

## شناسایی miRNA ها و ژن های هدف بالقوه آنها در گلرنگ زراعی (*Carthamus tinctorius* L)

### Identification of conserved miRNAs and their putative target genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L)

فرشید کوهی<sup>۱</sup>، کریم سرخه<sup>۲\*</sup>، سزای ایرسیزلی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

۲- استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

۳- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه آتاتورک ترکیه

Kouhi F<sup>1</sup>, Sorkheh K<sup>\*2</sup>, Ercisli S<sup>2</sup>

1- MSc Student, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz

2- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

3- Professor, Agricultural Faculty, Ataturk University, Turkey

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: karimsorkheh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

## چکیده

microRNA ها (miRNA) گروهی از RNA های غیر کد کننده و کوتاه (~۲۱ نوکلئوتید) هستند که از طریق تنظیم بیان ژن ها در سطح پس از رونویسی نقش کلیدی را در توسعه و فیزیولوژی گیاه ایفا می کنند. از آنجایی که تاکنون مطالعه جامعی در رابطه با شناسایی miRNA های گلرنگ به روش *in silico* انجام نشده است، در این پژوهش با آنالیز توالی های ژنومی، ۱۲۴ miRNA بالقوه متعلق به ۲۶ خانواده حفاظت شده، شناسایی و حضور ۲ مورد از آنها در ژنوم گلرنگ با استفاده از RT-qPCR تأیید شد. این ۲۹ خانواده miRNA به طور چشم گیری در اندازه متفاوت هستند. آنالیز توالی های pre-miRNA نشان داد که طول این پیش سازها در گلرنگ از ۵۷ تا ۳۱۷ با میانگین  $40/1 \pm 95/88$  نوکلئوتید متغیر است. دیگر نتیجه مهم به دست آمده در این مطالعه، موفقیت در تعیین کلاسترهای miR169، miR395 و miR397 در ژنوم گلرنگ بود. در مطالعه پیش رو برای نخستین بار اعضای خانواده های miR393، miR477، miR530، miR6111، miR6113 و miR6114 در ژنوم گلرنگ شناسایی شد. با استفاده از پروتکل های ارائه شده در مطالعات پیشین، در مجموع ۸۴ ژن هدف بالقوه برای miRNA های گلرنگ شناسایی شد. ژن های هدف این قبیل از ژن ها، فاکتورهای رونویسی، پروتئین های دخیل در همانندسازی DNA و آنزیم های متابولیکی را شامل می شوند. نتایج این مطالعه نشان داد که miRNA های حفاظت شده در گلرنگ وجود دارند و می توانند عملکرد مؤثری در پاسخ به تنش های محیطی نیز داشته باشند.

## واژه های کلیدی

کلاستر

*Carthamus tinctorius*  
*in silico*  
miRNA  
RT-qPCR

## مقدمه

گلرنگ زراعی (*Carthamus tinctorius* L.) یکی از مهم ترین محصولات دانه روغنی با عملکردی حدود ۴۰-۳۰ درصد روغن است که به عنوان منبعی برای تولید روغن های صنعتی، علوفه دام، عصاره های دارویی و رنگ های خوراکی در نظر گرفته می شود (Goodman 1964; Weiss 1971). با وجود اهمیت گلرنگ در بین محصولات زراعی، دانش اندکی در مورد سازمان دهی این گونه در سطح مولکولی به ویژه در ارتباط با کنترل بیان ژن ها وجود دارد. miRNA ها گروهی از RNA های کوتاه تنظیمی هستند که به طور منفی بیان ژن ها را در سطوح پس از رونویسی و از طریق اتصال به توالی mRNA هدف به صورت ایجاد برش و یا ممانعت از ترجمه تنظیم می کنند (Zhang et al. 2006a). در گیاهان، miRNA ها اغلب با ایجاد برش در رونوشت های mRNA عمل تنظیم بیان ژن ها را انجام می دهند (Rhoades et al. 2002; Bartel 2004). با توجه به نوع فعالیت miRNA ها در سلول، دخالت این RNA های کوتاه در بسیاری از فرایندهای متابولیکی و بیولوژیکی گیاهان از جمله نمو برگ ها (Palatnik et al. 2003)، رشد ریشه و ساقه (Guo et al. 2005; Williams et al. 2005)، هدایت سیگنال (Zhao et al. 2004) و تحمل به تنش های محیطی (Achard et al. 2004; Sunkar et al. 2009) به خوبی روشن شده است.

از زمان کشف اولین miRNA ها در گیاهان (Park 2002; Reinhart et al. 2002)، در مجموع ۸۳۷۵ miRNA بالغ در ۷۲ گونه گیاهی گزارش و در پایگاه های اطلاعاتی miRNA ثبت شده است (miRBase 21.0; <http://www.mirbase.org>). تعداد این miRNA ها به عنوان نتایج حاصل از مطالعات شناسایی miRNA های حفاظت شده و جدید از طریق روش های محاسباتی (*in silico*) و روش های آزمایشگاهی از قبیل کلونینگ<sup>۱</sup> مستقیم و توالی یابی عمیق<sup>۲</sup> در حال افزایش است. با این وجود تنها بخشی از miRNA های گیاهی شناسایی شده است و به دلیل محدودیت روش های تجربی، عملکرد بسیاری از آن ها تاکنون مشخص نشده است. در سال های اخیر پروژه های آزمایشگاهی به منظور شناسایی miRNA های گلرنگ زراعی نیز صورت گرفته است (Li et al. 2011).

<sup>1</sup> Direct Cloning<sup>2</sup> Deep Sequencing

(Cao et al. 2013; 2011) با این حال تاکنون هیچ توالی از miRNA های این گونه در پایگاه های اطلاعاتی miRNA ثبت نشده است.

در حالی که کلونینگ و توالی یابی عمیق مستقیم ترین راه برای شناسایی miRNA ها هستند، به دلیل این که بسیاری از خانواده های miRNA تکامل حفاظت شده ای دارند، روش های محاسباتی استراتژی های مفیدی را برای شناسایی غیرمستقیم miRNA ها ارائه می دهند (Zang et al. 2005). رویکرد جامعی را برای شناسایی miRNA ها با استفاده از توالی های موجود در پایگاه های اطلاعاتی EST معرفی کردند که می توان از این روش به منظور شناسایی miRNA ها در سایر توالی های ژنومیک، از جمله توالی های موجود در پایگاه های اطلاعاتی WGS و GSS نیز استفاده کرد (Sunkar and Jagadeeswaran 2008). اخیراً، ۶۳۹۰۶ کانتیگ از یک پروژه توالی یابی ژنوم (Whole Genome Shotgun Sequencing یا WGS) مربوط به گیاه گلرنگ زراعی در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شده است (بر اساس اطلاعات جمع آوری شده در ۲۷ آوریل ۲۰۱۶). این توالی ها می توانند منبع با ارزشی برای شناسایی miRNA های بالقوه در گلرنگ باشند. در مطالعه پیش رو، براساس الگوریتم BLASTn، همولوژی miRNA های ثبت شده در mirBase در برابر تمام توالی های WGS به منظور یافتن توالی های همولوگ بررسی شده است. همچنین با استفاده از یک روش مشابه اقدام به شناسایی ژن های هدف شد که نتیجه آن به دست آمدن توالی هایی بالقوه به عنوان هدف هر خانواده miRNA بود.

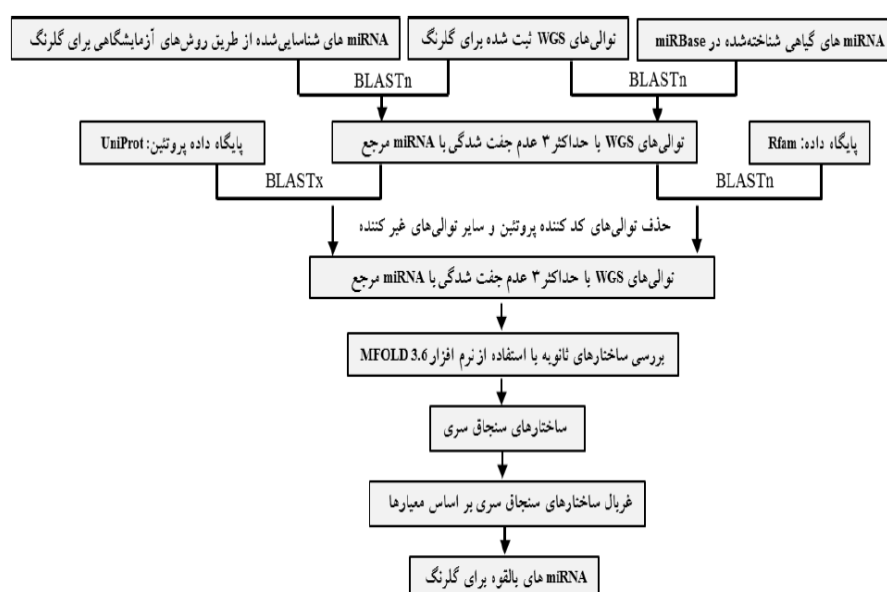
## مواد و روش ها

به منظور شناسایی miRNA های حفاظت شده در گلرنگ زراعی، مجموعاً ۸۳۷۵ miRNA بالغ از ۷۲ گونه گیاهی از پایگاه اطلاعاتی miRNA (miRBase 21.0) دانلود شد. پس از حذف توالی های تکراری، ۴۱۶۵ توالی منحصر به فرد برای آنالیز براساس همولوژی به دست آمد. در کنار miRNA های ثبت شده، از miRNA های شناسایی شده در مطالعات پیشین بر روی گلرنگ زراعی نیز به عنوان miRNA مرجع استفاده شد (Li et al. 2011).

بررسی شد. در ادامه با کمک نرم افزار مبتنی بر وب mfold (Zuker 2003) ساختار ثانویه Pre- miRNA توالی های باقی مانده بررسی شد. در شناسایی ساختارهای ساقه-حلقه پارامترهای پیش فرض mfold در نظر گرفته شد. از نتایج به دست آمده، توالی هایی به عنوان کاندید برای کد کردن miRNA در نظر گرفته شد که با معیارهای زیر مطابقت داشتند: ۱. تاخوردگی مناسب در ساختار ساقه-حلقه ۲. توالی miRNA باید تنها بر روی یک بازوی ساختار ساقه-حلقه قرار داشته باشد ۳. هیچ نوع شکستگی و یا برآمدگی در توالی miRNA و miRNA\* نباید وجود داشته باشد ۴. نباید بیش از ۶ عدم جفت شدگی و بیش از ۵ جفت شدگی G:U بین miRNA بالغ و توالی مکمل آن (miRNA\*/ miRNA) وجود داشته باشد ۵. ساختار ثانویه شناسایی شده باید پایین ترین مقدار MFE و بالاترین مقدار MFEI را داشته باشد (شکل ۱). اتصال کامل و از طرفی حفاظت شده بودن محل اتصال miRNAها، شناسایی بیوانفورماتیکی ژن های هدف را امکان پذیر می کند. در پژوهش حاضر، علاوه بر توالی های WGS از توالی های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی EST گلرنگ نیز برای شناسایی ژن های هدف استفاده شد.

(Cao et al. 2013). با توجه به محدود بودن تعداد توالی های ثبت شده از ترنسکرپتوم گلرنگ (تقریباً ۴۱۵۸۶ توالی در پایگاه اطلاعاتی EST)، در این مطالعه تصمیم گرفته شد از توالی های ژنومیک گلرنگ قابل دسترس در پایگاه اطلاعاتی GenBank برای این هدف استفاده شود. نتایج حاصل از توالی یابی ژنوم گلرنگ زراعی شامل ۴۶۳۹۰۶ کانتیگ ثبت شده توسط Bowers et al. (2016) به این منظور استفاده شد.

miRNAهای بالقوه مطابق با رویکردهای محاسباتی استفاده شده در مطالعات گذشته (Zang et al. 2005) با تغییراتی مختصر شناسایی شد. به طور خلاصه، ابتدا توالی miRNAهای مرجع به منظور شناسایی توالی های همولوگ در برابر تمام کانتیگ های WGS گلرنگ با استفاده از الگوریتم BLASTn (ورژن: 2.3.0) جستجو شد. از بین توالی های یافت شده، توالی هایی دارای حداکثر ۳ عدم جفت شدگی با miRNA مرجع برای اجرای مراحل بعد گزینش شدند. با استفاده از جستجو مبتنی بر BLASTx و BLASTn، همولوژی توالی های منحصر به فرد به دست آمده در برابر پایگاه های اطلاعاتی پروتئین (Uni Prot) و پایگاه اطلاعاتی RNAهای غیر کدکننده (Rfam:13.0) به ترتیب باهدف شناسایی و حذف توالی های کد کننده پروتئین و سایر توالی های غیر کدکننده



شکل ۱- سلسله مراتب شناسایی miRNAها در گلرنگ زراعی

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برای miRNA ها و ژن کنترل

|        | Primer  | Sequence (5'→3')                                    | Length     | Tm     | GC%  |     |
|--------|---------|-----------------------------------------------------|------------|--------|------|-----|
| miR398 | RT      | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAGGGG | 18         | 62.3   | 57.9 |     |
|        | Forward | GCAGTGTGTTCTCAGGTCG                                 |            |        |      |     |
|        | miRNA   | TGTGTTCTCAGGTCGCCCCCTG                              |            |        |      |     |
| miR408 | RT      | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGCCAG | 18         | 62.8   | 61.1 |     |
|        | Forward | CGTTGCACTGCCTCTTTCC                                 |            |        |      |     |
|        | miRNA   | TGCACTGCCTCTTCCCTGGCT                               |            |        |      |     |
|        | Reverse | GTGCAGGGTCCGAGGT                                    | 16         | 63.1   | 68.8 |     |
|        | Primer  | Sequence (5'→3')                                    | Gene ID    | Length | Tm   | GC% |
| Actin  | Forward | TGGAATGGAAGCGGCTGGTA                                | KJ634809.1 | 182    | 62   | 55  |
|        | Reverse | CTTGATCTTCATACTGCTTGG                               |            |        | 60   | 52  |

RNA (۲۰۰ نانوگرم) به همراه ۱ میکرولیتر آغازگر ساقه-حلقه (۱) میکرومولار) و ۵/۵ میکرو لیتر از آب عاری از نوکلئاز به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C انکوبه گردید و سپس به ظرف حاوی یخ به مدت ۲ دقیقه منتقل شد. در ادامه به مخلوط به دست آمده به ترتیب ۲ میکرو لیتر بافر واکنش (۵x) و ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس اضافه شد. واکنش رونویسی معکوس به ترتیب در دمای ۱۶°C به مدت ۳۰ دقیقه برای ۱ سیکل؛ ۳۰°C، ۳۰ ثانیه؛ ۴۲°C، ۳۰ ثانیه، ۵۰°C، ۱ ثانیه برای ۶۰ سیکل انجام گرفت و با انکوباسیون در دمای ۸۵°C به مدت ۵ دقیقه پایان یافت.

واکنش qPCR با استفاده از مخلوط واکنش تاکارا، حاوی SYBR Green و آغازگر رفت اختصاصی و برگشت عمومی در حجم ۱۰ میکرولیتر توسط دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus انجام شد. پس از اجرای واکنش qPCR تفاوت در سطوح بیان miRNA ها از طریق مقایسه میانگین C<sub>T</sub> ها بررسی شد و به منظور مقایسه نسبی بیان آن ها، نرمال سازی نتایج به دست آمده با استفاده از ژن اکتین صورت گرفت و به روش 2<sup>-ΔΔCT</sup> عمل شد (Schmittgen and Livak 2008). مقایسه بین نمونه ها با استفاده از آزمون T-test دوتایی انجام شد.

### نتایج

به منظور شناسایی miRNA های حفاظت شده، جستجو بر مبنای همولوژی در توالی های WGS موجود در پایگاه اطلاعاتی GenBank با استفاده از ۴۱۶۵ توالی miRNA بالغ از گونه های

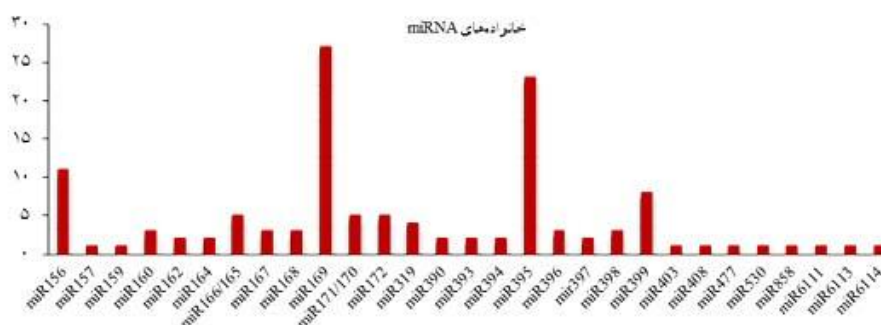
برای شناسایی محل اتصال miRNA ها به ژن هدف با استفاده از نرم افزار آنالین psRNA Target و مطابق ضوابط زیر عمل شد: ۱. بیش از ۴ عدم جفت شدگی در محل اتصال مجاز نیست ۲. جفت نشدن بازها در موقعیت ۱۰ و ۱۱ محل برش mRNA قابل قبول نیست ۳. حداکثر ۴ جفت شدگی G:U در محل اتصال مجاز است ۴. بر اساس رویکرد تعریف شده توسط (Lu et al. 2005)، امتیاز ≥۴ برای الگوهای جفت نشدگی در محل دوبلکس miRNA\*/mRNA در نظر گرفته شد. همچنین، به منظور درک بهتر عملکرد اهداف miRNA ها از نرم افزار Blast2GO (ورژن 4.1) برای بررسی Gene Ontology آن ها استفاده شد (Conesa et al. 2005).

نمونه های برگ و ریشه از گیاهچه های گلرنگ (رقم سینا: PI-537598) پس از رشد در گلخانه دانشگاه شهید چمران اهواز جمع آوری و در نیتروژن مایع فریز شدند. استخراج RNA کل از دو تکرار بیولوژیک با استفاده از کیت تجاری بایوبیسیک<sup>۱</sup> کانادا و مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (اپندورف، آلمان) و هم چنین بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای ساقه-حلقه برای دو miRNA مطابق با روش توصیف شده توسط (Varkony et al. 2007) با تغییراتی جزئی صورت گرفت (جدول ۱). به این منظور از کیت تجاری primescript RT reagent محصول شرکت تاکارا ژاپن استفاده شد. به طور خلاصه برای سنتز cDNA، ۱ میکرولیتر از هر نمونه

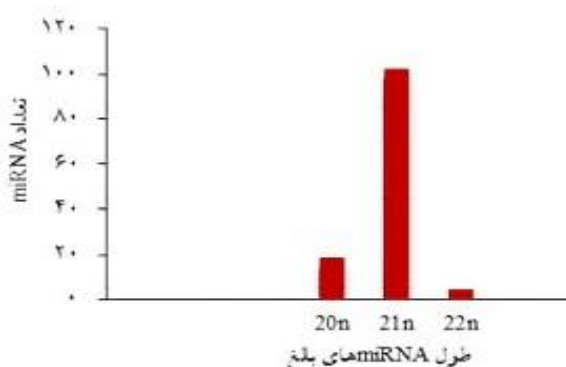
<sup>1</sup> Bio Basic

دارند. توالی‌های pre-miRNA در طول با هم متفاوت هستند. pre-miRNA ها بین ۵۷ تا ۳۱۷ با میانگین  $۹۵/۸۸ \pm ۴۰/۱$  نوکلئوتید طول دارند و طول اکثر آن‌ها بین ۵۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید است (شکل ۴). cti-mir172c با ۵۷ نوکلئوتید کوتاه‌ترین و miR169b با ۳۱۷ نوکلئوتید بلندترین توالی pre-miRNA را در بین miRNA ها دارند. به‌طور متوسط ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌های pre-miRNA دارای  $۵/۴۳ \pm ۴۴/۴$  بازهای A و U است که این مقدار از  $۳۱/۵۴$  تا  $۵۹/۰۱$  درصد متغیر است. همچنین  $۶۷/۲۴$  miRNA های شناسایی شده دارای نوکلئوتید U در انتهای ۵' خود هستند (شکل ۵). حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE) برای توالی‌های pre-miRNA گلرنگ معادل  $۱۲ \pm ۳۸/۴$  کیلوکالری بر مول است. یافته‌ها در این مطالعه نشان می‌دهند که miRNA های بالقوه شناسایی شده در گلرنگ دامنه وسیعی از مقادیر MFE را دارند، به‌طوری‌که از  $۰/۵۱$  تا  $۱/۳۸$  کیلوکالری بر مول قابل مشاهده است. میانگین مقادیر MFE برای miRNA های بالقوه گلرنگ  $۰/۱۷ \pm ۰/۹۴$  کیلوکالری بر مول است.

مختلف گیاهی به‌عنوان الگو و سپس غربال براساس آنالیز ساختار ثانویه pre-miRNA ها، منتج به شناسایی ۱۰۷ توالی منحصر به فرد به‌عنوان ژن‌های کد کننده ۱۲۶ miRNA در بین ۴۶۳۹۰۶ کانتیگ ثبت شده از ژنوم گلرنگ شد. miRNA های شناسایی شده گلرنگ در ۲۹ خانواده حفاظت شده دسته‌بندی شدند (شکل ۲). از بین این خانواده‌ها سه خانواده شناسایی شده است که ۱۰ و یا بیش از ۱۰ عضو دارند. سه خانواده miR156، miR169 و miR395 به ترتیب دارای ۱۰، ۲۷ و ۲۳ عضو هستند. تعداد اعضای سایر خانواده‌های miRNA کمتر از ۱۰ است و بیشتر آن‌ها تنها یک و یا دو عضو دارند. خصوصیات miRNA های شناسایی شده در بین خانواده‌های مختلف متفاوت است (جدول ۲). اکثر miRNA های شناسایی شده برای گلرنگ ۲۱ نوکلئوتید طول دارند ( $۸۳/۶$ ٪) و سایر آن‌ها به ترتیب دارای ۲۰ نوکلئوتید ( $۱۶/۳$ ٪) و ۲۲ نوکلئوتید ( $۳/۲۲$ ٪) طول هستند (شکل ۳). در مجموع از بین این miRNA ها ۶۴ miRNA ( $۵۰/۸۱$ ٪) بر روی بازوی ۳' و ۶۲ miRNA ( $۴۹/۱۹$ ٪) بر روی بازوی ۵' ساختار ساقه-حلقه قرار



شکل ۲- miRNA های شناسایی شده در گلرنگ زراعی



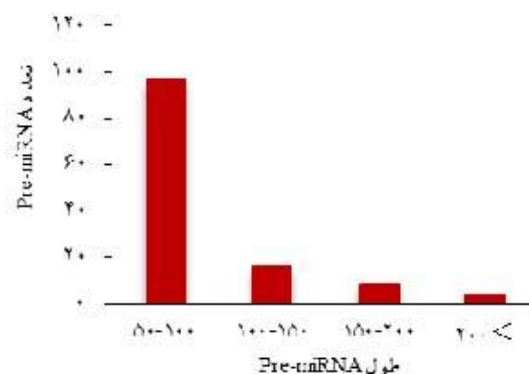
شکل ۳- اختلاف طول miRNA های بالغ شناسایی شده

جدول ۲- خصوصیات miRNA های شناسایی شده در گلرنگ زراعی

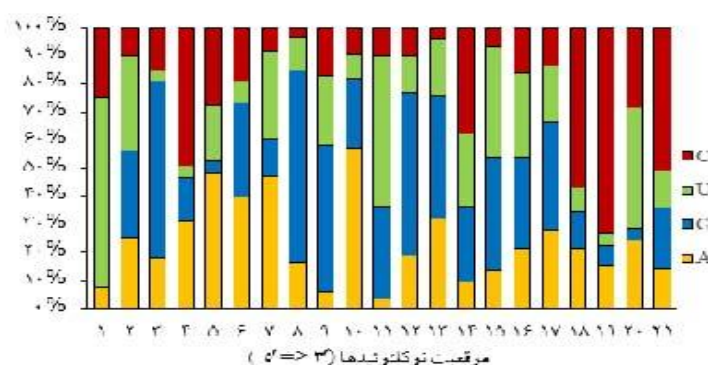
| miRNA           | gene ID        | location | Strand | Pre-miRNA length | GC (%) | MFE  | MFEI  | Predicted miRNA sequence      | Length |
|-----------------|----------------|----------|--------|------------------|--------|------|-------|-------------------------------|--------|
| cti-miR156k     | LUCG01214823.1 | 3'       | +      | 124              | 47.58  | 41.6 | 0.705 | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156b     | LUCG01229481.1 | 5'       | +      | 110              | 46.01  | 39.6 | 0.776 | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156c     | LUCG01205847.1 | 5'       | -      | 95               | 41.83  | 40.7 | 1.043 | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156d     | LUCG01107459.1 | 5'       | +      | 95               | 40.62  | 40.7 | 1.043 | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156e     | LUCG01252703.1 | 5'       | -      | 87               | 43.67  | 35.2 | 0.926 | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156f     | LUCG01301028.1 | 5'       | +      | 86               | 37.2   | 32.6 | 1.018 | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156a     | LUCG01123221.1 | 5'       | +      | 83               | 45.78  | 43.2 | 1.136 | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156h     | LUCG01157180.1 | 5'       | -      | 83               | 45.78  | 36.3 | 0.955 | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156j     | LUCG01223920.1 | 5'       | +      | 93               | 38.7   | 43.2 | 1.2   | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156g     | LUCG01141361.1 | 5'       | -      | 83               | 35.55  | 37.2 | 1.162 | 5':UGACAGAAAGAGAGUGAGCAC:3'   | 20     |
| cti-miR156i     | LUCG01204475.1 | 5'       | -      | 85               | 44.18  | 41.1 | 1.081 | 5':UGACAGAAAGAGAGAGCAC:3'     | 20     |
| cti-miR157      | LUCG01147638.1 | 5'       | -      | 90               | 34.48  | 37   | 1.233 | 5':UGACAGAAAGAGAGAGCAC:3'     | 20     |
| cti-miR159      | LUCG01179314.1 | 3'       | +      | 166              | 41.56  | 62   | 0.898 | 5':UUUGGAUUAGGGGAGCUCUA:3'    | 21     |
| cti-miR160c     | LUCG01076414.1 | 5'       | +      | 82               | 58.53  | 45.8 | 0.954 | 5':UGCCUGGCUCCCUUGUAUUGCCA:3' | 21     |
| cti-miR160a     | LUCG01085771.1 | 5'       | +      | 85               | 45.88  | 40.9 | 1.048 | 5':UGCCUGGCUCCCUUGUAUUGCCA:3' | 21     |
| cti-miR160b     | LUCG01460997.1 | 5'       | +      | 81               | 56.25  | 41   | 0.911 | 5':UGCCUGGCUCCCUUGUAUUGCCA:3' | 21     |
| cti-miR162b     | LUCG01462186.1 | 3'       | -      | 119              | 42.01  | 38.4 | 0.768 | 5':UCGAUAAACCUUGCAUCCAG:3'    | 21     |
| cti-miR162a     | LUCG01304413.1 | 3'       | +      | 92               | 47.82  | 31.5 | 0.715 | 5':UCGAUAAACCUUGCAUCCAG:3'    | 21     |
| cti-miR164a     | LUCG01111945.1 | 5'       | +      | 99               | 45.45  | 31.1 | 0.691 | 5':UGGAGAAGCAAGGUAACGUGCA:3'  | 21     |
| cti-miR164b     | LUCG01285418.1 | 5'       | -      | 84               | 33.4   | 33.4 | 0.814 | 5':UGGAGAAGCAAGGUAACGUGCA:3'  | 21     |
| cti-miR165/166e | LUCG01052069.1 | 3'       | -      | 68               | 47.05  | 32.2 | 1.006 | 5':UCGGACCAAGGCUUUAUUCUU:3'   | 21     |
| cti-miR165/166b | LUCG01305111.1 | 3'       | -      | 120              | 40.83  | 36.7 | 0.748 | 5':UCGGACCAAGGCUUUAUUCUU:3'   | 21     |
| cti-miR165/166a | LUCG01238108.1 | 3'       | +      | 80               | 45.67  | 30.9 | 0.835 | 5':UCGGACCAAGGCUUUAUUCUU:3'   | 21     |
| cti-miR165/166d | LUCG01446387.1 | 3'       | -      | 247              | 39.26  | 92.1 | 0.939 | 5':UCGGACCAAGGCUUUAUUCUU:3'   | 21     |
| cti-miR165/166c | LUCG01301651.1 | 3'       | -      | 204              | 40.48  | 73.5 | 0.885 | 5':UCGGACCAAGGCUUUAUUCUU:3'   | 21     |
| cti-miR167a     | LUCG01005689.1 | 5'       | +      | 89               | 42.69  | 35.9 | 0.944 | 5':UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA:3'   | 21     |
| cti-miR167b     | LUCG01009152.1 | 5'       | -      | 96               | 35.78  | 28.8 | 0.848 | 5':UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA:3'   | 21     |
| cti-miR167c     | LUCG01202037.1 | 5'       | +      | 72               | 44.44  | 29.2 | 0.912 | 5':UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA:3'   | 21     |
| cti-miR168b     | LUCG01272159.1 | 5'       | +      | 77               | 48.08  | 30   | 0.81  | 5':UCGCUUGGUGGAGGUCGGGAA:3'   | 21     |
| cti-miR168a     | LUCG01260940.1 | 5'       | +      | 59               | 57.62  | 30.7 | 0.902 | 5':UCGCUUGGUGGAGGUCGGGAA:3'   | 21     |
| cti-miR168c     | LUCG01292857.1 | 5'       | +      | 103              | 49.51  | 37.5 | 0.735 | 5':UCGCUUGGUAACAGGUCGGGAA:3'  | 21     |
| cti-miR169a     | LUCG01007750.1 | 5'       | +      | 81               | 45.67  | 35.8 | 0.967 | 5':CAGCCCAAGGAUGACUUGCCGG:3'  | 21     |
| cti-miR169b     | LUCG01280546.1 | 5'       | -      | 317              | 31.54  | 62.5 | 0.625 | 5':CAGCCCAAGGAUGACUUGCCGG:3'  | 21     |
| cti-miR169c     | LUCG01191289.1 | 5        | +      | 103              | 47.57  | 31.6 | 0.644 | 5':UAGCCCAAGGAUGACUUGCCAG:3'  | 21     |
| cti-miR169d     | LUCG01159517.1 | 5        | +      | 104              | 49.03  | 38.5 | 0.754 | 5':UAGCCCAAGGAUGACUUGCCUG:3'  | 21     |
| cti-miR169e     | LUCG01462435.1 | 5'       | +      | 61               | 57.37  | 33.2 | 0.948 | 5':CAGCCCAAGGAUGACUUGCCGA:3'  | 21     |
| cti-miR169f     | LUCG01044789.1 | 5        | +      | 113              | 35.39  | 37.6 | 0.94  | 5':UAGCCCAAGGAUGACUUGCCUA:3'  | 21     |
| cti-miR169g     | LUCG01265785.1 | 5        | -      | 98               | 41.83  | 34   | 0.829 | 5':UAGCCCAAGGAUGACUUGCCUA:3'  | 21     |
| cti-miR169h     | LUCG01457271.1 | 5'       | +      | 93               | 45.74  | 32.9 | 0.765 | 5':UAGCCCAAGGAUGACUUGCCGA:3'  | 21     |
| cti-miR169aj    | LUCG01094534.1 | 5        | +      | 92               | 43.47  | 38.4 | 0.96  | 5':UAGCCCAAGGAUGACUUGCCUU:3'  | 21     |
| cti-miR169ak    | LUCG01094534.1 | 5        | +      | 89               | 49.43  | 40.6 | 0.922 | 5':UAGCCCAAGGAUGACUUGCCAC:3'  | 21     |
| cti-miR169al    | LUCG01094534.1 | 5        | +      | 92               | 45.65  | 36.4 | 0.866 | 5':UAGCCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'  | 21     |

| miRNA           | gene ID        | location | Strand | Pre-miRNA length | GC (%) | MFE   | MFEI  | Predicted miRNA sequence     | Length |
|-----------------|----------------|----------|--------|------------------|--------|-------|-------|------------------------------|--------|
| cti-miR169ao    | LUCG01094534.1 | 5        | +      | 91               | 52.84  | 38.8  | 0.808 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCA:3'   | 20     |
| cti-miR169ai    | LUCG01094534.1 | 5        | +      | 89               | 49.43  | 40.6  | 0.922 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCA:3'   | 21     |
| cti-miR169am    | LUCG01094534.1 | 5        | +      | 89               | 48.31  | 38.1  | 0.886 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCA:3'   | 21     |
| cti-miR169an    | LUCG01094534.1 | 5        | +      | 92               | 45.65  | 31.7  | 0.754 | 5':UAGCCAAGGAUGAUUUGCCUC:3'  | 21     |
| cti-miR169bp    | LUCG01255108.1 | 5        | +      | 89               | 47.16  | 42.1  | 1.002 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCA:3'   | 21     |
| cti-miR169bq    | LUCG01255108.1 | 5        | +      | 92               | 43.47  | 34.6  | 0.865 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'  | 21     |
| cti-miR169br    | LUCG01255108.1 | 5        | +      | 89               | 49.43  | 40.6  | 0.922 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCA:3'   | 21     |
| cti-miR169bs    | LUCG01255108.1 | 5        | +      | 89               | 45.27  | 101.5 | 0.73  | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'  | 21     |
| cti-miR169ct    | LUCG01300483.1 | 5        | +      | 89               | 47.19  | 33.5  | 0.797 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCA:3'   | 21     |
| cti-miR169cu    | LUCG01300483.1 | 5        | +      | 92               | 41.3   | 35.7  | 0.939 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'  | 21     |
| cti-miR169dv    | LUCG01099248.1 | 5        | -      | 88               | 48.31  | 40.6  | 0.944 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCA:3'   | 21     |
| cti-miR169dw    | LUCG01099248.1 | 5        | -      | 91               | 46.15  | 33.9  | 0.807 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'  | 21     |
| cti-miR169ex    | LUCG01068728.1 | 5        | -      | 89               | 48.31  | 33.5  | 0.779 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCA:3'   | 21     |
| cti-miR169ey    | LUCG01068728.1 | 5        | -      | 92               | 46.73  | 34.5  | 0.802 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCUC:3'  | 21     |
| cti-miR169fz1   | LUCG01206195.1 | 5        | -      | 89               | 49.43  | 38.3  | 0.87  | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCCC:3'  | 21     |
| cti-miR169fz2   | LUCG01206195.1 | 5        | -      | 89               | 47.19  | 36.2  | 0.861 | 5':UAGCCAAGGAUGACUUGCCCC:3'  | 21     |
| cti-miR171/170a | LUCG01037829.1 | 3'       | -      | 78               | 47.43  | 35.5  | 0.959 | 5':UGAUUGAGCCGCCACCAUAUC:3'  | 21     |
| cti-miR171/170b | LUCG01013443.1 | 3'       | -      | 79               | 37.97  | 33.2  | 1.106 | 5':UGAUUGAGCCGCCCAUAUC:3'    | 21     |
| cti-miR171/170d | LUCG01063334.1 | 3'       | +      | 75               | 40     | 24.7  | 0.823 | 5':AGAUUGAGCCGCCCAUAUC:3'    | 21     |
| cti-miR171/170e | LUCG01185673.1 | 3'       | +      | 78               | 46.91  | 29.7  | 0.802 | 5':UUGAGCCGCCCAUAUAUC:3'     | 20     |
| cti-miR171/170c | LUCG01263343.1 | 3'       | -      | 78               | 38.46  | 34.3  | 1.143 | 5':UGAUUGAGCCGCCCAUAUAUC:3'  | 21     |
| cti-miR172a     | LUCG01461380.1 | 3'       | -      | 90               | 31.86  | 39.5  | 1.362 | 5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU:3'  | 21     |
| cti-miR172b     | LUCG01181992.1 | 3'       | +      | 140              | 40     | 47    | 0.839 | 5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU:3'  | 21     |
| cti-miR172c     | LUCG01258195.1 | 3'       | -      | 57               | 45.75  | 27.8  | 1.112 | 5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU:3'  | 21     |
| cti-miR172d     | LUCG01278387.1 | 3'       | +      | 139              | 35.97  | 45.2  | 0.904 | 5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG:3'  | 21     |
| cti-miR172e     | LUCG01183085.1 | 3'       | +      | 167              | 36.52  | 49.4  | 0.809 | 5':AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG:3'  | 21     |
| cti-miR319a     | LUCG01257360.1 | 3'       | +      | 170              | 47.33  | 69.7  | 0.86  | 5':UUGGACUGAAGGAGCUCUCCU:3'  | 21     |
| cti-miR319b     | LUCG01454010.1 | 3'       | -      | 175              | 43.93  | 67.6  | 0.866 | 5':UUGGACUGAAGGAGCUCUCCU:3'  | 21     |
| cti-miR319c     | LUCG01187119.1 | 3'       | -      | 165              | 41.81  | 57.4  | 0.831 | 5':UUGGACUGAAGGAGCUCUCCU:3'  | 21     |
| cti-miR319d     | LUCG01300110.1 | 3'       | -      | 170              | 41.17  | 63    | 0.9   | 5':UUGGACUGAAGGAGCUCUCCU:3'  | 21     |
| cti-miR390a     | LUCG01426686.1 | 5'       | -      | 100              | 41.58  | 38.1  | 0.907 | 5':AAGCUCAGGAGGGAUAGGCC:3'   | 21     |
| cti-miR390b     | LUCG01298544.1 | 5'       | -      | 88               | 38.63  | 39.4  | 1.158 | 5':AAGCUCAGGAGGGAUAGGCC:3'   | 21     |
| cti-miR393a     | LUCG01129628.1 | 5'       | +      | 92               | 39.5   | 40.9  | 1.202 | 5':UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUCC:3' | 22     |
| cti-miR393b     | LUCG01275921.1 | 5'       | -      | 97               | 36.08  | 37.6  | 1.074 | 5':UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUCC:3' | 22     |
| cti-miR394a     | LUCG01460485.1 | 5'       | +      | 71               | 47.22  | 23.5  | 0.691 | 5':UUGGCAUUCUGUCCACCUCC:3'   | 20     |
| cti-miR394b     | LUCG01304757.1 | 5'       | -      | 191              | 35.68  | 47.1  | 0.702 | 5':UUGGCAUUCUGUCCACCUCC:3'   | 20     |
| cti-miR395a     | LUCG01021757.1 | 3'       | +      | 66               | 45.45  | 32.6  | 1.086 | 5':CUGAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395b     | LUCG01035990.1 | 3'       | +      | 66               | 45.45  | 32.9  | 1.096 | 5':CUGAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395c     | LUCG01273550.1 | 3'       | -      | 65               | 46.96  | 35.3  | 1.138 | 5':CUGAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395d     | LUCG01450286.1 | 3'       | +      | 65               | 38.64  | 33.8  | 1.126 | 5':CUGAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395e     | LUCG01137156.1 | 3'       | -      | 65               | 42.42  | 30.7  | 1.096 | 5':CUGAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395f     | LUCG01300411.1 | 3'       | -      | 66               | 43.93  | 35    | 1.206 | 5':CUGAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |

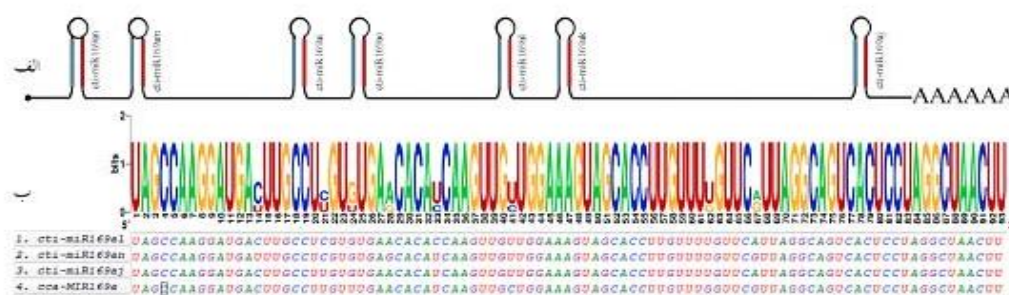
| miRNA        | gene ID        | location | Strand | Pre-miRNA length | GC (%) | MFE   | MFEI  | Predicted miRNA sequence      | Length |
|--------------|----------------|----------|--------|------------------|--------|-------|-------|-------------------------------|--------|
| cti-miR395g  | LUCG01109206.1 | 3'       | +      | 65               | 46.15  | 35.6  | 1.186 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395h  | LUCG01147001.1 | 3'       | -      | 71               | 31.6   | 31.6  | 1.089 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395ai | LUCG01102706.1 | 3'       | +      | 66               | 42.42  | 30.7  | 1.096 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395aj | LUCG01102706.1 | 3'       | +      | 65               | 44.64  | 36.6  | 1.262 | 5':CUGAAAGUGUUUGAGGAAACUC:3'  | 21     |
| cti-miR395bk | LUCG01215548.1 | 3'       | -      | 66               | 45.45  | 34.2  | 1.14  | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395bl | LUCG01215548.1 | 3'       | -      | 70               | 41.42  | 33.3  | 1.148 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395cm | LUCG01197122.1 | 3'       | -      | 66               | 43.93  | 34.6  | 1.193 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395do | LUCG01303497.1 | 3'       | +      | 69               | 43.39  | 29    | 0.966 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395dp | LUCG01303497.1 | 3'       | +      | 65               | 42.87  | 36.6  | 1.062 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395cn | LUCG01197122.1 | 3'       | -      | 65               | 44.93  | 34.6  | 1.193 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395eq | LUCG01242803.1 | 3'       | +      | 66               | 46.96  | 32.8  | 1.058 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395er | LUCG01242803.1 | 3'       | +      | 65               | 46.15  | 34.7  | 1.156 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACUC:3'   | 21     |
| cti-miR395s  | LUCG01297117.1 | 3'       | -      | 65               | 42.42  | 35.1  | 1.253 | 5':CUGAAAGUGUUUGAGGAAACUU:3'  | 21     |
| cti-miR395t  | LUCG01297507.1 | 3'       | -      | 65               | 45.45  | 37.1  | 1.236 | 5':CUGAAAGUGUUUGAGGAAACUC:3'  | 21     |
| cti-miR395u  | LUCG01362548.1 | 3'       | +      | 65               | 44.11  | 35.2  | 1.173 | 5':CUGAAAGUGUUUGAGGAAACUC:3'  | 21     |
| cti-miR395v  | LUCG01446129.1 | 3'       | -      | 68               | 42.02  | 28.7  | 0.989 | 5':CUGAAAGUGUUUGGGGAACU:3'    | 21     |
| cti-miR395w  | LUCG01449834.1 | 3'       | -      | 82               | 37.34  | 23.2  | 0.748 | 5':UGAGGUGUUUGAGGGAACUC:3'    | 20     |
| cti-miR396a  | LUCG01260106.1 | 5'       | +      | 113              | 38.39  | 62.2  | 1.382 | 5':UUGCACAGCUUUCUUGAAACUU:3'  | 21     |
| cti-miR396b  | LUCG01209959.1 | 5'       | -      | 99               | 39.39  | 37.9  | 0.971 | 5':UUGCACAGCUUUCUUGAAACUC:3'  | 21     |
| cti-miR396c  | LUCG01144649.1 | 5'       | +      | 86               | 38.37  | 36.4  | 1.103 | 5':UUGCACAGCUUUCUUGAAACUC:3'  | 21     |
| cti-miR396e  | LUCG01277585.1 | 5'       | -      | 108              | 35.18  | 42.3  | 1.11  | 5':UUGCACGGCUUUCUUGAAACUC:3'  | 21     |
| cti-miR397aa | LUCG01297574.1 | 3'       | -      | 64               | 39.2   | 35    | 1.2   | 5':UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG:3'   | 21     |
| cti-miR397ab | LUCG01297574.1 | 3'       | -      | 68               | 44.6   | 37    | 1.1   | 5':UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG:3'   | 21     |
| cti-miR398c  | LUCG01455851.1 | 3'       | -      | 80               | 44.44  | 24.8  | 0.688 | 5':CGUGUUCUCAGGUCGCGCCUG:3'   | 21     |
| cti-miR398a  | LUCG01220105.1 | 3'       | +      | 70               | 42.85  | 32.9  | 1.096 | 5':UGUGUUCUCAGGUCGCGCCUG:3'   | 21     |
| cti-miR398b  | LUCG01250810.1 | 3'       | +      | 107              | 38.31  | 40.8  | 0.995 | 5':UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU:3'   | 21     |
| cti-miR399a  | LUCG01184375.1 | 3'       | -      | 82               | 50     | 29.7  | 0.724 | 5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCAAG:3'  | 21     |
| cti-miR399b  | LUCG01392727.1 | 3'       | -      | 81               | 51.21  | 34.9  | 0.83  | 5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCAAG:3'  | 21     |
| cti-miR399c  | LUCG01270833.1 | 3'       | -      | 62               | 47.76  | 23.3  | 0.728 | 5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG:3'   | 21     |
| cti-miR399d  | LUCG01304411.1 | 3'       | -      | 61               | 59.01  | 35.5  | 0.986 | 5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG:3'   | 21     |
| cti-miR399e  | LUCG01270272.1 | 3'       | +      | 88               | 37.64  | 32.4  | 0.925 | 5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCUAG:3'  | 21     |
| cti-miR399f  | LUCG01415348.1 | 3'       | -      | 82               | 49.39  | 30.5  | 0.743 | 5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCAAG:3'  | 21     |
| cti-miR399g  | LUCG01455070.1 | 3'       | -      | 67               | 42.18  | 27.1  | 0.903 | 5':UGCCAAAGGAGAUUUGCCCUAG:3'  | 21     |
| cti-miR399h  | LUCG01150230.1 | 3'       | -      | 67               | 42.44  | 25.9  | 0.893 | 5':CGCCAAAGGAGAUUUGCCCUAG:3'  | 21     |
| cti-miR403   | LUCG01151710.1 | 3'       | -      | 137              | 39.41  | 48.3  | 0.89  | 5':UUAAGAUUACACGCACAAACUCG:3' | 21     |
| cti-miR408   | LUCG01461387.1 | 3'       | -      | 83               | 51.16  | 25.6  | 0.581 | 5':UGCACUGCCUCUCCCUUGGCU:3'   | 21     |
| cti-miR477   | LUCG01296802.1 | 5'       | -      | 97               | 42.85  | 40.6  | 0.966 | 5':CUCUCCCUCAAGGGCUUCUA:3'    | 20     |
| cti-miR530   | LUCG01298258.1 | 5'       | -      | 156              | 43.76  | 55.5  | 0.76  | 5':UGCAUUUGCACCUCGACCCUUU:3'  | 21     |
| cti-miR858   | LUCG01306454.1 | 3'       | +      | 111              | 52.29  | 29.1  | 0.51  | 5':UUGGUUGUCUGUUGGACCUUG:3'   | 21     |
| cti-miR6113  | LUCG01014363.1 | 5'       | +      | 79               | 35.33  | 43.7  | 0.987 | 5':UCUGAAACUCAAAGAACACGUG:3'  | 22     |
| cti-miR6114  | LUCG01108316.1 | 3'       | -      | 125              | 45.6   | 42.29 | 1.08  | 5':UGAAAGGAAUCAUGAACGUGA:3'   | 21     |
| cti-miR6111  | LUCG01274879.1 | 5'       | +      | 253              | 40.31  | 51.6  | 1.13  | 5':UCUUUAUGUCACGAUGUAUGAC:3'  | 22     |



شکل ۴- اختلاف طول Pre-miRNA ها



شکل ۵- موقعیت نوکلئوتیدها در طول miRNA های بالغ



شکل ۶- کلاستر miR169a در توالی LUCG01094534.1 (الف) موقعیت هر miRNA بر روی رونوشت کلاستر ج) حفاظت شده بودن توالی های pre-miRNA در کلاستر miR169a و در گونه های نزدیک (cca: *Cynara cardunculus* L.).

miR397a(a, b). نتایج هم ردیفی برای pre-miRNA های کلاستر miR169a حاکی از حفاظت شدگی بالای آنها در این کلاستر و در سایر گونه های گیاهی است (شکل ۶).

Stem-loop RT-PCR یک روش معتبر و دقیق برای تعیین سطح بیان miRNA های بالغ است به طوری که قادر است توالی miRNA هایی را که تنها در یک نوکلئوتید اختلاف دارند از هم تفکیک کند (Chen et al. 2005). در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و به روش سایبرگرین احتمال حضور

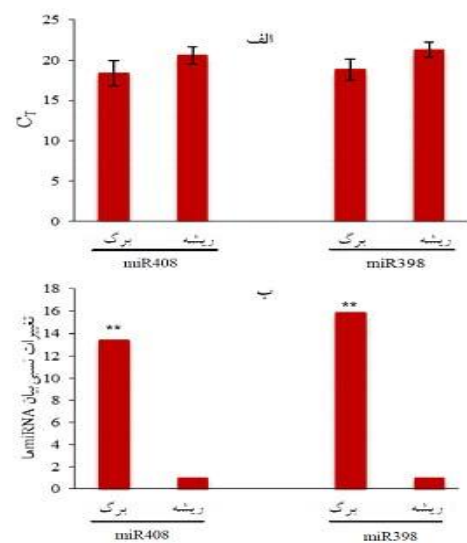
در این مطالعه، ۱۱ کلاستر miRNA بالقوه متعلق به سه خانواده متفاوت در گلرنگ شناسایی شد. خانواده cti-miR169 دارای پنج کلاستر شامل miR169a (i, j, k, l, m, n, o), miR169b (p, q, r), miR169c (t, u, v, w), miR169e (x, y) و miR169f (z1, z2) است (شکل ۵). به طور مشابه خانواده cti-miR395 دارای پنج کلاستر شامل cti-miR395a (i, j), miR395b (k, l), miR395c (m, n), miR395d (o, p), miR395e (q, r) است اما خانواده cti-miR397 تنها دارای یک کلاستر می باشد،

شناسایی ژن های هدف یکی از مراحل مهم در مطالعه بر روی miRNA ها است. با توجه به حفاظت شده بودن محل اتصال بین miRNA و mRNA هدف، امکان شناسایی این ژن ها با استفاده از جستجوی مبتنی بر همولوژی وجود دارد. در این مطالعه جستجو در توالی های EST و WGS منجر به شناسایی ۸۴ توالی کاندید به عنوان ژن هدف شد. برای اکثر خانواده های miRNA بیش از یک ژن به دست آمد (جدول ۳). miRNA های بالقوه گلرنگ اتصال کامل و یا تقریباً کاملی را با ژن های هدف خود نشان دادند (جدول ۳). نتایج حاصل از بررسی Gene Ontology نشان داد که توالی های هدف، متعلق به خانواده های ژنی مختلف و دارای عملکردهای بیولوژیکی و فیزیولوژیکی متفاوتی هستند. از جمله این ژن ها فاکتورهای رونویسی، پروتئین های دخیل در همانندسازی DNA، ژن های درگیر در متابولیسم سلولی و ژن های درگیر در پاسخ دهی گیاه به تنش های محیطی است؛ همچنین یافته ها نشان داد غالباً فعالیت این ژن ها درون هسته می باشد (شکل ۸ و جدول ۳).

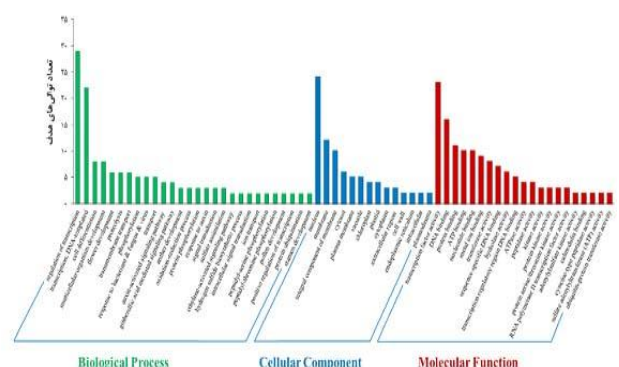
### بحث

روش های محاسباتی به عنوان یک رویکرد کارآمد تاکنون سبب پیش بینی صدها miRNA در بسیاری از گونه های گیاهی شده است. miRNA های بالقوه شناخته شده در این مطالعه دامنه وسیعی از خصوصیات را در بین خانواده های مختلف و حتی در میان اعضای یک خانواده نشان می دهند. برای مثال، در حالی که تنها یک عضو برای اکثر خانواده های miRNA شناسایی شده است، ۲۷ miRNA بالقوه برای خانواده miR169 و ۲۳ miRNA برای خانواده miR395 شناسایی شده است. تعداد اعضای برخی از خانواده های miRNA در گلرنگ بیشتر از تعداد miRNA ها در خانواده های مشابه در سایر گونه های گیاهی است. miR169، با ۱۴ عضو، بزرگ ترین خانواده miRNA در آرکیدوپسیس است (Li et al. 2010). همچنین خانواده miR156، با ۷ عضو، یکی از خانواده های قابل توجه در آرکیدوپسیس است (Griffiths et al. 2007) که به عنوان مهم ترین miRNA های دخیل در تغییر فاز رویشی به فاز زایشی شناخته می شوند (Wu and Poethig 2007).

miRNA های شناسایی شده از طریق آنالیز توالی های WGS در ژنوم گلرنگ بررسی شد. miR398 و miR408 دو خانواده مورد بررسی در این مطالعه هستند که نتایج qPCR بیان آنها را در هر دو اندام ریشه و برگ گیاهچه های گلرنگ تأیید کرد (شکل ۷). miR398 و miR408 الگوی بیان نسبتاً مشابهی نشان دادند به طوری که بیان هر دو در برگ نسبت به ریشه بالاتر است. این اختلاف بیان برای miR398 نسبت به miR408 بیشتر است (شکل ۷).



شکل ۷- نتایج بررسی بیان miR398 و miR408 (الف) سطح بیان miR398 و miR408 در دو اندام برگ و ریشه. (ب) اختلاف بیان miR398 و miR408 در برگ نسبت به ریشه. \*\* نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال یک درصد



شکل ۸- کلاس بندی نتایج به دست آمده از آنالیز GO برای ژن های هدف: عملکرد مولکولی (Molecular Function)، اجزاء سلولی (Cellular Component) و فرآیندهای بیولوژی (Biological Process) سه کلاسی هستند که وضعیت ژن های هدف را در سلول توصیف می کنند.

جدول ۳- ژن های هدف بالقوه برای miRNAهای گلرنگ

| miRNA family | Target_Acc.    | Target gene   | Target function                                                                                   | Expectation | Inhibition  |
|--------------|----------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| miR156       | LUCG01112023.1 | SPL12         | Transcription factor                                                                              | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01115084.1 | SPL6          |                                                                                                   | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01298205.1 | SPL13A        |                                                                                                   | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01224167.1 | RGL1          | transcriptional regulator                                                                         | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01243028.1 | SPL3          | Transcription factor                                                                              | 1           | Cleavage    |
| miR156/57    | LUCG01107968.1 | SBP1          |                                                                                                   | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01246162.1 | ABP19A        | Auxin receptor                                                                                    | 3           | Cleavage    |
|              | LUCG01056444.1 | EXPA          | cell wall organization- sexual reproduction                                                       | 2.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01143063.1 | MYB           | Transcription factor                                                                              | 2           | Cleavage    |
|              | LUCG01254949.1 | GAMYB         |                                                                                                   | 1           | Cleavage    |
| miR157       | EL374787       | ACT3          | ATP binding                                                                                       | 2.5         | Translation |
|              | EL378219       |               |                                                                                                   | 2.5         | Translation |
|              |                |               |                                                                                                   |             |             |
| miR160       | LUCG01282242.1 | ARFR          | transcription factor activity- auxin-activated signaling pathway- response to auxin               | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01300668.1 |               |                                                                                                   | 3.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01303928.1 |               |                                                                                                   | 0.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01462221.1 |               |                                                                                                   | 0.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01462439.1 |               |                                                                                                   | 0           | Cleavage    |
| miR162       | LUCG01307169.1 | CNGC9         | Acts as cyclic nucleotide                                                                         | 2.5         | Translation |
|              | LUCG01084634.1 | RD19B         | cysteine-type peptidase activity                                                                  | 2           | Cleavage    |
|              | EL372961       | HSP70         | Interacts with newly imported chloroplast proteins to assist in their maturation.                 | 3           | Cleavage    |
|              | EL386787.1     | A0A103XSZ1    | uncharacterized protein                                                                           | 3.5         | Cleavage    |
|              |                |               |                                                                                                   |             |             |
| miR164       | LUCG01279392.1 | NAC           | Transcription factor                                                                              | 1.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01015665.1 | AB19B         | auxin efflux                                                                                      | 0.5         | Cleavage    |
| miR166       | EL378923       | UBP7          | Involved in the processing of poly-ubiquitin precursors as well as that of ubiquitinated proteins | 2.5         | Cleavage    |
|              | EL390889       | REV           | transcription factor                                                                              | 3           | Cleavage    |
| miR167       | LUCG01205011.1 | A0A118K6Q9    | auxin-activated signaling pathway                                                                 | 4           | Cleavage    |
|              | LUCG01241175.1 | A0A103XEX9    |                                                                                                   | 4           | Cleavage    |
| miR168       | LUCG01301997.1 | A0A103XFL7    | carotene catabolic process                                                                        | 2.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01204103.1 | A0A103Y950    | gene silencing by RNA                                                                             | 3.5         | Cleavage    |
| miR169       | LUCG01293037.1 | 2A5A          | brassinosteroid mediated signaling pathway                                                        | 3.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01261417.1 | CIPKP         | intracellular signal transduction                                                                 | 3.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01463496.1 | CCAAT-binding | transcription factor activity                                                                     | 1           | Cleavage    |
| miR171       | LUCG01254007.1 | SCL15         | transcription factor activity                                                                     | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01112597.1 | SCL6          |                                                                                                   | 0.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01294608.1 |               |                                                                                                   | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01069633.1 |               |                                                                                                   | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01249264.1 |               |                                                                                                   | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01084527.1 |               |                                                                                                   | 1           | Cleavage    |
| miR172       | EL403681       | A0A103Y529    | transcription factor                                                                              | 1.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01281567.1 | AP2           |                                                                                                   | 1.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01304181.1 |               |                                                                                                   | 1.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01291350.1 | RAP2-7        |                                                                                                   | 1.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01260705.1 |               |                                                                                                   | 0.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01463844.1 |               |                                                                                                   | 0.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01083051.1 |               |                                                                                                   | 0.5         | Cleavage    |
| miR390       | EL385383       | At1g47380     | negative regulation of defense response to bacterium                                              | 2.5         | Cleavage    |
| miR319       | LUCG01179939.1 | TFCC          | Regulates microtubule function in seed development                                                | 2.5         | Cleavage    |
| miR393       | LUCG01294804.1 | TIR1          | Auxin receptor                                                                                    | 3           | Cleavage    |
|              | LUCG01295536.1 |               |                                                                                                   | 3.5         | Cleavage    |
|              | LUCG01297882.1 |               |                                                                                                   | 2           | Cleavage    |
| miR394       | LUCG01273264.1 | FBX6          | photoreceptor activity                                                                            | 1           | Cleavage    |
|              | LUCG01288514.1 | CIPKP         | intracellular signal transduction                                                                 | 2           | Cleavage    |
|              | EL381257       | At2g39750     | methylation                                                                                       | 2.5         | Cleavage    |

| miRNA family | Target_Acc.    | Target gene | Target function                                                | Expectation | Inhibition |
|--------------|----------------|-------------|----------------------------------------------------------------|-------------|------------|
| miR395       | LUCG01272954.1 | CAX3        | calcium:proton antiporter activity                             | 3           | Cleavage   |
|              | LUCG01293261.1 | APS1        | response to cadmium ion                                        | 2           | Cleavage   |
|              | LUCG01268932.1 | AB5C        | cellular potassium ion homeostasis- response to salt stress    | 2.5         | Cleavage   |
|              | LUCG01048975.1 | DES6        | fatty acid biosynthetic process                                | 2           | Cleavage   |
|              | EL373143       | APS         | response to cadmium ion                                        | 2.5         | Cleavage   |
|              | LUCG01290817.1 | SUT3        | carbohydrate transport                                         | 2           | Cleavage   |
|              | LUCG01059029.1 |             |                                                                | 1.5         | Cleavage   |
| miR396       | LUCG01074652.1 | SCP45       | Involved in plants secondary metabolism.                       | 3.5         | Cleavage   |
|              | EL376169       | GRF         | Transcription activator                                        | 3           | Cleavage   |
|              | EL378674       | TUN         | pollen tube development                                        | 1.5         | Cleavage   |
|              | EL393087       | RD21B       | response to salt stress                                        | 3           | Cleavage   |
| miR397       | EL394134.1     | LAC13       | copper ion binding                                             | 1.5         | Cleavage   |
|              | EL398108.1     | LAC3        |                                                                | 1           | Cleavage   |
|              | EL391150.1     | LAC3        |                                                                | 1.5         | Cleavage   |
|              | EL390754.1     | IRX12       |                                                                | 1.5         | Cleavage   |
|              | EL386866.1     | LAC7        |                                                                | 2           | Cleavage   |
|              | EL383646.1     | LAC16       |                                                                | 1.5         | Cleavage   |
| miR398       | EL410611       | SODCC       | superoxide dismutase activity                                  | 2.5         | Cleavage   |
|              | EL406119       |             |                                                                | 2.5         | Cleavage   |
|              | EL510881       |             |                                                                | 2.5         | Cleavage   |
| miR399       | EL377818       | TULP        | response to fungus                                             | 1.5         | Cleavage   |
| miR403       | LUCG01174959.1 | AGO2        | Involved in RNA-mediated post-transcriptional gene silencing   | 1           | Cleavage   |
|              | LUCG01263368.1 | At1g80870   | protein phosphorylation                                        | 2.5         | Cleavage   |
| miR408       | EL406272       | Cupredoxin  | electron transfer activity                                     | 3           | Cleavage   |
|              | EL411506       | Cupredoxin  |                                                                | 3           | Cleavage   |
| miR477       | LUCG01301932.1 | GAI1        | gibberellic acid mediated signaling pathway                    | 1           | Cleavage   |
|              | LUCG01025259.1 | RGA2        | transcriptional regulator                                      | 1           | Cleavage   |
| miR530       | LUCG01462342.1 | PUB34       | transmembrane receptor protein serine/threonine kinase binding | 3.5         | Cleavage   |
| miR588       | EL409419       | MYB         | Transcription factor                                           | 2.5         | Cleavage   |
| miR6111      | LUCG01268040.1 | A0A118JTA6  | protein kinase activity                                        | 1.5         | Cleavage   |
| miR6113      | LUCG01026540.1 | Z195D10.16  | zinc ion binding                                               | 1.5         | Cleavage   |
| miR6114      | LUCG01061254.1 | Z195.17     | Metal-binding, Zinc                                            | 2           | Cleavage   |

توالی ها حتی برای miRNA های یک خانواده نیز متفاوت است، این مسئله می تواند بر روی بیان آن ها مؤثر باشد و بسته به شرایط مکان- زمان سبب تفاوت در بیان آن ها شود ( Zhang et al. 2008). یکی دیگر از ویژگی های miRNA های شناسایی شده حضور عمده باز U در انتهای 5' آن ها است. تصور بر این است که قرار داشتن باز U در انتهای 5' miRNA های بالغ در شناسایی آن ها از سوی پروتئین آرگونات ۱ مؤثر است ( Zhang et al. 2006d).

دیگر دستاورد این مطالعه، شناسایی miRNA هایی است که در مطالعات پیشین در گلرنگ گزارش نشده اند ( Li et al. 2011; Cao et al. 2013). این miRNA ها اعضای خانواده های miR393، miR477، miR530، miR6111 و miR6114 هستند. با توجه به این که در مطالعات پیشین، شناسایی miRNA های گلرنگ مبتنی بر روش های توالی یابی عمیق بوده است، شش خانواده miRNA ذکر شده یا به دلیل عدم بیان و یا بیان محدود، شناسایی نشده اند. از این رو با وارد شدن روش های بیوانفورماتیک

بیشتر miRNA های گلرنگ (۶/۸۳٪) ۲۱ نوکلئوتید طول دارند که یکی از ویژگی های بارز برای miRNA های شناسایی شده در سویا (Zhang et al. 2008)، ذرت (Zhang et al. 2006b) و گراس (Unver and Budak 2009) بوده است. برخلاف طول miRNA ها، طول توالی های pre- miRNA تنوع بیشتری نشان می دهند. غالباً pre- miRNA های جانوری ۷۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید طول دارند (Ambros 2004)؛ اما طول این توالی ها در گیاهان بسیار متغیر است به طوری که تا چند صد نوکلئوتید نیز می رسد (Zhang et al. 2006c). این مقدار برای توالی های pre- miRNA گلرنگ به طور متوسط  $40/1 \pm 95/88$  نوکلئوتید است. بیشتر توالی های pre- miRNA گلرنگ (۷۵/۸۵٪) طولی بین ۵۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید دارند و این مشاهده با سایر مطالعات در این زمینه برای آرابیدوپسیس، برنج، کتان، ذرت، سویا و تنباکو سازگار است (Sunkar et al. 2005; Zhang et al. 2006b; Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2008; Frazier et al. 2010). نکته قابل توجهی که در مورد طول pre- miRNA وجود دارد این است که طول این

کلاسترهای miRNA اغلب در جانوران یافت می‌شوند و به‌طور هم‌زمان به‌عنوان یک پلی سیسترون رونویسی می‌شوند (Altuvia et al. 2005). با این که حضور کلاسترهای miRNA در گیاهان متداول نیست، اما تعداد کمی از خانواده‌های miRNA (از قبیل خانواده‌های miR395, miR399, miR169 و miR156) به‌صورت پلی سیسترون در ژنوم آنها یافت شده‌است (Jones-Rhoades and Bartel 2004; Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2008). ژنوم گلرنگ نیز مشابه با سایر گونه‌های گیاهی برخی از miRNAهای سه خانواده miR169, miR395 و miR397 به‌صورت پلی سیسترون و تحت کنترل یک پروموتور هستند. miRNAهای کلاستر شده تقریباً ۲۵٪ درصد از miRNAهای شناسایی شده در گلرنگ را شامل می‌شوند که این مسئله نشان می‌دهد این سه خانواده miRNA می‌توانند عملکردهای وسیع‌تری را نسبت به سایر خانواده‌های miRNA در گلرنگ داشته باشند. نکته قابل‌توجه در مورد کلاسترهای گلرنگ حفاظت شده بودن توالی pre-miRNA در ژنوم این گونه است، به‌طوری‌که می‌توان برخی از کلاسترها را کلاستر pre-miRNA نامید (شکل ۵). نتایج جستجوی همولوژی در توالی‌های ژنومی ثبت شده برای سایر گونه‌های خانواده آستراسه از قبیل *C. cardunculus* نشان داد که توالی‌های pre-miR169 در بین گونه‌های این خانواده می‌تواند کاملاً حفاظت شده باشد (شکل ۵). با توجه به دانش ما در این زمینه، گلرنگ اولین گونه خانواده آستراسه است که این کلاسترها در آن شناسایی شده‌است، ازاین‌رو می‌توان از روش حاضر برای شناسایی این کلاسترها در سایر گونه‌های این خانواده بهره برد.

نظریه حضور آنها در ژنوم گلرنگ مطرح شده است که نیاز به اعتبارسنجی دارند. توالی miRNAها باید بر روی یکی از بازوهای ساختار ساقه-حلقه باشد. در گلرنگ miRNAها تقریباً به یک نسبت بر روی بازوی ۳' و ۵' قرار دارد که نشان می‌دهد موقعیت آنها در ساختار ساقه-حلقه تحت تأثیر یک حالت خاص نیست (Frazier et al. 2010). در شکل ۹، نمونه‌هایی از توالی‌های pre-miRNAهای گلرنگ همراه با موقعیت توالی miRNA بر روی آنها ارائه شده‌است. توالی‌های pre-miRNA به دلیل داشتن یک ساختار ثانویه پایدار، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE) آنها در مقایسه با سایر RNA پایین‌تر است (Bonnet et al. 2004). با این‌حال سایر RNA، از قبیل tRNA و rRNA نیز می‌توانند ساختار سنجاق سری تشکیل دهند؛ بنابراین پیش‌بینی miRNAها نمی‌تواند تنها بر اساس MFE باشد. شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) می‌تواند miRNAها را از سایر RNAها به‌خوبی تفکیک کند، که مقدار آن برابر و یا بالاتر از ۰/۸۵ باشد (Zhang et al. 2006c). نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که مقادیر MFEI برای miRNAهای بالقوه گلرنگ به‌طور میانگین  $\pm 0.17 \text{ kcal/mol}$  است. این مقدار به‌طور معنی‌داری بسیار بالاتر از مقادیر MFEI سایر RNA از قبیل tRNAها (۰/۶۴)، rRNAها (۰/۵۹) و mRNAها (۰/۶۲ تا ۰/۶۶) است (Zhang et al. 2006c). بنابراین miRNAهای بالقوه گلرنگ بیش از هر RNA دیگری به توالی یک miRNA شباهت دارند.



شکل ۹- نمونه‌هایی از توالی‌های pre-miRNA گلرنگ همراه با موقعیت توالی miRNA بر روی آنها: توالی miRNA بالغ با رنگ قرمز مشخص شده‌است.

ZIP III، در شکل گیری قطبیت در برگ ها نقش ایفا می کنند (Emery et al. 2003). مطابق نتایج به دست آمده از شناسایی ژن های هدف در گلرنگ، خانواده miR166 فاکتورهای رونویسی HD-ZIP را هدف قرار می دهند، بنابراین می توان ادعا کرد که در گلرنگ نیز تنظیم نمو برگ ها توسط این خانواده کنترل می شود. براساس بررسی صورت گرفته پیش بینی می شود که miR172 گلرنگ پروتئین های AP2 (AP2-like) را هدف قرار می دهد. این مشابه سایر گزارش هایی است که نشان می دهند miR172 ژن های AP2 و AP2-like را هدف قرار می دهند و در نهایت منجر به تسریع در بلوغ و گلدهی می شوند (Aukerman and Sakai 2003).

اکثر خانواده های miRNA پیش بینی شده برای گلرنگ بیش از یک ژن را هدف قرار می دهند. براساس گزارش های منتشر شده از یک مطالعه، miRNA ها حدود ۱۰۰ سایت هدف را در میان ژن های کد کننده پروتئین دارند (Brennecke et al. 2005)؛ اضافه بر این چنین تصور می شود که miRNA ها با توجه به این که اتصال کاملی را با ژن های هدف در سلول های جانوری ندارند بیان بیش از ۳۰٪ از ژن های کد کننده پروتئین در انسان را تنظیم می کنند و این عدد با وجود کشف miRNA های جدید نیز افزایش پیدا خواهد کرد (Lewis et al. 2005)؛ اما در گیاهان اتصال کامل بین miRNA و ژن هدف تا حدودی این عمل را اختصاصی کرده است. با این وجود miRNA های گیاهی نیز بیان تعداد قابل توجهی از ژن ها را کنترل می کنند و با تنظیم بیان چندین ژن می توانند در طیف وسیعی از فرایندهای بیولوژیکی و متابولیکی دخیل باشند. استفاده از روش RT-qPCR علاوه بر تأیید نتایج به دست آمده از شناسایی miRNA های گلرنگ، سطوح متفاوتی از بیان را برای miR398 و miR408 نشان داد که می تواند حاکی از عملکرد مؤثر آن ها در رشد و نمو گیاهچه های گلرنگ باشد. یکی از دستاوردهای مهم در زمینه مطالعات بر روی miRNA ها، شناسایی دو ژن همولوگ سوپراکسید دیسموتاز (CSD1 و CSD2) به عنوان اهداف miR398 است که به وضوح تأثیر miRNA ها را در تحمل گیاه به تنش های اکسیداتیو نشان داد (Sunkar et al. 2006). یکی از اثرات ثانویه در پی تنش های غیرزنده در گیاهان، تجمع سریع گونه های اکسیژن فعال از قبیل سوپر اکسید ( $O_2^{\cdot -}$ )، پراکسید

miR169 نشان داده است که در تحمل به تنش های محیطی نقش دارد (Zhao et al. 2009) و کلاسترهایی از این miRNA قبلاً در گیاهانی مثل کتان (Zhang et al. 2007) و برنج (Zhou et al. 2009) شناسایی شده است. بنابراین، این کلاسترهای شناخته شده از miR169 در گلرنگ ممکن است منشأ تکاملی مشابهی را با سایر گونه های گیاهی داشته باشند و احتمالاً در مسیر تکاملی گونه های گیاهی مختلف نقش مشابهی داشته است.

عملکرد miRNA ها در کنترل بیان ژن ها پس از رونوشت برداری از آن ها به این صورت است که miRNA ها از طریق اتصال کامل و یا تقریباً کامل به mRNA هدف، سبب پرش و یا سرکوب ترجمه آن می شوند (Bartel 2004). برخلاف جانوران، miRNA ها در گیاهان جفت شدگی کامل تری با توالی هدف خود دارند و اغلب در گیاهان تنظیم بیان بر مبنای خرد کردن توالی هدف انجام می گیرد (Bartel 2004)؛ با این حال مشاهداتی نیز از تنظیم بیان ژن ها از طریق سرکوب ترجمه نیز وجود دارد (Aukerman and Sakai 2003). این میزان از مکمل بودن miRNA ها با ژن هدف امکان جستجو براساس همولوژی توالی ها را فراهم می کند. بر مبنای این اصل ما علاوه بر شناسایی miRNA ها، با توجه به ناشناخته بودن ژنوم و پروتئوم گلرنگ موفق به شناسایی ژن های هدف و پروتئین های کد کننده آن ها نیز شدیم. با توجه به سطح بالای حفاظت شدگی در miRNA های بالغ و محل اتصال آن ها به توالی هدف در میان قلمرو گیاهان (Zhang et al. 2006b)، این نتایج با مشاهدات صورت گرفته در سایر گیاهان سازگار است (Jones-Rhoades et al. 2006; Nie et al. 2015).

miRNA ها به طور معمول فاکتورهای رونویسی را که مهم ترین ابزارهای تنظیم کننده رشد و نمو در گیاهان هستند را هدف قرار می دهند (Jones-Rhoades and Bartel 2004). یافته ها نشان داد که خانواده miR156 در گلرنگ ژن های کد کننده خانواده فاکتور رونویسی Squamosa Promoter Binding Protein-Like (SPL) را که نقش مهمی در تنظیم نمو ایفا می کنند هدف قرار می دهند. گزارش هایی در ارتباط با سرکوب بیان SPL در آرابیدوپسیس (Jones-Rhoades et al. 2006) و همچنین در سایر گونه های گیاهی (Zhang et al. 2006e) توسط miR156 منتشر شده است. miR166 با هدف قرار دادن فاکتورهای رونویسی HD-

نشان داده است که miR408 بیان چندین ژن متعلق به خانواده Cupredoxin را تنظیم می‌کند. اعضای خانواده Cupredoxin پروتئین‌های مس آبی هستند که دارای یک دمین برای اتصال به یون‌های مس می‌باشند و به‌عنوان یک حامل الکترون عمل می‌کنند (Nersissian and Shipp 2002; Gough and Chothia 2004). مس در رشد و تکامل گیاه نقش مهمی ایفا می‌کند، زیرا به‌عنوان کوفاکتور بسیاری از پروتئین‌ها و آنزیم‌های دخیل در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، تولید بذر، توزیع کربوهیدرات، تثبیت نیتروژن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیسم دیواره سلولی عمل می‌کند (Pilon et al. 2006). Cu-microRNAها مسئول توزیع مس هستند و بیان پروتئین‌های وابسته به مس را در گیاهان هماهنگ می‌کنند (Pilon 2017). مطالعات پیشین نشان داده است که انباشت miR408 باعث رشد رویشی، افزایش بیوماس و عملکرد دانه و همچنین بیوستز رنگدانه‌ها در آرابیدسیپس می‌شود (Zhang et al. 2011, 2014; Zhang and Li 2013; Song et al. 2017). بنابراین شناسایی توالی مرتبط با Cupredoxin به‌عنوان هدف miR408 و الگوی بیان آن در گلرنگ زراعی می‌تواند گویای نقش مؤثر miR408 در هموستازی مس و بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی در این گونه باشد.

به‌طور کلی، با توجه به نقش حیاتی miRNAها در توسعه گیاهان و سازگاری آنها به تنش‌های محیطی، امروزه مطالعه در زمینه شناسایی و شناخت عملکرد این RNAهای کنترل‌کننده در گونه‌های مختلف گیاهی به روش‌های مختلف به‌سرعت گسترش یافته است. این تحقیق نیز با شناسایی miRNAهای گلرنگ زراعی علاوه بر تأیید بخشی از نتایج مطالعات پیشین زمینه انجام مطالعات بعدی را با هدف شناخت عملکرد آنها فراهم می‌کند.

هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) است (Bartels and Sunkar 2005). گونه‌های اکسیژن فعال تولیدشده در طول متابولیسم‌های درون‌سلولی، به‌وسیله آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (سیتوزولی و کلریلاستی) به پراکسید هیدروژن که سمیت کمتری دارند تبدیل می‌شوند و به‌این‌ترتیب یک تعادل بین تولید و حذف آنها همیشه برقرار می‌شود، درحالی‌که وقوع تنش‌های غیرزنده منجر به تولید و انباشت گونه‌های اکسیژن فعال در سطوح سمی می‌شود (Apel and Hirt 2004). کاهش بیان miR398 در زمان وقوع تنش شرایط را برای تحریک بیان ژن‌های CSD1 و CSD2 فراهم می‌کند که منجر به حذف رادیکال‌های آزاد می‌شود. در شرایط نرمال نیز miR398 در سطوح متوسط بیان می‌شود (اگرچه این سطوح در بافت‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد) و فراوانی رونوشت‌های CSD1 و CSD2 را تنظیم می‌کند (Sunkar et al. 2012). با توجه به حفاظت‌شده بودن محل اتصال miRNAها به ژن هدف، مشابه با سایر گونه‌های گیاهی برای گلرنگ زراعی نیز توالی‌های کدکننده آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان مهم‌ترین اهداف برای miR398 شناسایی شدند.

miR408 یکی از خانواده‌های بسیار حفاظت‌شده به شمار می‌آید و تا به امروز در بیش از ۳۰ گونه گیاهی گزارش شده است (Kozomara and Griffiths-Jones 2011)، این ویژگی می‌تواند نشان‌دهنده نقش حیاتی miR408 در تکامل گیاهان باشد. در گونه‌های مختلف گیاهی گزارش شده است که miR408 در پاسخ به انواع فاکتورهای محیطی، ازجمله مس، نور، تنش‌های شوری، کم‌آبی، سرما و گونه‌های اکسیژن فعال دارای الگوهای بیانی مشخصی است (Abdel-Ghany et al. 2009; Kantar et al. 2010; Zhang et al. 2014; Ma et al. 2015). مطالعات پیشین

### منابع

Abdel-Ghany SE (2009) Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. *Planta* 229:767-779.

Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131:3357-3365.

Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research* 33:2697-2706

Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350-355.

- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell* 15:2730-2741.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24:23-58.
- Bonnet E, Wuyts J, Rouzé: and Van de Peer Y (2004) Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics* 20:2911-2917.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLOS Biology* 3:e85.
- Cao S, Zhu QH, Shen W, Jiao X, Zhao X, Wang MB, Liu Q (2013) Comparative profiling of miRNA expression in developing seeds of high linoleic and high oleic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) plants. *Frontiers in Plant Science* 4:489.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Lao KQ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 33:e179-e179.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676.
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Current Biology* 13:1768-1774.
- Frazier TP, Xie F, Freistaedter A, Burklew CE, Zhang B (2010) Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Planta* 232:1289-1308.
- Goodman DH (1964) Safflower: utilization and significance in nutrition and allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 35:38-42.
- Gough J, Chothia C (2004) The linked conservation of structure and function in a family of high diversity: the monomeric cupredoxins. *Structure* 12:917-925.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2007) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research* 36:D154-D158.
- Guo HS, Xie Q, Fei JF, Chua NH (2005) MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *The Plant Cell* 17:1376-1386.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* 14:787-799.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Annual Review of Plant Biology* 57:19-53
- Kantar M, Unver T, Budak H (2010) Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. *Functional and Integrative Genomics* 10:493-507.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S (2010) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* 39:D152-D157.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
- Li H, Dong Y, Sun Y, Zhu E, Yang J, Liu X,... Li X (2011). Investigation of the microRNAs in safflower seed, leaf, and petal by high-throughput sequencing. *Planta* 233:611-619.
- Li YF, Zheng Y, Addo-Quaye C, Zhang L, Saini A, Jagadeeswaran G, Sunkar R (2010) Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. *The Plant Journal* 62:742-759.
- 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.
- Ma C, Burd S, Lers A (2015) miR408 is involved in abiotic stress responses in Arabidopsis. *The Plant Journal* 84:169-187.
- Nersissian AM, Shipp EL (2002) Blue copper-binding domains. *Advances in Protein Chemistry* 60:271-340.
- Nie S, Xu L, Wang Y, Huang D, Muleke EM, Sun X, Liu L (2015) Identification of bolting-related microRNAs and their targets reveals complex miRNA-mediated flowering-time regulatory networks in radish (*Raphanus sativus* L.). *Scientific Reports* 5:14034.
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 12:1484-1495.
- Pilon M (2017) The copper microRNAs. *New Phytologist* 213:1030-1035.
- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* 9:256-263.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes and Development* 16:1616-1626.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513-520.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols* 3:1101-1108.
- Song Z, Zhang L, Wang Y, Li H, Li S, Zhang H (2017) Constitutive Expression of miR408 Improves Biomass and Seed Yield in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 8:2114.
- Sunkar R (2010) MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* 21:805-811.

- Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK (2005) Cloning and characterization of microRNAs from rice. *The Plant Cell* 17:1397-1411.
- Sunkar R, Jagadeeswaran G (2008) In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biology* 8:37.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell* 18:2051-2065.
- Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science* 17:196-203.
- Unver T, Budak H (2009) Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*. *Planta* 230:659-669.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3:12.
- Weiss EA (1971) *Castor, Sesame and Safflower*. Leonard Hill, London. Micropropagation of Castor 145:0-9.
- Williams L, Grigg SP, Xie M, Christensen S, Fletcher JC (2005) Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development* 132:3657-3668.
- Wu G, Poethig RS (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133:3539-3547.
- Zhang B H, Pan XP, Wang QL, George, P, Anderson TA (2005) Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Research* 15:336.
- Zhang B, Pan X, Anderson TA (2006b) Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS Letters* 580:3753-3762.
- Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA (2006d) Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal* 46:243-259.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2006a) Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology* 289:3-16.
- Zhang B, Pan X, Stellwag EJ (2008) Identification of soybean microRNAs and their targets. *Planta* 229:161-182.
- Zhang B, Pan X, Wang Q, Cobb GP, Anderson TA (2006e) Computational identification of microRNAs and their targets. *Computational Biology and Chemistry* 30:395-407.
- Zhang B, Wang Q, Wang K, Pan X, Liu F, Guo T, Cobb GP, Anderson TA (2007) Identification of cotton microRNAs and their targets. *Gene* 397:26-37.
- Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA (2006c) Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63:246-254.
- Zhang H, He H, Wang X, Wang X, Yang X, Li L, Deng XW (2011) Genome-wide mapping of the HY5-mediated gene networks in *Arabidopsis* that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation. *The Plant Journal* 65:346-358.
- Zhang H, Li L (2013) SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 74:98-109.
- Zhang H, Zhao X, Li J, Cai H, Deng XW, Li L (2014) MicroRNA 408 is critical for the HY5-SPL7 gene network that mediates the coordinated response to light and copper. *The Plant Cell* 26:4933-4953.
- 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* 10:29.
- Zhou X, Sunkar R, Jin H, Zhu JK, Zhang W (2009) Genome-wide identification and analysis of small RNAs originated from natural antisense transcripts in *Oryza sativa*. *Genome Research* 19: 70-78.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31:3406-3415.