ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲
صفحه ۳۶۶ - ۳۵۷

شناسایی و تعیین خصوصیات میکرو RNAهای حفاظت شده در ریشه گیاه ریواس (*Rheum ribes*)

Identification and characterization of conserved microRNAs in Rheum ribes root (*Rheum ribes*)

سید اسعد تفسیری[۱]، احمد اسماعیلی*[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۱]، محمد مجدی[۲]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Tafsiri SA[1], Ismaili A[*1], Nazarian Firouzabadi F[1], Majdi M[2]

1- PhD Student, Professor, Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱)

چکیده

miRNAها (میرناها) دسته‌ای از مولکول‌های RNA کوتاه غیر کدکننده، با طولی حدود ۲۴-۱۸ نوکلئوتید هستند که ژن‌های هدف را در سطح پس از رونویسی کنترل می‌کنند. هیچ‌گونه گزارشی از شناسایی میرناها در گیاه ریواس ثبت نشده است. لذا در مطالعه حاضر به‌منظور پیش‌بینی میرناهای حفاظت شده بالقوه و ژن‌های هدفشان در ریشه گیاه ریواس، RNA کل از بافت ریشه استخراج شد و مورد توالی‌یابی قرار گرفت. سپس رونوشت‌های غیرکننده پروتئین شناسایی شدند و به‌عنوان توالی‌های نامزد پیش‌ساز میرنا در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ۸۲۰۴۷ رونوشت از گیاه ریواس به‌روش سرهم‌بندی نوپدید ایجاد شد. با جستجوی همولوژی این رونوشت‌ها با پایگاه داده mirbas و پیش‌بینی ساختار ثانویه، ۴ میرنا محافظت شده متعلق به خانواده‌های mir396، mir164، mir319 و mir168 شناسایی شدند. ۵۷۴ رونوشت از ترانسکریپتوم ریشه ریواس توسط این میرناها مورد هدف قرار گرفتند. در مجموع با توجه به نقش تنظیمی میرناهای شناسایی شده بر طیف وسیعی از ژن‌ها، می‌توان از این میرناها در شناسایی ژن‌های مرتبط با متابولیت‌های ثانویه بهره برد.

واژه‌های کلیدی

ریواس
ساختار ثانویه
میرنا
هستی‌شناسی ژن
Rheum ribes

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

ریواس (*Rheum ribes*) گیاهی گلدار متعلق به خانواده پلی‌گوناسه (*Polygonaceae*) می‌باشد (Cullen 1966). مطالعات داروشناسی نشان داده است که بیشتر قسمت‌های گیاه ریواس در طب سنتی به‌کار می‌رود. خواص دارویی ریشه گیاه ریواس بیشتر از دیگر اندام‌های گیاه می‌باشد که برای درمان دیابت به‌کار می‌رود و دارای خواص ضدسرطانی (Al-Shammari et al. 2020; Çınar Ayan et al. 2021) همراه با خواص سیتوتوکسی و آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Hamzeh et al. 2014; Naqishbandi et al. 2009; Öztürk et al. 2007; Raafat et al. 2021; Uyar et al. 2014). مطالعات قبلی اثبات کرده است که ریواس متابولیت‌های ثانویه فراوانی شامل استیلبن‌ها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و آنتراکینون‌ها را تولید می‌کند (Amiri et al. 2015; Çınar Ayan et al. 2021; Morozova et al. 2009; Shendure and Ji 2008) (Öztürk et al. 2007). مطالعات پیشین بیشتر روی ترکیبات شیمیایی و خواص دارویی گیاه ریواس متمرکز بوده‌اند و در سطح مولکولی پیشرفت‌های اندکی حاصل شده است.

توالی‌یابی نسل جدید تکنیک بسیار ارزشمندی جهت تسریع شناسایی ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی در گیاهان غیرمدل و بدون توالی ژنوم مرجع می‌باشد. در سال‌های اخیر، همزمان با پیشرفت‌های چشمگیر در فنون توالی‌یابی، استفاده از روش‌های محاسباتی برای دستورزی داده‌های با مقیاس وسیع ضروری می‌باشد (Jacob et al. 2016). یکی از مهم‌ترین ژن‌های کلیدی مؤثر در اغلب شبکه‌های ژنی، میرناها هستند (Jagadeeswaran et al. 2009). این کلاس از RNAهای غیرکدکننده از طریق فرآیند تداخل RNA، بیان بسیاری از ژن‌ها را در سطوح مختلف از جمله رونویسی، پردازش، پایداری RNA و ترجمه، از طریق جفت شدن با نواحی مکمل خود در mRNA هدف، تنظیم می‌کنند (Jung et al. 2009). یک ژن میرنای اولیه (pri–miRNA) گیاهی، معمولاً دارای یک ساختار ساقه – حلقه می‌باشد که در اولین مرحله از پردازش درون هسته‌ای، ساختار ساقه توسط آنزیم RNase III بریده شده و ساختار pre-miRNAs ایجاد می‌شود. در دومین مرحله از پردازش، حلقه انتهایی بریده شده و توالی دو رشته‌ای با طول متوسط ۱۸ – ۲۴ نوکلئوتید ایجاد می‌شود. در انتها با ورود ساختار دو رشته‌ای به سیتوپلاسم و تشکیل کمپلکس خاموشی القا شده (RISC)، ساختار تک رشته و بالغ میرنا ایجاد می‌شود (Du and Zamore 2005). تاکنون تعداد زیادی میرنا به همراه ژن‌های هدف‌شان در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده است (Gleave et al. 2008; Payriz et al. 2022; Sohrabi et al. 2020; Wang et al. 2012). روش‌های بیوانفورماتیکی که از ویژگی حفاظت‌شدگی بالای میرناها در گونه‌های گیاهی استفاده می‌کنند، روش مناسبی برای شناسایی میرناها می‌باشند. در این روش، به‌منظور شناسایی میرناهای حفاظت شده بالقوه، از بلاست پایگاه داده میرناهای شناسایی شده (http://www.mirbase.org) در مقابل پایگاه داده‌های موجود برای گیاه مورد نظراستفاده می‌شود (Gleave et al. 2008; Wang et al. 2012).

تاکنون هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد میرنا برای گیاه ریواس ثبت نشده است. از این‌رو هدف تحقیق حاضر توسعه داده‌های ترنسکریپتومی ریواس و شناسایی میرناهای حفاظت‌شده برای اولین بار از طریق تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ریشه‌های گیاه ریواس که هیچ گونه علایم بیماری نداشتند از کوه‌های تیتور (35º24'42"_N, 46º52'41"_E) واقع در ارتفاعات اطراف شهر سنندج در استان کردستان در اواخر فصل تابستان جمع‌آوری شدند. بعد از برداشت، نمونه‌ها تمیز و شسته شدند و به قطعات کوچک‌تری تقسیم و با ازت مایع فریز شدند و تا قبل از استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA کل از دو تکرار ریشه گیاه ریواس بر طبق پروتکل گزارش شده توسط Morante-Carriel و همکاران با اندکی تغییرات استخراج شد (Morante-Carriel et al. 2014). برای استخراج RNA، از روش CTAB و رسوب‌دهی با لیتیم کلراید به‌مدت ۲ شبانه‌روز استفاده شد که به‌طور مطلوبی باعث جداسازی RNA از DNA شد. پس از مراحل جداسازی و شستشو، RNA رسوب یافته در ۳۰-۴۰ میکرولیتر آب دیپس (Diethyl pyrocarbonate, DEPC) حل شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز ۱ درصد و با تعیین نسبت جذب نور با نسبت‌های

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

A260/280 و A260/230 با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) ارزیابی شد. سپس RNAهای با کیفیت بالا برای توالی‌یابی به شرکت نواژن (Novogene-Advancing Genomics, Improving Life, Beijing, China) فرستاده شدند.

برای ساخت کتابخانه cDNA از هر نمونه ۳ میکروگرم RNA تام با درجه یکپارچگی (RNA Integrity Number, RIN) بیشتر از ۷ مورد استفاده قرار گرفت. کتابخانه‌های cDNA با استفاده از کیت Illumina TruSeq™ RNA (Illumina, San Diego, CA, USA) طبق پروتکل شرکت سازنده ایجاد شدند، و در نهایت کتابخانه‌ی رونوشت برای هر نمونه با استفاده از پلاتفورم Illumina NovaSeq 6000 (Novogene-Advancing Genomics Improving Life, Beijing, China) توالی‌یابی شدند و خوانش‌های خوانده شده از هر دو انتها با طول ۱۵۰ جفت باز ایجاد شدند.

خوانش‌های کم کیفیت با تعداد بازهای N زیاد و خوانش‌هایی با نمره کیفیت باز کمتر از Q30 با استفاده از برنامه Trimmomatic (Bolger et al. 2014) حذف شدند و خوانش‌های باکیفیت با استفاده از برنامه Trinity سرهم‌بندی شدند (Grabherr et al. 2011; Haas et al. 2013). به‌منظور حذف توالی‌های سرهم‌بندی شده تکراری با آستانه شباهت ۹۰ درصد، از نرم‌افزار CD-HIT-EST (v4.6.8) استفاده شد (Li and Godzik 2006).

رونوشت‌های حاصل از سرهم‌بندی نوپدید به‌عنوان منبعی برای شناسایی میرناهای محافظت‌شده مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور همه توالی میرناهای ثبت شده گیاهی که شامل ۱۰۴۱۱ توالی میرنای بالغ بود از پایگاه mirbase به آدرس http://www.mirbase.org دانلود شدند. به‌منظور حذف توالی‌های تکراری میرنا از نرم‌افزار CD-HIT-EST (v4.6.8) با آستانه شباهت ۱۰۰ درصد استفاده شد (Li and Godzik 2006). سپس برای شناسایی رونوشت‌هایی که بیشترین شباهت را با توالی‌های میرنای بالغ دارند از ابزار Blastn با پارامترهای E-value ≤e^{-5} و mismatch < 4 استفاده شد. از توالی میرناهای بالغ دانلود شده به‌عنوان ورودی (Query) و از توالی‌های رونوشت به‌عنوان پایگاه مورد جستجو استفاده شد. سپس همه رونوشت‌های نامزد بر علیه پایگاه داده پروتئین‌های غیر تکراری NCBI (None Redundant protein database, NR) با پارامتر E-value ≤e^{-5}، بلاست X شدند و رونوشت‌هایی که در این پایگاه رکورد داشتند، حذف شدند.

شباهت بالای رونوشت‌های نامزد با توالی‌های میرنای بالغ به‌تنهایی برای اعتبارسنجی میرنای شناسایی شده کافی نمی‌باشد. بنابراین نحوه تاخوردگی و میزان انرژی آزاد ساختار میرنای اولیه رونوشت‌های کاندید با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomic Workbebch ver.21 مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور اطمینان از قرارگیری توالی میرنای بالغ در محل صحیح احتمالی خود در ساختار پیش‌ساز میرنا، محدوده ۱۰۰ نوکلئوتید در بالادست و پایین‌دست مختصات میرنای شناسایی شده از توالی رونوشت‌های نامزد با استفاده از ابزار Bedtools استخراج شد (Quinlan and Hall 2010). توالی‌های استخراج شده به‌عنوان ورودی برای نرم‌افزار CLC مورد استفاده قرار گرفتند. توالی‌هایی که دارای ساختار ساقه- حلقه مناسب و همچنین در یکی از بازوها شامل توالی میرنای بالغ بودند، به‌عنوان میرنای احتمالی شناخته شده و مورد بررسی قرار گرفتند. از پارامترهای: ۱- ساختار دوم با تاخوردگی مناسب و شامل ساختار ساقه حلقه، ۲- وجود توالی میرنای بالغ در یک بازو در ناحیه ساقه، ۳- عدم شکستگی در حلقه ساختار میرنا، ۴- حداکثر ۶ جفت نوکلئوتید غیر منطبق در ساختار میرنا و ۵- حداکثر اندازه گپ در ساختار میرنا ۵ نوکلئوتید، به‌منظور فیلتر کردن و شناسایی میرناها استفاده شد (Li et al. 2014; Mehta et al. 2016; Zhang et al. 2006). به‌منظور تعیین صحت ساختار میرنای احتمالی از پارامترهای درصد GC/AU، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE)، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده (AMFE)، و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) استفاده شد (روابط ۱، ۲ و ۳).

$$MFE=-\Delta G(kcal/mol) \quad \text{رابطه ۱}$$

$$AMFE = (MFE \div \text{طول میرنای پیش ساز}) \times ۱۰۰ \quad \text{رابطه ۲}$$

$$MFEI = (AMFE \div (GC\%) \quad \text{رابطه ۳}$$

شناسایی ژن‌های هدف میرناهای شناسایی‌شده با استفاده از ابزار psRNATarget با پارامترهای پیش‌فرض صورت گرفت (Dai and Zhao 2011). تفسیر عملکردی رونوشت‌های هدف میرناهای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

شناسایی شده با استفاده از ابزار بلاست X علیه پایگاه پروتئین‌های غیر تکراری NCBI (None Redundant protein database, NR) با در نظر گرفتن حد آستانه E-value < $1.0E^{-5}$ انجام گرفت (Altschul et al. 1997). تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های هدف میرناهای شناسایی شده با استفاده از ابزار Blast2Go انجام گرفت (Conesa et al. 2005). همه رونوشت‌های هدف میرناهای شناسایی شده علیه پایگاه داده KEGG (Kanehisa and Goto 2000) با استفاده از سرور آنلاین KEGG (KAAS)(http://www.genome.jp/kegg/kaas/) با E-value < 1.0E-5 بلاست شدند. تعیین KEGG orthology (KO) و نقشه‌یابی رونوشت‌ها به مسیرهای KEGG با روش BBH (bidirectional best hit) انجام شد (Moriya et al. 2007).

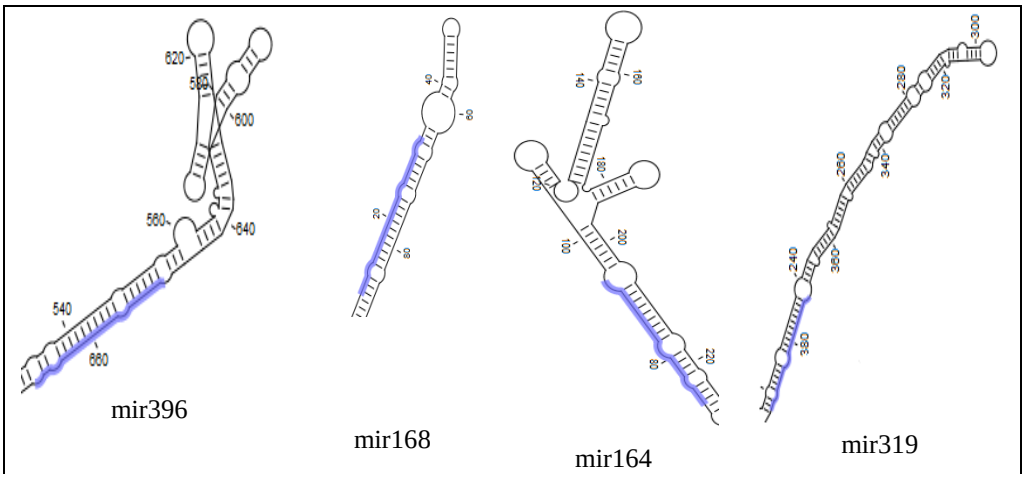
نتایج و بحث

توالی‌یابی رونوشت و سرهم‌بندی نوپدید: دو کتابخانه cDNA از RNA کل ریشه‌های گیاه ریواس ایجاد شد. کتابخانه‌ها با استفاده از پلاتفورم Illumina NovaSeq 6000 توالی‌یابی شدند. تقریبا ۸۳/۶۴ گیگابایت داده (تقریباً ۲۷۸ میلیون خوانش) از خوانش‌های جفتی ۱۵۰ جفت‌بازی ایجاد شد. بیش از ۹۴ درصد از خوانش‌ها کیفیت بیشتر از Q30 داشتند. پس از حذف آداپتورها و خوانش‌های کم‌کیفیت، ۱۶۴۸۷۸۹۶۸ و ۱۱۳۹۳۹۰۹۶ خوانش ایجاد شد. همه این خوانش‌ها با استفاده از برنامه Trinity سرهم‌بندی نوپدید شدند. در مجموع ۱۰۹۲۹۷ رونوشت ایجاد شد که طول آن‌ها از ۳۰۰ تا ۱۷۳۵۷ جفت‌باز متغییر بود. پس از حذف توالی‌های تکراری با آستانه همسانی ۹۰٪ با استفاده از نرم‌افزار CD-HIT، ۸۲۰۴۷ رونوشت باقی ماند که از این رونوشت‌ها برای شناسایی میرناها استفاده شد.

شناسایی میرناهای حفاظت شده: نتایج بلاست نشان داد که از ۸۲۰۴۷ رونوشت مورد جستجو علیه همه میرناهای گیاهی موجود در پایگاه mirBase، ۱۴۲ رونوشت منحصربه‌فرد با میرناهای گیاهی مطابقت داشتند. برای حذف رونوشت‌هایی که دارای رکورد در پایگاه پروتئین‌های غیر تکراری NCBI (None Redundant protein database, NR) بودند از بلاست X این رونوشت‌ها علیه این پایگاه داده استفاده شد. از رونوشت‌های نامزد، برای ۳۴ رونوشت در پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری NCBI رکوردی یافت نشد. مطالعه مشابهی که با هدف شناسایی میرناهای محافظت‌شده در گیاه گشنیز صورت گرفته بود، کارایی بالای داده‌های RNA-Seq و سرهم‌بندی نوپدید آن‌ها برای شناسایی میرناهای محافظت‌شده را تایید کرده است (Mir Drikvand et al. 2019). انتخاب میرناهای محافظت‌شده تنها بر اساس معیار همولوژی نتایج مطلوبی به‌همراه نخواهد داشت، بنابراین ساختار ثانویه رونوشت‌های شامل میرناهای احتمالی (۳۴ رونوشت) مورد بررسی قرار گرفتند (Hammond 2015; Xie et al. 2010). ساختار ثانویه توالی‌های نامزد از نظر تناسب ساختار ساقه– حلقه و محل قرارگیری توالی میرنای بالغ در ساختار ثانویه پیش‌بینی‌شده، در مرحله نخست کنترل شد. در مرحله بعدی توالی‌هایی حذف شدند که از نظر مقدار حداکثر فاصله و تعداد نوکلئوتید غیر منطبق در ساختار، نامطلوب شناسایی شدند. از مجموع توالی‌های مورد بررسی و بر اساس پارامترهای AU و MFEI، ۴ میرنا محافظت شده متعلق به خانواده‌های mir396، mir164، mir319 و mir168 شناسایی شدند (جدول ۱، شکل ۱). مطالعه‌ای که جهت شناسایی میرنا روی گیاه ذرت صورت گرفته بود، نشان داد که خانواده‌های mir396، mir164 و mir 168 در بافت ریشه‌های جوان بیشتر بیان شده است (Zhang et al. 2009) که با نتایج مطالعه ما در شناسایی این میرناها در ریشه مطابقت دارد. مطالعه دیگری روی شبدر نشان داد که فوق بیان mir396 باعث سرکوب ژن‌های سیکل سلولی و در نتیجه کاهش رشد ریشه می‌شود (Bazin et al. 2013). مطالعه دیگری در گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که mir396 در پاسخ به تنش خشکی نقش دارد (Liu et al. 2008)، این میرنا همچنین در نوک ریشه نسبت به بافت‌های دیگر گیاه بیشتر تجمع می‌یابد (Lelandais-Brière et al. 2009). در مطالعه‌ای که روی گیاه برنج انجام گرفت، دریک موتانت حساس به اکسین، افزایش بیان میرناهای وابسته به اکسین مانند mir164 منجر به کاهش ریشه‌های نابجا و جانبی و نقص کلاهک ریشه شد (Meng et al. 2009). مطالعه‌ای روی گندم نشان داد که mir164 با هدف‌گیری فاکتور رونویسی NAC باعث تنظیم نمو ریشه و تحمل به تنش‌های زنده می‌شود (Qing et al.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

2022). Mir168 که یک میرنای حفاظت شده در بین گونه‌های مختلف گیاهی می‌باشد، با هدف‌گیری آرگونات (AGO1) به‌طور غیر مستقیم با تأثیر بر بیان میرناهای دیگر، سازگاری به تنش شوری در گیاهان را تنظیم می‌کند.



شکل ۱- ساختار پیش‌ساز برای ۴ میرنای شناسایی شده در ترانسکریپتوم ریشه ریواس. قسمت‌های آبی‌رنگ مربوط به توالی‌های میرنای بالغ می‌باشد.

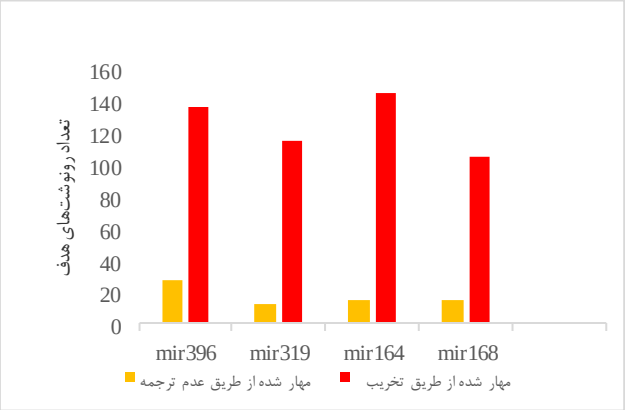
جدول ۱- ویژگی‌های میرناهای شناسایی شده در ریشه گیاه ریواس

نام میرنای شناسایی شده	Mir168	Mir164
طول رونوشت پیش‌ساز	۳۹۷	۴۴۶
محل قرار گرفتن میرنا روی رونوشت پیش‌ساز	۱۰-۳۱	۷۳-۹۳
طول توالی پیش‌ساز میرنا	۷۸	۱۵۳
توالی میرنای شناسایی شده	UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAAC	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA
طول میرنای شناسایی‌شده	۲۲	۲۱
درصد GC	۶۳/۶	۶۱/۹
درصد AU	۳۶/۴	۳۸/۰۹
MFE(kcal/mol)	۳۷/۵	۵۲/۹
AMFE	۴۸/۰۷	۳۴/۵۷
MFEI	۰/۷۵	۰/۵۶
نام میرنای شناسایی شده	Mir319	Mir396
طول رونوشت پیش‌ساز	۱۰۹۰	۹۲۷
محل قرار گرفتن میرنا روی رونوشت پیش‌ساز	۳۷۲-۳۹۲	۶۷۰-۱۸۴
طول توالی پیش‌ساز میرنا	۱۷۷	۱۳۷
توالی میرنای شناسایی شده	UGGACUGAAGGGAGCUCCCUC	GUUCAAGAAAGCUGUGGAAAA
طول میرنای شناسایی‌شده	۲۱	۲۱
درصد GC	۶۱/۹	۳۸/۰۹
درصد AU	۳۸/۰۹	۶۱/۹
MFE(kcal/mol)	۸۷/۷	۴۳/۸
AMFE	۴۹/۵	۳۱/۹۷
MFEI	۰/۸	۰/۸۴

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مطالعه‌ای روی برنج نشان داد که غیر فعال‌سازی mir168 باعث افزایش مقاومت به شوری می‌شود (Wan et al. 2022).

شناسایی ژن‌های هدف میرنا و تعیین نقش کارکردی آن‌ها: نتایج بررسی ژن‌های هدف میرناهای شناسایی شده در این مطالعه که با استفاده از ابزار psRNATarget صورت گرفت، نشان داد که در مجموع ۵۷۴ رونوشت از ترانسکریپتوم ریشه ریواس توسط این میرناها مورد هدف قرار می‌گیرند. تعداد رونوشت‌های مورد هدف برای میرناهای mir396، mir319، mir168 و mir164 به‌ترتیب ۱۶۵، ۱۲۸، ۱۲۱ و ۱۶۰ بودند. با انطباق توالی میرنای بالغ موجود در کمپلکس خاموشی با توالی mRNA ژن هدف، تخریب mRNA یا عدم ترجمه به پروتئین رخ خواهد داد. از ۵۷۴ رونوشت مورد هدف این میرناها، ۷۱ رونوشت با عدم ترجمه شدن و ۵۰۳ رونوشت با تخریب شدن توسط ۴ میرنای شناسایی شده تنظیم می‌شوند (شکل ۲).



شکل ۲- فراوانی رونوشت‌های هدف میرناهای شناسایی‌شده و نحوه کنترل بیان آن‌ها. ستون قرمز و نارنجی به‌ترتیب تعداد رونوشت‌های تنظیم‌شده توسط میرناها از طریق تخریب mRNA و مهار ترجمه را نشان‌می‌دهد.

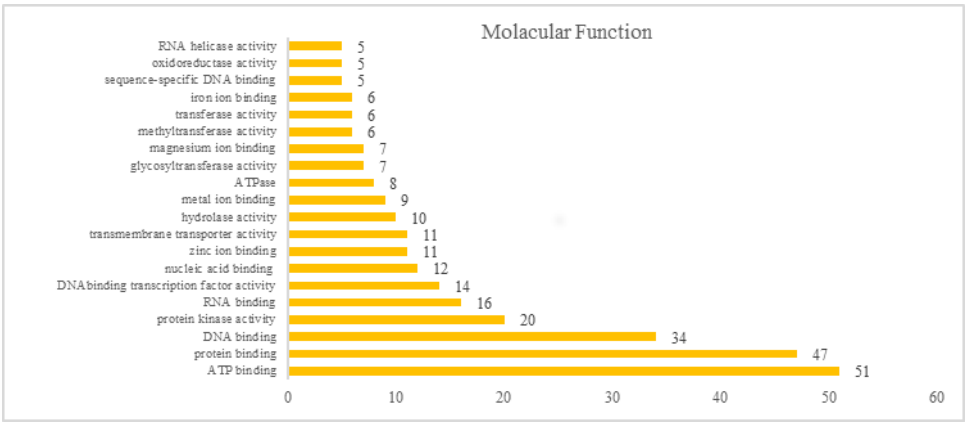
نتایج هستی‌شناسی رونوشت‌های هدف میرنا با استفاده از نرم‌افزار Blast2GO نشان داد که در زمینه عملکرد مولکولی (Molecular Function) گروه "اتصال ATP"، "اتصال پروتئین"، "اتصال DNA" و "فعالیت پروتئین کیناز" به‌ترتیب با ۵۱، ۴۷، ۳۴ و ۲۰ رونوشت بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (شکل ۳-الف). در حالی‌که در زمینه فرایند زیستی (Biological Process)، گروه‌های "تنظیم رونویسی، الگوی DNA"، "فسفوریلاسیون پروتئین"، "انتقال ترانسممبران" و "فرایند متابولیکی کربوهیدرات" به‌ترتیب با تعداد ۲۱، ۲۱، ۱۹ و ۸ رونوشت بیشترین فراوانی را به‌خود اختصاص دادند (شکل ۳-ب). و در زمینه اجزای سلولی (Cellular Component)، گروه‌های "کلروپلاست"، "غشای پلاسمایی"، "سیتوپلاسم" و "اجزای غشای داخلی" به‌ترتیب با تعداد ۴۳، ۴۲، ۲۱ و ۱۰ رونوشت بیشترین فراوانی را به‌خود اختصاص دادند (شکل ۳-ج).

KEGG یک پایگاه داده مرتبط با مسیرهای بیوشیمیایی است که اطلاعات عملکردهای ژنومیک، شیمیایی و سیستمیک را با همدیگر ادغام می‌کند. KEGG حاوی آنالیز سیستماتیک مسیرهای متابولیکی و عملکردهای محصولات ژن می‌باشد که به مطالعه رفتارهای بیولوژیکی ژن‌ها کمک شایانی کرده است (Gao et al. 2013; Kanehisa et al. 2012). آنالیز مبتنی بر مسیر به درک عملکرد ژن‌ها و شناسایی رونوشت‌های مختلف درگیر در مسیرهای بیوسنتزی گوناگون کمک خواهد کرد. در این مطالعه آنالیز مسیر KEGG روی رونوشت‌های هدف میرناهای شناسایی شده اجرا شد. در کل در بین ۵۷۴ رونوشت، ۱۱۹ رونوشت در پایگاه داده KEGG تفسیر شدند، که پنج دسته اولی شامل: فرایندهای سلولی (۲۱ رونوشت)، فرایندهای اطلاعاتی محیطی (۲۰ رونوشت)، فرایندهای اطلاعاتی ژنتیکی (۳۷ رونوشت)، سیستم‌های ارگانیسمی (۳۲ رونوشت) و متابولیسم (۴۸ رونوشت) می‌باشند (شکل ۴). ما همچنین رونوشت‌های مرتبط با متابولیت‌های ثانویه را بررسی کردیم. در مسیر مربوط به بیوسنتز ترپنوئیدها و پلی‌کتیدها، ۴ رونوشت شناسایی شد، که ۱ رونوشت مربوط به بیوسنتز زنجیره ترپنوئیدی و یک رونوشت مربوط به بیوسنتز کاروتنوئید بود. همچنین در مسیر مربوط به بیوسنتز دیگر متابولیت‌های ثانویه ۳ رونوشت شناسایی شد، که ۱ رونوشت مربوط به بیوسنتز فنیل‌پروپانوئید و ۲ رونوشت مربوط به بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گوناگون گیاهی بودند. مطالعه‌ی اثر ممانعت mir168 در تحمل به تنش شوری در گیاه برنج، نشان داد که بعضی از ژن‌های هدف این میرنا، مربوط به بیوسنتز زنجیره ترپنوئیدی بود (Wan et al. 2022).

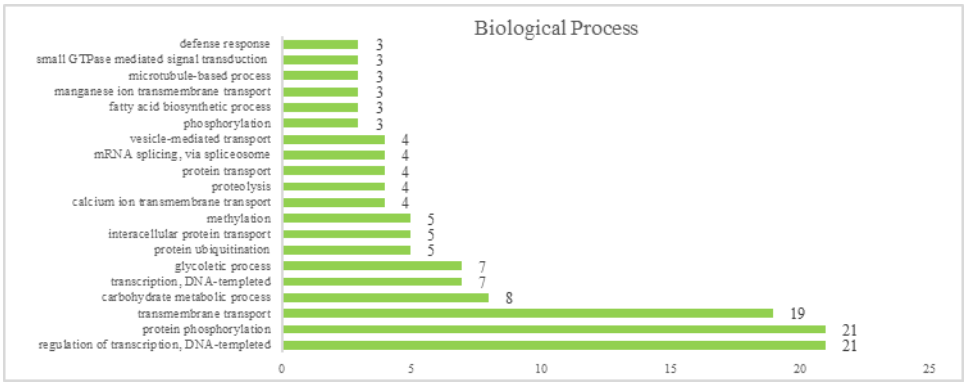
در مطالعه‌ی دیگری در گیاه *Persicaria minor* که جهت بررسی تنظیم بیوسنتز ترپنوئیدها به‌وسیله میرناها تحت تلقیح قارچ

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

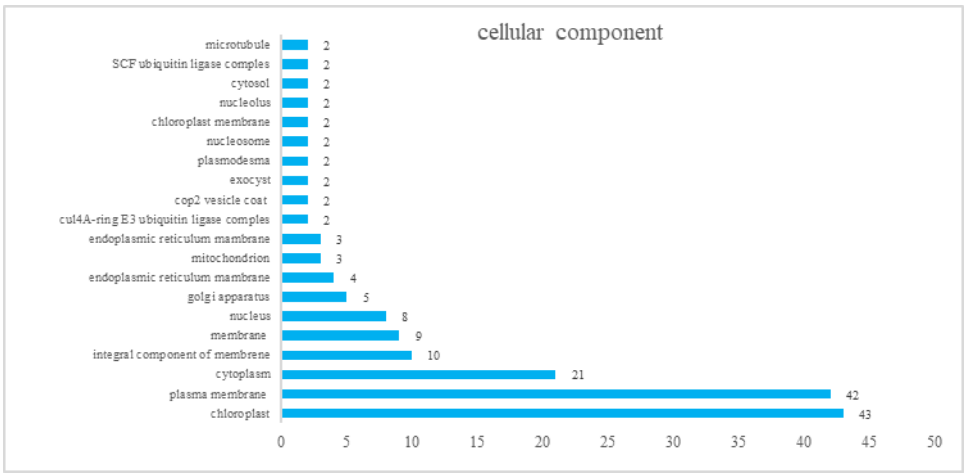
Fusarium oxysporum انجام گرفت، آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی زنجیره ترپنوئیدی به‌وسیله mir396 مورد هدف قرار گرفتند (Samad et al. 2019). عوامل رونویسی از دیگر اهداف میرنا بوده که با کنترل و تنظیم فرآیند رونویسی نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن‌ها برعهده دارند. میرناهای شناسایی شده با تأثیر بر این گروه از پروتئین‌ها، به‌طور غیرمستقیم بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند (Mandhan et al. 2012; Phookaew et al. 2014).



الف



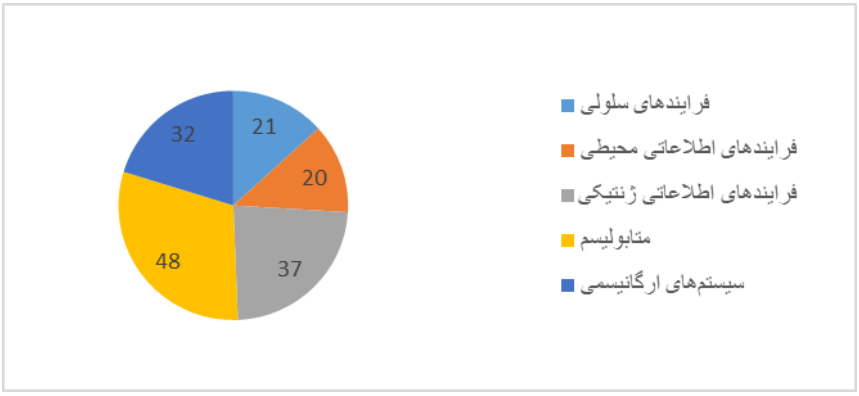
ب



ج

شکل۳- تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای میرناهای شناسایی شده در ریواس با استفاده از نرم‌افزار Blast2GO. الف: عملکرد مولکولی، ب: فرآیندهای زیستی و ج: اجزای سلولی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۴- طبقه‌بندی عملکردی KEGG با استفاده از سرور آنلاین KAAS روی ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای میرناهای شناسایی شده در ریواس

نتایج تاثیر میرناهای شناسایی شده در ریواس بر عوامل رونویسی نشان داد که ۵ خانواده از عوامل رونویسی به اسم خانواده‌های G2–like، GRAS، HD-ZIP، ERF و TCP توسط ۴ میرنای شناسایی شده تنظیم می‌شوند. ERFها خانواده‌ای از عوامل رونویسی با ۶۰ تا ۷۰ اسیدآمینه هستند که به‌طور کلی به زیر خانواده‌های AP2، ERF و RAV تقسیم می‌شوند. AP2 دارای دو دومین AP2/ERF بوده و در پاسخ به تنش کم‌آبی همراه ERF به ناحیه‌ای از DNA به نام عناصر پاسخ دهنده به اتیلن متصل شده و مجموعه‌ای از ژن‌ها را تنظیم می‌کند که در مکانیسم دفاعی گیاه نقش دارند (Mizoi et al. 2012). خانواده G-like نقش مهمی در رشد و توسعه گیاه و همچنین پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاه ایفا می‌کنند. تا کنون ۵۵ ژن از این خانواده در گیاه آرابیدوپسیس شناسایی شده است، که در شرایط و بافت‌های گوناگون بیان می‌شوند. AtGLK1 که عضوی از این خانواده است در ریشه‌های مسن و نوک ریشه بیشتر بیان می‌شود (Alam et al. 2022). خانواده GRAS نقش مهمی در رشد ریشه و شاخساره، سیگنالینگ جیبرلیک اسید و سیگنالینگ سیتوکروم A ایفا می‌کنند. (Bolle 2004; Hirsch and Oldroyd 2009; Tian et al. 2004). این خانواده دارای یک دومین حفاظت‌شده در انتهای C خود می‌باشند درحالی‌که انتهای دیگر متغیر می‌باشد (Cenci and Rouard 2017). خانواده HD-ZIP که دارای یک دومین زیپ–لوسین در انتهای کربوکسیل خود می‌باشند در بسیاری از گیاهان شناسایی شده‌اند. این خانواده در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی شرکت می‌کنند و در پاسخ به تنش‌های غیر زنده، انتقال پیام هورمونی (آبسزیک اسید، اتیلن و اکسین) و رشد و نمو گیاه دخالت دارند (Ariel et al. 2007; Sessa et al. 2018). miR319 با هدف‌گیری فاکتور رونویسی TCP نقش حیاتی در تنظیم شبکه بیان ژن و فرایندهای بیولوژیکی در طول زندگی گیاه برعهده دارد، که نه تنها روی تکثیر سلولی، شکل‌دهی گل و برگ و شاخه‌زایی تأثیر می‌گذارد، بلکه در بیوسنتز و انتقال فیتوهورمون‌ها مانند جاسمونیک اسید و اکسین و پاسخ به تنش‌های غیر زنده نیز دخالت دارد (Fang et al. 2021; Xu et al. 2017). به‌طور کلی، با توجه به نتایج می‌توان گفت اگر عوامل رونویسی را به‌عنوان کلیدهای راه‌انداز شبکه‌های ژنی درنظر بگیریم، میرناهای دخیل در کنترل آن‌ها را می‌توان به‌عنوان شاه‌کلیدهایی شناخت که با فعالیت‌شان طیف وسیعی از تغییرات در حوزه بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند. تقاضای جهانی برای داروهای گیاهی روزبه‌روز درحال افزایش است در نتیجه در سال‌های اخیر پژوهشگران با تمرکز بر گیاهان دارویی و محصولات ارزشمند آن‌ها در پی ارائه روشی مناسب برای افزایش بهره‌برداری صنعتی از این گیاهان می‌باشند (Gutiérrez-García et al. 2021; Lu et al. 2018). به‌طور کلی به‌دلیل ناشناخته ماندن جزئیات مسیر بیوسنتزی اغلب متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی تغییر و دست‌ورزی این مسیرها محققان را با چالش‌های جدی روبه‌رو ساخته‌است.میرناها یکی از مهم‌ترین اجزای تنظیمی در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در اغلب گیاهان به‌شمار می‌روند که می‌توانند با مهار بیان برخی از ژن‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه را دستخوش تغییرات معنی‌داری نمایند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

منابع

Al-Shammari AM, Jalill RDA, Hussein MF (2020) Combined therapy of oncolytic Newcastle disease virus and rhizomes extract of Rheum ribes enhances cancer virotherapy in vitro and in vivo. Molecular Biology Reports 47:1691-1702.

Alam I, Wu X, Yu Q, Ge L (2022) Comprehensive genomic analysis of G2-like transcription factor genes and their role in development and abiotic stresses in Arabidopsis. Diversity 14:228.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research 25:3389-3402.

Amiri N, Shafaghat A, Salimi F (2015) Screening of the Essential Oil, Hexane Extract, Chemical Composition, Antioxidant Activity, andAntimicrobial Acitivity of the Flower *Rheum ribes* L. from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants 18:1108-1115.

Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL (2007) The true story of the HD-Zip family. Trends in plant science, 12:419-426.

Bazin J, Khan GA, Combier JP, Bustos-Sanmamed P, Debernardi JM, Rodriguez R, Sorin C, Palatnik J, Hartmann C, Crespi M (2013) miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. The Plant Journal 74:920-934.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114-2120.

Bolle C (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. Planta 218:683-692.

Cenci A, Rouard M (2017) Evolutionary analyses of GRAS transcription factors in angiosperms. Frontiers in plant science 8:273.

Çınar Ayan İ, Çetinkaya S, Dursun HG, Süntar İ (2021) Bioactive compounds of Rheum ribes L. and its anticancerogenic effect via induction of apoptosis and miR-200 family expression in human colorectal cancer cells. Nutrition and Cancer 73:1228-1243.

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.

Cullen J (1966) Rheum L. Flora of Turkey and the east Aegean Islands 2:268-269.

Dai X, Zhao PX (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. Nucleic acids research 39:W155-W159.

Du T, Zamore PD (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA.

Fang Y, Zheng Y, Lu W, Li J, Duan Y, Zhang S, Wang Y (2021) Roles of miR319-regulated TCPs in plant development and response to abiotic stress. The Crop Journal 9:17-28.

Gao Y, Xu H, Shen Y, Wang J (2013) Transcriptomic analysis of rice (Oryza sativa) endosperm using the RNA-Seq technique. Plant molecular biology 81:363-378.

Gleave AP, Ampomah-Dwamena C, Berthold S, Dejnoprat S, Karunairetnam S, Nain B, Wang YY, Crowhurst RN, MacDiarmid RM (2008) Identification and characterisation of primary microRNAs from apple (*Malus domestica* cv. Royal Gala) expressed sequence tags. Tree Genetics and Genomes 4:343-358.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng, Q (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature biotechnology 29:644-652.

Gutiérrez-García C, Ahmed SS, Ramalingam S, Selvaraj D, Srivastava A, Paul S, Sharma A (2021) Identification of microRNAs from medicinal plant Murraya koenigii by high-throughput sequencing and their functional implications in secondary metabolite biosynthesis. Plants 11:46.

Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood, PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nature protocols 8:1494-1512.

Hammond SM (2015) An overview of microRNAs. Advanced drug delivery reviews 87:3-14.

Hamzeh S, Farokhi F, Heydari R, Manaffar R (2014) Renoprotective effect of hydroalcoholic extract of *Rheum ribes* root in diabetic female rats. Avicenna journal of phytomedicine 4:392.

Hirsch S, Oldroyd GE (2009) GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. Plant signaling and behavior 4:698-700.

Jacob C, Carrasco B, Schwember AR (2016) Advances in breeding and biotechnology of legume crops. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 127:561-584.

Jagadeeswaran G, Zheng Y, Li YF, Shukla LI, Matts J, Hoyt P, Macmil SL, Wiley GB, Roe BA, Zhang W (2009) Cloning and characterization of small RNAs from Medicago truncatula reveals four novel legume-specific microRNA families. New Phytologist 184:85-98.

Jung JH, Seo PJ, Park CM (2009) MicroRNA biogenesis and function in higher plants. Plant Biotechnology Reports 3:111-126.

Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic acids research 28:27-30.

Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M (2012) KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic acids research 40: D109-D114.

Lelandais-Brière C, Naya L, Sallet E, Calenge F, Frugier F, Hartmann C, Gouzy J, Crespi M (2009) Genome-wide small RNA analysis revealed differentially regulated miRNA isoforms in *Medicago truncatula* roots and nodules. Plant Cell 21:2780-2796.

Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics 22:1658-1659.

Li X, Hou Y, Zhang L, Zhang W, Quan C, Cui Y, Bian S (2014) Computational identification of conserved

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

microRNAs and their targets from expression sequence tags of blueberry (*Vaccinium corybosum*). Plant signaling and behavior 9:e29462.
Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. Rna 14:836-843.
Lu Y, Gao W, Huang LQ (2018) Synthesis and regulation of secondary metabolites by microRNA in medicinal plants. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica 43:1806-1811.
Mandhan V, Kaur J, Singh K (2012) smRNAome profiling to identify conserved and novel microRNAs in *Stevia rebaudiana* Bertoni. BMC plant biology 12:1-15.
Mehta A, Gupta H, Rawal R, Mankad A, Tiwari T, Patel M, Ghosh A (2016) In silico microRNA identification from *stevia rebaudiana* transcriptome assembly. European Journal of Medicinal Plants 15:1-14.
Meng Y, Huang F, Shi Q, Cao J, Chen D, Zhang J, Ni J, Wu P, Chen M (2009) Genome-wide survey of rice microRNAs and microRNA–target pairs in the root of a novel auxin-resistant mutant. Planta 230:883-898.
Mir Drikvand R, Sohrabi SS, ́Sohrabi SM, Samiei K (2019) Identification and characterization of conserved miRNAs of *Coriandrum sativum* L. using next-generation sequencing data. Crop Biotechnology 9:59-74.
Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms 1819:86-96.
Morante-Carriel J, Sellés-Marchart S, Martínez-Márquez A, Martínez-Esteso MJ, Luque I, Bru-Martínez R (2014) RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. Analytical Biochemistry 452:46-53.
Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M (2007) KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. Nucleic acids research 35:W182-W185.
Morozova O, Hirst M, Marra MA (2009) Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *A*nnual review of genomics and human genetics 10:135-151.
Naqishbandi AM, Josefsen K, Pedersen ME, Jäger AK (2009) Hypoglycemic activity of Iraqi *Rheum ribes* root extract. Pharmaceutical biology 47:380-383.
Öztürk M, Aydoğmuş-Öztürk F, Duru ME, Topçu G (2007) Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. Food chemistry 10:623-630.
Payriz A, Nejadsadeghi L, Nabati Ahmadi D (2022) Identification of miRNAs and their target genes in *Trachyspermum ammi*. Crop Biotechnology 11:1-15.
Phookaew P, Netrphan S, Sojikul P, Narangajavana J (2014) Involvement of miR164-and miR167-mediated target gene expressions in responses to water deficit in cassava. Biologia plantarum 58:469-478.
Qing C, DU Ly, Wen M, NIU Ry, WU Bw, GUO Lj, Meng M, LIU Xl, ZHAO Hx (2022) MiR164-TaNAC14 module regulates root development and abiotic-stress tolerance of wheat seedlings. Journal of Integrative Agriculture.
Quinlan AR, Hall IM (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics 26:841-842.
Raafat K, Aboul-Ela M, El-Lakany A (2021) Alloxan-induced diabetic thermal hyperalgesia, prophylaxis and phytotherapeutic effects of *Rheum ribes* L. in mouse model. Archives of pharmacal research 44:1-10.
Samad AFA, Rahnamaie-Tajadod R, Sajad M, Jani J, Murad AMA, Noor NM, Ismail I (2019) Regulation of terpenoid biosynthesis by miRNA in Persicaria minor induced by *Fusarium oxysporum*. BMC genomics 20:1-22.
Sessa G, Carabelli M, Possenti M, Morelli G, Ruberti I (2018) Multiple links between HD-Zip proteins and hormone networks. International Journal of Molecular Sciences 19:4047.
Shendure J, Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. Nature biotechnology 26:1135.
Sohrabi SS, Ismaili A, Nazarian F, Hossein F (2020) Identification and characterization of conserved miRNAs in lentil. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 32:606-616.
Tian C, Wan P, Sun S, Li J, Chen M (2004) Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. Plant molecular biology 54:519-532.
Uyar P, Coruh N, Iscan M (2014) Evaluation of in vitro antioxidative, cytotoxic and apoptotic activities of *Rheum ribes* ethyl acetate extracts. Journal of Plant Sciences 2:339-346.
Wan J, Meng S, Wang Q, Zhao J, Qiu X, Wang L, Li J, Lin Y, Mu L, Dang K (2022) Suppression of microRNA168 enhances salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). BMC plant biology 22:1-11.
Wang M, Wang Q, Wang B (2012) Identification and characterization of microRNAs in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.). PLoS One 7:e33696.
Xie F, Frazier TP, Zhang B (2010) Identification and characterization of microRNAs and their targets in the bioenergy plant switchgrass (*Panicum virgatum*). Planta 232:417-434.
Xu R, Gao H, Zhang S, Liu P, Wang X, Hao Y (2017) Genome-wide identification and phylogenetic, comparative genomic, alternative splicing, and expression analyses of TCP genes in plants. Plant Gene 12:23-32.
Zhang B, Pan X, Anderson TA (2006) Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. FEBS letters 580:3753-3762.
Zhang L, Chia JM, Kumari S, Stein JC, Liu Z, Narechania A, Maher CA, Guill K, McMullen MD, Ware D (2009) A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. PLoS genetics 5:e1000716.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]