

شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌های هدف miRNAهای پاسخ دهنده به تنش خشکی در کلزا (*Brassica napus*)

مریم پسندیده ارجمند^۱، حبیب اله سمیع زاده لاهیجی*^۱، محمد حسن بیگلویی^۲ و محمد محسن زاده گلفزانی^۱

^۱ ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

^۲ ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه مهندسی آب

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۴

چکیده

miRNAها مولکول‌های کوچک، غیرکدکننده و تنظیمی هستند که نقش مهمی در تنظیمات پس از بیان ژن در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند. با این که کلزا (*Brassica napus*) گیاه دانه روغنی بسیار مهمی در سطح جهانی است، هنوز اطلاعات کمی درباره مکانیسم‌های تنظیمی ژن‌های هدف miRNAهای پاسخ دهنده به خشکی در آن وجود دارد. لذا در این پژوهش ژن‌های هدف miRNAهای پاسخ دهنده به خشکی bna-miR860، bna-miR156b، bna-miR156c، bna-miR156g، bna-miR171a، bna-miR171d، bna-miR171e، bna-miR172d، bna-miR399a، bna-miR399b، bna-miR399c، bna-miR399d، bna-miR395e و bna-miR395f در کلزا توسط روش‌های بیوانفورماتیکی شناسایی شدند. سپس عملکرد مولکولی، فرآیند بیولوژیکی، اجزای سلولی، برهمکنش پروتئین‌ها و ارتباط مسیرهای عملکردی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش حاضر ۲۲۵ ژن هدف برای miRNAها شناسایی شد. بررسی بیوانفورماتیکی نشان داد که ژن‌های ریبوزومی، پروتئازومی و چاپرونی *RPS11*، *RPL9D*، *RPL36AA*، *RPP1C*، *RPT1A*، *RPT2a*، *RPT4A*، *RPN11*، *HSF1*، *HSFA1E*، *HSF4* و *HSFB2B* تحت تاثیر miRNAهای پاسخ دهنده به خشکی bna-miR172d، bna-miR156b/c/g، bna-miR860، bna-miR396a و bna-miR395d/e/f قرار می‌گیرند و در شرایط تنش خشکی ریبوزوم، پروتئازوم و انواع چاپرون‌ها توسط miRNAها در جهت تنظیم پروتئین‌ها و تحمل تنش تنظیم می‌شوند. بررسی آزمایشگاهی ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش می‌تواند گامی مهم و بنیادین در ایجاد ارقام مقاوم به خشکی کلزا در برنامه‌های به‌نژادی و مهندسی ژنتیک باشد.

واژه‌های کلیدی: پروتئازوم، چاپرون، ریبوزوم، IntaRNA، STRING

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۶۹۰۲۸۱، پست الکترونیکی: hsamizadeh@guilan.ac.ir

مقدمه

تنش‌های محیطی مانند خشکی، گرما، شوری و غیره سبب کاهش تولید گیاهان زراعی از جمله کلزا (*Brassica napus*) می‌شوند (۱۶). کلزا یکی از مهم‌ترین محصولات روغنی در سراسر جهان است که به خشکی حساس بوده و هر ساله تنش خشکی سبب کاهش شدید عملکرد آن می‌شود (۷۰). در شرایط تنش مجموعه‌ای از مکانیسم‌های تنظیمی ژن مانند تنظیم پس از بیان بمنظور حفظ هموستازی در گیاه اتفاق می‌افتد (۳۸ و ۶۸). خاموشی پس از بیان ژن (PTGS) (Post-transcriptional gene silencing) یکی از مکانیسم‌های تنظیمی برای سرکوب RNA پس از بیان است. این مکانیسم در مراحل رشد و نمو و در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند خشکی نقش بسیار مهمی دارد. این مکانیسم مهم توسط RNAهای مداخله‌کننده کوچک (siRNA) (Small interfering RNA) و miRNA (MicroRNA) انجام می‌شود (۲۶). miRNAها مولکول‌های کوچک، غیرکدکننده و تنظیمی با طول حدود ۱۸ تا ۲۶

تنش‌های محیطی مانند خشکی، گرما، شوری و غیره سبب کاهش تولید گیاهان زراعی از جمله کلزا (*Brassica napus*) می‌شوند (۱۶). کلزا یکی از مهم‌ترین محصولات روغنی در سراسر جهان است که به خشکی حساس بوده و هر ساله تنش خشکی سبب کاهش شدید عملکرد آن می‌شود (۷۰). در شرایط تنش مجموعه‌ای از مکانیسم‌های تنظیمی ژن مانند تنظیم پس از بیان بمنظور حفظ هموستازی در گیاه اتفاق می‌افتد (۳۸ و ۶۸). خاموشی پس از بیان ژن

موتاسیون در *RPL9C* و *RPL9D* نشان می‌دهد که تعداد نسخه و فراوانی این ژن‌ها در سلول بسیار حیاتی و مهم است (۱۴). *RPP2B* (Ribosomal protein P2B) نیز ژن‌های ریبوزومی مهمی هستند که در شرایط تنش‌های محیطی توسط miRNAها مورد هدف قرار می‌گیرند (۵۵). ارتباط تنظیمی مهمی بین ژن‌های کدکننده پروتئین ریبوزومی و فاکتور شوک حرارتی (HSF) (Heat-shock transcription factor) وجود دارد که می‌تواند در شرایط تنش نقش محافظت از پروتئین‌های ریبوزومی را داشته باشد. پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) (Heat-shock proteins) نقش بسیار کلیدی در بیوژنز ریبوزوم و پردازش rRNA دارند. از طرفی HSPها با چندین مسیر علامت‌دهی سلولی، فاکتورهای بیانی و پروتئین‌های پاسخ به استرس-های سلولی در ارتباط هستند (۴۲). بدون تردید برای حفظ حیات موجود، کارکرد ریبوزوم‌ها و پروتئین‌های سنتز شده توسط آن‌ها باید تنظیم شوند (۸). مطالعات نشان داده است که ریبوزوم‌ها خود توسط سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم تنظیم می‌شوند (۲۵، ۳۶، ۴۹ و ۶۳). در آرآبیدوپسیس *PRN11* (Regulatory particle non-triple-A ATPases) ژن هدف miRNA156 است (۳). RPN11 نوعی آنزیم (Deubiquitinating enzymes) DUBs مرتبط با پروتئازوم است که با حذف یوبیکوئیتین از پروتئین شرایط را برای دیوبیکوئیتینه شدن فراهم می‌کند (۴۸). miRNA156 با اثر بر ژن *PRN11* سبب دیوبیکوئیتینه شدن پروتئین‌ها می‌شود. نقش miRNA162 بر آنزیم‌های یوبیکوئیتینه شدن و miRNA408 و miRNA398 بر زیرواحدهای پروتئازوم در شرایط تنش محیطی ثابت شده است (۳). اخیراً نقشی از سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم در رابطه با سنتز پروتئین در ریبوزوم‌ها عنوان شده است که سوالات زیادی را درباره چگونگی کارکرد این دو سیستم بطور مستقل یا با هم ایجاد کرده است (۸). گیاهان از مسیرهای انتقال سیگنال برای درک محرک‌های محیطی و تغییرات بیان ژن برای ایجاد یک پاسخ هماهنگ استفاده

نوکلوئوتید هستند که از RNAهای بزرگتری که کدکننده پروتئین نیستند، مشتق می‌شوند (۷). miRNAها نقش مهمی در جنبه‌های مختلف رشد و نمو گیاهان اعم از مرفولوژی برگ، تشکیل ریشه‌های جانبی، علامت‌دهی هورمونی، انتقال از مرحله رویشی به زایشی، تنظیم زمان گلدهی و تولیدمثل برعهده دارند. یکی از نقش‌های مهم miRNA گیاهان تنظیمات پس از بیان ژن در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (۲۴، ۳۰، ۵۰ و ۵۲). روش‌های بیوانفورماتیکی در شناسایی miRNAهای حفاظت شده در گیاهان و جانوران و همچنین شناسایی ژن‌های هدف آن‌ها بسیار موفق بوده است (۴، ۴۶ و ۵۱). شناسایی miRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها در گیاهان از این جهت بسیار حائز اهمیت است که اکثر ژن‌های هدف miRNAها، ژن‌های بسیار مهم مانند فاکتورهای بیانی هستند (۵۳). این موضوع سبب می‌شود که miRNAها در مرکز تنظیم بیان ژن‌ها قرار گیرند (۴۶). هنوز در مورد این که تنظیم تولید پروتئین‌ها بطور کامل تحت کنترل miRNAهاست، تردید وجود دارد. اما با استفاده از تکنولوژی‌های با کارایی بالا مشخص شده است که miRNAها بر پاسخ‌های پروتئینی در شرایط تنش بسیار موثر هستند (۱۶). در آرآبیدوپسیس پروتئین‌های ریبوزومی توسط ژن‌های گوناگون کد می‌شوند. ژن‌های پروتئین‌های ریبوزومی برای نگهداشتن سطح طبیعی پروتئین ریبوزومی در سلول نقش تنظیمی دارند. یکی از این ژن‌های مهم *RPS11* (Ribosomal protein small subunit) است که پروتئینی ضروری در ساختار ریبوزوم است و با پروتئین‌های مهاجم در شرایط تنش برهمکنش ایجاد می‌کند (۱۴). در پژوهشی مشخص شد که اعمال تنش خشکی در آرآبیدوپسیس سبب افزایش چشمگیر پروتئین‌های ریبوزومی می‌شود (۶). همچنین مطالعه پروتئومیکس نشان داد که در شرایط تنش خشکی خانواده پروتئینی ریبوزوم *L6* (Ribosomal protein large subunit) (RPL) افزایش می‌یابند. تاخیر رشد مراحل ابتدایی نمو و مرگ رویان با

پایگاه داده miRBase (<http://miRbase.org/>)، miRNAهایی که تغییر بیان آن‌ها در تنش، بویژه در تنش خشکی در چندین گیاه از جمله کلزا با روش تعیین توالی miRNA (miRNA sequencing) ثابت شده بود، انتخاب شدند (جدول ۱).

بر این اساس miRNAهای bna-miR156b، bna-miR860، bna-miR171d، bna-miR171a، bna-miR156g، miR156c، bna-miR171e، bna-miR399a، bna-miR172d، bna-miR399b، bna-miR395e، bna-miR395d، bna-miR396a، miR399b و bna-miR395f بمنظور بررسی انتخاب شدند و توالی این miRNAها از پایگاه داده miRBase (<http://miRbase.org/>) بدست آمد.

می‌کنند و این موضوع نقش miRNAها در هماهنگی تنظیم بیان ژن در شرایط تنش را بطور واضح‌تری نمایان می‌کند (۳ و ۴۸). تنش خشکی در کلزا سالانه سبب کاهش چشمگیر عملکرد می‌شود. شناسایی مکانیسم‌های تنظیمی پاسخ به تنش بسیار حائز اهمیت هستند. لذا در این پژوهش انواع miRNAهای موثر در تنش خشکی در گیاهان بویژه کلزا که در سایر مطالعات شناسایی شده‌اند تعیین می‌شوند و ژن‌های هدف آن‌ها توسط روش‌های بیوانفورماتیکی شناسایی شده و ارتباط مسیرهای عملکردی آن‌ها مورد بحث قرار خواهد گرفت.

مواد و روشها

تعیین miRNAهای پاسخ دهنده به تنش خشکی: پس از جمع‌آوری اطلاعات و مرور منابع و همچنین بررسی

جدول ۱- اسامی miRNAهای انتخابی در منابع مختلف

Plants	miRNAs	Stresses	References
<i>Brassica napus</i>	miRNA860	Drought	(۲۲)
<i>Brassica rapa</i>	miRNA156b/c/g	Heat, Drought	(۲۲ و ۵)
<i>Brassica napus</i>			
<i>Brassica napus</i>	miRNA171a/d/e	Drought	(۶۹، ۲۲، ۱۷)
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
<i>Oryza sativa</i>			
<i>Brassica rapa</i>	miRNA172d	Heat, drought	(۶۹ و ۲۲، ۱۸، ۱۰، ۵)
<i>Brassica napus</i>			
<i>Brassica Juncea</i>			
<i>Oryza sativa</i>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	miRNA399a/b	ABA treatment, Drought, Salinity	(۲۲ و ۹)
<i>Brassica napus</i>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	miRNA396a	Drought	(۶۹ و ۲۸)
<i>Oryza sativa</i>			
<i>Brassica napus</i>	miRNA395d/e/f	Drought	(۶۹ و ۲۲)
<i>Oryza sativa</i>			

سپس شبکه ژنی آنالیز شد و ژن‌های با درجه ارتباط بیش‌تر یا مساوی ۵ انتخاب شدند. برای شناسایی ژن‌های مهم در شبکه از افزونه CytoHubba در نرم افزار Cytoscape و با استفاده از روش MCC (Maximal clique centrality) استفاده شد (۴۰).

کنترل صحت ژن‌های انتخاب شده: پس از انتخاب ژن‌ها بمنظور تعیین صحت وجود ژن در کلزا ابتدا توالی ژن‌ها در NCBI بلاست شد و پس از آن توالی ژن در کلزا بدست آمد و مورد هدف قرارگرفتن ژن توسط miRNA مورد نظر در psRNATarget، RNAhybrid و IntaRNA نیز تایید شد. سپس برهمکنش پروتئینی ژن‌های انتخاب شده و ارتباط مسیرهای عملکردی ژن‌ها مورد بررسی قرارگرفت.

در نهایت براساس مسیرهای عملکردی شناسایی شده از پایگاه بیوانفورماتیک DAVID، بررسی برهمکنش ژن‌ها در شبکه پروتئینی و همچنین مرور منابع در مورد ژن‌های انتخاب شده در سایر گیاهان، تعداد ۱۲ عدد از مهم‌ترین ژن‌های موثر در تنش خشکی بعنوان کلیدی‌ترین ژن‌های هدف miRNAهای پاسخ دهنده به تنش خشکی در کلزا انتخاب شدند و ارتباط مسیرهای عملکردی آن‌ها مورد بحث قرار گرفت.

نتایج

پس از انتخاب miRNAهای پاسخ دهنده به تنش خشکی و جمع‌آوری اطلاعات از تغییر بیان آن‌ها در شرایط تنش در مطالعات miRNA-seq، توالی miRNA بالغ از طریق پایگاه داده miRBase بدست آمد. پس از جستجوی امکان اتصال توالی بالغ miRNAها به ژن‌های هدف در psRNATarget، تعداد ۵۷۱ ژن هدف برای miRNAها شناسایی شد. پس از بررسی مجدد ژن‌ها در UniProt و NCBI، تعداد ۲۲۵ ژن انتخاب شدند و سایر ژن‌ها بدلیل مختلف مانند ناشناخته بودن ژن‌ها یا فاقد توالی شناسایی شده کامل حذف شدند. اتصال miRNA به توالی هدف براساس حداقل انرژی آزاد

شناسایی ژن‌های هدف miRNAها: بمنظور شناسایی

ژن‌های هدف miRNAهای تعیین شده، ابتدا از سرور psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) استفاده شد (۱۳) و برای هرکدام از miRNAها ژن‌های هدف بالقوه شناسایی شد. ژن‌های شناسایی شده دارای منشا گیاهی انتخاب و توالی آن‌ها ذخیره شد. سپس برای اطمینان از صحت اتصال miRNAها و ژن‌های هدف از دو نرم افزار RNAhybrid و IntaRNA نیز با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض استفاده شد. در هر دو نرم افزار از حداقل انرژی آزاد (mfe) (Minimum free energy) برای پیش‌بینی اتصال استفاده شده است (۳۱ و ۴۳).

تعیین اسم ژن‌ها: برای تعیین اسم ژن‌ها از دو سایت NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) و UniProt (<https://www.uniprot.org/>) استفاده شد. هر کدام از ژن‌ها با نام UniRef بدست آمده از psRNATarget جستجو شدند. در صورتی که با نام UniRef قابل جستجو نبودند، از طریق نام کامل در توضیحات موجود در uniprotKB یا براساس BLASTn توالی در NCBI مورد جستجو قرار گرفتند (۴۱ و ۵۴).

بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها (GO) و شناسایی مسیرهای

عملکردی ژن‌های هدف: بمنظور طبقه‌بندی عملکرد مولکولی، فرآیند بیولوژیکی، اجزای سلولی و پروتئین از سیستم رده بندی PANTHER (<http://www.pantherdb.org>) استفاده شد (۳۴). جهت بررسی هستی‌شناسی ژن‌های شناسایی شده از پایگاه بیوانفورماتیک DAVID (v6.8) (<https://david.ncifcrf.gov/>) و سایت KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض استفاده شد (۲۳).

بررسی برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI): برای رسم

شبکه ژنی از STRING (نسخه ۱۱) (<https://string-db.org/>) و همچنین افزونه STRING در نرم افزار Cytoscape (نسخه ۳.۸.۲) با پارامترهای پیش‌فرض استفاده شد (۳۷ و ۵۶).

سلولی نیز شامل ساختار سلولی (GO:0110165) (۴۷/۵٪) و درون سلولی (GO:0005622) (۴۱/۵٪) بود (شکل ۱).

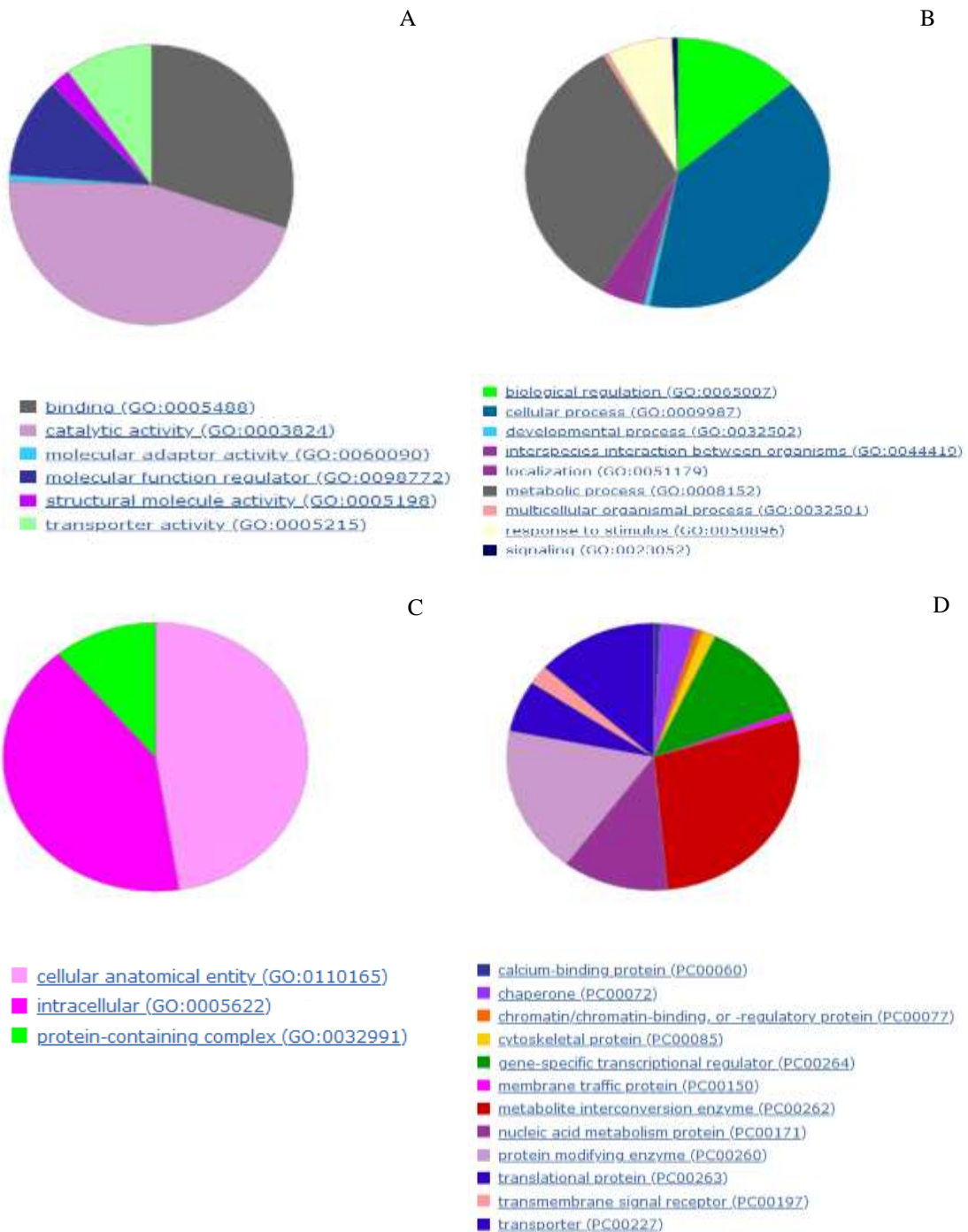
طبقه‌بندی پروتئین‌ها در PANTHER نیز نشان داد که پروتئین‌ها شامل آنزیم‌های تغییردهنده پروتئین (PC00260)، ترانسپورتر (PC00227)، پروتئین‌های غشایی (PC00150)، چاپرون (PC00072)، پروتئین‌های متابولیسم اسیدنوکلئیک (PC00171)، گیرنده علامت‌دهی غشا (Transmembrane signal receptor) (PC00197)، پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم (PC00060)، پروتئین‌های اسکلت سلولی (PC00085)، تنظیم‌کننده بیان اختصاصی ژن (PC00264)، پروتئین‌های تنظیمی (PC00263)، آنزیم‌های تبدیل متابولیتی (PC00262) و کروماتین/ اتصال کروماتین یا پروتئین‌های تنظیمی مرتبط با کروماتین‌ها (Chromatin/chromatin-binding, or -regulatory protein) (PC00077) بود. بیش‌ترین فراوانی طبقه‌بندی پروتئین‌ها مربوط به آنزیم‌های تغییردهنده متابولیت‌ها (PC00262) (۲۸/۱٪)، آنزیم‌های تغییردهنده پروتئین (PC00260) (۱۸٪)، ترانسپورتر (PC00227) (۱۳/۳٪)، پروتئین‌های متابولیسم اسیدنوکلئیک (PC00171) (۱۱/۷٪) و تنظیم‌کننده بیان اختصاصی ژن (PC00264) (۱۲/۵٪) بود (شکل ۱). بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها در DAVID نیز نشان داد که بیش‌ترین فرآیند بیولوژیکی ژن‌های مورد بررسی مربوط به بیان و تنظیم بیان بود. همچنین بیش‌تر ژن‌های مورد بررسی در مسیر متابولیکی نقش داشته و در هسته و سیتوسول حضور دارند و بیش‌تر آن‌ها از نظر عملکرد مولکولی نقش اتصال به ATP، پروتئین و فعالیت فاکتور بیانی و اتصال به جایگاه اختصاصی در DNA را دارا می‌باشند. بررسی مسیر عملکردی ژن‌ها در DAVID نشان داد که اکثر ژن‌های شناسایی شده مربوط به مسیرهای متابولیکی هستند.

آنالیز شبکه پروتئینی و تعیین درجه اتصال ۲۲۵ ژن شناسایی شده در Cytoscape نشان داد که ژن‌های *RPT2a*، *RPTIA*، *RPS11*، *RPL9D*، *RPL36AA*، *RPP1C*

در RNAhybrid و IntaRNA نیز مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت بترتیب برای *bna-miR860*، *bna-miR156b/c/g*، *bna-miR399a/b*، *bna-miR172d*، *bna-miR171a/d/e*، *bna-miR395d/e/f*، *amiR396a* تعداد ۱۷، ۵۰، ۱۶، ۳۶، ۱۳، ۵۹ و ۳۴ ژن هدف شناسایی شد. پس از آن ژن‌های شناسایی شده از نظر مسیرهای عملکردی و برهمکنش پروتئین نیز مورد بررسی قرار گرفتند. عملکرد مولکولی ژن‌ها مربوط به فعالیت آداپتور مولکولی (GO:0060090) (Molecular adaptor activity)، اتصال (GO:0005488) (Binding)، فعالیت مولکول ساختاری (GO:0005198) (Structural molecule activity)، تنظیم‌کننده عملکرد مولکولی (GO:0098772)، فعالیت کاتالیزوری (GO:0003824) و فعالیت ترانسپورتری (GO:0005215) بود. فرآیندهای بیولوژیکی ژن‌های شناسایی شده نیز شامل فرآیندهای سلولی (GO:0009987)، جانمایی (Localization) (GO:0051179)، تعامل بین گونه‌ای ارگانیسم‌ها (Interspecies interaction between organisms) (GO:0044419)، تنظیم بیولوژیکی (GO:0065007)، پاسخ دهنده به محرک‌ها (GO:0050896)، علامت‌دهی (GO:0023052)، فرآیندهای نموی (GO:0032502)، فرآیندهای ارگانیسمی پرسلولی (Multicellular organismal process) (GO:0032501) و فرآیندهای متابولیکی (GO:0008152) بود. اجزای سلولی نیز شامل ساختار سلول (Cellular anatomical entity) (GO:0110165)، کمپلکس پروتئینی (Protein-containing complex) (GO:0032991) و درون سلولی (Intracellular) (GO:0005622) بود. بیش‌ترین فراوانی در عملکرد مولکولی ژن‌ها مربوط به فعالیت کاتالیزوری (GO:0003824) (۴۵/۴٪) و اتصال (GO:0005488) (۳۰٪) بود. همچنین بیش‌ترین فراوانی در فرآیندهای بیولوژیکی مربوط به فرآیندهای سلولی (GO:0009987) (۳۹/۵٪)، فرآیندهای متابولیکی (GO:0008152) (۳۳/۵٪) و تنظیم بیولوژیکی (GO:0065007) (۱۳/۵٪) بود. بیش‌ترین فراوانی اجزای

برهمکنش زیادی در شبکه پروتئینی داشت و بعنوان ژن هدف miRNA396a در psRNATarget و IntaRNA شناسایی شد.

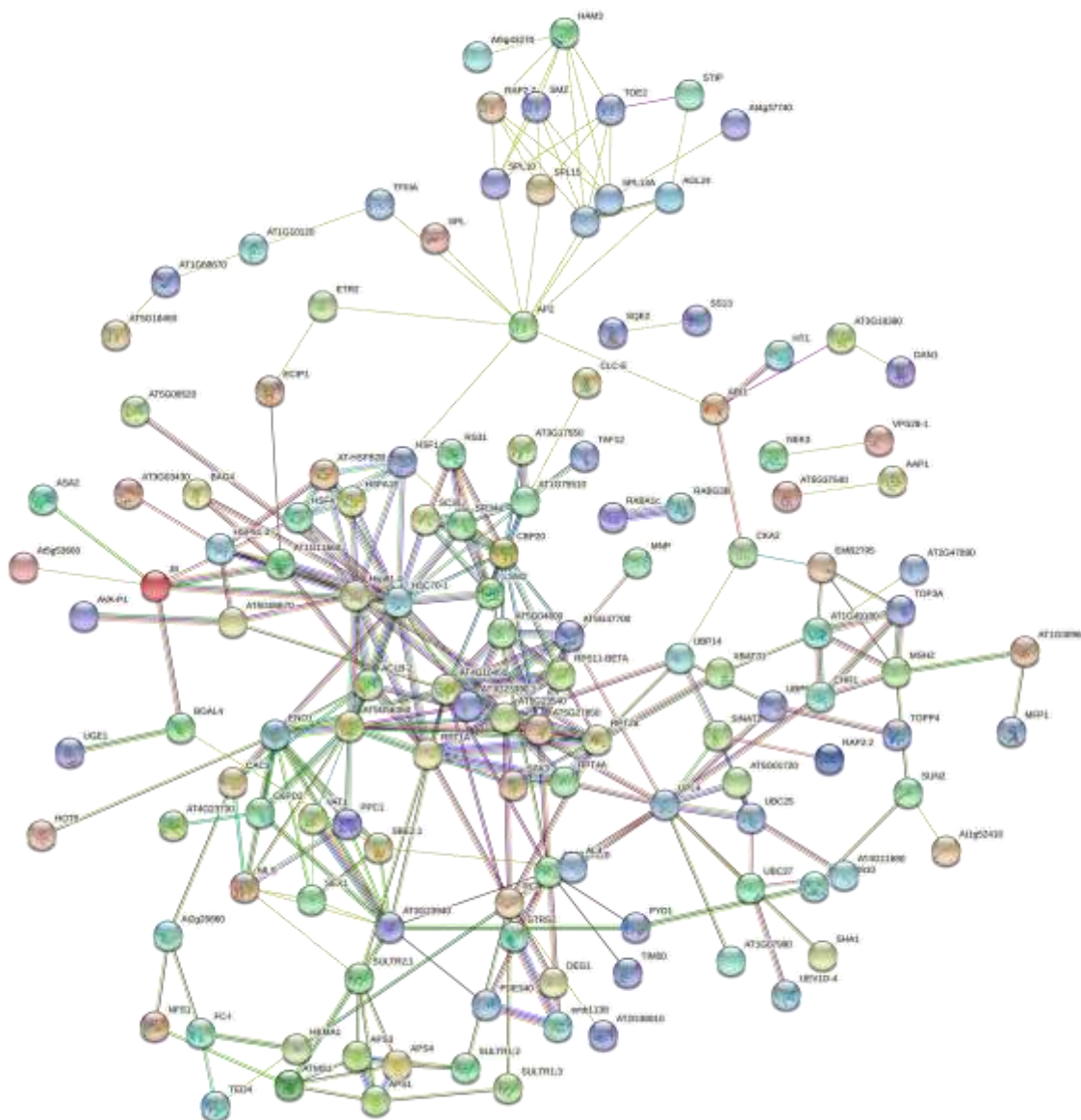
HSFB2B و *HSF4*، *HSFA1E*، *HSF1*، *RPN11*، *RPT4A* برهمکنش بسیار زیادی در شبکه پروتئینی داشته و با سایر ژن‌ها ارتباط زیادی دارند (شکل ۲ و ۴). ژن *HSP81.4* نیز



شکل ۱- نمودار دایره‌ای هستی‌شناسی ژن‌های هدف miRNA در PANTHER. A: عملکرد مولکولی، B: فرآیندهای بیولوژیکی، C: اجزای سلولی، D: طبقه بندی پروتئین

بررسی هستی‌شناسی ۱۲ ژن کاندید نشان داد که عملکرد مولکولی ۴۶/۷ درصد مربوط به اتصال (GO:0005488) و ۲۶/۷ درصد مربوط به تنظیم‌کننده عملکرد مولکولی (GO:0098772)، ۱۳/۳ درصد فعالیت مولکول ساختاری (GO:0005198) و ۱۳/۳ درصد ژن‌ها نیز مربوط به فعالیت کاتالیزوری (GO:0003824) می‌باشد.

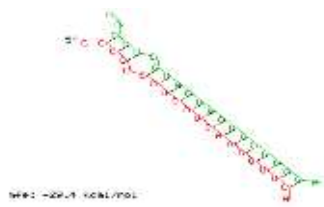
اما در RNAhybrid موردتایید قرار نگرفت. لذا جهت افزایش صحت انتخاب بعنوان مهم‌ترین ژن‌ها معرفی نگردید. پس از آنالیز شبکه پروتئینی، صحت وجود ژن‌های مذکور در کلزا و موردهدف قرارگرفتن آن توسط miRNA-های پاسخ‌دهنده به خشکی (جدول ۲ و شکل ۳) و همچنین مسیرهای عملکردی آن‌ها (شکل ۵) نیز مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲- برهمکنش شبکه پروتئین-پروتئین با استفاده از STRING برای ژن‌های شناسایی شده

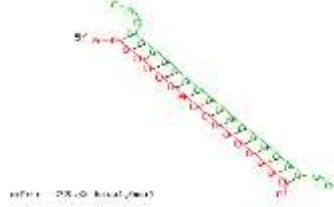
RPP1C

bna-miR156b/c/g



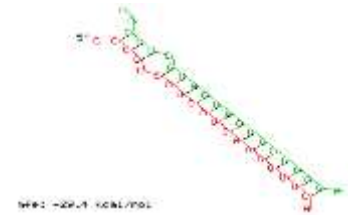
RPL36AA

bna-miR156b/c/g



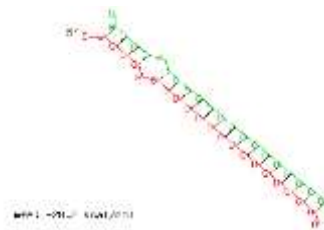
RPL9D

bna-miR172d



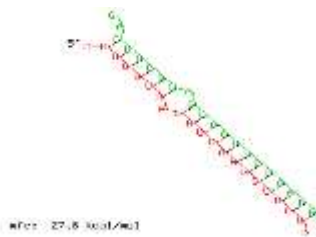
RPS11

bna-miR860



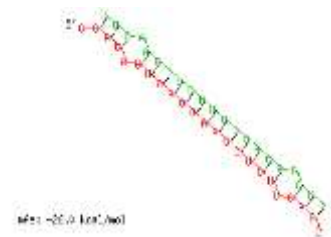
RPT1A

bna-miR172d



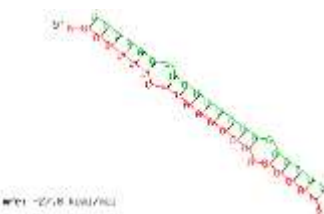
RPT2a

bna-miR396a



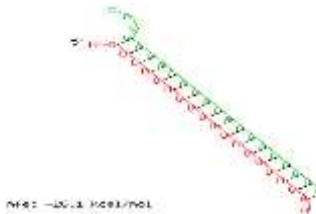
RPT4A

bna-miR396a



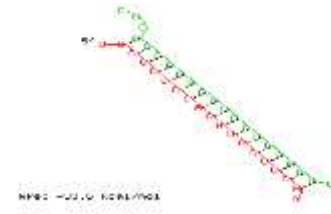
RPN11

bna-miR156b/c/g



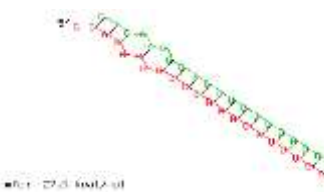
HSF1

bna-miR395d/e/f



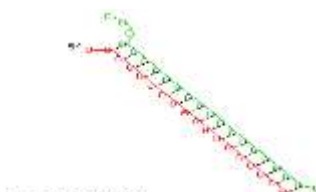
HSFA1E

bna-miR395d/e/f



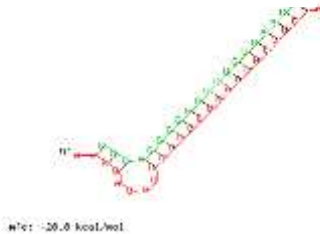
HSF4

bna-miR395d/e/f



HSFB2B

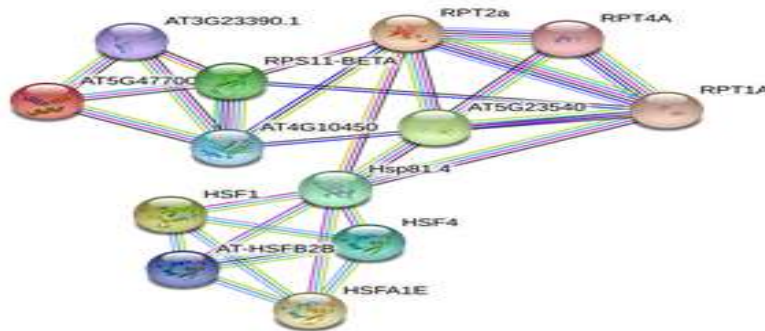
bna-miR395d/e/f



شکل ۳- اتصال miRNA به ژن هدف براساس حداقل انرژی آزاد در RNAhybrid

جدول ۲- اطلاعات کلی اتصال miRNA به توالی‌های هدف بر اساس حداقل انرژی آزاد در intaRNA

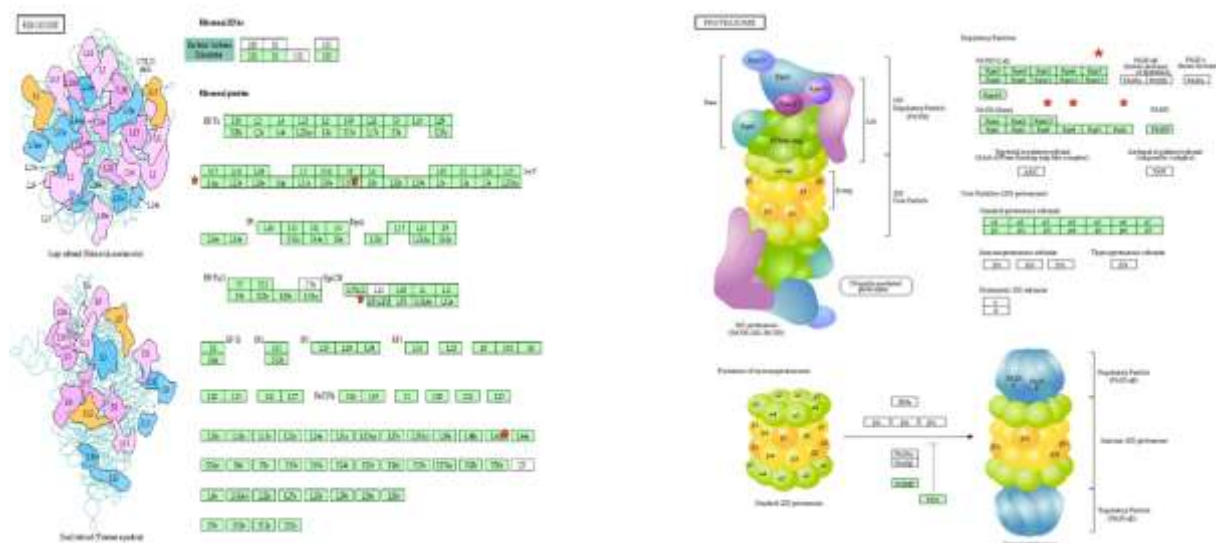
Gene	miRNA	miRNA position	Target RNA position	Energy (kcal/mol)	Hybridization Energy (kcal/mol)
1-AT5G47700 (<i>RPP1C</i>)	bna-miR156b/c/g	1-16	584-599	-18.59	-20.53
2-AT3G23390 (<i>RPL36AA</i>)	bna-miR156b/c/g	4-18	444-458	-14.78	-16.99
3-AT4G10450 (<i>RPL9D</i>)	bna-miR172d	2-15	142-155	-14.6	-18.23
4-AT5G23740 (<i>RPS11</i>)	bna-miR860	1-20	515-534	-15	-20.44
5-AT1G53750 (<i>RPT1A</i>)	bna-miR172d	1-19	988-1006	-14.01	-21.99
6-AT4G29040 (<i>RPT2a</i>)	bna-miR396a	8-18	1328-1338	-15.01	-15.7
7-AT5G43010 (<i>RPT4A</i>)	bna-miR396a	2-20	230-248	-11.57	-18.66
8-AT5G23540 (<i>RPN11</i>)	bna-miR156b/c/g	1-18	1045-1062	-17.96	-21.42
9-AT4G17750 (<i>HSF1</i>)	bna-miR395d/e/f	2-18	265-281	-25.71	-28.58
10-AT3G02990 (<i>HSFA1E</i>)	bna-miR395d/e/f	1-13	915-927	-13.44	-19.06
11-AT4G36990 (<i>HSF4</i>)	bna-miR395d/e/f	2-18	504-520	-20.64	-23.36
12-AT4G11660 (<i>HSFB2B</i>)	bna-miR395d/e/f	2-18	710-726	-20.76	-23.28



شکل ۴- برهمکنش شبکه پروتئین-پروتئین با استفاده از STRING برای ژن‌های معرفی شده

پروتئین ژن‌های کاندید نیز نشان داد که بترتیب ۴۱/۷، ۳۳/۳ و ۲۵ درصد ژن‌ها، پروتئین‌های ترجمه (PC00263)، تنظیم کننده بیان اختصاصی ژن (PC00264) و آنزیم تغییردهنده پروتئین (PC00260) (Protein modifying enzyme) بود. مسیرهای عملکردی شناسایی شده ژن‌های کاندید شامل پروتئازوم، ریبوزوم و چاپرون‌ها بود. برخی از ژن‌های کاندید در سیتوپلاسم و برخی نیز فقط در هسته فعالیت دارند.

فرآیندهای بیولوژیکی بترتیب ۳۴/۸، ۳۴/۸، ۲۶/۱ و ۴/۳ درصد ژن‌ها مربوط به فرآیندهای سلولی (GO:0009987)، فرآیندهای متابولیکی (GO:0008152)، تنظیم بیولوژیکی (GO:0065007) و پاسخ به محرک‌ها (GO:0050896) بود. همچنین بررسی اجزای سلولی ژن‌های کاندید نشان داد که بترتیب ۴۲/۳، ۳۰/۸ و ۲۶/۹ درصد ژن‌ها مربوط به فضای بین سلولی (GO:0005622)، ساختار سلول (GO:0110165) و کمپلکس‌های پروتئینی (GO:0032991) بود. طبقه‌بندی



شکل ۵- مسیر KEGG ژن‌های ریبوزوم و پروتئازوم در DAVID

۶۰S مانند *RPPIC* نقش مهمی برعهده دارند و تنش خشکی سبب افزایش *RPL36AA* و *RPPIC* می‌شود (۶). همچنین در تنش خشکی میزان بیان *bna-miR156b/c/g* در کلزا افزایش می‌یابد (۲۲). احتمالاً افزایش بیان پروتئین‌های ریبوزومی در شرایط تنش نوعی مکانیسم پاسخ دهنده در جهت افزایش سنتز پروتئین‌های موردنیاز موجود است و افزایش *bna-miR156b/c/g* می‌تواند نقش تنظیمی برای کاهش بیش از حد پروتئین‌های ریبوزومی داشته باشد. در پژوهشی مشخص شد که *RPL9D* از ژن‌های مهم در ساخت پروتئین‌های ریبوزومی است (۱۴) که مورد هدف *miRNA172d* قرار می‌گیرد. در تنش خشکی بیان *bna-miR172d* در کلزا افزایش می‌یابد (۲۲). افزایش بیان *miR172d* سبب برش و سرکوب ژن ریبوزومی *RPL9D* می‌شود. بالعکس در خشکی بیان *bna-miR860* در کلزا کاهش می‌یابد (۲۲). با کاهش بیان *bna-miR860* انتظار می‌رود که بیان ژن *RPS11* افزایش یابد و یا حداقل کمتر تحت اثر این *miRNA* قرار بگیرد. کاهش *bna-miR860* نشان می‌دهد که تغییر بیان *miRNA*‌های موثر بر ژن‌های ریبوزومی نمی‌تواند کاهش سنتز پروتئین‌ها توسط ریبوزوم‌ها را به اثبات برساند. با این حال تغییر بیان

بحث و نتیجه‌گیری

ژن‌های هدف *miRNA*‌های پاسخ دهنده به خشکی می‌توانند نقش مهمی در شبکه تنظیمی پاسخ گیاه به خشکی را ایفا کنند. شناسایی ژن‌های تنظیمی مهم در این پژوهش بعنوان ژن هدف *miRNA*‌ها، نشان دهنده این است که ژن‌های تنظیمی خود توسط تنظیم‌کننده‌های دیگری مانند *miRNA*‌ها تنظیم می‌شوند. ژن‌های ریبوزومی، پروتئازومی و چاپرونی از ژن‌های بسیار مهم تنظیمی هستند (۸، ۲۱ و ۴۸). در جانوران حدود ۶۰ درصد از ژن‌های کدکننده پروتئین توسط *miRNA*‌ها تنظیم می‌شوند. در گیاهان تعداد ژن‌هایی که توسط *miRNA*‌ها تنظیم می‌شوند، بسیار کم‌تر شناسایی شده‌اند (۵۳). بنابراین شناسایی مهم‌ترین ژن‌های تنظیمی در واکنش به تنش خشکی می‌تواند درک بهتری از مکانیسم شبکه تنظیمی در پاسخ به تنش را ایجاد کند. ۸۱ پروتئین ریبوزومی مختلف در آرابیدوپسیس شناسایی شده است که نقش بسیار مهمی در ساخت پروتئین دارند (۴۵). نتایج پژوهش حاضر نشان داده است که ژن *RPPIC* توسط *bna-miR156b/c/g* سرکوب می‌شود. در شرایط تنش خشکی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ریبوزومی خانواده

(۶۲). با تغییر پروتئین در شرایط تنش خشکی، پروتئین هدف توسط آنزیم‌های E1 (ubiquitin-activating enzyme;)، E2 (UBA ubiquitin-conjugating enzyme; UBC) و E3 (ubiquitin ligase; UBL) توسط یک یا چند مولکول یوبیکوئیتین یوبیکوئیتین می‌شود (۴۸). بر خلاف اتصال برگشت پذیر زنجیره یوبیکوئیتین، مرحله دوم اتصال محکم‌تری به پروتئازوم را توسط RPT1-6 ایجاد می‌کند و شرایط را برای تخریب پروتئین فراهم می‌کند (۳۹). پلیمر یوبیکوئیتین بصورت کووالانسی به پروتئین هدف متصل می‌شود. اتصال یوبیکوئیتین به پروتئین نوعی نشانه‌گذاری برای تجزیه پروتئین در پروتئازوم است (۶۲). اتصال سوبسترا باعث ایجاد تغییرات ساختاری در 19S RP (بخش تنظیمی) می‌شود که باعث فعال شدن پروتئازوم و باز شدن مسیر برای ورود پلی پپتید به 20S CP (بخش مرکزی) می‌شود (۳۲). ابتدا پروتئین باز شده و سپس توسط فعالیت پروتئازومی 20S CP به پپتیدهای کوتاه ۳ تا ۲۰ آمینو اسیدی شکسته می‌شود (۴۸). *RPT2a* و *RPT1A* نقش تنظیمی در عملکرد پروتئازوم ایفا می‌کنند و نتایج این پژوهش نشان داد که این بخش‌های تنظیمی نیز خود توسط miRNAها مورد هدف قرار می‌گیرند. *miRNA172d* با mRNA ژن *RPT1A* پروتئازومی مکمل شده و آن را برش می‌زند. در شرایط تنش خشکی *miR172d* در کلزا بطور چشمگیری افزایش بیان پیدا می‌کند (۲۲). افزایش این miRNAها سبب اتصال بیشتر به توالی هدف می‌شود و در نتیجه تعداد بیش‌تری از نسخه‌های بیان شده ژن را سرکوب می‌کند. بنابراین انتظار می‌رود که کاهش mRNA ژن *RPT1A* در خشکی اهمیت زیادی داشته باشد. کاهش بیان ژن‌های تنظیمی پروتئازوم سبب افزایش فعالیت PTGS می‌شود (۲۶). برش ژن *RPT2a* و *RPT4A* توسط *miRNA396a* می‌تواند سبب سرکوب این ژن تنظیمی در پروتئازوم و کاهش شناسایی پروتئین‌های هدف توسط پروتئازوم شود. در نتیجه ATP مصرفی برای شناسایی و اتصال پروتئین آسیب دیده به پروتئازوم کاهش می‌یابد و پروتئین‌های

miRNAهای سرکوب کننده ژن‌های ریپوزومی نشان از اهمیت زیرواحدهای ریپوزومی در تنظیم پاسخ به تنش خشکی دارد و این موضوع اهمیت مطالعه بیش‌تر در زمینه تغییر بیان زیرواحدهای ریپوزومی در تنش خشکی را مطرح می‌کند. در پژوهشی آنالیز فیلوژنتیکی ژن‌های ریپوزومی *RPL9* در براسیکاسه و سایر گیاهان دولپه و تک لپه نشان داد که تعداد نسخه‌های تکثیر ژن *RPL9* در گونه‌های مختلف متفاوت است و وجود چندین کپی از ژن‌های ریپوزومی خانواده ژنی *RPL4*، *RPL5*، *RPL27a*، *RPL36a* و *RPS6* در براسیکاسه بسیار حفاظت شده بوده و حاصل دوبرابر شدن ژنوم و یا حذف ژن در طی تکامل گونه است. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که عملکرد خانواده ژنی *RPL9* بسیار وابسته به تعداد نسخه‌های ژنی در سلول است (۱۴). بنابراین *miRNA172d* بعنوان یکی از عوامل تنظیمی، می‌تواند در تنظیم عملکرد *RPL9* موثر باشد. با توجه به مورد هدف قرارگرفتن پروتئین‌های ریپوزومی و همچنین تغییر بیان ژن‌های سازنده پروتئین‌های ریپوزومی در تنش خشکی، به احتمال زیاد ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ریپوزومی نقش بسیار مهمی را در مکانیسم دفاعی پاسخ به تنش برعهده دارند.

تحقیقات اخیر نشان داده است که پروتئین‌ها پس از ساخته شدن در ریپوزوم می‌توانند برای تنظیم به سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم یا سیستم اتوفازی وارد شوند (۸). انتقال پروتئین از ریپوزوم به مسیر پروتئازوم یا اتوفازی اهمیت نقش miRNAها را در تنظیم و هماهنگی این مسیرها بیش از پیش نمایان می‌کند. سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم یک کمپلکس پروتئینی وابسته به ATP برای تغییر و یا تخریب پروتئین است (۱۲). در شرایط تنش خشکی، پروتئین‌ها تغییر شکل داده و در سلول تجمع می‌یابند. در یوکاریوت‌ها تجزیه اکثر پروتئین‌ها توسط پروتئازوم انجام می‌شود (۱۱). تغییر در ساختار، جایابی و پایداری پروتئین می‌تواند بر عملکرد آن موثر باشد و عملکرد صحیح پروتئین‌ها وابسته به تجزیه آن‌ها است

می‌یابند (۲۲). افزایش بیان این miRNAها در خشکی می‌تواند نشان‌دهنده کاهش فعالیت پروتئازوم و در نتیجه افزایش فعالیت PTGS باشد. بنظر می‌رسد تنظیم پروتئازوم نقش بسیار مهمی در مقاومت به تنش خشکی برعهده دارد. برای محدود کردن اثرات مخرب گسترش و تجمع پروتئین‌ها در تنش خشکی، سلول‌ها چندین مسیر تاشدگی و تجزیه‌شدن را برای بازگشت بحالت طبیعی بکار می‌گیرند (۳۵). مسیر دیگر برای بهبود و محدود کردن تجمع پروتئین‌های آسیب‌دیده، استفاده از چاپرون‌ها است. چاپرون‌ها مولکول‌هایی هستند که بازشدن برگشت ناپذیر پروتئین را محدود می‌کنند و با ممانعت از تجمع پروتئین‌ها سبب تاشدن صحیح پروتئین‌ها می‌شوند و در صورت عدم ترمیم پروتئین‌های آسیب‌دیده آن‌ها را از بین می‌برند (۱۹). همچنین ترکیباتی که مانند چاپرون عمل می‌کنند، می‌توانند سبب حفظ پایداری آنزیم‌های تثبیت‌کننده CO₂، کاهش تجمع ROS، حفظ ساختار پروتئین‌ها، افزایش فعالیت آنزیم‌ها و در نهایت کاهش اثر تنش شوند (۱ و ۲). HSPها همچنین برای پاکسازی پروتئین‌های تجمع یافته به پروتئازوم‌ها وابسته هستند. فاکتور شاتل Ubiquilin 2 اتصالات HSP70 را شناسایی کرده و آن‌ها را برای تجزیه به مجموعه پروتئازوم می‌رساند (۱۹). هم افزایش HSPها و پروتئازوم در برهمکنش با تنش‌های محیطی سبب کاهش تجمع پروتئین‌های آسیب‌دیده در سلول می‌شود (۳۳). در آراییدوپسیس ژن‌های *HSF1* و *HSFA1E* بطور مداوم بیان می‌شوند و مسئول تحریک و راه‌اندازی پاسخ به تنش حرارتی هستند. این فاکتورهای بیانی به فاکتورهای تنش حرارتی متصل می‌شوند (۶۵). *bna-miR395d/e/f* در شرایط تنش خشکی کاهش می‌یابد (۲۲). بنابراین انتظار می‌رود که بیان ژن‌های *HSF1*، *HSFA1E*، *HSF4* و *HSFB2B* در این شرایط افزایش یابد. در آراییدوپسیس *HSF4* و *HSFB2B* سبب سرکوب تحریک HSPها در زمان ریکاوری پس از تنش می‌شوند (۲۰). آنالیز بیان ژن نشان داده است که ایزوفرم‌های HSF70 در شرایط خشکی، گرما، شوری و

آسیب دیده توسط مکانیسم خاموشی بیان ژن در مرحله بیان و پس از بیان تنظیم می‌شوند (۲۶). *RPT2a* در مسیر علامت‌دهی نقش مهمی در افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی دارد. نقش *RPT2a* در تحمل به تنش گرما، کمبود روی و بیماری به اثبات رسیده است (۲۷، ۴۴ و ۶۴). miRNAها می‌توانند با اثر بر پروتئین‌های پروتئازومی بر تجزیه پروتئین نیز اثر بگذارند. در شرایط تنش زیر واحد *RPT2a* شروع کننده خاموشی پس از بیان است و ایجاد موتاسیون در این ژن سبب سرکوب PTGS می‌شود و در نتیجه این عمل سبب تجمع پروتئین در سلول می‌شود. *RPT2a* عملکرد خاصی را به پروتئازوم در PTGS می‌دهد (۲۶) و با اثر بر افزایش تجمع siRNAها سبب افزایش PTGS می‌شود. در واقع *RPT2a* با سرکوب ماشین کنترل کیفی سبب افزایش PTGS در شرایط تنش می‌شود (۲۶). بنابراین می‌توان مورد هدف قرار گرفتن ژن *RPT2a* توسط miRNA را عاملی برای افزایش siRNAها و مرکز اصلی شروع فرآیند PTGS دانست. ممکن است سرکوب شدن بیان *RPT1A* نیز مرتبط با افزایش PTGS در تنش باشد. در واقع افزایش بیان miRNA172d در تنش خشکی، سبب سرکوب بیش‌تر *RPT1A* که مسئول شناسایی ژن‌های هدف برای تخریب است، می‌شود و فعالیت پروتئازوم بنفع PTGS کاهش می‌یابد. دیوبیکوئیتینه شدن پروتئین نیز توسط آنزیم DUBs انجام می‌شود (۴۸). miRNA156 سبب سرکوب ژن *RPN11* که ژن دیوبیکوئیتینه است، می‌شود. در پژوهشی موتاسیون اجزای RP در پروتئازوم سبب کاهش تحمل به تنش در آراییدوپسیس شد. آراییدوپسیسی که دارای ژن موتانت *RPN10* بود، تحمل کم‌تری نسبت به شوری، گرما و پرتو UV داشت (۴۷). همچنین موتانت *RPN1a* به تنش شوری و گرما حساس بود (۶۱). در پژوهش دیگر موتاسیون در *RPN12a* و *RPT2a* سبب کاهش تحمل تنش گرما (۲۷) و موتاسیون در *RPT5a* سبب کاهش تحمل کمبود روی شد (۴۴). miRNAهای سرکوب کننده ژن‌های پروتئازوم در کلزا بطور هماهنگ افزایش بیان

ریبوزومی، پروتئازومی و چاپرونی *RPL36AA*، *RPP1C*، *RPN11*، *RPT4A*، *RPT2a*، *RPT1A*، *RPS11*، *RPL9D*، *HSF1*، *HSFA1E*، *HSF4* و *HSFB2B* تحت تاثیر *miRNA* های پاسخ دهنده به خشکی *bna-miR156b/c/g*، *amiR172d*، *bna-miR860*، *bna-miR396a* و *bna-miR395d/e/f* قرار می‌گیرند و احتمالاً در شرایط تنش زیرواحدهای سازنده ریبوزوم، پروتئازوم و انواع چاپرون‌ها جهت کاهش یا افزایش تجزیه پروتئین‌ها بنفع سیستم تنظیمی PTGS و برای حفظ حیات موجود تغییر می‌یابند. در سایر مطالعات نقش *miRNA* های مورد بررسی در این پژوهش در شرایط خشکی با روش‌های پیشرفته آزمایشگاهی در کلزا و سایر گیاهان به اثبات رسیده است (جدول ۱). این پژوهش بمنظور شناسایی ژن‌های هدف این *miRNA* ها و بررسی ارتباط مسیرهای عملکردی آن‌ها نسبت به یکدیگر انجام شده است. بر اساس نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود که با اعمال تنش خشکی در ارقام مختلف گیاه کلزا، بیان *miRNA* های پیشنهاد شده و ژن‌های هدف شناسایی شده در این پژوهش با روش‌های آزمایشگاهی بررسی شود تا بتواند گامی مهم و بنیادین برای شناسایی ژن‌های مهم جهت ایجاد ارقام مقاوم به خشکی کلزا در برنامه‌های بهنژادی و مهندسی ژنتیک باشد.

ABA موثر هستند (۵۷). مطالعات بیش‌بانی و سرکوب بیان ژن‌های *HSF70* در گیاهان توتون، سویا و مرکبات نقش محافظتی آن‌ها را در طول تنش خشکی نشان می‌دهد (۶۶). از طرفی *bna-miR395d/e/f* کلزا در خشکی افزایش یافته و انتظار می‌رود که بیان *HSP81-4* کاهش یابد. در برنج بیان ژن‌های *OsHSP90-2* و *OsHSP90-4* که مشابه *HSP81-4* است، در خشکی، سرما، گرما و شوری افزایش یافت (۶۷). *HSFA1E*، *HSFA7b* و *HSFB2B* بوسیله افزایش بیان *HSFA3* تحریک می‌شوند، بیان بیش از حد *HSFA3* در شرایط معمول باعث افزایش بیان *HSFA1E* می‌شود. اما بیان *HSFA2* را که توسط *HSFA1E* پس از گرما یا تنش نور زیاد ایجاد می‌شود را افزایش نمی‌دهد. این اتصالات پیچیده و حلقه‌های بازخورد نشان می‌دهد که چندین سیگنال ورودی می‌توانند پاسخ‌های همپوشان اما متفاوت / *HSF* را *HSP* فعال کنند (۲۱). احتمالاً پس از سنتز پروتئین‌ها در ریبوزوم بخش مهمی از پاسخ گیاهان در برابر تنش خشکی مربوط به تغییر یا تجزیه پروتئین‌ها در ارتباط با چاپرون‌ها و پروتئازوم است. تنظیم هماهنگی بین این واحدها نیز خود در گروه عوامل تنظیمی دیگر مانند *miRNA* های پاسخ دهنده به خشکی است. بطور کلی نتایج بررسی بیوانفورماتیکی در این پژوهش نشان داد که ژن‌های

منابع

۲- علیخانی، ع.، عباسپور، ح.، صفی پور افشار، ا.، متولی زاده کاخکی، ع. ۱۳۹۸. تاثیر هورمون متیل جاسمونات بر تجمع کادمیوم، ظرفیت آنتی اکسیدانی و برخی صفات فیزیولوژیک دانه رست گندم (*Triticum aestivum* L). مجله زیست‌شناسی ایران. ۳۲(۴): ۷۶۴-۷۷۴.

۱- سلیمانی اقدم، م.، نادری، ر.، عسکری سرچشمه، م.، بابالار، م. ۱۳۹۸. تاثیر تیمار قبل و پس از برداشت گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) بر کنترل سرمازدگی گل شاخه بریده آنتوریوم (*Anthurium andraeanum* L). مجله زیست‌شناسی ایران. ۳۲(۱): ۸۶-۹۶.

3- Abreu, P. M., Gaspar, C. G., Buss, D. S., Ventura, J. A., Ferreira, P. C. and Fernandes, P. M. 2014. Carica papaya microRNAs are responsive to Papaya meleira virus infection. *PloS One*, 9(7): e103401.

4- Achakzai, H. K., Barozai, M. Y. K., Din, M., Baloch, I. A. and Achakzai, A. K. K. 2018. Identification and annotation of newly conserved microRNAs and their targets in wheat (*Triticum aestivum* L.). *PloS One*, 13(7): e0200033.

- 5- Ahmed, W., Xia, Y., Li, R., Bai, G., Siddique, K. H. and Guo, P. 2020. Non-coding RNAs: Functional roles in the regulation of stress response in Brassica crops. *Genomics*, 112(2): 1419-1424.
- 6- Alqurashi, M., Chiapello, M., Bianchet, C., Paolucci, F., Lilley, K. S. and Gehring, C. 2018. Early responses to severe drought stress in the *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture proteome. *Proteomes*, 6(4): 38.
- 7- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S. A. M., Marshall, M. and Matzke, M. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9(3): 277-279.
- 8- An, H. and Harper, J.W. 2020. Ribosome abundance control via the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Molecular Biology*, 432(1): 170-184.
- 9- Baek, D., Chun, H. J., Kang, S., Shin, G., Park, S. J., Hong, H., Kim, C., Kim, D. H., Lee, S. Y., Kim, M. C. and Yun, D. J. 2016. A role for *Arabidopsis* miR399f in salt, drought, and ABA signaling. *Molecules and Cells*, 39(2): 111.
- 10- Bhardwaj, A. R., Joshi, G., Pandey, R., Kukreja, B., Goel, S., Jagannath, A., Kumar, A., Katiyar-Agarwal, S. and Agarwal, M. 2014. A genome-wide perspective of miRNAome in response to high temperature, salinity and drought stresses in *Brassica juncea* (Czern) L. *PLoS One*, 9(3): e92456.
- 11- Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y. and Hochstrasser, M. 2017. Proteasome structure and assembly. *Molecular Biology*, 429(22): 3500-3524.
- 12- Collins, G. A. and Goldberg, A. L. 2017. The logic of the 26S proteasome. *Cell*, 169(5): 792-806.
- 13- Dai, X., Zhuang, Z. and Zhao, P. X. 2018. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research*, 46(W1): W49-W54.
- 14- Devis, D., Firth, S. M., Liang, Z. and Byrne, M. E. 2015. Dosage sensitivity of RPL9 and concerted evolution of ribosomal protein genes in plants. *Frontiers in plant science*, 6:1102.
- 15- Finley, D. 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 477-513.
- 16- Gharechahi, J., Sharifi, G., Mirzaei, M., Zeinalabedini, M. and Salekdeh, G. H. 2019. Abiotic stress responsive microRNome and proteome: How correlated are they?. *Environmental and Experimental Botany*, 165: 150-160.
- 17- Hajdarpašić, A. and Ruggenthaler, P. 2012. Analysis of miRNA expression under stress in *Arabidopsis thaliana*. *Basic Medical Sciences*, 12(3): 169.
- 18- Han, Y., Zhang, X., Wang, Y. and Ming, F. 2013. The suppression of WRKY44 by GIGANTEA-miR172 pathway is involved in drought response of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 8(11): e73541.
- 19- Hjerpe, R., Bett, J. S., Keuss, M. J., Solovyova, A., McWilliams, T. G., Johnson, C., Sahu, I., Varghese, J., Wood, N., Wightman, M. and Osborne, G. 2016. UBQLN2 mediates autophagy-independent protein aggregate clearance by the proteasome. *Cell*, 166(4): 935-949.
- 20- Ikeda, M., Mitsuda, N. and Ohme-Takagi, M. 2011. *Arabidopsis* HsfB1 and HsfB2b act as repressors of the expression of heat-inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance. *Plant Physiology*, 157(3): 1243-1254.
- 21- Jacob, P., Hirt, H. and Bendahmane, A. 2017. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology*, 15(4): 405-414.
- 22- Jian, H., Wang, J., Wang, T., Wei, L., Li, J. and Liu, L. 2016. Identification of rapeseed microRNAs involved in early stage seed germination under salt and drought stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7: 658.
- 23- Jiao, X., Sherman, B. T., Huang, D. W., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C. and Lempicki, R. A. 2012. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics*, 28(13): 1805-1806.
- 24- Jones-Rhoades, M. W. and Bartel, D. P. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14(6): 787-799.
- 25- Juszkievicz, S. and Hegde, R. S. 2018. Quality control of orphaned proteins. *Molecular cell*, 71(3): 443-457.
- 26- Kim, M. H., Jeon, J., Lee, S., Lee, J. H., Gao, L., Lee, B. H., Park, J. M., Kim, Y. J. and Kwak, J. M. 2019. Proteasome subunit RPT2a promotes PTGS through repressing RNA quality control in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 5(12): 1273-1282.

- 27- Kurepa, J., Toh-e, A. and Smalle, J. A. 2008. 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *The Plant*, 53(1): 102-114.
- 28- Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A. and Zheng, C. C. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14(5): 836-843.
- 29- Lv, Q., Zhang, L., Zan, T., Li, L. and Li, X. 2020. Wheat RING E3 ubiquitin ligase TaDIS1 degrade TaSTP via the 26S proteasome pathway. *Plant Science*, 296: 110494.
- 30- Mallory, A. C. and Vaucheret, H. 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics*, 38(6): S31-S36.
- 31- Mann, M., Wright, P. R. and Backofen, R. 2017. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 45(W1): W435-W439.
- 32- Matyskiela, M.E., Lander, G. C. and Martin, A. 2013. Conformational switching of the 26S proteasome enables substrate degradation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(7): 781.
- 33- McLoughlin, F., Kim, M., Marshall, R. S., Vierstra, R. D. and Vierling, E. 2019. HSP101 interacts with the proteasome and promotes the clearance of ubiquitylated protein aggregates. *Plant Physiology*, 180(4): 1829-1847.
- 34- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T. and Thomas, P. D. 2013. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols*, 8(8): 1551-1566.
- 35- Mogk, A., Bukau, B. and Kampinga, H. H. 2018. Cellular handling of protein aggregates by disaggregation machines. *Molecular Cell*, 69(2): 214-226.
- 36- Nguyen, A. T., Prado, M. A., Schmidt, P. J., Sendamarai, A. K., Wilson-Grady, J. T., Min, M., Campagna, D. R., Tian, G., Shi, Y., Dederer, V. and Kawan, M. 2017. UBE2O remodels the proteome during terminal erythroid differentiation. *Science*, 4(357): 6350.
- 37- Otasek, D., Morris, J. H., Bouças, J., Pico, A. R. and Demchak, B. 2019. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis. *Genome Biology*, 20(1): 1-15.
- 38- Pei, Y., Bai, J., Guo, X., Zhao, M., Ma, Q. and Song, X. 2019. Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant maize leaves under osmotic stress. *Plant Science*, 99(4): 467-479.
- 39- Peth, A., Uchiki, T. and Goldberg, A. L. 2010. ATP-dependent steps in the binding of ubiquitin conjugates to the 26S proteasome that commit to degradation. *Molecular Cell*, 40(4): 671-681.
- 40- Pezeshkian, Z., Mirhoseini, S. Z. and Ghovvati, S. 2020. Identification of hub genes involved in apparent metabolizable energy of chickens. *Animal Biotechnology*, 1-8.
- 41- Pruitt, K. D. and Maglott, D. R. 2001. RefSeq and LocusLink: NCBI gene-centered resources. *Nucleic Acids Research*, 29(1): 137-140.
- 42- Ramsøe, A., Clark, M. S. and Sleight, V. A. 2020. Gene network analyses support subfunctionalization hypothesis for duplicated hsp70 genes in the Antarctic clam. *Cell Stress and Chaperones*, 25: 1111-1116.
- 43- Rehmsmeier, M., Steffen, P., Höchsmann, M. and Giegerich, R. 2004. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10(10): 1507-1517.
- 44- Sakamoto, T., Kamiya, T., Sako, K., Yamaguchi, J., Yamagami, M. and Fujiwara, T. 2011. *Arabidopsis thaliana* 26S proteasome subunits RPT2a and RPT5a are crucial for zinc deficiency-tolerance. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(3): 561-567.
- 45- Salih, K. J., Duncan, O., Li, L., Troesch, J. and Millar, A. H. 2019. Refining the composition of the *Arabidopsis thaliana* 80S cytosolic ribosome. *BioRxiv*, 764316:1-18.
- 46- Shamloo-Dashtpajardi, R., Razi, H. and Ebrahimie, E. 2015. Mining expressed sequence tags of rapeseed (*Brassica napus* L.) to predict the drought responsive regulatory network. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(3): 329-340.
- 47- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T. J., Babiychuk, E., Kushnir, S. and Vierstra, R. D. 2003. The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(4): 965-980.
- 48- Stone, S. L. 2019. Role of the ubiquitin proteasome system in plant response to abiotic stress. *Cell and Molecular Biology*, 343: 65-110.
- 49- Sung, M. K., Porras-Yakushi, T. R., Reitsma, J. M., Huber, F. M., Sweredoski, M. J., Hoelz, A., Hess, S. and Deshaies, R. J. 2016. A conserved quality-control pathway that mediates

- degradation of unassembled ribosomal proteins. *Elife*, 5: e19105.
- 50- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J. K. 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science*, 12(7): 301-309.
- 51- Sunkar, R. and Jagadeeswaran, G. 2008. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biology*, 8(1): 1-13.
- 52- Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J. K. 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(8): 2051-2065.
- 53- Sunkar, R., Li, Y. F. and Jagadeeswaran, G. 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 17(4): 196-203.
- 54- Suzek, B. E., Huang, H., McGarvey, P., Mazumder, R. and Wu, C. H. 2007. UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics*, 23(10): 1282-1288.
- 55- Swapna, M. and Kumar, S. 2017. MicroRNAs and their regulatory role in sugarcane. *Frontiers in Plant Science*, 8: 997.
- 56- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P. and Jensen, L. J. 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1): D607-D613.
- 57- Tang, T., Yu, A., Li, P., Yang, H., Liu, G. and Liu, L. 2016. Sequence analysis of the Hsp70 family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses. *Scientific Reports*, 6(1): 1-14.
- 58- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., Koonin, E. V. and Deshaies, R. J. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, 298(5593): 611-615.
- 59- Vierstra, R. D. 2009. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6): 385-397.
- 60- Vierstra, R. D. 2012. The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiology*, 160(1): 2-14.
- 61- Wang, S., Kurepa, J. and Smalle, J. A. 2009. The *Arabidopsis* 26S proteasome subunit RPN1a is required for optimal plant growth and stress responses. *Plant and Cell Physiology*, 50(9): 1721-1725.
- 62- Xu, F. Q. and Xue, H. W. 2019. The ubiquitin-proteasome system in plant responses to environments. *Plant, Cell and Environment*, 42(10): 2931-2944.
- 63- Yanagitani, K., Juszkievicz, S. and Hegde, R. S. 2017. UBE2O is a quality control factor for orphans of multiprotein complexes. *Science*, 357(6350): 472-475.
- 64- Yao, C., Wu, Y., Nie, H. and Tang, D. 2012. RPN1a, a 26S proteasome subunit, is required for innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant*, 71(6): 1015-1028.
- 65- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J. M., Seki, M., Todaka, D. and Osakabe, Y. 2011. *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics*, 286(5): 321-332.
- 66- Yu, A., Li, P., Tang, T., Wang, J., Chen, Y. and Liu, L. 2015. Roles of Hsp70s in stress responses of microorganisms, plants, and animals. *BioMed Research International*, 10319: 1-8.
- 67- Zhang, H., Li, L., Ye, T., Chen, R., Gao, X. and Xu, Z. 2016. Molecular characterization, expression pattern and function analysis of the OsHSP90 family in rice. *Biotechnology and Biotechnological equipment*, 30(4): 669-676.
- 68- Zhang, J., Xu, Y., Huan, Q. and Chong, K. 2009. Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 10(1): 1-16.
- 69- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M. and Luo, L. 2010. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Experimental Botany*, 61(15): 4157-4168.
- 70- Zhu, J., Cai, D., Wang, J., Cao, J., Wen, Y., He, J., Zhao, L., Wang, D. and Zhang, S. 2021. Physiological and anatomical changes in two Rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes under drought stress conditions. *Oil Crop Science*, 6(2): 97-104.

In silico identification of drought-responsive miRNAs target genes in Canola (*Brassica napus*)

Pasandideh Arjmand M.¹, Samizadeh Lahiji H.¹, Biglouei M.H.² and Mohsenzadeh Golfazani M.¹

¹ Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

² Dept. of Water Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding, and regulatory molecules that play an important role in post gene expression regulation in response to biotic and abiotic stresses. Although Canola (*Brassica napus*) is a globally important oilseed, little is known about the regulation mechanisms of drought-responsive miRNAs target genes. Therefore, in this study target genes of drought-responsive miRNAs of bna-miR860, bna-miR156b, bna-miR156c, bna-miR156g, bna-miR171a, bna-miR171d, bna-miR171e, bna-miR172d, bna-miR399a, bna-miR399b, bna-miR396a, bna-miR395d, bna-miR395e and bna-miR395f in Canola were identified by bioinformatics tools. Molecular function, biological process, cellular component, proteins interaction, and relation of their pathways were investigated. In the present study were identified 225 target genes for miRNAs. Bioinformatics study showed that ribosome, proteasome, and chaperon-related genes of *RPP1C*, *RPL36AA*, *RPL9D*, *RPS11*, *RPT1A*, *RPT2a*, *RPT4A*, *RPN11*, *HSF1*, *HSFA1E*, *HSF4*, and *HSFB2B* are targets of drought-responsive miRNAs of bna-miR172d, bna-miR156b/c/g, bna-miR860, bna-miR396a and bna-miR395d/e/f. Ribosomes, proteasomes, and chaperons are regulated by drought-responsive miRNAs for protein regulation and stress tolerance under drought conditions. Laboratory study of identified genes in this study can be a fundamental step in the production of drought-resistant Canola cultivars in breeding and genetic engineering programs.

Key words: Chaperone, IntaRNA, Proteasome, Ribosome, STRING