ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱
صفحه ۳۰۶ - ۲۹۵

بررسی بیوانفورماتیکی و شناسایی نقش osa-miR164 در پاسخ به تنش غیر زیستی در برنج

In Silico identification of osa-miR164 role in response to abiotic stress in rice

زهرا قربانزاده[۱]، رسمیه حمید[۲]، محمدرضا غفاری*[۱]، قاسم حسینی سالکده[۱]

۱- به‌ترتیب دکتری، استادیار، استاد، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استادیار، موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

Ghorbanzadeh Z[1], Hamid R[2], Ghaffari MR[*1], Hosseini Salekdeh Gh[1]

1- PhD, Assistant Professor, Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2- Assistant Professor, cotton Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) gorgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:mrghaffari52@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳)

چکیده

MicroRNA (miRNA) گروه بزرگی از RNAهای کوچک و غیرکدکننده (~ ۲۲ نوکلئوتید) هستند که در تنظیم پسارونویسی بیان ژن به‌صورت برش mRNA هدف و یا مهار ترجمه نقش دارند. مطالعات نشان داده‌اند که miRNAها نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان به شرایط نامطلوب محیطی دارند. در این مطالعه خانواده miR164 در برنج (*Oryza sativa*)، مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک، توالی کلیه osa-miR164 متعلق به خانواده miR164 برنج تجزیه و تحلیل شده، و پروفایل بیانی osa-miR164 تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی مختلف ارزیابی شد. سپس عناصر تنظیمی سیس بر روی پیشبرهای ژن osa-miR164 پیش‌بینی شده و به‌طور همزمان ژن‌های هدف miR164 و عملکرد آن‌ها شناسایی شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد نقاط حفاظتی زیادی در توالی‌های osa-miR164 بالغ وجود دارد که در توالی‌های پیش‌ساز دیده نمی‌شود. بنابراین الگوهای بیانی متفاوت اعضای خانواده ژنی osa-miR164 تحت شرایط تنش و عناصر تنظیمی متعدد سیس موجود در پیشبرهای ژن osa-miR164 ممکن است توضیحی برای الگوی بیانی متنوع osa-miR164 باشد. در این تحقیق برخی از ژن‌های هدف بالقوه osa-miR164 شناسایی و بیان آن‌ها در شرایط تنش‌های مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در مجموع یافته‌های این پژوهش منبع با ارزشی برای شناسایی و ارزیابی بیشتر میان کنش بین ژن‌های هدف خانواده osa-miR164 در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی

برنج
پاسخ به تنش غیر زیستی
غیر کدکننده
miR164
RNA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

مقدمه

مولکول‌های میکروRNA (miRNA)، RNAهای غیرکدکننده کوچک و تک‌رشته‌ای به طول ۲۲ نوکلئوتید هستند که طی فرایندی از RNA دورشته‌ای (dsRNA[1]) حاصل می‌شوند (Bartel 2004). miRNAها در گیاهان عمدتاً در کنترل بیان ژن در سطوح رونویسی و پس از رونویسی نقش دارند و از miRNA اولیه به‌وسیله RNAپلی‌مراز II از ژن‌های miRNA رونویسی می‌شوند. miRNAهای بالغ از رونوشت‌های پیش‌ساز ساختار ساقه–حلقه دورشته‌ای (پیش‌ساز miRNA) پس از پردازش با HYL1, HEN1, DCL1 تولید می‌شوند. در نهایت، miRNAهای بالغ در یک کمپلکس خاموش کننده (RISC) گنجانده می‌شوند که mRNAهای خاص را هدف قرار می‌دهند (Morris and Mattick 2014). miRNAها، توالی مکمل خود را شناسایی و با برش mRNA هدف و یا مهار ترجمه، بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند (Li and Yu 2021). miRNAهای گیاهی و ژن‌های مورد هدف آن‌ها در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی و متابولیکی گیاه مانند رشد، بیوسنتز ترکیبات، پیام‌رسانی اکسین، تشکیل ریشه‌های جانبی و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و زیستی مختلف نقش دارند (Hamid et al. 2020). در میان این ژن های هدف، بسیاری از فاکتورهای رونویسی از جمله NAC، SPL و NF-YA نیز قرار دارند؛ تنظیم این عوامل رونویسی توسط miRNAها بیان ژن‌های پایین دست این عوامل را افزایش یا کاهش می‌دهد (Sharma et al. 2021). خانواده miR164 یک miRNA حفاظت شده است که در بسیاری از گونه‌های گیاهی شناسایی شده است و یکی از اولین miRNAهای کلون شده از آرابیدوپسیس می‌باشد (Laufs et al. 2004). خانواده‌miR164، ژن‌های حفاظت شدهٔ متعلق به عوامل رونویسی NAC را هدف قرار می‌دهند. یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی در گیاهان، عوامل رونویسی NAC هستند (Mohanta et al. 2020). این خانواده به‌عنوان پیچیده‌ترین ابرخانواده عوامل رونویسی در گیاهان به‌شمار می‌رود. ژن‌های NAC مختص گیاهان هستند و در تمامی گونه‌های گیاهی حضور دارد. NAC از سه زیر خانواده پروتئینی که پیشتر شناسایی شده‌اند تشکیل شده‌است. NAM از اطلسی، ATAF1/2 و CUC2 از آرابیدوپسیس که هر سه دمین NAC دارند سه زیر خانواده NAC هستند. پروتئین‌های خانواده ژنی NAC شامل یک دمین NAC بسیار حفاظت شده در انتهای آمینی و یک ناحیه تنظیم رونویسی بسیار متغیر در انتهای کربوکسیلی هستند. دمین انتهای آمینی از حدود ۱۵۰ تا ۱۶۰ اسید آمینه با پنج زیردمین A-E تشکیل شده است که برای اتصال این عوامل به DNA ضروری می‌باشند (Puranik et al. 2012). به‌عنوان عامل مهم در حفظ رشد جانبی ریشه، تشکیل اندام‌های رویشی و گل، پیری برگ و مرگ سلولی مورد نیاز است (Ghorbanzadeh and Ghafari 2019). در آرابیدوپسیس سه عضو از خانواده (ath- miR164) miR164a/b/c پنج mRNA کدکننده دمین NAC (CUC1/At3g15170, CUC2/At5g53950, NAC1/At1g56010, At5g07680, and At5g61430) را مورد هدف قرار می‌دهد (Mallory et al. 2004). در ذرت miR164 به‌طور مستقیم ZmNAC1 را هدف قرار می‌دهد که باعث نمو ریشه‌های جانبی می‌شود. ژن NAC1 نقش ضروری در سیگنالینگ اکسین بر عهده دارد که موجب نمو ریشه جانبی می‌شود. مشخص شده است که AtNAC1 به‌عنوان واسطه در مسیر پیام‌دهی اکسین عمل نموده و ژن‌های کدکننده مولکول‌های درگیر در نمو ریشه جانبی را فعال می‌کند (Li et al. 2012). چندین مطالعه نشان داده‌اند که خانواده miR164 در پاسخ گیاه به تنش‌های غیرزیستی نیز شرکت می‌کند. در برنج، ٦ عضو ژن در خانواده miR164 وجود دارد که شامل osa-miR164a/b/c/d/e/fاست (Li et al. 2012). گزارش شده که ژن‌های miR164 که NAC (OMTN) را مورد هدف قرار می‌دهند، ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی تحمل به خشکی در برنج عمل کنند، بیش‌بیان ژن‌های OMTN2،OMTN3، OMTN4 و OMTN6 باعث افزایش حساسیت به خشکی در گیاهان تراریخته برنج می‌شود (Fang et al. 2014).

برنج (*Oryza sativa* L)یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی است که غذای بیش از یک سوم جمعیت جهان را تأمین می‌کند. تنش‌های زیستی و غیرزیستی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد و عملکرد برنج هستند، تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۵۰ بیش از ۵۰ درصد از زمین‌های زراعی جهان در معرض تنش خشکی قرار گیرند (Chauhan et al. 2017). تنش‌های محیطی

[1] Duble strand RNA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

اثرات زیادی بر رشد و نمو و در نهایت عملکرد گیاهان دارند (Cattivelli et al. 2008). سازگاری گیاهان در رویارویی با تنش‌های محیطی، وابسته به شبکه‌هایی از فرایندهای مولکولی دخیل در تنش است، بنابراین شناسایی و بررسی خصوصیات ژن‌های دخیل در تنظیمات این سامانه شبکه‌ای ضرروری است (Vinocur and Altman 2005). شناسایی miRNAها و ژن‌های حفاظت شده هدف آن‌ها برای درک جنبه‌های تنظیمی رشد و نمو این گیاهان و پاسخ به تنش‌ها، ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به نقش‌های متعدد عوامل رونویسی NAC در تحمل به تنش‌های محیطی، درک مکانیسم‌های مولکولی پروتئین‌های NAC و تنظیم پیچیده آن‌ها توسط miR164 امری مهم خواهد بود. هدف این مطالعه بررسی miR164 برنج و ژن‌های هدف آن‌ها در پاسخ به شرایط تنش با استفاده از رویکرد بیوانفورماتیک جهت تحقیق پروفایل بیانی osa-miR164 تحت تیمارهای مختلف تنش، تنظیم بیان ژن‌های osa-miR164 توسط عناصر تنظیمی سیس[1] موجود در پیشبرهای ژن و روند بیان ژن‌های هدف miR164 تحت تنش‌های مختلف است.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده miR164 با جستجو در پایگاه اطلاعاتی miRbase (http://www.mirbase.org) (Kozomara and Griffiths-Jones 2014) آغاز شد و توالی ساختار ثانویه و بالغ miRNAها جمع‌آوری شدند. سپس این توالی‌ها توسط نرم‌افزار Clustal W (Larkin et al. 2007) و Mega 7 (Kumar et al. 2016) هم‌ردیف شدند.

برای شناسایی راه‌اندازها، توالی‌های بالادستی پیش‌ساز microRNAهای هر ژن osa-miR164 از پایگاه‌داده ژنوم برنج (http://rice.plantbiology.msu.edu/) دانلود شد. توالی ۱۵۰۰ جفت‌باز از ۵ پیش ساز miRNA به‌عنوان ناحیه پیشبر بازیابی شد. TSSsها[2] (محل شروع رونویسی) توسط پیش‌بینی کننده هسته یوکاریوتی YAPP (http://www.bioinformatics.org/yapp/cgibin/yapp.cgi)، که ابزاری برای اسکن عناصر راه‌انداز هسته است، شناسایی شدند. BREs (عناصر تشخیص B)[3]، جعبه‌های TATA[4]، INR[5] (موتیف آغازگر) و DPE[6] (عنصر راه‌انداز پایین دست) و ترکیب‌های هم‌افزایی این عناصر نیز شناسایی شدند. پیشبرهای تایید شده نزدیک‌ترین پیشبرها به ۵ پیش‌ساز miR164 بودند.

مناطق پیش بر احتمالی (۱۵۰۰ جفت‌باز بالادست پیش‌ساز miRNAها) برای پیش‌بینی عناصر تنظیمی سیس و موتیف‌های تنظیم‌کننده به‌کار گرفته شدند. برای آنالیز عناصر تنظیمی سیس در خانواده osa-miR164 از پایگاه داده SOGO (https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgibin/sogo.cgi?lang=en) استفاده شد.

توالی‌های بالغ miR164 از پایگاه اطلاعاتی miRbase به‌دست آمد، و ژن‌های هدف miR164 با استفاده از نرم‌افزار psRNA Target (version 2017) با پارامترهای پیش فرض پیش‌بینی شد. از پایگاه RAD-DB و Uniprot نیز برای تایید عملکرد ژن‌های هدف miR164 استفاده شد.

پروفایل‌های بیانی osa-miR164a/b/c/d/e/f از پایگاه داده PmiRExAt@NABI (Gurjar et al. 2016) استخراج شد. سطح بیان نسبی ژن بین شرایط کنترل و تیمارهای مختلف یا شرایط تنش ارائه شد.

بررسی بیان ژن‌های انتخابی با استفاده از RT-qPCR صورت گرفت، در این مطالعه از بذور دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به خشکی برنج استفاده شد. کشت بذور ژنوتیپ‌های مختلف در محلول غذایی یوشیدا با شرایط دمای ی ۳ ±۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی صورت پذیرفت. اعمال تنش رو ی گیاهچه‌های ۳۵ روزه با فنوتیپی مشابه انجام شد (Rathod et al. 2020). تنش به‌صورت قطع آبیاری به مدت ۱۴ روز اعمال شد. ظرفیت زراعی خاک سی عدد گلدان به‌صورت تصادفی از نقاط مختلف گلخانه روزانه و به روش وزنی اندازه‌گیری شد. نمونه برداری در روز چهاردهم که ظرفیت زراعی مطلوب ۵±۳۰٪ به‌دست آمد، از بافت های ریشه

[1] cis
[2] Transcription starting sites

[3] B recognition elements
[4] TATA boxes
[5] initiator motif
[6] downstream promoter element

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

(۳ تکرار بیولوژیکی)، از گیاهان شاهد و تحت تیمار تنش انجام شد (Thoppurathu et al. 2022). نمونه‌ها برای انجام مراحل بعدی در فریزر ۸۰ -درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج RNA کل با استفاده از محلول ترایزول شرکت Invitrogen انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA توسط دستگاه نانودارپ شرکت ND-100 (Nanodrop technologies, W ilmington, DE, USA) انجام شد. همچنین الکتروفورز ژل یک درصد بررسی شد. جهت حذف آلودگی DNA در محلول استخراج RNA کل، از آنزیم DNase شرکت Geneall استفاده شد. سپس ساخت cDNA توسط کیت synthesis cDNA iScript شرکت BioRad مطابق با دستورالعمل توصیه شده صورت پذیرفت. الگوی بیانی ژن‌های کاندید در تحمل به تنش خشکی به‌وسیله PCR کمی با استفاده از کیت SYBR 1SuperMix Green شرکت Quanta و دستگاه Real-time PCR شرکت Bio-Rad مطالعه شد. هر واکنش qPCR-RT در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر از The Maxima SYBR Green/ROX RT-qPCR Mix Master. شرکت ترمو فیشر آمریکا، ۲ میکرولیتر cDNA رقیق شده، ۳ /۰ میکرولیتر آغازگر و ٤ /۳ میکرولیتر آب عاری از RNase، با استفاده از چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ٦۰ درجه سانتی‌گراد ٦۰ ثانیه در ٤۰ چرخه بوده و ۳ کنترل منفی (NTC) نیز در نظر گرفته شد. آنالیز منحنی ذوب نمونه‌ها و سیکل آستانه با نرم‌افزار CFX (Rad-Bio) محاسبه و ژن 18S rRNA به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد (جدول ۱) میزان بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Rathod et al. 2020) و در نهایت، میزان تغییرات بیان این ژن‌ها تحت تنش خشکی نسبت به شاهد (آبیاری معمولی) سنجیده شدند.

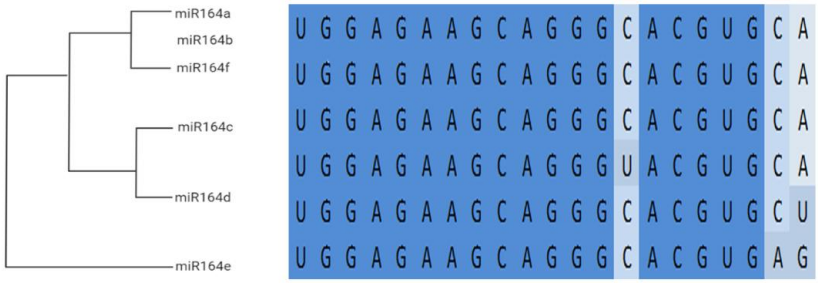
نتایج

براساس پایگاه اطلاعاتی miRbase خانواده ژنی miR164 در برنج متشکل از ٦ ژن است، که شامل (miR164a, miR164b, miR164c, miR164d, miR164e, miR164f) می‌باشند. miR164a, miR164b, miR164c, miR164d, miR164e, miR164f به‌ترتیب روی کروموزوم‌های شماره هفت ۲۸۵۲۳۳٤۱-۲۸۵۲۳٤۹٦ و شماره پنج ۱۵۸۹٦۱٦۳-۱۵۸۹٦۲۷۱، کروموزوم شماره پنج ۱۷۳۲۷٤٤۰-۱۷۳۲۷۵۵۸، کروموزوم شماره دو ۳۳۱٤۳۵٦۷-۳۳۱٤۳٦٦۰، کروموزوم شماره سه ۱۰۵٤۲۱۵۷-۱۰۵٤۲۲۸ و کروموزوم شماره پنج ۲۳۳٤۳۹۰۸-۲۳۳٤٤۱۱۷ قرار دارند. توالی‌های بالغ (miR164a, miR164b, miR164f) صد درصد یکسان هستند (شکل ۱). اگرچه miR164c و miR164d در یک نوکلئوتید با miR164a,b,f متفاوت هستند. چهاردهمین باز از miR164c و بیست و یکمین باز از miR164d یوراسیل می‌باشد. همچنین miR164e دارای دو نوکلئوتید متفاوت است، در این مولکول بیستمین باز آدنین و بیست و یکمین باز گوانین می‌باشد (شکل ۱).

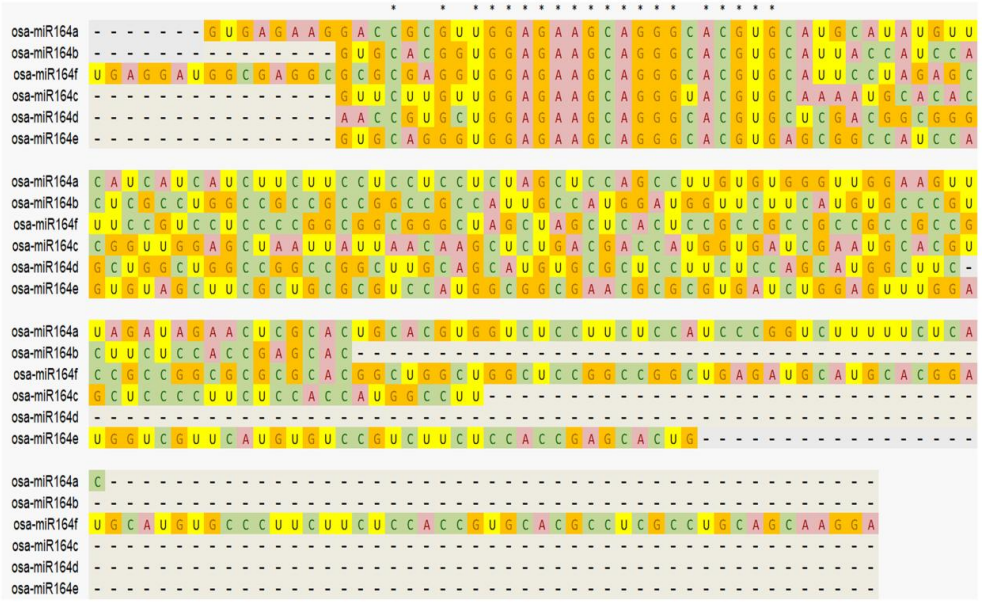
جدول ۱- مشخصات آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژن‌های انتخابی با استفاده از نرم‌افزارOligo

نام آغازگر	شماره دستیابی	توالی پیشرو	توالی معکوس	اندازه محصول	درصد GC
DREB	Os01g0968800	GAAGCTGCCGCGATCCAT	GATCTCGCGCTTCTCTCGC	۱۵۲	۵۲
ERF	Os02g0657000	CATGCATGCAAGCCAGCTAC	GACGCAAACGCAGGACAAAA	۱٦۰	۵٤
OMTN6	Os08t0200600-02	CCGGAGACCTTCAGTGTGTT	CTTGTCGGATCCACGCAATC	۱۸۵	۵۵
OMTN4	Os06t0675600-01	TCCGCAAAGAAGGACAAGGG	ACATGGAGAATCCAACAAAGG	۱۲۰	۵۸
MYB	Os01g0142500	ATCGCCTCTTGTCCTCGTTC	CCATGAACCAGTTCCCCCTC	۱۷٤	۵۵
18S rRNA		CTACGTCCCTGCCCTTTGTAC	ACACTTCACCGGACCATTCAA		

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]



شکل ۱- هم‌ردیفی توالی بالغ miR164 در برنج



شکل ۲- هم‌ردیفی توالی‌های پیش‌ساز miR164. سمبل ستاره نوکلئوتیدهای یکسان را نشان می‌دهد

از آن‌جایی‌که توالی‌های بالغ osa-miR164 بسیار حفاظت شده‌اند، توالی‌های پیش‌ساز osa-miR 164 بیشتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که توالی‌های پیش‌ساز اعضای خانواده osa-miR 164 کاملاً متفاوت بودند (به استثنای توالی‌های بالغ). توالی‌های پیش‌ساز فقط یک نوکلئوتید C (پنجمین باز بالادست توالی بالغ) و یک نوکلئوتید G (دومین باز بالادست توالی بالغ) مشترک دارند (شکل ۲).

عناصر تنظیمی سیس موجود در پیشبرهای ژن‌های osa-miR 164 جدول ۲ نشان داده شده است. موتیف‌های MYC، MYB و CuRe که به‌ترتیب در پاسخ به اسید آبسیزیک و تنظیم پاسخ به تنش خشکی نقش دارند، در همه ژن‌ها به تعداد زیاد یافت می‌شوند، که نشان می‌دهد خانواده ژنی miR164 به شدت توسط تنش خشکی، اسید آبسیزیک تنظیم می‌شود. موتیف DRE (در پاسخ به خشکی) در ژن‌های osa-miR164c و osa-miR164f رایج می‌باشد. این موتیف در قسمت انتهایی ناحیه تنظیمی ۵ در osa-miR164c یافت می‌شوند در حالی‌که در ژن osa-miR164f به‌طور گسترده پخش می‌شوند. موتیف SuRe (عنصر پاسخگو به گوگرد) در همه ژن‌ها در مقادیر کم یافت شد، در حالی که Erd-1 (که برای پاسخ اولیه به کم آبی لازم است) در تمام مناطق تنظیمی ژن osa-miR164 در فراوانی‌های مختلف مشاهده شد. موتیف LRT (عنصر پاسخ به دمای پایین) تنها در Mirهای osa-miR164b,c,f مشاهده شد. موتیف I-box و ASF-1 (عنصر تنظیم نور) در تمام مناطق تنظیمی اعضای خانواده ژنی osa-miR164 گسترده بود. عناصر بیانگر قند (TATAY، A-box، جعبه پیریمیدین، GARE) به‌طور متفاوتی بین شش ژن توزیع یافته‌اند، و در osa-miR164e وجود نداشتند. موتیف GARE در osa-

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

miR164d و osa-miR164f مشاهده شد در حالی‌که A-box فقط در osa-miR164f وجود داشت. با توجه به عناصر تنظیمی سیس مرتبط با هورمون، موتیف ABRE (عنصر پاسخگو به اسید آبسیزیک) در ۵ ژن osa-miR164 مشاهده شد در حالی‌که در-osa miR164b یافت نشد. S-box (نقش مهم در پاسخ به ABA) فقط در osa-miR164c قرار داشت. ARF (پاسخ اکسین) با فراوانی‌های مختلف در همه ژن‌ها و بالاترین میزان در -osa miR164f مشاهده شد

جدول ۲- عناصر تنظیمی سیس احتمالی در توالی‌های تنظیمی ′۵ خانواده ژن osa-miR164 شناسایی شده و ۱/۵ کیلو باز (kb) منطقه تنظیمی با استفاده از پایگاه‌های داده PLACE و YAPP مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت

عناصر تنظیمی سیس	توالی	عملکرد	منابع	miR164					
				a	b	c	d	e	f
DRE	A/GCCGAC	پاسخ به شوری و خشکی	(Nakashima et al. 2009)	0	1	5	0	0	12
ABRE	(C/A)ACG (T/C) G(T/C/G)	پاسخ به ابسیزیک اسید	(Mohanty 2021)	2	0	1	1	2	1
MYC	CATGTG; CACATG; CANNTG	پاسخ به اتیلن	(Khan et al. 2017)	22	18	14	20	22	17
GARE	TAACAA (G/A)	پاسخ به جیبرلین	(Nakashima et al. 2009)	0	0	0	4	0	9
CuRE	5′-TTTGC (T/G)C(A/G)-3′	پاسخ به کمبود اکسیژن	(Labbé et al. 1999)	10	4	6	8	10	19
SuRE	GAGAC	پاسخ به سولفور	(Maruyama-Nakashita et al. 2005)	1	4	1	2	2	3
ARF	GGTCCAT; TGTCTC	پاسخ به اکسیژن	(Nakashima et al. 2009)	1	3	2	1	3	8
MYB	WAACCA; TAACTG; CNGTTR; YAACKG; GGATA; CAACTG	تنظیم خشکی	(Li et al. 2019)	9	13	2	7	6	2
Erd 1	ACGT	پاسخ به دهیدراته	(Mohanty 2021)	8	0	4	2	8	6
Pyrimidine box	TTTTTTCC; CCTTTT	پاسخ به جیبرلین	(Mena et al. 2002)	3	1	1	2	0	1
TATCCAY motif	TATCCA	مهار قندی	(Li et al. 2006)	1	0	1	1	0	1
SRE	TTATCCA	مهار قندی	(Maruyama-Nakashita et al. 2005)	2	1	0	0	0	0
LTRE	ACCGACA; CCGAAA; GTCGAC	پاسخ به دمای پایین	(Sheshadri et al. 2016)	0	2	6	0	0	3
A-box	TACGTA	مهار قندی	(Kovalchuk et al. 2012)	0	0	0	0	0	2
S-box	CACCT(C/T) (C/T)A	پاسخ به ابسیزیک اسید و قند	(Acevedo-Hernández et al. 2005)	0	0	1	0	0	0
CMSRE-1	TGGACGG	سیگنالدهی کربوهیدرات	(Morikami et al. 2005)	0	0	0	0	2	0
ASF-1 motif	TGGACG	تنظیم نوری	(Xu et al. 2013)	5	1	4	2	1	3
I-box	GATAAG	جعبه نوری	(Rose et al. 1999)	6	4	1	4	2	3

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

جدول ۳- ژن‌های مورد هدف osa-miR164 با مکان ژنی و عملکرد

مطالعات سابق	عملکرد ژن هدف	نام ژن هدف	مکان ژن هدف	میکرو ار ان
بیان ژن NAC در پاسخ به خشکی (Fang et al. 2014)	سرعت رونویسی اطلاعات ژنتیکی از DNA به mRNA را با اتصال به یک توالی DNA خاص کنترل می کند.	NAC1(OMTN1)	LOC_Os02g36880	Osa-miR164a /b/c/d/e/f
		OMTN2	LOC_Os04g38720	
		OMTN3	LOC_Os12g41680	
		OMTN4	LOC_Os06g46270	
		OMTN5	LOC_Os06g23650	
شناسایی ژن‌های حاوی دمین BRUP و سطح پاسخ به تنش‌های غیرزیستی (Ding et al. 2009)	بیان شده در پرچم	BURP	LOC_Os02g18690	
پروفایل بیانی ژن‌های مربوط به گلدهی (Wang et al. 2018)	ژن‌های مربوط به گل‌دهی در رقم وحشی برنج	ppg4	LOC_Os09g37700	
بیان خانواده ژنیNAC در پاسخ به خشکی(Fang et al. 2014)	سرعت رونویسی اطلاعات ژنتیکی از DNA به mRNA را با اتصال به یک توالی DNA خاص کنترل می‌کند.	OMTN6	LOC_Os08g10080	Osa-miR164 a/b/d/e/f
پاسخ به تنش‌های غیرزیستی (Zhang et al. 2017)	پروتئین ترنسپوزون		LOC_Os03g47310	

پیش‌بینی ژن‌های هدف در شناسایی ارتباط عملکردی miRNAهای بالقوه مربوطه بسیار مهم است. نُه ژن هدف osa-miR164 که توسط نرم‌افزار psRNA target پیش‌بینی شدند شامل پروتئین‌های دمین NAC (OMTN1, OMTN6)، پروتئین دمین BURP (osBURP4)، پروتئوفسفوگیلیکان و LOC_Os03g47310 می‌باشند (جدول ۳). پنج ژن (OMTN1, OMTN5)، پروتئین دمین BURP (osBURP4) و پروتئوفسفوگیلیکان به‌وسیله شش ژن osa-miR164 تنظیم می‌شوند. سایر ژن‌ها (OMTN6 and LOC-os03g47310) به‌وسیله پنج osa-miR146 به‌جزء osa-miR164c تنظیم می‌شوند. ژن‌های NAC پیش‌بینی شده دارای یک جایگاه مکمل osa-miR164 با دو یا سه باز ناجور با miR164 بودند. این نتایج نشان داد جایگاه‌های هدف osa-miR164 در ژن‌های NAC بسیار حفاظت شده است.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، الگوهای بیان ژن‌های osa-miR164 در پاسخ به عوامل تنش‌زا متنوع بود. در حالی‌که سطح بیان osa-miR164c کاهش یافت، سایر ژن‌های osa-miR164a/b/f/d در تمام شرایط تنش افزایش سطح بیان نشان دادند. سطح بیان osa-miR164e به طور متفاوتی بین شرایط تنش تغییر یافت، که سطح این Mir در شرایط خشکی و شوری کاهش یافت در حالی‌که تحت شرایط تنش سرما افزایش بیان نشان داده است. پروفایل بیان هشت ژن هدف osa-miR164 به‌جزء ژن LOC_Os03g47310 در اندام هوایی و ریشه در شرایط تنش‌های مختلف از پایگاه‌های داده TENOR و RiceXPro به‌دست آمد و به‌صورت نقشه حرارتی در شکل ٤ نشان داده شده است. بیان ژن در ریشه در شکل ٤ الف نشان داده شده است. در خانواده ژنی NAC ژن *MTN1* (*MTN1-OMTN6*) در تمام شرایط تنش افزایش بیان داشته و تحت تنش اسمزی، ABA و JA بالاترین میزان بیان را نشان داد؛ MTN5 نیز تقریباً در تمام شرایط

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

تنش افزایش بیان داشته است؛ OMTN3 تحت تیمارهای خشکی، سرما، تنش اسمزی ABA و JA کاهش بیان داشته، اما در شرایط شوری بالا افزایش بیان داشته و OMTN6 در تمام شرایط تنش کاهش بیان داشته است.



شکل ۳- نقشه حرارتی نشان دهنده سطح بیان osa-miR164 در تنش‌های غیرزیستی

OsBURP04 در تمام شرایط تنش افزایش بیان داشت، در حالی‌که PPG 4 در اکثر شرایط تنش به جز شوری بالا کاهش بیان داشته است.

از طرفی، در شاخه (شکل ٤ ب)، بیشتر خانواده ژن NAC تحت شرایط تنش خشکی، اسمز و ABA کاهش بیان داشتند، به‌جزء MTN2 که به‌طور متفاوتی افزایش بیان داشت. OsBURP04 در تمام شرایط تنش افزایش بیان داشته است. PPG 4 در تیمارهای شوری بالا، خشکی و سرما کاهش بیان داشته اما در تنش‌های اسمزی، ABA و JA افزایش بیان داشته است (شکل ٤ ب).

مقایسه بیان ژن بین ساقه و ریشه، پاسخ‌های متضاد و یا متنوعی نشان، و پاسخ‌ها روند اختصاصی بافت (ارگان) نشان می‌دهند. OMTN 1 در همه تنش‌ها در ریشه افزایش بیان داشته، اما در بسیاری از تنش‌ها در ساقه کاهش بیان نشان می‌دهد. در ریشه، OMTN 2 در شوری بالا افزایش بیان و در شرایط تنش سرما کاهش بیان نشان می‌دهد اما در ساقه وضعیت متفاوت است. OMTN 4 در تیمارهای شوری بالا، خشکی، تنش اسمزی، JA، افزایش بیان و در شرایط تنش سرما در ریشه کاهش بیان نشان داد، اما در اندام هوایی بیان OMTN 4 در جهت مخالف بود. MTN5 در تمام تنش‌ها در ریشه افزایش بیان را نشان می‌دهد، اما در اندام هوایی بیان آن در تیمارهای خشکی، سرما، اسمزی و ABA روند کاهش داشته است. در مقابل، OMTN 6 در تمام تنش‌ها در ریشه کاهش بیان، اما تحت تیمار JA در ساقه افزایش بیان نشان داد. بیان ژن PPG 4 نیز در تیمارهای شوری بالا، ABA و JA پاسخ‌های متضادی بین ریشه و اندام هوایی نشان داد.

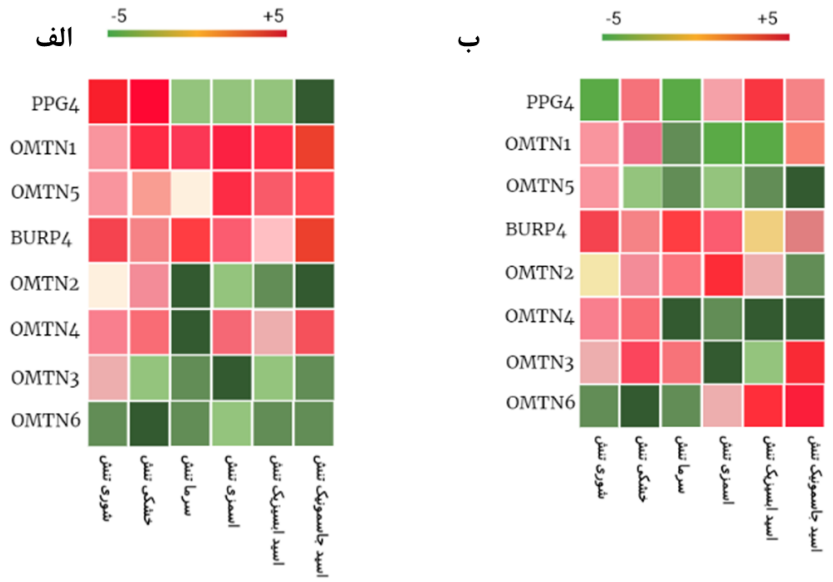
جهت دستیابی به اطلاعات بیشتر در زمینه ژن‌های مورد هدف miR164 در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، بیان ۵ ژن هدف miR164 به‌عنوان ژن انتخابی تحت تیمار خشکی با استفاده از qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن DREB بعد از اعمال تیمار خشکی در بافت ریشه، افزایش بیان ۳/۱٤ برابری نسبت به شاهد نشان داد. افزایش بیان ٤/۳٦ برابری ژن OMTN4 نسبت به شاهد در بافت ریشه باعث تحمل به تنش خشکی می‌شود. بعد از اعمال تنش خشکی کاهش بیان ٤/۸٦ برابری ژن OMTN6 نسبت به شاهد در بافت‌های ریشه نشان داد (شکل ۵).

بحث

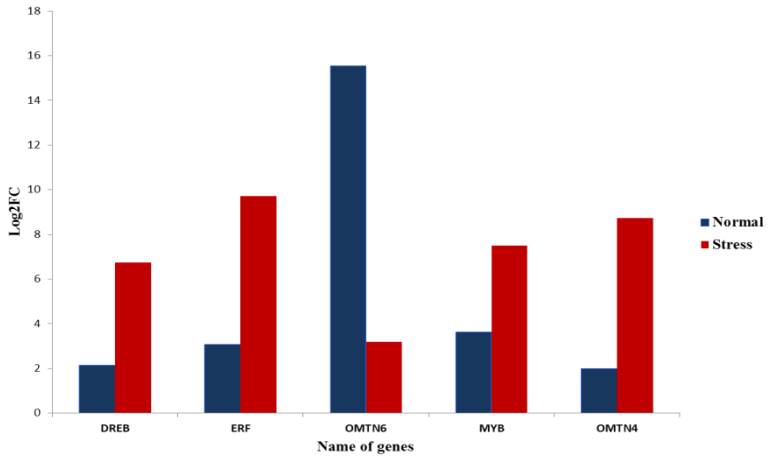
MicroRNAها مولکول‌های RNA غیرکدکننده کوچکی هستند که نقش کلیدی در رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های گیاهان دارند. miRNAها با تنظیم بیان ژن‌های هدف مورد نظر عمل می‌کنند. بنابراین، شناسایی ژن‌های هدف احتمالی miRNAها روشی مؤثر برای بررسی مکانیسم‌های پیچیده مسئول سازگاری با شرایط تنش فراهم می‌کند. در این مطالعه با استفاده از رویکردهای بیوانفورماتیک، خانواده miR164 در برنج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج آنالیز نشان داد که توالی‌های بالغ osa-miR164 a/b/c/d/e/f بسیار حفاظت شده هستند، این یافته‌ها با گزارشات مطابقت دارد Fang et al. (2014) در حالی‌که توالی‌های پیش‌سازها بسیار متغیر هستند. توالی‌های متنوع پیش‌سازهای miR164 ممکن است برای طراحی آغازگرهایی برای تعیین کمیت سطوح بیان ژن miR164، به‌ویژه برای osa-miR164 a/b//f که در توالی‌های بالغ کاملاً یکسان نشان داده شده‌اند، جالب باشد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]



شکل ٤- نقشه حرارتی الگوی بیان ژن‌های هدف osa-miR164 در شرایط محیطی نامطلوب در نمونه‌های ریشه (الف) و نمونه‌های شاخه (ب)



شکل ٥- بررسی بیان نسبی ژن‌های هدف miR164 کاندید ایجاد تحمل به تنش خشکی در برنج

به‌منظور درک اینکه چگونه عوامل تنش بیان ژن‌های osa-miR 164 را تنظیم می‌کنند، مناطق تنظیمی ژن‌های osa-miR 164 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج ترکیبات مختلف عناصر تنظیمی سیس موجود در پیشبرهر osa-miR164 الگوی بیان متنوع ژن‌های osa-miR164 را در پاسخ به شرایط محیطی مختلف نشان می‌دهد. با این حال، داده‌های بیانی osa-miR164ها در پایگاه داده هنوز محدود است، که در آن سطوح بیان osa-miR164a/b/f به‌طور جداگانه یافت نمی‌شود (شکل ۳). برخی از عناصر کلیدی تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به تنش غیرزیستی (DRE، MYC، MYB، و غیره) و مرتبط با هورمون (GARE، ABRE، ARF) در پیشبر ژن osa-miR164 یافت شد که نشان‌دهنده نقش عملکردی miR164 در پاسخ به شرایط تنش در برنج است. در مطالعه‌ای osa-miR164 تحت تنش رادیواکتیو افزایش بیان داشته است (Zhang et al. 2011). بیان ژن miR164 در پاسخ به تنش شوری بین گونه‌های گیاهی متفاوت است، که در آن افزایش بیان در *Arabidopsis thaliana* (Amor et al. 2009) و *Populus trichocarpa* (Li et al. 2013) مشاهده شد، اما کاهش بیان در *Zea mays* (Li et al. 2013) و *Panicum virgatum* (Xie et al. 2015) مشاهده شد. مطالعه قبلی گزارش کرده است که پیام‌رسانی اکسین

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

توسط miR164 برای رشد طبیعی ریشه جانبی مهم است (Kim et al. 2009). بیان MiR164 با سطح اکسین و NAC1 هدف برای تنظیم پیام رسانی اکسین مطابقت داشت (Liu and Chen 2009). در تحقیقات قبلی، نشان داده شد که miR164 برنج، شش ژن NAC با نام OMTN1-OMTN6 و ۳ ژن دیگر به نام OMT7-OMT9 را هدف قرار می‌دهند (Fang et al. 2014).

در این مطالعه، ۹ ژن هدف osa-miR164 قابل بررسی‌اند که در برخی از آن‌ها در پاسخ‌های تنش در برنج مانند ژن‌های کدکننده پروتئین‌های حوزه NAC OMTN1-OMTN6، گزارش شده بودند (جدول ۲). سطوح بیان ژن‌های مورد هدف osa-miR164 تحت شرایط تنش مختلف بین نمونه‌های ریشه و نمونه‌های شاخه متغیر بود و پاسخ‌های متضاد اختصاصی بافت را نشان دادند. (شکل ٤). بنابراین ممکن است انجام آزمایشات برای بررسی سطوح بیان ژن‌های osa-miR 164 به‌طور جداگانه در ریشه‌ها و شاخساره‌های گیاه برنج معنی‌دار باشد. به‌طور کلی، خانواده miR164 برنج دارای شش عضو ژن است که توسط عناصر تنظیمی سیس مرتبط با تنش تنظیم می‌شوند و متعاقباً بیان ژن‌های هدف درگیر در پاسخ به تنش را تنظیم می‌کنند. درک عمیق مکانیسم‌های تنظیمی توسط miRNA که مسئول کنترل تنش هستند ممکن است به کشف شبکه‌های تنظیمی پاسخ به تنش کمک کند و همچنین به توسعه راهکارهای جدید برای تولید گیاهان برنج متحمل در برابر تنش‌های غیرزیستی کمک کند.

سپاسگزاری

از بخش زیست‌شناسی سامانه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به خاطر فراهم آوردن امکانات این تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع

Acevedo Hernández GJ, P León and LR Herrera Estrella (2005) "Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light responsive unit is mediated by direct binding of ABI4." The Plant Journal 43:506-519.

Amor BB, S Wirth, F Merchan, P Laporte, Yd'Aubenton-Carafa, J Hirsch, A Maizel, A Mallory, A Lucas and JM Deragon (2009) Novel long non-protein coding RNAs involved in Arabidopsis differentiation and stress responses. Genome research 19:57-69.

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. cell 116:281-297.

Cattivelli L, F Rizza, F-W Badeck, E Mazzucotelli, AM Mastrangelo, E Francia, C Marè, A Tondelli and AM Stanca (2008) "Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics." Field crops research 105:1-14.

Chauhan BS, K Jabran and G Mahajan (2017) Rice production worldwide, Springer.

Ding X, X Hou, K Xie and L Xiong (2009) "Genome-wide identification of BURP domain-containing genes in rice reveals a gene family with diverse structures and responses to abiotic stresses." Planta 230:149-163.

Fang Y, K Xie and L Xiong (2014) "Conserved miR164-targeted NAC genes negatively regulate drought resistance in rice." Journal of experimental botany 65:2119-2135.

Ghorbanzadeh Z and MR Ghafari (2019) "miRNAs: Superheroes in the Rice Plant Misery Time." Journal of Biosafety 11:97-122.

Gurjar AKS. AS Panwar, R Gupta and SS Mantri (2016) "PmiRExAt: plant miRNA expression atlas database and web applications." Database 2016.

Hamid R, F Jacob, H Marashi, V Rathod and RS Tomar (2020) "Uncloaking lncRNA-meditated gene expression as a potential regulator of CMS in cotton (Gossypium hirsutum L.)." Genomics 112:3354-3364.

Khan MR, I Khan, Z Ibrar, J Léon and AA Naz (2017) "Drought-responsive genes expressed predominantly in root tissues are enriched with homotypic cis-regulatory clusters in promoters of major cereal crops." The Crop Journal 5:195-206.

Kim JH, H R Woo, J Kim, PO Lim, IC Lee, SH Choi, D Hwang and HG Nam (2009) "Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis." Science 323:1053-1057.

Kovalchuk N, W Wu, O Eini, N Bazanova, M Pallotta, N Shirley, R Singh, A Ismagul, S Eliby and A Johnson (2012) "The scutellar vascular bundle–specific promoter of the wheat HD- Zip IV transcription factor shows similar spatial and temporal activity in transgenic wheat, barley and rice." Plant biotechnology journal 10:43-53.

Kozomara A and S Griffiths-Jones (2014) "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data." Nucleic acids research 42:D68-D73.

Kumar S, G Stecher and K Tamura (2016) "MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

bigger datasets." Molecular biology and evolution 33:1870-1874.
Labbé S, MM Peña, AR Fernandes and DJ Thiele (1999) "A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in Schizosaccharomyces pombe." Journal of Biological Chemistry 274:36252-36260.
Larkin MA, G Blackshields, NP Brown, R Chenna, PA McGettigan, H McWilliam, F Valentin, I M Wallace, A Wilm and R Lopez (2007) "Clustal W and Clustal X version 2.0." bioinformatics 23:2947-2948.
Laufs P, A Peaucelle, H.Morin and J Traas (2004) "MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems."
Li B, H Duan, J Li, XW Deng, W Yin and X Xia (2013) "Global identification of miRNAs and targets in Populus euphratica under salt stress." Plant molecular biology 81:525-539.
Li J, G Guo, W Guo, G Guo, D Tong, Z Ni, Q Sun and Y Yao (2012) "miRNA164-directed cleavage of ZmNAC1 confers lateral root development in maize (Zea mays L.)." BMC plant biology 12:1-14.
Li J, G Han, C Sun and N Sui (2019) "Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding." Plant signaling & behavior 14:1613131.
Li, M and B Yu (2021) "Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis." RNA biology 18:2087-2096.
Li Y, K K Lee, S Walsh, C Smith, S Hadingham, K Sorefan, G Cawley and M W Bevan (2006) "Establishing glucose-and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine." Genome research 16:414-427.
Liu Q and Y-Q Chen (2009) "Insights into the mechanism of plant development: interactions of miRNAs pathway with phytohormone response." Biochemical and biophysical research communications 384:1-5.
Mallory AC, DV Dugas, D P Bartel and B Bartel (2004) "MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs." Current Biology 14:1035-1046.
Maruyama- Nakashita A, Y Nakamura, A Watanabe- Takahashi, E Inoue, T Yamaya and H Takahashi (2005) "Identification of a novel cis- acting element conferring sulfur deficiency response in Arabidopsis roots." The Plant Journal 42:305-314.
Mena M, FJ Cejudo, I Isabel-Lamoneda and P Carbonero (2002) "A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone." Plant Physiology 130:111-119.
Mohanta TK, D Yadav, A Khan, A Hashem, B Tabassum, AL Khan, EF Abd_Allah and A Al-Harrasi (2020) "Genomics, molecular and evolutionary perspective of NAC transcription factors." PloS one 15:e0231425.
Mohanty B (2021) "Promoter architecture and transcriptional regulation of genes upregulated in germination and coleoptile elongation of diverse Rice genotypes tolerant to submergence." Frontiers in Genetics 12:235.
Morikami A, R Matsunaga, Y Tanaka, S Suzuki, S Mano and K Nakamura (2005) "Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco." Molecular Genetics and Genomics 272:690-699.
Morris KV and JS Mattick (2014) "The rise of regulatory RNA." Nature Reviews Genetics 15:423-437.
Nakashima K, Y Ito and K Yamaguchi-Shinozaki (2009) "Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses." Plant physiology 149:88-95.
Puranik S, PP Sahu, PS Srivastava and M Prasad (2012) "NAC proteins: regulation and role in stress tolerance." Trends in plant science 17:369-381.
Rathod V, R Hamid, RS Tomar, S Padhiyar, J Kheni, P Thirumalaisamy and NS Munshi (2020) "Peanut (Arachis hypogaea) transcriptome revealed the molecular interactions of the defense mechanism in response to early leaf spot fungi (Cercospora arachidicola)." Plant Gene 23:100243.
Rathod V, R Hamid, RS Tomar, R Patel, S Padhiyar, J Kheni, P Thirumalaisamy and NS Munshi (2020) "Comparative RNA-Seq profiling of a resistant and susceptible peanut (Arachis hypogaea) genotypes in response to leaf rust infection caused by Puccinia arachidis." 3 Biotech 10:1-15.
Rose A, I Meier and U Wienand (1999) "The tomato I- box binding factor LeMYBI is a member of a novel class of Myb- like proteins." The Plant Journal 20:641-652.
Sharma R, S Upadhyay, S Bhattacharya and A Singh (2021) "Abiotic stress-responsive miRNA and transcription factor-mediated gene regulatory network in Oryza sativa: construction and structural measure study." Frontiers in genetics 12:130.
Sheshadri S, M Nishanth and B Simon (2016) "Stress-mediated cis-element transcription factor interactions interconnecting primary and specialized metabolism in planta." Frontiers in plant science 7:1725.
Thoppurathu FJ, Z Ghorbanzadeh, AK Vala, R Hamid and M Joshi (2022) "Unravelling the treasure trove of drought-responsive genes in wild-type peanut through transcriptomics and physiological analyses of root." Functional and Integrative Genomics: 1-19.
Vinocur B and A Altman (2005) "Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations." Current opinion in biotechnology 16:123-132.
Wang J, Y Long, J Zhang, M Xue, G Huang, K Huang, Q Yuan and X Pei (2018) "Combined analysis and miRNA expression profiles of the flowering related genes in common wild rice (oryza rufipogon Griff.)." Genes and genomics 40:835-845.
Xie F, Q Wang, R Sun and B Zhang (2015) "Deep sequencing reveals important roles of microRNAs in response to drought and salinity stress in cotton." Journal of experimental botany 66:789-804.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

ion radiation-induced microRNAs in rice." Advances in space research 47:1054-1061.

Xu F, X Huang, L Li, G Deng, H Cheng, X Rong, J Li and S Cheng (2013) "Molecular cloning and characterization of GbDXS and GbGGPPS gene promoters from Ginkgo biloba." Genet Mol Res 12:293-301.

Zhang J, K Chen, Y Pang, S A Naveed, X Zhao, X Wang, Y Wang, M Dingkuhn, J Pasuquin and Z Li (2017) "QTL mapping and candidate gene analysis of ferrous iron and zinc toxicity tolerance at seedling stage in rice by genome-wide association study." BMC genomics 18:1-15.

Zhang M, S Liang, X Hang, Y Xiang, Z Cheng, W Li, J Shi, L Huang and Y Sun (2011) "Identification of heavy-

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]