

شناسایی و تحلیل بیان ریز RNAهای حفاظت‌شده مرتبط با تنش شوری

در عدس (*Lens culinaris* L.)

مهدی گودرزی، احمد اسماعیلی*، سید سجاد سهرابی، فرهاد نظریان فیروزآبادی و حمید رضا عیسوند

ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۸

چکیده

میکرو RNAها (miRNAs)، خانواده‌ای از ریز RNAها (sRNA) هستند که بیان ژن‌ها را در سطح پس از رونویسی با تخریب mRNA یا ممانعت از ترجمه تنظیم می‌کنند. گرچه تاکنون هزاران میرنا در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده است با این حال، اطلاعاتی از وجود میرناهای حفاظت‌شده مرتبط با تنش شوری در عدس (*Lens culinaris* L.) که یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین محصولات زراعی در ایران و کشورهای در حال توسعه به‌شمار می‌رود، گزارش نشده است. مطالعه حاضر به منظور شناسایی میرناهای محافظت‌شده بالقوه و ژن‌های هدف آن‌ها در ترنسکریپتوم گیاه عدس تحت تنش شوری انجام شد. در این مطالعه، ۵۵۸۹۲ یونی ژنی که از فرآیند سرهم‌بندی نوپدید، مجموع خوانش‌های کوتاه مشتق شده از توالی‌یابی RNA عدس تحت دو شرایط کنترل و تنش شوری صورت گرفته بود برای پیش‌بینی miRNAهای حفاظت‌شده و ژن‌های هدف آن‌ها استفاده شد. در نهایت از بین توالی‌های کاندید شش میرنای محافظت‌شده با پتانسیل بسیار بالا (lcu-miR167، lcu-miR156، lcu-miR169، lcu-miR171، lcu-miR396 و lcu-miR390) پس از اعمال فیلترهای سخت‌گیرانه شناسایی شدند. میرناهای شناسایی‌شده دارای بیان متفاوتی در تنش شوری بودند. نتایج نشان داد که ژن‌های هدف میرناهای شناسایی شده در اغلب فرآیندهای زیستی همچون تمایز، رشد و نمو، انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نقش مهمی ایفا می‌کنند. علاوه بر این نتایج نشان داد که برخی از عوامل رونویسی متعلق به خانواده‌های SBP، C2H2، GRAS، M-type_MADS و MYB به‌طور وسیعی تحت تاثیر فرآیند تنظیمی میرناهای شناسایی شده قرار می‌گیرند. مجموعه میرناها و ژن‌های هدف شناسایی شده در مطالعه حاضر می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای مفید برای پژوهش‌های عمیق‌تر و دقیق‌تر در مورد نقش میرناها در پاسخ به تنش شوری عدس محسوب شوند.

واژه‌های کلیدی: ترنسکریپتوم، تنش شوری، میرنا، عدس

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

مقدمه

گیاهان از جمله تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، تولید شده است و زمینه مناسبی برای شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده این صفات را فراهم نموده است. توالی‌یابی نسل جدید، یکی از کلیدی‌ترین فناوری‌های مؤثر در ژنومیکس کارکردی به‌شمار می‌رود که با تولید داده‌های ژنومی و ترنسکریپتومی در مقیاس بالا راه را برای شناسایی ژن‌ها و همچنین بازسازی شبکه‌های ژنی هموار کرده است (۲۵).

بسیاری از صفات با ارزش اقتصادی بالا در گیاهان، از طریق شبکه‌های برهمکنش ژنی پیچیده‌ای کنترل می‌شوند، از این‌رو استفاده از روش‌های به‌نژادی سنتی به‌تنهایی برای بهره‌مند شدن حداکثری از پتانسیل ژنتیکی گیاهان، در اغلب موارد زمان‌بر بوده و در برخی موارد نیز نتایج مطلوبی به‌همراه نخواهد داشت (۲۷ و ۲۸). در سال‌های اخیر، هم‌زمان با پیشرفت‌های صورت گرفته در ژنومیکس گیاهی، حجم بالایی از اطلاعات در مورد شبکه‌های برهمکنشی و تنظیمی ژن‌های مؤثر در بروز صفات حیاتی

گیاهان غیرمدلی که ژنوم مرجع کاملی ندارند، گزارش شده است (۲ و ۶۹). فرآیند سرهم‌بندی نوپدید، محتوای ترنسکرپتومی مطلوبی جهت شناسایی *In silico* ژن‌های کلیدی دخیل در شبکه ژنی از جمله میرناها فراهم ساخته است.

عدس زراعی گیاهی دیپلوئید ($2n = 2x = 14$)، خودگرده‌افشان با اندازه ژنومی معادل ۴ Gb (۴) بوده که پس از نخود و نخودفرنگی سومین گیاه مهم گروه حبوبات دانه‌ای سردسیر محسوب می‌شود (۳۹). در میان حبوبات دانه‌ای سردسیر، عدس غنی‌ترین لگوم از نظر اسیدآمینوهای مهم مانند لیزین، آرژنین و لوسین است. از سوی دیگر این محصول با داشتن شاخص گلیسمی پایین به‌طور مؤثری در رژیم غذایی افراد مبتلا به دیابت، چاقی و بیماری‌های قلبی عروقی توصیه شده است (۶۲). همچنین این گیاه با داشتن قابلیت تثبیت نیتروژن هوا در خاک، موجب افزایش حاصلخیزی خاک شده و در تناوب با غلات موجب کاهش مصرف کودهای شیمیایی و افزایش محصول غلات می‌شود (۷). با توجه به محدوده وسیع کشت عدس در سر تا سر جهان، مواجهه دوره رشد این گیاه با انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی اجتناب‌ناپذیر است. به دلیل تنوع ژرمپلاسمی پایین، اندازه ژنوم بزرگ و وجود توالی‌های تکراری بالای DNA، اطلاعات بسیار اندکی از مکانیسم‌های پاسخ عدس به تنش‌های محیطی نسبت به سایر حبوبات، در دسترس می‌باشد.

شوری یکی از شدیدترین تنش‌های محیطی است (۲۶) که کاهش تولید محصولات مهم زراعی از جمله عدس، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک را در بر دارد. اثرات مضر این پدیده بر رشد، توسعه و کلیه فرآیندهای سوخت و سازی گیاهان از جمله فتوسنتز، سنتز پروتئین، سوخت و ساز چربی، هموستازی یون و تجمع اسمولیت‌ها در مطالعات متعددی گزارش شده است (۱، ۲۰، ۲۸، ۳۱ و ۵۶). با این حال تاکنون اطلاعات جامعی از تغییرات ترنسکرپتوم عدس تحت تنش شوری گزارش نشده است.

میکرو RNAها (میرناها) یکی از مهم‌ترین عناصر تنظیمی در اغلب شبکه‌های ژنی هستند (۶۴). این کلاس از RNAهای غیررمزگردان از طریق فرآیند تداخل RNA، بیان بسیاری از ژن‌ها را در سطوح مختلف از جمله؛ رونویسی، پردازش، پایداری RNA و ترجمه تنظیم می‌کنند (۳۸). به‌طور کلی، در اولین مرحله از پردازش درون هسته‌ای، بخش ساقه از ساختار ساقه - حلقه میرنای اولیه توسط آنزیم RNaseIII (DCL1) بریده شده و ساختار pre-miRNAs ایجاد می‌گردد. در ادامه، حلقه انتهایی بریده شده و توالی دو رشته‌ای (miRNA/miRNA*duplex) با طول متوسط ۲۲~ نوکلئوتید ایجاد می‌گردد. در انتها با ورود ساختار دو رشته به سیتوپلاسم و تشکیل کمپلکس خاموشی القاء شده ساختار تک‌رشته و بالغ میرنا ایجاد می‌گردد (۱۸). با پیشرفت دانش در رابطه با میرناها پایگاه‌های اطلاعات زیادی به‌صورت برخط ایجاد شد تا دسترسی به توالی‌ها، عملکرد، ویژگی‌ها و ژن‌های هدف میرناها آسان گردد؛ همچنین ابزار و نرم‌افزارهای مختلف برای پیش‌بینی میرناها و ژن‌های هدف و تسهیل شبکه مطالعات عملکردی این مولکول‌های تنظیمی توسعه پیدا کردند (۲۴ و ۶۷). برای شناسایی ژن‌های هدف میرنا در پژوهش‌های مختلف از سه روش بیوانفورماتیکی، بیوشیمیایی و روش‌های مبتنی بر امیکس استفاده شده است (۳۲). سرعت بالا و مقرون به‌صرفه‌تر بودن روش‌های بیوانفورماتیکی که از ویژگی حفاظت‌شدگی بالای میرناها در گونه‌های گیاهی استفاده می‌کنند، نسبت به سایر روش‌های شناسایی میرنا، موجب اقبال عمومی استفاده از این روش‌ها شده است (۶۰). در رهیافت بیوانفورماتیکی مبتنی بر همولوژی، از پایگاه داده میرناهای شناسایی‌شده (Mirbase) به‌منظور شناسایی میرناهای حفاظت‌شده بالقوه، در مقابل پایگاه داده ترنسکرپتومی موجود برای گیاه مورد نظر استفاده می‌شود (۲۴، ۶۲، ۶۷ و ۶۸). در مطالعات متعدد کارایی استفاده از داده‌های حاصل از تحلیل RNA-Seq جهت بازسازی و تحلیل ترنسکرپتوم گیاهان به‌ویژه

دستگاه پیکودراپ و ژل (ادرسد) الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. پس از آماده‌سازی کتابخانه‌های cDNA توسط کیت IlluminaTruSeq™RNA Sample Preparation و در نهایت از پلتفرم IlluminaHiSeq2500 برای فرآیند توالی‌یابی کتابخانه‌ها استفاده شد. در نهایت از ۸ نمونه با کیفیت بالا (دو تکرار در هر گروه-بافت)، توالی‌یابی به صورت از دو سو خوانش (Paired-end) و با طول ۱۵۰-جفت‌باز صورت گرفت.

کیفیت اولیه توالی‌های خام برای همه نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار FastQC v0.11.6 مورد ارزیابی قرار گرفت. برای حذف توالی‌های آداپتور باقی‌مانده از خوانش‌های خام، از نرم‌افزارهای Cutadapt (۴۶) استفاده شد. در نهایت از نرم‌افزار Trimmomatic v0.27 برای حذف توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phred score کمتر از ۳۰) و خوانش‌های با فراوانی بالای نوکلئوتیدهای خوانش نشده (N) استفاده شد (۸).

سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های پردازش شده: پس از فرآیند پردازش داده‌های توالی‌یابی شده، از خوانش‌های با کیفیت بالا به‌عنوان توالی‌های ورودی برای سرهم‌بندی (اسمبلی) ترنسکریپتوم گیاه عدس تحت تنش شوری استفاده شد. سرهم‌بندی نوپدید با استفاده از نرم‌افزار Trinity و بر اساس پارامترهای پیش‌فرض این نرم‌افزار انجام شد (۲۹). نرم‌افزار، سرهم‌بندی قطعات را تا رسیدن به کانتیگ‌ها ادامه می‌دهد. از بسته نرم‌افزاری CD-Hit-EST، به‌منظور حذف کانتیگ‌های اضافی استفاده شد و کمیت-سنجی سرهم‌بندی نوپدید با تعیین آماره‌های تعداد کانتیگ، طول بزرگ‌ترین کانتیگ، N50، طول متوسط کانتیگ‌ها محاسبه شد (۲۳ و ۵۹).

شناسایی و بررسی ساختارهای ثانویه: از یونی‌ژن‌هایی که پس از انجام مراحل سرهم‌بندی نوپدید، کمیت‌سنجی و حذف کانتیگ‌های تکراری حاصل شده بودند، به‌عنوان منبعی برای شناسایی میرنا‌های محافظت‌شده استفاده شد. به

با توجه عدم وجود ژنوم مرجع مستندسازی شده برای عدس و همچنین در دسترس نبودن اطلاعات کافی در مورد میرنا‌های شناسایی‌شده این گیاه، هدف از این پژوهش شناسایی، تعیین خصوصیات و بررسی بیان میرنا‌های محافظت‌شده و اهداف آن‌ها از کتابخانه‌های ترنسکریپتومی گیاه عدس تحت تنش شوری، برای اولین بار می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: پس از تهیه بذور عدس (رقم گچساران) از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، بذور به گلدان‌های حاوی ورمی‌کولایت، پیت‌ماس و شن (با نسبت مساوی) انتقال یافتند. سپس گلدان‌ها به اتاق کشت با شرایط شدت نوری ۱۴۰۰-۱۲۰۰ لوکسی، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و روزانه با محلول نیم‌هوگلد آب‌یاری شدند. گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های ۲۱ روزه به‌منظور اعمال تنش شوری به دو گروه تیمار و کنترل تقسیم شدند. برای اعمال تیمار شوری از روش اضافه کردن نمک NaCl به محلول غذایی نیم‌هوگلد استفاده شد. میزان شوری محلول نیم‌هوگلد برای اعمال تنش شوری براساس مرور منابع ۱۰۰ میلی‌مولار تعیین شد. به‌مدت ۷ روز آب‌یاری با نیم‌هوگلد شور انجام و برای ممانعت از تجمع نمک هر ۲ تا ۳ روز یک‌بار آبشویی صورت گرفت. پس از اعمال تیمار، از بافت برگ و ریشه گیاهچه‌ها در هر دو گروه آزمایشی (کنترل و تیمار) به‌منظور استخراج RNA کل، نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار داده شده و تا زمان توالی‌یابی در یخچال با دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA، توالی‌یابی و پردازش داده‌ها: استخراج RNA کل با استفاده از محلول تریزول (Trizolreagent) طبق پروتکل شرکت سازنده (Invitrogen, lifetechnology) برای همه نمونه‌ها (۳ تکرار برای هر گروه-بافت) انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از

تا ۷۰ درصدی AU، حداکثر ۳ نوکلئوتید فاصله در ساختار میرنا و میزان شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی بیشتر از ۸۵ کیلوکالری بر مول (۹ و ۷۷) فیلتر و شناسایی شدند (۴۳ و ۴۹).

شناسایی ژن‌های هدف miRNAهای مورد بررسی: با استفاده از پایگاه برخط psRNATarget (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget)، شناسایی ژن‌های هدف برای miRNAهای مورد بررسی با در نظر گرفتن معیارهای پیش‌فرض صورت گرفت. ضوابط و محدودیت‌های پیش‌فرضی که برای شناسایی ژن‌های هدف بالقوه در نظر گرفته شده شامل یک امتیاز به ازای هر عدم جفت‌شدگی میان miRNA و ژن هدف و نیم امتیاز به ازای هر جفت‌شدگی U:G و در نهایت دو امتیاز برای هر حباب بود. علاوه بر این حداکثر امتیاز مجاز برای معرفی ژن هدف جدید ۳ در نظر گرفته شد و همچنین در ناحیه seed (نوکلئوتیدهای ۲ تا ۹ miRNA) که نقش اصلی را در شناسایی و اتصال miRNA به ژن هدف دارد تنها اجازه یک عدم جفت‌شدگی داده شد (۱۵). به منظور مستندسازی ژن‌های هدف میرناها، از ابزار BLASTx استفاده شد. تحلیل هستی‌شناسی (Gene Ontology, GO)، تفسیر و تعیین زیر گروه‌های عملکردی (فرآیندهای زیستی (Biological Process, BP)، اجزای سلولی (Cellular Component, CC) و عملکرد مولکولی (Molecular Function, MF)) ژن‌های هدف با استفاده از نرم‌افزار Blast2GO طبق مقادیر پیش‌فرض صورت گرفت (۱۳). علاوه بر این به منظور ترسیم نقشه حرارتی بیان ژن‌های هدف میرناهای شناسایی شده برحسب تعداد قطعات در هر کیلوباز میلیون (Fragments Per Kilobase Million, FPKM)، از ابزار تحت وب Heatmaper با در نظر گرفتن مقادیر پیش‌فرض، استفاده شد (۵).

نتایج و بحث

کاهش اختلاف بین حداکثر پتانسیل ژنتیکی گیاهان و

این منظور، کلیه‌ی توالی‌های میرنای ثبت شده برای گونه‌های گیاهی، از پایگاه mirbase (http://www.mirbase.org) دریافت شدند. شناسایی یونی‌ژن‌های با بیشترین شباهت با توالی‌های میرنای بالغ با استفاده از ابزار BLASTn با در نظر گرفتن پارامترهای E-value ≤ 10 و mismatch < 4 صورت گرفت. از توالی میرناهای بالغ دریافت شده از پایگاه mirbase به‌عنوان ورودی و از یونی‌ژن‌ها به‌عنوان پایگاه مورد جستجو استفاده شد. توالی‌های حاصل از BLASTn با ابزار BLASTx نیز علیه پایگاه داده NR مورد هم‌ردیفی قرار گرفت و توالی‌های دارای نتیجه در این پایگاه از تحلیل‌های پایین‌دستی حذف شدند.

نوع تاخوردگی‌ها و میزان انرژی آزاد ساختار میرنای اولیه در یونی‌ژن‌های حاصل با استفاده از ابزار RNA Folding Form موجود در وبسایت (http://unafold.rna.albany.edu/) مورد بررسی قرار گرفت (۸۰). به‌منظور اعتبارسنجی از قرارگیری توالی میرنای بالغ در محل و جهت صحیح احتمالی خود، یک ناحیه‌ی ۱۰۰ نوکلئوتیدی در بالادست و پایین‌دست میرنای شناسایی‌شده از توالی یونی‌ژن‌های انتخابی با استفاده از ابزار Bedtools استخراج شد (۵۵). توالی‌هایی که در یکی از بازوها خود شامل توالی میرنای بالغ بوده و همچنین دارای ساختار ساقه-حلقه مناسب بودند به‌عنوان میرناهای احتمالی مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور تعیین صحت ساختار میرناهای احتمالی و حذف نتایج کاذب از پارامترهای درصد GC/AU، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی ($MFE = -$)، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده (ΔG)، حداکثر انرژی آزاد تاخوردگی ($pre-miRNA \text{ length} \times 100$) و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی ($MFEI = GC\% \div AMFE$) استفاده شد (۵۳ و ۷۱). در نهایت توالی‌های با تاخوردگی مناسب و وجود ساختار ساقه حلقه، وجود توالی میرنای بالغ در یک بازو در ناحیه ساقه، عدم شکستگی در حلقه میرنا، حداکثر ۶ جفت نوکلئوتید غیرمنطبق در ساختار میرنا، محتوای ۳۰

سرهم‌بندی این تعداد خوانش و همچنین حذف کانتیگ‌های تکراری، ۵۵۸۹۲ رونوشت منحصربه‌فرد به‌دست آمد. رونوشت‌های تکراری حاصل از سرهم‌بندی ناقص خوانش‌ها، به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای تجزیه و تحلیل و نتایج حاصل از توالی‌یابی RNA را با انحراف روبرو می‌سازند؛ از این‌رو در مطالعات متعدد بر کاهش افزونگی کاذب رونوشت‌ها به‌ویژه هنگام مطالعه ترنسکرپتوم گیاهان غیرمدل تأکید شده است (۵۲). مقادیر محاسبه شده برای سنجش کیفیت اسمبلی ایجاد شده نظیر N50 (۱۶۷۳ جفت‌باز) و میانگین طول (۱۱۶۸/۴۶ جفت‌باز) کیفیت مطلوب ترنسکرپتوم سرهم‌بندی شده عدس را تأیید نمود (جدول ۲). در مطالعات مختلف از N50 و میانگین طول توالی‌ها برای تعیین کیفیت اسمبلی استفاده می‌شود. نتایج سرهم‌بندی ترنسکرپتوم عدس نشان داد که استفاده از فناوری NGS، می‌تواند منبع مناسبی برای تولید محتوای ژنتیکی جهت تجزیه و تحلیل و شناسایی ژن‌ها و عوامل دخیل در فرآیندهای مختلف زیستی در عدس محسوب شود.

شناسایی میرناهای محافظت‌شده: نقش میرناها در تنظیم فرآیندهای مهم زیستی گیاهان از جمله تحمل به تنش‌ها در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. تاکنون ۴۸۸۸۵ میرنا در موجودات مختلف شناسایی و در پایگاه mirbase ثبت شده است.

عملکرد واقعی آن‌ها یکی از مهم‌ترین اهداف به‌نژادگران محسوب می‌شود. امروزه تولید داده‌های امیکس (ژنومی و ترنسکرپتومی) مبتنی بر فناوری NGS، به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است (۵۸) و فرصت مناسبی برای تولید محتوای ژنتیکی برای تعداد زیادی از گیاهان غیرمدل که از این منظر بسیار فقیر محسوب می‌شدند، فراهم شده است (۶۵). سرهم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA، بستر مناسبی برای شناسایی و بررسی تغییرات بیان اغلب ژن‌ها و عوامل دخیل در شبکه‌های زیستی از جمله میرناها، بدون نیاز به یک توالی ژنوم مرجع، فراهم ساخته است (۱۹ و ۴۷). ژنوم عدس نیز تاکنون به‌علت تنوع ژرم‌پلاسمی ضعیف، حجم ژنوم بالا و وجود توالی تکراری بالا به‌صورت کامل انتشار نیافته است؛ از این‌رو می‌توان چنین اظهار نمود که نسبت به سایر حبوبات مهم درصد بسیار کمی از کل ژنوم این گیاه مستندسازی شده است (۶۱).

در مطالعه حاضر پس از اعمال تنش شوری، داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA عدس که تحت شرایط نرمال و تنش شوری دست آمده بودند، مورد پردازش قرار گرفتند. در مجموع ۳۳۷۳۶۷۴۰۶ خوانش تمیز شده پس از حذف خوانش‌های کم کیفیت طی فرآیند پردازش حاصل شد (جدول ۱) که از

جدول ۱- اطلاعات آماری مجموعه داده استفاده شده در مطالعه حاضر

| شرایط | نوع بافت | تعداد خوانش‌های خام | تعداد خوانش‌های تمیز شده | درصد خوانش‌های با کیفیت بیشتر از Q30 |
|-------|----------|---------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| کنترل | برگ | ۴۷۱۶۸۰۵۲ | ۴۳۶۹۹۳۳۸ | ۹۸/۷۵ |
| کنترل | برگ | ۵۳۶۲۷۳۶۰ | ۴۹۸۲۰۸۹۲ | ۹۸/۶۵ |
| کنترل | ریشه | ۴۹۷۳۰۴۷۴ | ۴۲۶۳۵۰۴۰ | ۹۷/۷۱ |
| کنترل | ریشه | ۳۹۵۴۵۸۶۶ | ۳۴۵۳۵۵۰۶ | ۹۸/۹۴ |
| شوری | برگ | ۴۸۸۷۶۲۰۴ | ۴۲۰۲۴۵۶۶ | ۹۷/۵۵ |
| شوری | برگ | ۴۶۲۰۸۹۲۲ | ۳۹۹۰۶۴۵۶ | ۹۷/۶۵ |
| شوری | ریشه | ۵۰۱۲۰۱۱۶ | ۴۳۲۶۹۹۶۴ | ۹۶/۵۵ |
| شوری | ریشه | ۴۸۳۰۷۵۵۴ | ۴۱۴۷۵۶۴۴ | ۹۶/۷۶ |

جدول ۲- مشخصات کمی و کیفی سرهم‌بندی ترنسکرپتوم عدس تحت تنش شوری

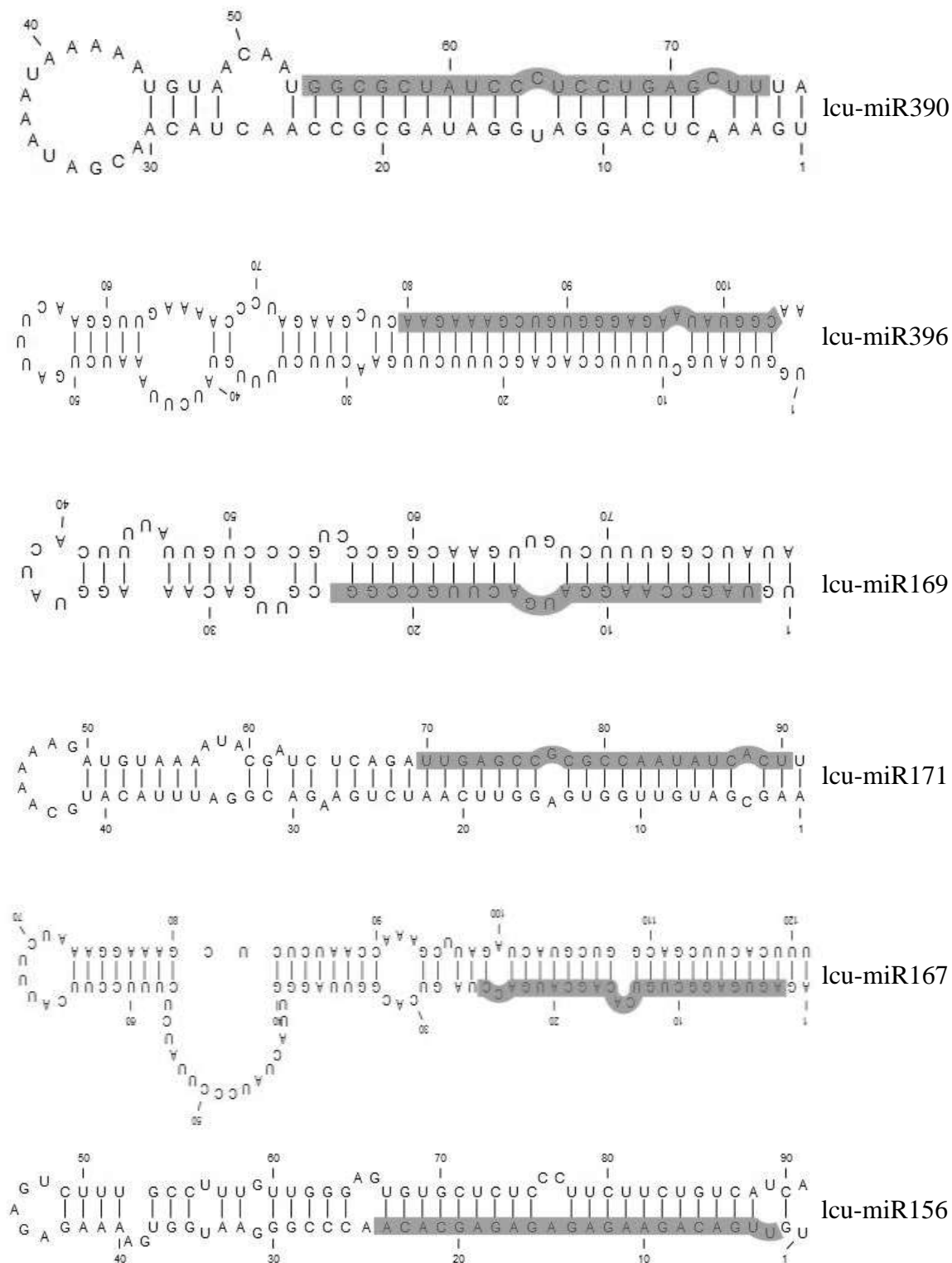
| ویژگی | مقادیر |
|---|----------|
| تعداد رونوشت | ۵۵۸۹۲ |
| کوتاه‌ترین اندازه رونوشت (نوکلئوتید) | ۱۴۹ |
| بلندترین اندازه رونوشت (نوکلئوتید) | ۱۶۸۲۹ |
| تعداد کل نوکلئوتید | ۶۵۳۱۰۳۹۱ |
| میانگین طول (نوکلئوتید) | ۱۱۶۸/۴۶ |
| تعداد رونوشت با طول کمتر از ۲۰۰ (نوکلئوتید) | ۱۵ |
| تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱ (نوکلئوتید) | ۲۴۳۳۱ |
| تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱۰ (نوکلئوتید) | ۱۳ |
| رونوشت‌های دارای قاب خوانش باز | ۲۲۳۲۹ |
| N90 (nt) | ۵۳۱ |
| N70 (nt) | ۱۱۰۵ |
| N50 (nt) | ۱۶۷۳ |
| N30 (nt) | ۲۳۵۷ |
| N10 (nt) | ۳۷۴۴ |
| %GC | ۳۸ |

توالی‌هایی نامطلوب از نظر مقدار شکاف در توالی و تعداد نوکلئوتید انطباق نیافته، حذف شدند. در نهایت بر اساس پارامتر درصد AU و MFEI (جدول ۳)، شش میرنای محافظت‌شده با پتانسیل بسیار بالا متعلق به خانواده‌های miR167، miR171، miR2118، miR169، miR396، miR390 شناسایی شدند که ساختار پیش ساز میرنا به‌همراه محل قرارگیری توالی میرنای بالغ هرکدام از میرناهای شناسایی‌شده در شکل ۱ ارائه شده است. اکثریت میرناهای شناسایی شده، قبلاً در گونه‌های گیاهی مدل از قبیل آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، سویا (*Glycine max*)، کاملینا (*Camelina sativa*) و کاج (*Pinus silvestris*) گزارش شده‌اند.

در این مطالعه طول توالی‌های بالغ میرناهای شناخته‌شده از nt ۲۱ تا nt ۲۴ متغیر بوده و تعداد سه میرنا یافت شدند که ابتدای ناحیه ۵' با باز یوراسیل (U) آغاز می‌شود. یکی از ویژگی‌های توالی میرنا دارا بودن توالی باز یوراسیل در ابتدای ناحیه ۵' می‌باشد. تفاوت در طول میرناها نیز به منحصربه‌فرد بودن عملکردها برای تنظیم بیورنز میرناها یا بیان ژن‌های هدف مرتبط اشاره دارد. ساختارهای پیش‌بینی

در این مطالعه از روش مبتنی بر همولوژی برای شناسایی میرناهای حفاظت‌شده در ترنسکرپتوم عدس تحت تنش شوری استفاده شد. کارایی استفاده از روش‌های محاسباتی برای شناسایی میرناهای محافظت‌شده در سایر مطالعات مشابه نیز مورد تأیید قرار گرفته است (۲۴، ۴۷، ۴۸، ۶۰، ۶۷ و ۷۰). نتایج هم‌ردیفی محلی میرناهای گیاهی با رونوشت‌های حاصل از سرهم‌بندی ترنسکرپتوم نشان داد که از ۵۵۸۹۲ رونوشت در ترنسکرپتوم مرجع، ۵۷۷۸ رونوشت با توالی‌های میرنای بالغ گیاهی مطابقت داشتند. پس از حذف رونوشت‌های رمزکننده پروتئین، تعداد رونوشت میرنای احتمالی به ۱۴۱۹ توالی رسید. با توجه به اینکه تمایز بین توالی میرنا با سایر انواع RNA تنها از طریق همولوژی منجر به شناسایی توالی‌های کاذب خواهد شد (۷۷)، در مطالعه حاضر ساختار ثانویه توالی‌ها توسط ابزار RNA Folding Form موجود در وب‌سایت mfold مورد بررسی قرار گرفت (۳۲ و ۷۰). ساختار ثانویه توالی‌های کاندید از نظر تناسب ساختار ساقه - حلقه و محل قرارگیری توالی میرنای بالغ در ساختار ثانویه پیش‌بینی شده، در مرحله نخست کنترل شد. در دومین مرحله،

شده با طول‌های متفاوت مشابه مطالعات انجام شده در آرابیدوپسیس، برنج (۴۲) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) می‌باشد (۷۳).



شکل ۱- ساختار پیش‌ساز برای شش میرنای شناسایی شده در ترنسکریپتوم عدس تحت تنش شوری. بخش‌های های‌لایت شده، توالی میرنای بالغ را نشان می‌دهد.

جدول ۳- ویژگی‌های میرنا‌های شناسایی‌شده در عدس تحت تنش شوری

| ویژگی‌ها | نام میرنای بالغ | | | | | |
|--------------------------------------|--|---|---|--|---|---|
| | lcu-miR156 | lcu-miR167 | lcu-miR169 | lcu-miR171 | lcu-miR396 | lcu-miR390 |
| نام بونی‌ژن | evgLocus_ 11587 | evgLocus_ 1351 | evgLocus_ 23141 | evgLocus_ 14790 | evgLocus_ 68512 | evgLocus_ 65114 |
| طول بونی‌ژن (جفت‌باز) | ۸۷۸ | ۱۷۱۹ | ۵۵۸ | ۷۱۸ | ۱۷۸۷ | ۵۴۱ |
| مختصات توالی میرنای بالغ روی بونی‌ژن | ۴۰۱..۴۲۲ | ۱۰۵۴..۱۰۷۶ | ۱۱۲..۱۳۲ | ۱۱۰..۱۳۰ | ۲۹۶..۳۱۹ | ۴۲۱..۴۴۱ |
| تعداد نوکلئوتیدهای غیر منطبق | ۷/۲۹E-۰۶ | ۲/۲E-۰۶ | ۲/۳۷E-۰۵ | ۲/۳۷E-۰۵ | ۶/۵۲E-۰۷ | ۲/۳۷E-۰۵ |
| ارزش مورد انتظار | ۴۳/۰۰ | ۴۴/۹۰ | ۴۱/۱۰ | ۴۱/۱۰ | ۴۶/۸۰ | ۴۱/۱۰ |
| bit score | ۹۱ | ۱۲۱ | ۷۹ | ۹۱ | ۱۰۵ | ۷۶ |
| طول توالی پیش‌ساز میرنا (جفت‌باز) | ۷/۲۹E-۰۶ | ۲/۲E-۰۶ | ۲/۳۷E-۰۵ | ۲/۳۷E-۰۵ | ۶/۵۲E-۰۷ | ۲/۳۷E-۰۵ |
| توالی میرنای شناسایی‌شده (جفت‌باز) | ۵'- UUGACAGA AGAGAGA GAGCACA -۳' | ۵'- GGUCAUGC UGUGACAG CCUCACU -۳' | ۵'- UAGCCAAG GAUGACUU GCCGG -۳' | ۵'- UUGAGCC GCGCAA UAUCACU -۳' | ۵'- AAGAAAAGC UGUGGGAG AAUAUGGC -۳' | ۵'- AAGCUCA GGAGGGA UAGCGCC -۳' |
| رشته | + | - | + | + | + | - |
| طول میرنای شناسایی‌شده (جفت‌باز) | ۲۲ | ۲۳ | ۲۱ | ۲۱ | ۲۴ | ۲۱ |
| درصد GC | ۴۸/۳۵ | ۴۳/۸۰ | ۴۸/۱۰ | ۴۰/۶۶ | ۳۸/۱۰ | ۴۰/۷۹ |
| درصد AU | ۵۱/۶۵ | ۵۶/۲۰ | ۵۱/۹۰ | ۵۹/۳۴ | ۶۱/۹۰ | ۵۹/۲۱ |
| MFE (kcal/mol) | -۴۵/۰۰ | -۵۰/۶۰ | -۴۲/۱۰ | -۴۴/۲۰ | -۴۶/۱۰ | -۳۴/۳۰ |
| AMFE | -۴۹/۴۵ | -۴۱/۸۲ | -۵۳/۲۹ | -۴۸/۵۷ | -۴۳/۹۰ | -۴۵/۱۳ |
| MFEI | ۱/۰۲ | ۰/۹۵ | ۱/۱۱ | ۱/۱۹ | ۱/۱۵ | ۱/۱۱ |

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

بود، نشان داد که سرهم‌بندی نوپدید از کارایی بسیار بالاتری برای شناسایی میرنا‌های حفاظت‌شده برخوردار بوده؛ به طوری که از مجموع رونوشت ایجاد شده توسط فرآیند سرهم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم استویا، ۴۶۱۶ رونوشت با میرنا‌های بالغ تطابق یافته که در نهایت از بین این توالی‌ها ۳۱ میرنای با پتانسیل بالا

به‌طور کلی با افزایش پایگاه‌های اطلاعاتی برای گیاهان احتمال موفقیت تشخیص میرناها نیز افزایش یافته است (۵۰). پژوهش مهتا و همکاران (۴۸) که با هدف مقایسه شناسایی میرنا‌های حفاظت‌شده از دو منبع EST و سرهم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم حاصل از توالی‌یابی RNA در گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*)

نشانی داد که کاهش بیان miR156 در گیاهان تراریخت موجب افزایش حساسیت به تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش شوری می‌گردد. نقش مؤثر miR167 در پاسخ به تنش شوری ذرت (*Zea mays*) در پژوهش فو و همکاران (۲۱) مورد تأیید قرار گرفت، با این حال تفاوت بیان قابل‌توجهی برای این گونه میرنا در بافت برگ و ریشه ذرت گزارش شده است. برخی از اعضای خانواده miR169 در تنش‌های خشکی (۷۶)، سرما (۴۰)، شوری (۷۸) و کمبود ازت (۷۹) افزایش بیان نشان داده و احتمالاً نقش مؤثری در تنظیم زمان گل‌دهی طی تنش‌های اکسیداتیو دارند (۱۴). تجزیه و تحلیل ریزآرایه نشان داد که چندین میرنا، از جمله miR156 miR159 miR167 miR168 miR171 miR319 miR396 در پاسخ به تنش شوری در آراییدوپسیس نقش مؤثری دارند (۳ و ۴۱). مطالعات در ذرت (۱۷)، گندم (*Triticum aestivum*) (۳۰)، برنج (*Oryza sativa*) (۲۲)، جو (*Hordeum vulgare*) (۱۶) و نیشکر (*Sacrum officinarum*) (۱۰) نشان داده‌اند که miR171 یکی از مهم‌ترین miRNAهای پاسخگو به تنش‌های محیطی از جمله شوری می‌باشد. در گونه‌های مختلف گیاهی miR396 از جمله میرناهای محافظت‌شده بوده که از طریق تنظیم ژن‌های هدف خود که اغلب عوامل رونویسی تنظیم‌کننده رشد می‌باشند، در رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش دارند (۷۴). خوگیری گیاهان و رشد آن‌ها در محیط‌های شور به شدت به سیستم ریشه گیاه و همچنین نحوه پیام‌رسانی اکسین بستگی دارد. miR390 RNAهای تداخل‌دهنده کوچک ترانس‌اکتین (*tasiRNA*) و عوامل پاسخ به اکسین یک ماژول تنظیمی را تشکیل می‌دهند که در کنترل رشد ریشه جانبی نقش دارند. نتایج مطالعه هی و همکاران (۳۳) نشان داد که بیان miR390 تحت تنش شوری به شدت افزایش یافته که این بیان بیش‌ازحد باعث تحریک توسعه ریشه‌های جانبی و افزایش تحمل به تنش شوری می‌گردد، در حالی که با خاموشی miR390 رشد ریشه‌های جانبی سرکوب‌شده و مقاومت در برابر تنش شوری کاهش می‌یابد (۳۳).

شناسایی ژن‌های هدف: تکامل تنظیم ژن بدون توجه به توسعه نقش تنظیم‌کننده‌ها میسر نمی‌شود. در یوکاریوت‌ها، شبکه‌های

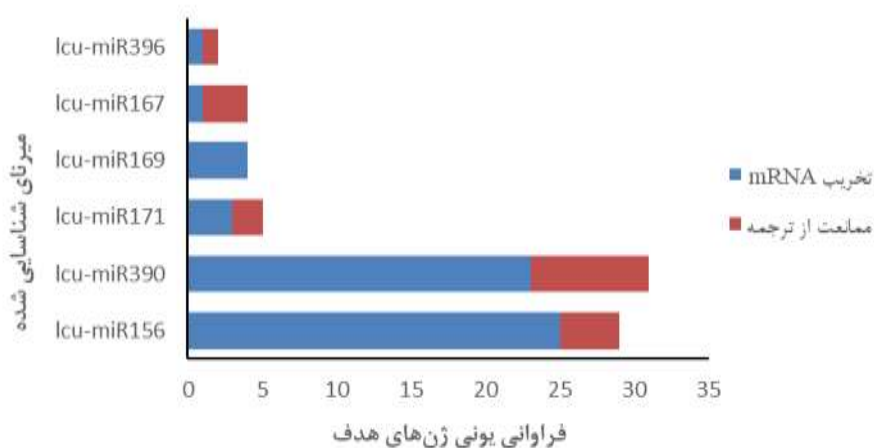
شناسایی شد (۴۸). در مطالعه‌ای مشابه نیز هفت میرنای محافظت شده در ترنسکرپتوم عدس تحت تنش گرما شناسایی شد (۳۴). احتمال حضور میرنا در توالی‌های ترنسکرپتومی طبق پژوهش ژانگ و همکاران (۷۶) ۰/۰۱ درصد گزارش شده است؛ با توجه به این موضوع می‌توان گفت که تعداد میرنای شناسایی‌شده در مطالعه حاضر نیز با محاسبات ارائه شده برای احتمال حضور میرنا در ترنسکرپتوم مطابقت دارد. نتایج بررسی ساختار ثانویه میرناهای شناسایی‌شده در مطالعه حاضر نشان داد که میانگین A/U برای شش میرنای شناسایی‌شده ۵۷ درصد می‌باشد. ساختار پیش‌ساز میرناهایی که درصد A+U بالایی دارند نسبت به دیگر فرم‌های RNA غنی از باندهای هیدروژنی می‌باشند. باندهای هیدروژنی و جفت شدن بازها اغلب باعث پایداری ساختار سنجاق سری میرناها می‌شوند (۷۵ و ۷۶). از این رو می‌توان گفت ساختار میرناهای شناسایی‌شده از نظر ویژگی درصد A/U وضعیت مناسبی دارند. میزان پارامتر MFEI مهم‌ترین عامل در تمایز انواع ساختار ثانویه در انواع RNA می‌باشد. کمترین مقدار این پارامتر برای تشخیص و تمایز RNA ریبوزومی (بیشتر از ۰/۵۹ کیلوکالری بر مول) و بیشترین مقدر آن برای تشخیص میرنا (بیشتر از ۰/۸۵ کیلوکالری بر مول) از سایر انواع RNA گزارش شده است (۷۷). میانگین و کمترین میزان پارامتر MFEI محاسبه شده در مطالعه حاضر به ترتیب ۱/۰۹ و ۰/۹۵ کیلوکالری بر مول می‌باشد که از کمینه مقدار گزارش شده برای تمایز میرنا بیشتر می‌باشند (جدول ۳).

خانواده میرناهای شناسایی‌شده در اغلب فعالیت‌های زیستی به‌خصوص پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارای نقش تنظیمی مهمی می‌باشند. بررسی نقش miR156 در آراییدوپسیس نشان داد که این گونه میرنا در تنظیم بیان ژن‌های SPL (*Squamosal promoter binding protein-like (SPL) genes*) نقش مستقیم داشته به طوری که بیش‌بین این گونه میرنا، فرآیندهای مختلف در دوره‌های مختلف رشد و نمو آراییدوپسیس را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۷۲). miR156 با تنظیم گلدهی به‌موقع در پاسخ به انواع تنش‌های محیطی از نقش بسیار مهمی برخوردار است. نتایج پژوهش کویی و همکاران (۱۴)

اختصاص دادند و در مقابل GO ترم‌های "فرآیندهای توسعه محور" و "پاسخ به محرک‌ها" کمترین میزان فراوانی را به خود اختصاص دادند. در گروه اجزای سلولی (CC)، سه GO ترم شامل "آناتومیک سلولی"، "درون‌سلولی" و "ترکیبات پروتئینی پیچیده" بیشترین میزان فراوانی ژنی را نشان دادند. "اتصال" و "فرآیندهای فروکافتی" دو GO ترمی بودند که فراوانی ژنی آنها در گروه عملکرد مولکولی (MF) نسبت به سایر GO ترم‌ها بیشتر بود. با توجه به نتایج هستی‌شناسی ژن‌های هدف می‌توان گفت، میرنا‌های شناسایی‌شده در مطالعه حاضر نیز مشابه با نتایج مطالعاتی که بر روی میرنا‌هایی که تاکنون شناسایی شده‌اند، 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 (۱۳-۱۱، ۳۷، ۳۸ و ۵۷).

تنظیمی عوامل رونویسی به‌طور عمومی با تنظیم‌کننده‌های مختلف از جمله میرناها برهمکنش دارند. فراوانی ژن‌های هدفی که تحت کنترل احتمالی میرنا‌های شناسایی‌شده قرار می‌گیرند و همچنین نحوه کنترل بیان آنها توسط میرنا‌های شناسایی‌شده در شکل ۲ ارائه شده است. در مطالعه حاضر بیشترین تعداد ژن هدف مربوط به میرنا‌های lcu-miR390 و lcu-miR156 و کمترین تعداد ژن هدف مختص به میرنای lcu-miR396 بود. از مجموع ۷۵ ژنی که توسط میرنا‌های شناسایی‌شده کنترل می‌گردند ۵۷ ژن از طریق تخریب mRNA و ۱۸ ژن از طریق ممانعت از ترجمه تنظیم می‌گردد.

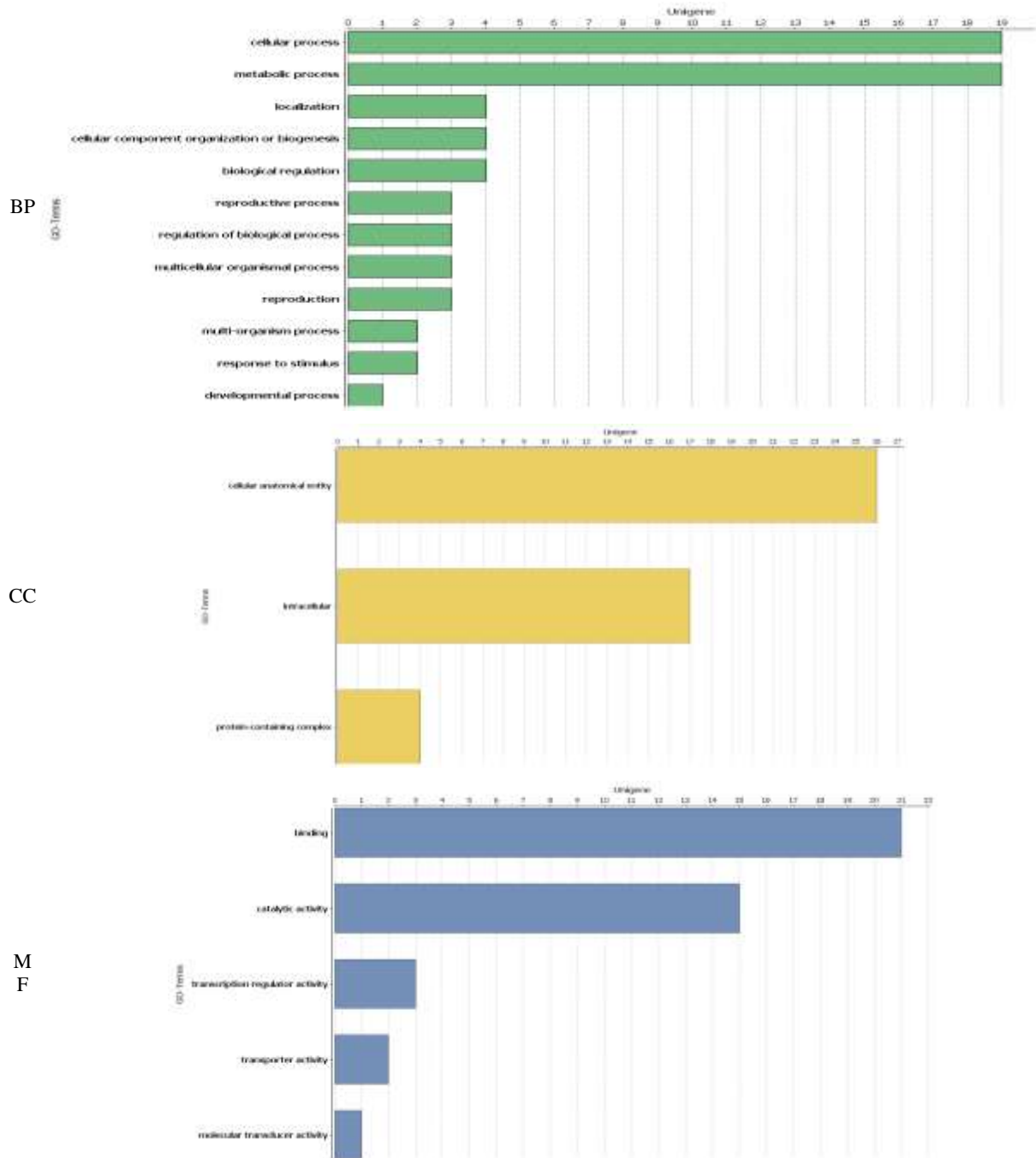
تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های هدف، نقش مهم این گروه از ژن‌ها در اغلب فرآیندهای زیستی را نشان داد (شکل ۳). در گروه فرآیندهای زیستی (BP)، فراوانی GO ترم‌های "فرآیندهای سلولی" و "فرآیندهای متابولیکی" بیشترین فراوانی را به خود



شکل ۲- فراوانی ژن‌های هدف میرنا و نحوه کنترل بیان آنها. شناسایی ژن‌های هدف با استفاده از پایگاه داده psRNATarget (۱۵) انجام شده است.

شناسایی‌شده در بافت ریشه بیشتر از بافت برگ بود. از سوی دیگر گروه‌بندی میرنا‌های شناسایی‌شده نشان داد که بیان lcu-miR156 نسبت به پنج میرنای دیگر متفاوت بوده، به‌طوری که بیان lcu-miR156 برخلاف سایر میرنا‌های شناسایی‌شده در بافت برگ بیشتر از بافت ریشه می‌باشد.

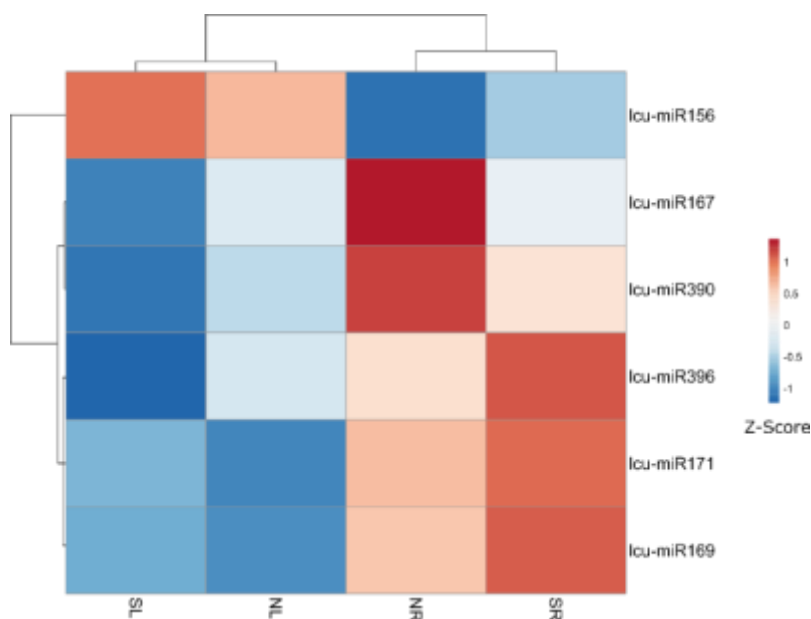
میزان بیان میرنا‌های شناسایی‌شده برحسب FPKM در بافت‌ها و شرایط محیطی نرمال و تنش شوری در قالب نقشه حرارتی (شکل ۴) ارائه شده است. نتایج بررسی بیان میرنا‌های شناسایی‌شده نشان داد که بیان این میرنا‌ها در بافت‌های برگ و ریشه نسبت به هم متفاوت بوده، به‌طوری که در هر دو حالت تنش و نرمال بیان میرنا‌های



شکل ۳- تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های هدف میرنا‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار Blast2GO (۱۳). محور عمودی و افقی به ترتیب درصد فراوانی ژن‌ها و ترم‌های سه زیرگروه فرآیندهای زیستی (BP)، اجزای سلولی (CC) و عملکرد مولکولی (MF) را نشان می‌دهند. تحلیل

تنظیم شبکه‌های ژنی را بر عهده داشته، اغلب با تنظیم بیان عوامل رونویسی اثر خود را بر کل شبکه تنظیمی نشان می‌دهند (۴۴ و ۵۷). در مطالعه حاضر هم‌ردیفی ژن‌های هدف میرنا‌های شناسایی شده علیه پایگاه داده عوامل رونویسی گیاهی نیز صورت گرفت.

مطالعه پگلا و همکاران (۵۴) نشان داد که بیان میرنا‌های مختلف تحت تنش شوری در آرابیدوپسیس، برنج، ذرت و گندم متفاوت می‌باشد و هر کدام از گیاهان مختلف سطوح مختلفی از بیان صفر تا چند برابر شدن بیان را نشان می‌دهند (۵۴). با توجه به اینکه اغلب میرناها سطح اولیه از



شکل ۴- نقشه‌ی حرارتی (Heat map) بیان میرناهای شناسایی شده (برحسب FPKM) در عدس تحت تنش شوری با استفاده از ابزار تحت وب heatmap (۵).

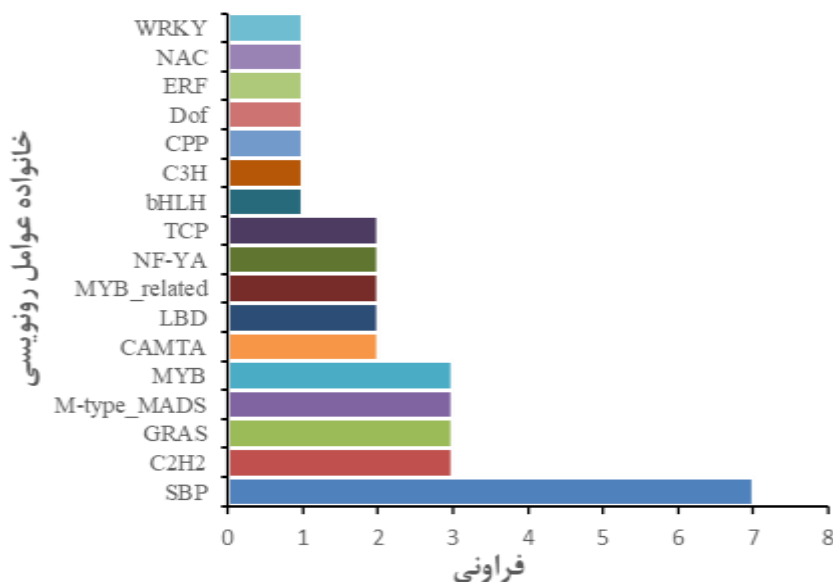
SL: نمونه تنش شوری برگ؛ NL: نمونه کنترل برگ؛ NR: نمونه کنترل ریشه؛ SR: نمونه تنش شوری ریشه

(Ethylene Response Factors) Dof (DNA binding with one)، (finger CPP)، (Cell Penetrating Peptides) C3H، (basic Helix-Loop-Helix) bHLH و (type finger motifs) کمترین میزان فراوانی را در بین اهداف میرناهای شناسایی شده به خود اختصاص دادند.

با توجه به اهمیت و فراوانی ژنی خانواده SBP به بررسی این خانواده پرداخته شد. تعداد ۱۶ عضو برای خانواده SBP در پایگاه TAIR ثبت شده است. در مطالعه وانگ و همکاران (۶۶) نقش عوامل رونویسی SBP که از جمله عوامل رونویسی ویژه گیاهان می‌باشد در پاسخ به تنش شوری در گز چینی (*Tamarix chinensis*) مورد تأیید قرار گرفته است. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ژن‌های SBP تنظیم‌کننده مهمی در تحمل تنش‌های غیرزیستی در بسیاری از گیاهان هستند (۶۳). مطالعات ژنتیکی گسترده‌ای نقش خانواده SBP و شبه پروتئین‌های آن‌ها را در گونه‌های گیاهی مختلف در پاسخ به انواع تنش‌های محیطی از جمله شوری، خشکی، سرما و گرما را تأیید می‌نماید (۴۵). برخی از این عوامل رونویسی با تنظیم بیان ژن‌های درگیر در فرآیند انتقال پیام، مهار گونه‌های واکنش‌دهنده اکسیژن

نتایج نشان داد که بیش از ۵۰ درصد از ژن‌های هدف مورد بررسی اعضای خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی می‌باشند (شکل ۵). نتایج مطالعه حسینی و همکاران (۳۴) نیز نشان داد که میرناهای حفاظت شده و ژن‌های هدف آن‌ها در پاسخ به تنش گرما در عدس، بیان فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در پاسخ به تنش گرما مانند HSF (Heat Shock transcription Factor) را تنظیم می‌کنند. میرناها با کنترل بیان عوامل رونویسی، به‌طور غیرمستقیم بیان ژن‌های متعدد دیگری را کنترل می‌کنند. نتایج نشان داد که بیشترین تأثیر میرناهای شناسایی شده بر خانواده SBP (Squamosa promoter binding protein) بوده و پس از آن خانواده‌های C2H2 (Cys2-His2 protein, C2H2)، GRAS (Gibberellin Acid Insensitive (Gai), Repressor Of M-type_MADS (Ga1 (Rga) and Scarecrow (Scr) Minichromosome maintenance factor 1, Agamous from *Arabidopsis*, Deficiens from *Antirrhinum majus*, Serum response factor) MYB (Myeloblastosis) دارای بیشترین ژن‌های هدف برای میرناهای شناسایی شده در این مطالعه بودند. در مقابل خانواده‌های WRKY (WRKY and the zinc-finger-) WRKYGQK و (like motifs Cys(2)-His (NAM, ATAF and CUC)NAC، ERF

منفی دیگر خانواده‌های عوامل رونویسی شناسایی شده در گونه‌های مختلف گیاهی مورد تأیید قرار گرفته است (۵۴) و (۶۶).



شکل ۵- توزیع فراوانی خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی که توسط میرنا‌های شناسایی شده کنترل می‌شوند. از پایگاه داده PlantTFDB (۳۶) جهت شناسایی عوامل رونویسی استفاده شده است.

باشد و شش میرنای شناسایی شده در این مطالعه نیز به‌عنوان کلیدهای زیستی نقش مهمی در این مکانیسم بر عهده دارند. هرچند روند بیان میرنا‌های شناسایی شده در بافت‌های مختلف متفاوت بود با این حال نمی‌توان از تأثیر آن‌ها بر ژن‌های هدفشان در دو بافت برگ و ریشه چشم‌پوشی نمود. از مهم‌ترین اهداف میرنا‌های شناسایی شده در این مطالعه می‌توان به خانواده عوامل رونویسی SBP اشاره نمود. همچنین نتایج هستی‌شناسی ژن‌های هدف نیز گستردگی عملکرد ژن‌های هدف این میرناها را به‌خوبی مشخص نمود. با این حال تأیید ژن‌های هدف شناسایی شده در این مطالعه نیاز به بررسی آزمایشگاهی بیشتر دارد. به‌طور کلی مجموعه میرناها و ژن‌های هدف شناسایی شده در مطالعه حاضر می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای مفید برای پژوهش‌های عمیق‌تر و دقیق‌تر در مورد نقش میرناها در پاسخ به تنش شوری عدس محسوب شود.

(Reactive Oxygen Species, ROS)، تجمع POD/SOD (Superoxide dismutase/Peroxidase (POD))، سنتز پرولین و متابولیسم آنتوسیانین در پاسخ به تنش خشکی و شوری شرکت می‌کنند (۵۱). در مطالعات مختلف تنظیم مثبت یا

نتیجه‌گیری کلی

عدس هرچند از نظر تغذیه‌ای و زراعی دارای اهمیت جهانی می‌باشد، با این حال برنامه‌های اصلاحی آن نسبت به سایر حبوبات مهم با سرعت کمتری پیش می‌رود. حجم ژنوم بالا و فراوانی بالای توالی‌های تکراری در DNA این گیاه از جمله عوامل محدودکننده‌ی پروژه ژنوم عدس به‌شمار می‌رود، که سایر برنامه‌های ژنتیکی این گیاه را نیز تحت شعاع قرار می‌دهد. در مطالعه‌ی حاضر به‌منظور استفاده از ظرفیت داده‌های حاصل از توالی‌یابی در شناخت ژن‌ها و عوامل دخیل در کنترل فرآیندهای زیستی عدس، سرهم‌بندی ترنسکرپتوم با استفاده از مجموعه داده‌های جمع‌آوری شده در شرایط نرمال و تنش شوری صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مکانیسم پاسخ عدس به تنش شوری دارای ابعاد پیچیده و گسترده‌ای می‌-

منابع

1. Abazarian R, Yazdani MR, Khosroyar K, Arvin P. 2011. Effects of different levels of salinity on germination of four components of lentil cultivars. *African Journal of Agricultural Research*: 6(12):2761-2766.
2. Alisoltani A, Ebrahimi S, Azarian S, Hematyar M, Shiran B, Jahanbazi H, Fallahi H, Mousavi-Fard S, Rafiei F. 2016. Parallel consideration of SSRs and differentially expressed genes under abiotic stress for targeted development of functional markers in almond and related *Prunus* species. *Scientia Horticulturae*: 198:462-472.
3. Alzahrani SM, Alaraidh IA, Khan MA, Migdadi HM, Alghamdi SS, Alsahli AA. 2019. Identification and characterization of salt-responsive microRNAs in *Vicia faba* by high-throughput sequencing. *Genes*: 10(4):303.
4. Arumuganathan K, Earle E. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant molecular biology reporter*: 9(3):208-218.
5. Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, Wishart DS. 2016. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. 44(W1):W147-W153.
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. Bohra A, Pandey MK, Jha UC, Singh B, Singh IP, Datta D, Chaturvedi SK, Nadarajan N, Varshney RK. 2014. Genomics-assisted breeding in four major pulse crops of developing countries: present status and prospects. *Theoretical and Applied Genetics*: 127(6):1263-1291.
8. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*: 30(15):2114-2120.
9. 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(17):2911-2917.
10. Carnavale Bottino M, Rosario S, Grativol C, Thiebaut F, Rojas CA, Farrineli L, Hemerly AS, Ferreira PCG. 2013. High-throughput sequencing of small RNA transcriptome reveals salt stress regulated microRNAs in sugarcane. *PLoS one*: 8(3):e59423.
11. Chen PY, Manninga H, Slanchev K, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, John B, Marks DS, Gaidatzis D. 2005. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes & development*: 19(11):1288-1293.
12. Chen X. 2005. microRNA biogenesis and function in plants. *FEBS letters*: 579(26):5923-5931.
13. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles MJB. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. 21(18):3674-3676.
14. Cui LG, Shan JX, Shi M, Gao JP, Lin HX. 2014. The miR156-SPL 9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *The Plant Journal*: 80(6):1108-1117.
15. Dai X, Zhao PX. 2011. psRNAtarget: a plant small RNA target analysis server. 39(suppl_2):W155-W159.
16. Deng P, Wang L, Cui L, Feng K, Liu F, Du X, Tong W, Nie X, Ji W, Weining S. 2015. Global identification of microRNAs and their targets in barley under salinity stress. *PLoS One*: 10(9):e0137990.
17. Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z, Zheng Y. 2009. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of botany*: 103(1):29-38.
18. Du T, Zamore PD. 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA.
19. Duan J, Xia C, Zhao G, Jia J, Kong X. 2012. Optimizing de novo common wheat transcriptome assembly using short-read RNA-Seq data. *BMC genomics*: 13(1):1-12.
20. El-Monem A, Sharaf M. 2008. Tolerance of five genotypes of lentil to NaCl-salinity stress. *New York Science Journal*: 1:70-80.
21. Fu R, Zhang M, Zhao Y, He X, Ding C, Wang S, Feng Y, Song X, Li P, Wang B. 2017. Identification of salt tolerance-related microRNAs and their targets in maize (*Zea mays* L.) using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Frontiers in plant science*: 8:864.
22. Gao P, Bai X, Yang L, Lv D, Pan X, Li Y, Cai H, Ji W, Chen Q, Zhu Y. 2011. osa-MIR393: a salinity-and alkaline stress-related microRNA gene. *Molecular biology reports*: 38(1):237-242.
23. Gilbert D. 2016. Accurate & complete gene construction with EvidentialGene. Galaxy Community Conference.
24. Gleave AP, Ampomah-Dwamena C, Berthold S, Dejnopratt S, Karunaitnam S, Nain B, Wang Y-Y, 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(2):343-358.
25. Goossens A, Häkkinen ST, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Söderlund H, Zabeau M. 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 100(14):8595-8600.
26. Goudarzi M, Pakniyat H. 2008. Comparison between salt tolerance of various cultivars of wheat and maize. *Journal of Applied Sciences*: 8(12):2300-2305.
27. Goudarzi M, Pakniyat H. 2008. Evaluation of wheat cultivars under salinity stress based on some

- agronomic and physiological traits. *Journal of Agriculture and Social Science*: 4:35-38.
28. Goudarzi M, Pakniyat H. 2009. Salinity causes increase in proline and protein contents and peroxidase activity in wheat cultivars. *Journal of Applied Sciences*: 9(2):348-353.
 29. Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. 2011. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*: 29(7):644-652.
 30. Gupta OP, Meena NL, Sharma I, Sharma P. 2014. Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. *Molecular Biology Reports*: 41(7):4623-4629.
 31. Hamdy A, Katerji N, Mastrorilli M, Ameen A. 2000. Lentil (*Lens culinaris* Med.) sensitivity to salinity through the water use efficiency. *International Symposium on Techniques to Control Salination for Horticultural Productivity 573*: p. 311-319.
 32. Hammond SM. 2015. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*: 87:3-14.
 33. He F, Xu C, Fu X, Shen Y, Guo L, Leng M, Luo K. 2018. The MicroRNA390/TRANS-ACTING SHORT INTERFERING RNA3 module mediates lateral root growth under salt stress via the auxin pathway. *Plant Physiology*: 177(2):775-791.
 34. Hosseini SZ, Ismaili A, Nazarian-Firouzabadi F, Fallahi H, Rezaeineja A. 2021. Identification and characterization of conserved miRNAs in lentil. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*: 34(1):143-154.
 35. Hosseini SZ, Ismaili A, Nazarian-Firouzabadi F, Fallahi H, Nejad AR, Sohrabi SSJG. 2021. Dissecting the molecular responses of lentil to individual and combined drought and heat stresses by comparative transcriptomic analysis. *113(2)*:693-705.
 36. Jin J, Tian F, Yang D-C, Meng Y-Q, Kong L, Luo J, Gao GJNar. 2016. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *gkw982*.
 37. Jung HJ, Park SJ, Kang H. 2013. Regulation of RNA metabolism in plant development and stress responses. *Journal of Plant Biology*: 56(3):123-129.
 38. Jung J-H, Seo PJ, Park C-M. 2009. MicroRNA biogenesis and function in higher plants. *Plant Biotechnology Reports*: 3(2):111-126.
 39. Khazaei H, Caron CT, Fedoruk M, Diapari M, Vandenberg A, Coyne CJ, McGee R, Bett KE. 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.
 40. Lee H, Yoo SJ, Lee JH, Kim W, Yoo SK, Fitzgerald H, Carrington JC, Ahn JH. 2010. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. *Nucleic acids research*: 38(9):3081-3093.
 41. Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, Helliwell CA, Ito T, Meyerowitz E, Yu H. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental cell*: 15(1):110-120.
 42. Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*: 22(13):1658-1659.
 43. 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(9):e29462.
 44. Mandhan V, Kaur J, Singh K. 2012. smRNAome profiling to identify conserved and novel microRNAs in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC plant biology*: 12(1):1-15.
 45. Mao H-D, Yu L-J, Li Z-J, Yan Y, Han R, Liu H, Ma M. 2016. Genome-wide analysis of the SPL family transcription factors and their responses to abiotic stresses in maize. *Plant Gene*: 6:1-12.
 46. Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*: 17(1):10-12.
 47. Mathiyalagan R, Subramaniam S, Natarajan S, Kim YJ, Sun MS, Kim SY, Kim Y-J, Yang DC. 2013. In silico profiling of microRNAs in Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer). *Journal of Ginseng Research*: 37(2):227.
 48. Mehta A, Baltimore D. 2016. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nature Reviews Immunology*: 16(5):279.
 49. 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*: 1-14.
 50. Mir Drikvand R, Sohrabi SS, Sohrabi SM, Samiei K. 2019. Identification and characterization of conserved miRNAs of *Coriandrum sativum* L. using next-generation sequencing data. *Crop Biotechnology*: 9(25):59-74.
 51. Ning K, Chen S, Huang H, Jiang J, Yuan H, Li H. 2017. Molecular characterization and expression analysis of the SPL gene family with BpSPL9 transgenic lines found to confer tolerance to abiotic stress in *Betula platyphylla* Suk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*: 130(3):469-481.
 52. Ono H, Ishii K, Kozaki T, Ogiwara I, Kanekatsu M, Yamada T. 2015. Removal of redundant contigs from de novo RNA-Seq assemblies via homology search improves accurate detection of differentially expressed genes. *BMC genomics*: 16(1):1-13.
 53. Padmashree D, Ramachandraswamy N. 2016. Identification and characterization of conserved miRNAs with its targets mRNA in *Trichinella Spiralis*. *Bioinformatics*: 12(5):279.
 54. Pegler JL, Grof CP, Eamens AL. 2018. Profiling of the differential abundance of drought and salt stress-responsive microRNAs across grass crop and genetic model plant species. *Agronomy*: 8(7):118.

55. Quinlan AR. 2014. BEDTools: the Swiss-army tool for genome feature analysis. *Current protocols in bioinformatics*: 47(1):11.12. 11-11.12. 34.
56. Rahimi A, Norton R, McNeil D, Hoseini SM. 2009. Effects of Salinity and Temperature on Germination, Seedling Growth and Ion Relations of Two Lentil (*Lens culinaris*) Cultivars. *Seed Technology*:76-86.
57. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *cell*: 110(4):513-520.
58. Singh VK, Singh AK, Singh S, Singh BD. Springer; 2015. Next-generation sequencing (NGS) tools and impact in plant breeding. *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*: p. 563-612.
59. Smith-Unna R, Bournsnel C, Patro R, Hibberd JM, Kelly S. 2016. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome research*: 26(8):1134-1144.
60. Sohrab SS, Ismaili A, Nazarian F, Fallahi H. 2019. Identification and characterization of conserved miRNAs in lentil. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*: 32(4):432-444.
61. Sohrabi SS, Ismaili A, Nazarian-Firouzabadi F, Fallahi H, Hosseini SZ. 2022. Identification of key genes and molecular mechanisms associated with temperature stress in lentil. *Gene*: 807:145952.
62. Srivastava R, Vasishtha H. 2012. Saponins and lectins of Indian chickpeas (*Cicer arietinum*) and lentils (*Lens culinaris*). *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*: 25(1):44-47.
63. Stief A, Altmann S, Hoffmann K, Pant BD, Scheible W-R, Bäurle I. 2014. Arabidopsis miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *The Plant Cell*: 26(4):1792-1807.
64. Sunkar R, Jagadeeswaran G. 2008. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC plant biology*: 8(1):1-13.
65. Unamba CI, Nag A, Sharma RK. 2015. Next generation sequencing technologies: the doorway to the unexplored genomics of non-model plants. *Frontiers in plant science*: 6:1074.
66. Wang J, Ye Y, Xu M, Feng L, Xu L-a. 2019. Roles of the SPL gene family and miR156 in the salt stress responses of tamarisk (*Tamarix chinensis*). *BMC plant biology*: 19(1):1-11.
67. Wang M, Wang Q, Wang B. 2012. Identification and Characterization of MicroRNAs in Asiatic Cotton (*Gossypium arboreum* L.). *PLOS ONE*: 7(4):e33696.
68. Wang S, Zhou G, Huang X, Hu J, Wang B, Lin C, Li X, Jia Y, Wang A. 2017. Transcriptome analysis of non-heading Chinese cabbage under heat stress by RNA-seq and marker identification. *Euphytica*: 213(5):109.
69. Wang S, Zhou H, Wu J, Han J, Li S, Shao S. 2017. Transcriptomic Analysis Reveals Genes Mediating Salt Tolerance through Calcineurin/CchA-Independent Signaling in *Aspergillus nidulans*. *BioMed Research International*: 2017.
70. Xie F, Frazier TP, Zhang B. 2010. Identification and characterization of microRNAs and their targets in the bioenergy plant switchgrass (*Panicum virgatum*). *Planta*: 232(2):417-434.
71. Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC. 2005. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant physiology*: 138(4):2145-2154.
72. Xu M, Hu T, Zhao J, Park M-Y, Earley KW, Wu G, Yang L, Poethig RS. 2016. Developmental functions of miR156-regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics*: 12(8):e1006263.
73. Yin Z, Li C, Han X, Shen F. 2008. Identification of conserved microRNAs and their target genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Gene*: 414(1-2):60-66.
74. Yuan S, Zhao J, Li Z, Hu Q, Yuan N, Zhou M, Xia X, Noorai R, Saski C, Li S. 2019. MicroRNA396-mediated alteration in plant development and salinity stress response in creeping bentgrass. *Horticulture research*: 6(1):1-13.
75. Zhang B, Pan X, Anderson TA. 2006. MicroRNA: a new player in stem cells. *Journal of cellular physiology*: 209(2):266-269.
76. Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. 2006. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*: 46(2):243-259.
77. Zhang B, Pan X, Cox S, Cobb G, Anderson T. 2006. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*: 63(2):246-254.
78. Zhao B, Ge L, Liang R, Li W, Ruan K, Lin H, Jin Y. 2009. Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC molecular biology*: 10(1):1-10.
79. Zhao M, Ding H, Zhu JK, Zhang F, Li WX. 2011. Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New phytologist*: 190(4):906-915.
80. Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*: 31(13):3406-3415.

Identification and expression analysis of salt stress-related miRNAs in Lentil (*Lens culinaris* L.)

Goudarzi M., Ismaili A., Sohrabi S.S., Farhad Nazarian-Firouzabadi F., and Eisvand H.R.

Dept. of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) constitute a family of small RNA (sRNA) population that regulates gene expression at the post-transcriptional levels by targeting mRNAs for degradation or by inhibiting protein translation. Although thousands of miRNAs have been identified in many plant species, no studies have been reported on discovering conserved stress-related miRNAs in lentil (*Lens culinaris*), one of the most important staple food crops in Iran and developing countries. The present study was performed to identify the conserved miRNAs and their target genes in the lentil transcriptome under salt stress. In this study, 55892 unigenes from the de novo assembly process of a set of short reads derived from RNA sequencing (RNA-seq) technology of lentil under control and salt stress conditions were used for the prediction of conserved miRNAs and their target genes. Finally, six potential miRNAs named lcu-miR156, lcu-miR167, lcu-miR169, lcu-miR171, lcu-miR396, and lcu-miR390, which belong to six conserved families, were identified. The identified miRNAs exhibited differential expression under salt stress. The results showed that the target genes of the identified miRNAs play important roles in most biological processes, including differentiation, growth, signaling, and responses to biotic and abiotic stresses. In addition, the results showed that some transcription factors belonging to SBP, C2H2, GRAS, M-type_MADS and MYB families are widely affected by the regulatory process of identified miRNAs. In general, the set of miRNAs and their target genes identified in the present study can be used as a useful basis for more in-depth and accurate research on the role of miRNAs in the response of lentil to salt stress.

Keywords: Salt stress, miRNA, Lentil, Transcriptome