DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

شناسایی miRNAهای پاسخ‌دهنده به تنش گرما در عدس و ژن‌های هدف آنها

سیده زهرا حسینی[۱]، احمد اسماعیلی[۱*]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۱]، حسین فلاحی[۲] و عبدالحسین رضایی‌نژاد[۳]

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

[۲] ایران، کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

[۳] ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۰۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۸

چکیده

کاهش عملکرد محصولات کشاورزی در اثر گرم شدن کره زمین، امنیت غذایی را تهدید می‌کند. واکنش گیاهان به تنش گرمایی یک فرآیند پیچیده است. miRNAها با ایجاد تغییرات پس از نسخه‌برداری به‌ویژه در فاکتورهای نسخه‌برداری، نقش مهمی را در پاسخ به تنش‌ها بازی می‌کنند. نقش miRNAها در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاه عدس به عنوان یکی از مهمترین لگوم‌ها تا کنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این مطالعه، به‌منظور شناسایی miRNAهای حفاظت شده و ژن‌های هدف آنها در عدس، RNA کل بافت برگ با استفاده از محلول ترایزول استخراج و توالی‌یابی شد. سپس توالی ترانسکریپت‌هایی که هیچ پروتئینی را کد نمی‌کردند به‌منظور شناسایی توالی‌های پیش‌ساز miRNA مورد بررسی قرارگرفتند. در مجموع هفت miRNAی حفاظت شده متعلق به ۶ خانواده‌ی miR408، miR166، miR167، miR169، miR172 و miR156 شناسایی شدند که از بین آنها miR408، miR166d و miR169d در پاسخ به تنش گرما کاهش و miR156b-3p افزایش بیان یافتند. نتایج مطالعه‌ی ترانسکریپت‌های هدف این miRNAها نشان داد که اغلب این miRNAها، بیان فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در پاسخ به تنش گرما مانند HSF، NF-Y، ARR-B، WRKY، MYB، AP_2 و C_3H را تنظیم می‌کنند. نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌تواند به درک بهتر تنظیم شبکه‌ی بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش گرما کمک کند.

واژه‌های کلیدی: بیان افتراقی، miRNA، تنش گرما، عدس، miRBase

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

مقدمه

با گرم شدن کره‌ی زمین، تنش گرما به یک چالش مهم برای امنیت غذایی در آینده تبدیل شده است. تنش گرما بر روی فتوسنتز، تقسیم سلولی و محتوای آب گیاه تاثیر می‌گذارد (۲۰) و با ایجاد اختلال در عملکرد مولکولی، فیزیولوژیکی و آناتومی، سبب کاهش عملکرد محصول گیاهان می‌شود (۱۸).

حبوبات بعد از غلات دارای بالاترین ارزش غذایی برای انسان و دام هستند که به‌طور گسترده در مناطق گرمسیری خشک و نیمه‌خشک و عمدتا به‌صورت دیم در سراسر جهان کشت می‌شوند (۱۴). عدس یکی از گیاهانی است که به مقدار زیادی در تغذیه‌ی انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴) و با داشتن بیش از ۲۰ درصد پروتئین، ارزش غذایی بالایی دارد و به دلیل تثبیت نیتروژن و کنترل علف‌های هرز و عوامل بیماری‌زا، گیاهی مناسب برای قرار گرفتن در تناوب کشت با سایر گیاهان زراعی است (۱۵). عدس بعد از نخود بیشترین سطح زیر کشت حبوبات را در ایران دارا است (۲).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

miRNAها RNAهایی با طول ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید هستند که پروتئینی را کد نمی‌کنند و با اتصال به توالی مکمل خود که در نواحی تنظیمی ژن‌ها قرار دارند در بسیاری از فرآیندهای زیستی مانند تکثیر، تمایز و مرگ سلولی نقش دارند (۱). miRNA ها به همراه isomiRها و small RNAها نقش مهمی در تنظیم بیان پس از نسخه‌برداری در فرآیندهای سلولی از جمله نمو و پاسخ به تنش‌ها دارند. با استفاده از روش‌های جدید، miRNAهای متعددی شناسایی شده‌اند که در پاسخ گیاهان به تنش‌ها نقش دارند (۶). شواهد نشان می‌دهد که RNAهای کوچک به همراه فاکتورهای نسخه‌برداری به ویژه HSFها (heat shock transcription factor) و تنظیمات اپی‌ژنتیک در پاسخ‌های گیاهان به گرما در سطح نسخه‌برداری دخیل هستند. miR398 یکی از مولکول‌ها شناسایی شده در پاسخ به تنش گرما است که تولید نوعی از آنزیم‌های هضم کننده‌ی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را سرکوب می‌کند (۲۰). miR156 از دیگر miRNAهای دخیل در پاسخ به تنش گرما است که فاکتورهای نسخه‌برداری Squamosa promoter-binding-like را سرکوب می‌کند (۲۰). بعضی از اعضای خانواده‌ی miR156 که بیان ژن‌های SPL را کنترل می‌کنند بر روی رشد و نمو و پاسخ به تنش‌ها نقش دارند. افزایش بیان miR156 در یونجه (*Medicago sativa*) سبب کاهش بیان SPL13 و افزایش تحمل به دمای۴۰°C شد (۱۸). miR173 در تحمل به تنش گرما در آرابیدوپسیس دخیل است (۹). مطالعات نشان داده است که تنش‌های غیرزنده سبب تغییر در میزان بیان تعداد زیادی از miRNA می‌شوند. بنابراین ممکن است miRNAها اهداف جدیدی برای بهبود تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی از طریق دست‌کاری ژنتیکی باشند. در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، miRNAها از طریق مکمل شدن با توالی هدف، کنترل مسیرهای انتقال پیام و کنترل توسعه‌ی ریشه عمل می‌کنند. به طور کلی، miRNAهای القاء شونده توسط تنش موجب کاهش بیان تنظیم کننده‌های منفی تحمل تنش می‌شوند، در حالی که miRNA های مهار شده توسط تنش سبب تجمع و فعالیت تنظیم کننده های مثبت می‌شوند. اخیرا مطالعات زیادی با هدف شناسایی miRNAهایی که به تنش‌های مختلف پاسخ می‌دهند انجام شده است. برخی از این مطالعات با استفاده از نسل جدید توالی‌یابی انجام شده است (۲۵). گسترش فن‌آوری‌های توالی‌یابی جدید در چند سال اخیر امکان شناسایی و تعیین میزان بیان تعداد زیادی از گروه‌های RNAی کوچک که در تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی از جمله پاسخ به تنش دخیل هستند را امکان‌پذیر کرده است و وجود تنظیمات زیادی در مرحله بعد از نسخه‌برداری را آشکار کرده است(۱۱). هدف از این مطالعه شناسایی miRNAهای حفاظت شده و ژن‌های هدف آنها در گیاه عدس و مطالعه‌ی پاسخ این miRNAها به تنش گرما با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی نسل جدید است.

مواد و روشها

اعمال تیمار تنش: این تحقیق در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. بذر عدس رقم گچساران در گلدان‌های پر شده با شن، پیت و ورمیکولیت (با نسبت‌های مساوی) کشت شدند و در گلخانه‌ای با دمای ۲۵°C، رطوبت نسبی حدود ۵۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. از محلول غذایی نیم‌هوگلند برای آبیاری و تغذیه‌ی گیاهچه‌ها استفاده شد. به منظور اعمال تنش گرما، ۲۱ روز بعد از جوانه زدن بذرها، نیمی از گلدان‌ها به فضای رشد دیگری با شرایط مشابه قبل ولی با دمای ۴۰°C منتقل شد و بقیه‌ی گلدن‌های حاوی گیاهان شاهد همچنان در دمای ۲۵°C نگهداری شدند. بعد از گذشت ۴ ساعت از شروع اعمال تنش برگ‌های کاملا گسترش یافته از هر دو گروه شاهد و تیمار گرما جمع‌آوری و فورا در ازت مایع قرار داده شد و به منظور استفاده در آنالیزهای بعدی به دمای ۸۰°C- منتقل شد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

جداسازی RNA کل و توالی‌یابی ترانسکریپتوم: RNA کل با استفاده از محلول Trizol (Invitrogen, CA, USA) مطابق با روش شرکت سازنده، استخراج شد. RNA کل از مخلوطی از برگ‌های هفت گیاه برای هر یک از تیمارها (در دو تکرار) استخراج شد. کیفیت و خلوص نمونه‌های RNA با تعیین نسبت جذب در طول موج 260nm/280nm و 260nm/230nm با استفاده از پیکودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. RNA کل به منظور تعیین درجه‌ی پیوستگی RNA (RIN) با استفاده از Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) آنالیز شد. نمونه‌های RNA کل دارای RIN بالاتر از ۷ برای توالی‌یابی استفاده شدند. کتابخانه‌های توالی‌یابی ترانسکریپتوم مطابق پروتوکل Illumina RNA-Seq ساخته شد و با استفاده از پلاتفورم Illumina HiSeq 2500 (Novogene, China) توالی‌یابی شدند و خوانش‌های دوطرفه‌ای با طول ۱۵۰ جفت باز به دست آمد.

اسمبلی نوپدید خوانش‌ها: بعد از بررسی کیفیت خوانش‌ها (حدود ۴۰ میلیون خوانش برای هر نمونه) با استفاده از نرم‌افزار FastQC، خوانش‌های با کیفیت مربوط به تمام نمونه‌ها با استفاده از برنامه‌ی Trinity با تنظیمات پیش‌فرض، سرهم‌بندی شد (۱۰). از بین کانتگ‌های به دست آمده، کانتیگ‌های اضافی (کانتیگ‌هایی که بیش از ۹۵ درصد به هم شباهت دارند) با استفاده از نرم‌افزار CD-HIT-EST (http://weizhong-lab.ucsd. Edu/cd-hit/) حذف شدند تا از بین کانتیگ‌های مشابه تنها یک کانتیگ منحصر به فرد باقی بماند.

شناسایی miRNAهای حفاظت شده و پیش‌بینی ساختار دوم آنها: مجموعه‌ی کانتیگ‌های به‌دست آمده به‌عنوان منبعی برای شناسایی miRNAها محافظت‌شده مورد استفاده قرار گرفت. توالی‌های miRNAهای گیاهی ثبت شده از پایگاه mirbase به آدرس http://www.mirbase.org دانلود شد. به‌منظور حذف توالی‌های تکراری miRNAها از نرم‌افزار CD-HIT-EST (v4.6.8) استفاده شد (۱۶). برای شناسایی کانتیگ‌هایی که بیشترین شباهت را با توالی‌های miRNAی بالغ دارند از ابزار Blastn با پارامترهای E-value ≤ 10، mismatch < 4 و آستانه طول miRNAهای بالقوه بین ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید استفاده شد و توالی miRNAهای گیاهی ثبت شده‌ی غیرتکراری برعلیه توالی کانتیگ‌ها به‌عنوان پایگاه داده مورد جستجو قرار گرفت. سپس توالی کانتیگ‌هایی که با توالی miRNAهای بالغ شباهت داشتند علیه پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری (Non-Redundant proteins, NR) با استفاده از ابزار Blastx با E-value ≤ 0.001 جستجو شده و کانتیگ‌های دارای انطباق با توالی‌های پروتئینی این پایگاه داده حذف شدند.

برای اطمینان از اینکه توالی miRNA بالغ در ساختار ثانویه‌ی RNA در مکان مناسبی قرار گرفته و این توالی به واقع به یک پیش‌ساز miRNA تعلق دارد، نحوه تاخوردگی و میزان انرژی آزاد ساختار miRNA شناسایی شده بر روی کانتیگ‌ها مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزار Bedtools بخشی از توالی کانتیگ کاندید شامل توالی miRNAهای بالغ به همراه ۱۰۰ نوکلئوتید در بالادست و پایین‌دست آن جدا شد (۲۲) و ساختار آن از طریق وب سرور mfold به آدرس http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form با پارامترهای پیش فرض مورد بررسی قرار گرفت. بعد از بررسی ساختار ثانویه، توالی‌هایی که دارای ساختار ثانویه‌ی مناسب در محدوده‌ی توالی miRNA بالغ بودند انتخاب و بخشی از توالی آنها که احتمالا مربوط به ساختار پیش‌ساز miRNA بود برش داده شد و تاخوردگی و میزان انرژی آزاد آنها دوباره مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت GC/AU تعیین شد و پارامترهای حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy, MFE)، پارامترهای حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده (Adjusted minimal free energy, AMFE) و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

(Minimal free energy index, MFEI) با استفاده از فرمول‌های مربوطه محاسبه شدند (۲۱ و ۲۴).

در نهایت miRNAهای دارای ساختار ثانویه‌ی مناسب ساقه و حلقه‌ی بدون شکستگی در حلقه که توالی miRNA بالغ در یکی از بازوهای ناحیه ساقه آن قرار داشت با محتوای ۳۰ تا ۷۰ درصدی AU ؛ با حداکثر ۶ جفت نوکلئوتید غیر منطبق؛ با حداکثر اندازه گپ ۳ نوکلئوتید و حداقل انرژی آزاد بیشتر از۸۵ کیلوکالری بر مول ($kcal.mol^{-1}$) بودند به عنوان miRNAهای با پتانسیل بالا انتخاب شدند (۱۹).

شناسایی ژن‌های هدف miRNAهای شناسایی شده: برای تعیین ژن‌های هدف miRNAهای کاندید از psRNATarget (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget) استفاده شد (۷). توالی miRNAهایی که براساس پارامترهای بالا انتخاب شدند بر علیه تمام کانتیگ‌های به دست آمده از سرهم‌بندی نوپدید مورد تحلیل قرار گرفت.

به‌منظور مستندسازی و تفسیر کارکرد (Functional annotation) ژن‌های هدف miRNAها، از ابزار BLASTX نرم‌افزار NCBI Blast (v2.6.0) استفاده شد (۵). ترانسکریپت‌های هدف در مقابل پایگاه‌های داده‌های پروتئینی غیرتکراری NR (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db) و داده‌های پروتئینی عوامل رونویسی گیاهی با در نظر گرفتن حد آستانه معادل E-value ≤ 1.0 E^{-5} مورد BlastX قرار گرفت.

آنالیز بیان افتراقی: به‌منظور تعیین miRNAها و ترانسکریپت‌های هدف که در پاسخ به تنش گرما دچار تغییر بیان شده‌اند، خوانش‌های مربوط به تیمار تنش و شاهد (حدود ۴۰ میلیون خوانش برای هر تکرار در هر تیمار) به‌طور جداگانه با استفاده از نرم‌افزار Bowtie2 با کانتیگ‌های مربوط به miRNAها و ترانسکریپت‌های هدف نقشه‌یابی شدند و ترانسکریپت‌های دارای بیان افتراقی با استفاده از برنامه‌ی edgeR (R package) شناسایی شدند. ترانسکریپت‌هایی که دارای تفاوت بیان معنی‌داری با FDR (false discovery rate) values<۰/۰۵ و log_2Fold Chang ≥ |1| در پاسخ به تنش گرما نسبت به شاهد بودند تعیین شدند.

نتایج و بحث

از سرهم‌بندی خوانش‌های با کیفیت، تعداد ۶۵۵۷۳ کانتیگ بدست آمد. میانگین طول کانتیگ‌ها ۱۰۰۸/۲ و شاخص N50 آن ۱۴۰۲ جفت باز بود. map کردن خوانش‌ها به اسمبلی نشان داد که ۸۳/۲۶ درصد از کل خوانش‌های با کیفیت به صورت اختصاصی به کانتیگ‌های اسمبلی چسبیدند.

شناسایی miRNAهای حفاظت شده: در نتیجه‌ی انطباق miRNAهای حفاظت شده‌ی گیاهی بر علیه ترانسکریپتوم نوپدید، ۵۷۴۳ ترانسکریپت به‌صورت اختصاصی با miRNAهای گیاهی مطابقت داشتند. بعد از حذف ترانسکریپت‌های کدکننده‌ی پروتئین، در نهایت تعداد ۲۹۰۹ ترانسکریپت که در این پایگاه داده‌های رکوردی دریافت نکردند برای شناسایی miRNAها مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند.

توالی‌یابی RNA یک روش جدید برای مطالعه‌ی بیان ژن است که حجم زیادی از داده را تولید می‌کند و از آن در مطالعه‌ی بیان ژن در گیاهان و از جمله حبوبات استفاده شده است (۳). از این روش به‌منظور شناسایی miRNAها استفاده شده است (۱۳، ۱۷). در مطالعه‌ی حاضر، ۷ مورد از miRNAهای حفاظت شده در گیاهان در ترانسکریپتوم عدس شناسایی شد که شامل miR408، miR166d، miR167c-3p، miR169d، miR172، miR156b-3p و miR156f بود (جدول ۱، شکل ۱).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

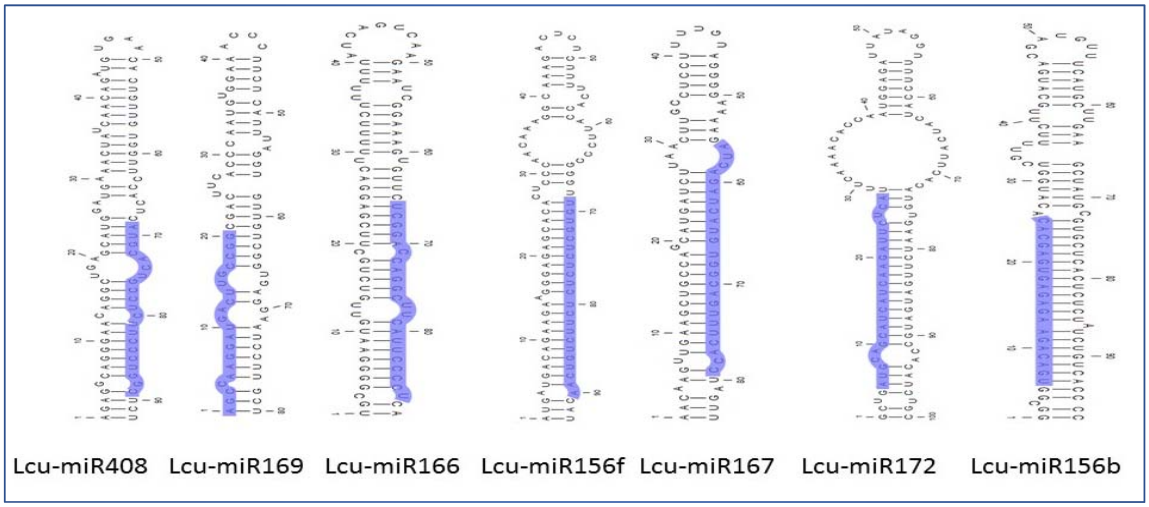
جدول ۱- ویژگی‌های miRNAهای شناسایی شده در عدس

نام miRNA بالغ	نام ترانسکریپت	مختصات توالی miRNA بالغ بر روی ترانسکریپت	تعداد نوکلئوتیدهای غیر منطبق	ارزش مورد انتظار	مختصات توالی miRNA بالغ روی پیش‌ساز میرنا	طول توالی پیش ساز miRNA	توالی miRNA بالغ 5'-3'	درصد AU پیش‌ساز miRNA	درصد GC پیش‌ساز miRNA	MFE (kcal/mol)	AMFE	MFEI
lcu-miR408	contig_19727	205..225	0	0.00001	100..120	92	AUGCACUGCCUCUUCCCUGGC	0.49	0.51	51.5	55.978	1.096
lcu-miR166d	contig_21077	372..393	0	0.000003	100..121	89	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCCU	0.54	0.46	39.7	44.607	0.968
lcu-miR167c-3p	contig_21194	194..217	1	0.00002	100..123	84	AUCAGAUCAUGUGGCAGCUUCACC	0.57	0.43	39.9	47.5	1.108
lcu-miR169d	contig_27005	90..111	0	0.00005	89..110	80	UGAGCCAAGGAUGACUUGCCGGU	0.49	0. 51	35.7	44.625	0.87
lcu-miR172	contig_30413	890..912	0	0.000001	100..122	100	UGAGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU	0.61	0.39	38.1	38.1	0.97
lcu-miR156b-3p	contig_30578	249..270	0	0.000003	100..121	97	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	0.49	0.51	60	61.85	1.22
lcu-miR156f	contig_31094	387..408	0	0.000003	100..121	93	UUGACAGAAGAGAGAGAGCACA	0.53	0.47	43.6	46.88	0.99

MFE: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی؛ AMFE: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده؛ MFEI: شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

در بین آنها miR408، miR166d و miR169d کاهش بیان و miR156b-3p افزایش بیان داشتند (جدول ۲) ولی ۳ مورد دیگر تغییر بیانی را نشان ندادند. استفاده از این روش برای شناسایی miRNAهایی که بیان آنها در پاسخ به تنش گرما در گندم دوروم دچار تغییر می‌شود سبب شناسایی ۱۲ و ۲۵ مورد miRNA به ترتیب در دو رقم Cappelli و Ofanto شد (۸). بیشتر miRNAهای پاسخ‌دهنده به گرما در رقم Ofanto دچار کاهش بیان شدند. miR159 یکی از شناخته‌شده‌ترین miRNAهای پاسخ‌دهنده به گرما است (۸) و در مطالعه‌ی حاضر miR156b-3p که یکی از اعضای این خانواده است در پاسخ به تنش گرما افزایش بیان یافت. نتایج مربوط به شناسایی ترانسکریپت‌های هدف نشان داد که سه ژن Squamosa promoter-binding-like (SPL) شامل هومولوگ ژن *Mt*SPL13 ، *At*SPL4 و *At*SPL6 از ترانسکریپت‌های هدف miR156b-3p هستند. افزایش بیان miR156 در یونجه (*M. sativa*) سبب کاهش بیان SPL13 و در نتیجه افزایش تحمل به دمای۴۰°C شد. در اثر افزایش بیان miR156 در این گیاه سطح آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله آنتوسیانین‌ها افزایش بیان پیدا کردند (۱۸). در نتایج مطالعه‌ی حاضر تغییری در میزان بیان ژن‌های هدف مشاهده نشد که این می‌تواند به این دلیل باشد که چون سرکوب SPL و در نتیجه‌ی آن بیان ژن‌های القاء شونده توسط گرما بعد از پایان تنش و در مرحله‌ی بازیابی گزارش شده است (۲۰) و با توجه به اینکه نمونه‌برداری از گیاهان در مطالعه‌ی حاضر در انتهای زمان اعمال تیمار گرمایی صورت گرفته است (و نه بعد از زمان بازیابی)، از این رو تغییری در فراوانی ترانسکریپت‌های هدف در نتایج مشاهده نشد. علاوه بر این ژن‌ها در مطالعه‌ی حاضر، ژن NF-YB نیز که از ژن‌های هدف miR156 است افزایش بیان پیدا کرد.



شکل ۱- ساختار ثانویه پیش ساز miRNAهای شناسایی شده در عدس. توالی miRNA بالغ با رنگ آبی مشخص شده است.

تمامی ترانسکریپت‌های هدف miR166d شناسایی شده در مطالعه‌ی حاضر از فاکتورهای نسخه‌برداری HD-ZIP هستند. در مطالعه‌ای که با هدف شناسایی miRNAهای پاسخ دهنده به تنش خشکی در سویا انجام شده است نیز فاکتورهای نسخه‌برداری HD-ZIP ژن‌های هدف miR166 بودند و miR166 به همراه miR156 بیشترین فراوانی را در بین miRNAهای حفاظت شده در بافت نوک ریشه اولیه دارا بودند (۲۶). میزان بیان miR166 در پاسخ به تنش خشکی در سویا افزایش و در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن کاهش بیان یافته است (۲۳، ۲۶).

در مطالعه‌ی حاضر میزان بیان miR169 در پاسخ به تنش گرما کاهش یافت. این ژن در دسته‌ی miRNAهای دارای

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

فراوانی کم در بافت نوک ریشه اولیه سویا گزارش شده است و در رقم سویا متحمل به خشکی در پاسخ به تنش خشکی کاهش بیان نشان داده است. در مطالعه‌ی حاضر ترانسکریپت‌های هدف miR169 شامل فاکتورهای نسخه‌برداری NF-YA (nuclear transcription factor Y subunit A)، HSF و M-type_MADS بود که با کاهش بیان miR169d در پاسخ به تنش گرما بیان همولوگ ژن *Ca* NF-YA3 کاهش و بیان ژن Hsf افزایش یافت (جدول ۳). در مطالعه‌ی miRNAهای سویا دو ژن NF-YA به عنوان ژن هدف miR169 معرفی شدند که در پاسخ به تنش خشکی افزایش بیان پیدا کردند (۲۶). ژن NF-YA2 از ژن‌های هدف DREB2A است و به همراه NF-YB3 در شبکه‌ی تنظیم ترانسکریپشنی در پاسخ به تنش گرما حضور دارد (۲۰). افزایش بیان ژن NF-YB ، از ژن‌های هدف miR156، همزمان با کاهش بیان NF-YA3، از ژن‌های هدف miR169، در پاسخ به تنش گرما نشان دهنده‌ی نقش مهم این دو miRNA در شبکه‌ی تنظیم پاسخ به تنش گرما در عدس است. فاکتورهای نسخه‌برداری شوک حرارتی (HSF) از مهم‌ترین فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در پاسخ به تنش گرما هستند. HsfA1 یکی از عوامل مهم پاسخ به تنش گرما است که بیان آن توسط miR398 که یکی از مولکول‌ها شناسایی شده در پاسخ به تنش گرما است کنترل می‌شود. miR398، تولید آنزیم‌های هضم کننده‌ی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مثل برخی از سوپراکسیددسموتازها را سرکوب می‌کند و سبب تجمع ROS شده و در نتیجه سبب فعال شدن HsfA1 می‌شود که یکی از عوامل مهم پاسخ به تنش گرما است (۲۰).

جدول ۲- میزان تغییر بیان miRNA های شناسایی شده تحت تنش گرما.

نام miRNA	log 2 fold change	FDR
Lcu-miR408	-2.14	1.03E-05
Lcu -miR166d	-1.27	0.0006826
Lcu -miR167c-3p	0.56	0.7254311
Lcu -miR169d	-4.77	4.53E-05
Lcu -miR172	-1.87	0.2309336
Lcu -miR156b-3p	1.12	0.05
Lcu -miR156f	-0.30	1

جدول۳- مشخصات کانتیگ‌های هدف miRNA در عدس که در پاسخ به تنش گرما بیان افتراقی داشتند.

نام miRNA	کانتیگ هدف miRNA	log2 fold change	FDR	Annotation
lcu-miR172	contig_10213	1.31	1.19E-08	AP2 Transcription Factor
lcu-miR172	contig_7628	-1.17	3.11E-11	C3H Transcription Factor
lcu-miR172	contig_9759	1.63	3.69E-20	ARR-B Transcription Factor
lcu-miR167c-3p	contig_17573	1.68	2.85E-09	WRKY Transcription Factor
lcu-miR156f	contig_24713	-1.37	0.0362959	MYB Transcription Factor
lcu-miR156f	contig_3306	-2.45	1.23E-24	alpha-glucosidase
lcu-miR156f	contig_9456	1.41	1.92E-16	hypothetical protein OsI_02903
lcu-miR169d	contig_18433	-1.05	0.0039418	NF-YA Transcription Factor
lcu-miR169d	contig_19027	-4.1	0.0065003	NF-YA Transcription Factor
lcu-miR169d	contig_25248	1.18	0.0303817	HSF Transcription Factor
Lcu -miR156b-3p	contig_21432	5.87	2.43E-169	NF-YB Transcription Factor
Lcu -miR408	contig_14101	-1.11	0.0048166	basic blue protein-like

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

miR408 یکی دیگر از miRNAهایی است که در پاسخ به گرما کاهش بیان پیدا کرده است. تنها یک توالی هدف در ترانسکریپتوم عدس برای این miRNA شناسایی شد که مربوط به ژن basic blue protein-like بود. بیان miR408 در طی فرآیند زیست پالایی کادمیوم گزارش شده که ژن هدف آن basic blue copper protein بود (۱۲).

نتیجه‌گیری کلی

پدید آمدن توالی‌یابی نسل جدید به دست آوردن اطلاعات ژنتیکی و به ویژه اطلاعات مربوط به انواع RNAها را حتی در گیاهانی مانند عدس که توالی کامل ژنوم آنها در دست نیست، امکان پذیر کرده است. miRNAها نقش گسترده‌ای در تنظیم بیان ژن‌ها در عملکرد بیولوژیکی گیاهان و از جمله پاسخ به تنش‌ها دارند. در مطالعه‌ی حاضر هفت miRNAی حفاظت شده برای عدس شناسایی شد که چهار مورد از آنها در پاسخ به تنش گرما تغییر بیان نشان دادند. بررسی ژن‌های هدف این miRNAها نشان داد که اغلب آنها بیان فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در پاسخ به تنش‌ها و به‌ویژه تنش گرما را کنترل می‌کنند و این نشان می‌دهد که نقش آنها در پاسخ به تنش گرما یک نقش کلیدی است. بنابراین مطالعه‌ی دقیق نقش هر یک از این miRNAها در پاسخ به تنش گرما می‌تواند سبب درک بهتر مکانیزم‌های دخیل در ایجاد تحمل به گرما در عدس شود و روش‌های مورد استفاده برای تولید گیاهان متحمل به تنش گرما را متحول کند.

منابع

۱- احتشام نعیم، مودی مهدیه، خیراللهی مجید (۱۳۹۳) سنتز miRNA و مکانیسم‌های تنظیمی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان. ۳۲ (۲۹۶)، ۱۲۵۶-۱۲۶۸.

۲- باقری عبدالرضا، گلدانی مرتضی، حسن‌زاده مجتبی (۱۳۷۶). زراعت و اصلاح عدس. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۴۸ صفحه.

۳- میرزایی سعید. ۱۳۹۶. پروفایل ترانسکریپتوم نوک شاخه و ریشه گیاه سویا. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۰(۴)، ۴۹۹-۵۱۱.

۴- مینویی سعید، مینایی تهرانی داریوش، جمشیدی میترا، یوسفی زینب، طالبی مجید، کاوند بابک، غفاری زهرا، شادمان سحر. ۱۳۹۲. مطالعه تأثیر خاک آلوده به نفت خام بر فعالیت آنزیم آلکالن فسفاتاز در گیاه عدس (*Lens culinaris*). مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۲۶(۳)، ۳۸۶-۳۹۲.

5- Altschul SF, Madden TL, Schaffer 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

6- Budak H, Kantar M, Bulut R, Akpinar, BA (2015). Stress responsive miRNAs and isomiRs in cereals. Plant Science, 235: 1-13.

7- Dai X, Zhao PX (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. Nucleic Acids Research, 39: 155-159.

8- Giusti L, Mica, E, Bertolini E, De Leonardis AM, Faccioli P, Cattivelli L, Crosatti C (2017). microRNAs differentially modulated in response to heat and drought stress in durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency. Functional and integrative genomics, 17: 293-309.

9- Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. Frontiers in Plant Science, 5: 151.

10- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature biotechnology, 29: 644.

11- Guerra D, Crosatti C, Khoshro HH, Mastrangelo AM, Mica E, Mazzucotelli E (2015) Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: a

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

spider's web of mechanisms. Frontiers in Plant Science, 6: 57

12- Han X, Yin H, Song X, Zhang Y, Liu M, Sang J, Jiang J, Li J, Zhuo R (2016). Integration of small RNA s, degradome and transcriptome sequencing in hyperaccumulator *Sedum alfredii* uncovers a complex regulatory network and provides insights into cadmium phytoremediation. Plant biotechnology journal, 14: 1470-1483.

13- Henderson IR, Zhang X, Lu C, Johnson L, Meyers BC, Green PJ, Jacobsen SE (2006) Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. Nature genetics, 38: 721–725.

14- Hussain SS, Hussain M, Irfan M, Siddique KH (2018). Legume, Microbiome, and Regulatory Functions of miRNAs in Systematic Regulation of Symbiosis in Plant Microbiome: Stress Response pp. 255-282, Springer.

15- Kumar S, Barpete S, Kumar J, Gupta P, Sarker A, (2013) Global lentil production: constraints and strategies. SATSA Mukhapatra–Annu Tech. 17: 1-13.

16- Li W, Jaroszewski L, Godzik A (2001). Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. Bioinformatics, 17: 282-283.

17- 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.

18- Matthews C (2018). Characterizing the Role of the miR156-SPL Network in Heat Stress Response in Medicago sativa. Electronic Thesis and Dissertation Repository. 5478. https://ir.lib.uwo.ca/etd/5478.

19- 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.

20- Ohama N, Sato H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. Trends in Plant Science, 22: 53-65.

21- Padmashree D, Ramachandraswamy N (2016). Identification and characterization of conserved miRNAs with its targets mRNA in Trichinella Spiralis. Bioinformation, 12: 279-284.

22- Quinlan AR, Hall I (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics, 26: 841-842.

23- Wang Y, Zhang C, Hao Q, Sha A, Zhou R, Zhou X, Yuan L (2013) Elucidation of miRNA-mediated responses to low nitrogen stress by deep sequencing of two spybean genotypes. PLoS One, 8:e67423.

24- Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA (2006). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. Cellular and Molecular Life Sciences, 63: 246-254.

25- Zhang B (2015). MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. Journal of Experimental Botany, 66: 1749-1761.

26- Zheng Y, Hivrale V, Zhang X, Valliyodan B, Lelandais-Brière C, Farmer AD May GD, Crespi M, Nguyen HT, Sunkar R (2016). Small RNA profiles in soybean primary root tips under water deficit. BMC Systems Biology, 10: 126.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.1.12.9

Identification of Heat Stress-Responsive MicroRNAs in lentil *(lens culinaris)* and Their Target Genes

Hosseini S.Z.,[1] Ismaili A.,[1] Nazarian Firouzabadi F.,[1] Fallahi H.[2] and Rezaeinejad A.[3]

[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.

[3] Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran.

Abstract

Reduction in crops yield due to global warming threatens food security. Response of plants to heat stress is a complex prosses. MicroRNAs play an essential role in heat stress response regulatory network with post-translational modification of transcript, specially transcription factors. Lentil is one of the most important legumes cultivated in Iran. The role of microRNAs, in response to biotic and abiotic stresses in lentil plant, has not been studied so far. In this study, in order to identify conserved miRNAs and their target genes in lentil under heat stress, the total RNA was extracted using Trizol reagent and the RNA samples were sequenced. Then, transcripts which did not code any protein were examined to identification of miRNA precursors. Finally, seven miRNAs were identified which belonged to six conserved miRNA families including miR408, miR172, miR169, miR167, miR166 and miR156 that miR408, miR169 and miR166 were downregulated and miR156 was upregulated in response to heat stress. Study of these miRNAs targets showed that, most of these miRNAs involved in regulation of heat stress-responsive transcription factors including of HSF, NF-Y subunits, ARR-B, WRKY, MYB, AP_2 and C_3H. This result can help to better understanding of gene expression regulatory network in response to heat stress.

Key words: Differential expression, miRNA, Heat stress, Lentil, miRBase