

بررسی بیوانفورماتیکی microRNAهای دخیل در تنش سرما و اثر آن‌ها بر پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم اسیدهای چرب در کلزا (*Brassica napus* L.)

محمد مهدی تقوایی¹، حبیب‌الله سمیع‌زاده لاهیجی^{2*}، محمدرضا بختیاری‌زاده³، محمد محسن‌زاده گل‌فازانی⁴

1. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

2. استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

3. استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

4. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: 1398/6/1 - تاریخ پذیرش: 1398/9/22)

Bioinformatics analysis of microRNAs related to cold stress and their effects on proteins associated with fatty acids metabolism in rapeseed (*Brassica napus* L.)

Mohammad Mahdi Taghvaei¹, Habibollah Samizadeh Lahiji^{2*}, Mohammad Reza Bakhtiarizadeh³, Mohammad Mohsenzadeh Golafazani⁴

1. Ph.D. Candidate of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University Campus 2, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Sciences, Aburayhan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Iran

4. Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran.

(Received: Aug. 23, 2019 - Accepted: Dec. 13, 2019)

Abstract

Rapeseed (*Brassica napus*) is one of the most important oil plants in the world. Not only it has rich sources of fatty acids, but also contains protein. Cold stress is one of the growth limiting factors for this plant, which causes massive molecular changes inside the plant. In this research miRNAs, bna-miR164a, bra-miR5712, bra-miR5717, bna-miR6029, bna-miR6035, bna-N_miR2, bna-N_miR16 that previously had been studied separately in cold and fatty acid biosynthesis, were selected for investigation of the relationship between microRNAs, Cold stress, Fatty Acids and Lipids. Afterwards, bioinformatics prediction of target genes, investigation of gene ontology and their functional pathway and mapping of protein interactions network were performed. As a result, it was discovered that miRNAs which are effective in cold stress, beside regulation of target genes such as SCRM2, HOS1, STZ, GLP4, PP2CA, which are responsible for cold response and thermal stimulus-response, also have regulatory roles on other target genes such as KAS2, FAD8, FAD4, AAD3, FAD7, FAD2 which are involved in biological processes such as unsaturated fatty acid biosynthesis, unsaturated fatty acid metabolism, fatty acid biosynthesis, fatty acid metabolism, cellular lipid catabolism and lipid metabolism, lipid biosynthesis, cellular lipid metabolism. Evaluation of Protein-Protein Interactions revealed that there was a relation between the target genes involved in fatty acid biosynthesis and the target genes involved in cold stress. The next step for subsequent research is to investigate the expression of these miRNAs and their target genes during cold stress and further experimental verifications to prove the regulatory relationship between them.

Keywords: Gene Ontology, KEGG, Protein-protein interaction, STRING.

چکیده

کلزا (*Brassica napus*) از مهم‌ترین گیاهان روغنی در سطح جهان است که علاوه بر دارا بودن ذخایر غنی اسیدهای چرب، حاوی پروتئین نیز می‌باشد. تنش سرما از عوامل محدودکننده رشد این گیاه است که می‌تواند منجر به تغییرات وسیعی به لحاظ مولکولی در درون گیاه شود. در پژوهش حاضر، به منظور بررسی ارتباط بین مولکول‌های miRNA، تنش سرما، اسیدهای چرب و لیپیدها، مولکول‌های miRNA با اسامی bna-miR164a، bra-miR5712، bra-miR5717، bna-miR6029، bna-miR6035، bna-N_miR2، bna-N_miR16 که قبلاً به صورت جداگانه در سرما و بیوسنتز اسیدهای چرب بررسی شده بودند، انتخاب شدند. سپس پیش‌بینی بیوانفورماتیکی ژن‌های هدف، بررسی هستی‌شناسی و مسیر عملکردی آن‌ها و ترسیم شبکه برهم‌کنش پروتئین‌ها انجام شد. در نتیجه مشخص شد مولکول‌های miRNA که در تنش سرما مؤثرند، علاوه بر اثر تنظیمی بر ژن‌های هدفی همچون SCRM2, HOS1, STZ, GLP4, PP2CA که در پاسخ به سرما و پاسخ به محرک دمایی تأثیر گذارند، بر ژن‌های هدف دیگری همچون KAS2, FAD8, FAD4, AAD3, FAD7, FAD2 که در مسیر فرآیندهای بیولوژیکی مانند بیوسنتز اسید چرب اشباع‌نشده، متابولیسم اسید چرب غیراشباع، بیوسنتز اسید چرب، متابولیسم اسید چرب، کاتابولیسم لیپید سلولی و متابولیسم لیپید، بیوسنتز لیپید، متابولیسم لیپید سلولی نقش دارند نیز اثر گذارند. بررسی برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین نیز حاکی از ارتباط ژن‌های هدف درگیر در تنش سرما با ژن‌های هدف درگیر در بیوسنتز اسیدهای چرب بود. گام بعدی در پژوهش‌های پیش رو بررسی بیان این مولکول‌های miRNA و ژن‌های هدف در طی تنش سرما است تا وجود ارتباط تنظیمی میان آن‌ها توسط روش‌های آزمایشگاهی مورد تأیید بیش‌تر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: برهم‌کنش پروتئین-پروتئین، هستی‌شناسی، KEGG، STRING.

مقدمه

کلزا (*Brassica napus*) به‌عنوان مهم‌ترین منابع روغن برای مصرف غذایی و صنعتی محسوب می‌شود، اغلب با تنش‌های غیر زیستی از جمله دمای پایین مواجه است که پیامد آن تأخیر در رشد گیاه و حتی مرگ می‌باشد (Chen *et al.*, 2011). به دلیل اهمیت این نبات در حوزه‌های زیستی و کشاورزی باید مکانیسم ملکولی مقاومت به سرما در کلزا درک شود. در تولید محصولات زراعی، دمای پائین به‌عنوان یک محدودیت محسوب می‌گردد (Andrews, 1987). مقاومت گیاهان در مقابل تنش سرما مشتمل بر تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین تغییر در میزان بیان ژن‌ها در گیاهان است. استرس سرما منجر به کاهش رشد و نمو گیاه می‌شود، همچنین تغییر ترکیب فیزیکی و شیمیایی غشاهای سلول باعث نشت الکترولیت شده و به دنبال آن جریان پروتوپلاسمیک کاهش یافته و تغییر در متابولیسم سلولی رخ می‌دهد (Thomashow, 1999). پاسخ‌های بعدی به سرما به‌صورت تغییرات در ترکیب اسیدنوکلئیک و پروتئین، تشکیل آنزیم، تعادل آب و مواد مغذی و اختلال فتوسنتز، به‌طور خاص آسیب فتوسیستم¹2 (PSII) دیده می‌شود (Chinnusamy *et al.*, 2007). گیاهان می‌توانند به کمک فرآیند سازگاری به سرما² درجه حرارت دماهای پایین (0 تا 15 درجه سانتی‌گراد) را تحمل کنند (Thomashow, 1999; Chinnusamy *et al.*, 2010). تغییرات در ترکیب پروتئین‌ها و چربی‌های غشا مکانیسم‌هایی هستند که کمک می‌کند سلول‌ها سرما را حس کنند (Takahashi *et al.*, 2013). سیالیت غشای پلاسما از منظر ساختاری و عملکردی برای نقش متابولیکی و فیزیکی آن از اهمیت بالایی برخوردار است. غشا پلاسما که در دمای بالا به حالت مایع است در دمای پایین به یک فاز ژل مانند

تبدیل می‌شود، کاهش دما در غشاها منجر به افزایش سطح چربی‌های غیراشباع و افزایش ثبات در غشا می‌شود در نتیجه به سلول اجازه می‌دهد که به‌صورت مکانیکی با سرما سازگاری ایجاد کند (Miquel *et al.*, 1993; M. Chen and Thelen, 2013). از دیگر مکانیسم‌های درک سرما که به‌طور کامل شناخته نشده است، کانال‌های کلسیم، گیرنده‌های مرتبط با کینازها و G-پروتئین‌ها است. به‌طور معمول، سرما باعث ایجاد یک آبشار سیگنالینگ می‌شود که در واقع شامل جریان کلسیم و پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم³ (CDPKs)، آبشارهای کینازی⁴ (MAP) است و همچنین منجر به ایجاد مولکول‌های سیگنالینگ لیپیدی مانند فسفاتیدیک اسید، دی‌آسیل گلیسرول و اینوزیتول فسفات، می‌شود که به‌طور کل بر بیان ژن‌ها تأثیرگذار هستند. بیوسنتز لیپید شامل فرآیندهای است که در اندامک‌های مختلف سلولی مانند پلاستیدها، شبکه اندوپلاسمی⁵ (ER) و سیتوزول بوده و با استفاده از مسیرهای پیچیده انجام می‌شود. سنتز اسید چرب با استفاده از جریان کربنی حاصل از فتوسنتز به شکل پیرووات که در پلاستید قرار دارد انجام می‌شود و پس از آن تولید مولکول‌های چرب پیچیده تر از زنجیرهای آسیل چربی در پلاستید یا با انتقال به سیتوزول و شبکه اندوپلاسمی (ER) صورت می‌گیرد. این عمل بر اساس تقاضا برای زنجیره‌های آسیل تنظیم می‌شود و تولید آن مطابق با نیاز گیاه انجام می‌شود (Ohlrogge and Jaworski, 1997; Li-Beisson *et al.*, 2013). اولین خط دفاع فیزیکی در برابر تنش‌های زنده، کوتیکول‌های برگ است. کوتین و سوبرین موجود در دیواره سلولی گیاهان، پلیمرهای مشتق‌شده از اسید چرب هستند که موانع

3. Ca dependent protein kinases

4. Mitogen-activated protein

5. Endoplasmic reticulum

1. Photosystem II

2. Cold acclimation

در یوکاریوت‌ها را از طریق مهار ترجمه یا تخریب توالی‌های mRNA تنظیم می‌کنند. نواحی هدف اکثر مولکول‌های microRNA در گیاهان، اغلب در چارچوب خوانش باز^۲ (ORF) بوده و به ندرت، در انتهای '5' UTR، '3' UTR یا در توالی‌های RNA غیر کدکننده وجود دارند (Megha, Basu, Joshi, et al., 2018). مولکول‌های microRNA از طریق قطعه‌قطعه کردن توالی‌های mRNA هدف و یا جلوگیری از ترجمه، فعالیت تنظیمی خود را اعمال می‌کنند (Unver et al., 2009). مولکول‌های microRNA منشأ درون‌زاد^۳ دارند و توسط RNA pol II از روی ژنهای MIR رونویسی می‌شوند که این محصول Pri-miR نامیده می‌شود و ساختار سنجاق سری داشته و در انتهای '3' آن دم پلی A و در انتهای '5' کلاهک دارد. پردازش مولکول‌های microRNA در گیاهان توسط Dicer-like در هسته انجام می‌شود که در نتیجه این عمل Pri-miRNA به Pre-miRNA تبدیل می‌شود و در نهایت مولکول‌های microRNA دو رشته‌ای 21-24 نوکلئوتیدی بالغ تولیدشده و به سیتوپلاسم منتقل می‌شود، سپس یکی از دو رشته microRNA در کمپلکس RISC^۴ قرار می‌گیرد، انتخاب تک رشته براساس خصوصیات ترمودینامیکی است. microRNA بالغ از طریق جفت شدن نسبی یا کامل با توالی‌های mRNA هدف باعث تجزیه یا مهار ترجمه می‌شود. عامل کلیدی در مکانیسم کارکردی miRNA وجود بازهای مکمل بین ژن هدف و miRNA است. گیاه به محض قرار گرفتن در شرایط تنش و دریافت علامت‌های محیطی تغییراتی را در سطح مولکولی ایجاد می‌کند، از جمله این اتفاقات تغییر در بیان مولکول‌های microRNA است.

شیمیایی و فیزیکی را به وجود می‌آورند که سلول را از پاتوژن‌های خارجی محافظت می‌کنند و حرکت گازها، آب را کنترل می‌کنند (Shepherd and Wynne Griffiths, 2006). در واقع نخستین قسمتی که اثرات زیان‌آور تنش را تجربه می‌کنند غشای پلاسما است که به‌عنوان مانع اصلی میان ارگانیسم و محیط خارجی در نظر گرفته می‌شود. تغییرات در ترکیب / ساختار چربی در غشای پلاسما تحت تنش‌های محیطی برای حفظ ثبات و عملکرد غشا ضروری است. به‌طور کلی، غشاهای بیولوژیک نه تنها در حفاظت، هوموستازی و متابولیسم سلول نقش مهمی دارند، بلکه همچنین در تشخیص سیگنال‌ها و آبشارهای سیگنالینگ نیز، اهمیت دارند (Steponkus, 1984; Z. Xin and Browse, 2000). بیان ژن ناشی از سرما می‌تواند به صورت گذرا یا بلند مدت انجام شود. بیان گذرا به‌طور کلی تا پنج ساعت در معرض قرار گرفتن در معرض سرما دیده می‌شود، درحالی‌که ژن‌هایی که بیان طولانی مدت دارند، در تمام دوره‌های استرس سرما فعال هستند. گیاهان اغلب به تنش سرما با افزایش غلظت لیپید غیراشباع غشایی، کاهش زنجیره، تغییر ترکیبات لیپید و یا تغییر نسبت چربی / پروتئین پاسخ می‌دهند (Takahashi et al., 2013). تحمل سرما در گیاهان پیشرفته تر با کمک ژن‌های دسچوراز^۱ امکان پذیر است (Wada et al., 1990; Ishizaki, 1996). (Nishizawa et al., 1996).

مولکول‌های microRNA توالی‌های RNA کوچک به طول تقریبی 21 تا 22 نوکلئوتید هستند که توسط ژنوم موجود کد شده، هیچ نوع پروتئینی را کد نمی‌کنند و به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم بیان ژن پس از رونویسی در گیاهان و جانوران شناخته شده‌اند (Bartel, 2004). مولکول‌های microRNA بیان ژن

2. Open reading frame
3. Untranslated region
4. Endogenous
5. RNA-induced silencing complex

1. Desaturases

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 براساس حداقل انرژی آزاد² (MFE)، بررسی حفاظت‌شدگی توالی موردنظر و بررسی حضور چندین جایگاه مکمل در هدف می‌باشد (Min and Yoon, 2010). در پژوهش حاضر سعی شده است تا با کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی و آنالیز شبکه پروتئینی برای اولین بار در کلزا، ارتباط مولکول‌های microRNA دخیل در سرما، با پروتئین‌هایی که در فرآیندهای مرتبط با اسیدهای چرب و لیپیدها دارای نقشی کلیدی هستند و به‌طور همزمان در سرما نیز مؤثرند، مورد بررسی قرار گرفته تا ابعاد جدیدتری از این ارتباطات درون سلولی آشکار شود.

مواد و روش‌ها

انتخاب miRNAها

این تحقیق بر پایه بررسی بیوانفورماتیکی مولکول‌های microRNA و ژن‌های هدف بالقوه آن‌ها به کمک الگوریتم‌های موجود در نرم‌افزارهای تحت وب و Stand alone صورت گرفته است. انتخاب مولکول‌های microRNA مورد بررسی با استفاده از داده‌های موجود در تحقیقات گذشته که به‌کمک تکنیک توالی‌یابی نسل جدید³ در زمینه تنش سرما و اسیدهای چرب صورت گرفته و همچنین با بررسی پایگاه داده miRBase (<http://miRbase.org/>) انجام گرفت (جدول 1). بر این اساس مولکول‌های microRNA با اسامی bna-miR164a، bra-miR5712، bna-miR6029، bna-miR6035، bna-N_miR2 و N_miR16 به‌منظور بررسی انتخاب شدند.

در دهه‌های اخیر، تعداد زیادی از مولکول‌های microRNA توسط توالی‌یابی ژنوم با کارایی بالا¹ شناخته شده‌اند (Meyers *et al.*, 2006; Sanei and Chen, 2015). مولکول‌های microRNA نقش مهمی در فرآیندهای رشد گیاهان شامل گل، برگ و رشد بذر، آغاز ریشه، انتقال فاز و رشد آوندی دارند (Moreno-Risueno *et al.*, 2012). علاوه بر این، مولکول‌های microRNA همچنین در پاسخ به استرس‌های زیستی یا غیر زیستی، مانند سرما، خشکی، شوری، اکسیداسیون نقش دارند (Seo *et al.*, 2013). مطالعه مکانیسم‌هایی که کنترل بیوژنز مولکول‌های microRNA تخریب و سطح فعالیت آن‌ها در گیاهان را نشان می‌دهد، یک حوزه تحقیقاتی مهم است. همچنین مطالعات اندکی در مورد نقش مولکول‌های microRNA در بیوسنتز اسیدهای چرب و متابولیسم لیپید و ارتباط آن‌ها با سرما در کلزا انجام شده است. امروزه محققان به روش‌هایی روی آورده‌اند که اهداف مولکول‌های microRNA را قبل از انجام آزمایش‌های تجربی و صرف زمان و هزینه‌های گزاف به دقت تعیین کنند. در واقع این روش‌ها می‌توانند باعث درک هر چه بهتر عملکرد مولکول‌های microRNA در روندهای زیستی و در نتیجه پیش‌بینی اثرات آن‌ها گردند. بر همین اساس ابزارهای پیش‌بینی متعددی ایجاد شده است تا محقق در ابتدا برهم کنش احتمالی ژن‌ها و مولکول‌های microRNA را با این ابزارها پیش‌بینی و سپس به تأییدسازی تجربی این برهم‌کنش‌ها و اثبات آن‌ها بپردازد (Riffo-Campos *et al.*, 2016). طی سال‌های اخیر با پیشرفت علم بیوانفورماتیک، ابزارهای متعدد محاسباتی پیشگویی کننده هدف برای مولکول‌های microRNA معرفی شده است که با استفاده از الگوریتم‌های خاص خود و بررسی چندین ویژگی، ژن‌های هدف متعددی براساس

1. High throughput sequencing

2. Minimum free energy

3. Next Generation Sequencing

جدول 1. لیست مولکول‌های microRNA انتخابی مرتبط با تنش سرما و اسیدهای چرب به همراه منابع مورد بررسی قرار گرفته شده

miRNAs	گیاهان بررسی شده	منابع
bna-miR164a	<i>Brassica napus</i> <i>Brassica rapa</i>	(Hu <i>et al.</i> , 2006; Hu <i>et al.</i> , 2008; Yu <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2016; Megha <i>et al.</i> , 2018)
bra-miR5712	<i>Brassica napus</i> <i>Brassica rapa</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2017; Megha <i>et al.</i> , 2018)
bra-miR5717	<i>Brassica napus</i> <i>Brassica rapa</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2016; Megha <i>et al.</i> , 2018)
bna-miR6029	<i>Brassica napus</i>	(Zhao <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2016; Wang <i>et al.</i> , 2017; Megha <i>et al.</i> , 2018)
bna-miR6035	<i>Brassica napus</i>	(Zhao <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2016; Wang <i>et al.</i> , 2017; Megha <i>et al.</i> , 2018)
bna-N_miR2	<i>Brassica napus</i>	(Megha <i>et al.</i> , 2018)
bna-N_miR16	<i>Brassica napus</i>	(Megha <i>et al.</i> , 2018)

به منظور پی بردن به عملکرد ژن و صحت وجود آن BLASTn توالی‌ها در NCBI صورت گرفت. همچنین با استفاده از نرم افزار RNAhybrid پیش‌بینی هیبریداسیون توالی‌های هدف با مولکول‌های microRNA براساس حداقل انرژی آزاد (MFE) انجام شد (Rehmsmeier *et al.*, 2004) و در نهایت جهت تأیید نهایی، پیش‌بینی اهداف به کمک نرم افزار IntaRNA انجام شد (Mann *et al.*, 2017). کلیه مراحل با استفاده از پارامترهای پیش فرض در نرم افزارها انجام گرفت.

بررسی هستی‌شناسی و مسیر عملکردی ژن‌های هدف

شناسایی، دسته‌بندی و بررسی هستی‌شناسی^۲ (GO) ژن‌های هدف و همچنین شناسایی مسیر عملکردی^۳ آن‌ها با کمک ابزار کلاسترینگ حاشیه‌نویسی عملکردی^۴ پایگاه بیوانفورماتیک DAVID و سایت KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) با استفاده از پارامترهای پیش فرض انجام گرفت (Haung *et al.*, 2009) و طبقه‌بندی تمام پروتئین‌ها براساس عملکرد مولکولی و فرآیندهای بیولوژیکی با استفاده از سیستم PANTHER (FDR < 0/05 p-value) انجام شد (Mi *et al.*, 2018).

بررسی حفاظت‌شدگی و رسم درخت فیلوژنی

انتخاب مولکول‌های microRNA کاندید با استفاده از نتایج تحقیقات گذشته که بر روی دو گیاه *Brassica napus* انجام شده بود صورت گرفت، بنابراین به منظور بررسی حفاظت‌شدگی مولکول‌های microRNA در سایر اعضای خانواده *Brassicaceae* شامل *Brassica napus*، *Arabidopsis thaliana*، *Brassica rapa* ابتدا با *Camelina sativa* و *Arabidopsis lyrata* استفاده از پایگاه اطلاعاتی miRBase توالی هر کدام از مولکول‌های microRNA به دست آمد و سپس با روش ClustalW و نرم افزار MEGA X هم‌ردیفی با روش اتصال - همسایگی (NJ)^۱ انجام شد و روابط تکاملی به صورت درخت فیلوژنتیکی رسم شد (Yang *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2013).

پیش‌گویی ژن‌های هدف

پیش‌بینی ژن‌های هدف به کمک سه نرم افزار انجام شد. به این منظور به کمک نرم افزار psRNATarget نسخه 2017 با استفاده از DFCI Gene Index (BNGI, version 5) مربوط به گیاه کلزا، شناسایی ژن‌های هدف انجام شد، این نرم افزار به صورت اختصاصی به منظور شناسایی ژن‌های هدف در گیاهان طراحی شده است (Dai *et al.*, 2018).

2. Gene Ontology

3. Pathway

4. Functional annotation clustering

1. Neighbor-joining

بررسی میانکنش پروتئین‌ها

شبکه‌های متقابل پروتئین- پروتئین یک عنصر مهم برای درک فرآیندهای سلولی هستند. پروتئین‌ها عمدتاً به صورت شبکه‌ای در تعامل با یکدیگر عمل می‌کنند، به این ترتیب برای ترسیم شبکه میانکنش پروتئین‌ها¹ (PPIs) از پایگاه داده STRING استفاده شد. این پایگاه داده حاوی اطلاعات منابع متعددی از جمله داده‌های تجربی، روش‌های پیش‌بینی محاسباتی است که مرتب به روز می‌شوند. در این پایگاه به هر تعامل نمرات 0 تا 1 داده می‌شود، شاخص حداقل امتیاز متقابل مورد نیاز² به صورت پیش‌فرض روی 0/4 تنظیم شد (Szkarczyk *et al.*, 2018).

نتایج و بحث

مولکول‌های microRNA در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی و متابولیکی، مانند توسعه ویژه بافت، حفظ سلول‌های بنیادی و تمایز و زمان‌بندی رشد، شرکت می‌کنند. نتایج تحقیقات قبلی که با استفاده از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید انجام گرفته بیانگر این واقعیت بود که مولکول‌های microRNA انتخاب شده در این تحقیق مؤثر در تنش سرما بودند (Megha *et al.*, 2018; *al.*, 2018). از طرفی گیاهان اغلب به تنش سرما با افزایش غلظت لیپید غیراشباع غشایی، کاهش زنجیره، تغییر ترکیبات لیپید و یا تغییر نسبت چربی/ پروتئین پاسخ می‌دهند (Takahashi *et al.*, 2013).

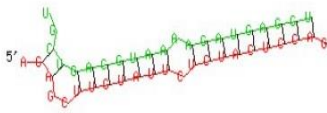
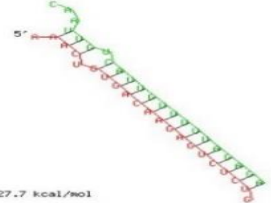
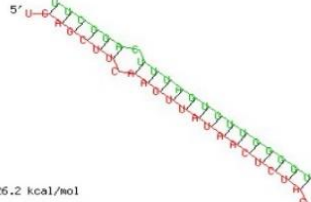
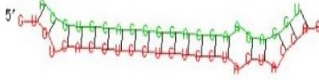
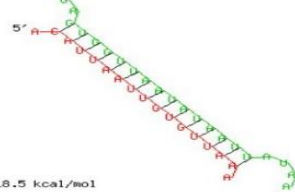
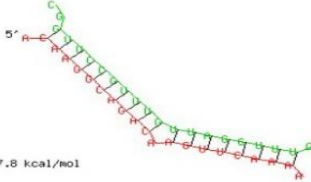
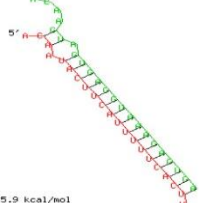
بنابراین بررسی ارتباط مولکول‌های microRNA تنش سرما و اسیدهای چرب و لیپیدها می‌تواند حاوی نتایج ره‌گشایی باشد. در این تحقیق، به منظور نشان دادن روابط تکاملی مولکول‌های microRNA درخت فیلوژنتیکی رسم شد،

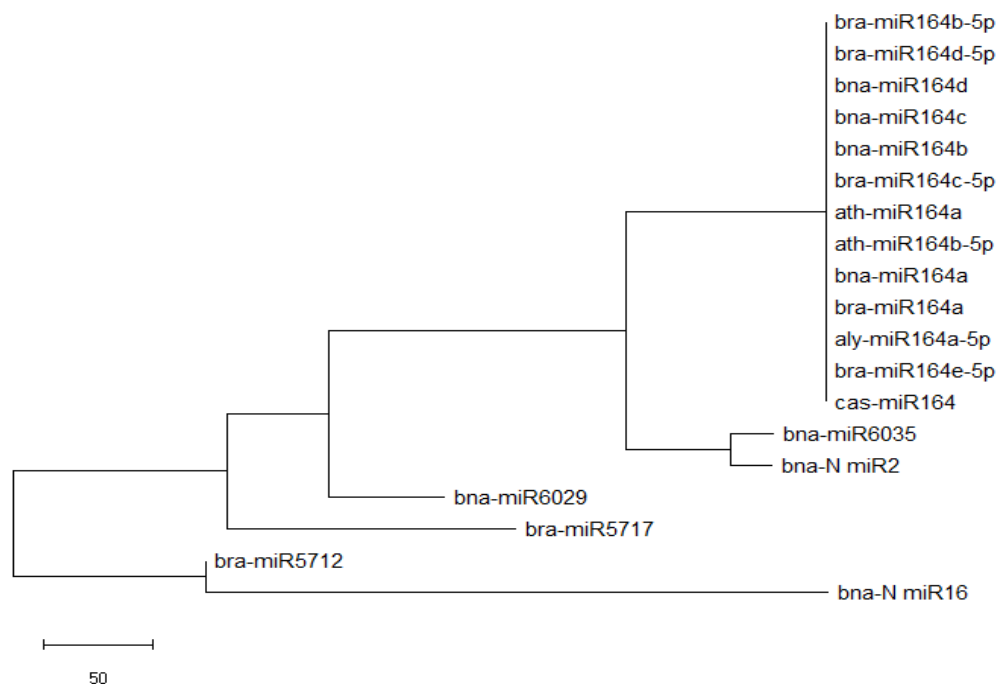
نتایج نشان داد که miR164 از حفاظت‌شدگی بسیار بالایی در خانواده *Brassicaceae* برخوردار بود. مولکول‌های microRNA با اسامی miR5712، miR5717 مشترک در *Brassica napus*، *Brassica rapa* و مولکول‌های microRNA با اسامی miR6029، miR6035، bna-N_miR2، bna-N_miR16 به صورت اختصاصی در *Brassica napus* وجود داشت (شکل 1).

به منظور مشخص کردن عملکرد مولکول‌های microRNA و اثراتی که بر رونویسی ژن‌ها دارند، ضروری است که اهداف و فرآیندهای بیولوژیکی خاصی که ممکن است توسط آن‌ها تحت تأثیر قرار گیرد مشخص شود. با توجه به حفاظت‌شده بودن محل اتصال بین miRNA و mRNA هدف، امکان شناسایی این ژن‌ها با استفاده از جستجوی مبتنی بر همولوژی وجود دارد (Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Sunkar and Zhu, 2007). بنابراین اولین قدم شناسایی ژن‌های هدف است تا پس از آن با دسته‌بندی پروتئین‌ها و شناسایی مسیر عملکردی مؤثر در متابولیسم اسیدهای چرب و لیپیدها ارتباط آن‌ها را به طور جامع بررسی کرد. در نتیجه این بررسی 110 ژن هدف برای 7 miRNA شناسایی شد (شکل 1).

1. Protein-protein interaction networks
2. Minimum required interaction score

جدول 2. تعدادی از ژن‌های هدف مرتبط با اسیدهای چرب و لیپیدهای گیاه کلزا که با استفاده از نرم‌افزارهای IntaRNA و RNAhybrid پیش بینی شده است.

miRNAs	Gene symbol	miRNA-mRNA interactions	
miR6035	ACC1	<pre> 4860 4878 5'-UGC...AGAGC C GAAGG...CUU-3' UUGUAUU UCUACUCCA : : GACGUAA AGAUGAGGU 3'-UGCU A -5' query 18 1 </pre> <p>interaction energy = -15.14960 kcal/mol nfe: -26.7 kcal/mol</p>	
bnA-N_miR16	DCI1	<pre> 891 909 5'-UAA...UCUA U GUUG...UCA-3' AAC GUGACAAGAGUCUCU : : : UUG CAUUGUUUUUAGAGA 3'-CAA U -5' query 19 1 </pre> <p>interaction energy = -16.225 kcal/mol nfe: -27.7 kcal/mol</p>	
miR6029	FATA2	<pre> 1050 1072 5'-GAG...CGCAU C GAUUA...AUA-3' GAGCUU AAGUUUAACUCUA : : : : : : : : UUCGGA UUUAGUGUUGGGU 3'- C -5' query 21 1 </pre> <p>interaction energy = -13.23960 kcal/mol nfe: -26.2 kcal/mol</p>	
miR164	FAD4	<pre> 240 261 5'-GUA...CGUGU A A CCACG...CCA-3' CACGUCUCUCUCU CU CCA : : : : : GUGCACGGGACGA GA GGU 3'-AC A -5' query 20 1 </pre> <p>interaction energy = -23.56290 kcal/mol nfe: -35.1 kcal/mol</p>	
miR5712	FAD7	<pre> 982 998 5'-GAG...AGUGA AAAUG...AAU-3' CAUUAUUUGUGUUA : : : : : : : GUGGUUAAUUAUU 3'-GA AUAA-5' query 20 4 </pre> <p>interaction energy = -8.39542 kcal/mol nfe: -18.5 kcal/mol</p>	
miR5717	FAD8	<pre> 1508 1526 5'-ACU...CAAA G AACU...UCA-3' CAAGGCAGACAA UUCAAA : : : : : GUUCCGUUUGUU AGGUUU 3'-CG G-5' query 19 2 </pre> <p>interaction energy = -16.6753 kcal/mol nfe: -27.8 kcal/mol</p>	
bnA-N_miR2	KAS2	<pre> 1897 1915 5'-UGU...ACAA A UUGG...AUA-3' CA UACUUAUUUUUUCACU : : : : : : GU GUGAGGUAAGAGUGA 3'-ACAA A -5' query 19 1 </pre> <p>interaction energy = -17.8163 kcal/mol nfe: -25.9 kcal/mol</p>	



شکل 1. درخت فیلوژنتیکی رسم‌شده خانواده *Brassicaceae*. به‌منظور بررسی حفاظت‌شدگی مولکول‌های microRNA به روش ClustalW و نرم‌افزار MEGA X و هم‌ردیفی با روش اتصال-همسایگی (NJ) انجام شد.

عملکرد مولکولی^۳ طبقه‌بندی می‌کند (Balakrishnan *et al.*, 2013). بر این اساس در میان اجزای سلولی، بیشترین فراوانی مرتبط با «سلول»، «اندامک» بود. همچنین بیشترین فراوانی در پروسه‌های بیولوژیکی شامل «پروسه‌های سلولی»^۴، «پروسه‌های متابولیک»^۵ و «جانمایی»^۶ شد. در مورد عملکردهای مولکولی، «فعالیت کاتالیزوری»^۷، «اتصال»^۸ و «فعالیت انتقالی»^۹، بیشترین فراوانی را داشتند (شکل 2). تجزیه و تحلیل غنی‌سازی GO^{۱۰} به‌طور کامل‌تر نشان داد علاوه بر «پاسخ به سرما» (GO:0009409)، «پاسخ به محرک دمایی» (GO:0009266)، عناصر GO مربوط به «بیوستنز

تنظیم بیان mRNA توسط مولکول‌های microRNA از طریق دو مکانیزم اصلی، برش mRNA و مهار ترجمه صورت می‌گیرد. میزان مکمل بودن بین miRNA و محل اتصال آن بر روی هدف، حالت عمل آن را تعیین می‌کند؛ مکمل شدن بالا منجر به برش mRNA هدف می‌شود، در صورتی که مکمل شدن ناقص باعث مهار ترجمه می‌شود (Liu *et al.*, 2014). بر این اساس 23 ژن از طریق مهار ترجمه و 87 ژن از طریق برش تنظیم می‌شوند. در جدول 2 به تعدادی از ژن‌های هدف که براساس بررسی حاضر در فرآیندهای مرتبط با اسیدهای چرب و لیپیدها مشارکت دارند اشاره شده است.

به‌طور کلی هستی‌شناسی (GO) ژن‌های هدف پیش‌بینی‌شده را به اجزای سلولی^۱، پروسه بیولوژیکی^۲ و

3. Molecular Function
4. Cellular process
5. Metabolic process
6. Localization
7. Catalytic activity
8. Binding
9. Transporter activity
10. GO enrichment analysis

1. Cellular Component
2. Biological Process

(ACC1)، کتو اسیل سینتاز 1 (KAS1) و 2 (KAS2)، استرول اسیل دسچوراز (AAD3)، اسیل تیواستراز (FATA) در این مسیر تحت تأثیر قرار می‌گیرند (شکل 3). همان‌طور که در شکل 3 نشان داده شده است، در سنتز اسیدهای چرب از استیل CoA به‌عنوان سوبسترا و مالونیل-ACP به‌عنوان یک طول‌کننده زنجیره استفاده می‌شود و استیل-CoA به کمک ACC به مالونیل-CoA تبدیل می‌شود، مالونیل CoA تولید شده توسط ACC، نقش دهنده کربن را برای هر چرخه مسیر بیوستنز اسید چرب انجام می‌دهد. سپس مالونیل تیواستراز در هر چرخه دستخوش واکنش‌هایی با استیل-CoA می‌شود، مرحله‌ای که توسط کتواسیل-ACP سنتز از نوع 3 (KASIII)، کتواسیل-ACP ردوکتاز (KAR)، هیدروکسیل-ACP دهیدراتاز (HAD) و اتول-ACP ردوکتاز (ER)، کاتالیز می‌شود، این عمل به‌منظور تولید اسید چرب اشباع‌شده با دو کربن اضافی است. بعد از 7 چرخه، اسیل-ACP با 16 کربن اشباع‌شده یا می‌تواند توسط FATB هیدرولیز شود یا توسط KASII برای تولید ACP-0:18 طولی شود، سپس به کمک استرول اسیل دسچوراز (AAD3) به ACP-1:18 تبدیل و به کمک اسیل تیواستراز (FATA) هیدرولیز می‌شود (Wang et al., 2016). در این بین miR6035 استیل کوآ کربوکسیلاز را هدف قرار می‌دهد، ACC1 یک آنزیم مهم و کلیدی است که فرآیند کربوکسیلاسیون استیل کوآ برای تولید مالونیل کوآ را کاتالیز می‌کند و به‌عنوان یک گام مهم برای بیوستنز اسیدهای چرب در پلاستیدها محسوب می‌شود (Wang et al., 2017). بنابراین فعالیت تنظیمی miR6035 می‌تواند نقشی کلیدی در بیوستنز اسیدهای چرب داشته باشد.

اسید چرب اشباع‌نشده» (GO:0006636)، «متابولیسم اسید چرب غیراشباع» (GO:0033559)، «بیوستنز اسید چرب» (GO:0006633)، «متابولیسم اسید چرب» (GO:0006631)، «کاتابولیسم لیپید سلولی» (GO:0044242) و «متابولیسم لیپید» (GO:0006629)، «بیوستنز لیپید» (GO:0008610)، «متابولیسم لیپید سلولی» (GO:0044255) معنی‌دار شدند (جدول 3).

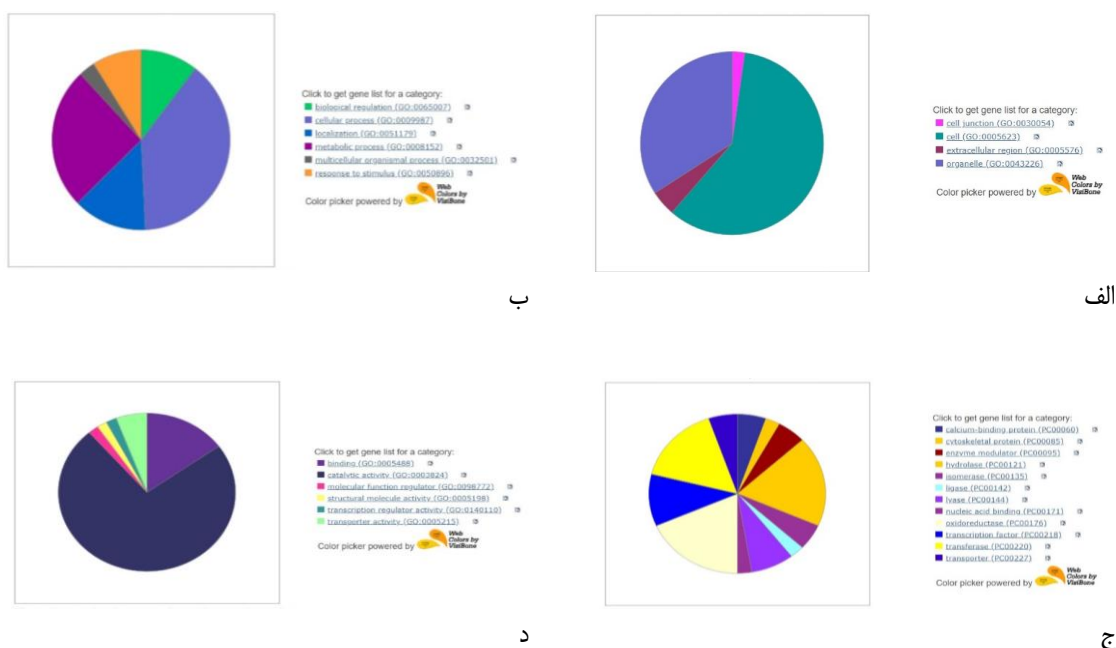
به‌طور کلی تعداد 19 ژن هدف در پروسه‌های مرتبط با اسیدهای چرب و لیپیدها حضور دارند که البته برخی از آنها در چند پروسه به صورت مشترک فعالیت دارند که از جمله شاخص‌ترین این ژن‌های هدف می‌توان به ژن‌های اسید چرب دسچوراز¹ (FAD)، استیل کوآ کربوکسیلاز² (ACC1) و کتو اسیل سینتاز³ (KAS1، KAS2) اشاره کرد. این نتایج حاکی از آن است که ژن‌های هدف پیش‌بینی شده ممکن است در گستره وسیعی از فرآیندهای مرتبط با اسید چرب و لیپیدها علاوه بر پاسخ آن‌ها به سرما نیز دخیل باشند.

بررسی مسیر KEGG¹ فرآیندهای مرتبط با اسیدهای چرب و لیپیدها نشان داد که مسیرهایی همچون بیوستنز اسیدهای چرب، متابولیسم اسیدهای چرب، بیوستنز اسیدهای چرب غیراشباع در طی تنش سرما و تحت تأثیر مولکول‌های microRNA فعال می‌شوند. در میان مسیرهای مرتبط با اسیدهای چرب و لیپیدها، بیشترین ژن‌های هدف در مسیر بیوستنز اسیدهای چرب دیده می‌شود، بررسی این مسیر نشان می‌دهد که ژن‌های هدف استیل کوآ کربوکسیلاز

1. Fatty acids desaturase

2. Acetyl-CoA carboxylase1

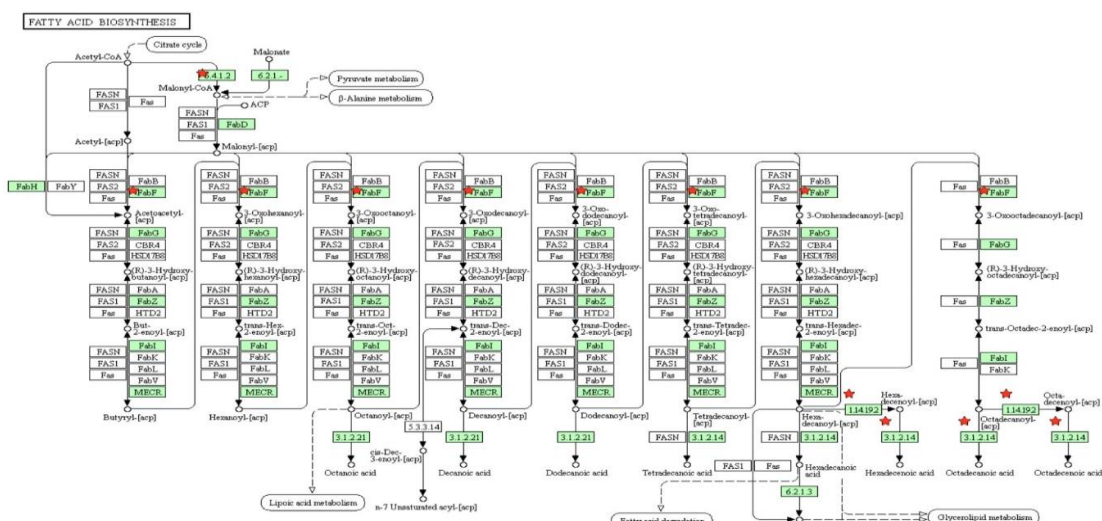
3. Ketoacyl synthase



شکل 2. نمودار دایره‌ای هستی‌شناسی (Gene Ontology) ژن‌های هدف با استفاده از سیستم PANTHER ($p < 0/05$ FDR) (الف: اجزای سلولی (Cellular Component)، ب) پروسه‌های بیولوژیکی (Biological Process)، ج) عملکرد مولکولی (Molecular Function)، د) نوع پروتئین (Type of protein))

جدول 3. عناصر GO فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با اسیدهای چرب، لیپیدها و سرما ($p\text{-value} < 0/05$ FDR) که از بقیه فرآیندهای یافت شده تفکیک شدند.

GO biological process complete	Gene symbol	background gene count	observed gene count	false discovery rate (FDR)
unsaturated fatty acid biosynthetic process (GO:0006636)	KAS2,FAD8,FAD4,AAD3,FAD7,FAD2	23	6	9.82E-08
unsaturated fatty acid metabolic process (GO:0033559)	KAS2,FAD8,FAD4,AAD3,FAD7,FAD2	24	6	1.12E-07
fatty acid biosynthetic process (GO:0006633)	KAS2,FAD8,FAD4,PKP1,KAS1,ACP1,AAD3,KCS4,FAD7,ACC1,FAD2,FATA2	150	12	1.19E-10
fatty acid metabolic process (GO:0006631)	KAS2,FAD8,FAD4,PKP1,KAS1,ACP1,AAD3,KCS4,DCI1,FAD7,ACC1,FAD2,AIM1,FATA2	246	14	9.58E-11
cellular lipid catabolic process (GO:0044242)	NCED4,NCED9,DCI1,AIM1	98	4	1.93E-02
lipid metabolic process (GO:0006629)	PKP1,ATL3,NCED4,KAS2,ABA1,FAD8,FAD4,AO4,PKP1,KAS1,ACP1,AAD3,IP5P2,KCS4,NCED9,DCI1,FAD7,ACC1,FAD2,AIM1,FATA2	993	21	4.32E-09
lipid biosynthetic process (GO:0008610)	KAS2,ABA1,FAD8,FAD4,AO4,PKP1,KAS1,ACP1,AAD3,KCS4,NCED9,FAD7,ACC1,FAD2,FATA2	537	15	8.56E-08
cellular lipid metabolic process (GO:0044255)	NCED4,KAS2,ABA1,FAD8,FAD4,AO4,PKP1,KAS1,ACP1,AAD3,IP5P2,KCS4,NCED9,DCI1,FAD7,ACC1,FAD2,AIM1,FATA2	720	19	1.39E-09
response to cold (GO:0009409)	SCRM2,KAS2,STZ,GLP4,PP2CA,cpHsc70,FAD7,ACC1,RCA,HOS1	421	10	1.68E-04
response to temperature stimulus (GO:0009266)	SCRM2,KAS2,STZ,ABA1,FAD8,EIN2,GLP4,PP2CA,FAD7,ACC1,RCA,HOS1, cpHsc70-1	612	13	1.76E-05



شکل 3. مسیر KEGG بیوسنتز اسیدهای چرب - ژنهای هدف FATA, AAD3, KAS2, KAS1, ACC1 که در این مسیر تحت تأثیر قرار می‌گیرند، ستاره‌ها نشان‌دهنده ژنهای هدف هستند.

بررسی‌ها نشان می‌دهد، موتانت‌های آرابیدوبسیس *sfr3* به دلیل تغییر نفوذپذیری کوتیکول به انجماد حساس هستند. این فنوتیپ به وسیله یک جهش در ژن ACC1 که یک استیل کوآ کربوکسیلاز (ACCase) سیتوپلاسمی درگیر در بیوسنتز اسیدهای چرب است، ایجاد می‌شود (Amid *et al.*, 2012). همچنین طول زنجیره توسط ACC1 تنظیم می‌شود. به عنوان مثال، در جهش یافته *sfr3* آرابیدوبسیس به دلیل جهش در ACC1 حساسیت به انجماد دیده شد این آنزیم مسئول تشکیل مالونیل-CoA برای تولید زنجیره اسید چرب بسیار بلند (VLCFA) است که برای تشکیل لیپیدهای پیچیده مانند اسفنگولیپیدها ضروری است (Baud *et al.*, 2003). به نظر می‌رسد، تنظیم مقادیر استیل کوآ کربوکسیلاز میزان کلی سنتز اسیدهای چرب را کنترل کند. بنابراین فعال شدن آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز به عنوان نقطه تنظیم‌کننده بیوسنتز اسیدهای چرب مهم است. از سوی دیگر، متوقف شدن فعالیت استیل کوآ کربوکسیلاز از رشد گیاه

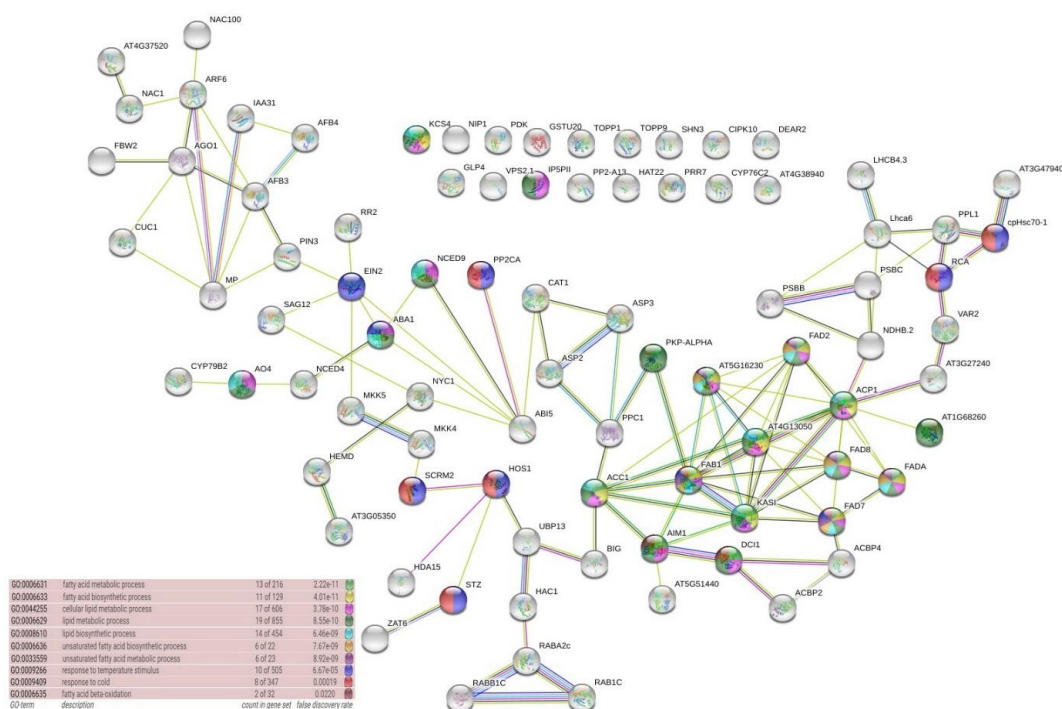
جلوگیری می‌کند، زیرا اسیدهای چرب لازم برای کمک به ساختار غشاها تولید نخواهد شد (Shaner, 2004).
 β -کتوآسیل-ACP سنتاز 1 (KAS1)، آنزیم مورد نیاز برای تنظیم طول زنجیره در گیاهان است که توسط miR6035 و miR16-bna-N تنظیم می‌شود (Yuan *et al.*, 2015). همچنین آنزیم کتو آسیل سنتاز 2 (KAS2) که توسط miR5717 و miR2-bna-N هدف قرار می‌گیرد، یک آنزیم مؤثر در بیوسنتز اسیدهای چرب است و مطالعات نشان داده از طریق حفظ یکپارچگی غشای کلروپلاست، مقاومت به دماهای پایین را تنظیم می‌کند. به عنوان نمونه، جهش یافته *fab1* آرابیدوبسیس تا حدودی در فعالیت پروتئین KAS2 مشکل داشتند و در نتیجه این نقص، افزایش سطح اسید چرب 0:16 در لیپیدهای غشایی رخ داد که با آسیب و مرگ جهش یافته‌ها در دمای پایین همراه شد (Anders *et al.*, 2002). FATA2 نیز بر اساس یافته‌ها توسط miR6029 تنظیم می‌شود. تیو استرازهای حامل آسیل پروتئین (ACP) آنزیم‌هایی‌اند که ختم سنتز اسید چرب داخل پلاسمیدی را با هیدرولیز کردن

1. Very-Long-Chain-Fatty-Acid

گیاه ذرت صورت گرفت مشخص شد که بیان *ZmFAD2.1* و *ZmFAD2.2*، *ZmFAD7* به طور قابل توجهی تحت تنش سرما افزایش بیان داشتند (Zhao *et al.*, 2019). همچنین در پژوهش دیگری که بر روی آراییدوبسیس انجام شد، مشاهده گردید با سرکوب فعالیت *FAD2*، گیاهان *fad2* به دمای 12 درجه سانتی‌گراد حساس می‌شوند و هنگامی که در معرض دمای 6 درجه قرار می‌گیرند می‌میرند (Miquel *et al.*, 1993). در مقابل، فرا بیان *FAD3* در آراییدوبسیس منجر به افزایش غلظت اسید لینولئیک در غشاهای میتوکندری و وپسکوزیته بالا شده که در نتیجه آن کاهش استحکام غشا با قرار گرفتن در معرض استرس سرما گزارش شد (Matos *et al.*, 2007). از طرفی این بررسی نشان داد که *miR164* همچنین *FAD4* را مورد هدف قرار می‌دهد که در تولید گونه‌های مولکولی فسفاتیدیل گلیسرول خاص کلرپلاست دخیل است (Gao *et al.*, 2009). همچنین *FAD7* ژن هدف *miR5712* است، به نظر می‌رسد امگا 3 اسید چرب دسچوراز کلروپلاستی از فریدوکسین به‌عنوان یک اهداکننده الکترون برای اسیدهای چرب اشباع‌شده به گالاکتولیپید، سولفولیپید و فسفاتیدیل گلیسرول استفاده می‌کند (Iba *et al.*, 1993). همچنین مشخص شده این آنزیم در تحمل به سرما نقش مؤثری دارد، در پژوهشی ژن *fad7* از آراییدوبسیس به گیاه تنباکو منتقل شد و مشخص شد در این گیاهان کلروز ناشی از سرما کاهش پیدا کرده و گیاهان تراریخت مقاومت بیشتری به سرما از خود نشان دادند (Kodama *et al.*, 1994). یکی دیگر از آنزیم‌های مؤثر *FAD8* است که توسط *miR5717* تنظیم می‌شود. در پژوهشی که بر روی این ژن در برنج صورت گرفت مشخص شد موتانت‌های *osfad8* که توانایی تولید این آنزیم را نداشتند نسبت به سرما از خود حساسیت نشان می‌دادند و این یافته‌ها بیانگر این است که وجود این آنزیم برای سازگاری به سرما ضروری

ترکیبات آسیل-ACP کنترل می‌کند. نوع *FatA* نقش اساسی در انتقال قطعات اسید چرب C18 دارد که برای ساختن گلیسرولیپید در بیشتر گیاهان استفاده می‌شود (Moreno-Pérez *et al.*, 2012). توانایی تنظیم سیالیت غشا براساس درجه حرارت اغلب به تنظیم غیراشباع‌سازی اسیدهای چرب غشا و طول زنجیره مرتبط است (Uemura *et al.*, 1995). افزایش سطوح اسید چرب غیراشباع به‌وسیله اسید چرب دسچوراز (*FAD*) که در کلرپلاست و در ER وجود دارد، انجام می‌شود. اسید چرب دسچورازهای گیاهی (*FADs*) باعث کاهش اشباع اسیدهای چرب به اشکال مختلف می‌شوند و نقش مهمی در تنظیم ترکیب اسیدهای چرب و حفظ سیالیت غشایی تحت تنش دما دارند، در گیاهان تا 7 نوع آنزیم *FAD* وجود دارد که نقش مهمی در میزان اشباع اسیدهای چرب غشا ایفا می‌کنند. *FAD2* و *FAD3* بر میزان اشباع لیپید خارج کلرپلاست اثر گذارند، درحالی که *FAD4*، *FAD5*، *FAD6*، *FAD7* و *FAD8* نقش فعال در غیراشباع‌سازی لیپید درون کلرپلاست دارند (Browse and Somerville, 1991; Zhao *et al.*, 2019). با مطالعه جهش یافته‌های اسید چرب در آراییدوبسیس (موتانت‌های *FAD*) می‌توان نقش برخی از این ژن‌ها در تحمل سرما را مشاهده کرد. در مسیر متابولیسم اسیدهای چرب آنزیم اسید چرب دسچوراز 2 (*FAD2*) نیز تحت تأثیر *miR164* قرار می‌گیرد. محتوای اسید اولئیک توسط ژن اسید چرب دسچوراز 2 (*FAD2*) کنترل می‌شود، بررسی بر روی جهش یافته‌های *BnFAD2* در کلزا مشخص کرد با جهش در این ژن میزان تجمع اولئیک اسید در گیاه بالا می‌رود (Long *et al.*, 2018; Amosova *et al.*, 2019). در پژوهشی که بر روی ژن‌های *FAD* در

است (Tovuu *et al.*, 2016).



شکل 4. شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPIs) با استفاده از پایگاه داده STRING برای پروتئین های شناسایی شده، گره های رنگی نشان دهنده پروتئین های مرتبط با سرما و متابولیسم اسیدهای چرب است و گره های خاکستری مربوط به سایر پروتئین های بیولوژیکی است.

دهنده 87 گره¹ و 116 لبه² بود که از این تعداد 17 ژن در شبکه قرار نگرفته و تعاملی با یکدیگر نداشتند. همان طور که در شکل 4 مشاهده می شود تعاملات مستقیم و غیرمستقیمی بین پروتئین های دخیل در فرآیندهای مرتبط با اسیدهای چرب و لیپیدها و پروتئین های دخیل در واکنش به سرما و تغییرات حرارتی دیده می شود. به نظر می رسد که ژن های رمزگذاری کننده پیرووات کیناز نیز ممکن است نقش مهمی در سنتز اسید چرب در کلزا داشته باشند (Wang *et al.*, 2016).

همان طور که در شبکه پروتئینی مشاهده می شود، ارتباطات مستقیمی بین پروتئین های مؤثر در متابولیسم پیرووات مانند PPC1 و PKP1 که توسط

در این پژوهش به منظور بررسی اثرات متقابل پروتئین ها از پلات فرم STRING استفاده شد که در آن گره ها نمایانگر پروتئین ها هستند و اتصالات تعاملات شناخته شده یا پیش بینی شده، مستقیم و غیرمستقیم آن ها را نشان می دهند. ارتباط بین هر دو گره پروتئینی مبتنی بر اطلاعات موجود استخراج شده از پایگاه داده های مربوطه و مقالات است. این شبکه به صورت پیش فرض کلیه تعاملات پروتئینی با حداقل امتیاز متقابل مورد نیاز 0/4 را نشان می دهد. با توجه به این نکته که برخی از مولکول های microRNA دارای اهداف مشترک بودند بنابراین از 110 هدف شناسایی شده 87 شناسه ژنی به این پلت فرم داده شد. بررسی میانکنش کلیه ژن های هدف نشان

1. Nods
2. Edges

در پژوهش حاضر سعی شد تا ارتباط مولکول‌های microRNA دخیل در سرما با تغییراتی که در فرآیندهای مرتبط با اسیدهای چرب و لیپیدها رخ می‌دهد بررسی شود. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که در اثر قرار گرفتن گیاه در معرض سرما مولکول‌های microRNA که در طی تنش سرما فعال می‌شوند صرفاً بر ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با سرما اثر نمی‌گذارند و دارای اثرات جامع‌تر و گسترده‌تر بوده و بر سایر فرآیندهای سلولی و متابولیکی نیز اثرگذارند، این خود گویای پیچیدگی موجود در پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی می‌باشد. با توجه به نتایج به دست‌آمده گیاه کلزا به کمک مولکول‌های microRNA و از طریق اثر بر ژن‌های مؤثر در فرآیندهایی نظیر سنتز اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع به نحوی در برابر تنش سرما از خود واکنش نشان می‌دهد، این امر بخصوص در گیاه کلزا که از محتوای اسید چرب بالایی برخوردار است می‌تواند بسیار تأثیرگذار باشد. به‌عنوان نمونه همان‌طور پیشتر اشاره شد، بر روی ژن ACC1 اثرگذار است، که نقشی کلیدی در بیوسنتز اسیدهای چرب دارد. بنابراین احتمالاً با دست‌ورزی بر روی آن می‌توان بیوسنتز اسیدهای چرب و پاسخ به سرما را تحت تاثیر قرار داد. بنابراین با بررسی نقش مولکول‌های microRNA و ژن‌های هدف مربوط به آن‌ها، می‌توان به افق دید وسیع‌تری در ارتباط با تنش سرما و اثر آن بر مسیرهای درگیر در متابولیسم اسیدهای چرب و لیپیدها دست یافت. از این رو پیشنهاد می‌شود، در پژوهش‌های پیش رو بیان این مولکول‌های miRNA و ژن‌های هدف مرتبط با تنش سرما و متابولیسم اسیدهای چرب و سایر پروسه‌های بیولوژیکی به‌منظور یافتن ارتباط تنظیمی میان آن‌ها مورد تأییدسازی‌های تجربی بیش‌تر قرار گیرد.

miR164 و bna-N_miR16 تنظیم می‌شوند با پروتئین‌هایی همچون ACC1 و KAS2 وجود دارد که این امر وابستگی این فرآیندها به یکدیگر را آشکار می‌کند. هورمون ABA در سازگاری به سرما فعال می‌شود و از طریق تأثیر در افزایش متابولیسم فسفولیپید و تولید پیامبران ثانویه در پاسخ به سرما اثرگذار است (Xiong *et al.*, 2002) پروتئین‌های ABA1 و NCED9 که به‌وسیله miR164 و bna-N_miR16 تنظیم می‌شوند در شبکه برهم‌کنش پروتئینی وجود داشته و علاوه بر حضور در مسیر بیوسنتز آبسزیک در بیوسنتز و متابولیسم لیپیدها هم نقش دارند (Xiong *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2003). پژوهش انجام‌شده بر روی کلزا نشان داد، بسیاری از ژن‌های سیگنالینگ ABA در طی سازگاری به سرما و شوک سرمایی در گیاه کلزا تغییر بیان یافتند (Xin *et al.*, 2019). همچنین پروتئین‌هایی مانند ACC1، KASII، FAD7 که علاوه بر بیوسنتز اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع و در پاسخ به سرما نقش دارند، در شبکه تعامل با سایر پروتئین‌های مرتبط با سرما مانند STZ، SCRM2، PP2CA، cpHsc70، RCA، HOS1 دیده می‌شوند. در طی مطالعه‌ای که بر روی ارتباط مولکول‌های microRNA موجود با تولید روغن انجام شد، مشخص شد که miR156، miR167 و miR6029 از طریق هدف قرار دادن ARF، SPL و VIP1 بر میزان روغن دانه‌های گیاه کلزا تأثیر می‌گذارد (Zhao *et al.*, 2012)، و همچنین در بررسی دیگری بر روی همین گیاه مشخص شد بیان ژن KAR توسط مولکول‌های microRNA شناخته‌شده bna-miR156b، bna-miR156c، bna-miR156g و bna-miR6029 تنظیم می‌شود. البته در پژوهش حاضر برای miR6029 چنین هدفی یافت نشد، این نتیجه می‌تواند به دلیل روش‌ها یا الگوریتم‌های متفاوت در شناسایی ژن‌های هدف باشد.

REFERENCES

- Akhtar MM, Micolucci L, Islam MS, Olivieri F, Procopio AD (2015) Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res.* 44(1): 24-44.
- Amid A, Lytovchenko A, Fernie AR, Warren G, Thorlby GJ (2012) The sensitive to freezing3 mutation of *Arabidopsis thaliana* is a cold-sensitive allele of homomeric acetyl-CoA carboxylase that results in cold-induced cuticle deficiencies. *J. Exp. Bot.* 63(14): 5289-5299.
- Amosova AV, Zoshchuk SA, Volovik VT, Shirokova AV, Horuzhiy NE, Mozgova GV,... Samatadze TE (2019) Phenotypic, biochemical and genomic variability in generations of the rapeseed (*Brassica napus* L.) mutant lines obtained via chemical mutagenesis. *PloS One.* 14(8).
- Anders S, Samuel T, Anthony J (2002) KAS2 cDNA complements the phenotypes of the *Arabidopsis fab1* mutant that differs in a single residue bordering the substrate binding pocket. *Plant J.*
- Andrews C (1987) Low-temperature stress in field and forage crop production—an overview. *Can. J. Plant Sci.* 67(4): 1121-1133.
- Balakrishnan R, Harris MA, Huntley R, Van Auken K, Cherry JM (2013) A guide to best practices for Gene Ontology (GO) manual annotation. Database. 2013.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell.* 116(2): 281-297.
- Baud S, Guyon V, Kronenberger J, Wuillème S, Miquel M, Caboche M, . . . Rochat C (2003) Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 33(1): 75-86.
- Browse J, Somerville C (1991) Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 42(1): 467-506.
- Chen L, Zhong H, Ren F, Guo Q-Q, Hu X-P, Li X-B (2011) A novel cold-regulated gene, COR25, of *Brassica napus* is involved in plant response and tolerance to cold stress. *Plant Cell Rep.* 30(4): 463-471.
- Chen M, Thelen JJ (2013) Acyl-lipid desaturase2 is required for chilling and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *plant cell.* 25(4): 1430-1444.
- Chinnusamy V, Zhu J-K, Sunkar R (2010) Gene regulation during cold stress acclimation in plants *Plant Stress Tolerance* (pp. 39-55): Springer.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12(10): 444-451.
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res.* 46(W1): W49-W54.
- Gao J, Ajjawi I, Manoli A, Sawin A, Xu C, Froehlich JE, ... Benning C (2009) Fatty acid desaturase4 of *Arabidopsis* encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases. *Plant J.* 60(5): 832-839.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(35): 12987-12992.
- Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 67(1-2): 169-181.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using

- DAVID bioinformatics resources. Nat. Protoc. 4(1): 44.
- Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, Fuse T, Nishimura M, Arondel V, Somerville C (1993) A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 268(32): 24099-24105.
- Ishizaki-Nishizawa O, Fujii T, Azuma M, Sekiguchi K, Murata N, Ohtani T, Toguri T (1996) Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. Nat. Biotechnol. 14(8): 1003.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Mol. Cell. 14(6): 787-799.
- Kodama H, Hamada T, Horiguchi G, Nishimura M, Iba K (1994) Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast [omega]-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. Plant Physiol. 105(2): 601-605.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35(6): 1547-1549.
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Durrett TP (2013) Acyl-lipid metabolism. The arabidopsis book. 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(2): 741-753.
- Long W, Hu M, Gao J, Chen S, Zhang J, Cheng L, Pu H (2018) Identification and functional analysis of two new mutant *BnFAD2* alleles that confer elevated oleic acid content in rapeseed. Frontiers in genetics. 9: 399.
- Mann M, Wright PR, Backofen R (2017) IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. Nucleic Acids Res. 45(W1): W435-W439.
- Matos AR, Hourton-Cabassa C, Çiçek D, Rezé N, Arrabaça JD, Zachowski A, Moreau F (2007) Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana* *fad2* and *FAD3+* cell suspensions altered in membrane lipid composition. Plant Cell Physiol. 48(6): 856-865.
- Megha S, Basu U, Joshi RK, Kav NN (2018) Physiological studies and genome-wide microRNA profiling of cold-stressed *Brassica napus*. Plant Physiol. Biochem. 132: 1-17.
- Megha S, Basu U, Kav NN (2018) Regulation of low temperature stress in plants by microRNAs. Plant, Cell Environ. 41(1): 1-15.
- Meyers BC, Souret FF, Lu C, Green PJ (2006) Sweating the small stuff: microRNA discovery in plants. Curr. Opin. Biotechnol. 17(2): 139-146.
- Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X, Thomas PD (2018) PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. Nucleic Acids Res. 47(D1): D419-D426.
- Min H, Yoon S (2010) Got target?: computational methods for microRNA target prediction and their extension. Exp. Mol. Med. 42(4): 233.
- Miquel M, James D, Dooner H (1993) *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. Proc. Natl. Acad. Sci. 90(13):6028-6212.
- Moreno-Pérez AJ, Venegas-Calero M, Vaistij FE, Salas JJ, Larson TR, Garcés R, . . . Martínez-Force E (2012) Reduced expression of *FatA* thioesterases in *Arabidopsis* affects the oil content and fatty acid composition

- of the seeds. *Planta*. 235(3): 629-639.
- Moreno-Risueno MA, Van Norman JM, Benfey PN (2012) Transcriptional switches direct plant organ formation and patterning *Current topics in developmental biology* (Vol. 98, pp. 229-257): Elsevier.
- Ohlrogge JB, Jaworski JG (1997) Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 48(1): 109-136.
- Pandey B, Gupta OP, Pandey DM, Sharma I, Sharma P (2013) Identification of new stress-induced microRNA and their targets in wheat using computational approach. *Plant signaling & behavior*. 8(5).e23932
- Rehmsmeier M, Steffen P, Höchsmann M, Giegerich R (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna*. 10(10): 1507-1517.
- Riffo-Campos Á, Riquelme I, Brebi-Mieville P (2016) Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose? *Int. J. Mol. Sci.* 17(12): 1987.
- Sanei M, Chen X (2015) Mechanisms of microRNA turnover. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 199-206.
- Seo J-K, Wu J, Lii Y, Li Y, Jin H (2013) Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26(6): 617-625.
- Shaner DL (2004) Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*. 60(1): 17-24.
- Shepherd T, Wynne Griffiths D (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.* 171(3): 469-499.
- Steponkus PL (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35(1): 543-584.
- Sunkar R, Zhu JK (2007) Micro RNAs and short-interfering RNAs in plants. *J. Integr. Plant Biol.* 49(6): 817-826.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, . . . Bork P (2018) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47(D1): D607-D613.
- Takahashi D, Li B, Nakayama T, Kawamura Y, Uemura M (2013) Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance. *Front. Plant Sci.* 4: 90.
- Tan B-C, Joseph LM, Deng W-T, Liu L, Li Q-B, Cline K, McCarty DR (2003) Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* 35(1): 44-56. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01786.x
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 50(1): 571-599.
- Tovuu A, Zulfugarov IS, Wu G, Kang IS, Kim C, Moon BY, Lee C-H (2016) Rice mutants deficient in ω -3 fatty acid desaturase (FAD8) fail to acclimate to cold temperatures. *Plant Physiol. Biochem.* 109: 525-535.
- Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL (1995) Cold acclimation of Arabidopsis thaliana (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant Physiol.* 109(1): 15-30.
- Unver T, Namuth-Covert DM, Budak H (2009) Review of current methodological approaches for characterizing microRNAs in plants. *Int. J. Plant Genomics*. 2009.
- Wada H, Combos Z, Murata N (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature*. 200(6289):347
- Wang J, Jian H, Wang T, Wei L, Li J, Li C, Liu L (2016) Identification of microRNAs actively involved in fatty acid biosynthesis in developing

- Brassica napus seeds using high-throughput sequencing. *Front. Plant Sci.* 7: 1570.
- Wang Z, Qiao Y, Zhang J, Shi W, Zhang J (2017) Genome wide identification of microRNAs involved in fatty acid and lipid metabolism of Brassica napus by small RNA and degradome sequencing. *Gene.* 619: 61-70.
- Xin H, Xianchao N, Pan X, Wei L, Min Y, Yu K, ... Wei H (2019) Comparative transcriptome analyses revealed conserved and novel responses to cold and freezing stress in Brassica napus L. *G3: Genes, Genomes, Genetics: g3.* 400229.402019.
- Xin Z, Browse J (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell Environ.* 23(9): 893-902.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu J-K (2002) Regulation of Osmotic Stress-responsive Gene Expression by the LOS6/ABA1 Locus in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry.* 277(10): 8588-8596.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu J-K (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *plant cell.* 14(suppl 1): S165-S183.
- Yang H, Zhang H, Zhu L, Zhang C, Li D (2012) Identification and characterization of microRNAs in *Macaca fascicularis* by EST analysis. *Comparative and functional genomics.* 2012.
- Yu X, Wang H, Lu Y, de Ruiter M, Carriaso M, Prins M, ... He Y (2011) Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in Brassica rapa. *J. Exp. Bot.* 63(2): 1025-1038.
- Yuan Y, Liang Y, Li B, Zheng Y, Luo X, Dongdong L (2015) Cloning and function characterization of a β -Ketoacyl-acyl-ACP Synthase I from coconut (*Cocos nucifera* L.) endosperm. *Plant Mol. Biol. Rep.* 33(4): 1131-1140.
- Zhao X, Wei J, He L, Zhang Y, Zhao Y, Xu L, Liu M (2019) Identification of Fatty Acid Desaturases in Maize and Their Differential Responses to Low and High Temperature. *Genes.* 10(6): 445.
- Zhao Y-T, Wang M, Fu S-X, Yang W-C, Qi C-K, Wang X-J (2012) Small RNA profiling in two Brassica napus cultivars identifies microRNAs with oil production-and development-correlated expression and new small RNA classes. *Plant Physiol.* 158(2): 813-823.