

شناسایی microRNA (miRNA) ها و ژنهای هدف آن‌ها در دو گونه *Cichorium intybus* و *Cichorium endivia*

محمد چهاربنیچه فرجی^۱، محمدرضا نقوی^{۲*}، منیژه سبکدست نودهی^۳، جابر نصیری^۴، نفیسه خسروی دهقان^۵

۱ و ۲. به ترتیب دانشجوی، استاد، استادیار و دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۴
استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج، ۵. دانشگاه علوم پزشکی البرز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۲۹)

چکیده

miRNAها مجموعه‌ای از مولکول‌های کوچک RNA غیرکد کننده و درونزاد، با طول حدود ۲۲ نوکلئوتید هستند که در تنظیم پس از رونویسی از طریق تخریب mRNAهای هدف و یا سرکوب ترجمه آن‌ها، نقش دارند. این مولکول‌ها به صورت تکاملی در قلمرو گیاهی حفاظت شده هستند؛ از این رو، با استفاده از ابزارها و روش‌های مقایسه‌ای می‌توان آن‌ها و همچنین ژنهای هدف آن‌ها را پیشگویی کرد. در مطالعه حاضر، از روش‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی و همچنین توالی‌های EST دو گونه کاسنی و miRNA موجود در بانک‌های اطلاعاتی، جهت شناسایی miRNAها و ژنهای هدف آن‌ها در دو گونه *C. endivia* و *C. intybus* استفاده شد. این توالی‌ها در ابتدا Blastn شدند و در نهایت و پس از طی مراحل مختلف، چهار miRNA متعلق به خانواده‌های miR166، miR162، miR156 و miR393 شناسایی شد. همچنین تعداد زیادی ژن از جمله *TIRI*، ژنهای پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور *Squamusa* و ... به‌عنوان ژنهای هدف این miRNAها شناسایی شدند. نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان miR156 در برگ گونه *C. endivia*، بیشتر از گل آن و همچنین بالاتر از بیان این miRNA در برگ و گل گونه *C. intybus* است.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، ریل تایم PCR، کاسنی، EST، miRNAها.

Identification of conserved microRNAs and their targets in *Cichorium intybus* and *Cichorium endivia*

Mohammad Chaharbonicheh Faraji¹, Mohammad Reza Naghavi^{2*}, Manizheh Sabokdast Noudehi³, Jabber Nasiri⁴, Nafiseh Khosravi Dehghan⁵

1,2,3. Agronomy and Plant Breeding Department, Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran. 4. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOL, Karaj, Iran. 5. Alborz University of Medical Science, Karaj, Iran.

(Received: July 6, 2019 - Accepted: April 17, 2020)

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are a class of short and endogenously initiated non-coding RNAs that post-transcriptionally control gene expression via either translational repression or mRNA degradation. Mature miRNAs are reported to be highly conserved throughout the plant kingdom; therefore, comparative genomics approaches are used to predict the novel miRNA genes and their target genes. In this study, bioinformatics and laboratory approaches followed by the EST and miRNA sequences in the databases for chicory species were employed for the identification of potential miRNAs and their potential targets either in *Cichorium intybus* or *Cichorium endivia*. To identify the potential miRNAs in the *C. intybus* and *C. endivia*, all the publicly available EST sequences of the plant were blasted against the previously known Plant miRNAs. Ultimately, four novel miRNAs belonging to four different families of miR166, miR156, miR162 and miR393 were identified. Also, a large number of genes, such as *TIRI*, *Squamusa* promoter binding proteins genes were identified as target genes of these miRNAs. Furthermore, the results of Real Time PCR showed that the transcriptional activities of miR156 in the leaf tissue of *C. endivia* are extremely high, not only than those observed for flower tissue of the same species, but also as compared with the leaf and flower tissues of the another species of *C. intybus*.

Keywords: Bioinformatics, chicory, EST, MicroRNAs, real time PCR

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

مقدمه

شامل *C. endivia* و *C. intybus* صورت گرفت. با انجام این کار، می توان به نقش تنظیمی احتمالی miRNAها در تنظیم بیان ژن های مسیرهای مختلف بیوسنتزی متابولیت ها متابولیت های اولیه و ثانویه پی برد. در ادامه، به نقش سینرژیستی یا آنتاگونیستی آنها با ژن های هدف پی برده خواهد شد که این امر خود می تواند در مهندسی مسیر بیوسنتزی انواع متابولیت ها و ترکیبات زیستی درون گیاهی کمک نماید.

مواد و روش ها

توالی های miRNA و EST

تعداد ۲۸۶۴۵ توالی miRNA بالغ شناخته شده در تمام گونه ها، به عنوان miRNAهای مرجع (reference) جهت پیش گویی miRNAهای حفاظت شده در دو گونه گیاهی کاسنی شامل *C. intybus* و *C. endivia* از بانک اطلاعاتی miRbase (<http://www.mirbase.org>) فروگذاری شد. تعداد ۸۴۱۴۴ توالی EST مربوط به این دو گونه نیز از بخش EST بانک اطلاعاتی NCBI (<http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>) با فرمت FASTA فروگذاری شد (Xie et al., 2007). نمونه های تکراری با استفاده از نرم افزار Excel 2013 و مرتب کردن آنها (sort) و سپس حذف توالی هایی که بیش از یک بار تکرار شده بودند، حذف شدند.

جستجوی همولوژی

جهت جستجوی همولوژی بین miRNAها و ESTهای این دو گونه، از الگوریتم BLASTn (BLAST2.2.21) در بانک اطلاعاتی NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) استفاده شد. پارامترهایی که جهت به دست آوردن توالی های کاندیدا miRNA در نظر گرفته شد، شامل میزان $e\text{-value} \geq 0.001$ حداکثر عدم جفت شدگی بین miRNA و EST = چهار بود (Xie et al., 2007).

Blastx

miRNAهای توالی های کدکننده پروتئینی نیستند؛ بنابراین توالی های کاندیدا miRNA که پروتئین کد

کاسنی گیاهی دارویی با نام علمی *Cichorium intybus* به معنی کاسنی وحشی است. نوع دیگر آن، کاسنی اهلی به نام آندیو (*Cichorium endivia*) یا کاسنی فرنگی است که به عنوان سالاد مصرف می شود (Chakraborty et al., 2016). اکثر قسمت های این گیاه دارای مقادیر زیادی ترکیبات شیمیایی دارویی مهم از جمله اینولین، آلکالوئیدها، سسکوئیترپن لاکتون ها، کومارین ها، ویتامین ها، رنگدانه های کلروفیلی، استرول های غیر اشباع، فلاوونوئیدها، ساپونین ها و تانین هاست (Srivastava et al., 2017).

سنتز متابولیت های گیاهی و به طور کلی تمام فرآیندهای سلولی، تحت کنترل سیستم ژنتیکی است که از جمله این روش ها می توان به کنترل بیان ژن توسط miRNAها اشاره کرد. miRNAها گروهی از RNAهای غیر کد کننده کوچک هستند که سبب کنترل بیان ژن پس از رونویسی از طریق سرکوب یا تخریب mRNA ژن های هدفشان می شوند (Reinhart et al., 2002). پس از کشف وجود miRNAها در آرآبیدوپسیس و اینکه این نوع RNAهای غیر کد کننده ممکن است ناشی از تکامل یوکاریوت ها باشند، تعداد miRNAهای شناسایی شده از طریق روش های آزمایشگاهی و مقایسه ای به صورت فزاینده ای در جانوران، گیاهان و حتی ویروس ها افزایش یافت (Mallory et al., 2006). روش های مقایسه ای ژنومیکی بر پایه حفاظت توالی، جهت شناسایی miRNA جدید استفاده می شوند و روش های بر پایه همولوژی، به شناسایی خانواده های miRNA بدون داشتن توالی های ژنومی کمک می کنند. زمانی که توالی های ژنومی در دسترس نباشد، می توان ESTها و GSSها را جهت شناسایی miRNAها به کار برد. ESTها توالی های cDNA جزئی از ژن های بیان شده ای هستند که درون یک پلاسمید کلون شده اند (Zhang et al., 2005).

به همین منظور، این تحقیق با هدف شناسایی miRNA و ژن های هدف آنها در دو گونه کاسنی

miRNAهای پیشگویی شده قرار می‌گیرد، از وب سایت psRNA Target (Plant Small RNA Target Analysis Server. 2017) استفاده شد. در این مرحله، miRNAهای پیشگویی شده به‌عنوان query در برابر ترانسکریپتوم AGI و TAIR استفاده شدند (Devi et al., 2016). پارامترهای این مرحله به‌صورت پیش فرض و توسط سرور اعمال شد که شامل حداکثر e-value برابر سه، تعداد جایگاه‌های هدف برابر دو، دامنهی عدم جفت شدگی مرکزی برای مهار رونویسی بین نه تا ۱۱، حداکثر عدم جفت شدگی در جایگاه جفت شدن بزرگتر یا مساوی چهار و نداشتن هیچگونه gap می‌باشند (Devi et al., 2016).

استخراج RNA، سنتز cDNA، انجام واکنش‌های

زنجیره‌ای حرارتی (PCR) و Real Time PCR
استخراج RNA با کیت استخراج بایوزول و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. جهت سنتز cDNA از سه نوع پرایمر شامل RT stem-loop، forward و reverse بر اساس توالی بالغ هر miRNA گزارش شده در سایت miRbase استفاده شد. پرایمرهای RT stem-loop و forward به‌صورت اختصاصی و پرایمر reverse به‌صورت عمومی برای تمامی miRNA طراحی شدند و طراحی پرایمر با استفاده از الگوریتم Primer-3 و Quest Primer صورت گرفت (Din et al., 2012). برای هر واکنش PCR حدود ۰/۸ میکرولیتر از پرایمرهای forward و reverse، ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس PCR و سه میکرولیتر cDNA اضافه شد. حجم نهایی واکنش، با آب مقطر به ۱۵ میکرولیتر رسانده شد و سپس واکنش با استفاده از دستورالعمل (Varkonyi-Gasic et al., 2007) انجام شد. جهت تعیین تمایز بیان miRNA بین اندام‌های مختلف، از واکنش‌های Real Time PCR استفاده شد؛ برای این منظور، از cDNAهای مربوط به دو اندام برگ و گل هر دو گونه استفاده شد. این مرحله با استفاده از کیت شرکت Solis BioDyne که از رنگ فلئورسنت Eva Green استفاده می‌کند انجام شد. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌های حرارتی و غلظت مواد، طبق دستورالعمل

می‌کنند، باید حذف شوند. برای این منظور، از الگوریتم BLASTx در بانک اطلاعاتی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) استفاده شد. در این مرحله، توالی‌های EST که به‌عنوان کاندیداهای miRNA غربال شده بودند، در برابر تمام توالی‌های کد کننده پروتئینی (Non-redundant protein Blastx (sequences (nr) (Zhou et al., 2008).

تعیین ساختار ثانویه پیشساز miRNA (pre-miRNA)

پیش‌بینی ساختار ثانویه pre-miRNA‌هایی با ساختار مناسب برای تبدیل شدن به miRNA، با استفاده از سرور MFOLD انجام شد (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>) انجام شد (Pérez-Quintero et al., 2012) و پارامترهای پیش‌فرض این سرور برای این مرحله مورد استفاده قرار گرفت. سپس توالی‌هایی که ساختار ثانویه‌ای با شرایط زیر داشتند به‌عنوان کاندیدا miRNA در نظر گرفته شدند:

حداکثر تعداد بازهای جفت نشده بین توالی miRNA و توالی پیش‌ساز آن بیشتر از چهار نوکلئوتید نباشد؛ داشتن MFEI منفی بالاتر از انواع دیگر RNA؛ داشتن حداقل انرژی آزاد folding پیش‌ساز miRNA؛ عدم وجود حلقه یا شکاف بزرگ در توالی miRNA بالغ و در نهایت این‌که توالی miRNA بالغ باید روی حلقه پیش‌ساز قرار گیرد (Zhang et al., 2006).

تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی

RNAهای کوچک (sRNAها) به‌صورت طبیعی در بین موجودات مختلف حفاظت شده هستند؛ از این رو می‌توان ارتولوگ‌های آن‌ها را از طریق آنالیزهای بیوانفورماتیکی کشف کرد. miRNAهای کاندید حاصل از مراحل قبل، جهت بررسی روابط تکاملی آن‌ها در برنامه MEGA7 بر اساس فاصله ژنتیکی مورد آنالیز قرار گرفتند و درخت فیلوژنتیکی آن‌ها ترسیم شد (Devi et al., 2016).

تعیین ژن‌های هدف miRNAهای پیشگویی شده

جهت تعیین ژن‌هایی که رونوشت آن‌ها، هدف

جدول ۱ و ۲ شان داده شده است. پس از فیلتر کردن توالی های جانوری و داده های تکراری، جهت حذف توالی های کد کننده پروتئینی Blastx در برابر تمام توالی های پروتئینی NCBI صورت گرفت (Devi et al., 2016). در مطالعه ای که به منظور آنالیز شبکه های تنظیم بیان ژن از طریق miRNA در گیاه *C. intybus* صورت گرفت، 91 miRNA کاندیدا متعلق به ۵۷ خانواده miRNA پیشگویی شد (Srivastava et al., 2017). پس از حذف داده های با خطای مثبت و منفی بالا، در نهایت ۲۸ خانواده miRNA باقی ماند. در این مطالعه، در مجموع پنج miRNA کاندیدا در گونه *C. intybus* (bdi-miR162, ath-miR393b-3p, bna-miR156a, gma-miR166h-3p و bdi-miR166e-3p) و دو miRNA کاندیدا در گونه *C. endivia* (ath-miR162a-5p و cme-miR156j) به دست آمد که همولوژی بالایی با miRNA های گیاهان عالی داشتند (Devi et al., 2016).

(Varkonyi-Gasic et al., 2007) اعمال شد. از آن جا که ژن رفرنس برای این miRNA ها وجود نداشت، یکی از بافت ها به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و بافت دیگر با آن مقایسه شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزارهای Rest و Excel 2013 انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی miRNA ها

طبیعت حفاظت شدگی در بین miRNA های بالغ، شناسایی آن ها را در گونه هایی که توالی ژنومی آن ها به طور کامل مشخص نیست به مقدار زیادی تسهیل می کند (Devi et al., 2016). در این مطالعه، روش های مقایسه ای جهت شناسایی miRNA های حفاظت شده دو گونه کاسنی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که در بین توالی های EST گونه *C. intybus*، سیزده توالی با شش توالی miRNA و از توالی های EST گونه *C. endivia* نیز یازده توالی با چهار miRNA دارای همولوژی هستند. نتایج این مرحله در

جدول ۱- نتایج جستجوی همولوژی بین EST های گونه *C. intybus* در برابر miRNA های بالغ سایر جانداران

Table 1. Identification of homology search of *C. intybus* C. EST against other organism miRNAs

miRNA	EST	Identity	AliLength	mismatch	q-start	q-end	s-start	s-end	e-value
ath-miR393b-3p	EH705516.1	100	19	0	1	19	133	151	2.00E-07
ath-miR393b-3p	EH708787.1	100	19	0	1	19	165	183	2.00E-07
ath-miR5021	EH690608.1	100	18	0	3	20	1	18	7.00E-07
bdi-miR162	EH697729.1	100	19	0	1	19	200	218	2.00E-07
bdi-miR162	EH705786.1	100	19	0	1	19	200	218	2.00E-07
bdi-miR162	EH705869.1	100	19	0	1	19	200	218	2.00E-07
bdi-miR166e-3p	EH673915.1	100	20	0	2	21	180	199	5.00E-08
bdi-miR166e-3p	EH692022.1	100	19	0	1	19	200	218	2.00E-07
bdi-miR166e-3p	EH704864.1	100	19	0	2	20	175	193	2.00E-07
bna-miR156a	EH683240.1	100	19	0	1	19	200	218	2.00E-07
crm-miR-2229b	FL682357.1	100	20	0	4	23	219	200	6.00E-08
gma-miR166h-3p	EH673915.1	100	19	0	3	21	180	198	2.00E-07
gma-miR166h-3p	EH692022.1	100	20	0	1	20	199	218	5.00E-08
gma-miR166h-3p	EH704864.1	100	19	0	3	21	175	193	2.00E-07
osa-miR5082	FL680337.1	100	19	0	2	20	222	204	2.00E-07
rno-miR-331-5p	FL674541.1	100	19	0	1	19	56	38	2.00E-07

(ath-miR393b-3p) بودند. miRNA های کاندیدا شناسایی شده در این تحقیق، با نتایج پیشگویی (Srivastava et al., 2017) مقایسه شدند که در این میان، سه miRNA شامل miR162، miR156 و miR393 مشترک بودند، اما miR166 به عنوان یک miRNA جدید در این مطالعه شناسایی شد.

توصیف miRNA های کاندیدا در کاسنی

در مجموع هفت توالی کاندیدا شناسایی شده متعلق به چهار خانواده miRNA بودند که اکثر خانواده ها دو عضوی (bdi-miR162, ath-miR162a-5p, bna-miR156a, cme-miR156j, gma-miR166h-3p و miR156a) و فقط یک خانواده یک عضوی (bdi-miR166e-3p)

miR156، miR166 و miR162 و miR393 قبلا در وحشی (Xie *et al.*, 2010) نیز شناسایی شده‌اند. گیاهانی مثل مرکبات (Song *et al.*, 2009) و ارزن

جدول ۲- نتایج جستجوی همولوژی بین ESTهای گونه *C. endivia* در برابر miRNAهای بالغ سایر جانداران.

Table 1. Identification of homology search of *C. endivia* C. EST against other organism miRNAs

miRNA	EST	Identity	AliLength	Mismatch	q-start	q-end	s-start	s-end	E-value
ath-miR162a-5p	EL355282.1	95.45	22	1	1	22	200	221	8.00E-07
ath-miR162a-5p	EL357851.1	95.45	22	1	1	22	200	221	8.00E-07
ath-miR162a-5p	EL364741.1	95.45	22	1	1	22	191	212	8.00E-07
ath-miR162a-5p	EL365237.1	95.45	22	1	1	22	200	221	8.00E-07
ath-miR162a-5p	EL366205.1	95.45	22	1	1	22	200	221	8.00E-07
ath-miR162a-5p	EL369343.1	95.45	22	1	1	22	180	201	8.00E-07
ath-miR162a-5p	EL369624.1	95.45	22	1	1	22	200	221	8.00E-07
bna-miR171g	EL347264.1	95.45	22	1	1	22	200	221	8.00E-07
cme-miR156j	EL345696.1	95.24	21	1	1	21	198	218	3.00E-06
han-miR3630-5p	EL346114.1	95.45	22	1	1	22	200	221	8.00E-07
sme-miR-754c-2-3p	EL361505.1	100	20	0	1	20	200	219	6.00E-08

گونه *C. intybus* و هشت توالی pre-miRNA مناسب برای گونه *C. endivia* ده وجود داشت. شکل ۱ و ۲، نتایج تعیین ساختار ثانویه در گونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد.

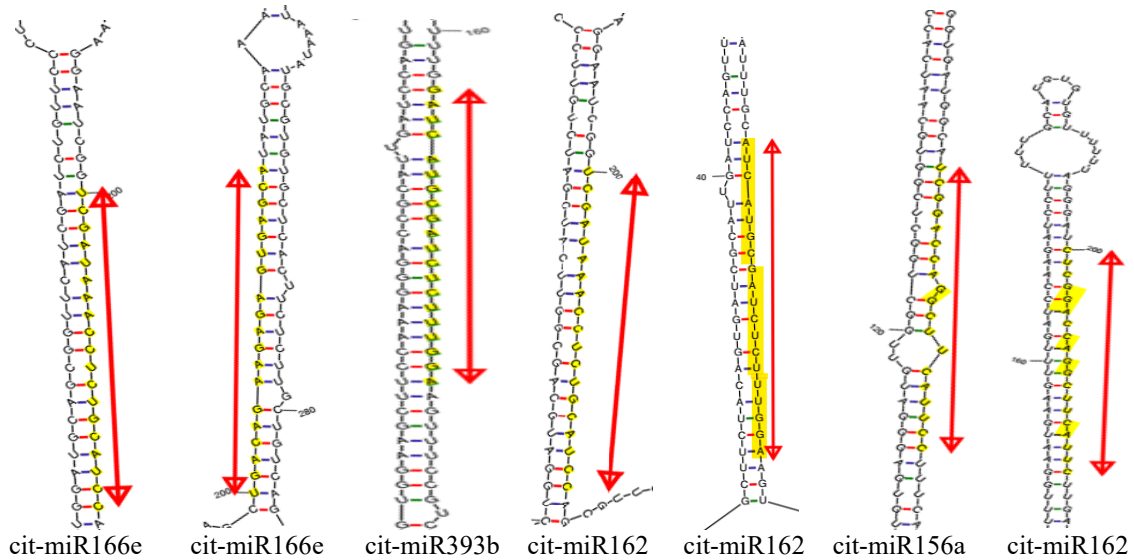
پیشگویی ژن‌های هدف miRNAهای شناسایی شده

مطالعات قبلی نشان می‌دهند که miRNAها، بیان ژن را از طریق جفت شدن کامل یا تقریباً کامل با ژن‌های هدفشان و تخریب یا سرکوب کردن آن‌ها انجام می‌دهند. miRNAهای گیاهی، درجه بالایی از جفت شدن با اهدافشان نشان می‌دهند که این امر، پیشگویی ژن‌های هدف آن‌ها را ممکن می‌سازد (Devi *et al.*, 2016). در این مطالعه، Transport Inhibitor Respons1 (TIR1) به‌عنوان هدف احتمالی miR393 ارائه شد که با نتایج (Devi *et al.*, 2016) روی گیاه گلرنگ زراعی مطابقت داشت. این پروتئین به‌عنوان یک فاکتور رونویسی در پاسخ به اکسین عمل می‌کند (Devi *et al.*, 2016). از جمله هدف‌هایی که برای miR156 یافت شد، یکی پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور *Squamusa* و دیگری خانواده‌ی پروتئین کیناز هستند. پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور *Squamusa* (SBP یا SPL)، خانواده‌ای از فاکتورهای رونویسی هستند که با دُمین (domain) اختصاصی متصل شونده به DNA مشخص می‌شود

طول miRNAهای بالغ کاسنی، بین ۲۴-۱۹ نوکلئوتید و به طور متوسط ۲۱/۳۷ می‌باشد که مشابه با miRNAهای گیاهانی است که قبلاً مطالعه شده‌اند (Xie *et al.*, 2010). حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE)، اهمیت بسیار بالایی در تشکیل ساختار ثانویه RNAها دارد و به‌طور کلی، هر چه این مقدار منفی‌تر باشد، پایداری آن ساختار بیشتر است (Xie *et al.*, 2010). این عدد برای گونه *C. intybus* از -۸۴ kcal/mol تا -۱۱۱/۷ kcal/mol متغیر بود و به‌طور متوسط -۱۰۲/۶۵ kcal/mol بود. همچنین در گونه *C. endivia*، این عدد از -۹۴/۵ kcal/mol تا -۱۱۷/۵ kcal/mol متغیر بود و به‌طور متوسط -۱۰۲/۴ kcal/mol بود. یک توالی پیشساز miRNA مناسب باید از پایداری بالایی نسبت به دیگر ساختارها برخوردار باشد. در این ساختار، تعداد عدم جفت شدگی بین توالی miRNA بالغ و miRNA* نباید از تعداد مشخصی زیادتر باشد و هر چه تعداد این عدم جفت شدگی کمتر باشد، آن ساختار از مطلوبیت بیشتری برای تبدیل شدن به یک miRNA بالغ برخوردار است. برای این منظور، از سرور MFOLD با پارامترهای پیشفرض جهت تعیین ساختار ثانویه pre-miRNA، حداقل انرژی آزاد folding، تعیین تعداد عدم جفت شدگی و ... استفاده شد. نتایج این مرحله نشان داد که هفت توالی pre-miRNA مناسب برای

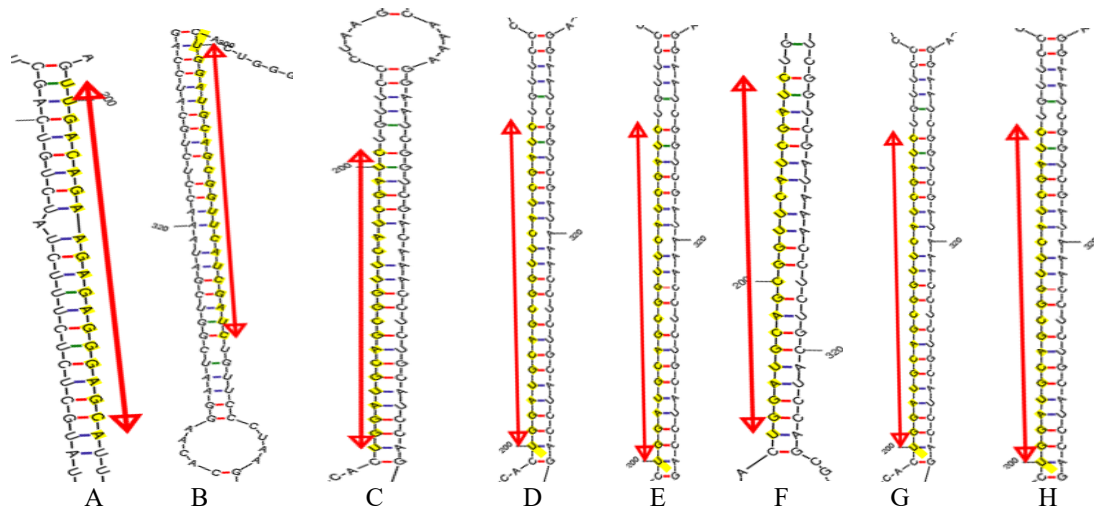
6miR16 می توان به ژن های کدکننده پروتئین های متصل شونده به RNA و پروتئین های HD-ZIP که در اتصال به DNA و لیپید نقش دارند اشاره کرد. سایر نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.

(Chain et al.,2015). از مهم ترین ژن های هدف برای mir162 می توان به ژن های کدکننده پروتئین شبه دایسر یک (DCL1)، سیترات پروتئینازها و ATP سیترات لیازها و از مهم ترین ژن های هدف برای



شکل ۱- ساختار ثانویه ساقه-حلقه در pre-miRNAها کاندیدا در گونه *C. intybus*. نواحی مشخص شده، دربردارنده توالی بالغ miRNA هستند که با اسفاده از سرور MFOLD به دست آمدند.

Figure 1. Predicted stem-loop hairpin secondary structures of the newly potential miRNAs identified in *C. intybus* that are generated by MFOLD. The mature miRNAs located in the secondary stem loop hairpin structure are highlighted in red color.



شکل ۲- ساختار ثانویه ساقه-حلقه در pre-miRNAها کاندیدا در گونه *C. endivia*. با استفاده از سرور MFOLD. نواحی مشخص شده، دربردارنده توالی بالغ miRNA هستند. از A تا F و همچنین H، مربوط به cen-miR162a و G مربوط به cen-miR156j می باشند.

Figure 2. Predicted stem-loop hairpin secondary structures of the newly potential miRNAs identified in *C. endivia* that are generated by MFOLD. The mature miRNAs located in the secondary stem loop hairpin structure are highlighted in red color. Secondary structures of A to F and H belong to miR162a, while G belongs to cen-miR156j.

جدول ۳- ژن‌های هدف miRNAهای جدید حاصل از ESTهای کاسنی، TAIR و AGI

Table 3. Targets of the newly predicted miRNAs from coffee EST sequences, TAIR and AGI

miRNA	Target protein	Target ID	GO annotation	
			Biological function	Molecular function
mir162	Methyltransferase dependent on S-adenosyl L-methionine	AT5G2618.1	rRNA methylation	methyltransferase RNA
	RING-H2 group F2A	AT5G2000.1	Cell cycle regulation ...	Iron binding
	Cysteine proteinase	AT1G10570.2	protein desumoylation ...	endopeptidase SUMO specific protease,
	peroxidase	AT2G18140.1	hydrogen peroxide catabolism	peroxidation metal ion binding
	ATP citrate lyase	AT1G10670.3	coA biosynthesis ...	ATP citrate synthase
	DCL1	TC400535	gene silencing, RNA processing	Ribonuclease III
miR156	Squamosa promoter binding proteins	AT2G33810.1	increase of transcription, Leaf formation	binding transcription factor, DNA
	Protein kinase	AT3G28690.1		Serine / threonine kinase activity
miR166	proteins HD-ZIP	TC392453		DNA and lipid binding
	RNA binding glycine rich proteins	TC370088		RNA binding
	transcription factors homeodomain	TC359261	Cell differentiation ...	DNA and lipid binding, transcription factor
	AP2/B3 transcription factors	AT1G49475.1	Transcription regulation	DNA binding
	MSL5	AT3G14810.1	Ionic channel	Anion transport
	basic leucine zipper transcription factor	AT2G36270.1	B transcription factor	Positive transcription regulation
	RNA-binding (RRM/RBD/RNP) motifs proteins	AT5G19960.1	mRNA binding	polyadenylation mRNA
Phosphatidylinositol 3,4 kinase	AT1G49340.2	Phosphatidylinositol phosphorylation	kinase	
miR393b	lektine kinase 3 receptor	TC362950	Defensive response	Serine / threonine kinase activity
	Tyrosine phosphatase	TC361553	Peptidyl tyrosine dephosphorylation	Protein Tyrosine / Serine / Threonine Phosphatase
	Protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1)	TC361747	auxin signaling pathway	Auxin binding, auxin receptor

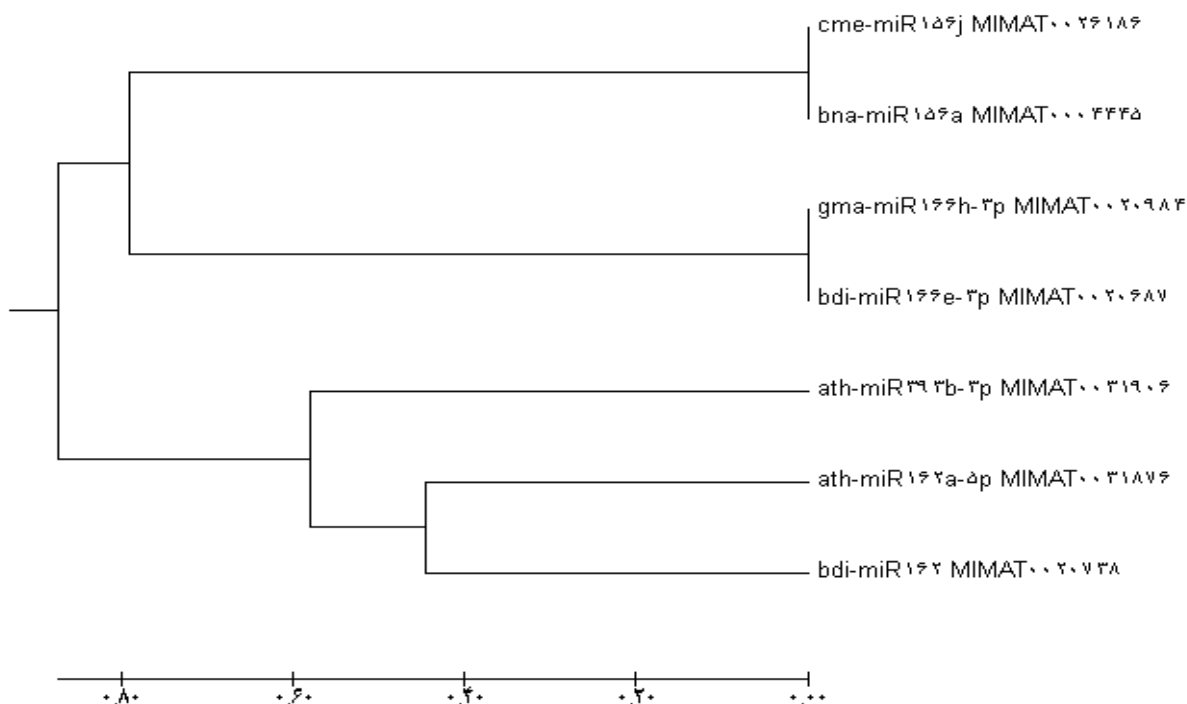
بررسی روابط فیلوژنتیکی

جهت بررسی روابط تکاملی بین خانواده‌های miRNA این دو گونه، از نرم‌افزار MEGA7 براساس الگوریتم UPGMA استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی (شکل ۳) نشان داد که این miRNAها بر اساس روابط تکاملی و حفاظت شدگی توالی، در سه گروه متفاوت قرار می‌گیرند؛ گروه اول شامل miR156a و miR156j، گروه دوم شامل miR166e و miR166h و گروه سوم شامل miR162، miR162a و miR393b بودند. در این بین، بیشترین شباهت (کمترین فاصله) بین miR156a و miR156j و همچنین بین miR166e و miR166h مشاهده شد که نزدیک به ۱۰۰ درصد همولوژی داشتند. علت این امر آن است که هر کدام از این دو گروه، به یک خانواده miRNA تعلق دارند و هر خانواده نیز از حفاظت شدگی بالایی در بین اعضا خود برخوردار است. در گروه سوم که شامل miR162

miR162a و miR393b هستند، فاصله‌ی ژنتیکی زیادی مشاهده می‌شود، به طوری که بین دو miR162 و miR162a حدود ۴۳٪ تفاوت توالی و همچنین بین این دو miRNA و miR393b حدود ۵۸٪ تفاوت توالی وجود دارد. در نهایت، بین دو گروه اول و گروه سوم، حدود ۹۰٪ فاصله مشاهده شد.

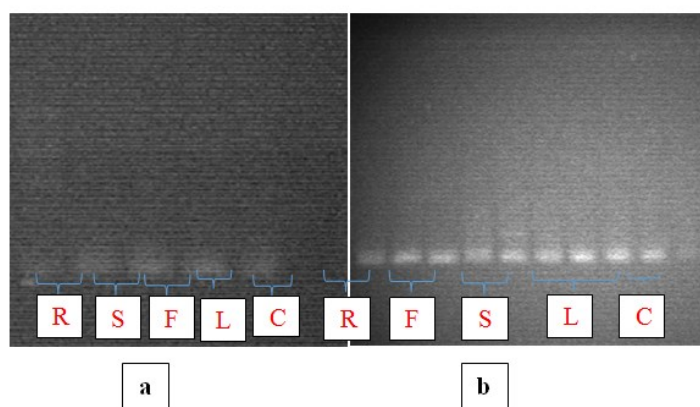
نتایج سنتز cDNA و تکثیر miRNAها

پس از سنتز cDNA، جهت اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها و همچنین تکثیر miRNAها، از واکنش‌های PCR استفاده شد و تمامی چهار miRNA مربوط به دو گونه تکثیر شدند. نتایج تکثیر دو miR156 و miR166 در شکل ۴ نشان داده شده است. در شکل ۴، ریشه با R (Root)، ساقه با S (Stem)، گل با F (Flower)، برگ با L (Leaf) و کنترل با C نشان داده شده است.



شکل ۳- نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی pre-miRNAهای جدید پیشگویی شده دو گونه کاسنی

Figure 3. Phylogenetic analysis of the newly predicted pre-miRNA sequences of two chicory species



شکل ۴- شناسایی miRNAها در هر دو گونه *C. intybus* و *C. endivia*. a: miR156 و b: miR166

Figure 4. Detection of miRNA with conventional PCR. a: miR156, b: miR166

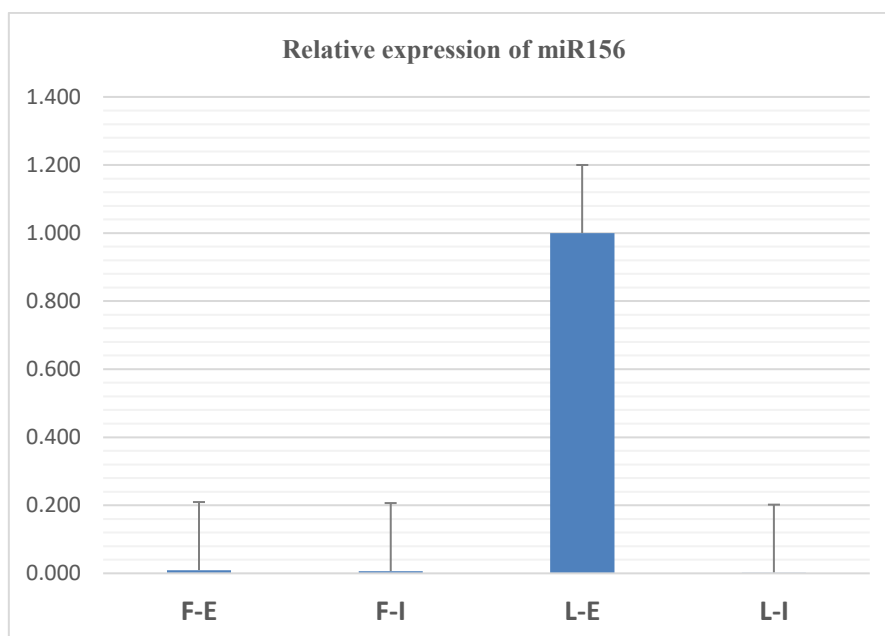
شدند، ولی به دلیل عدم توانایی در optimize کردن آنها، وارد آنالیزها نشدند. از عواملی که ممکن است علت عدم تکثیر دیگر miRNAها باشد این است که فقط از دو اندام گل و برگ برای انجام آزمایش استفاده شد (Xie *et al.*, 2007). نتایج آنالیز Real Time PCR برای miR156 و اندازه‌گیری خطای استاندارد تیمارهای مختلف توسط نرم‌افزار Excel 2013 نشان داد که این miRNA در برگ گونه *C. endivia*

نتایج Real Time PCR

جهت بررسی تفاوت بیان miRNAهای در اندام‌های مختلف، از Real Time PCR استفاده شد و برای این منظور، بافت گل و برگ هر دو گونه جهت بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که از تمام miRNAهای بررسی شده، فقط miR156 در هر دو گونه تکثیر می‌شود؛ سایر miRNAها اگر چه تکثیر

شده است. نکته قابل توجه در این تحقیق آن است که بیان ژن‌های هدف، مورد آزمون قرار نگرفت و بنابراین نمی‌توان تنها بر مبنای میزان بیان miRNA‌های آزمون شده قضاوت نمود.

بیشترین میزان بیان را داشت، در حالی که در سه بافت دیگر (برگ و گل گونه *C. intybus* و گل گونه *C. endivia*) تفاوت معناداری از نظر میزان بیان نسبی وجود نداشت. این نتایج در شکل ۵ نشان داده



شکل ۵- بیان نسبی miR156 در دو گونه کاسنی *C. endivia* و *C. intybus*: F-I: گل *C. intybus*، L-I: برگ *C. intybus*، F-E: گل *C. endivia* و L-E: برگ *C. endivia*

Figure 5. Relative expression of miR156 in *C. endivia* and *C. intybus*. F-I: *C. intybus* flower; L-I: *C. intybus* leaf; F-E: *C. endivia* flower; L-E: *C. endivia* leaf.

۱۹ ژن هدف برای آنها شد. اکثر ژن‌های هدف پیشگویی شده، ژن‌های دخیل در پاسخ به اکسین، ژن‌های کد کننده پروتئین شبه دایسر یک (DCL1)، سیترات پروتئینازها و ATP سیترات لیازها و ژن‌های کدکننده پروتئین‌های متصل شونده به RNA و پروتئین‌های HD-ZIP دخیل در انصال به DNA و لیپید، را شامل شدند.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق، از یک مجموعه ابزارهای بیوانفورماتیکی و روش‌های آزمایشگاهی برای شناسایی miRNAها و ژن‌های هدف آنها در دو گونه گیاهی کاسنی شامل *C. endivia* و *C. intybus* که از منابع مهم متابولیت‌های مهمی چون اینولین هستند استفاده شد که منجر به شناسایی چهار miRNA و پیشگویی

REFERENCES

- Din, M., Barozai, M. Y. K. & Baloch, I. A. (2014). Identification and functional analysis of new conserved microRNAs and their targets in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Turkish Journal of Botany*, 38(6), 1199-1213.
- Devi, K. J., Chakraborty, S., Deb, B. & Rajwanshi, R. (2016). Computational identification and functional annotation of microRNAs and their targets from expressed sequence tags (ESTs) and genome survey sequences (GSSs) of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Gene*, 6, 30-42.
- Das, S., Vasudeva, N. & Sharma, S. (2016). *C. intybus*: A concise report on its ethnomedicinal, botanical, and phytopharmacological aspects. *Drug Development and Therapeutics*, 7(1), 1.
- De Paola, D., Cattonaro, F., Pignone, D. & Sonnante, G. (2012). The miRNAome of globe artichoke: conserved and novel micro RNAs and target analysis. *BMC Genomics*, 13(1), 41.

5. Pérez-Quintero, Á. L., Sablok, G., Tatarinova, T. V., Conesa, A., Kuo, J. & López, C. (2012). Mining of miRNAs and potential targets from gene oriented clusters of transcripts sequences of the anti-malarial plant, *Artemisia annua*. *Biotechnology Letters*, 34(4), 737-745.
6. Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B. & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, 16(13), 1616-1626.
7. Song, C., Fang, J., Li, X., Liu, H. & Chao, C. T. (2009). Identification and characterization of 27 conserved microRNAs in citrus. *Planta*, 230(4), 671-685.
8. Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F. & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(1), 12.
9. Xie, F. L., Huang, S. Q., Guo, K., Xiang, A. L., Zhu, Y. Y., Nie, L. & Yang, Z. M. (2007). Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *Febs Letters*, 581(7), 1464-1474.
10. Zhang, B., Pan, X. & Anderson, T. A. (2006). Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS Letters*, 580(15), 3753-3762.
11. Zhou, Z. S., Wang, S. J. & Yang, Z. M. (2008). Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere*, 70(8), 1500-1509.