

Study of miRNAs involved in drought and salt stress stresses and ontology of target genes in Brassica species

Neda Zolfaghari Khutbehsera

MSc Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail address: zolfghari.neda744@gmail.com

Mohammad Mohsenzadeh Golfazani 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail address: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

Mohammad Mehdi Taghvaei 

Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail address: mahdi.taghvaei@gmail.com

Habibollah Samizadeh Lahiji 

Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail address: hsamizadeh@guilan.ac.ir

Abstract

Objective

Abiotic stresses such as drought and salinity significantly affect plant growth and performance. Plants use strategies to adapt and tolerate drought and salt stress that may threaten their survival during their life cycle, one of which is miRNA-mediated post-transcriptional regulation.

Materials and methods

In the current research, miRNAs that showed significant expression during salt and drought stress were selected by checking the references to investigate this phenomenon in rapeseed plants. The phylogenetic tree was constructed to analyze and compare the evolutionary relationships and conservation of MicroRNA effective in drought and salinity stress in *Brassica napus*, *Brassica rapa*, and *Brassica oleracea* species. Target genes for selected miRNAs were identified using psRNATarget online software. Categorization and gene ontology of target genes and identification of biological pathways were accomplished; also, proteins were classified based on molecular function

and biological processes. The Protein-protein interaction was analyzed to comprehensively interpret the relationships between the target genes. In the present study, 225 target genes for miRNAs were identified.

Results

After examining the protein interaction network, it was found that there were the most interactions between ribosomal, proteasome subunits, and the ubiquitin-proteasome system. This result determined that drought and salinity stress leads to the activation of various biological systems and pathways and changes in gene expression along with the activation of the protein synthesis machine and alterations in protein content. By activating post-transcriptional gene regulation (PTGR) and post-translational modifications (PTMs), the plant regulates the abundance, activities, intracellular distribution, and transport of regulatory proteins involved in various growth processes as well as stress response.

Conclusion

The results of this study will lead to a broader perspective regarding stress and its effect on the pathways involved in cellular processes and will reveal the wide dimensions of the stress response.

Keywords: Abiotic stress, Post-transcriptional gene regulation, Post-translational modifications, Protein-protein interaction, psRNATarget, STRING.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Zolfaghari Khutbehsera N, Mohsenzadeh Golfazani M, Taghvaei MM, Samizadeh H (2022) Study of miRNAs involved in drought and salt stress stresses and ontology of target genes in Brassica species. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (4), 103-132.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (4), 103-132. DOI: 10.22103/jab.2022.20206.1429

Received: August 23, 2022.

Received in revised form: November 06, 2022.

Accepted: November 07, 2022.

Published online: November 15, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors


مطالعه miRNA های درگیر در تنش های شوری و خشکی و هستی شناسی ژن های هدف در گونه های *Brassica*

ندا ذوالفقاری خطبه سرا


دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: zolfghari.neda744@gmail.com

محمد محسن زاده گلفزانی 

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

محمد مهدی تقوایی 

استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: mahdi.taghvaei@gmail.com

حبیب ... سمیع زاده لاهیجی 

استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: hsamizadeh@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۶

چکیده

هدف: رشد و عملکرد گیاه به طور چشمگیری تحت تأثیر تنش های غیر زیستی مانند خشکی و شوری قرار می گیرد. گیاهان برای انطباق و تحمل تنش شوری و خشکی که ممکن است بقای آن ها را در طول چرخه زندگی آن ها تهدید کند، راهکارهایی را بکار می برند که یکی از آن ها تنظیمات پس از رونویسی با واسطه miRNA است.

مواد و روش ها: بدین منظور در تحقیق حاضر، برای بررسی این پدیده در گیاه کلزا ابتدا با بررسی منابع miRNA هایی که در طی تنش های شوری و خشکی بیان معنی داری از خود نشان داده بودند انتخاب شدند. به منظور بررسی و مقایسه روابط تکاملی و حفاظت شدگی MicroRNA مؤثر در تنش خشکی و شوری در سه گونه *Brassica napus*، *Brassica rapa* و *Brassica oleracea* درخت فیلوژنتیکی برای آن ها رسم شد. به کمک نرم افزار آنلاین psRNATarget شناسایی ژن های هدف برای miRNA های انتخاب شده صورت گرفت. دسته بندی و بررسی هستی شناسی ژن های هدف انجام شد. به منظور انجام تفسیر و

تحلیل جامعی از روابط بین ژن‌های هدف، شبکه میانکشی پروتئین‌ها ترسیم شد. در پژوهش حاضر ۲۲۵ ژن هدف برای miRNAها شناسایی شد.

نتایج: پس از بررسی شبکه میانکشی پروتئین‌ها مشخص شد که بیشترین تعاملات بین زیر واحدهای ریبوزومی، پروتازومی و سیستم یوبیکوئیتین-پروتازوم وجود داشت. این نتیجه گویای این است که، تنش خشکی و شوری منجر به فعال شدن سیستم‌ها و مسیرهای مختلف بیولوژیکی و تغییر در بیان ژن‌ها همراه با فعال شدن ماشین پروتئین‌سازی و تغییر در محتوای پروتئینی می‌شود و گیاه از طریق فعال کردن تنظیم ژن پس از رونویسی و تغییرات پس از ترجمه، فراوانی، فعالیت‌ها، تقسیم‌بندی درون سلولی و انتقال پروتئین‌های تنظیم‌کننده درگیر در فرآیندهای مختلف رشد و همچنین پاسخ‌دهی به تنش را تنظیم می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی دید وسیع‌تری در ارتباط با تنش‌ها و اثر آن بر مسیرهای درگیر در فرآیندهای سلولی خواهد شد و ابعاد گسترده پاسخ به تنش‌ها را آشکار خواهد کرد.

کلیدواژه‌ها: تنش غیرزیستی، تنظیم ژن پس از رونویسی، تغییرات پس از ترجمه، میانکشی پروتئین‌ها، psRNATarget،

STRING

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ندا ذوالفقاری خطبه سرا نداء، محسن زاده گلفزانی محمد، تقوایی محمدمهدی، سمیع زاده لاهیجی حبیب ا... (۱۴۰۱) مطالعه miRNAهای درگیر در تنش‌های شوری و خشکی و هستی‌شناسی ژن‌های هدف در گونه‌های *Brassica*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۴(۴)، ۱-۲۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian

Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

گیاهان با تنش‌های غیر زیستی و زیستی متعدد از جمله گرما، نور، سرما، هیپوکسی، خشکی، شوری و عفونت‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی روبرو هستند. تنش می‌تواند منجر به تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی شود تغییراتی که ظرفیت فتوسنتز را کاهش می‌دهد و در نتیجه بهره‌وری و رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Hirayama & Shinozaki 2010). تحمل گیاه یا سازگاری با تنش شوری و خشکی شامل شبکه‌های مولکولی یا ژنی، مسیرهای متابولیکی پیچیده و صفات فیزیولوژیکی است. به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره

مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمتمل بر همانندسازی ماده ژنتیکی^۱، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Arabpour et al. 2021). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Mohammadabadi et al. 2021). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Shahsavari et al. 2021). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). گیاهان به کمبود مواد مغذی، شوری و خشکی عمدتاً از طریق تنظیم رونویسی پاسخ می‌دهند، اما تنظیمات پس از رونویسی با واسطه miRNA نیز در این پاسخ دخیل است (Zhang et al. 2020). تحت تنش خشکی ژن‌های بسیاری در گیاهان القا می‌شود و اندامک‌های مختلفی تحت تأثیر آن قرار می‌گیرد. تنش خشکی در گیاهان منجر به مهار فتوسنتز و تنفس در اندامک‌های مانند کلروپلاست و میتوکندری و تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) و برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن می‌شود (Meng et al. 2020; Liu et al. 2021; Razi & Muneer 2021). تنش شوری به وجود مقادیر اضافی یون‌های Na^+ و Cl^- در خاک یا محیطی که گیاه در آن رشد می‌کند اشاره دارد (Moin et al. 2021). به دلیل تجمع بالای یون سدیم در طول تنش شوری، جذب آب توسط ریشه کاهش می‌یابد و سرعت تعرق از طریق روزه‌ها افزایش می‌یابد که منجر به آسیب غشا، اختلال در سم‌زدایی ردوکس و کاهش کلی فعالیت فتوسنتزی می‌شود. بنابراین، یک سرکوب اولیه رشد گیاهان به دلیل اثرات هیپراسموتیک^۲ اتفاق می‌افتد و توقف رشد بعدی را می‌توان به سطوح سمی یون‌ها نسبت داد. استراتژی‌ها متعددی در گیاهان برای انطباق و تحمل تنش شوری که ممکن است بقای آن‌ها را در طول چرخه زندگی آن‌ها تهدید کند، تکامل یافته‌اند. ژن‌های ناشی از تنش به سرعت از طریق انتقال سیگنال شوری فعال می‌شوند، از جمله فاکتورهای رونویسی پاسخ اولیه^۳، مانند ژن‌های خانواده *MYBs*، *CBF/DREB* و *ABF/AREBs*، و در نتیجه ژن‌های پایین‌دستی پاسخ با تأخیر^۴ را در سطح رونویسی برای درک و سازگاری با تنش محیطی تنظیم می‌کند (Li et al. 2021). به دلیل پتانسیل microRNA ها در هدف قرار دادن تعداد زیادی از mRNA ها، این دسته

¹ DNA

² hyperosmotic

³ early-response transcription factors

⁴ delayed-response genes

اولیگونوکلئوتیدهای ۲۱-۲۲ تایی تقریباً در تمام پدیده‌های بیولوژیکی شامل تنظیم چرخه سلولی، رشد سلولی، آپوپتوزیس، تمایز سلولی، انتقال علامت، تجزیه پروتئین و همچنین تنظیم بیوتنز خود و پاسخ به تنش نقش دارند (Zhang et al. 2006). گیاهان جنس براسیکا معمولاً به دلیل تغییرات فصلی و تغییرات جغرافیایی با تنش‌هایی مواجه می‌شوند که در رشد و نمو گیاه اختلال ایجاد می‌کند. با این حال، گیاهان می‌توانند با تعدیل بیان ژن هدف، خود را با این شرایط سازگار کنند. در مطالعه‌ای (Yu et al. 2012) در *Brassica rapa*، ۲۱ miRNA جدید از ۱۹ خانواده miRNA را شناسایی کردند که از این میان چهار miRNA به‌ویژه bra-miR1885b.3 و bramiR5718 در پاسخ به گرما نقش داشتند (Yu et al. 2012). علاوه بر این، توالی یابی با کارایی بالا^۵ ۱۲۵ miRNA جدید و ۲۲۱ miRNA حفظ‌شده را شناسایی کرد که نقش مهمی در پاسخ به تنش، متابولیسم، رشد و توسعه *B. rapa* داشتند (Wang et al. 2012a). همچنین با استفاده از یک رویکرد مبتنی بر ژنومیک مقایسه‌ای، ۱۲۶ miRNA جدید در *Brassica juncea* شناسایی شد که در انواع مختلف فرآیندهای بیولوژیکی شامل دمای بالا، خشکی و شوری نقش دارند (Bhardwaj et al. 2014). به همین ترتیب، در مطالعات دیگری با کمک توالی‌یابی نسل جدید miRNA های جدیدی را شناسایی کردند که ژن‌های متعلق به فاکتور رونویسی خانواده *TCP*، فاکتور رونویسی خانواده *GRAS*، فاکتور پاسخ اکسین، فاکتور رونویسی *AP2*، فاکتور رونویسی *NAC* و فاکتور رونویسی *MYB* در *B. juncea* را مورد هدف قرار می‌دهند (Yang et al. 2013). در گونه *oleracea*، نتایج نشان داد miR157a، miR166، miR167 و miR168c به‌عنوان فراوان‌ترین مولکول‌ها و miR166، miR167 و miR169 به‌عنوان بزرگ‌ترین خانواده miRNA شناسایی شدند و پیش‌بینی شد که این miRNAها ممکن است mRNAهایی را که چندین پروتئین بالقوه درگیر در تنظیم عملکردهای مختلف مانند پاسخ تنش غیر زیستی، فسفریلاسیون اکسیداتیو، ارتباط سلولی و محرک‌های هورمونی را کد می‌کنند، مورد هدف قرار دهند (Lukasik et al. 2013). به‌طور مشابه، تجزیه و تحلیل محاسباتی مبتنی بر ژنومیک مقایسه‌ای در *B. oleracea*، ۱۹۳ miRNA بالقوه را شناسایی کرد. همچنین miR158، miR156، miRNA169 و miR5021 به‌عنوان بزرگ‌ترین خانواده‌های miRNA شناسایی شدند که در عملکردهای مختلفی از جمله رشد گیاه، انتقال سیگنال و پاسخ به تنش شرکت می‌کنند (Wang et al. 2012b). شوری و خشکی دو تنش مهم غیر زیستی هستند که به‌طور قابل‌توجهی جوانه‌زنی، نمو و بهره‌وری بذر گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. گیاهان مکانیسم‌های دفاعی سازمان‌یافته‌ای از طریق تعدیل بیان ژن در سطوح رونویسی و پس از رونویسی برای مقابله با چنین تغییرات محیطی سختی دارند. علاوه بر بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش، مشخص شده است چندین خانواده miRNA توسط این دو تنش غیرزیستی تنظیم می‌شود. تعداد زیادی miRNA مربوط به تنش خشکی در گیاهان به کمک توالی یابی small RNA شناسایی شدند. در ذرت، ۶۵ miRNA مرتبط با خشکی متعلق به ۱۳ خانواده با استفاده از داده‌های ریزآرایه شناسایی شدند (Aravind et al. 2017). با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید چندین miRNA که نقش مهمی در تعدیل بیان ژن برای مقابله با تنش شوری و

⁵ Next-generation sequencing

خشکی در جنس براسیکا دارند، شناسایی شده‌اند. به‌عنوان مثال، در *B. juncea* از ۱۲۶ miRNA جدید شناسایی شده، miR164، miR160، و miR156 صورت تجربی تأیید شدند (Bhardwaj et al. 2014). در مطالعه دیگری، (Jian et al. 2016) miRNAهای جدید و حفاظت‌شده را در *B. napus* تحت تنش خشکی و شوری شناسایی کرد. آن‌ها ۸۸۲ miRNA جدید و ۸۵ miRNA شناخته‌شده متعلق به ۳۱ خانواده را شناسایی کردند که از این میان miR172 افزایش بیان داشت، اما miR395، miR156، miR399، miR169، miR171، و miR860 کاهش بیان یافتند (Jian et al. 2016). در *B. oleracea*، Tian et al. (2014) miRNA کاندید احتمالی و ۴۲ miRNA شناخته‌شده احتمالی را در پاسخ به تنش شوری شناسایی کردند. از این میان تحت تنش شوری، miR855، miR393، miR34، miR3، و miR34 کاهش قابل توجهی از خود نشان دادند. درحالی‌که miR37 و miR396a افزایش قابل توجهی را نشان دادند (Tian et al. 2014). microRNAها به‌طور تکاملی در گونه‌های گیاهی حفظ می‌شوند و معمولاً به خانواده‌های تکاملی حفاظت‌شده تعلق دارند. بنابراین، microRNAهای شناسایی‌شده در سایر گونه‌های گیاهی را می‌توان برای مطالعات اولیه و بیوانفورماتیک استفاده کرد (Taghvaei et al. 2022). طی سال‌های اخیر با پیشرفت علم بیوانفورماتیک، ابزارهای متعدد محاسباتی پیشگویی‌کننده هدف برای مولکول‌های microRNA معرفی شده است که با استفاده از الگوریتم‌های خاص خود و بررسی چندین ویژگی، ژن‌های هدف متعددی بر اساس امتیاز در نظر گرفته برای مجموعه مولکول‌های microRNA معرفی می‌کنند (Akhtar et al. 2015). برخی از این ویژگی‌ها شامل الگوی جفت‌شدگی، پایداری ترمودینامیکی هیبرید miRNA-mRNA بر اساس حداقل انرژی آزاد، بررسی حفاظت‌شدگی توالی موردنظر و بررسی حضور چندین جایگاه مکمل در هدف است (Min & Yoon 2010). اطلاعات زیادی در مورد تنظیم بیان ژن در پاسخ به تنش‌های شوری و خشکی در سطح رونویسی وجود دارد. با این حال، اطلاعات کمی در مورد این فرآیند در سطح پس از رونویسی وجود دارد. تنوع و پیچیدگی تنظیم miRNA نشان‌دهنده اهمیت آن‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی است و بسیاری از ماژول‌های تنظیم miRNA می‌توانند یک شبکه تنظیمی پیچیده miRNA-mRNA را تشکیل دهند. بنابراین، تحقیق روی شبکه‌های تنظیم‌کننده-miRNA mRNA می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای درک فرآیندهای بیولوژیکی پیچیده ارائه دهد، که برای مطالعه بیشتر مکانیسم‌های تحمل خشکی و شوری در گیاه از اهمیت بالایی برخوردار است.

مواد و روش‌ها

انتخاب miRNAهای مؤثر در تنش خشکی و شوری: با استفاده از مرور مقالات و پژوهش‌هایی که عمدتاً به کمک تکنیک توالی‌یابی با کارایی بالا انجام گرفته بود، انتخاب microRNAهای مؤثر در تنش خشکی و شوری انجام گرفت (جدول ۱) و پس از آن به کمک پایگاه داده miRBase (<http://mirbase.org/>) توالی‌های آن‌ها دریافت و موردبررسی قرار

⁶ Minimum free energy (MFE)

گرفت (جدول ۲). بر این اساس مولکول‌های microRNA با اسامی bna-miR169, bna-miR171, bna-miR156, bna-miR172, bna-miR399, bna-miR396, bna-miR395, bna-miR393, bna-miR860 به منظور بررسی انتخاب شدند.

جدول ۱. لیست مولکول‌های microRNA انتخابی مرتبط با تنش خشکی و شوری به همراه منابع مورد بررسی قرار گرفته شده

Table 1. The list of selected microRNAs related to drought and salinity stress and their references

miRNAs	گیاهان بررسی شده Plant	نوع تنش stress	منابع references
miR156	<i>Brassica napus</i> <i>Brassica juncea</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Saccharum ssp</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	خشکی و شوری Drought and salt	Barrera-Figueroa et al. 2012; Khraiwesh et al. 2012; Carnavale Bottino et al. 2013; (Bhardwaj et al. 2014; Jian et al. 2016)
miR169	<i>Brassica napus</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Saccharum ssp</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	خشکی و شوری Drought and salt	Barrera-Figueroa et al. 2012; Khraiwesh et al. 2012; Gentile et al. 2015; Akdogan et al. (2016; Jian et al. 2016)
miR171	<i>Brassica napus</i> <i>Saccharum ssp</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	خشکی و شوری Drought and salt	Zhou et al. 2010b; Khraiwesh et al. 2012;) (Gentile et al. 2015; Jian et al. 2016)
miR172	<i>Brassica napus</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Saccharum ssp</i>	خشکی Drought	Zhou et al. 2010b; Gentile et al. 2015; Jian) (et al. 2016)
miR395	<i>Brassica napus</i> <i>Triticum aestivum</i>	خشکی Drought	(Akdogan et al. 2016; Jian et al. 2016)
miR393	<i>Brassica oleracea</i> <i>Brassica napus</i>	شوری salt	(Tian et al. 2014; Jian et al. 2016)
miR396	<i>Brassica oleracea</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	شوری salt	Khraiwesh et al. 2012; Tian et al. 2014;) (Pegler et al. 2021)
miR399	<i>Brassica napus</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	خشکی و شوری Drought and salt	(Baek et al. 2016; Jian et al. 2016)
miR860	<i>Brassica napus</i>	خشکی و شوری Drought and salt	(Jian et al. 2016)

بررسی روابط تکاملی و حفاظت شدگی microRNA مؤثر در تنش خشکی و شوری: به منظور بررسی روابط

تکاملی و حفاظت شدگی microRNA مؤثر در تنش خشکی و شوری در سه گونه *Brassica rapa*، *Brassica napus* و *Brassica oleracea* توالی‌های اولیه و بالغ miRNAهای *Brassica napus* از پایگاه داده miRBase دریافت شد (جدول ۲). به منظور بررسی و شناسایی آن‌ها در دو گونه *Brassica oleracea*، *Brassica rapa* با استفاده از BLASTn در پایگاه داده miRBase با استفاده از توالی miRNAهای بالغ دریافتی انجام شد و توالی‌های مشابه یافت شده برای بررسی روابط تکاملی استفاده شد. سپس هم‌ردیفی چند گانه^۷ توالی‌های اولیه miRNAها با استفاده از نرم‌افزار Unipro UGENE v. 40.1 انجام شد (Okonechnikov et al. 2012) و برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی نرم‌افزار MEGAX (Kumar et al. 2018) با روش اتصال-همسایگی (NJ) و آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار مورد استفاده قرار گرفت (Gupta et al. 2019; Taghvaei et al. 2019).

پیش‌بینی ژن‌های هدف: با استفاده از توالی‌های مربوط به miRNAهای بالغ و به کمک نرم‌افزار آنالین psRNATarget، نسخه ۲۰۱۷ با استفاده از DFCI Gene Index (BNGI, version 5) مربوط به گیاه کلزا، شناسایی ژن‌های هدف با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض، انجام شد (Dai et al. 2018; Mohsenzadeh Golfazani et al. 2022b).

بررسی هستی‌شناسی^۸ و مسیر عملکردی ژن‌های هدف: دسته‌بندی و بررسی هستی‌شناسی ژن‌های هدف با کمک سایت KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) طبق پارامترهای پیش‌فرض انجام گرفت (Huang et al. 2009; Mi et al. 2018).

بررسی برهم‌کنش پروتئین‌ها: به منظور انجام تفسیر و تحلیل جامعی از روابط بین ژن‌های هدف، اطلاعات و شناسه ژنی اهداف پیش‌بینی شده با کمک پایگاه UniProt (<https://www.uniprot.org>) به دست آمده و از این داده‌ها برای بررسی میانکنش‌های ژن‌های هدف و همچنین ترسیم شبکه میانکنش پروتئین‌ها^۹ (PPIs) به کمک پایگاه داده STRING استفاده شد. در این پایگاه به هر تعامل نمرات صفر تا یک داده می‌شود، شاخص حداقل امتیاز متقابل مورد نیاز^{۱۰} به صورت پیش‌فرض روی ۰/۴ تنظیم شد (Szkarczyk et al. 2018; Taghvaei et al. 2022). برای مشخص کردن ژن‌هایی که بیشترین تعامل و برهم‌کنش را با یکدیگر دارند، از ابزار CytoHubba (روش MCC^{۱۱}) در نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳/۸ استفاده شد (Shannon et al. 2003; Mohsenzadeh Golfazani et al. 2022a).

⁷ Multiple Alignment

⁸ Gene Ontology (GO)

⁹ Protein-protein interaction networks

¹⁰ Minimum required interaction score

¹¹ Maximal clique centrality

جدول ۲. توالی های اولیه و بالغ microRNAهای *Brassica napus* مرتبط با تنش خشکی و شوری

Table 2. Primary and mature sequences of *Brassica napus* microRNAs associated with drought and salinity stress

miRNAs	Primary sequences توالی اولیه	توالی بالغ Mature sequences
miR156	<p>bna-MIR156c MI0006484 GGGAGUGAUGCAGGUUGUACAGAAGAUAGAGAGCACUAAGGAUGAC AUGCAAGUACAAGGAUUAAGGAAAUUCAAGAAAGAGAGGAAAAAAGA GCCUGCAUCUUACUCUUUUGUCUCUCUAUACUUCUGUCAAUACCAU AUUUAUUCU bna-MIR156b MI0006481 UAGGUUUGAGAGUGAUGCUGGUUGUUGACAGAAGAUAGAGAGCACUAA GGAUGACAUGCAAGUACAUUGUAUGUAUCAUCACACCGCCUUGGUAU GAUUACAAAAUAAAACCAUUCAAAGAGAGAGAGAGAGAGCCUGCA UGUCUACUCUUUCGUCUCUCUAUACUUCUGACACCACAUUUUUUCU CUUCUUUCUUAACUA bna-MIR156g MI0020263 CGUUGAUAGUGUUGACAGAAGAUAGAGAGCACAGAUAGAGAUGCAA UUUGGAGCAGCUUGUAUGCAUCGUACUCCUUUGUCUCUCUAGUCUUC UGUCAUCACUCGUUACUUG</p>	<p>bna-miR156c MIMAT0005639 UUGACAGAAGAUAG AGAGCAC bna-miR156b MIMAT0005636 UUGACAGAAGAUAG AGAGCAC bna-miR156g MIMAT0023616 UUGACAGAAGAUAG AGAGCAC</p>
miR169	<p>bna-MIR169k MI0006467 AAACGGUGACAUGAAGAAGUAGAGAAGUUGUGUGGUAGCCAAGGAUGACU UGCCUGCGUCUUACACCAUUAUCACAGACUUUAUCGAUAGUCUCUGAGU UGGUUAGGCUGUAGGCAGUCUCCUCGGCUAUUCAGACACUCCUUCUUUC CCUCAUUUC bna-MIR169g MI0006463 GAGAAACGGUGACAUGAAGAAGUAGAGAAGUUGUGUGGUAGCCAAGGAUG ACUUGCCUGCGUCUUUAACACCAUUAUCAAAAGACUUUAUCGAUAGUCUCU GAGUUGGUUAGGCUGUAGGCAGUCUCCUUGGCUAUUCAGACACUCCUC UUUCUCCUCAUUUCACAUUUUC bna-MIR169h MI0006464 GAGAAUUGGUGACAUGAAGAAGUAGAGAAGUUGUGUGGUAGCCAAGGAUG ACUUGCCUGCGUCUUAGACCAUUAUCAAAAGACUAAAAGAUUGAUA GUCUUCGAUGAAUUGGUUAAUCGGUAGGCAGUCUCCUCGGCUAUUCAG ACAGUUCUCUUUCUCCUCAUUUCACAUUUUC bna-MIR169e MI0006461 GUUUCAGGCAGUCUCCUUGGCUAUCUUGACAUCUUUUUCUUCUCCAU UUAUACUUCUUUCUUUGUAUUUUUCGAAUCCAAUUAUUUUUUUUUC UAUAAAUUUACUACGAAAUCUUUAACAACUUCUUAACAAAGUAUGU UAUUAGAAAACUACCACUUUUUGCAUUUAUUACAAGUAGUACGUG GUGAGUGUAUGCAUUCUUUAGAAGGAAUUGUCAAAAGGUGAAUAGAAGA AUCAUUUUGGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUUAUUUCU bna-MIR169a MI0006457 UGUGACCAAGUAGUGUGCAGCCAAGGAUGACUUGCCGAUUUAAAAUA UCUGAUAAAGUAAUUUUAUUUCGUUUUUAAAGAAAAAAUUAUGAUCGG CAAGUUGCCUUGGCUAUUCGUUUUUUGUGUCGCG bna-MIR169i MI0006465 AGAGUCAUGUUUAGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUGCUCUUUUUACCU CCAUGAUUCAUUUUUAGUACAGUUUUGGAUUACUAGCUUCUAAAAGA GUAUAGUAAUUCAAAUCUUGUUAUUUAGUAGGGUAAACAGUUUCAG CGAGUCUCCUUGGCUAUCUUGACAUCUU bna-MIR169f MI0006462 GUCAAAGAUAGAAUAGGAGAAUUCUAAUUUGGUAGCCAAGGAUGACUUGC CUACUUCUUUGCGAAGGAAAUGGUCACGGUGUCAUGUUUGAAAGUGA AUUAUAAUUUAAGAGUAUAUCAUUUAGUGACCAUUUUUGCUAUAUA AAGAUUUAGGCAGUCUCCUUGGCUAUCUUUAUAUGUUCUUCUUUCU AUCUCAGAC bna-MIR169c MI0006459 AGAUGAAUAGAAGAAUCAUAAUUUGGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUAAU UCUUGAGAGUAAAAUUGGCUAGGUUGCAUGUUAAAAAGUUACUUGAUGG AGUUUCAUUUAGACCAUUUUUCUUAACAAAUGAAUUAAGGCAGUCUCCU UGGCUAUCUUUAUAGUUCUUCUCUCUCAUCU bna-MIR169n MI0020276 AGAAUUGCAUGAAGUGGAGUAGAGUAUAAUGCAGCCAAGGAUGACUUG CCGGAGGGUCGUUCAUCAUGCAUAAUAAUUAUUGGUGAUGAACAUAAU CUGGCAAGUUGCCUUCGGCUACAUUUUGCUCUCUUCUACUCAUGCAA CUCUC <bna-MIR169d MI0006460 GAAGGAGAUUGCAAGAUGAAUAGGAGAUUUUCUAAUUUGGUAGCCAAGG AUGACUUGCCUACUUCUUUGCGAAGGAAAUGGUCACGGUGUCAUGU UGAAAGUGAAUUAACAUUUUUAAGAGUAUAUCAUUUAGUGACCAUUUU GCGUAUAAAAGAUAAUAGGCAGUCUCCUUGGCUAUCUUUAUAUGUUC UUCUUUCUCAUCUCAGACAUUUACCUUC bna-MIR169m MI0006469 UAUAUGUAUCAGAGAGUCAUGCAUGGAAAAUAGAGAAUAGAUAAUGAG CCAAAGAUAGACUUGCCGAUUUAACCAAGAAUUUAAAACUGAUAAUGG UGACUGGCAAGUCGACUUUGGCUUCUUUCUUCUUCUUUCUUGAUG UAAGACUCUAGAUACUUAU bna-MIR169j MI0006466 GUGUUUAGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUGCUCUUGUUCACCUCCACGAU UCAACUUUAACGUUGAAGGGUUUGGAUUAUUGUGCAUUAACAUGU AUAAUAAUUUGAAUUAUGUUAUUUGGCUUCUUUGGCUUAGGUUCAGGCA GUCUCCUUGGCUAUUUUGACAU</p>	<p>bna-miR169n MIMAT0023629 CAGCCAAGGAUGAC UUGCCGG bna-miR169b MIMAT0005613 CAGCCAAGGAUGAC UUGCCGA bna-miR169i MIMAT0005620 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169g MIMAT0005618 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169j MIMAT0005621 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169f MIMAT0005617 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUA bna-miR169k MIMAT0005622 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169d MIMAT0005615 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUA bna-miR169e MIMAT0005616 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUA bna-miR169h MIMAT0005619 UAGCCAAGGAUGAC UUGCCUGC bna-miR169a MIMAT0005612 CAGCCAAGGAUGAC UUGCCGA</p>

	<p>bna-MIR169b MI0006458 GUGACCAAGUAGUGGCAGCCAAGGAUGACUUGCCGAUUUGAAAUAU AUUUUUAAAACUUUACUAAGACAUCUUUUCAGUUUCAAAUUUGUCUUG GAGAGGCUAGGAAGAAAUAACAUAUUUUUCGUAUUUAAAAGAAAAA UAUGAUCGGCAAGUUUUCCUUGGCUACAUGUUUUUUGGUCGC bna-MIR169i MI0006468 CAUGGCGAAAAGAGUCGUGUUUAGUAGCCAAGGAUGACUUGCCUGCUC UUGUUCACCCUCCAGAUUCAACUUUUACGUUGAAGGGUUUUGGAUUA UUGUGCAUUCAACUAGUAUAAUAAUUUGAAAUCAUGUUGAAUCUUUGU GGUUUAGGUUUUCAGGCAGUCUCCUUGGCUAUUUUGACAUAUUUUUC AUCCAUG</p>	
miR171	<p>bna-MIR171a MI0006450 UGGUCACAGCGAGAUUUAGUGCGGUUCAAUCAAAUAGUCUCACUCUUA GUUGAUAGAGAUUGAUUUUGUUCGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACGCA UAUAACCA bna-MIR171e MI0006454 CAAUACGAGAUUUUGGUGGUUCAAUACAGAAAACACACUCUUUUGU UGUAGAGAUCCGUUUUGUUUGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACGAG bna-MIR171d MI0006453 ACAAUGCGAGAUUUUGGUGCGGUUCAAUACAGAAAACACACUCUUUUG UUGUAGAGAUCCGUUUUGUUUGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACGAGUGU bna-MIR171b MI0006451 GGUAACGCGAGAUUUAGUGCGGUUCAAUCAAAUAGUCGUGUUCUCAC UUGAUAGAGAUCCGUUUUGUUCGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACGCGU CAACC</p>	<p>bna-miR171c MIMAT0005607 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG bna-miR171a MIMAT0005605 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG bna-miR171e MIMAT0005609 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG bna-miR171b MIMAT0005606 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG bna-miR171d MIMAT0005608 UUGAGCCGUGCCAA UAUCACG</p>
miR172	<p>bna-MIR172d MI0020277 UUUUUGCUAUUGCAUCAUCAAGAUUCAGAAAUCAUUAUCCUUGAU GGUUCUCCUUCGAGCCUGUCUUUUUGGUUUUGAGAAUCUUGAUGAU CUGCAGCGGCGAUUAAA</p>	<p>bna-miR172d MIMAT0023630 AGAAUCUUGAUGAU GCUGCAG</p>
miR395	<p>bna-MIR395f MI0020288 GUCCUCUUGAGUUCUUUUAACGCUUCAUUGUUCAGACUUGGUUGUCU AAUAUCUACCGAUACAACAACGUAUAUGAACACUGAAGUGUUUGGGGGG ACUCUAGGUGGC bna-MIR395d MI0020286 GCCCCAUAGAGUUCUUUUAACGCUUCAUUGUAGAUUACUCCAGUCACAU UUUUUUUUUUAAAUGUUUGGUGCAUUUUUGUAUACAACACUGAAGUG UUUGGGGGGACUCGUGGUGC bna-MIR395e MI0020287 CCCCUUGAGUUCUUUGAAACGCUUCAUUGUUCAUUACGUAGAUGUUUA GUAAAUCAAUUCAUAUGAACACUGAAGUGUUUGGGGGGACUCUAGGUGG</p>	<p>bna-miR395d MIMAT0023639 CUGAAGUGUUUGGG GGGACUC bna-miR395f MIMAT0023641 CUGAAGUGUUUGGG GGGACUC bna-miR395e MIMAT0023640 CUGAAGUGUUUGGG GGGACUC</p>
miR399	<p>bna-MIR399a MI0005774 ACAGGGCAAGAUCUCUAUUGGCAGAAAACCAUUACUUAAGAUCUUUGCA UCUCUUUCUGCAUUGAUUUUGUAGUGAGUUCUCUGCCAAAGGAGAUUUG CCCGGU bna-MIR399b MI0020289 AUUACAGGGCAAGAUCUCUAUUGGCAGGAAACCAUUACUUGACCUUUG CAUCUCUUUAUGCAUUGUUUGUAGUGAGUUCUCUGCCAAAGGAGAUU UGCCCGGUAU bna-MIR399c MI0020290 AUUACAGGGCAAGAUCUUUGGCAGGAAUCCAUAUACUUCAGUCUUA CAUAUGCAUAUAUGUUUGGUGAGCUCUCUGCCAAAGGAGAUUUGUC CGGUAU</p>	<p>bna-miR399b MIMAT0023642 UGCCAAAGGAGAUU UGCCCGG bna-miR399a MIMAT0004449 UGCCAAAGGAGAUU UGCCCGG bna-miR399c MIMAT0023643 UGCCAAAGGAGAUU UGCCCGG</p>
miR396	<p>bna-MIR396a MI0005773 UCCACAGCUUUCUUGAACUUUCUUUUUCAUUUCCUUUAUUUUASAGCG AAAUUAAAUAACUAAAAAUCUCUAAACAUUUAAACACUCUASAAAAAAA AGCUCAAASAAAGCUGUGGA</p>	<p>bna-miR396a MIMAT0004448 UCCACAGCUUUCU UGAACUU</p>
miR393	<p>bna-MIR393 MI0005772 UCCAAAGGGGCAUGCAUUGAUCCUAAUCAAGCUGAGUUUUUCCGAAUA AUUAAUUUUUUUUUUUCUCAUUGGAAAGAUAGAAAAAUAUUUUUGC UUCGUUUUCCGGAUCAUGCAUCUCUUCGGA</p>	<p>bna-miR393 MIMAT0004447 UCCAAAGGGGCAUG CAUUGAU</p>
miR860	<p>bna-MIR860 MI0020292 UGGUCACAGUGUAAUUGUAGUAGUCCAAUCUAUUGAAGUACUAGCACAC CAUCUCUAGUGAGAUUGUUGGUUGAGUAGUCAAUAUCAUUGGACUAC AUAAUUACUUUUGAUCAA</p>	<p>bna-miR860 MIMAT0023645 UCAAUACAUUGGAC UACAUAU</p>

نتایج و بحث

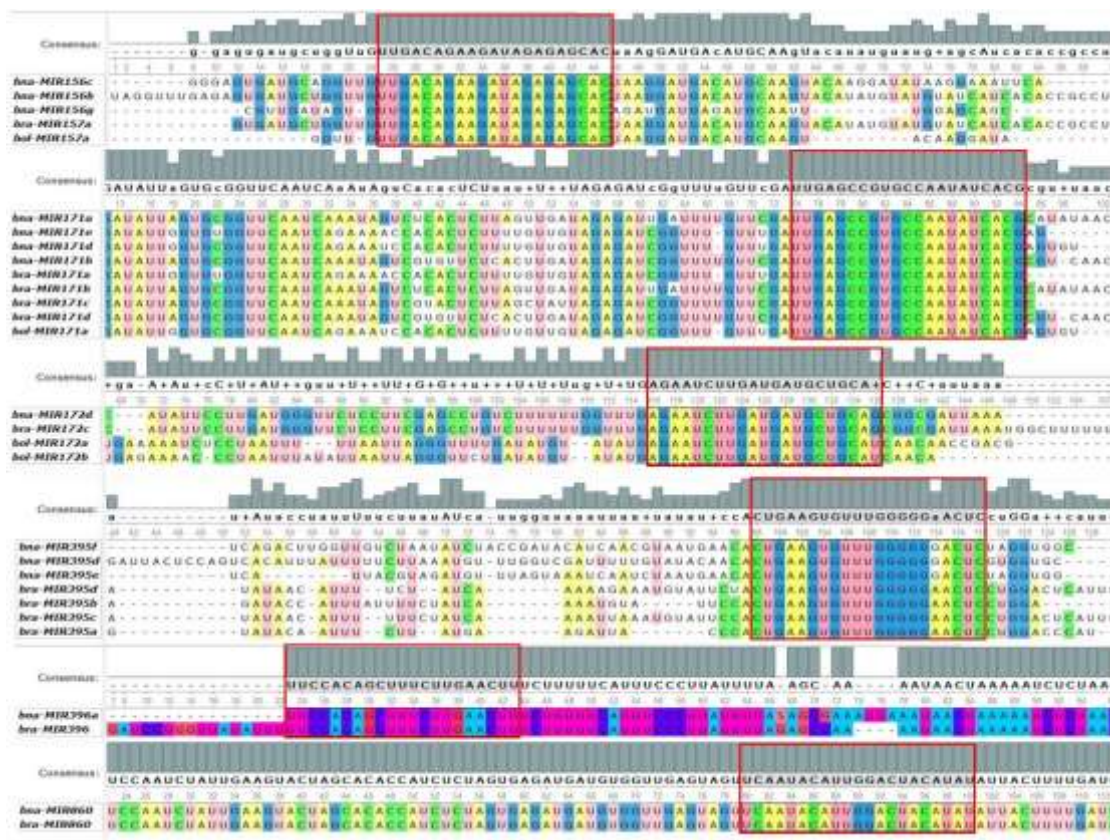
انتخاب، بررسی حفاظت‌شدگی و رسم درخت فیلوژنی **miRNA**ها: در این بخش مولکول‌های microRNA

با اسامی bna-miR156, bna-miR171, bna-miR169, bna-miR860, bna-miR393, bna-miR395, bna-

miR396، bna-miR399، bna-miR172 در گیاه *Brassica napus* مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی‌های تکاملی و کامل‌تر آن دسته از miRNAهای انتخاب شدند که علاوه بر تأثیر در تنش خشکی و شوری در کلزا، دارای همولوگ در گونه‌های اجدادی *Brassica oleracea*، *Brassica rapa* موجود در پایگاه miRBase بودند. بر این اساس BLASTn توالی miRNAهای بالغ در پایگاه miRBase در بین گونه‌های انتخابی صورت گرفت. نتایج نشان داد که برای برخی از miRNAهای بالغ *B. Napus* هیچ توالی مشابهی در دو گونه *B. rapa* و *B. oleracea* وجود نداشت، این miRNAها شامل bna-miR169، bna-miR399، bna-miR393 بود. با این وجود مطالعات گذشته نشان داد که bna-miR393 در تنش شوری در گیاه *Brassica oleracea* دیده شد (Tian et al. 2014) لذا این miRNA از لیست کنار گذاشته نشد. با این حال توالی مختص آن در پایگاه miRBase وجود نداشت. با وجود اینکه خانواده miR156 در گونه *B. rapa* شناسایی شده بود، اما BLASTn توالی بالغ bna-miR156 کلزا تشابه کامل آن را با bra-miR157a و bol-miR157a متعلق به خانواده miR157 در دو گونه *B. rapa* و *B. oleracea* نشان داد. برای خانواده miR171 (miR171a/b/c/d/e) در گونه *B. rapa* bra-miR171a/b/c/d شناسایی شد و در گونه *B. oleracea* فقط نوع bol-miR171a شناسایی شد. بررسی bna-miR395d/e/f نشان‌دهنده تشابه بالایی با bra-miR395a/b/c/d در *B. rapa* بود، ولی هیچ توالی مشابهی در *B. oleracea* یافت نشد. همچنین bna-miR396a با bra-miR396-5p در *B. rapa* تشابه داشت و در *B. oleracea* مشابهتی یافت نشد. با این وجود با توجه به مطالعه گذشته bna-miR396 در تنش شوری در گیاه *Brassica oleracea* دیده شد (Tian et al. 2014). هم‌ردیفی bna-miR172d کلزا با miRNAهای بالغ دو گونه *B. rapa*، *B. oleracea* به ترتیب نشان‌دهنده تشابه با bra-miR172c، bol-miR172a و bol-miR172b بود. بررسی مشابهت bna-miR860 کلزا نیز نشان داد که این miRNA فقط در *B. rapa* دارای توالی مشابه bra-miR860 بود. هم‌ردیفی توالی‌های اولیه miRNAهای مشترک نشان داد که این توالی‌ها در ساختار اولیه خود در برخی موارد بین گونه‌های مورد بررسی دارای تفاوت در نوکلئوتیدهای سازنده بودند، این تفاوت بخصوص در miR393 نمود بیشتری داشت (شکل ۱) و با این وجود نتایج هم‌ردیفی حاکی از حفاظت شدگی بالای ناحیه مؤثر miRNAها داشت. این بخش از توالی در نهایت به صورت miRNA بالغ وارد ساختار کمپلکس RISC^{۱۲} شده و نقش عملکردی برای مهار یا تخریب mRNA هدف خواهد داشت. بنابراین با توجه به نقش عملکردی این بخش از توالی miRNA، حفاظت شدگی بالایی در این ناحیه دیده شد بخصوص در miRNAهای خانواده miR156، miR171، miR396 و miR860 که کاملاً منطبق بر یکدیگر بودند. با این حال در خانواده‌های miR172 و miR395 به ترتیب تفاوت تک نوکلئوتید G با U و G با A مشاهده شد. نکته حائز اهمیت هم‌ردیفی کامل توالی اولیه miR860 در دو گونه

¹² RNA-induced silencing complex

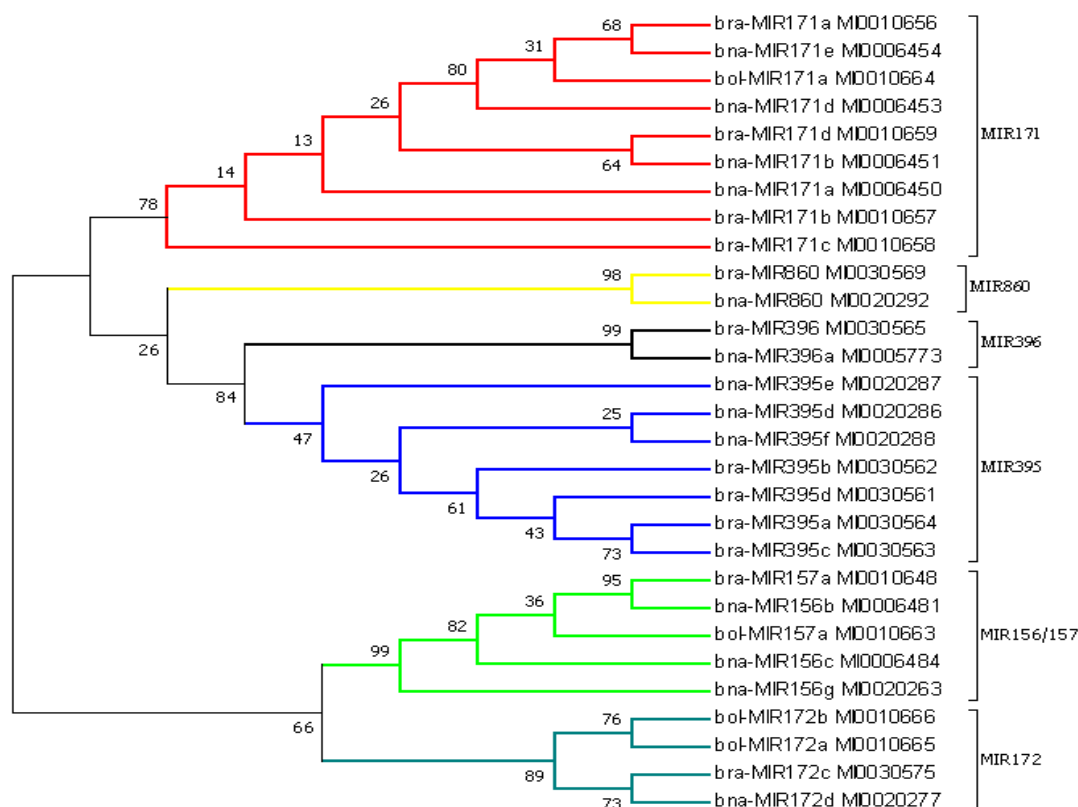
B. napus و *B. rapa* بود که نشان داد حتی در این توالی اولیه نیز حفاظت شدگی به میزان بالای حفظ شده است. برر سی درخت فیلوژنی هم قرابت و حفاظت شدگی این خانواده‌های miRNA را به وضوح نشان داد (شکل ۲).



شکل ۱. هم ردیفی چند گانه توالی های اولیه miRNAها در گیاهان *B. napus*، *B. rapa* و *B. oleracea* با استفاده از افزونه ClustalW در نرم‌افزار Unipro UGENE انجام شد، کادر قرمز نشان‌دهنده توالی حفاظت شده و بخش عملکردی در miRNAهای مورد بررسی است

Figure 1. The multiple alignments of the primary sequence of miRNAs in *B. napus*, *B. rapa*, and *B. oleracea* plants were performed using the ClustalW plugin in Unipro UGENE software. The red box indicates the conserved and functional sequence in the studied miRNAs

با توجه به اینکه کلزا در واقع هر دو دسته کروموزوم‌های *B. rapa* و *B. oleracea* را در خود جای داده این میزان از حفاظت شدگی در توالی‌های miRNA دور از انتظار نبود. همانطور که اشاره شد نقش miRNAهای مورد بررسی در تنش‌های خشکی و شوری در کلزا مشخص شد، از طرفی نقش miR396 و miR393 نیز در گیاه *B. oleracea* مشخص شده بود (Tian et al. 2014). با این وجود، بررسی برای نقش این دسته از miRNAهای مؤثر در تنش خشکی و شوری در گیاه *B. rapa* صورت نگرفته است به احتمال زیاد بررسی این miRNAها می‌تواند آشکار کننده نقش برخی از آنها در تنش خشکی و شوری در گیاه *B. rapa* باشد. این گونه تحقیقات می‌تواند راه‌های سریعتری را برای دستیابی به عناصر مؤثر در تنش‌ها فراهم آورد و از صرف هزینه و وقت زیاد جلوگیری کند.



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی توالی‌های اولیه miRNAهای در گیاهان *B. napus*، *B. rapa* و *B. oleracea* با استفاده از نرم‌افزار MEGAX با روش اتصال-همسایگی و آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار رسم شد
Figure 2. The phylogenetic tree of primary sequences of miRNAs in *B. napus*, *B. rapa*, and *B. oleracea* plants was constructed using MEGAX software with the neighbor-joining method and bootstrap test with 1000 replications

شناسایی ژن‌های هدف: شناسایی اهداف مولکول‌های microRNA و فرآیندهای بیولوژیکی که این اهداف در آن‌ها

شرکت دارد می‌تواند هر چه بیشتر آشکار کننده نقش تنظیمی miRNAها باشد. لذا به‌عنوان اولین قدم شناسایی این اهداف و دسته بندی و بررسی مسیر عملکردی آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. اتصال بین miRNA و mRNA هدف، نوع عملکرد آن را تعیین می‌کند بنابراین؛ امکان شناسایی این ژن‌ها با استفاده از جستجوی مبتنی بر همولوژی وجود دارد (Jones-Rhoades & Bartel 2007; Sunkar & Zhu 2004). در واقع، اتصال کامل‌تر منجر به برش^{۱۳} mRNA هدف و اتصال ناقص باعث مهار ترجمه^{۱۴} می‌شود (Liu et al. 2014). یکی از عواملی که می‌تواند میزان جفت شدگی بین miRNA و mRNA هدف را نشان دهد سطح انتظار^{۱۵} است، هر چه این مقدار عدد کمتری باشد نشان‌دهنده اتصالات بیشتر و کاملتری خواهد بود.

¹³ Cleavage
¹⁴ Translation
¹⁵ Expectation

bna-miR156: در نتیجه این بررسی ۴۸ ژن هدف برای bna-miR156 شناسایی شد (جدول ۳)، که از این تعداد

پنج ژن از طریق مکانیزم مهار ترجمه و ۴۳ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR156 کمترین سطح انتظار

با مقدار ۱/۵ متعلق به ژن‌های (SPL10) squamosa promoter binding protein-like 10، squamosa promoter

(SPL2) binding protein-like 2، (SPL15) squamosa promoter binding protein-like 15، بود.

جدول ۳. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR156 به کمک نرم‌افزار psRNATarget

Table 3. Target gene identified for bna-miR156 using psRNATarget

miRNA_Acc	Target_Acc.	Expectation	Target_start	Target_end	Inhibition	Gene names
bna-miR156c	TC200337	1.5	1168	1188	Cleavage	SPL10
bna-miR156c	TC210178	1.5	1108	1128	Cleavage	SPL2
bna-miR156c	CX189447	1.5	290	310	Cleavage	SPL15
bna-miR156c	TC197337	2.5	429	449	Cleavage	SPL13B
bna-miR156c	TC163178	2.5	84	104	Cleavage	aap1
bna-miR156c	TC201789	2.5	51	71	Translation	PSB28
bna-miR156c	TC173904	3	687	707	Cleavage	SC35
bna-miR156c	TC177533	3	505	525	Cleavage	SPL3
bna-miR156c	TC209054	3	118	138	Cleavage	VPS28-1
bna-miR156c	TC198942	3.5	274	294	Cleavage	ATJ8
bna-miR156c	TC182301	3.5	1029	1049	Cleavage	AL4
bna-miR156c	GR444442	3.5	16	36	Cleavage	MSH2
bna-miR156c	TC178093	3.5	554	574	Cleavage	RPPIC
bna-miR156c	TC209692	3.5	10	30	Cleavage	CCX3
bna-miR156c	TC169034	3.5	634	654	Cleavage	SPL3
bna-miR156c	DW999514	3.5	44	64	Cleavage	At1g48330
bna-miR156c	TC193647	3.5	1000	1020	Cleavage	RPN11
bna-miR156c	TC175666	3.5	879	899	Cleavage	SGPP
bna-miR156c	TC176166	3.5	98	118	Cleavage	At2g45990
bna-miR156c	TC166520	3.5	692	712	Cleavage	MCD7.8
bna-miR156c	TC193661	3.5	1182	1202	Cleavage	NEK3
bna-miR156c	DW998491	3.5	651	671	Translation	At5g43440
bna-miR156c	TC165577	4	1237	1257	Cleavage	ADH2
bna-miR156c	TC171289	4	787	807	Cleavage	RH26
bna-miR156c	TC195178	4	289	309	Cleavage	RH25
bna-miR156c	TC163889	4	751	771	Cleavage	VHA-c5
bna-miR156c	TC183113	4	1345	1365	Cleavage	RPS17D
bna-miR156c	TC189091	4	430	450	Cleavage	At3g18410
bna-miR156c	CX188322	4	594	614	Cleavage	IP5P6
bna-miR156c	TC179878	4	436	456	Cleavage	At3g18410
bna-miR156c	TC162866	4	2103	2123	Cleavage	HSP70-1
bna-miR156c	TC213502	4	842	862	Translation	PES
bna-miR156c	TC172623	4	91	111	Translation	NCER2
bna-miR156c	TC180759	4	65	85	Cleavage	CID9
bna-miR156c	TC171695	4	37	57	Cleavage	SSL12
bna-miR156c	TC195611	4	52	72	Cleavage	PYD1
bna-miR156c	TC166315	4	995	1015	Cleavage	CWLP
bna-miR156c	TC172188	4	54	74	Cleavage	ATL52
bna-miR156c	TC194111	4	460	480	Translation	At5g44005
bna-miR156c	TC211365	4	207	227	Cleavage	TOPP4
bna-miR156c	TC183876	4	1376	1396	Cleavage	ABI1
bna-miR156c	TC167642	4	870	890	Cleavage	SGPP
bna-miR156c	TC196356	4	25	45	Cleavage	GATA18
bna-miR156c	TC191133	4	151	171	Cleavage	RABA1C
bna-miR156c	ES998325	4	163	183	Cleavage	At1g49180
bna-miR156c	ES905761	4	121	141	Cleavage	FBL3
bna-miR156c	TC175661	4	513	533	Cleavage	POLD4
bna-miR156c	TC178589	4	405	425	Cleavage	At5g07960

بررسی منابع نشان داد که ژن هدف SPL10 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: شکل دهی برگ^{۱۶}، تنظیم منفی فرآیند متابولیک اکسین^{۱۷}، تنظیم زمان گذار از مرحله رویشی به زایشی، تنظیم رونویسی نقش داشت. همچنین ژن هدف SPL2 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: نمو بساک^{۱۸}، تنظیم منفی فرآیند متابولیک اکسین، تنظیم زمان گذار از مرحله رویشی به زایشی، تنظیم رونویسی نقش داشت. ژن هدف SPL15 نیز در فرآیندهای نمو بساک، تنظیم تکثیر جمعیت سلولی^{۱۹}، تنظیم اندازه سلول، تنظیم رونویسی، اثرگذار بود (Riechmann et al. 2000; Shikata et al. 2009; Xing et al. 2010; Ye et al. 2020).

bna-miR171: ۱۵ ژن هدف برای bna-miR171 شناسایی شد (جدول ۴)، که از این تعداد چهار ژن از طریق مکانیزم

مهار ترجمه و ۱۱ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR171 کمترین سطح انتظار با مقدار دو متعلق به ژن‌های Scarecrow-like protein 15 (SCL15)، Scarecrow-like protein 6 (SCL6) بود. ژن هدف SCL15 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: تمایز سلولی^{۲۰}، تنظیم رونویسی و ژن هدف SCL6 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: تمایز سلولی، تقسیم سلولی، ریتم شبانه روز، تنظیم رونویسی اثرگذار بودند (Engstrom et al. 2011; Gaudet et al. 2011; Li et al. 2011).

جدول ۴. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR171 به کمک نرم افزار psRNATarget

Table 4. Target gene identified for bna-miR171 using psRNATarget

miRNA_Acc.	Target_Acc.	Expectation	Target_start	Target_end	Inhibition	Gene names
bna-miR171c	TC191279	2	598	618	Translation	SCL15
bna-miR171c	TC195562	2	831	851	Cleavage	SCL6
bna-miR171c	TC194761	4	563	583	Cleavage	CIPK5
bna-miR171c	TC167577	4	810	830	Cleavage	CDKG1
bna-miR171c	TC179460	4	465	485	Cleavage	GTE5
bna-miR171c	TC197116	4	223	243	Translation	DALL4
bna-miR171c	CN829556	4	123	143	Translation	MRF3
bna-miR171c	TC172757	4	247	267	Translation	MCD1
bna-miR171c	TC199491	4	541	561	Cleavage	POT4
bna-miR171c	EE409212	4	211	231	Cleavage	At2g15560
bna-miR171c	EV083949	4	151	171	Cleavage	LPAT3
bna-miR171c	TC202894	4	405	425	Cleavage	MAB16.4
bna-miR171c	TC168689	4	686	706	Cleavage	NIFS1
bna-miR171c	TC201185	4	1418	1438	Cleavage	At3g06270
bna-miR171c	TC197122	4	1070	1090	Cleavage	At5g54780

bna-miR172: در نتیجه این بررسی ۴۰ ژن هدف برای bna-miR172 شناسایی شد (جدول ۵)، که از این تعداد دو

ژن از طریق مکانیزم مهار ترجمه و ۳۸ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR172 کمترین سطح انتظار با

¹⁶ leaf shaping

¹⁷ Negative regulation of auxin metabolic process

¹⁸ Anther development

¹⁹ Regulation of cell population proliferation

²⁰ Cell differentiation

مقدار ۵/۰ متعلق به ژن‌های (TOE2) AP2-like ethylene-responsive transcription factor. Floral homeotic protein. AP2 (AP2) APETALA 2 (AP2)، Ethylene-responsive transcription factor (RAP2-7) بود. بررسی منابع نشان داد که ژن هدف AP2 در فرآیندهای بیولوژیکی شامل: تمایز سلولی، رشد گل، نگهداری مریستم، نمو تخمک گیاهی، نمو بذر، تعیین هویت اندام گل شرکت دارد. همچنین ژن‌های TOE2 و RAP2-7 در مسیر سیگنالینگ فعال شده با اتیلن^{۲۱} دخیل هستند (Kunst et al. 1989; Jofuku et al. 1994; Jofuku et al. 2005; Würschum et al. 2006; Huang et al. 2013).

جدول ۵. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR172 به کمک نرم افزار psRNATarget

Table 5. Target gene identified for bna-miR172 using psRNATarget

miRNA_Acc.	Target_Acc.	Expectation	Target_start	Target_end	Inhibition	Gene names
bna-miR172d	TC195815	0.5	314	334	Cleavage	AP2
bna-miR172d	DY020927	0.5	440	460	Cleavage	TOE2
bna-miR172d	TC192206	0.5	618	638	Cleavage	RAP2-7
bna-miR172d	TC184340	1.5	833	853	Cleavage	SMZ
bna-miR172d	TC206341	1.5	156	176	Cleavage	RCA
bna-miR172d	GR450692	2	205	225	Cleavage	SULTR1;3
bna-miR172d	TC178706	2.5	591	611	Cleavage	HSD3
bna-miR172d	EE481041	2.5	285	305	Cleavage	TRF-like 5
bna-miR172d	TC171490	3	90	110	Cleavage	LIP1
bna-miR172d	ES903597	3	671	691	Translation	SMXL3
bna-miR172d	TC161981	3.5	167	187	Cleavage	CNGC1
bna-miR172d	TC185148	3.5	117	137	Cleavage	RKS1
bna-miR172d	TC206849	3.5	501	521	Cleavage	CRK24
bna-miR172d	TC205639	3.5	293	313	Cleavage	SPA3
bna-miR172d	EV163824	3.5	260	280	Cleavage	ABC6
bna-miR172d	FG564604	3.5	222	242	Cleavage	At5g25330
bna-miR172d	TC199033	3.5	1253	1273	Translation	At2g03510
bna-miR172d	TC168318	3.5	720	740	Cleavage	TA1
bna-miR172d	TC172909	3.5	1007	1027	Cleavage	RPT1A
bna-miR172d	CN730332	3.5	82	102	Cleavage	At2g33847
bna-miR172d	EV188001	3.5	561	581	Cleavage	COL13
bna-miR172d	TC176478	3.5	139	159	Cleavage	RPL9D
bna-miR172d	DY025345	3.5	522	542	Cleavage	VAT1
bna-miR172d	EL626840	3.5	118	138	Cleavage	LIP1
bna-miR172d	TC212778	3.5	277	297	Cleavage	XBAT31
bna-miR172d	CN729904	4	248	268	Cleavage	ACA2
bna-miR172d	TC204762	4	628	648	Cleavage	SHA1
bna-miR172d	TC163985	4	1062	1082	Cleavage	HO1
bna-miR172d	TC201376	4	356	376	Cleavage	CYTB5-E
bna-miR172d	EE436169	4	601	621	Cleavage	DTX19
bna-miR172d	TC176438	4	949	969	Cleavage	At5g43190
bna-miR172d	TC173017	4	205	225	Cleavage	CKA2
bna-miR172d	TC193129	4	68	88	Cleavage	At5g60615
bna-miR172d	TC162435	4	750	770	Cleavage	At2g30170
bna-miR172d	EE508972	4	281	301	Cleavage	At3g13882
bna-miR172d	TC190823	4	282	302	Cleavage	PILS5
bna-miR172d	ES900502	4	483	503	Cleavage	PUB6
bna-miR172d	TC190716	4	249	269	Cleavage	At3g02880
bna-miR172d	TC190395	4	702	722	Cleavage	TFIIIA

²¹ Ethylene-activated signaling pathway

bna-miR393: برای bna-miR393. ۲۱ ژن هدف شناسایی شد (جدول ۶)، که از این تعداد دو ژن از طریق مکانیزم

مهار ترجمه و ۱۹ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR393 کمترین سطح انتظار با مقدار یک متعلق به ژن هدف 3 Auxin signaling F-box 3 (AFB3) بود. این ژن در فرآیندهای بیولوژیکی زیادی از جمله: مسیر سیگنالینگ فعال شده با اکسین، پاسخ سلولی به نیترات، پاسخ دفاعی، توسعه ریشه جانبی، بلوغ گرده، نمو ریشه اولیه، یوبی کوئیتیناسیون پروتئین^{۲۲}، نمو پرچم دخیل است (Cecchetti et al. 2008; Vidal et al. 2010).

جدول ۶. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR393 به کمک نرم افزار psRNA Target

Table 6. Target gene identified for bna-miR393 using psRNA Target

miRNA_Acc.	Target_Acc.	Expectation	Target_start	Target_end	Inhibition	Gene names
bna-miR393	TC175423	1	1093	1113	Cleavage	AFB3
bna-miR393	TC180163	1.5	762	782	Cleavage	TIR1
bna-miR393	TC176250	2.5	236	256	Cleavage	BHLH77
bna-miR393	TC181533	2.5	920	940	Cleavage	GRHI
bna-miR393	TC178553	3	877	897	Cleavage	PBL7
bna-miR393	GR448850	3	279	299	Cleavage	At4g27130
bna-miR393	TC189968	3.5	1299	1319	Cleavage	PSAT1
bna-miR393	CD825577	3.5	133	153	Cleavage	CDS1
bna-miR393	TC169101	3.5	729	749	Cleavage	THI1
bna-miR393	ES922859	3.5	117	137	Cleavage	At1g30440
bna-miR393	CD836704	3.5	205	225	Cleavage	DXPS3
bna-miR393	TC193588	4	1217	1238	Cleavage	A36
bna-miR393	TC177542	4	331	351	Translation	CYCA3-2
bna-miR393	DY013027	4	587	607	Cleavage	SGS3
bna-miR393	TC208184	4	198	220	Cleavage	At4g31790
bna-miR393	TC189722	4	198	218	Cleavage	PGD2
bna-miR393	TC167611	4	657	677	Cleavage	LHCB5
bna-miR393	TC203655	4	432	452	Cleavage	At3g25545
bna-miR393	EL623319	4	56	76	Cleavage	At1g20430
bna-miR393	TC213130	4	1231	1251	Translation	PYD3
bna-miR393	EE468726	4	57	77	Cleavage	RPS15AA

bna-miR395: ۳۵ ژن هدف برای bna-miR156 شناسایی شد (جدول ۷)، که از این تعداد دو ژن از طریق مکانیزم

مهار ترجمه و ۳۳ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR395 کمترین سطح انتظار با مقدار دو متعلق به ژن‌های ATP sulfurylase 4 (APS4)، Sulfate transporter 2.1 (SULTR2;1)، Sm-like protein LSM2 (LSM2) بود. از لحاظ فرآیندهای بیولوژیکی ژن APS4 در فرآیند بیوسنتز سولفید هیدروژن، اسمیلاسیون سولفات مؤثر است (Gaudet et al. 2011). ژن SULTR2;1 نیز در انتقال غشایی سولفات و ژن LSM2 در اسپیلیسینگ mRNA نقش دارند (Takahashi et al. 2000; Gaudet et al. 2011).

²² Protein ubiquitination

جدول ۷. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR395 به کمک نرم افزار psRNA Target

Table 7. Target gene identified for bna-miR395 using psRNA Target

miRNA_Acc.	Target_Acc.	Expectation	Target_start	Target_end	Inhibition	Gene names
bna-miR395d	TC161837	2	395	415	Cleavage	APS4
bna-miR395d	TC196344	2	110	130	Cleavage	SULTR2;1
bna-miR395d	TC194625	2	153	173	Cleavage	LSM2
bna-miR395d	EE505105	3	26	46	Cleavage	ERF5
bna-miR395d	TC164712	3	161	181	Cleavage	AOC1
bna-miR395d	TC210033	3	29	49	Cleavage	IAA16
bna-miR395d	TC167317	4	358	378	Cleavage	APS1
bna-miR395d	TC212796	4	76	96	Cleavage	HSFA1A
bna-miR395d	TC166732	4	731	751	Cleavage	DAN1
bna-miR395d	TC170860	4	381	401	Cleavage	UBP14
bna-miR395d	TC181206	4	451	471	Cleavage	At5g07670
bna-miR395d	TC163140	4	13	33	Cleavage	At5g45880
bna-miR395d	TC164950	4	1062	1082	Cleavage	FRO5
bna-miR395d	EL622706	4	327	347	Cleavage	PER66
bna-miR395d	TC195097	4	419	439	Cleavage	APS3
bna-miR395d	TC174114	4	13	33	Cleavage	GWD1
bna-miR395d	FG578632	4	282	302	Cleavage	HSFA1E
bna-miR395d	EE432116	4	252	272	Cleavage	SULTR1;2
bna-miR395d	FG562207	4	428	448	Cleavage	At1g27030
bna-miR395d	EV196300	4	400	420	Cleavage	At5g39980
bna-miR395d	TC207631	4	580	600	Cleavage	SUR1
bna-miR395d	EV158747	4	9	29	Cleavage	SPL
bna-miR395d	EE463322	4	593	613	Cleavage	PBL7
bna-miR395d	TC193450	4	325	345	Cleavage	At3g43583
bna-miR395d	TC169359	4	415	435	Cleavage	LTPG5
bna-miR395d	TC214178	4	895	915	Translation	HHO2
bna-miR395d	TC178967	4	433	453	Cleavage	HSFB1
bna-miR395d	TC170043	4	861	881	Cleavage	BHLH128
bna-miR395d	TC177707	4	857	877	Translation	HHO2
bna-miR395d	TC173035	4	580	600	Cleavage	HSFB2B
bna-miR395d	TC206782	4	1644	1664	Cleavage	At5g44680
bna-miR395d	EL590625	4	396	416	Cleavage	ILL3
bna-miR395d	TC210886	4	209	229	Cleavage	WOX9
bna-miR395d	TC212205	4	429	449	Cleavage	G6PD2
bna-miR395d	TC201952	4	332	352	Cleavage	At1g19860

bna-miR396: بر اساس نتایج ۶۱ ژن هدف برای bna-miR396 شناسایی شد (جدول ۸)، که از این تعداد سه ژن

از طریق مکانیزم مهار ترجمه و ۵۸ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای bna-miR396 کمترین سطح انتظار با مقدار دو متعلق به ژن‌های *Malate synthase (MLS)* *Atypical CYS HIS rich thioredoxin 5 (Acht5)* بود. این طور به نظر می‌رسد دو ژن *MLS* و *Acht5* در فرآیندهای نظیر انتقال الکترون، چرخه گلی اکسیلات، چرخه تری کربوکسیلیک اسید نقش داشته باشند (Gaudet et al. 2011).

bna-miR860: برای bna-miR860، ۱۵ ژن هدف شناسایی شد (جدول ۹)، که از این تعداد دو ژن از طریق مکانیزم

مهار ترجمه و ۱۳ ژن از طریق مکانیزم برش تنظیم می‌شوند. برای این microRNA کمترین سطح انتظار با مقدار ۱/۵ متعلق به ژن *Ferrochelatase-1 (FC1)* بود. این ژن در فرآیندهای بیولوژیکی از جمله فرآیند بیوسنتز هم، پاسخ به تنش اکسیداتیو، نقش دارد (Nagai et al. 2007).

جدول ۸. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR396 به کمک نرم افزار psRNA Target

Table 8. Target gene identified for bna-miR396 using psRNA Target

miRNA_Acc.	Target_Acc.	Expectation	Target_start	Target_end	Inhibition	Gene names
bna-miR396a	TC187500	2	513	533	Cleavage	ACHT5
bna-miR396a	EV034616	2	81	101	Cleavage	MLS
bna-miR396a	TC170340	2.5	643	663	Cleavage	At2g29340
bna-miR396a	TC177516	2.5	900	920	Cleavage	At1g75510
bna-miR396a	TC183331	2.5	522	542	Cleavage	ATG10
bna-miR396a	TC189970	2.5	931	951	Cleavage	RH3
bna-miR396a	TC177014	2.5	1457	1477	Cleavage	DEGP1
bna-miR396a	TC181583	2.5	675	695	Cleavage	CAC3
bna-miR396a	TC200332	2.5	699	719	Cleavage	AGL24
bna-miR396a	TC171496	3	719	739	Translation	FLU
bna-miR396a	TC187395	3	545	566	Cleavage	GRF9
bna-miR396a	EL588114	3	508	528	Cleavage	SRM1
bna-miR396a	EE557600	3	252	273	Cleavage	GRF4
bna-miR396a	CX278866	3	511	531	Cleavage	TIM50
bna-miR396a	TC196487	3	785	806	Cleavage	GRF2
bna-miR396a	TC181676	3	483	503	Cleavage	HEMA1
bna-miR396a	TC179132	3	635	656	Cleavage	GRF7
bna-miR396a	TC177807	3	610	631	Cleavage	GRF4
bna-miR396a	DV643325	3	158	178	Cleavage	CEP14
bna-miR396a	TC173822	3	334	354	Cleavage	At4g32590
bna-miR396a	GR463390	3	387	407	Cleavage	UBC25
bna-miR396a	DW997496	3	543	563	Cleavage	HSP90-4
bna-miR396a	EL625432	3	203	223	Cleavage	UBP5
bna-miR396a	TC188123	3	425	445	Cleavage	HSP90-2
bna-miR396a	TC213959	3	994	1014	Cleavage	At1g07310
bna-miR396a	TC198128	3	845	865	Cleavage	At1g07990
bna-miR396a	TC213531	3	387	407	Cleavage	MNJ7.25
bna-miR396a	TC191005	3.5	769	789	Cleavage	STR7
bna-miR396a	EL623951	3.5	653	673	Cleavage	LAP3
bna-miR396a	TC189021	3.5	474	494	Cleavage	XBPC3
bna-miR396a	EE553181	3.5	181	201	Cleavage	SINAT2
bna-miR396a	TC188333	3.5	740	760	Cleavage	4CL4
bna-miR396a	TC209102	3.5	770	790	Cleavage	NPF8.3
bna-miR396a	EV078031	3.5	279	299	Cleavage	BIO1
bna-miR396a	TC165833	3.5	691	711	Cleavage	BAG4
bna-miR396a	TC195066	3.5	599	619	Cleavage	AT4g29040
bna-miR396a	EE426459	3.5	145	165	Cleavage	BHLH74
bna-miR396a	TC162813	3.5	523	543	Cleavage	RD21C
bna-miR396a	TC171464	3.5	22	42	Cleavage	RPT4A
bna-miR396a	TC164713	3.5	411	431	Cleavage	RAP2-2
bna-miR396a	TC169703	3.5	39	59	Cleavage	LUP1
bna-miR396a	TC167449	3.5	1387	1407	Cleavage	BGLU44
bna-miR396a	FG572766	3.5	15	35	Cleavage	RS31
bna-miR396a	TC168895	4	676	696	Cleavage	At5g61440
bna-miR396a	EE425761	4	202	222	Cleavage	ASA2
bna-miR396a	EE430620	4	430	450	Cleavage	SR34A
bna-miR396a	TC169694	4	353	373	Cleavage	BGAL4
bna-miR396a	EE463642	4	498	518	Cleavage	At3g19370
bna-miR396a	TC181006	4	785	805	Translation	SBE2.1
bna-miR396a	FG574661	4	413	433	Cleavage	CPI
bna-miR396a	TC176910	4	406	426	Cleavage	At3g01660
bna-miR396a	TC170128	4	497	517	Cleavage	RD21A
bna-miR396a	TC168631	4	247	267	Cleavage	MFP1
bna-miR396a	TC199637	4	134	153	Translation	RABG3B
bna-miR396a	TC209595	4	496	516	Cleavage	RD21B
bna-miR396a	EV120573	4	445	465	Cleavage	MS1
bna-miR396a	EE428719	4	374	394	Cleavage	RPL18C
bna-miR396a	TC203440	4	581	601	Cleavage	At5g27330
bna-miR396a	FG557805	4	362	382	Cleavage	TPR14
bna-miR396a	TC174733	4	305	325	Cleavage	F24G24.70
bna-miR396a	TC190025	4	561	581	Cleavage	CHI3

جدول ۹. ژن هدف شناسایی شده برای bna-miR860 به کمک نرم افزار psRNA Target

Table 9. Target gene identified for bna-miR156 using psRNA Target

miRNA_Acc.	Target_Acc.	Expectation	Target_start	Target_end	Inhibition	Gene names
bna-miR860	TC167118	1.5	1642	1662	Cleavage	FC1
bna-miR860	TC188635	3	1143	1163	Cleavage	ENO1
bna-miR860	TC172219	3	1199	1219	Cleavage	RPS11C
bna-miR860	TC212133	3	392	412	Cleavage	At5g06400
bna-miR860	TC191881	3	631	651	Cleavage	IQD22
bna-miR860	CX279675	3	452	472	Cleavage	UGE1
bna-miR860	TC197230	3	462	482	Translation	CML28
bna-miR860	TC175260	3.5	534	553	Cleavage	At5g03795
bna-miR860	TC211326	3.5	758	778	Cleavage	At5g55840
bna-miR860	TC190350	4	1288	1308	Cleavage	At4g11680
bna-miR860	GR438961	4	491	511	Translation	T20H2.24
bna-miR860	TC205632	4	824	844	Cleavage	UBC37
bna-miR860	TC177133	4	1176	1196	Cleavage	MPA22.8
bna-miR860	TC202599	4	470	490	Cleavage	At5g08670
bna-miR860	TC188682	4	539	559	Cleavage	SUVH3

هستی شناسی ژن های هدف: در بررسی هستی شناسی ژن های هدف پیش بینی شده را به اجزای سلولی، فرآیندهای

بیولوژیکی و عملکرد مولکولی طبقه بندی می کنند (Balakrishnan et al. 2013). بر این اساس، در فرآیندهای بیولوژیکی

بیشترین فراوانی شامل «فرآیندهای سلولی»، «فرآیندهای متابولیک»، «تنظیم بیولوژیکی» و «پاسخ به محرکها» بود. در میان

اجزای سلولی، بیشترین فراوانی مرتبط با «آناتومی سلول»، «درون سلولی» و «کمپلکس پروتئینی» بود. همچنین در مورد

عملکردهای مولکولی، «فعالیت کاتالیزوری»، «اتصال» و «تنظیم کننده عملکرد مولکولی»، بیشترین فراوانی را داشتند. در جدول

یک جزئیات مربوط به بررسی هستی شناسی ژن های هدف به همراه شماره دسترسی GO آن ها آورده شده است و نمودار دایره

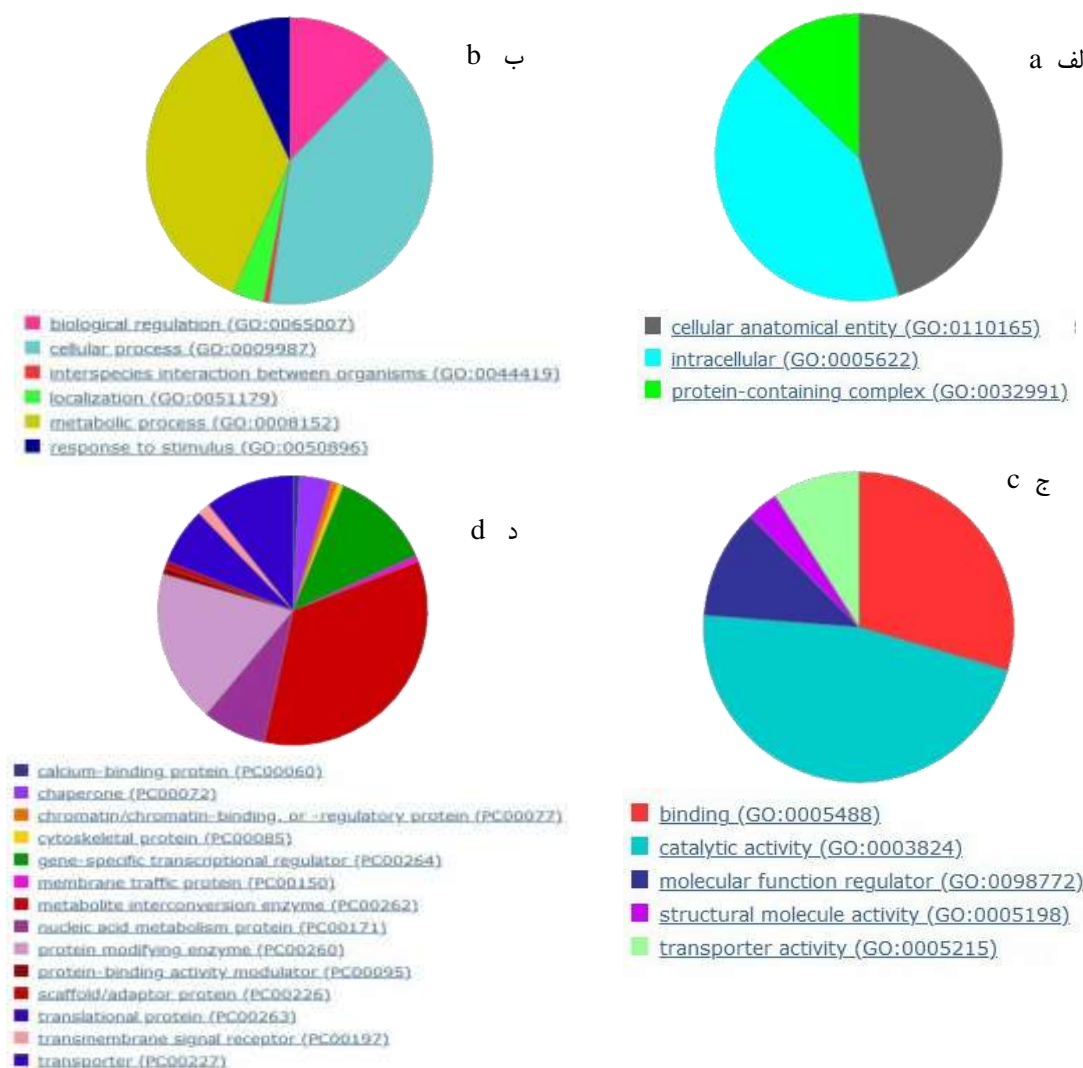
آن ها در شکل سه رسم شده است (شکل ۳، جدول ۱۰).

جدول ۱۰. هستی شناسی ژن های هدف با استفاده از سیستم PANTHER (p-value < 0.05 FDR)

Table 10. Ontology of target genes using PANTHER system (p-value <0.05 FDR)

Category name (Accession)	Genes Count	Percentage
فرآیندهای بیولوژیکی (Biological Process)		
cellular process (GO:0009987)	69	40.10%
metabolic process (GO:0008152)	63	36.60%
biological regulation (GO:0065007)	21	12.20%
response to stimulus (GO:0050896)	12	7.00%
localization (GO:0051179)	6	3.50%
interspecies interaction between organisms (GO:0044419)	1	0.60%
اجزای سلولی (Cellular Component)		
cellular anatomical entity (GO:0110165)	86	45.50%
intracellular (GO:0005622)	79	41.80%
protein-containing complex (GO:0032991)	24	12.70%
عملکرد مولکولی (Molecular Function)		
catalytic activity (GO:0003824)	57	46.70%
binding (GO:0005488)	36	29.50%
molecular function regulator (GO:0098772)	14	11.50%
transporter activity (GO:0005215)	11	9.00%
structural molecule activity (GO:0005198)	4	3.30%

همچنین طبقه بندی ژن‌های هدف بر اساس نوع پروتئین نیز صورت گرفت، براساس آن، بیش‌ترین دسته از پروتئین‌ها مربوط به «آنزیم‌های تبدیل‌کننده متابولیت‌ها»^{۲۳}، «آنزیم اصلاح‌کننده پروتئین»^{۲۴} و «تنظیم‌کننده رونویسی مختص ژن»^{۲۵} بود. در جدول ۱۱ جزئیات مربوط به طبقه‌بندی ژن‌های هدف بر اساس نوع پروتئین به همراه شماره دسترسی آن‌ها آورده شده است و نمودار دایره آن‌ها در شکل ۳ آمده است.



شکل ۳. نمودار دایره‌ای هستی‌شناسی و طبقه‌بندی پروتئینی ژن‌های هدف با استفاده از سیستم PANTHER: (الف) اجزای سلولی، (ب) فرآیندهای بیولوژیکی، (ج) عملکرد مولکولی، (د) طبقه‌بندی پروتئینی

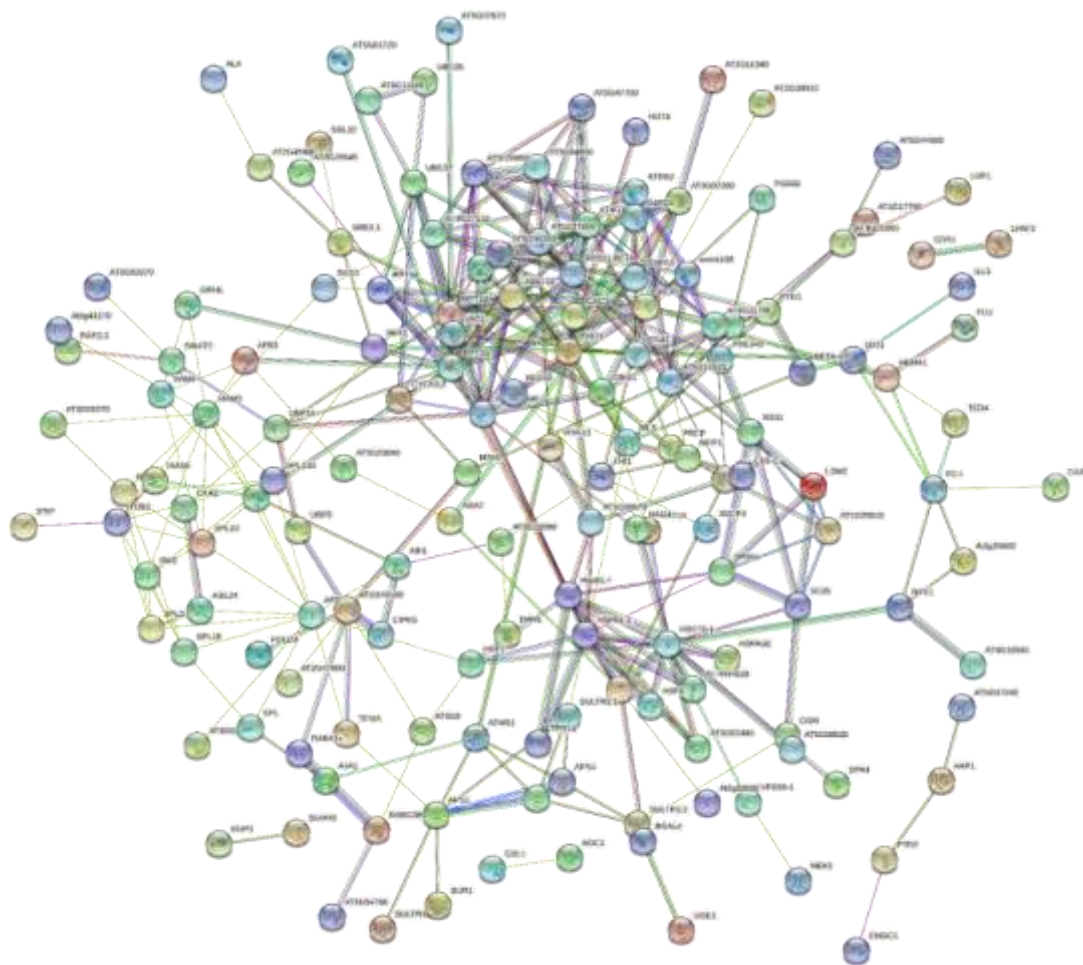
Figure 3. Circular diagram of GO and protein classification of target genes using PANTHER: a) cellular components, b) biological processes, c) molecular function, d) protein classification

²³ Metabolite interconversion enzyme

²⁴ Protein modifying enzyme

²⁵ Gene-specific transcriptional regulator

برهم کنش‌های پروتئینی: برای بررسی برهم کنش‌های پروتئینی از پلات فرم STRING استفاده شد که در آن گره‌ها^{۲۶} نمایانگر پروتئین‌ها هستند و اتصالات (لبه^{۲۷}) تعاملات شناخته شده یا پیش‌بینی شده، مستقیم و غیرمستقیم آن‌ها را نشان می‌دهند. در واقع، ارتباط بین گره‌های پروتئینی مبتنی بر اطلاعات موجود استخراج شده از پایگاه داده‌های مربوطه و مقالات است. حداقل امتیاز متقابل مورد نیاز برای برقراری اتصالات به صورت پیش فرض ۰/۴ قرار گرفته شد. بر این اساس شناسه‌های ژنی که به این پلت فرم داده شد، مشخص گردید که ژن‌های هدف شامل ۲۲۶ گره و ۳۳۶ لبه بود و از این تعداد ۶۹ ژن در شبکه قرار نگرفته و تعاملی با یکدیگر نداشتند (شکل ۴).



شکل ۴. شبکه تعامل پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING. گره‌های رنگی نشان‌دهنده پروتئین‌ها هستند و خطوط رنگی نشان‌دهنده تعامل آن‌ها با یکدیگر

Figure 4. Protein-protein interaction network using STRING database. Colored nodes represent proteins, and colored lines represent their interaction with each other

²⁶ Nods

²⁷ Edges

آنالیز این شبکه پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape و افزونه CytoHubba مشخص کرد که برخی از این ژن‌های هدف دارای تعاملات بالایی با هستند. بر این اساس ۲۰ عدد از آن‌هایی که بیشترین تعامل را در شبکه داشتند با روش MMC شناسایی شدند که در شکل پنج مشخص گردید. همانطور که پیش‌تر در آنالیز مسیر KEGG مشخص شده بود، در این قسمت نیز بخش عمده‌ای از ژن‌های هدف مرتبط با زیر واحدهای ریوزومی و پروتئازومی هستند. می‌دهد. در این میان ژن‌های ریوزومی که بیشترین تعامل را داشتند به ترتیب: *RPS11C* توسط *miR860* *RPS15AA* توسط *mir393* *RPL9D* توسط *miR396* *RPL18C* توسط *miR172* *RPP1C* و *RPS17D* توسط *miR156* مورد هدف قرار گرفتند و ژن‌های پروتئازومی نیز به ترتیب: *RPT2a* توسط *miR396* و *RPT1a* توسط *miR172* و *RPN11* توسط *miR156* تنظیم می‌شوند. در بخش‌های قبل به نقش این ژن‌ها در فرآیند پاسخ به تنش اشاره شد. از طرف دیگر مشاهده شد یکی دیگر از ژن‌هایی که دارای تعاملات بالایی با این مجموعه بود ژن پروتئین ناقل یوبیکوئیتین^{۲۸۳۷} بود که توسط *miR860* تنظیم می‌شود.

جدول ۱۱. طبقه بندی ژن‌های هدف بر اساس نوع پروتئین با استفاده از سیستم PANTHER (FDR) (p-value < 0.05)

Table 11. Classification of target genes based on protein type using PANTHER system (p-value < 0.05 FDR)

Category name (Accession)	Genes Count	Percentage
metabolite interconversion enzyme (PC00262)	45	34.40%
protein modifying enzyme (PC00260)	24	18.30%
gene-specific transcriptional regulator (PC00264)	16	12.20%
transporter (PC00227)	14	10.70%
nucleic acid metabolism protein (PC00171)	10	7.60%
translational protein (PC00263)	9	6.90%
chaperone (PC00072)	5	3.80%
transmembrane signal receptor (PC00197)	2	1.50%
scaffold/adaptor protein (PC00226)	1	0.80%
membrane traffic protein (PC00150)	1	0.80%
protein-binding activity modulator (PC00095)	1	0.80%
calcium-binding protein (PC00060)	1	0.80%
cytoskeletal protein (PC00085)	1	0.80%
chromatin/chromatin-binding, or -regulatory protein (PC00077)	1	0.80%

در تمام یوکاریوت‌ها، سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم^{۲۹} (UPS) یکی از مسیرهای اصلی کنترل کیفیت پروتئین است که برای

تخریب پروتئین‌های نادرست یا اضافی برای حفظ هموستاز پروتئوم گیاهی استفاده می‌شود (Su et al. 2020). در UPS،

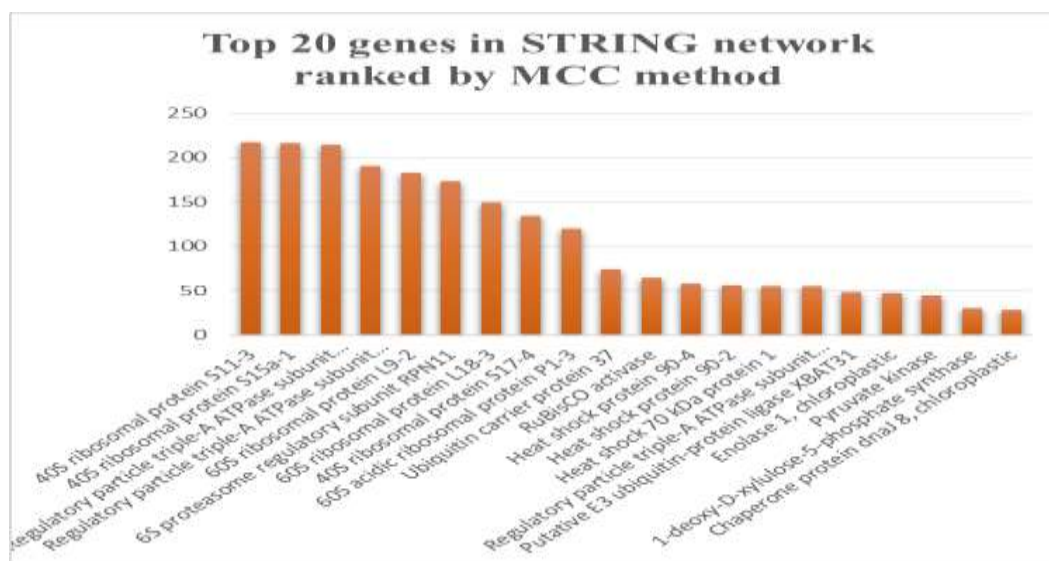
پروتئین‌هایی که باید تجزیه شوند با مولکول‌های یوبیکوئیتین برچسب‌گذاری می‌شوند. این فرآیند جفت‌شدگی^{۳۰} یوبیکوئیتین به سه

²⁸ Ubiquitin carrier protein 37 (UBC37)

²⁹ Ubiquitin-proteasome system

³⁰ Conjugation process

نوع آنزیم یوبیکوئیتین نیاز دارد: E1 (آنزیم فعال کننده یوبیکوئیتین^{۳۱})، E2 (آنزیم جفت کننده یوبیکوئیتین^{۳۲})، و E3 (پروتئین لیگاز یوبیکوئیتین^{۳۳}). متعاقباً، پروتئین‌های پلی یوبی کوئیتینه در پروتئازوم‌ها که از انواع زیر واحدها و پروتئین‌های تنظیم کننده تشکیل شده‌اند، تجزیه می‌شوند (Su et al. 2020). UPS یک تنظیم کننده کلیدی هموستاز پروتئوم گیاهی است. در پاسخ به تنش محیطی، UPS می‌تواند بیان ژن و پاسخ‌های سلولی را از طریق یوبی کوئیتیناسیون^{۳۴} پروتئین‌های تنظیم کننده مانند فاکتورهای رونویسی دخیل در پاسخ‌های تنش محیطی تنظیم کند. بسیاری از ژن‌های کد کننده اجزای درگیر در UPS توسط تنش غیر زیستی القا می‌شوند (Xu & Xue 2019). نقش‌های مرتبط با تنش برای تعدادی از آنزیم‌های یوبیکوئیتین نشان داده شده است. بسیاری از ژن‌های کد کننده E2 القاء کننده تنش هستند. سطوح رونوشت *Glycine max UBC2* (*GmUBC2*; سویا)، *Arachis hypogaea UBC2* (*AhUBC2*; بادام زمینی) و *Arabidopsis UBC32* (*AtUBC32*) در پاسخ به تنش خشکی و/یا شوری تنظیم می‌شود (Zhou et al. 2010a; Cui et al. 2012). فرا بیان *AtUBC32* گیاهان را به تنش شوری حساس کرد (Cui et al. 2012). برعکس، گیاهان جهش یافته *AtUBC32* تحمل بیشتری نسبت به تنش شوری دارند. همچنین گیاهان تاریخته آرابیدوپسیس با فرایبان *Vigna radiata UBC1* (*VrUBC1*; ماش)، *AhUBC2* یا *GmUBC2* نسبت به تنش خشکی تحمل بیشتری نشان دادند (Chung et al. 2013).



شکل ۵. نمودار ژن‌های دارای بیشترین تعامل و برهم کنش با یکدیگر که به کمک ابزار CytoHubba با استفاده از روش MCC به دست آمد

Figure 5. The graph of genes with the most interaction was obtained using the CytoHubba tool and the MCC method

³¹ Ubiquitin activating enzyme; UBA
³² Ubiquitin conjugating enzyme; UBC
³³ Ubiquitin ligase; UBL
³⁴ Ubiquitination

نتیجه گیری: در پژوهش حاضر سعی شد تا ارتباط مولکول‌های microRNA دخیل در تنش شوری و خشکی با تغییراتی که در فرآیندهای بیولوژیکی در طی این تنش رخ می‌دهد، بررسی شود. با توجه به نتایج یافته‌های ما اینطور به نظر می‌رسد تنش منجر به فعال شدن سیستم‌ها و مسیرهای مختلف بیولوژیکی و تغییر در بیان ژن‌ها همراه با فعال شدن ماشین پروتئین‌سازی و تغییر در محتوای پروتئینی می‌شود و در نتیجه گیاه برای محافظت از خود و تحمل و یا ایجاد سازگاری به شرایط موجود و حفظ همونستاز پروتئینی از طریق فعال کردن تنظیم ژن پس از رونویسی^{۳۵} (PTGR) مانند فرآیند پیرایش و استفاده از microRNA مکانیزم‌های و تغییرات پس از ترجمه^{۳۶} (PTMs) مانند یوبی کوئیتیناسیون، فسفوریلاسیون، متیلاسیون و استیلاسیون، فراوانی، فعالیت‌ها، تقسیم‌بندی درون سلولی و انتقال پروتئین‌های تنظیم‌کننده درگیر در فرآیندهای مختلف رشد و همچنین پاسخ‌دهی به تنش را تنظیم می‌کند. به همین دلیل تعاملات گسترده و درهم‌تنیده بین این سیستم‌ها مورد انتظار است. بنابراین بررسی نقش microRNA و ژن‌های هدف مربوط به آن‌ها و همچنین سیستم‌هایی که منجر به تغییرات پس از ترجمه می‌شوند منجر به ایجاد به افق دید وسیع‌تری در ارتباط با تنش‌ها و اثر آن بر مسیرهای درگیر در فرآیندهای سلولی خواهد شد و ابعاد گسترده پاسخ به تنش‌ها را آشکار خواهد کرد.

سپاسگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات هیات محترم تحریریه مجله بیوتکنولوژی کشاورزی و همچنین دقت نظر داوران ارجمند به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری نمایند.

منابع

- عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.
- محسن زاده گلفزانی محمد، پسندیده ارجمند مریم، سمیع زاده لاهیجی حبیب ا... (۱۴۰۰) شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌های کلیدی دخیل در تنش اسمزی گیاه آرابیدوپسیس. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۱)، ۱-۲۲.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۴-۱۶۹.
- محمدآبادی محمدرضا، سفلی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

³⁵ Post-transcriptional gene regulation

³⁶ Post-translational modifications

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳): ۱۱۱-۱۲۲.

References

- Akdogan G, Tufekci ED, Uranbey S et al. (2016) miRNA-based drought regulation in wheat. *Funct Integr Genomics* 16, 221-233.
- Akhtar MM, Micolucci L, Islam MS et al. (2015) Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res* 44, 24-44.
- Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 13 (4), 183-200 (In Persian).
- Aravind J, Rinku S, Pooja B et al. (2017) Identification, Characterization, and Functional Validation of Drought-responsive MicroRNAs in Subtropical Maize Inbreds. *Front Plant Sci* 8, 941.
- Baek D, Chun HJ, Kang S et al. (2016) A Role for Arabidopsis miR399f in Salt, Drought, and ABA Signaling. *Mol Cells* 39, 111-118.
- Balakrishnan R, Harris MA, Huntley R et al. (2013) A guide to best practices for Gene Ontology (GO) manual annotation. Database bat054.
- Barrera-Figueroa BE, Gao L, Wu Z et al. (2012) High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress-regulated microRNAs in the inflorescences of rice. *Plant Biol* 12, 132.
- Bhardwaj AR, Joshi G, Pandey R et al. (2014) A Genome-Wide Perspective of miRNAome in Response to High Temperature, Salinity and Drought Stresses in *Brassica juncea* (Czern) L. *PLOS ONE* 9, e92456.
- Carnavale Bottino M, Rosario S, Grativol C et al. (2013) High-Throughput Sequencing of Small RNA Transcriptome Reveals Salt Stress Regulated MicroRNAs in Sugarcane. *PLOS ONE* 8, e59423.
- Cecchetti V, Altamura MM, Falasca G et al. (2008) Auxin regulates Arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20, 1760-1774.
- Chung E, Cho C-W, So H-A et al. (2013) Overexpression of VrUBC1, a Mung Bean E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme, Enhances Osmotic Stress Tolerance in Arabidopsis. *PLOS ONE* 8, e66056.
- Cui F, Liu L, Zhao Q et al. (2012) Arabidopsis Ubiquitin Conjugase UBC32 Is an ERAD Component That Functions in Brassinosteroid-Mediated Salt Stress Tolerance. *Plant Cell* 24, 233-244.
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res* 46, 49-54.
- Engstrom EM, Andersen CM, Gumulak-Smith J et al. (2011) Arabidopsis homologs of the petunia hairy meristem gene are required for maintenance of shoot and root indeterminacy. *Plant Physiol* 155, 735-750.
- Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE et al. (2011) Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief Bioinform* 12, 449-462.
- Gentile A, Dias LI, Mattos RS et al. (2015) microRNAs and drought responses in sugarcane. *Front Plant Sci* 6, 58.
- Gupta S, Dong Y, Dijkwel PP et al. (2019) Genome-wide analysis of ROS antioxidant genes in resurrection species suggest an involvement of distinct ROS detoxification systems during desiccation. *Int J Mol Sci* 20, 3101.
- Hirayama T, Shinozaki K (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* 61, 1041-1052.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44.
- Huang H-Y, Jiang W-B, Hu Y-W et al. (2013) BR signal influences Arabidopsis ovule and seed number through regulating related genes expression by *BZRI*. *Mol Plant* 6, 456-469.

- Jian H, Wang J, Wang T et al. (2016) Identification of Rapeseed microRNAs Involved in Early Stage Seed Germination under Salt and Drought Stresses. *Front Plant Sci* 7, 658.
- Jofuku KD, den Boer BG, Van Montagu M et al. (1994) Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* 6, 1211-1225.
- Jofuku KD, Omidyar PK, Gee Z et al. (2005) Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene APETALA2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3117-3122.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14, 787-799.
- Khraiwesh B, Zhu J-K, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta* 1819, 137-148.
- Kumar S, Stecher G, Li M et al. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547-1549.
- Kunst L, Klenz JE, Martinez-Zapater J et al. (1989) AP2 Gene Determines the Identity of Perianth Organs in Flowers of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 1, 1195-1208.
- Li G, Siddiqui H, Teng Y et al. (2011) Coordinated transcriptional regulation underlying the circadian clock in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* 13, 616-622.
- Li Y, Guo Q, Liu P et al. (2021) Dual roles of the serine/arginine-rich splicing factor SR45a in promoting and interacting with nuclear cap-binding complex to modulate the salt-stress response in Arabidopsis. *New Phytol* 230, 641-655.
- Liu D, Liu H, Du H et al. (2021) Relationship between polyamines conjugated to mitochondrion membrane and mitochondrion conformation from developing wheat embryos under drought stress. *J Biosci* 46, 1-11.
- Liu Q, Wang F, Axtell MJ (2014) Analysis of complementarity requirements for plant microRNA targeting using a Nicotiana benthamiana quantitative transient assay. *Plant Cell* 26, 741-753.
- Lukasik A, Pietrykowska H, Paczek L et al. (2013) High-throughput sequencing identification of novel and conserved miRNAs in the Brassica oleracea leaves. *BMC Genomics* 14, 801.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (Foeniculum vulgare) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Meng C, Yang M, Wang Y et al. (2020) SIWHY2 interacts with SIRECA2 to maintain mitochondrial function under drought stress in tomato. *Plant Sci* 301, 110674.
- Mi H, Muruganujan A, Ebert D et al. (2018) PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res* 47, 419-426.
- Min H, Yoon S (2010) Got target?: computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Exp Mol Med* 42, 233.
- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (Foeniculum vulgare) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542.
- Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12, 191-208 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).

- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.
- Mohsenzadeh Golfazani M, Pasandideh Arjmand M, Samizadeh Lahiji HJABJ (2022a) Bioinformatics identification of hub genes involved in osmotic stress of Arabidopsis. Agric Biotechnol J 14, 155-174. (In Persian).
- Mohsenzadeh Golfazani M, Taghvaei MM, Samizadeh Lahiji H et al. (2022b) Investigation of proteins' interaction network and the expression pattern of genes involved in the ABA biogenesis and antioxidant system under methanol spray in drought-stressed rapeseed. 3 Biotech 12, 217.
- Moin M, Saha A, Bakshi A et al. (2021) Constitutive expression of Ribosomal Protein L6 modulates salt tolerance in rice transgenic plants. Gene 789, 145670.
- Nagai S, Koide M, Takahashi S et al. (2007) Induction of isoforms of tetrapyrrole biosynthetic enzymes, AtHEMA2 and AtFC1, under stress conditions and their physiological functions in Arabidopsis. Plant Physiol 144, 1039-1051.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M et al. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics 28, 1166-1167.
- Pegler JL, Nguyen DQ, Oultram JM et al. (2021) Molecular Manipulation of the MiR396/GRF Expression Module Alters the Salt Stress Response of Arabidopsis thaliana. Agron 11, 1751.
- Razi K, Muneer SJCRiB (2021) Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. Crit Rev Biotechnol 41 (5), 669-691.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G et al. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Sci 290, 2105-2110.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. Anim Biotechnol 33, 1-11.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O et al. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res 13 (11), 2498-2504.
- Shikata M, Koyama T, Mitsuda N et al. (2009) Arabidopsis SBP-box genes SPL10, SPL11 and SPL2 control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase. Plant Cell Physiol 50, 2133-2145.
- Su T, Yang M, Wang P et al. (2020) Interplay between the Ubiquitin Proteasome System and Ubiquitin-Mediated Autophagy in Plants. Cells 9 (10), 2219.
- Sunkar R, Zhu JK (2007) microRNAs and short-interfering RNAs in plants. J Integr Plant Biol 49, 817-826.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D et al. (2018) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res 47, 607-613.
- Taghvaei MM, Lahiji HS, Golfazani MM (2022) Evaluation of expression changes, proteins interaction network, and microRNAs targeting catalase and superoxide dismutase genes under cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.). OCL 29 (3),
- Taghvaei MM, Samizadeh Lahiji H, Bakhtiarzadeh MR et al. (2019) Bioinformatics analysis of microRNAs related to cold Stress and their effects on proteins associated with fatty acids metabolism in rapeseed (*Brassica napus* L.). J Crop Biotech 9, 41-58.
- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW et al. (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 23(2), 171-182.
- Tian Y, Tian Y, Luo X et al. (2014) Identification and characterization of microRNAs related to salt stress in broccoli, using high-throughput sequencing and bioinformatics analysis. BMC Plant Biol 14, 226.

- Vidal EA, Araus V, Lu C et al. (2010) Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 4477-4482.
- Wang F, Li L, Liu L et al. (2012a) High-throughput sequencing discovery of conserved and novel microRNAs in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Mol Genet Genomics* 287, 555-563.
- Wang J, Yang X, Xu H et al. (2012b) Identification and characterization of microRNAs and their target genes in *Brassica oleracea*. *Gene* 505, 300-308.
- Wang R, Zou J, Meng J et al. (2018) Integrative analysis of genome-wide lncRNA and mRNA expression in newly synthesized Brassica hexaploids. *Ecol Evol* 8, 6034-6052.
- Würschum T, Gross-Hardt R, Laux T (2006) *APETALA2* regulates the stem cell niche in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell* 18, 295-307.
- Xing S, Salinas M, Höhmann S et al. (2010) miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 3935-3950.
- Xu F-Q, Xue H-W (2019) The ubiquitin-proteasome system in plant responses to environments. *Plant, Cell Environ* 42, 2931-2944.
- Yang J, Liu X, Xu B et al. (2013) Identification of miRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile and its maintainer fertile lines of *Brassica juncea*. *Genomics* 14 (9).
- Ye B-B, Shang G-D, Pan Y et al. (2020) AP2/ERF Transcription Factors Integrate Age and Wound Signals for Root Regeneration. *Plant Cell* 32, 226-241.
- Yu X, Wang H, Lu Y et al. (2012) Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in *Brassica rapa*. *J Exp Bot* 63, 1025-1038.
- Zhang B, Pan X, Cannon CH et al. (2006) Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J* 46, 243-259.
- Zhang Y, Zhang A, Li X et al. (2020) The Role of Chloroplast Gene Expression in Plant Responses to Environmental Stress. *Int J Mol Sci* 21 (17), 6082.
- Zhou G-A, Chang R-Z, Qiu L-J (2010a) Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 72, 357-367.
- Zhou L, Liu Y, Liu Z et al. (2010b) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *J Exp Bot* 61, 4157-4168.