زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

پیش‌بینی بیوانفورماتیکی توالی‌های حفاظت شده miRNA و مطالعه روند ایجاد و از بین رفتن آنها در بقولات

بهزاد حاجی‌اقراری[1*]، مجاهد کمالی‌زاده[2]

۱–استاد، دانشگاه جهرم، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، جهرم، ایران
۲–استاد، دانشگاه جهرم، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، جهرم، ایران

*صندوق پستی ۷٤۱۳٥۱۱۱، جهرم، ایران
bheghrari@yahoo.com

دریافت: ۱٤۰۰/۰٦/۱۱ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۳/۲۲

چکیده

خانواده بقولات یکی از مهمترین خانواده‌های گیاهان است. در این پژوهش توالی‌های پیش‌ساز miRNA ها در هفت گونه از بقولات شامل *Arachis hypogaea*، *Glycine max*، *Glycine soja*، *Lotus japonicus*، *Medicago truncatula*، *Phaseolus vulgaris* و *Vigna unguiculata* به شیوه جستجوی توالی‌های پیش‌ساز حامل توالی‌های همولوگ miRNA ای بالغ در میان توالی‌های نسخه‌برداری شونده و با در نظر گرفتن مشخصات اختصاصی توالی و ساختمان دوم توالی پیش ساز درmiRNA های شناسایی شده، پیش‌بینی و مشخصات آنها مورد توجه قرارگرفت. همچنین جایگاه ژنومی توالی‌های پیش‌ساز تعیین شد. در این مطالعه، ٤۱٤ توالی پیش‌ساز miRNA متعلق به ۱۳۰ خانواده در هفت گونه مذکور که مشخصات توالی و ساختار دوم آنها با مشخصات توالی‌های پیش‌ساز miRNA گیاهی همخوانی داشت، پیش‌بینی و مشخصات آنها گزارش شد. روابط بین گونه‌ها براساس روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA ای در هرگونه بر ا ساس بی شینه پار سمیونی به شیوه دولو به‌د ست آمد و از این طریق درخت فیلوژنتیکی ارتباط گونه‌ها ترسیم شد. خانواده‌های miRNA به‌وجود آمده و از بین رفته در گونه‌های مورد مطالعه در طول پیدایش و تکامل گونه‌ها مشخص و گزارش شد. نتایج نشان داد روند ایجاد خانواده‌های miRNA در این خانواده اخیرا از شدت زیادی برخوردار بوده است. روابط بین گونه‌ها بر اساس روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA به شیوه مدل بیشینه پارسیمونی همخوانی با روابط فیلوژنی ندارد. در این مطالعه تعدادی از خانواده‌های miRNA به‌عنوان خانواده‌های اختصاصی گونه و اختصاصی گروه شناسایی شد که امکان استفاده از آنها به‌عنوان شناسه‌گر گونه/گروه وجود دارد.

واژگان کلیدی: miRNA، خانواده بقولات، بیشینه پارسیمونی دولو، جستجوی توالی‌های همولوگ miRNA

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

۱-مقدمه

تنظیم بیان ژن شامل فرایندهایی است که توسط سلول برای تنظیم (افزایش یا کاهش) بیان یک ژن مشخص یا گروهی از ژن‌های مرتبط با هم انجام می‌شود. تنظیم بیان ژن در هر مرحله از فرایند بیان ژن شامل پیش از رونویسی، شروع رونویسی، رونویسی، پیرایش RNA[1]، ترجمه و تغییرات پس از ترجمه یک ژن انجام می‌شود [۱]. اغلب در یک شبکه تنظیم بیان ژن، برخی ژن‌ها قادر به کنترل عملکرد برخی دیگر می باشند. تنظیم و کنترل بیان ژن امری حیاتی در سلول های موجودات زنده مختلف به شمار می‌رود و به شیوه‌های مختلف انجام می‌شود. این فرایند سبب تولید فراورده‌های ژنی مورد نیاز در زمان مورد نیاز و به میزان مورد نیاز می‌شود. بنابراین قابلیت انعطاف پذیری و سازگاری با شرایط مختلف محیط برای موجود زنده امکان پذیر می شود. در سلول‌های یوکاریوتی مکانیسم‌های مختلفی برای تنظیم بیان ژن وجود دارد و تنظیم بیان ژن توسط miRNA ها[2] یکی از مکانسیم‌های مهم و متداول است.

miRNA ها توالی های کوچک به طول ۱۸-۲٤ نوکلئوتید می باشند که در تنظیم بیان ژن در موجودات زنده یوکاریوتی در مرحله حین نسخه‌برداری و پس از نسخه‌برداری نقش دارند [۲].miRNA ها از جایگاه‌های اختصاصی بر روی ژنوم رونویسی و طی فرایند بیو شیمیایی مشخصی در سلول و با مشارکت آنزیم‌های متعدد توالی آنها آزاد شده و به کمک سیستم آنزیمی پیچیده در تنظیم بیان ژن در حین نسخه‌برداری یا پس از نسخه‌برداری مشارکت می‌کنند [۳- ۵]. این توالی‌ها با تاثیر بر روی تظاهر ژن‌ها در شبکه‌های بیان ژنی تاثیر خود را در رشد و نمو، تمایز و پاسخ گیاه به محرک‌های زنده و غیر زنده محیطی اعمال می‌کنند[٦]. همچنین، این توالی‌ها در دفاع از گیاه در برابر عوامل ژنتیکی مهاجم مانند ویروس‌ها و توالی‌های ترانسپوزانی نقش دارند [۷ و ۸]. توالی بسیاری از پیش سازهایmiRNA که حامل miRNA بالغ هستند، در برخی گونه‌های گیاهی شناسایی شده و در پایگاه ثبت توالی های miRNA میربیس[3] [۷ و ۹-۱۱] به ثبت رسیده‌اند. با این حال امروزه تلاش‌ها برای شناسایی و ثبت توالی‌های miRNA در یوکاریوت‌ها بخصوص در گیاهان همچنان ادامه دارد [۱٦-۱۲]. با شناسایی و ثبت کامل توالی های miRNA دانشمندان قادر خواهند بود شبکه بیان و تنظیم ژن را در هر گونه به طور کامل شناسایی و تکمیل کنند.

شیوه‌های آزمایشگاهی مختلفی برای شناسایی miRNA ها و اهداف ژنی آنها توسعه داده شده است [٤ و۱۷-۲۰]. با استفاده از همین روش‌ها توالی تعداد زیادی از miRNA ها شناسایی و در پایگاه‌های ثبت توالی miRNA به ثبت رسیده‌اند. روش‌های آزمایشگاهی به دلیل نیاز به هزینه و زمان زیاد برای شناسایی miRNA های بیان شده در شرایط و استرس‌های مختلف محیطی در عمل کارایی مناسبی برای شناسایی miRNA ها ندارند [۲۱]. با توجه به مشکلات روش‌های آزمایشگاهی تشخیص جایگاه ژنی miRNA، امروزه استفاده از روش‌های جایگزین مانند روش‌های بیوانفورماتیکی تشخیص جایگاه ژنی miRNA متداول شده است [۲۲].

خانواده بقولات[4] یکی از مهمترین خانواده های گیاهان است. این خانواده شامل گونه‌های مهم غذایی و صنعتی می‌باشد. هدف از اجرای این پژوهش شناسایی و پیش‌بینی ژن‌های miRNA حفاظت شده در مجموعه توالی‌های نسخه‌برداری شونده گونه‌های خانواده بقولات و همچنین مطالعه روند ایجاد و از بین رفتن ژن های miRNA در گونه‌های این خانواده می‌باشد. شناسایی خانواده‌های ژنی miRNA در گونه های مورد مطالعه، گوناگونی ژن های miRNA در گونه ها و تعداد پارالوگ های آنها، منشاء

1 . RNA splicing
2 . miRNAs
3 . miRBase
1 . Leguminosae

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

ژن‌های miRNA موجود در گونه‌های مختلف، توزیع این ژن‌ها بر روی کروموزوم گونه‌ها، مدل روند تکاملی در گیاهان بر اســاس روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA، روند ایجاد و از بین رفتن ژن‌های miRNA در طول زمان تکامل آنها، موضــوع مطالعه در این پژوهش اســت. این پژوهش بر اســاس آنالیز و تحلیل مجموعه داده‌های چندین منبع پایگاه داده، همچون پایگاه داده میربیس و پایگاه داده جامع بانک ژن و با اســتفاده از ابزارهای کامپیوتری آنالیز طرح‌ریزی و تحلیل شده است.

۲-مواد و روش‌ها

۱-۲جستجوی miRNA های گیاهی بالقوه در گونه‌های گیاهی خانواده بقولات

برای جستجو و استخراج توالی‌های پیش‌ساز miRNA بالغ همولوگ با توالی‌های شــناســایی شــده miRNA گیاهی، توالی‌های نسخه‌برداری شونده[1] ثبت شده برای گونه‌های *Arachis hypogaea* ، *Glycine max*، *Glycine soja*، *Lotus japonicus*، *Medicago truncatula*، *Phaseolus vulgaris* و *Vigna unguiculata* از پایگاه داده توالی‌های نسخه‌برداری شونده بانک ژن[2] (قابل دسترس در تار نمای http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest:) در قــالــب فایل های مجزا جمع‌آوری شـــد. همچنین، توالی های پیش ساز و بالغ miRNA ثبت شده برای گونه‌های گیاهی از پایگاه داده میربیس اســتخراج و در قالب فایل جداگانه ذخیره شـد. توالی‌های نسـخه‌برداری شـونده تکراری ثبت شــده برای هر گونه با اســتفاده از ابزار کامپیوتری CodonCode Aligner 6,0,2 شــناســایی و حذف شــد. همچنین، توالی‌های تکراری پیش‌ســاز و بالغ miRNA ها نیز با این شــیوه از فایل‌های ذخیره شــده حذف شــد. توالی‌های همولوگ با هر کدام از توالی‌های miRNA بالغ گونه‌های گیاهی شناسایی شده (که حداکثر ٤ اسیدنوکلئیک جایگزین در توالی آنها مشـاهده می‌شـد و دارای ایی ولیو کمتر یـا برابر ۱۰ در طول همترازی بودنـد) بر روی توالی‌های نسخه‌برداری شونده هر گونه، توسط الگوریتم بلاســت نوکلئوتید[3] [۲۱] مشــخص شــد. این توالی‌ها به‌صــورت جداگانه ذخیره شــدند. مکمل توالی همولوگ توالی شــناســایی شــده بین توالی‌های اســتخراج شــده که حداکثر ٤ نوکلئوتید جایگزین در توالی آنها مشـــاهده می شد و فاصله بین این دو توالی حداکثر ۳۰۰ توالی بود، جســتجو و توالی حد فاصــل بین توالی‌های miRNA و مکمل آن به اضــافه دو نوکلئوتید از ســمت '۳ از توالی مذکور استخراج شد. برنامه کامپیوتری این مرحله در بستر نرم‌افزاری متلب تهیه و استفاده شد(فایل ضمیمه ۱). برای حذف توالی‌های ترجمه شــونده به پروتئین، توالی‌های پروتئین‌های گیاهی از پایگاه داده یونی پرات/ ســوئیس پرات[4] دریافت شد و توالی‌های مشابه توالی‌های پروتئینی در مجموع توالی های دارای همولوگ miRNA با انجام بلاســت ایکس[5] که ســه قاب ترجمه شــده هر کدام از توالی‌های مجموعه توالی‌های دارای همولوگ miRNA را با توالی‌های پروتئینی اخذ شـده از پایگاه داده‌های مربوطه مقایسه می‌کند، شناسایی و متمایز شد (توالی‌هایی با ایی ولیو کمتر یا برابر 10^{-20} در طول همترازی، انتخاب شدند). در این مرحله، توالی‌های به‌دســت آمده توالی‌هایی غیر ترجمه شــونده به پروتئین و حامل توالی‌های همولوگ miRNA می‌باشــند. ســپس، توالی‌های به‌دســت آمده با توالی‌های ذخیره شده در پایگاه داده RFEM که توالی‌های خانواده های مختلف RNA را درخود ذخیره می‌کند، با انجام بلاست نوکلئوتید مقایسه و توالی‌های مشابه با سایر خانواده‌های RNA از باقی توالی‌ها حذف شد (توالی‌هایی با ایی ولیو کمتر یا برابر با 10^{-8}در طول همترازی، انتخاب شـدند). در مرحله بعد سـاختار دوم توالی‌ها با اسـتفاده از

[1] Expressed sequence tags (ESTs)
[2] NCBI
[3] BlastN
[4] Uniprot/Swissprot
[5] BlastX

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

روش کمترین انرژی آزاد در ســاختار دوم RNA توســط نرم‌افزار RNA فولد۱ ترسیم و مشـخصـات سـاختار دوم RNA ها مشخص شد. توالی‌هایی که مشخصات ساختار دوم آنها با مشـخصــات کلی سـاختار دوم در miRNA ها مطابقت دا شت [۱۱ و ۱۵]، به‌عنوان توالی پیش ساز توالی miRNA هم خـانواده بـا miRNA همولوگ انتخـاب و معرفی شـدند. در مورد توالی‌های پیش‌ساز تکراری که از توالی‌های رونوی‍سی شونده مختلف به‌د ست آمد، یکی از توالی‌ها مورد توجه قرار گرفت و باقی توالی‌ها حذف شد. توالی‌های شــناســایی شــده با توجه به خانواده‌هایی که توالی‌های miRNA بالغ‌شــان به آنها شــباهت داشــته و پارالوگ‌های شنا سایی شده و ثبت شده برای هر خانواده miRNA و بازویی که توالی miRNA بالغ در ساختار دوم آن جای می‌گیرد، تعداد کپی‌های miRNA بالغ در توالی مختلف پیش سازها، پیش سازهای شنا سایی و ثبت شده برای هر خانواده و بر اســاس قانون نامگذاری miRNA ها ارائه شده تو سط مایر و همکاران [۱۸] نامگذاری شدند. مشخصات آنها شامل شماره ثبت شده توالی نسخه‌برداری شونده‌ای که توالی miRNA از آن ا ستخراج شده، جایگاه توالی پیش‌ساز بر روی توالی نسخه‌برداری شونده، بازویی که توالی بالغ miRNA در ساختار دوم توالی پیش ساز بر روی آن قرار می‌گیرد، انرژی آزاد و شــاخص انرژی آزاد در ساختار دوم توالی پیش‌ساز و محتوی مجموع نوکلئوتید سیتوزین و گوانین توالی پیش‌ساز miRNA مشخص شد. در مرحله بعد توالی‌های پیش‌ســاز و بالغ miRNA های شناسایی شده در این مطالعه و miRNA هایی که برای هر گونه گیاهی مورد مطالعه در پایگاه داده ثبت توالی‌های miRNA میربیس ثبت شــده بود، برای انجام مراحل بعدی مطالعه و آنالیز مورد توجه قرار گرفت.

۲-۲ شناسایی توالی‌های پیش‌ساز miRNA مشتق شده از توالی‌های ترانســپوزونی و رترو ترانســپوزونی و توالی‌های دارای نواحی تکرار شونده و ساده

از پــایــگــاه داده ســـنســـور۲ (http://www.girinst.org/censor/index.php; [۲۳]) برای شناسایی توالی‌های مشابه ترانسپوزانی و رتروترانسپوزانی در توالی‌های پیش‌بینی شده پیش‌ساز برای هر گونه گیاهی اســتفاده شــد. در این پایگاه داده عناصــر تکرار شــونده ترانســپوزونی و رتروترانســپوزونی به گروه‌های عناصــر ترانسپوز شونده، عناصر تکرار شونده، ژن‌هایی در چندین کپی و ویروس‌های تلفیق شــونده گروه بندی می‌شــوند. با جســتجو در این پایگاه داده، توالی‌های پیش‌ســاز دارای چنین توالی‌هایی شــناســایی شــدند. همچنین، از نرم‌افزار تــحــت وب رپــیــد مــاســکــر۳ ([۲٤] ;http://www.repeatmasker.org/) برای شــناســایی توالی‌های تکرار شــونده ســاده و نواحی با ترکیب ســاده نوکلئوتیدی در طول توالی‌های پیش‌ساز استفاده شد.

۲-۳ بررســی حضــور یا عدم حضــور خانواده‌های miRNA

حضــور خانواده‌های ثبت شــده در پایگاه داده میربیس و شنا سایی شده برای هرگونه گیاهی در این مطالعه و عدم حـضور آنها در یک گونه گیاهی برر سی شد و به صورت فایل جداگانه برای انجام آنالیزهای بعدی ذخیره شد.

۲-٤ بررســی جایگاه ژنومی miRNA های پیش‌بینی بر روی ژنوم

جایگاه ژنومی توالی‌های شناسایی شده پیش‌ساز miRNA در مورد گونه‌هایی که توالی ژنومی آنها به طور کامل مشــخص شــده و در پایگاه داده بانک ژن به ثبت رســیده بودند و در دســترس قرار داشــتند، تعیین شــد. برای این منظور جایگاه توالی‌های پیش‌ساز miRNA استخراج شده به کمک برنامه نرم‌افزاری بلاســت نوکلئوتیدی در ژنوم

۱ RNAfold
۲ Censor
۳ Repeatmasker

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

گونه مورد مطالعه جستجو شد. پارامترهای نرم افزار بلاست به جز ایی ولیو[1] که به عدد 10^{-10} تعدیل شد، بقیه پارامترها بر اساس پیشنهاد نرم‌افزار تنظیم شدند. جایگاه‌های ژنومی که با کل طول توالی پیش‌ساز بیش از ۹۸ درصد یکسانی داشتند، مورد توجه قرار گرفته و شماره کروموزوم و جایگاه توالی بر روی کروموزوم به‌عنوان جایگاه ژنومی برای توالی پیش‌ساز miRNA معرفی شد. درمواردی که بیش از یک جایگاه برای توالی miRNA شناسایی شد، همه آنها به‌عنوان جایگاه‌های مضاعف ژن miRNA بر روی ژنوم شناسایی شدند.

۵-۲ مطالعه روند ایجاد و از بین رفتن خانواده های miRNA در گونه‌های گیاهی خانواده بقولات

در این مطالعه روند ایجاد و از بین رفتن خانواده های miRNA در گونه های خانواده بقولات در طول زمان تکاملی به دو شیوه بررسی شد. در شیوه اول ابتدا بر اساس بیشینه پارسیمونی ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA درخت فیلوژنی بر اساس روش دولو[2] ترسیم و ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های ژنی در هر مسیر تکاملی مورد توجه قرار گرفت. به عبارتی درخت فیلوژنتیکی برای گونه‌های مورد مطالعه، صرفا بر اساس ایجاد و از بین رفتن خانواده های miRNA توسط برنامه دولو-پی[3] از مجموعه برنامه‌های آنالیز فیلوژنتیکی در بسته فیلیپ[4] وارد و درخت فیلوژنتیکی با بیشترین پارسیمونی ترسیم شد. در ادامه روابط بین گونه‌ها بر این اساس با روابط فیلوژنتیکی موجود بین گونه‌ها مقایسه شد و از این طریق میزان نقش پدید آمدن و از بین رفتن خانواده های miRNA ها در ایجاد تنوع بین گونه‌ها ارزیابی شد. در شیوه دوم، درخت فیلوژنی حاصل از روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها ترسیم و بیشینه پارسیمونی ایجاد و از بین رفتن خانواده های miRNA در مسیرهای این درخت فیلوژنتیکی تعیین و ایجاد شد و از بین رفتن خانواده‌های مختلف در مسیرهای تکاملی مشخص شد. برای انجام این بخش از مطالعه ابتدا وجود یا نبود خانواده‌های miRNA برای هر گونه به صورت دو خصوصیتی (عدد یک برای خانواده موجود و عدد صفر برای خانواده غایب) برای هر گونه مشخص شد.

۳-نتایج

در این مطالعه تعداد ٤۱٤ توالی miRNA متعلق به۱۳۰ خانواده در گونه های مطالعه شده از خانواده بقولات شناسایی شد. از این تعداد، ۱۵۳ توالی پیش‌ساز حائز شرایط برای گونه *Glycine max* شناسایی شد. این تعداد توالی پیش‌ساز miRNA از ۱۲۱ توالی نسخه‌برداری شونده ژنومی به‌دست آمد. این توالی‌های پیش‌ساز miRNA حامل توالی های بالغ miRNA از ٦٦ خانواده miRNA گیاهی بودند (فایل ضمیمه ۲). در این میان خانواده miR5021 دارای بیشترین توالی های همولوگ miRNA شناسایی شده بود. توالی‌های پیش‌ساز پیش‌بینی شده برای این گونه طول‌های متفاوتی داشتند. بیشترین طول شناخته شده برای این گونه ۲۹۸ نوکلئوتید می‌باشد. دامنه طولی ۵۰ تا ۸۰ نوکلئوتید بیشترین توالی‌های پیش ساز پیش‌بینی شده را به خود اختصاص دادند. ٤۵ عدد از توالی‌های بالغ شناسایی شده برای این گونه در جایگاه اولین نوکلئوتید انتهایی '۵ توالی خود دارای نوکلئوتید آدنین، ۱۹ توالی نوکلئوتید سیتوزین، ۱٦ توالی نوکلئوتید گوانین و ۷۳ توالی نوکلئوتید اوراسیل بودند. همچنین، توالی‌های بالغ miRNA شناسایی شده برای این گونه نیز طول‌های متفاوتی دارند. توالی های بالغ که طول آنها ۲۱ نوکلئوتید بود، بیشترین تعداد را در بین توالی‌های بالغ شناسایی شده داشتند.کمینه انرژی آزاد و شاخص کمینه انرژی آزاد توالی‌های پیش ساز کاندید محاسبه شد. بیشتر توالی‌های شناسایی شده کمینه انرژی آزادشان در محدوده ۲۰ تا ۸۰ کیلو کالری بر مول و اکثر توالی های پیش‌ساز miRNA

1 E-value
2 Dollo maximum parsimony
3 Dollo-p
4 Phylip

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

پیش‌بینی شده دارای شاخص کمینه انرژی در محدوده ۰/۸ تا ۱/۲ کیلو کالری بر مول می باشند. مطالعه کیفیت توالی‌های پیش‌ساز پیش‌بینی شده برای این گونه نشان داد برخی از توالی‌های شناخته شده دارای نواحی مشابه تکراری در ترکیب خود هستند. همچنین، برخی از این توالی‌های پیش‌ساز پیش‌بینی شده دارای نواحی تکرار شونده و نواحی با ترکیب ساده بودند که مشخصات آنها مشخص شد (فایل ضمیمه ۳).

تعداد ۲۸۶۱۷۶ توالی نسخه‌برداری شونده از ژنوم گونه *Medicago truncatula* از پایگاه داده EST به‌دست آمد که از بین این توالی ها، توالی های هومولوگ با توالی های miRNA گیاهی مورد جستجو قرار گرفت (فایل ضمیمه ۲). از این مجموع توالی‌های نسخه‌برداری شونده تعداد ۹۹ توالی پیش‌ساز miRNA هومولوگ با miRNA های گیاهی شناسایی شد. این توالی‌های پیش‌ساز شناسایی شده حامل miRNA های بالغ گیاهی متعلق به ٤٧ خانواده می‌باشند. از این میان ۲۵ خانواده جدید برای این گونه شناسایی شد. خانواده *MIR*1436 بیشینه عضو miRNA شناسایی شده (به تعداد ۱۰ توالی) را به خود اختصاص داد. طول توالی‌های پیش‌ساز متغییر بودند. بیشترین طول به‌دست آمده برای توالی پیش‌ساز در این گونه ۳۰۳ نوکلئوتید می‌باشد. پراکنش طول در توالی‌های پیش‌ساز نشان داد که miRNA های شناسایی شده برای این گونه نسبت به سایر گونه‌ها طول بیشتری دارند. اولین نوکلئوتید در توالی‌های بالغ پیش‌بینی شده در این گونه در ۲۹ توالی آدنین، در ۱۰ توالی سیتوزین، در ۹ توالی گوانین و ۵۱ توالی دارای نوکلئوتید یوراسیل بود. توالی‌های miRNA بالغ نیز طول‌های متغییری داشتند و بیشترین فراوانی به توالی‌های بالغ miRNA با طول ۲۱ نوکلئوتید مربوط بود. مطالعه ساختار دوم توالی‌های پیش‌ساز شناسایی شده نشان داد که این توالی‌ها کمینه انرژی آزادی بین ۲۱/۱ تا ۱۸۵/۹ کیلو کالری بر مول داشته و شاخص کمینه انرژی آزاد توالی‌های پیش‌ساز شناسایی شده برای این گونه بین ۱/۹۱۸ و ۰/۸ کیلو کالری بر مول متغیر است. بررسی توالی‌های پیش‌ساز در این گونه نشان می‌دهد که تعداد زیادی از این توالی‌ها مشابه با توالی‌های ترانسپوژانی و رتروترانسپوزانی هستند. همچنین، تعدادی نواحی تکرارشونده و دارای ترکیب ساده توالی در برخی از توالی‌ها پیش‌ساز مشاهده شد (فایل ضمیمه ۳).

تعداد ۱۸۸۰۸ توالی نسخه‌برداری شونده از ژنوم *Glycine soja* در پایگاه داده EET جمع‌آوری و در این مطالعه استفاده شد. از این مجموع توالی‌های نسخه‌برداری شونده تعداد ۹ توالی پیش‌ساز miRNA هومولوگ با miRNA های گیاهی شناسایی شد (فایل ضمیمه ۲). این تعداد توالی‌های شناسایی شده پیش‌ساز miRNA حامل miRNA های هومولوگ گیاهی، متعلق به ۵ خانواده بودند که همه این خانواده‌ها برای اولین بار شناسایی شدند. خانواده *MIR*169 بیشترین تعداد عضو miRNA شناسایی شده (به تعداد ٤ توالی) را دارد. توالی های پیش‌ساز miRNA دارای طول‌های متفاوتی بودند. *MIR*1520 دارای طولانی‌ترین توالی پیش‌ساز miRNA بود (۱۳۷ نوکلئوتید). پراکنش طول در توالی‌های پیش‌ساز این گونه نشان داد miRNA های شناسایی شده برای این گونه از میانگین طول کمتری نسبت به دوگونه قبلی برخوردار بودند. اولین نوکلئوتید توالی‌های بالغ miRNA پیش‌بینی شده در این گونه در ۳ توالی آدنین، در۲ توالی سیتوزین، در۳ توالی گوانین و در یک توالی یوراسیل بود. miRNA های بالغ شناسایی شده در این گونه دارای طول های متفاوتی می‌با شند و بیشترین تعداد توالی بالغ miRNA شناسایی شده در این گونه ۲۱ نوکلئوتید طول دارند. ساختار دوم توالی‌های پیش ساز شناسایی دارای کمینه انرژی آزاد این توالی‌ها بین ۱۵ تا ٤٩ کیلوکالری بر مول می‌باشد. نواحی تکرار شونده و دارای ترکیب ساده در ٤ پیش‌ساز miRNA مشخص شدند (فایل ضمیمه ۳).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

گونه *Lotus japonicus* دارای 243067 توالی نسخه‌برداری شونده ثبت شده می‌باشد. در مطالعه حاضر توالی‌های بالقوه همولوگ با توالی های ثبت شده miRNA های گیاهی بر اساس دستوالعمل فوق‌الذکر جستجو شد. از این مجموعه توالی‌های نسخه‌برداری شونده، تعداد ۳۹ توالی پیش‌ساز miRNA همولوگ با miRNA های گیاهی شناسایی شد (فایل ضمیمه ۲). این تعداد از توالی‌های شناسایی شده پیش‌ساز حامل miRNA های همولوگ گیاهی، متعلق به ۲۳ خانواده بودند که ۱۳ خانواده از بین آنها برای اولین بار شناسایی شدند. خانواده *MIR*5202 با ٤ توالی بیشترین تعداد عضو شناسایی شده را داشت. توالی های پیش‌ساز دارای طول های متفاوتی بود ند. *MIR*5205 با داشتن توالی پیش‌سازی به طول ۳۰٤- نوکلئوتید طولانی‌ترین توالی پیش‌ساز شناسایی شده می باشد. بررسی پراکنش طول توالی های این گونه مشخص نمود miRNA های شناسایی شده برای این گونه برعکس گونه *Glycine max* دارای طول کمتری هستند. به طوری‌که ۱۱ توالی از ٢٤ توالی پیش‌ساز شناخته شده برای این گونه، طولی کمتر از ۸۰ نوکلئوتید داشتند. اولین نوکلئوتید درتوالی های بالغ miRNA این گونه در ۱۵ توالی یوراسیل، در ۵ توالی آدنین، در ۳ توالی سیتوزین و در یک توالی گوانین بود. توالی های بالغ miRNA نیز با طول‌های متفاوت شناسایی شدند. بیشترین تعداد توالی‌های بالغ در این گونه نیز دارای ۲۱ نوکلئوتید می‌باشد. ساختار دوم توالی‌های پیش ساز miRNA شناسایی شده برای این گونه دارای کمینه انرژی آزاد بین ۲۰ تا ۸۱/۲ کیلوکالری بر مول می‌باشند. شاخص کمینه انرژی آزاد این توالی‌ها نیز بین ۰/۸۰۳ تا ۱/٤۰۳ کیلو کالری بر مول محاسبه شد. مطالعه کیفیت توالی‌های شناسایی شده پیش‌ساز miRNA در این گونه گیاهی نشان داد که برخی از توالی های پیش‌ساز این گونه دارای تعدادی نواحی با توالی‌های تکرار شونده و دارای ترکیب ساده می‌باشند (فایل ضمیمه ۳).

تعداد ۱۵۳۳۳۷ توالی نسخه‌برداری شونده از ژنوم گونه *Phaseolus vulgaris* در پایگاه داده EST ثبت شده است. از بین این توالی های نسخه‌برداری شونده از ژنوم، توالی‌های همولوگ با miRNA های گیاهی مورد جستجو قرار گرفت. از مجموع این توالی‌های نسخه‌برداری شونده تعداد ۳۷ توالی پیش‌ساز همولوگ با miRNA های گیاهی شناسایی شد. این تعداد توالی‌های شناسایی شده پیش‌ساز حامل miRNA هایی متعلق به ۲۰ خانواده می‌باشند که ۸ خانواده برای این گونه جدید شناسایی شدند. طول توالی‌های پیش‌ساز miRNA در این گونه نیز متغیر بود. بیشینه طول به‌دست آمده برای توالی پیش‌ساز miRNA در این گونه ۲۷۹ نوکلئوتید می‌باشد. ساختار دوم توالی‌های پیش‌ساز miRNA شناسایی شده این توالی‌ها کمینه انرژی آزادی بین ٦/٧ تا ۱۱٥/۲ کیلوکالری بر مول دارند. شاخص کمینه انرژی آزاد این توالی‌ها نیز بین ۰/۸۰۲ تا ۲/۹ کیلو کالری بر مول محاسبه شد. مطالعه کیفیت توالی‌های شناسایی شده پیش‌ساز miRNA در این گونه گیاهی نشان داد برخی از توالی‌های پیش‌ساز این گونه دارای تعدادی نواحی دارای توالی‌های تکرار شونده و دارای ترکیب ساده می‌باشند (فایل ضمیمه ۳).

با بررسی توالی نسخه‌برداری شونده ثبت شده در پایگاه داده EST در مورد گونه *Vigna unguiculata* تعداد ۱۸۹۵۹۳ توالی ثبت به‌دست آمد. پس از اعمال فیلترهای مورد نظر بر روی توالی ها در این گونه، تعداد ۸٤ توالی بالقوه و نامزد miRNA دارای شرایط مورد انتظار شناسایی شد(فایل ضمیمه ۲). این توالی‌ها در ۳۱ خانواده مشخص شدند که ۲۰ خانواده از آنها برای اولین بار برای این گونه شناسایی شدند. همانند سایر گیاهان خانواده فاباسه، خانواده *MIR*5021 در مورد این گونه هم شناسایی شد. همچنین، این خانواده دارای بیشترین عضو در بین

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

خانوده‌های شناسایی شده بود (۲۰ miRNA). طویل‌ترین توالی پیش ساز miRNA در این گونه ۲٥٦ نوکلئوتید طول دارد. بررسی طول توالی‌های بالغ در این گونه نشان داد که مانند سایر گونه ها طوالی های با طول ۲۱ نوکلئوتید بیشترین تعداد را به خود اختصاص دادند. کمینه انرژی آزاد ساختار دوم توالی‌های پیش ساز miRNA شناسایی شده برای این گونه بین ۷/۲ تا ۱۸۷/٤ کیلوکالری بر مول محاسبه شد. همانند سایر گونه‌ها بیشتر توالی‌های پیش‌ساز انرژی آزاد تاخوردگی بین ۲۰ تا ۳۹ کیلو کالری بر مول دارند. شاخص کمترین انرژی تاخوردگی نیز با ا ستفاده از فرمول موبوطه برای توالی‌های پیش ساز محاسبه شد. بررسی ساختار توالی‌های پیش‌ساز در این گونه نشان داد که این توالی ها دارای نواحی ساده تکرار شو نده می‌با شند(فایل ضمیمه ۳).برای گونه *Arachis hypogaea* تعداد ۲۰۵۸۷۲ توالی نسخه‌برداری شونده از پایگاه داده مربوطه به‌دست آمد که برای شناسایی miRNA های بالقوه این گونه مورد جستجو قرار گرفتند. تعداد ۷۳ توالی بالقوه miRNA شناسایی شد که شامل ۳۳ خانواده بودند و ۲۳ خانواده برای اولین بار در این گونه شناسایی شد. خانواده *MIR*3509 دارای بیشترین تعداد عضو در این گونه می‌باشد (۱۳ عضو). طویل‌ترین توالی پیش‌ساز دارای ۳۳۲ نوکلئوتید می باشد. توالی های با طول ۵۰ تا ۷۹ نوکلئوتید بیشترین تعداد به خود اختصاص دادند. بررسی طول توالی‌های بالغ miRNA نشان داد که مانند سایر گونه ها توالی‌های بالغ miRNA با طول ۲۱ نوکلئوتید بیشترین تعداد را دارند. تقریبا همه توالی های پیش‌ساز انرژی تاخوردگی کمتر از ۷۹ کیلوکالری بر مول دارند و توالی های پیش‌ساز با انرژی تاخوردگی بین ۲۰ تا ۳۹ کیلوکاالری بر مول بیشترین تعداد را به خود اختصاص دادند. وجود توالی‌های تکرار شونده در ساختار توالی‌های پیش ساز شناسایی شده توالی‌ها تکرار شونده در ساختار پیش‌سازها شناسایی شد (فایل ضمیمه ۳).

۱-۳ تعیین مکان ژنومی miRNA های شناسایی شده

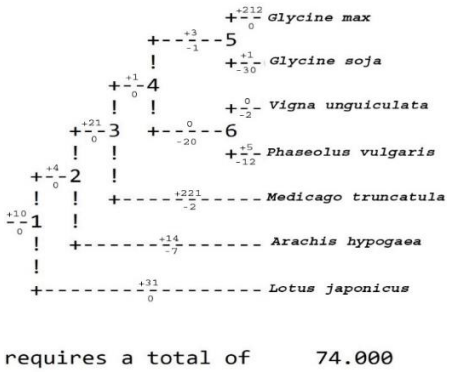
مکان ژنومی توالی‌های پیش‌ساز miRNA های پیش‌بینی شده از طریق انجام همردیف‌سازی برای گونه‌هایی که ژنوم آنها به طور کامل توالی یابی شده بود، جستجو و مشخص شد. برای گونه‌هایی که ژنوم آنها به‌طور کامل توالی یابی شده بود (۳ گونه شامل: *Glycine max*، *Medicago truncatula*، *Phaseolus vulgaris*)، توالی‌های پیش‌ساز miRNA شناسایی شده مکان‌یابی شد. برای برخی از توالی‌های پیش‌ساز دارای یک جایگاه ژنومی و برخی بیش از یک جایگاه ژنومی شناسایی شد. فاصله جایگاه های ژنومی در روی کروموزوم مشابه، مختلف شناسایی شد. برخی از توالی‌ها دارای مکان ژنومی بر روی کروموزوم‌های مختلفی شناسایی شد. برای برخی از توالی‌های پیش ساز نیز مکان ژنی مشخصی بر روی ژنوم گونه مورد نظر پیدا نشد. همچنین ژن‌های miRNA بر روی هر دو رشته‌های مثبت و منفی ژنومی شناسایی شد (فایل ضمیمه شماره ۲).

۲-۳ روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA در گونه‌های گیاهی خانواده بقولات

وجود و یا نبود خانواده‌های miRNA در گونه‌ها به‌صورت دو خصوصیتی (عدد یک برای خانواده موجود و عدد صفر برای خانواده غایب) در فایل جداگانه‌ای تهیه شد (فایل ضمیمه ٤). نکته قابل توجه در خصوص این لیست، نبود خانواده مشترک در لیست همه گونه‌های مورد مطالعه می باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که خانواده اختصاصی miRNA در خانواده بقولات تاکنون شناسایی نشده است. روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه بر اساس ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA در بین گونه‌ها و جنس‌ها توسط مدل بیشینه پارسیمونی دولو مدل شد. نتایج به‌دست آمده روابط بین گونه‌ها بر ا ساس روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA مشخص کرد (شکل ۱). نتیجه مقایسه درخت فیلوژنتیکی ترسیمی بر

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

شکل ۱ توپولوژی درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA



شـــکل ۲. روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA در درخت روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه به شـــیوه مدل بیشـــینه پارسیمونی دولو. اعداد نمایش داده شده بر روی مسیرهای تکاملی نشان دهنده تعداد خانواده‌های ایجاد شده(+) و از بین رفته(−) در طول مسیر تکاملی را نمایش می‌دهد.

ا ساس روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA در گونه های مورد مطالعه با درخت فیلوژنتیکی آنها نشان داد توپولوژی درخت فیلوژنتیکی تر سیم شده بر ا ساس روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های ژنی miRNA و درخت پیش‌بینی روابط فیلوژنتیکی آنها تفاوت نسـبتا زیادی باهم دارد. این مورد پی شتر در مورد گیاهان دولپه‌ای م شاهده و گزارش شـده اسـت [۱٤.] همچنین، در این مطالعه روند ایجاد و از بین رفتن خانواده های miRNA در گو نه های گیاهی خانواده بقولات بر ا ساس بی شینه پار سیمونی دولو در بین جنس‌ها و گونه‌های این خانواده بر اسـاس درخت فیلوژنتیکی خانواده مذکور بر سی شد و زمان تقریبی پدید آمدن و از بین رفتن خانواده‌های miRNA در طول زمان تکاملی آنها پیش‌بینی شد (شکل ۲).

بر این اســـاس این امکان فراهم آمد تا زمان تقریبی پدید آمدن و از بین رفتن خانواده‌های مختلف miRNA ها در طول زمان تکاملی قابل پیش‌بینی باشـد. نیز خانواده‌های به وجود آمده و از بین رفته در اجداد این گونه ها در خانواده پیش‌بینی شود (جدول ۱).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

جدول ۱. لیســت خانواده‌های miRNA به وجود آمده و از بین رفته در گونه‌ها و اجداد آنها در طول زمان تکاملی بر اســاس مدل بیشــینه پارسیمونی دولو بر اساس ارتباط فیلوژنتیکی گونه‌ها.

مسیر تکاملی	تعداد miRNA های اضافه شده	خانواده‌های میکروآر ان ای های اضافه شده	تعداد miRNA های حذف شده	خانواده‌های miRNA های حذف شده
ریشه به مسیر 1	10	167-171-172-390-396-397-408-1507-211-9722	0	-
ریشه درخت به گونه *Lotus japonicus*	10		0	-
مسیر 1 به 2	4	156-159-160-398	0	-
مسیر 2 به 3	21	162-164-166-168-169-319-1530-5037-393-395-399-482-530-1509-1510-1521-5281-5559-5761	0	-
مسیر 3 به 4	1	1533	0	-
مسیر 4 به 5	3	158-2109-3522	1	2595
مسیر 5 به *Glycine max*	218	1521-395-403-828-854-862-1534-1535-1536-2107-2108-1522-1523-1524-1525-1526-1527-1528-1529-1530-1531-1532-4340-4341-4342-4343-4344-4345-4346-4347-4348-4349-4350-4351-4352-4353-4354-4355-4356-4357-4358-4359-4360-4361-4362-4363-4364-4365-4367-4368-4369-4370-4371-4372-4373-4374-4375-4376-4377-4378-4379-4380-4381-4382-4383-4384-4385-4386-4387-4388-4389-4390-4391-4392-4393-4394-4395-4396-4397-4398-4399-4400-4401-4402-4403-4404-4405-4406-4407-4408-4409-4410-4411-4412-4413-4414-4415-4416-4992-4993-4994-4995-4996-4997-4998-5030-5031-5032-5033-5034-5035-5036-5038-5039-5040-5041-5042-5043-5044-5225-5368-5369-5370-5371-5372-5373-5374-5375-5376-5377-5378-5379-5380-5667-5668-5669-5670-5671-5672-5673-5674-5675-5676-5677-5678-5679-5762-5763-5764-5765-5766-5767-5768-5769-5770-5771-5772-5773-5774-5775-5776-5777-5778-5779-5780-5781-5782-5783-5784-5785-5786-6299-6300-9723-9724-9725-9726-9727-9728-9729-9730-9731-9732-9733-9734-9735-9736-9737-9738-9739-9740-9741-9742-9743-9744-9745-9746-9747-9748-9749-9750-9751-9752-9753-9754-9755-9756-9757-9758-9759-9760-9761-9762-9763-9764-9765-	0	-
مسیر 5 به *Glycine soja*	1	2218	30	156–159–160–162–163–166–168–169–171–172–319–390–393–395–396–397–398–399–408–530–1533–2111–2118–2119–5037–5281–5559–5761–9722–
مسیر 4 به 6	0	–	20	159–166–167–171–1509–1510–5559–390–393–

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

396–397–398–530–2114–2119–2606–5037–5281–5761–9722–				
1533–2595	2	–	0	مسیر 6 به *Vigna unguiculata*
160–162–164–168–169–172–395–399–408–482–1507–2118	12	779–1435–1438–2019–5140–5185	5	مسیر 6 به *Phaseolus vulgaris*
171–9722	2	2086–2087–2088–2089–2199–4114–5554–5555–5556–5557–5558–5560–5561–5562–5563–2585–2586–2587–2588–2589–2590–2591–2592–2593–2595–2596–2597–2598–2599–2600–2601–2602–2603–2606–2607–2608–2609–2610–2611–2612–2613–2614–2615–2616–2617–2618–2619–2620–2621–2622–2623–2624–2625–2626–2627–2628–2629–2630–2631–2632–2633–2634–2635–2636–2637–2638–2639–2640–2641–2642–2643–2644–2645–2646–2647–2648–2649–2650–2651–2652–2653–2654–2655–2656–2657–2658–2659–2660–2661–2662–2663–2664–2665–2666–2667–2668–2669–2670–2671–2672–2673–2674–2675–2676–2677–2678–2679–2680–5204–5205–5205–5206–5207–5208–5209–5210–5211–5212–5213–5214–5215–5216–5217–5218–5219–5220–5221–5222–5223–5224–5225–5226–5227–5228–5229–5230–5231–5232–5233–5234–5235–5236–5237–5238–5239–5240–5241–5242–5243–5244–5245–5246–5247–5248–5249–5250–5251–5252–5253–5254–5255–5256–5257–5258–5259–5260–5261–5262–5263–5264–5265–5266–5267–5268–5269–5270–5271–5272–5273–5274–5275–5276–5277–5278–5279–5280–5282–5283–5284–5285–5286–5287–5288–5289–5290–5291–5292–5293–5294–5295–5296–5297–5298–5299–5679–5740–5742–5743–5744–5745–5746–5747–5748–5749–5750–5751–5752–5753–5754–5755–5756–5757–5758–5759–5780–5781–5782–5783–5784–5785–	221	مسیر 3 به *Medicago truncatula*
171–172–390–396–397–2111–9722	7	3508–3509–3510–3511–3512–3513–3514–3515–1516–3517–3518–3519–3520–3521–	14	مسیر 2 به *Arachis hypogaea*
–	0	7516–7517–7518–7519–7520–7521–7522–7523–7524–7525–7526–7527–7528–7529–7530–7531–7532–7533–7534–7535–7536–7537–7538–7539–7540–7541–7542–7543–7544–7545–7546–	31	مسیر 1 به *Lotus japonicus*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

٤-بحث

مطالعه miRNA ها می‌تواند به‌عنوان زمینه‌ای با چشم انداز مطلوب و دارای کارایی مناسب برای مهندسی ژنتیک برای افزایش محصولات غذایی و تعدیل اثرات مربوط به تغییرات آب و هوایی ایجاد شده در سطح جهانی ناشی از فعالیت‌های جوامع انسانی بر روی گیاهان و نیز به منظور ایجاد امنیت غذایی از اهمیت ویژه ای برخوردار باشد[٢٥]. شناسایی miRNA ها بر اساس جستجوی توالی‌های حامل توالی‌های miRNA هومولوگ با توالی‌ها بالغ miRNA شناسایی شده در درون توالی های نسخه‌برداری شونده یکی از شیوه‌های کارآمد در شناسایی توالی‌های miRNA به شمار می‌آید [٢٦] که در تلفیق با اطلاعات حاصل از توالی یابی، منجر به شناسایی تعداد زیادی ژن‌های miRNA شده است. توالی‌های نسخه‌برداری شونده در شرایط مختلف سلول از روی ژنوم رونویسی می‌شوند. تعداد توالی‌های miRNA قابل شناسایی برای یک گونه بستگی به تعداد توالی‌های رونویسی مطالعه شده و ثبت شده برای آن گونه در پایگاه داده مربوطه دارد. در گیاهان، هرچند توالی‌های پیش‌ساز miRNA حفاظت شده نمی‌باشد، ولی دارای خصوصیات مشخص و قابل تمایزی در ترکیب توالی، طول و ساختار دوم می‌باشند، که امکان تمایز چنین توالی هایی را از توالی های مشابه به دیگر امکان‌پذیر می‌کند [٢٧]. در مطالعه حاضر برای بروز رسانی لیست miRNA های شناسایی شده برای گونه‌های مورد مطالعه بقولات، شناسایی توالی‌های miRNA و خانواده‌های آنها مورد توجه قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد دستورالعمل به کارگرفته شده از کارایی مناسبی در شناسایی توالی‌های دارای ساختارهای مشابه ساختار توالی‌های miRNA پیش ساز که حامل توالی‌های هومولوگ بالغ می‌باشند، برخوردار است. گرچه این شیوه دارای ایراداتی نیز می‌باشد. یکی از ایرادهایی که دستورالعمل تهیه شده برای جستجوی اینگونه توالی‌ها دارد، این است که تعداد miRNA های شناسایی شده علاوه بر تعداد توالی‌های رونویسی مطالعه شده و ثبت شده بسیار وابسته به پارامترهای تعریف شده بر اساس ویژگی‌های توالی‌های miRNA می‌باشد. یکی دیگر از ایرادهای این دستورالعمل، عدم شناسایی توالی‌های پیش‌ساز miRNA ایی است که در اثر فرآوری آنزیمی RNA های غیر رمزگذار دیگر مانند RNA های ناقل[1] [١٧] ایجاد می‌شوند.

در این مطالعه تعداد زیادی توالی های ایزو miRNA (miRNA هایی که در یک یا چند توالی در دو انتهای توالی miRNA بالغ باهم اختلاف دارند[٩]) در توالی‌های به‌دست آمده مشاهده شد. به نظر می‌رسد ایجاد چنین توالی‌هایی از توالی‌های پیش‌ساز در نتیجه فعالیت انواع آنزیم‌های DCL[2] باشد. که در گیاهان تعداد زیادی از انواع این آنزیم‌ها در طول زمان تکامل گونه‌های گیاهی پدید آمده است [٢٧] و یا ممکن است نتیجه اشتباه در برش توالی بالغ miRNA توسط این آنزیم باشد [١٩و ٢٨] و ارتباطی با فعالیت پارالوگ‌ها نداشته باشد [٢٨]. در این مطالعه ایزو miRNA ها به دلیل تعلق به یک جایگاه‌ژنی، چشم‌پوشی شدند.

توالی‌های پیش‌ساز هم‌خانواده مضاعف‌شده[3] (خوشه شدن[4]) در گونه‌ها به فراوانی مشاهده شد (فایل ضمیمه ٢). فاصله بین توالی‌های مضاعف شده در گیاهان بسیار متنوع مشاهده شد. مضاعف شدن توالی‌های پیش‌ساز در گیاهان فراوان دیده می‌شود و گزارش‌های دیگری از آنها در منابع مختلف آمده است [١٠ و ٢٩]. جایگاه‌های ژنومی توالی‌های پیش‌بینی شده متفاوت یک توالی پیش ساز این امکان را فراهم می‌سازد که در شرایط مختلف امکان رونویسی از جایگاه‌های متفاوت داشته باشد. توالی‌هایی که در جایگاه‌های مختلف به‌صورت یکسان مشاهده

1 Transfer RNA (tRNA)
2 Dicer like protein (DCL)
3 Duplication
4 Clustring

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

می‌شـــوند، نتیجه پدیده مضــاعف شـــدن ژن در زمان‌های بســـیار نزدیک می‌باشـــند. کپی‌های توالی با فاصـــله‌های مختلف بر روی یـک کروموزوم و حتی بر روی کروموزوم‌های دیگر مشاهده می شود. مضاعف شدن یک ژن از فشـــار انتخاب طبیعی بر روی آن کاســـته و امکان ایجاد تغییرات نوکلئوتیدی بیشتر را هم بر روی توالی‌های پیش‌ســاز و هم بر روی توالی‌های بالغ فراهم می‌ســازد و موجب ایجاد تعدد پارالوگ در miRNA بر روی ژنوم می‌شود. خوشه‌شدن توالی‌های پیش‌ساز غیرهم‌خانواده هر چند در جانوران معمول اســـت [۳۰]، در گیاهان به‌ندرت دیده می شود [۳۱]. این گونه خو شه‌ها به دلیل اینکه باهم رونویسی می‌شوند، به‌نظر می‌رسد بر روی یک شبکه ژنی به‌طور هم‌زمان موثر باشند[۳۱].

تعدادی از توالی‌های پیش ساز پیش‌بینی شده در ترکیب توالی خود دارای توالی های مشـــا به ترانســـپوزونی و رتروترانسپوزونی می‌باشند (فایل ضمیمه شماره۳). شواهد نشان می‌دهد ترانسپوزون‌ها و رتروترانسپوزون‌ها در ایجاد تعـداد زیـادی از خـانواده‌هـای miRNA گیـاهی موثر بوده‌اند[۳۳]. ممکن است یکی از شیوه‌های ترانسپوزون‌ها و رتروترانسپوزون‌ها در تکامل گیاهان به واسطه مشارکت آنها در ایجاد برخی توالی‌ها و خانواده‌های miRNA باشد. همچنین، ممکن است شناسایی توالی‌های ترانسپوزونی و رتروترانســـپوزونی در توالی برخی miRNA ها که دارای تعداد زیادی توالی‌های مضـــاعف شـــده یا تعداد زیادی پارالوگ miRNA در ژنوم می‌باشـــند، ارتباط مســـتقیم با فعالیت ترانســپوزون‌ها و رتروترانســپوزون‌ها در این گونه داشـــته باشـــد. همچنین، اولین نوکلئوتید انتهای ′۵ در توالی‌های بالغ دارای اهمیت زیادی اســـت. اهمیت نوع نوکلئوتید در ابتدای′۵ توالی بالغ در تمایل خانواده پروتئین خانواده ای‌جی‌او به اتصـــال با توالی miRNA بالغ عنوان شده است [۹ و ۳۲].

در مورد برخی توالی‌های پیش‌ســـاز، جایگاه ژنومی آنها بر روی ژنوم گونه مورد مطالعه یافت نشـد. فقدان جایگاه ژنومی برخی توالی‌های پیش‌ســـازی که به شـــیوه‌های آزمایشگاهی یا بیوانفورماتیکی شناسایی شده است در منابع مختلف نیز گزارش شـــده اســـت [۱۱ و ۱۵]. به‌نظر می‌رسد یکی از علل عدم شناسایی جایگاه ژنومی در مورد برخی از توالی‌های پیش‌ساز به دلیل تغییراتی است که پس از رونویســـی جایگاه ژنومی و ایجاد توالی اولیه miRNA بر روی توالی رخ می‌دهـد[۳۳ و۳٤]. چنین تغییرات در توالی‌های رونویسی شونده رمزگذار پروتئین و تبدیل آنها به RNA پیک (پیامبر) بالغ مشاهده می‌شود[۳۵].

در این پژوهش روابط بین گونه‌ها بر اســاس روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA به شـیوه مدل بیشـینه پارسیمونی دولو مدل شد. بر اساس این مدل روند ایجاد و از بین رفتن خـانواده‌هـای miRNA بـا ارتبـاط فیلوژنی گونه‌ها همخوانی نداشته است. این نتیجه شاید به این دلیل باشد که miRNA ها به تنهایی در تنوع ایجاد شده در طول زمان تکاملی موثر نبوده‌اند و وجود و نبود آنها به‌تنهایی نمی‌تواند عامل ایجاد تنوع در این گیاهان باشـــد. هر چند تداوم ایجاد آنها در گونه‌ها و نقش آنها به‌ویژه در بهبود واکنش گیاه به عوامل و اســترس‌های محیطی باعث شــده در طول زمان تکاملی موجب ســازگاری بیشــتر آنها شــود [۳٦]. همچنین، روند ایجاد و از بین رفتن خانواده‌های miRNA در این گونه‌ها بر اساس مدل بیشینه پارسیمونی در درخت روابط فیلوژنتیکی شـناخته شـده نشـان می‌دهد برخی از خانواده‌های شـــناخته شـــده اخیرا در این گونه‌ها ایجاد شـــده‌اند و اختصـــاصـــی گونه‌اند (جداول ۱). به‌نظر می‌رسد ایجاد گونه‌های جدید در طول تکامل آنها با ایجاد و از بین رفتن برخی خانواده‌های همراه بوده است (جدول ۱).

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0] [Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

۵- منابع

[1] Hajieghrari B, Farrokhi N (2022) Plant RNA-mediated gene regulatory network. Genomics 114 (1), 409-442.

[2] Farrokhi N, Hajieghrari B (2020) Chronicles of dolos and apate in plant microRNAs. Biologia

[3] Budak H, Akpinar BA (2015) Plant miRNAs: biogenesis organization and origins. Funct Integr Genomics 15:523–531. https://doi.org/10.1007/s10142-015-0451-2

[4] Rogers K, Chen X (2013) Biogenesis, Turnover, and mode of action of plant micro RNAs. The Plant Cell, 25:2383-2399.

[5] Voinnet O (2009) Origin biogenesis and activity of plant microRNAs. Cell 136:669–687. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046

[6] Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. Biochemica et Biophysica Acta, 1819:137-148.

[7] Hajieghrari B, Farrokhi N, Goliaei B, Kavousi K (2019) The role of microRNAs in defense against viral phytopathogens. Physiol Mol Plant Pathol 107: 8–13.

[8] Nozawa M, Miura S, Nei M (2012). Origins and evolution of micro RNA genes in plant species. Genome Biol Evol, 4(3): 230-239

[9] Ebhardt H A, Fedynak A, Fahlman RP (2010) Naturally occurring variations in sequence length creates micro RNA isoforms that differ in Argonaut effector complex specificity. Silence, 1:12.

[10] Dhandapani V, Ramchiary N, Paul P, et al (2011) Identification of potential micro RNAs and their targets in *Brassica rapa* L. Mol Cells, 32:21-37.

[11] Hajieghrari, B, Farrokhi N, Goliaei B, Kavousi K (2019b) *In silico* identification of conserved miRNAs from *Physcomitrella Patens* ESTs and their target characterization. Curr Bioinformatics, 12(6)

[12] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Van Dongen S, et al (2006) MiRBase: micro RNA sequences targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res, 34 D140–4.

[13] Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ (2008). MiRBase: tools for micro RNA genomics. Nucleic Acids Res, 36 D154–8.

[14] Hajieghrari B, Farrokhi N (2020) Investigation on the conserved microRNA genes in higher plants. Plant Molecular Biology Reporter. https://doi.org/10.1007/s11105-020-01228-9

[15] Hajieghrari B, Farrokhi N, Goliaei B, Kavousi K (2015) Computational identification, characterization and analysis of conserved miRNAs and their targets in *Amborella Trichopoda*. J Data Mining Genomics Proteomics 6:2.

[16] Hajieghrari B, Farrokhi N, Goliaei B, Kavousi K (2016) Identification and characterization of novel miRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* by computational methods. MicroRNA 5:66-77.

[17] Rother S, Meister G (2011) Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. Biochimie, 93(11):1905-15.

[18] Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, et al (2008) Criteria for annotation of plant Micro RNAs. Plant Cell, 20(12):3186-90.

[19] Kurihara Y, Watanabe Y (2004) Arabidopsis micro- RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101:2753–2758.

[20] Kohany O, Gentles AJ, Hankus L, Jurka J (2006) Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. BMC Bioinformatics, 25(7):474.

[21] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 215:403-410.

[22] Budak H, Bulut R, Kantar M, Alptekin B (2015) Micro RNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. Brif Funct Gen, 15(1): 1-7.

[23] Kohany O, Gentles AJ, Hankus L, Jurka J (2006) Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. BMC Bioinformatics, 25(7):474.

[24] Smit AFA, Hubley R, Green P (2013) RepeatMasker.

[25] Nekrutenko A, Taylor J (2012) Next-generation sequencing data interpretation: enhancing reproducibility and accessibility. Nat Rev Genet, 13(9): 667-72.

[26] Dezulian T, Remmert M, Palatnik JF, et al (2006) Identification of plant micro RNA homologs. Bioinformatics. 22(3):359-360.

[27] Margis R, Fusaro AF, Smith NA, et al (2006) The evolution and diversification of Dicers in plants. FEBS Letters, 580:2442-2450.

[28] Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC (2011) Evolution and functional diversification of mi RNA genes. The Plant Cell, 23:431-442.

[29] Axtell MJ (2013) Classification and comparison of small RNAs from plants. Annu Rev Plant Biol, 64:137-196.

[30] Naqvi AF, Islam N, Choudhury NP, Haq QMH (2009) The fascinating world of RNA interference. Int J Biol Sci, 5(2): 97–117.

[31] Li A, Mao L (2006). Evolution of plant micro RNA gene families. Cell Res, 1-7.

[32] Rogers K, Chen X (2013) Biogenesis, Turnover, and mode of action of plant micro RNAs. The Plant Cell, 25:2383-2399.

[33] Kruszka K, Barneche F, Guyot F et al (2013) Plant dicistronic tRNA–snoRNA genes: a new mode

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

of expression of the small nucleolar RNAs processed by RNase Z. EMBO J 22(3): 621–632.
[34] Mica E, Piccolo V, Delledonne M, et al (2009) High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in *Vitis vinifera*. BMC Genomics, 10:558.
[35] Will CL, Lührmann R (2011). Spliceosome structure and function. Cold Spring Harb Perspect Biol, 3(7): a003707.
[36] Chen X (2005). Micro RNA biogenesis and Function in plants. FEBS Letter, 579:5923-5931.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]

In silicon prediction of conserved miRNAs in Leguminosae and their gains and losses during evolutionary process

Behzad Hajieghrari[1*], Mojahed Kamalizadeh[2]

1. PhD. Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
2. PhD. Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran.

bheghrari@yahoo.com

Receipt: 2021/09/02 Accepted: 2022/06/12

Abstract

Leguminosae is one of the most important plant families. In this study, we searched *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, *G. soja*, *Lotus japonicas*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris*, and *Vigna unguiculata* conserved miRNAs through Expressed Sequence Tag (EST) based-homology method. All candidate sequences with appropriate fold-back structures were screened and characterized according to several filtering criteria. Chromosomal MIR locus and their distributions determined. The Dollo maximum parsimony was employed to construct the species relationship based on the MIR birth and death. Also, the number of MIRs gains and losses in the evolutionary process. In addition, we estimated the numbers of MIRs in their ancestral species using Dollo maximum parsimony in their phylogenetic tree. We found 414 novel miRNAs from 130 MIR families meeting the restricted filtering criteria. Either evolutionary time or the number of miRNAs gains and losses are estimated and characterized in the ancestral species based on the taxon-based phylogenetic tree. It speculates that gains of miRNA gene families within Leguminosae have accelerated during its evolutionary time. In addition, several taxon-specific MIR families find to assign diverse taxon and their species. Our thorough analyses resulted in the definition of some miRNA families as being lineage-specific. Therefore, they can use as markers in future systematic studies.

Keywords: microRNA, Leguminosae, Maximum Dollo parsimony, EST based-homology search.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-21]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.14.1.4.0]