دوفصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2018.109993.1249
جلد ۲۶، شماره ۲، صفحه ۱۶۴-۱۵۵ (۱۳۹۷)

شناسایی miRNAها و ژن‌های هدف مرتبط با آنها در گیاه شبدر قرمز (*Trifolium pratense*)

محمدرضا نقوی[۱]* و علی اکبر کریمی[۲]

۱*- نویسنده و مسئول مکاتبات، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

پست الکترونیک: mnaghavi@ut.ac.ir

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۶

چکیده

میکروآرناها (miRNA) یک رده از RNAهای تنظیم‌کننده کوچک درونی و غیرکدکننده پروتئینی که متشکل از حدود ۱۸-۲۲ نوکلئوتید بوده و تنظیم بیان ژن را در سطح رونویسی و پس از رونویسی ژن بر عهده دارند و طبق تحقیقات انجام شده نقش‌های اساسی در فرایندهای نموی، زمان گلدهی و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. تاکنون روش‌های متفاوتی برای شناسایی miRNAها، معرفی شده است که عبارتند از: روش نورترن بلات، ریزآرایه، qRT-PCR و روش‌های بیوانفورماتیکی. در این میان ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش شناسایی miRNAها، روش بیوانفورماتیکی می‌باشد. در این مطالعه با یک رویکرد بیوانفورماتیکی با هدف شناسایی miRNA متمایز در گیاه شبدر قرمز مبتنی بر جستجوی همولوژی بین ESTهای گیاه شبدر قرمز و miRNAها انجام شد. به‌طوری‌که ابتدا در آن همه توالی‌های ESTهای گیاه شبدر قرمز از بانک اطلاعاتی NCBI در برابر miRNAهای شناخته شده BLASTn شدند که در نهایت یک miRNA کاندید متمایز در گیاه شبدر قرمز شناسایی شد. در مجموع شش ژن هدف پیش‌بینی شده برای این miRNA نیز شناسایی شد و این ژن‌های هدف عمدتا کدکننده مونود هیدرو اسکوربات ردوکتاز۱ (برقراری تعادل گونه‌های فعال اکسیژن در چرخه اسکوربات-گلوتاتیون)، پروتئین FES1 (یک پروتئین حاوی دومین انگشت روی چسبنده به DNA)، پروتئین RHF2A (یوبی کوئیتین لیگاز E3 دخیل در پیشبرد گامتوژنز)، RNA هلیکاز وابسته به ATP (تعمیر و متابولیسم RNA)، پروتئین‌های انتقالی MFS (تسهیل‌کننده حرکت املاح کوچک از عرض غشای سلولی در پاسخ به گرادیانت شیمواسمزی) و در نهایت پروتئین AT-hook (یک موتیف متصل شونده به DNA) نیز بودند.

واژه‌های کلیدی: جستجوی همسانی، EST، بیوانفورماتیک، ژن‌های هدف، miRNA

مقدمه

شبدر قرمز گیاهی است علفی و چندساله که در مناطق معتدله کره زمین می‌روید. گل شبدر دارای مواد شیمیایی مانند تریفولین، ایزوتریفولین و اسانس روغنی می‌باشد. این گیاه دارای املاح معدنی مانند سلیس، آهن، فسفر، گوگرد، پتاسیم، منیزیوم، منگنز، روی، مس، سرب، نیکل و کبالت است. شبدر قرمز یکی از غنی‌ترین منابع ماده‌ای موسوم به «ایزوفلاون» است که کارآیی شبیه به استروژن دارد که برای درمان گرگرفتگی، کاهش کلسترول، سلامت سینه و بهبود سیستم گردش خون استفاده می‌شود. از دیگر فواید دارویی

این گیاه می‌توان به جلوگیری از شکل‌گیری لخته‌های خون، پلاک‌های سرخرگی و ابتلا به سرطان پستان و تخمدان و سرطان خوش‌خیم پروستات اشاره کرد (Bodinet & Freudenstein, 2004).

میکروآرناها یک رده از RNAهای تنظیم‌کننده کوچک درونی که مشتق شده از توالی پیش‌ساز خود و عمدتا تنظیم بیان ژن را در سطح پس از رونویسی بر عهده دارند. Lin4 اولین miRNA است که در *Caenorhabditis elegans* کشف شد و مشخص شد که Lin14 یکی از اهداف این miRNA بوده که بیان این miRNA در انتقال از مرحله اول به دوم لاروی لازم است و در سال 2002 برای اولین بار miRNAها در گیاهان کشف شد (Park *et al*., 2002).

میکروآرناها در گیاهان دارای نقش‌های مختلفی ازجمله در رشد و نمو، متابولیسم، مورفوژنز، انتقال سیگنال، تعیین زمان گلدهی و پاسخ به استرس‌های زنده و غیر زنده هستند (Li & Zhang, 2016). ساخت miRNAها در هسته و سیتوپلاسم انجام می‌شود. میکروآرناها اکثرا توسط RNA پلیمراز II به‌صورت مولکول‌های پیش‌ساز تاخورده رونویسی شده که این محصول Pri-miR نامیده شده و ساختار سنجاق سری داشته و دم پلی A در انتهای ’۳ آن و کلاهک را در ’۵ دارد (Unver *et al*., 2009). پردازش miRNAدر مرحله اول در داخل هسته که ساختار ساقه–حلقه این رونوشت‌ها توسط یک کمپلکس آنزیمی RNAse III (Drosha) انجام شده که حاصل آن منجر به ایجاد یک پیش‌ساز سنجاق سری ۶۰–۷۰ نوکلئوتیدی (Pre-miR) می‌شود. مرحله دوم پردازش در داخل سیتوپلاسم و در نتیجه عملکرد RNAse III (Dicer) که منجر به پردازش نهایی miRNA می‌شود و miRNA دورشته‌ای ۲۰–۲۴ تولید می‌گردد. فرم فعال miRNA تنظیمی به‌شکل تک‌رشته‌ای (RNA راهنما) بوده که با کمپلکس پروتئینی (RISC) RNA-induced silencing complex تلفیق می‌گردد که انتخاب تک‌رشته بر اساس خصوصیات ترمودینامیکی است. در این کمپلکس، RNA راهنما به‌عنوان عضو جدید RISK آن را به‌طرف RNA هدف راهنمایی می‌کند. این miRNA بالغ از طریق جفت‌شدن نسبی با mRNAهای هدف (معمولا جفت‌شدن با ناحیه 3’UTR انجام می‌شود) باعث تجزیه یا مهار ترجمه می‌شود (Lin *et al*., 2005). در مواردی که جفت‌شدن miRNA با هدف خود کامل یا نسبتا کامل باشد برش mRNA هدف در ناحیه‌ای که با نوکلئوتیدهای ۱۰ و ۱۱ miRNA جفت‌شده است انجام می‌شود. آرگونات در این برش نقش اساسی داشته و یکی از پروتئین‌های اساسی کمپلکس miRNPs و RISK می‌باشد. برای ایجادRISK فعال مولکول RNA دورشته‌ای کوچک که توسط دایسر ایجاد شده است به کمپلکس RISK ملحق شده که این dsRNA واسرشته شده تا رشته RNA راهنما و RNA گذرا را ایجاد کرده که رشته گذرا در اثر عمل یک هلیکاز حذف شده و از کمپلکس آزاد می‌گردد. در این حالت، RISK ایجاد شده را RISK بالغ نامیده که حاوی تک‌رشته RNA راهنما است و آماده شناسایی و برش mRNA هدف می‌شود. ایجاد تعداد کمی جفت باز مکمل برای برهم‌کنش عملکردی بین miRNA و توالی مولکول هدف ضروریست. اتصال miRNAها همچنین می‌تواند سبب ناپایداری دم پلیA در mRNA هدف شده و آغاز ترجمه آن را ناکارآمد کند (Wiemer, 2007). هدف از این تحقیق شناسایی miRNAهای متمایز گیاه شبدر قرمز و ژن‌های هدف آن با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مبتنی بر جستجوی همولوژی بین ESTهای گیاه شبدر قرمز موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و miRNAهای سایت miRBae با انجام BLASTn بود.

مواد و روش‌ها

منابع miRNA:

میکروآرناهایی که استفاده گردید از سایت miRBase دانلود شد که حاوی تعداد 28645 توالی miRNA بالغ شناخته شده از تعداد زیادی گونه بود. این miRNAها با توالی‌های EST گیاه شبدر قرمز بر اساس جستجوی همسانی مورد مقایسه قرار گرفتند (Zhang *et al*., 2007).

منابع EST گیاه شبدر قرمز:

در مجموع حدود 38109 EST گیاه شبدر قرمز از بانک اطلاعاتی NCBI قسمت EST آن (Anonymous1) به‌دست آمد.

جستجوی همولوژی بین miRNA و ESTها:

شناسایی miRNAهای گیاه شبدر قرمز برحسب روش‌های بیوانفورماتیکی قبلی که انتشار یافته است انجام شد (Zhang *et al*., 2005, 2007; Yin *et al*., 2008). توالی‌های بالغ miRNA و ESTهای گیاه مورد نظر در الگوریتم BLASTn در ویندوز لینوکس آپلود شدند (BLAST2.2.21). سپس توالی‌های EST با توالی‌های بالغ miRNA گیاهی مورد مقایسه قرار گرفتند (Zhang *et al*., 2005). منابع miRNA به‌عنوان توالی شناخته شده و منابع EST به‌عنوان توالی تردیدی برای جستجوی همولوژی به‌کار گرفته شدند. برای تجزیه‌وتحلیل ESTها نیز Evalue=0.001 در نظر گرفته شد. سپس ESTهای کاندید که حداکثر تا چهار عدم جفت‌شدگی با miRNA داشتند انتخاب شدند.

شناسایی miRNAهای متمایز غیرکدکننده پروتئینی:

میکروآرنا از توالی‌های EST غیرکدکننده پروتئینی به‌وجود می‌آید، بنابراین بعد از BLASTx توالی‌های EST کدکننده پروتئینی حذف شده و توالی‌های غیرکدکننده پروتئینی باقی ماندند (Altschtl *et al*., 1997).

تعیین ساختار ثانویه miRNAهای متمایز به‌وسیله MFOLD:

از نرم‌افزار MFOLD برای پیش‌بینی ساختار ثانویه miRNAهای کاندید متمایز استفاده شد. نرم‌افزار Mfold، برنامه اینترنتی برای پیش‌بینی ساختارهای ثانویه اسیدهای نوکلئیک است. این برنامه، نتایج روش برنامه‌ریزی شده دینامیک و محاسبات ترمودینامیکی را برای شناسایی بیشتر ساختارهای ثانویه با حداقل انرژی آزاد ترکیب می‌کند. نرم‌افزار محاسباتی مبتنی بر وب MFOLD (Anonymous 2)قابل دسترس می‌باشد (Zuker, 2003). پارامترهایی مانند توالی RNA خطی، دمای تاخوردگی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط یونی ۱ مولار NaCL برای پیش‌بینی ساختار ثانویه به‌کار برده شد. نتایج MFOLD شامل حداقل انرژی آزاد (Kcal/mol)، درصد محتویات (A+T) و (G+C) و شاخص حداقل انرژی آزاد فولدینگ (MFE) و AMFE و MFEI می‌باشد که به‌شرح زیر محاسبه می‌شود (Zhang *et al*., 2006a):

$$\text{AMFE} = \frac{\text{MFE}}{\text{Length of precursor sequence (LP)}}$$

$$\text{MFEI} = \frac{\text{AMFE}}{(\text{G+C})\%}$$

پارامترهای به‌کار برده شده بر روی miRNAهای بالغ و پیش‌ساز آن شامل: الف- حلقه پیش‌ساز miRNA دربرگیرنده قسمت بالغ miRNA باشد. ب- یک حلقه یا شکاف بزرگ در توالی miRNA بالغ وجود نداشته باشد. ج- شاخص حداقل انرژی فولدینگ (MFEI) از انواع دیگر RNAها بیشتر بوده و حداقل انرژی منفی فولدینگ (MFE) پیش‌ساز miRNA کمتر باشد. د- تعداد بازهای غیر مشابه بین miRNAهای بالغ و پیش‌ساز حداکثر تا شش نوکلئوتید باشد.

تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی:

RNAهای کوچک به‌دلیل حفاظت‌شدگی می‌توانند به وسیله کشف ارتولوگ از طریق تجزیه‌وتحلیل بیوانفورماتیک انجام بشود. میکروآرناهای گیاهی موجود در سایت miRBase با miRNA کاندید گیاه شبدر قرمز مورد جستجوی همسانی قرار گرفت و توالی‌هایی که با miRNA کاندید شبدر قرمز مشابهت داشت در برنامه MEGA5.0 با روش neighbor-joining (NJ)، برای نشان‌دادن روابط تکاملی با دیگر اعضای خانواده به‌صورت درخت فیلوژنتیکی انجام شد (Tamura *et al*., 2011).

پیش‌گویی ژن‌های هدف miRNAهای کاندید گیاه شبدر قرمز:

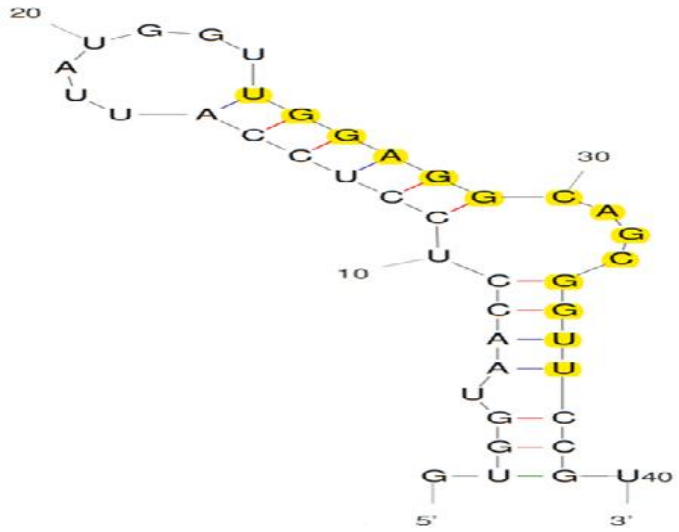
برای شناسایی رونوشت‌ها و ژن‌های هدف از تشابه مکمل معکوس بین miRNA و رونوشت هدف استفاده شد. در ضمن miRNA کاندید گیاه شبدر قرمز به‌عنوان توالی تردیدی در برابر گیاه ارابیدوبسیس DFCI Gene Index (AGI), version 15)) با استفاده از psRNATARGET (Anonymous 3) مورد استفاده قرار گرفت. سپس برای پی بردن به عملکرد این ژن‌های هدف، مورد جستجوی همسانی قرار گرفتند.

پارامترهای زیر در هنگام استفاده از این سایت نیز به‌کار برده شد: الف- حداکثر ارزش مورد انتظار =۳، ب- محدوده عدم تشابه بازهای مرکزی برای مهار ترجمه بین ۱۱-۹ نوکلئوتید، ج- تعداد جایگاه‌های مورد هدف = ۲، د- حداکثر عدم تشابه در جایگاه‌های مکمل کمتر از چهار و بدون هیچ‌گونه فاصله (gap) (Dai & Zhao, 2011).

نتایج

شناسایی miRNAهای کاندید در گیاه شبدر قرمز

میکروآرناهای بالغ گیاهی سطح بالایی از حفاظت‌شدگی درون قلمرو گیاهی دارند و ژن‌های miRNA در یک گونه ممکن است در گونه‌های اورتولوگ یا همولوگ دیگر وجود داشته باشد. بنابراین، توالی miRNA شناخته شده برای شناسایی miRNAهای کاندید جدید در شبدر قرمز مورد استفاده قرار گرفت. برای شناسایی miRNAهای جدید در گیاه شبدر قرمز از روش‌های بیوانفورماتیکی مبتنی بر جستجوی همسانی استفاده شد (Zhang *et al*., 2006b). در کل تعداد 28645 توالی miRNA بالغ شناخته شده از تعداد زیادی گونه از سایت miRBase دانلود شد. این miRNAها به‌عنوان توالی شناخته شده برای جستجوی همولوژی در برابر ESTهای گیاه شبدر قرمز مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از انجام BLASTn بین توالی‌های EST گیاه شبدر قرمز و تمام miRNAهای سایت miRBase حدود 510 توالی مشابه به‌دست آمد. جستجوی BLAST با E-value پایین‌تر ناحیه تشابه قابل توجه‌تری را در میان ESTها و miRNAهای بالغ به‌وجود آورد. بنابراین توالی‌هایی با بیشترین مشابهت در بین نوکلئوتیدهای ESTها و miRNAها و حداقل عدم تشابه در بین جایگاه‌های مکمل به‌دست آمد. بعد از انجام BLASTx به‌منظور حذف توالی‌های کدکننده پروتئینی و باقی‌ماندن توالی‌های غیرکدکننده پروتئینی، یک miRNA متمایز به‌دست آمد. سپس توالی‌های EST به‌وجود آورنده این miRNAهای بالغ غیرکدکننده پروتئینی برای تعیین ساختار ثانویه به سرور MFOLD انتقال یافتند. نتایج به‌دست آمده توسط MFOLD به‌صورت دستی برای تعیین توالی پیش‌ساز miRNA و ساختار ساقه-حلقه مناسب با استفاده از معیارهای از پیش توضیح داده شده بررسی گردید. حداقل انرژی آزاد فولدینگ (MFE) یک شاخص برجسته برای تعیین ساختار ثانویه اسیدهای نوکلئیک مانند RNA و DNA می‌باشد. حداقل انرژی آزاد فولدینگ پایین‌تر (منفی‌تر)، از نظر ترمودینامیکی برای ساختار ثانویه توالی‌های RNA یا DNA مربوطه پایدارتر است. توالی پیش‌ساز miRNA به‌طور معنی‌داری ارزش MFEI بالاتری نسبت به RNAهای غیرکدکننده پروتئینی مانند tRNA وrRNA یا کدکننده پروتئینی مثل mRNA دارند (Bonnet *et al*., 2004). برای جلوگیری از پیش‌بینی نادرست miRNAها از دیگر RNAهای کوچک MFEI شاخص بسیار مطلوبی محسوب می‌شود. شاخص MFEI با استفاده از گزارش‌های قبلی نیز محاسبه شد (Yin *et al*., 2008). طول پیش‌ساز miRNA مورد نظر ما ۴۱ نوکلئوتید و شاخص MFEI نیز ۰/۶۴ محاسبه شد. با توجه به شکل ۱ ساختار ثانویه پیش‌ساز ساقه-حلقه miRNA متمایز کاندید در گیاه شبدر قرمز در MFOLD با MFE=15.1 ترسیم شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود قسمت بالغ miRNA گیاه شبدر قرمز در قسمت حلقه ساختار پیش‌ساز miRNA قرار دارد که یکی از شروط اساسی در ترسیم ساختار ثانویه در MFOLD می‌باشد.



شکل ۱. ساختار پیش‌ساز ساقه–حلقه **miRNA** متمایز در گیاه شبدر قرمز (بخش رنگی قسمت بالغ آن را نشان می‌دهد)

شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی برای **miRNA** متمایز جدید در شبدر قرمز (**miR162**)

مقایسه توالی‌های بالغ miRNA کاندید با دیگر اعضای خانواده مشابه نشان داد که اغلب اعضا درجه‌ای بالا از تشابه با miRNA کاندید دارند. درخت فیلوژنتیکی در میان اعضای این خانواده یک ارتباط تکاملی بین miRNA گیاه شبدر و دیگر اعضا را نشان داد. با توجه به شکل miRNA۲ کاندید متمایز گیاه شبدر قرمز که در شکل نشان داده شده است بیشترین شباهت را با Zma-miR162-5P که بر روی آنزیم پلی‌نوکلئوتید فسفریلاز تأثیر داشته که این آنزیم در پاسخ به کمبود فسفات و در فرایند بیوسنتزی کلروفیل، زانتوفیل و کاروتن نقش داشت؛ همچنین شباهت زیادی با aly-miR162a-5p, bra-miR162a-5p, csi-miR162-5p, ath-miR162a-5p, داشت و عملکرد ath-miR162a-5p و csi-miR162-5p بر روی پروتئین هدف ژن مونودهیدرو اسکوربات ردوکتاز۱ و aly-miR162a-5p, bra-miR162a-5p بر روی پروتئین هدف نوکلئوزید تری فسفات هیدرولاز تأثیر می‌گذارند.

جدول ۱. ویژگی‌های miRNA متمایز در گیاه شبدر قرمز

ویژگی‌ها	مقدار
EST ID	BB9339952
طول توالی EST	۱۸۲
طول پیش‌ساز miRNA	۴۱
طول بالغ miRNA	۱۴
توالی بالغ miRNA	UGGAGGCAGCGGUU
MFE	۱۵/۱
AMFE	۰/۳۶
MFEI	۰/۶۴
نوکلئوتیدهای غیر مشابه	۴
تعداد نوکلئوتیدها در توالی پیش‌ساز miRNA	A=۶/T=۱۲/G=۱۳/C=۱۰
(A+U/T)%	۰/۴۴
(C+G)%	۰/۵۶
خانواده miRNA	miR162

جدول ۲. فهرست پروتئین‌های هدف برای miRNA متمایز در گیاه شبدر قرمز

پیش بینی نوع بازدارندگی	شماره ژن هدف	عملکرد بیولوژیکی	پروتئین هدف
Cleavage	BP625957	برقراری تعادل گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در چرخه اسکوربات–گلوتاتیون	مونود هیدرو اسکوربات ردوکتاز۱
Cleavage	TC385258	یک پروتئین حاوی دومین انگشت روی و پروتئین چسبنده به DNA	پروتئینFES1
Cleavage	TC364946	یوبی کوئیتین E3 لیگاز	پروتئین RHF2A
Cleavage	TC365167	تعمیر و متابولیسم RNA	RNA هلیکاز وابسته به ATP
Cleavage	CB074611	تسهیل کننده حرکت املاح کوچک از عرض غشای سلولی	پروتئین‌های MFS
Translation	TC364616	موتیف متصل به DNA	پروتئین AT- hook

بحث

میکروآرناها می‌توانند به‌عنوان یک ابزار اصلاحی جدید در بهبود ژنتیکی گیاهان عمل کرده و برخی از آنها اثر نیرومند در تنظیم صفات عمده زراعی دارند. تاکنون چندین miRNA گیاهی با استفاده از رویکردهای بیوانفورماتیکی یا روش آزمایشگاهی شناسایی شده است، اما هیچ توالی قابل دسترس و یا اطلاعات عملکردی در رابطه با miRNAهای گیاه شبدر قرمز تا این تاریخ گزارش نشده است. در این مطالعه یک miRNA کاندید و ژن‌های هدف مرتبط با آن در گیاه شبدر قرمز شناسایی شد. برای پی‌بردن به نقش miRNAها در عملکردهای مختلف سلولی نیز، شناسایی ژن‌های هدف miRNA یک مرحله مهمی می‌باشد. میکروآرناها در ارگانیسم‌های مختلف حفاظت‌شده هستند، بنابراین عملکردشان هم حفاظت‌شده است. ژن‌های هدف miRNAها عمدتا تأثیر بر رشد و نمو گیاه می‌گذارند. در این مطالعه در مجموع شش ژن هدف برای miR162 که متعلق به چندین خانواده ژنی با عملکردهای بیولوژیکی مختلف بودند به‌دست آمد. ژن‌های هدف پیش‌بینی شده برای miRNA گیاه شبدر قرمز بیش از یک ژن به‌دست آمد که این ژن‌ها توسط یک miRNA تنظیم می‌شوند. بعضی از miRNAها به‌طور مستقیم فاکتورهای رونویسی هدف و یا به‌طور غیرمستقیم تأثیر بر رشد و نمو و همچنین ژن‌های مختص کنترل گیاهی را بر عهده دارند.

یکی از اهداف miR162 ژن مونودهیدرو اسکوربات ردوکتاز1 می‌باشد. در بیشتر گیاهان عالی دهیدرو اسکوربات ردوکتاز(DHAR) از طریق برقراری تعادل گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در چرخه آسکوربات–گلوتاتیون دارد. فعالیت این ژن احیای رادیکال مونودهیدرو اسکوربات ردوکتاز به‌کمک NADPH می‌باشد و مکان فعالیت آن در سیتوزول، میتوکندری و کلروپلاست می‌باشد (Wells & xu, 1994). ژن هدف دیگر FES1 که کدکننده یک پروتئین حاوی دومین انگشت روی (Zinc finger domain) و یک پروتئین چسبنده به DNA می‌باشد. یکی دیگر از ژن‌های هدف این miRNA نیز کدکننده نوعی پروتئین RHF2A (RING-H2 group F2A) و یوبی کوئیتین لیگاز E3 که در گامتوژنز دخیل می‌باشد، است. پروتئین RHF2A ممکن است در هدف قرار دادن ICK4KRP6 برای

تخریب میوز مربوطه به‌کار رود. پروتئین RHF2A در اندام گل بیان می‌شود (Liu et al., 2008).

یکی دیگر از ژن‌های هدف این miRNA نیز RNA هلیکاز وابسته به ATP می‌باشد که آنزیم‌های بسیار حفاظت‌شده‌ای هستند که به‌طور اختصاصی بر همه جنبه‌های متابولیسم RNA تأثیرگذارند. این پروتئین‌ها یا اتصال شونده و یا تعمیر RNA و یا کمپلکس RNA–پروتئین را در یک مدل وابسته به ATP تشکیل می‌دهند. RNA هلیکاز یکی از بزرگترین خانواده‌های پروتئینی در متابولیسم RNA می‌باشد. در سلول اغلب عملکرد RNA هلیکاز در فرایندهای اختصاصی شامل بیوژنز ریبوزوم، پیرایش Pre-mRNA، ترجمه، بیوژنز snRNP، ذخیره و زوال و خروج RNA و پردازش RNA میتوکندریایی می‌باشد (Tanner & linder, 2001).

پروتئین‌های (Major Facilitator Superfamily MFS) از اهداف دیگر miR162 که یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های انتقال دهنده بوده و تسهیل‌کننده حرکت املاح کوچک از عرض غشای سلولی در پاسخ به شیب شیمواسمزی می‌باشد. عملکرد خانواده پروتئین MFS در وهله اول جذب قندها و بعد انتقال دارو و متابولیت، الیگوساکاریدها، اسیدهای آمینه و اکسی آنیون‌ها می‌باشد (Marger & Saier, 1993). ژن مورد هدف دیگر این miRNA نیز پروتئین AT-hook است که در گیاهان یک موتیف متصل به DNA می‌باشد و این موتیف بسیار حفاظت‌شده و پالیندرومیک می‌باشد. پروتئین AT-hook به شیار کوچک از نواحی غنی A-T در DNA می‌چسبد (Singh et al., 2006). البته انجام آزمایش qRT-PCR برای مقایسه و اعتبارسنجی سطوح بیان miRNA و ژن‌های هدف آن در اندام‌های مختلف گیاه شبدر قرمز می‌تواند انجام شود که در این باره همبستگی منفی معنی‌دار بین میزان بیان miRNA و ژن هدف آن در اندام خاص گیاه شبدر قرمز گواه بر تأیید این miRNA در گیاه شبدر قرمز می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25: 3389–3402.
- Anonymous1: http://www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Anonymous2: http://frontend.bioinfo.rpi.edu /applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi.
- Anonymous3:http://planTgrn.noble.org/psRNATarge.
- Bodinet, C. and Freudenstein, J., 2004. "Influence of marketed herbal menopause preparations on MCF-7 cell proliferation". Menopause, 11 (3): 281–289.
- Bonnet, E., Wuyts, J., Rouze, P. and Peer, Y.V., 2004. Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. Bioinformatics, 20: 2911–2917.
- Dai, X. and Zhao, P.X., 2011. PsRNA Target: a plant small RNA target analysis server. Nucleic Acids Research, 39: W155–W159.
- Li, C. and Zhang, B., 2016. MicroRNAs in control of plant development. Journal of cellular physiology, 231(2): 303-313.
- Lin, S. L., Chang, D. and Ying, S.Y., 2005. Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. Gene, *356*: 32-38.
- Liu, J., Zhang, Y., Qin, G., Tsuge, T., Sakaguchi, N., Luo, G. and Aoyama, T., 2008. Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during Arabidopsis gametogenesis. The Plant Cell, 20(6): 1538-1554.
- Marger, M.D. and Saier, M.H., 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. Trends in biochemical sciences, *18*(1): 13-20.
- Park, W., Li, J.J., Song, R.T., Messing, J. and Chen, X.M., 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Curr. Biol., 12:1484–1495
- Singh, M., D'silva, L. and Holak, T.A., 2006. DNA-binding properties of the recombinant high-mobility-group-like AT-hook-containing region from human BRG1 protein. Biological chemistry, 387(10/11):1469-1478.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionar y distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731–2739.
- Tanner, N. K. and Linder, P., 2001. DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific

dissociation functions. Molecular cell, 8(2):251-262.
– Unver, T. and Budak, H., 2009. Conserved microRNAs and their targets in model grass species Brachypodium distachyon. Planta, 230(4), 659-669.
– Wells, W.W. and Xu, D.P., 1994. Dehydroascorbate reduction. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, *26*(4): 369-377.
– Wiemer, E.A., 2007. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *European* Journal of Cancer, *43*(10): 1529-1544.
– Yin, Z., Li, C, Han, X. and Shen, F., 2008. Identification of conserved microRNAs and their target genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Gene* 414:60–66
– Zhang, B. and Pan, X. and Stellwag, E., 2008. Identification of soybean microRNAs and their targets. Planta, 229:161–182
– Zhang, B., Wang, Q., Wang, K., Pan, X., Liu, F., Guo, T. and Anderson, T.A. 2007. Identification of cotton microRNAs and their targets. Gene, *397*(1), 26-37.
– Zhang, B.H., Pan, X.P., Cox, S.B., Cobb, G.P. and Anderson, T.A., 2006a. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. Cell. Mol. Life Sci. 63, 246.
– Zhang, B.H., Pan, X.P., Cox, S.B., Cobb, G.P. and Anderson, T.A., 2006b. Conservation and divergence of plant microRNA genes. Plant Journal, 46, 243–259.
– Zhang, W., Luo, Y., Gong, X., Zeng, W. and Li, S., 2009. Computational identification of 48 potato microRNAs and their targets. Comput Biol. Chem., 33:84–93
– Zhang, Y., 2005. miRU: an automated plant miRNA target prediction server. Nucleic Acids Research, 33(Web Server issue):W701–4
– Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research, 31:3406–3415

Identification of miRNAs and their target genes in red clover (*Trifolium pretense*)

M.R. Naghavi[1*], A.A. Karimi[2]

1*- Corresponding author, Prof., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran
Email: mnaghavi@ut.ac.ir
2- M.Sc. student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran

Received: 15.03.2017 Accepted: 27.05.2018

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are a group of 18_22 nucleotides long noncoding small endogenous that derived from its precursor sequence and evolutionary conserved post-transcriptional regulatory RNAs, which show an enormous role in various biological and metabolic processes in both animals and plants. MiRNA detection methods including microarray, qRT-PCR , northern blot and bioinformatics methods in which the easiest and cheapest way to identify miRNA is bioinformatics method. A bioinformatics approach was used to identify potential miRNA in red clover. EST-based homology search was applied to find potential miRNA of red clover. We blasted publicly available EST sequences obtained from NCBI GenBank against previously known plant miRNAs. A total of six miRNA target genes based on their complementary sequences were also detected. Target genes encoding mono dehydro ascorbate reductase 1 play an important role in maintaining balance in the cycle of reactive oxygen species ascorbate-glutathione, FES1 proteins that contain zinc finger domain binding DNA, RHF2A gene encoding E3 ubiquitin-protein ligase involved in the positive regulation of the gametogenesis progression, RNA helicase ATP-dependent is involved in the RNA repair and metabolism, Major facilitator superfamily (MFS) is a superfamily of membrane transport proteins that facilitate movement of small solutes across cell membranes in response to chemiosmotic gradients, AT-hook DNA binding motif protein.

Keywords: Bioinformatics, EST, homology search, miRNA, target genes