم‌کنندهٔ کوچک درون‌هسته‌ای و غیر کدکنندهٔ پروتئینی بوده که متشکل از حدود ۱۷-۲۲ نوکلئوتید هستند. **miRNA**ها بیان ژن را پس از رونویسی با تجزیهٔ **mRNA** یا مهار ترجمهٔ آن‌ها کنترل کرده و نقش‌های متنوعی را در فرایندهای زیستی (بیولوژیکی) و سوخت‌وسازی (متابولیکی) در گیاهان و جانوران بازی می‌کنند. روش‌های چندی برای شناسایی **miRNA**ها موجود است که یکی از ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین آن‌ها، روش شناسایی داده‌های زیستی (بیوانفورماتیکی) است. در این بررسی با یک رویکرد داده‌های زیستی با هدف شناسایی **miRNA** متمایز در گیاه خشخاش، بررسی مبتنی بر جستجوی همسانی (همولوژی) بین **EST**های گیاه خشخاش و **miRNA**ها انجام گرفت. به‌طوری‌که در آغاز توالی **EST**های گیاه خشخاش از بانک اطلاعاتی **NCBI** در برابر **miRNA**های شناخته‌شده **BLASTn** شدند و در نهایت هفت **miRNA** نامزد متمایز در گیاه خشخاش شناسایی شد. ژن‌های هدف شناسایی‌شده با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف بررسی شدند و در نهایت مشخص شد که **miRNA**های نامزد به‌طور عمده مرتبط با ژن‌های رمزکنندهٔ سرین/ ترئونین کیناز (انتقال سیگنال)، پروتئین‌های **PPR** (ویرایش و پایداری **RNA**)، گلوبولین‌های **7S** (آب‌گیری و پسابش یا هیدراسیون و دهیدراسیون یاخته)، فتوتروپین‌ها (پاسخ‌های نورگرایی)، پروتئین‌های سرین/ ترئونین فسفاتاز (سوخت‌وساز گلیکوژن) و پروتئین‌های خانوادهٔ **TIR** (دفاع در برابر باکتری‌ها) است. این ژن‌ها نقش مهمی در رشد و نمو ، سوخت‌وساز ، تعیین ریخت‌شناختی (مورفولوژی) و زمان گلدهی و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده را بازی می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، گیاه خشخاش، هم‌ردیفی توالی، **EST**، **miRNA**، **RNA** غیر رمز آور، ***Papaver somniferum***.

Identification of miRNAs and their related target genes in *Papaver somniferum*

A.A. Karimi[1], M.R. Naghavi[2*], J. Nasiri[3]

1. M.Sc. Student of Biotechnology, Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran

2.Corresponding author, Professor, Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran, Email

3. Postdoctoral researcher, Genetic engineering and molecular genetics, Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: April 8, 2017 - Accepted: May 22, 2017)

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are a group of 17-22 nucleotides that derived from their precursor sequences and represent normally various roles in numerous biological and metabolic processes in both animals and plants. Among several approaches to identify miRNAs, the bioinformatics-based methods are regarded as one of the easiest and cheapest ways to identify miRNAs. In this study, to identify potential miRNAs in *Papaver somniferum*, the publicly available EST sequences of the plant were obtained from NCBI GenBank and blasted against the previously known Plant miRNAs. Ultimately, seven distinguished potential miRNAs were acquired in the plant. The target genes of the predicted miRNAs included a protein serine/threonine kinase (signal transduction), PPR protein family (edit and stability of RNA) and globulins 7 S (hydration and dehydration cells), phototropin (response to phototropism), protein of serine/threonine phosphatase (glycogen metabolism), TIR protein family (defense against bacteria). These genes play an important role in plant growth and development, metabolism, morphology and determination of flowering time and diverse plant responses against different biotic and abiotic stresses.

Keywords: Bioinformatics, EST, miRNA, Non-coding RNA, Opium poppy, *Papaver somniferum*, Sequence alignment.

* Corresponding author E-mail: mnaghavi@ut.ac.ir

مقدمه

گیاه خشخاش یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی مورد استفادهٔ بشر در سراسر جهان است و دارای منابع اولیهٔ ترکیب‌های تسکین‌دهنده و افیونی می‌باشد. این گیاه تولیدکنندهٔ شمار زیادی از آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین است. شیرابه (لاتکس) به‌دست‌آمده از کپسول نارس و ترشح‌های مرتبط با آن میزان زیادی آلکالوئید با خواص ضد درد می‌باشد که حاوی ۱۲ درصد مورفین بوده و میزان کمتری آلکالوئیدهای دیگری مانند کدئین و تبائین (فرونشاننده‌های درد) و نوسکاپین (ضدسرفه و تومور)، پاپاورین، توبوکورارین (آرامش ماهیچه‌ای) و سنگوئینارین (عامل ضدمیکروبی) را نیز دارا می‌باشد. مورفین و کدئین مهم‌ترین و مؤثرترین داروی مسکن در پزشکی در سرتاسر جهان محسوب می‌شوند. کشت و کار خشخاش افیونی برای تولید تجاری مورفین و کدئین بخش مهمی از چشم‌انداز کشاورزی در بسیاری از نقاط جهان است (Hagel & Facchini, 2013). miRNA یک رده از RNAهای تنظیم‌کنندهٔ کوچک درونی بوده که از توالی پیش‌ساز خود مشتق شده و در تنظیم بیان ژن نقش دارد. در سال ۲۰۰۲ برای نخستین بار miRNA ها در گیاهان کشف شدند(Park *et al.*, 2002). miRNA ها نقش کلیدی در شکل‌گیری (مورفوژنز) گیاهی، تنظیم مریستم جنینی ریشه، توسعهٔ برگ و شبکهٔ ریشه‌ای گیاه، تغییر مرحله‌ای از رشد رویشی به زایشی، کنترل صفات زراعی مهم گیاهان، انتقال سیگنال و پاسخ به شرایط محیطی مانند تنش‌های زنده و غیرزنده ایفا می‌کنند (Li & zhang, 2016). ساخت miRNA ها در هسته و سیتوپلاسم صورت می‌گیرد. miRNAها توسط RNA پلیمراز II به‌صورت مولکول‌های پیش‌ساز تاخورده (Pre-miRNA) سنتز می‌شوند. ساختار ساقه-حلقه این رونوشت‌ها توسط یک کمپلکس آنزیمی RNase III ویژهٔ برش RNA دو رشته‌ای به نام Drosha مستقر در هسته تشخیص داده شده و پردازش می‌شود. این آنزیم به همراه یک زیر واحد پروتئینی ضروری برای عملکرد اختصاصی خود (که در برخی موجودات Pasha و در دیگر موجودها DGCR8 نامیده می‌شود) عمل می‌کند و این دو پروتئین با یکدیگر یک مجموعهٔ ریزپردازشگر فعال را تشکیل می‌دهند. پردازش اولیه منجر به ایجاد یک پیش‌ساز سنجاق سری ۶۵-۷۰ نوکلئوتیدی می‌شود، که این ریز (میکرو) RNA پیش‌ساز به سیتوپلاسم منتقل‌شده و در آنجا، RNase III دیگری به نام Dicer لوپ انتهایی Pre-miRNA را برش داده و منجر به پردازش نهایی ریز RNA می‌شود. بنابراین عملکرد دروشا و به دنبال آن دایسر منجر به ایجاد مولکول RNA به طول ۲۱-۲۵ نوکلئوتید می‌شود که در تنظیم بیان ژن نقش دارد. فرم فعال miRNA تنظیمی به شکل تک‌رشته‌ای است که در این حالت RNA راهنما[1] خوانده می‌شود که با کمپلکس پروتئینی RISK تلفیق می‌شود و آن را به‌سوی RNA هدف راهنمایی می‌کند. RNA راهنما با mRNA هدف ایجاد جفت باز می‌کند که در نهایت باعث خاموشی بیان ژن می‌شود. عضو مرکزی این کمپلکس تنظیمی، پروتئینی است که ارگونات نامیده می‌شود که از خانوادهٔ آنزیم‌های برش‌دهندهٔ RNA است. ایجاد شمار کمی جفت باز مکمل برای برهمکنش عملکردی بین ریز RNA و توالی مولکول هدف ضروری است. برش تا حدودی در نقطهٔ وسط ناحیهٔ دو رشته‌ای RNA هدف-RNA راهنما حد واسط نوکلئوتید ۱۰ و ۱۱ از انتهای ۵ مولکول RNA هدف ایجادشده که این عمل سبب ناپایداری دم پلیA در mRNA هدف شده و آغاز ترجمهٔ آن را ناکارآمد می‌کند (Wiemer, 2007). هدف از این تحقیق شناسایی miRNAهای متمایز گیاه خشخاش (*P. somnifeum*) و ژن‌های هدف آن با استفاده از روش‌های داده‌های زیستی (بیوانفورماتیکی) مبتنی بر جستجوی همسانی (همولوژی) بین ESTهای گیاه خشخاش موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و miRNAهای سایت miRBase با انجام BLASTn می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منابع miRNA

شمار ۲۸۶۴۵ توالی miRNA بالغ شناخته‌شده از شمار زیادی گونه از پایگاه داده miRBase به آدرس

1. Guide

اینترنتی http://www.mirbase.org/ دانلود شدند. توالی‌های miRNA به‌عنوان توالی شناخته‌شده[1] برای یافتن miRNAهای حفاظت‌شده بر پایهٔ جستجوی همسانی بین miRNAها و ESTهای گیاه خشخاش بکار گرفته شد.

منابع EST گیاه خشخاش و جستجوی همسانی بین miRNA و ESTها

درمجموع، ۲۱۰۴۶ EST گیاه خشخاش از بانک اطلاعاتی NCBI قسمت EST آن (dbEST) به آدرس اینترنتی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) دانلود شد. توالی‌های بالغ miRNA گیاهی در الگوریتم BLASTn (BLAST2.2.21) برای جستجوی همسانی در برابر ESTهای گیاه خشخاش در لینوکس آپلود شدند. تنظیم‌های BLASTn با در نظر گرفتن میزان مورد انتظار[2] ۰/۰۰۶ تنظیم شد. توالی‌های miRNA به‌عنوان توالی شناخته‌شده و توالی‌های EST به‌عنوان توالی تردیدی[3] با یکدیگر برای جستجوی همسانی مقایسه شدند. سپس ESTهایی که با توالی‌های بالغ miRNA حداکثر تا چهار عدم جفت‌شدگی داشتند به‌عنوان نامزد انتخاب شدند (Zhang *et al*., 2005).

انجام BLASTx برای شناسایی miRNAهای غیر رمز آور

در مرحلهٔ بعدی با انجام BLASTx، توالی‌های EST غیر رمز آور باقی ماندند. با توجه به این امر که miRNAها از توالی‌های EST غیر رمز آور بوجود می‌آیند، بنابراین توالی‌های EST رمز آور حذف‌شده و تنها توالی‌های غیر رمز آور باقی ماندند (Altschul *et al*., 1997).

تعیین ساختار ثانویهٔ miRNAهای متمایز به‌وسیلهٔ MFOLD

برای پیش‌بینی ساختار ثانویهٔ miRNAهای نامزد انتخاب‌شده، از نرم‌افزار MFOLD استفاده شد. این ابزار محاسباتی تحت وب در آدرس http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi قابل دسترس است (Zuker, 2003). خروجی‌های MFOLD شامل کمترین انرژی آزاد (ΔG Kcal/mol)، شمار بازوها در هر ساختار و شمار نوکلئوتیدها (A، G، C وT)، اندازه و تقارن داخلی حلقه‌ها در بازوها، اندازهٔ مارپیچ در بازوها، جایگاه ناحیه‌های جفت شده، درصد محتویات (A+T) و (G+C) و شاخص کمترین انرژی آزاد فولدینگ (MFE)، AMFE و MFEI است که به قرار زیر محاسبه می‌شوند (Zhang *et al*,. 2006c).

AMFE = (MFE / Pre-miRNA طول 100*)

MFEI = (AMFE / (G+C)) %

پارامترهای به کار گرفته‌شده روی miRNAهای بالغ و پیش‌ساز آن شامل موارد ذیل بودند: الف- شمار بازهای غیر همسان بین miRNA های بالغ و پیش ساز حداکثر تا شش نوکلئوتید باشد. ب- شاخص کمترین انرژی فولدینگ (MFEI) بالاتر از انواع دیگر RNA ها و کمترین انرژی منفی فولدینگ (MFE) پیش‌ساز miRNA کمتر باشد. ج- یک حلقه یا شکاف بزرگ در توالی miRNA بالغ وجود نداشته باشد. د- قسمت بالغ miRNA باید روی حلقهٔ پیش‌ساز miRNA قرار گیرد. ه- طول miRNA بالغ در حدود دامنهٔ بین ۱۷-۲۴ باشد. و- محتوای بازهای A+U پیش‌ساز miRNA باید بین ۳۰ درصد تا ۷۰ درصد باشد.

تحلیل تبارزایی (انالیز فیلوژنتیکی)

RNA های کوچک به‌طور طبیعی حفاظت‌شده هستند. به همین دلیل کشف راست نسخه (اورتولوگ) می‌تواند با تجزیه‌وتحلیل داده‌های زیستی صورت بگیرد. برای نشان دادن روابط تکاملی miRNAهای نامزد متمایز گیاه خشخاش، از انالیز فیلوژنتیکی استفاده شد که با برنامهٔ MEGA3.0 انجام شد (Tamura *et al*., 2011).

پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNAهای نامزد در گیاه خشخاش

برای شناسایی رونوشت‌ها و ژن‌های هدف از تشابه مکمل معکوس بین miRNA و رونوشت هدف استفاده

1. Subject
2. E-value
3. Query

می‌شود. ژن‌های هدف این miRNAها از گونه‌های مختلف گیاهی در وب‌سایت psRNATARGET انتخاب شدند. ژن‌ها و رونوشت‌های هدف Pso-miR1863 از گیاه گرمک، Pso-miR845 و Pso-miR7782-3p از گیاه جاروی جنگل (*Brachypodium distachyon*)، Pso-miR8175 و Pso-miR444a-5p از گیاه علف تال (ارابیدوبسیس)، Pso-miR8744 از گیاه پنبه و Pso-miR9746i از گیاه سویا با استفاده از وب‌سایت psRNATARGET به آدرس اینترنتی </hTTp://planTgrn.noble.org/psRNATargeT> استفاده شدند. سپس برای پی بردن به عملکرد این ژن‌های هدف، آن‌ها BLASTn شدند.

پارامترهای زیر در هنگام استفاده از این سایت به کار گرفته شد: الف- بیشترین ارزش مورد انتظار برابر با ۳ بود. ب- شمار جایگاه‌های مورد هدف برابر با ۲ بود. ج- محدودهٔ نداشتن تشابه بازهای مرکزی بین ۱۱-۹ نوکلئوتید بود. د- بیشترین نبود تشابه در جایگاه‌های مکمل کمتر از چهار و بدون هیچ‌گونه فاصله (gap) باشد (Dai & Zhao, 2011).

نتایج و بحث

شناسایی miRNAهای نامزد در گیاه خشخاش

برای شناسایی miRNAهای جدید در گیاه خشخاش ما از روش‌های داده‌های زیستی مبتنی بر جستجوی همسانی استفاده شد. انجام یک روش داده‌های زیستی برای شناسایی miRNAهای جدید محتمل است چراکه اغلب miRNAهای بالغ شناخته‌شده به‌صورت تکاملی در گونه‌های مختلف درون قلمرو گیاهی حفاظت‌شده هستند (Zhang *et al*., 2006d).

پس از انجام BLASTn بین توالی‌های EST گیاه خشخاش و همهٔ miRNAهای سایت miRBase، حدود ۹۲ توالی همسانی به دست آمد. جستجوی BLAST با E-value پایین‌تر ناحیهٔ همانندی قابل‌توجه‌تری را در میان EST ها و miRNAهای بالغ به وجود آورد. بنابراین توالی‌هایی با ۱۰۰ درصد همسانی و شمار کمی عدم تشابه به دست آمد. پس از انجام BLASTx به‌منظور حذف توالی‌های کدکنندهٔ پروتئینی و باقی ماندن توالی‌های غیرکدکنندهٔ پروتئینی، نهایتا هفت miRNA متمایز به دست آمد. سپس توالی‌های EST به‌وجودآورندهٔ این miRNAهای بالغ غیرکدکنندهٔ پروتئینی برای تعیین ساختار ثانویه به سرور MFOLD انتقال یافتند. نتایج به‌دست‌آمده توسط MFOLD به‌صورت دستی برای تعیین توالی پیش‌ساز miRNA و ساختار ساقه-حلقه مناسب با استفاده از معیارهای از پیش توضیح داده شده بررسی شد.

کمترین انرژی آزاد فولدینگ (MFE) یک شاخص برجسته برای تعیین ساختار ثانویهٔ اسیدهای نوکلئیک مانند RNA و DNA است. MFE پایین‌تر از نظر ترمودینامیکی برای ساختار ثانویهٔ توالی‌های RNA یا DNA مربوطه پایدارتر است. توالی پیش‌ساز miRNA به‌طور معنی‌داری ارزش MFEI بالاتری نسبت به RNAهای غیرکدکنندهٔ پروتئینی مانند tRNA و rRNA یا RNAهای کدکنندهٔ پروتئینی مانند mRNA دارند (Bonnet *et al*., 2004). برای جلوگیری از پیش‌بینی نادرست miRNAها از دیگر RNAهای کوچک، MFEI شاخص بسیار مطلوبی به شمار می‌آید. شاخص MFEI با استفاده از گزارش‌های پیشین محاسبه شد (Yin *et al*., 2008). با توجه به جدول ۱، طول پیش‌ساز Pso-MIR1863 حدود ۶۲ نوکلئوتید و شاخص MFEI حدود ۰/۸۲ بدست آمد، و برای دیگر miRNA ها نیز این دو شاخص محاسبه شدند.

ساختار ثانویهٔ پیش‌ساز ساقه-حلقه هفت miRNA متمایز نامزد در گیاه خشخاش در MFOLD ترسیم شد (شکل ۱). همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، قسمت بالغ miRNA گیاه خشخاش در قسمت حلقهٔ ساختار ثانویهٔ پیش ساز miRNA قرار داشت، که یکی از شروط اساسی در ترسیم ساختار ثانویه در MFOLD قرار دارد.

درضمن، درخت فیلوژنتیکی برای نشان دادن روابط تکاملی بین miRNA های متمایز گیاه خشخاش ترسیم شد (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، Pso-miR1863 و Pso-miR845 که به ترتیب بر روی پروتئین‌های هدف سرین/ ترئونین کیناز و پروتئین‌های سیتوکروم P450 تأثیر می‌گذارند بیشترین همانندی ژنتیکی را با یکدیگر

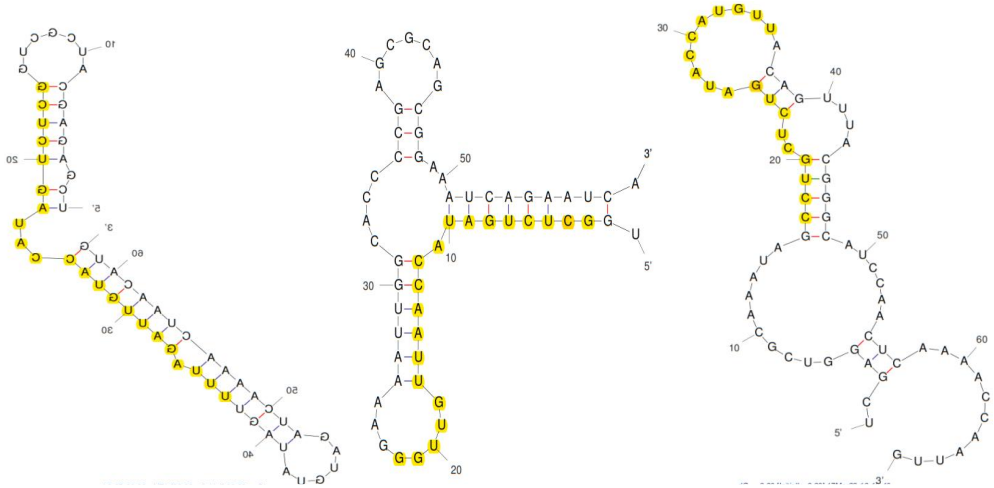
داشته و همچنین Pso-miR444a-5p و Pso-miR8744 که به ترتیب بر روی پروتئین‌های خانوادهٔ TIR و آنزیم ریبولوز فسفات۳-اپی مراز تأثیرگذار بوده با یکدیگر بیشترین همانندی ژنتیکی دارند و Pso-miR9746i کمترین رابطهٔ تکاملی را با دیگر miRNA های نامزد گیاه خشخاش دارند.

جدول ۱. ویژگی‌های miRNAهای جدید شناسایی‌شدهٔ گیاه خشخاش

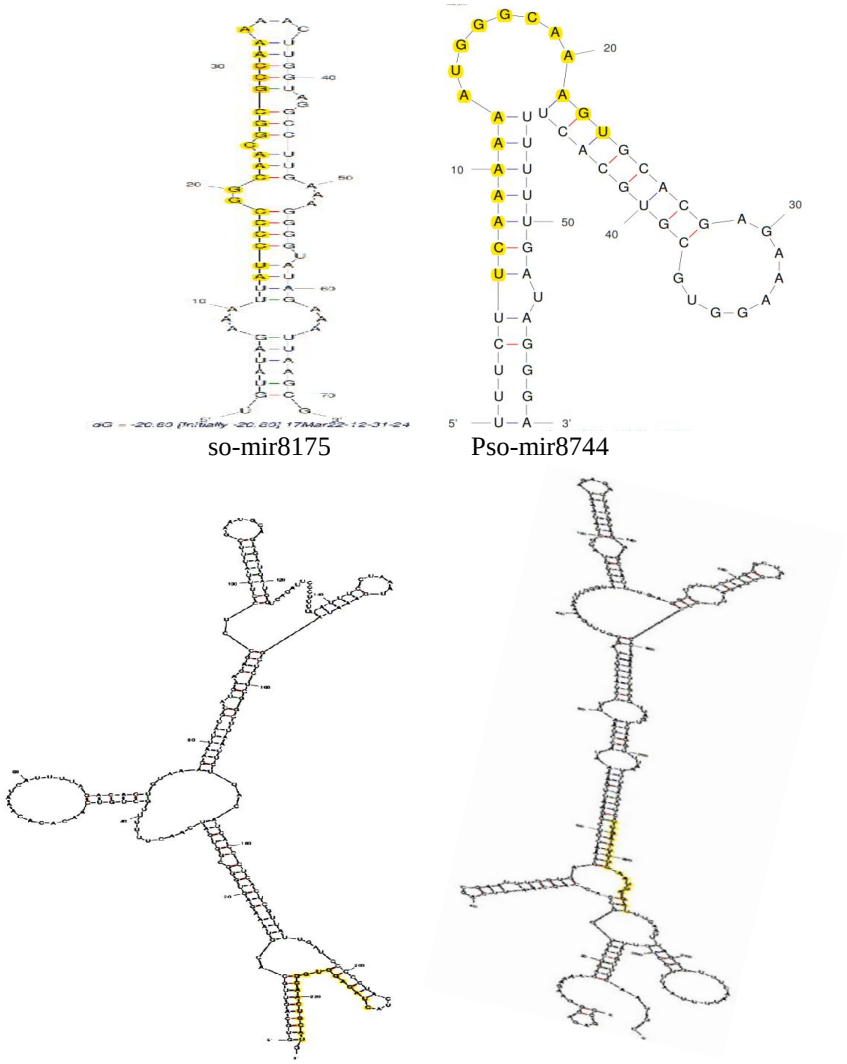
Table 1. Characteristics of newly identified miRNA in *Papaver somniferum*

Accession	[1]MFE	[2]LP	[3]LM	A+U	[4]MFEI	Homologous New miRNA	*P. somniferum* miRNA
Pso-miR1863	GCUCUGAUACCAUGU	EST:	-20.30	62	22	0.61	0.82	cme-miR1863
Pso-miR845	UAGAUUU	FG604901					
	GCUCUGAUACCAAUU	EST:	-13.83	60	20	0.50	0.46	
Pso-miR7782-3p	GUUGG	FG604800						bdi-miR845
	CCUGCUCUGAUACCAU	EST:	-9.20	68	19	0.54	0.30	
Pso-miR8175	GUU	FE966194					
Pso-miR444a-5p	AUCCCCGGCAACGGC	EST:	-20.80	71	19	0.54	0.63	bdi-miR7782-3p
	GCCA	FG609597					
Pso-miR8744	CUAGAGGUGGCAAC	EST:	-60.22	227	19	0.61	0.68	ath-miR8175
Pso-miR9746i	UGCAU	FG612596					
	UCAAAAAAUGGGCA	EST:	-16.5	58	18	0.60	0.71	
	AAGU	FG604764						osa-miR444a-5p
		EST:	-63.81	275	17	0.66	0.52	
	UUGAAUUUCAAUUAGAU	FE965393						
								gra-miR8744
								gma-miR9746i

1. MFEs: minimal folding free energies (kcal mol^{-1}). 2. LP: length of pre-miRNA. 3. LM: length of mature miRNAs. 4. MFEIs: minimal folding free energy indices.

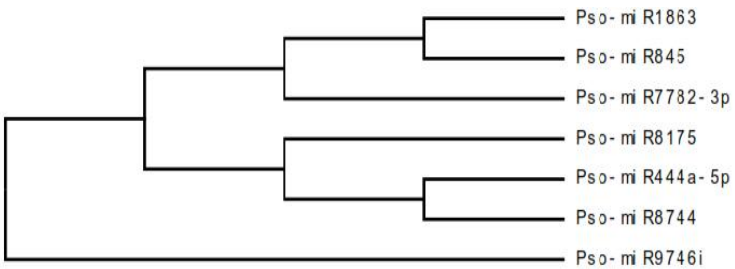


Pso-mir7782 Pso-mir845 Pso-mir1863



شکل ۱. ساختارهای ثانویهٔ ساقه–حلقه miRNAهای جدید شناسایی‌شده در گیاه خشخاش. قسمت بالغ miRNA با رنگ زرد مشخص شده است.

Figure 2. Some of the secondary stem-loop structures of newly identified *Papaver somniferum* miRNAs. Mature miRNA sequences are colored (blue).



شکل ۲. درخت تبارزایی برای miRNA های جدید شناسایی‌شده در خشخاش

Table 8. Phylogenetic tree for the newly identified miRNA in *Papaver somniferum*.

پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNA های متمایز گیاه خشخاش

برای پی بردن به نقش miRNAها در عملکردهای مختلف یاخته‌ای، شناسایی ژن‌های هدف miRNA یک مرحلهٔ مهمی است. در این تحقیق، ژن‌های هدف

مختلفی برای هفت miRNA به دست آمد که متعلق به چندین خانوادهٔ ژنی با عملکردهای زیستی (بیولوژیکی) مختلف بودند. این miRNAها به‌طور مستقیم با تأثیر بر رشد و نمو، ریخت‌شناختی، زمان گلدهی، سوخت‌وساز، پاسخ به تنش را بر عهده دارند.

Pso-miR1863 در فرایندهای زیستی مانند تنظیم چرخهٔ یاخته‌ای و انتقال سیگنال، سازمان‌دهی اکتین و میکروتوبول یاخته‌ای و پردازش RNA نقش دارد و روی ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین سرین/ترئونین کیناز، پروتئین ABIL5، پروتئین dynamin-2A-like و پروتئین pentatricopeptide repeat (PPR) تأثیر می‌گذارد. پروتئین سرین/ترئونین کیناز پروتئینی مؤثر در پاسخ انتقال سیگنال خاص در یاخته، تنظیم پیشرفت چرخهٔ یاخته‌ای و رونویسی فرآیندهای فعال‌سازی سیگنالینگ نقش ایفا می‌کند (Vincent & Settleman., 1997). پروتئین ABIL5 درگیر در تنظیم سازمان‌دهی اکتین و میکروتوبول یاخته‌ای است. پروتئین dynamin-2A-like یک پروتئین مولد نیرو مرتبط با میکروتوبول که در انتقال ریزکیسه (وزیکول)های پروتئین پوششی کلاترین حد واسط از قسمت ترانس شبکهٔ گلژی به واکوئل مرکزی نقش دارد (Jin *et al*., 2001). پروتئین PPR یک خانوادهٔ بزرگ از پروتئین‌های متصل به RNA بوده که فرایندهای پردازش، پیرایش، ویرایش و انتقال RNAها را تسهیل می‌کند (Manna, 2015).

هدف‌های ژنی Pso-miR845 بیشتر در فرایندهای پاسخ به تنش خشکی، رشد و نمو و پاسخ‌های نورگرایی دخیل هستند که Pso-miR845 معمولا ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین‌های سیتوکروم P450 (CYPs)، گلوبولین 7S، فتوتروپین‌ها، عامل‌های رونویسی ARFsها را مورد هدف قرار می‌دهد. سیتوکروم P450 (CYPs) پروتئین‌هایی به‌عنوان هموپروتئین‌ها بوده که در زنجیرهٔ انتقال الکترون نقش ایفا می‌کند (Lamb *et al*., 2009). گلوبولین‌های 7S عمده پروتئین‌های ذخیره‌ای دانهٔ گیاهان بوده که این پروتئین‌ها نقش‌هایی در فرایندهای آب‌گیری/پسابش دارند (Müntz, 1998). ARFها، عامل‌های رونویسی بوده که به‌طور اختصاصی به ناحیه راه‌اندازهای پاسخ به اکسین (AuxREs) متصل می‌شوند، به‌عنوان فعال‌کنندهٔ رونویسی عمل کرده و واسطهٔ تشکیل محور جنینی و تمایز بافت‌های آوندی هستند (Hagen & Guilfoyle, 2002). فتوتروپین‌ها، پروتئین‌های گیرندهٔ نوری بوده که واسطهٔ پاسخ‌های نورگرایی و تغییر رشد در گیاهان هستند.

Pso-miR7782 نیز پروتئین‌هایی که در حفظ سیکل‌های منظم میتوزی برای تشکیل ریشه‌های جانبی مورد نیاز است را مورد هدف قرار می‌دهد (Didonato *et al*., 2004). ژن مورد هدف Ath-miR8175 گالاکتوز اکسیداز بوده که این آنزیم D-گالاکتوز را به D-گالاکتو هگزو دی الدوز و H_2O_2 تبدیل کرده و همچنین قادر به تسریع کاتالیز انواع مختلف الکل‌ها از گالاکتوز است (Bertini *et al*., 2007).

Pso-Mir8744 به‌طور عمده بر فرایندهای فیزیزلوژیکی مانند نورساخت (فتوسنتز) و سوخت‌وساز یاخته‌ای، تنظیم بیان ژن و پاسخ به تنش گرمایی تأثیرگذار بوده و ژن‌های کدکنندهٔ آنزیم ریبولوز فسفات ۳-اپی مراز، آنزیم سرین-ترئونین فسفاتاز (PSP) ، پروتئین Chaperon dnaj (Hsp40) و پروتئین‌های خانوادهٔ ING را مورد هدف قرار می‌دهد. ریبولوز فسفات ۳- اپی مراز برای تثبیت کربن در گیاهان از طریق چرخهٔ کالوین و حالت غیراکسایش (اکسیداتیو) مسیر پنتوزفسفات مورد نیاز است (Akana *et al*., 2006). پروتئین سرین-ترئونین فسفاتاز (PSP) نقش محوری در فسفرزدایی (دفسفریلاسیون) پروتئین‌ها در سازوکار تنظیم یاخته‌ای و سوخت‌وساز گلیکوژن را بر عهده دارند (Wera & Hemmings, 1995). پروتئین‌های Chaperon dnaj (Hsp40)، برای حفاظت و جلوگیری از تجمع غیر قابل‌برگشت پروتئین‌ها در طول ساخت و زمان تکانهٔ (شوک) گرمایی به خدمت گرفته می‌شوند (Qiu *et al*., 2006). پروتئین‌های خانوادهٔ ING در ترمیم DNA، مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ یاخته و تنظیم بیان ژن از طریق هدف قرار دادن هیستون استیلاز/داستیلاز نقش ایفا می‌کنند (He *et al*., 2005).

Pso-miR9746i نیز در ترمیم DNA آسیب‌دیده و مسدود کردن چنگال همانندسازی و هیدرولیز ساکارز و Pso-miR444a در فرایند انتقال سیگنال درون‌یاخته‌ای و پاسخ ایمنی ذاتی در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها و تنظیم واکنش‌های درونی GDP/GTP اغلب پروتئین‌ها نقش دارند. انجام آزمایش qRT-PCR برای مقایسه و اعتبارسنجی سطوح بیان miRNA و ژن‌های هدف آن در اندام‌های مختلف گیاه خشخاش می‌تواند انجام شود. که در این باره همبستگی منفی معنی‌دار بین میزان بیان miRNA و ژن هدف آن در اندام خاص گیاه خشخاش گواه بر تأیید این miRNA در این گیاه است.

جدول ۲. فهرست هدف‌های ژنی پیش‌بینی‌شدهٔ داده‌های زیستی miRNA های نامزد گیاه خشخاش.

Table 2. List of computer-based predicted targets of *P. somniferum* miRNAs

miRNA	پروتئین هدف	عملکرد زیستی	Target Acc.	گونه گیاهی
Pso-miR1863	سرین/ترئونین کیناز	انتقال سیگنال	METC015205	*Cucumis melo*
	پروتئین ABIL5	سازمان‌دهی اکتین و میکروتوبول	METC043373	
	Dynamin-2A-like protein	انتقال ریزکیسه‌های پروتئین پوششی کلاترین	METC008607	
	پروتئین PPR	ویرایش، پایداری و انتقال RNA	METC031017	
Pso-miR845	سیتوکروم P450	زنجیرهٔ انتقال الکترون	Bradi1g36725.1	*Brachypodium distachyon*
	گلوبولین 7S	آب‌گیری/ پسابش	Bradi2g25850.1	
	فتوتروپین‌ها	پاسخ‌های نورگرایی	Bradi5g07360.3	
	عامل رونویسی ARFs	عامل رونویسی پاسخ به هورمون اکسین	Bradi3g03420.3	
Pso-miR7782	پروتئین‌های آغازکننده تشکیل ریشه‌های جانبی	حفظ چرخه‌های منظم میتوزی برای تشکیل ریشه‌های جانبی	Bradi3g19910.2	*Brachypodium distachyon*
Pso-miR8175	گالاکتوز اکسیداز	کاتالیز الکل‌های مختلف از گالاکتوز	TC366626	*Arabidopsis*
Pso-miR444a	پروتئین‌های خانوادهٔ TIR	پاسخ ایمنی ذاتی در برابر باکتری‌ها	TC388495	*Arabidopsis*
	پروتئین‌های خانواده GDI2	تنظیم واکنش‌های درونی GDP/GTP	BP658598	
Pso-miR8744	ریبولوز فسفات۳-اپی مراز	تثبیت کربن در گیاهان	CO127192	*Gossypium raimondii*
	سرین- ترئونین فسفاتاز	فسفرزدایی پروتئین‌ها	CO107913	
	پروتئین Chaperon dnaj	حفاظت از پروتئین‌ها در زمان تنش یاخته‌ای	TC515	
	پروتئین‌های خانواده ING	ترمیم DNA و مرگ برنامه‌ریزی‌شده یاخته	CO110739	
Pso-miR9746i	پروتئین Rada	ترمیم DNA صدمه دیده	TC432759	*Glycine max*
	اینورتاز سیتوزولی	آبکافت ساکارز	TC463100	

نتیجه‌گیری کلی

miRNAها می‌توانند بعنوان ابزارهای اصلاحی جدید در بهبود ژنتیکی گیاهان عمل کرده و برخی از آنها تأثیری نیرومند در تنظیم صفات عمدهٔ زراعی دارند. در این بررسی، برای تشخیص miRNAهای گیاه خشخاش، با یک رویکرد داده‌های زیستی مبتنی بر جستجوی همسانی، درابتدا ESTهای گیاه خشخاش در برابر miRNA های شناخته‌شدهٔ پیشین، BLASTn شدند و درنهایت هفت miRNA نامزد متمایز در گیاه خشخاش شناسایی شد. این miRNAها نقش مهمی در مهار فرایندهای زیستی مانند رشد و نمو، نور ساخت، سوخت‌وساز و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. Pso-miR7782 با هدف قرار دادن پروتئین‌های مورد نیاز برای آغاز تشکیل ریشه‌های جانبی، در مهار و مدیریت پاسخ به تنش خشکی نقش ایفا می‌کند. Pso-miR8744 با مهار میزان بیان آنزیم ریبولوز ۳-فسفات اپی مراز در نورساخت نقش داشته و همچنین در پاسخ به تکانهٔ گرمایی از تجمع غیر قابل‌برگشت پروتئین‌ها در زمان تنش گرمایی جلوگیری می‌کند. این بررسی نخستین گزارشی است که در رابطه با miRNAهای دخیل در رشدونمو، نورساخت و پاسخ به تنش خشکی در گیاه خشخاش گزارش می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهش و فناوری وزارت علوم،

تحقیقات و فناوری بابت حمایت مالی از این تحقیق در قالب طرح کاربردی با شماره شناسه ۲۰۰ تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCES

1. Akana, J., Fedorov, A. A., Fedorov, E., Novak, W.R., Babbitt, P.C., Almo, S.C. & Gerlt, J.A. (2006). D-Ribulose 5-phosphate 3-epimerase: functional and structural relationships to members of the ribulose-phosphate binding (beta/alpha) 8-barrel superfamily. *Biochemistry*, 45 (8), 2493–503.
2. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25, 3389–3402.
3. Barratt, D.P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J. & Smith, A. M. (2009). Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(31), 13124-13129.
4. Beam, C. E., Saveson, C. J. & Lovett, S. T. (2002). Role for radA/sms in recombination intermediate processing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *184*(24), 6836-6844.
5. Bertini, I. (2007). *Biological inorganic chemistry: structure and reactivity*. University Science Books.
6. Bonnet, E., Wuyts, J., Rouze, P. & Peer, Y.V. (2004). Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics* 20, 2911–2917.
7. Mitcham, J. L., Parnet, P., Bonnert, T. P., Garka, K. E., Gerhart, M. J., Slack, J. L. & Sims, J. E. (1996). T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(10), 5777-5783.
8. Dai, X., Zhao, P.X. (2011). PsRNATarget: a plant small RNA target analysis s erver. *Nucleic Acids Res*. 39, W155–W159.
9. DiDonato, R. J., Arbuckle, E., Buker, S., Sheets, J., Tobar, J., Totong, R. & Celenza, J. L. (2004). Arabidopsis ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *The Plant Journal*, *37*(3), 340-353.
10. Hagel, J. M. & Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism–a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, pct020.
11. Hagen, G. & Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*, *49*(3-4), 373-385.
12. He, G. H., Helbing, C. C., Wagner, M. J., Sensen, C. W. & Riabowol, K. (2005). Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Molecular biology and evolution*, *22*(1), 104-116.
13. Jin, J. B., Kim, Y. A., Kim, S. J., Lee, S. H., Kim, D. H., Cheong, G. W. & Hwang, I. (2001). A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13(7), 1511-1526.
14. Lamb, D. C., Lei, L., Warrilow, A. G., Lepesheva, G. I., Mullins, J. G., Waterman, M. R. & Kelly, S. L. (2009). The first virally encoded cytochrome p450. *Journal of virology*, *83*(16), 8266-8269.
15. Li, C. & Zhang, B. (2016). MicroRNAs in control of plant development. *Journal of cellular physiology*, 231(2), 303-313.
16. Lin, S. L., Chang, D. & Ying, S. Y. (2005). Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. *Gene*, *356*, 32-38.
17. Manna, S. (2015). An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie*, 113, 93-99.
18. Müntz, K. (1998). Globulins from legume seeds: Structure and function during storage and reactivation. In *Plant Proteins from European Crops* (pp. 3-12). *Springer Berlin Heidelberg*.
19. 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*(17), 1484-1495.
20. Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S. & Wang, L. (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and molecular life sciences*, *63*(22), 2560-2570.
21. Sedlacek, Z., Munstermann, E., Mincheva, A., Lichter, P. & Poustka, A. (1998). The human rab GDI β gene with long retroposon-rich introns maps to 10p15 and its pseudogene to 7p11-p13. *Mammalian genome*, *9*(1), 78-80.
22. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol*. 28, 2731–2739.
23. Unver, T., Budak, H. (2009) Conserved microRNAs and their targets in model grass species

Brachypodium distachyon. *Planta* 230:659–669.
24. Vincent, S. & Settleman, J. (1997). The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(4), 2247-2256.
25. Wiemer, E. A. (2007). The role of microRNAs in cancer: no small matter. *European journal of cancer*, 43(10), 1529-1544.
26. Yin, Z., Li, C., Han, X. & Shen, F. (2008). Identification of conserved microRNAs and their target genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Gene*, *414*(1), 60-66.
27. Wera, S. & Hemmings, B. A. (1995). Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal*, *311*(Pt 1), 17.
28. Zhang, Y. (2005). miRU: an automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Res*. 33(Web Server issue):W701–4.
29. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. (2006a). Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology*, *289*(1), 3-16.
30. Zhang, B., Pan, X., Wang, Q., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. (2006b). Computational identification of microRNAs and their targets. *Computational Biology and Chemistry*, *30*(6), 395-407.
31. Zhang, B.H., Pan, X.P., Cox, S.B., Cobb, G.P., Anderson, T.A. (2006c). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cell. Mol. Life Sci*. 63, 246.
32. Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. (2006d). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*, *46*(2), 243-259.
33. Zhang, B., Wang, Q., Wang, K., Pan, X., Liu, F., Guo, T., Anderson, T. A. (2007). Identification of cotton microRNAs and their targets. *Gene*, *397*(1), 26-37.
34. Zhang, B., Pan, X. & Stellwag, E. J. (2008). Identification of soybean microRNAs and their targets. *Planta*, *229*(1), 161-182.
35. Zhang, W., Luo, Y., Gong, X., Zeng, W., Li, S. (2009). Computational identification of 48 potato microRNAs and their targets. *Comput Biol Chem* 33:84–93.
36. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31:3406–3415.