مجله علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوازدهم، شماره یکم، پیاپی سی‌ونهم، پائیز ۱۴۰۱ (۳۶-۱۵)

Crop Biotech.
Autumn (2022) 12(1): 15-36 DOI: 10.30473/cb.2022.66104.1893

«مقاله پژوهشی»

بررسی مسیر عملکردی ژن‌های هدف miRNAها در پاسخ به تنش‌های شوری و خشکی در کلزا

محمد محسن‌زاده گلفزانی[1*]، علیرضا ترنگ[2]، رامین صیقلانی[3]

۱. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران

۳. مربی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۴- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۱)

Study of a functional pathway of miRNAs target genes in response to drought ant salt stresses in canola

Mohammad Mohsenzadeh Golfazani[1*], Ali Reza Tarang[2], Ramin Seighalani[3]

1. Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir
2. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
3. Instructor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

(Received: Sep. 15, 2022 - Accepted: Dec. 12, 2022)

چکیده

تنوع و پیچیدگی تنظیم miRNA نشان‌دهنده اهمیت آن‌ها در فرآیندهای زیستی است و بسیاری از بخش‌های تنظیم miRNA می‌توانند یک شبکه تنظیمی پیچیده miRNA-mRNA را تشکیل دهند. بنابراین، تحقیق روی شبکه‌های تنظیم‌کننده miRNA-mRNA می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای درک فرآیندهای زیستی پیچیده ارائه دهد، که برای مطالعه بیشتر مکانیسم‌های تحمل به تنش در گیاهان به خصوص در گیاه کلزا از اهمیت بالایی برخوردار است. در این پژوهش با استفاده از مرور مقالات انجام شده در زمینه تنش های غیر زیستی انتخاب miRNA های مؤثر در تنش خشکی و شوری انجام گرفت و با استفاده از توالی‌های مربوط به miRNAهای بالغ و به کمک نرم‌افزار آنلاین psRNATarget، شناسایی ژن‌های هدف انجام شد. لیست ژنی از ۲۲۵ ژن هدف شناسایی شده با کمک پایگاه UniProt تهیه شد. شناسایی مسیر عملکردی آن‌ها با کمک پایگاه بیوانفورماتیک DAVID و سایت KEGG طبق پارامترهای پیش‌فرض انجام گرفت. بررسی‌ها نشان داد که این ژن‌های هدف در مسیرهای زیستی متعددی ازجمله ریبوزوم، اسپلایسوزوم، پروتئازوم، متابولیسم پورین، متابولیسم سلنوکامپاند و متابولیسم سولفور شرکت داشتند. همچنین به منظور بررسی ژن‌های هم بیان از پایگاه داده STRING استفاده شد که نشان‌دهنده وجود ۳۷ ژن هم بیان در بین ژن‌های هدف شناسایی شده بود.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، تنظیم بیان ژن، DAVID، KEGG، miRNA.

Abstract

There is much information about the regulation of gene expression in response to various stresses at the transcriptional level. Nevertheless, there is limited information about this process at the post-transcriptional level. The diversity and complexity of miRNA regulation indicates their importance in biological processes. Many miRNA regulatory modules can form a complex miRNA-mRNA regulatory network. Therefore, research on miRNA-mRNA regulatory networks can provide valuable information for understanding complex biological processes. These data are very important to further study the stress tolerance mechanisms in plants, especially in rapeseed. In this research, the selection of miRNAs related to drought and salinity stress was made by reviewing the articles on abiotic stresses. Then the target genes were identified using the sequences of mature miRNAs and psRNATarget online software. A gene list of 225 identified target genes was prepared using the UniProt database. Their functional pathway was identified utilizing the DAVID bioinformatics database and KEGG database according to default parameters. Investigations showed that these target genes were involved in several biological pathways including ribosome, spliceosome, proteasome, purine metabolism, selenocompound metabolism, and sulfur metabolism. In addition, the STRING database was used to check co-expression genes. Our result indicated the existence of 37 co-expression genes among the identified target genes.

Keywords: Bioinformatics, DAVID, KEGG, miRNA, Regulation of gene expression.

* نویسنده مسئول: محمد محسن‌زاده گلفزانی
E-mail: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* از تیره شب‌بو یا چلیپاییان یکی از مهمترین گیاهان روغنی یکساله است که در تأمین انرژی و امنیت غذایی در سطح جهان نقش بسزایی دارد و برخلاف بیشتر گیاهان روغنی، در فصل پاییز قابل کشت بوده و از عملکرد بالایی برخوردار است. این گیاه روزبلند و سرمادوست در مناطقی با زمستان سرد کشت می‌شود (Pasandideh *et al.*, 2018). آسیب‌های ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به ماکرومولکول‌ها تحت تنش، مهمترین عامل پیشگیری کننده رشد در کلزا است (Ramezanzadeh Bishegahi *et al.*, 2021). تنش به‌عنوان عاملی شناخته می‌شود که مانع پدید آمدن یک سیستم زیستی کارآمد است. تعریف فیزیولوژیکی تنش در واقع می‌تواند به یک دسته از شرایط اطلاق شود که باعث یک تغییر نابجا در فرآیندهای زیستی شده و نهایتاً منجر به آسیب گردد. رشد و توسعه گیاهان تحت تأثیر تنش‌های محیطی شامل تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (Seki *et al.*, 2003). تنش‌های زیست‌محیطی با محدود کردن عملکرد و بهره‌وری محصولات کشاورزی، تهدید بزرگی برای کشاورزی است. اثرات نامطلوب تنش‌های محیطی به دلیل افزایش جمعیت جهان و تغییرات آب و هوایی بدتر می‌شود. گیاهان با تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش در هسته، سیتوپلاسم و اندامک‌ها برای مقابله با این تنش‌های محیطی اقدام می‌کنند (Zhang *et al.*, 2020). رایج‌ترین تنش آبی که با آن مواجه می‌شویم، تنش کمبود آب است که به‌عنوان تنش خشکی شناخته می‌شود. حذف آب از غشای ساختار طبیعی دولایه را مختل می‌کند. تنش خشکی در دو لایه لیپیدی همچنین ممکن است منجر به جابجایی پروتئین‌های غشایی شود و این امر منجر به از دست دادن یکپارچگی غشاء، در سلول و از دست دادن فعالیت آنزیم‌ها می‌شود که به‌طور عمده مبتنی بر غشاء هستند. علاوه بر آسیب غشایی، پروتئین سیتوزولی و اندامک ممکن است کاهش فعالیت داشته باشند یا حتی ممکن است در صورت کم‌آبی دچار واسرشته شدن کامل شوند. غلظت بالای الکترولیت‌های سلولی به دلیل کم‌آبی پروتوپلاسم نیز ممکن است باعث اختلال در متابولیسم سلولی شود. اجزاء و مسیرها تنش خشکی و شوری با یکدیگر مرتبط هستند. زیرا هر دو تنش خشکی و شوری درنهایت منجر به کم‌آبی سلول و عدم تعادل اسمزی می‌شوند. تقریباً هر جنبه‌ای از فیزیولوژی گیاهان و همچنین متابولیسم سلولی تحت تأثیر تنش شوری و خشکی قرار می‌گیرد (Verma *et al.*, 2013). شوری خاک یک تهدید مهم برای تولید پایدار کشاورزی در سراسر جهان است. شوری یک تنش غیرزیستی رایج در مناطق خشک و نیمه‌خشک است که بر متابولیسم گیاه در سطوح فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی تأثیر منفی می‌گذارد و بهره‌وری گیاه را کاهش می‌دهد (Wang *et al.*, 2018). این تنش با اختلال در کلروپلاست و هدایت روزنه‌ای، بر فتوسنتز، متابولیسم و سنتز پروتئین تأثیر می‌گذارد و تنش شدید حتی می‌تواند بقای گیاهان را تهدید کند. تنش شوری به وجود مقادیر اضافی یون‌های Na^+ و Cl^- در خاک یا محیطی که گیاه در آن رشد می‌کند اشاره دارد . (Verma *et al.*, 2013).

اولین miRNA (lin-4) در نماتد *Caenorhabditis elegans* کشف شد و به‌عنوان RNAهای موقتی کوچک[1] (stRNA) در آن زمان در نظر گرفته شد (Lee *et al.*, 1993). در سال ۲۰۰۱، به دلیل نقش تنظیمی که در آن‌ها مشاهده‌شده، به این stRNAها یک اسم رسمی با عنوان miRNAها داده شد و به‌عنوان یک گروه مجزا از RNAها طبقه‌بندی شدند (Lagos-Quintana *et al.*, 2001).

1. Small temporal RNAs

پس از آن در اواسط سال ۲۰۰۲ وجود RNAهایی با مشخصات miRNA در *Arabidopsis thaliana* گزارش شد (Llave *et al*., 2002). از زمان کشف اولین miRNA در سال ۱۹۹۳، طیف گسترده‌ای از مطالعات شواهد روشنی برای درگیری miRNAها در بسیاری از فرآیندهای زیستی ازجمله پاسخ به تنش ارائه کرده است. به دلیل پتانسیل miRNAها در هدف قرار دادن تعداد زیادی از mRNAها، این دسته اولیگونوکلئوتیدهای ۲۱-۲۲ تایی تقریباً در تمام پدیده‌های زیستی شامل تنظیم چرخه سلولی، رشد سلولی، آپوپتوزیس، تمایز سلولی، انتقال علامت، تجزیه پروتئین و همچنین تنظیم بیوژنز خود و پاسخ به تنش نقش دارند (Zhang *et al*., 2006). miRNAها از طریق قطعه‌قطعه کردن mRNAهای هدف و یا جلوگیری از ترجمه، فعالیت تنظیمی خود را اعمال می‌کنند. این miRNA در عملکرد کمپلکس RISC نقش مهمی دارد به‌صورتی‌که اگر تغییرات شیمیایی در این نوکلئوتیدها اعمال شود یا اگر خود توالی عوض شود تأثیر کمپلکس RISC بر mRNA کاهش می‌یابد. عامل کلیدی در مکانیسم کارکردی miRNA وجود بازهای مکمل مابین ژن هدف و miRNA است (Bartel, 2004). البته در مواردی مشاهده‌شده است که مسیرهای سرکوب ترجمه و مسیرهای برش، همپوشانی داشته‌اند و مکانیزم‌های یکسانی دارند، به‌طور مثال در مورد خانواده miR172 که بیان APETALA2 (AP2) را تنظیم می‌کند این موضوع مشاهده‌شده است (Aukerman & Sakai, 2003). این مطالعات بیانگر این است که تنظیم بیان mRNA توسط miRNAها بواسطه مکانیسم‌های مختلفی از جمله برش، مهار ترجمه یا ترکیبی از هر دو انجام می‌گیرد. گیاهان براسیکا معمولاً به دلیل تغییرات فصلی و تغییرات جغرافیایی با تنش‌هایی مواجه می‌شوند که در رشد و نمو گیاه اختلال ایجاد می‌کند. با این‌حال، گیاهان می‌توانند با تعدیل بیان ژن هدف، خود را با این شرایط سازگار کنند. شواهد در حال ظهور نشان داده‌اند که miRNAها در تنظیم بیان ژن هدف در طی تنش‌ها نقش دارند.miRNAها به‌طور تکاملی در گونه‌های گیاهی حفظ می‌شوند، بنابراین، miRNAهای شناسایی‌شده در سایر گونه‌های گیاهی را می‌توان برای مطالعات اولیه و بیوانفورماتیک استفاده کرد (Taghvaei *et al*., 2022). Yu *et al*. (2012) در *Brassica rapa*، ۲۱ miRNA جدید از ۱۹ خانواده miRNA را شناسایی کردند که در پاسخ به گرما چهار miRNA به‌ویژه bramiR5718 و bra-miR1885b.3 نقش داشتند. بررسی مسیر KEGG [1] برای ژن‌های هدف می‌تواند آشکارکننده مسیرهای عملکردی این ژن‌ها باشد و درواقع بیانگر این است که این ژن‌های هدف در کدام مسیرهای زیستی درگیر هستند و تنظیم بیان آن‌ها می‌تواند در نهایت تنظیم‌کننده کدام مسیرهای زیستی باشد و تحقیق روی miRNA می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای درک فرآیندهای بیولوژیکی پیچیده ارائه دهد نتایج این مطالعه می‌تواند نشان‌دهنده ژن‌های دخیل در مسیرهای زیستی متعدد باشد، که برای مطالعه بیشتر مکانیسم‌های تحمل خشکی و شوری در کلزا از اهمیت بالایی برخوردار است.

مواد و روش‌ها

با استفاده از بررسی مقالات انجام شده در زمینه تنش‌های غیرزیستی، انتخاب miRNAهای مؤثر در گیاه کلزا تنش خشکی و شوری انجام گرفت و پس از آن به‌کمک پایگاه داده miRBase (http://miRbase.org/) توالی‌های آن‌ها دریافت و مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس مولکول‌های miRNA با اسامی bna-miR156، bna-miR171،

1. KEGG Pathway

bna-miR169، bna-miR860، bna-miR393، bna-miR395، bna-miR396، bna-miR399، bna-miR172 به‌منظور بررسی انتخاب شدند. با استفاده از توالی‌های مربوط به miRNAهای بالغ و نرم‌افزار برخط psRNATarget (نسخه ۲۰۱۷) با بهره گیری از داده DFCI Gene Index (BNGI, version 5) مربوط به گیاه کلزا و با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض (ارزش موردانتظار[1]، ۵)، شناسایی ژن‌های هدف انجام شد (Dai *et al.*, 2018; Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2022a; Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2022b) عنوان ژنهای هدف شناسایی شده در پژوهش دیگر آمده است (Zolfaghari Khutbehsera *et al.*, 2022).

اطلاعات و شناسه ژنی اهداف پیش‌بینی‌شده با کمک پایگاه (https://www.uniprot.org) UniProt به‌دست‌آمده و به صورت یک لیست ژنی سازماندهی شد. با استفاده فهرست ژن‌های هدف شناسایی‌شده، شناسایی مسیر عملکردی[2] آن‌ها با کمک پایگاه‌های بیوانفورماتیکی DAVID[3] و سایت KEGG[4] طبق پارامترهای پیش‌فرض انجام گرفت (Huang *et al.*, 2009). همچنین به منظور بررسی و شناسایی ژن‌های هم بیان[5] (ژنهای که با هم بیان می‌شوند) و ارتباط آن‌ها با یکدیگر، لیست ژنی با کمک پایگاه داده STRING مورد بررسی قرار گرفت. در این پایگاه به هر تعامل نمرات صفر تا یک داده می‌شود، شاخص حداقل امتیاز متقابل موردنیاز یک به‌صورت پیش‌فرض روی ۰/۴ تنظیم شد (Szklarczyk *et al.*, 2018; Taghvaei *et al.*, 2022).

در پایگاه KEGG (www.genome.jp/kegg) هدف اولیه این پایگاه ساماندهی به اطلاعات موجود در مورد ارتباط بین ماکرو مولکول‌های زیستی به‌ویژه مسیرهای بیوشیمیایی، مسیرهای تنظیمی و فرآیندهای زیستی بود. هدف نهایی KEGG استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی به‌منظور بازسازی و پیش‌بینی عملکرد ژن‌ها و محصولات آن‌ها در مسیرهای سلولی است. در حال حاضر، KEGG به‌عنوان پایگاهی از داده‌های سامانه‌های زیستی، بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی و تعدادی از مسیرهای تنظیمی و رکوردهای فراوانی از ژن‌ها، آنزیم‌ها و سوبستراهای آن‌ها را به‌طور مستقیم یا با لینک دادن پوشش می‌دهد.

بانک اطلاعاتی DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov) یک منبع بیوانفورماتیک برخط مبتنی بر وب است که هدف آن ارائه ابزاری برای تفسیر کاربردی فهرست‌های ژن‌ها/ پروتئین‌ها است؛ مانند مواردی است که از مطالعات ژنومی و پروتئومیک استخراج‌شده است. برای هر لیست ژن بارگذاری شده در سایت، منابع بیوانفورماتیکی DAVID نه‌تنها تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن را ارائه می‌دهد، بلکه ابزارهایی را نیز فراهم می‌کند که به کاربران امکان می‌دهد فهرست‌های با تعداد زیاد ژن را در گروه‌های عملکردی طبقه‌بندی کنند (Huang *et al.*, 2009).

شبکه تعامل پروتئین-پروتئین یک بخش مهم در بیوانفورماتیک برای درک سیستمی فرآیندهای سلولی است. چنین شبکه‌هایی را می‌توان برای ارزیابی داده‌های ژنومیک کارکردی به‌کار برد. STRING یک بانک اطلاعاتی برخط هست که داده‌های حاصل از تحقیقات تجربی و پیشگویی شده از برهمکنش پروتئین-پروتئین در آن جمع‌آوری‌شده است. پایگاه داده STRING شامل اطلاعات از منابع متعددی ازجمله داده‌های تجربی، داده‌های حاصل از روش‌های پیش‌بینی محاسباتی و داده‌های مجموعه متون علمی هست. داده‌های این بانک آزادانه در

1. Expectation
2. Pathway
3. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
4. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
5. Co-Expression

دسترس است و به‌طور منظم به‌روز می‌شود (Szklarczyk *et al*., 2018).

نتایج و بحث

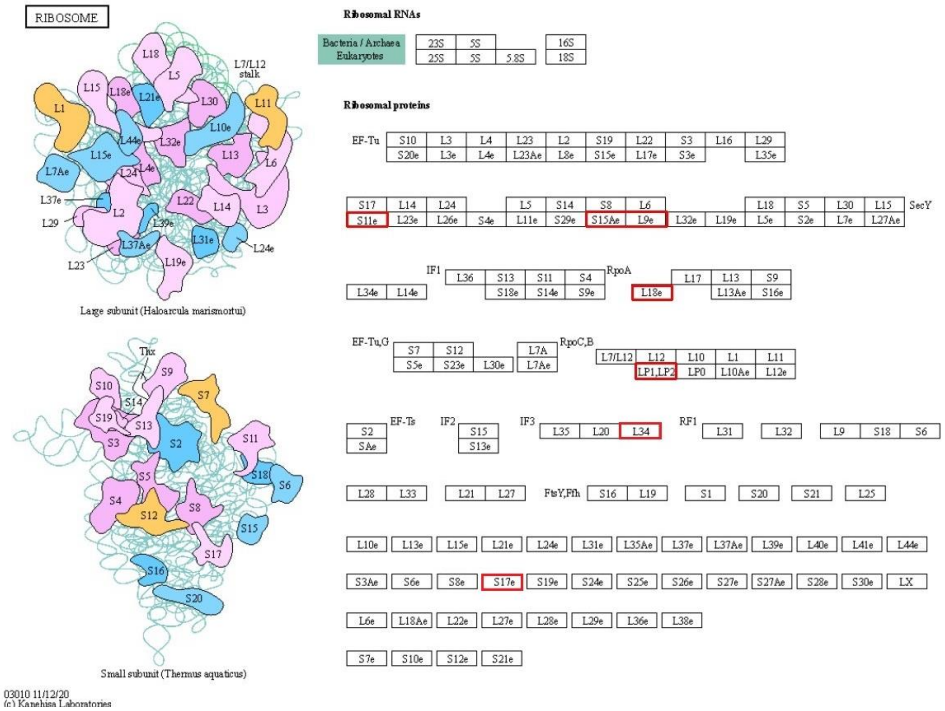
ژن‌های هدف miRNA پس از بررسی‌های اولیه و مشخص کردن اسامی شناخته شده آن‌ها در غالب یک لیست ژنی توسط پایگاه DAVID مورد بررسی قرار گرفت، این پایگاه داده به کمک اطلاعات جمع آوری شده از پایگاه KEGG مشخص کرد که حضور برخی از ژن‌های هدف شناسایی شده در برخی از مسیرهای زیستی اثر گزارتر است. سپس با کمک این دو پایگاه داده تصاویر شماتیک این مسیرها به همراه ژن‌های هدف شناسایی شده در هر مسیر دریافت شد. این نتایج نشان‌دهنده این است که miRNAهای مورد بررسی که در تنش‌های خشکی و شوری تغییر بیان داشتند می‌توانند نقش خود را از طریق تنظیم برخی از ژن‌های موثر در از فرآیندهای زیستی اعمال کنند. لذا این مسیرهای زیستی شناسایی شده که ژن‌های هدف به‌طور عمده در آنها دخیل هستند، می‌تواند در پژوهش‌های تجربی آتی مورد استفاده قرار گیرد. این مسیرها به ترتیب شامل: ریبوزوم، اسپلایسوزوم، پروتئازوم، متابولیسم پورین، متابولیسم سلنوکامپاند و متابولیسم سولفور بودند.

بررسی مسیر عملکردی ژن‌های هدف miRNAها در ریبوزوم

با توجه به شکل ۱ که مسیر KEGG ریبوزوم را نشان می‌دهد ژن‌های ریبوزومی *RPP1C* و *RPS17D*، توسط miR156، *RPL18C* توسط miR396، *RPL34* و *RPL9D* توسط miR172، *RPS15AA* توسط mir393 و *RPS11C* توسط miR860 مورد هدف قرار گرفتند. گیاهان استراتژی‌های زیادی را برای بقای تکامل داده‌اند، ازجمله آن‌ها القای ژن‌های مختلف پاسخ‌دهنده به تنش مانند ژن پروتئین ریبوزومی است، این ژن‌ها پروتئین‌های حیاتی را رمزگذاری می‌کنند که اثرات خشکی و تنش شوری را در گیاهان کاهش می‌دهند. پروتئین‌های ریبوزومی نقش ذاتی در تولید ساختار rRNA ایفا می‌کنند و همچنین به‌عنوان اجزای سازنده ماشین سنتز پروتئین عمل می‌کنند. آن‌ها همچنین برای رشد و نمو همه موجودات حیاتی هستند. مشخص‌شده که پروتئین‌های ریبوزومی[1] (RPs) از جمله پروتئین‌های زیر واحد کوچک[2] (RPS) و زیر واحد بزرگ[3] (RPL)، در چندین عملکرد بسیار مهم شامل: اتصال زیرواحدهای ریبوزوم، سنتز پروتئین و سایر عملکردهای سلولی اساسی دخیل هستند. ترکیب زیرواحدهای پروتئین ریبوزومی به‌صورت ناهمگن است و این امر به وضوح نشان می‌دهد که هر زیر واحد منفرد به غیر از عملکردهای سلولی پایه که با آن‌ها مرتبط هستند، عملکردهای دیگری نیز دارند (Mazahar *et al*., 2019). همچنین مشاهده‌شده که بیان پروتئین‌های ریبوزومی توسط عوامل محیطی تنظیم می‌شود (Hulm *et al*., 2005; Moin *et al*., 2016b).

دخالت پروتئین‌های ریبوزومی در عملکردهای اضافی ریبوزومی در سیستم‌های حیوانی نیز به خوبی ارائه شده است (Warner & McIntosh, 2009). همچنین این عملکردهای اضافی پروتئین‌های ریبوزومی در تنش‌های محیطی در گیاهان نیز اثبات شده است. چندین ژن RPL و RPS در مراحل اولیه تحت تنش شوری در برنج تنظیم می‌شوند (Kawasaki *et al*., 2001). جهش در *RPL24*، که یک عامل مهم شروع ترجمه است، منجر به نقص در رشد مادگی و تخمدان گیاه آرابیدوپسیس شد (Nishimura *et al*., 2004).

1. Ribosomal proteins
2. Small subunit
3. Large subunit



شکل ۱. مسیر KEGG مرتبط با ریبوزوم، این مسیر با استفاده از جستجوی فهرست ژن‌های هدف miRNAها در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی DAVID و KEGG شناسایی شده است. آن دسته از ژن‌های پروتئین‌های ریبوزومی هدف miRNAها که در این مسیر تحت تأثیر قرار می‌گیرد با مستطیل قرمز نشان داده شده‌اند.
S11: RPS11C, S15A: RPS15AA, L9: RPL9D, L18: RPL18C, LP1,LP2: RPP1C, L34: RPL34, S17: RPS17D

بنابراین، نقش پروتئین‌های ریبوزومی در عملکردهای دیگر ریبوزومی در گیاهان دیده می‌شود. راندمان مصرف آب[1] (WUE) یک ویژگی مهم زراعی در برنج است. در گیاهان جهش‌یافته برنج، افزایش فعالیت دو ژن زیر واحد بزرگ پروتئین ریبوزومی، *RPL6* و *RPL23A* به‌طور قابل توجهی بازده مصرف آب را افزایش داد (Moin *et al.*, 2016a). در یک مطالعه دیگر مشخص شد که PRL6 در تحمل گیاه برنج به شوری مؤثر است (Moin *et al.*, 2021). بررسی‌های دیگر در مورد ژن‌های *RPL* و *RPS* در برنج نشان داد، که این ژن‌ها در تیمارهای مختلف با تنش‌های غیر زیستی و زیستی به‌طور متفاوتی تنظیم می‌شوند. افزایش بیان *RPL23A* در برنج و افزایش تحمل به تنش غیرزیستی نشان‌دهنده نقش این ژنها در پاسخ به تنش است (Moin *et al.*, 2017). مطالعات بر روی عملکرد پروتئین‌های ریبوزوم کلروپلاست نشان داده است که حفظ کارایی ترجمه ژن کلروپلاست برای توسعه مناسب کلروپلاست در دمای پایین مهم است. جهش‌یافته‌های ذرت (*Zea mays*) فاقد پروتئین ریبوزومی RPS17 وقتی در دمای متوسط (۲۷ درجه سانتی‌گراد) رشد کردند سبز کم رنگ و در شرایط خنک (۱۷ درجه سانتی‌گراد) آلبینو بودند (Zhang *et al.*, 2020). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عوامل تنش غیرزیستی رونویسی ژن‌های کدکننده پروتئین RPLرا تنظیم می‌کند. به‌عنوان مثال، مشخص شد که در گیاه کتان *RPL14-2* در تحمل گیاه به خشکی و شوری نقش داشت (Shiraku *et al.*, 2021). GmRPL37 در طی تنش سرما در گیاه سویا بیان بالایی داشت و نقش مثبتی در تحمل سرما در این گیاه داشت (Kim *et al.*, 2004).

1. Water use efficiency

افزایش بیان RPL44 در *Aspergillus glaucus* باعث افزایش تحمل به خشکی و تنش شوری شد (Liu *et al*., 2014). در گیاهان تنباکو، ژن *RPL33* زمانی‌که گیاهان در شرایط مناسب رشد می‌کنند ضروری نیست، اما در افزایش سازگاری در طی تنش سرما بسیار مهم است (Rogalski *et al*., 2008). بررسی‌ها مشخص کرد که در شرایط تنش خشکی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ریبوزومی خانواده ۶۰S مانند RPP1C نقش مهمی بر عهده دارند و تنش خشکی سبب افزایش *RPP1C* و *RPL36AA* می‌شود (Alqurashi *et al*., 2018). از طرفی در تنش خشکی میزان بیان bna-miR156 در کلزا کاهش می‌یابد (Jian *et al*., 2016). ژن *RPL9D* بوسیله miR172d مورد هدف قرار می‌گیرد. در تنش خشکی بیان miR172d در کلزا کاهش می‌یابد (Jian *et al*., 2016). این کاهش بیان miR172d می‌تواند نقش تنظیمی در تولید ژن ریبوزومی *RPL9D* داشته باشد. همچنین در خشکی بیان miR860 در کلزا کاهش می‌یابد (Jian *et al*., 2016). با کاهش بیان miR860 انتظار می‌رود که بیان ژن RPS11 افزایش یابد. از آنجایی‌که تنش‌های شوری و خشکی می‌تواند منجر به تغییر سنتز پروتئین شود، مشاهده‌شده است که افزایش ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ریبوزومی در گیاهان تحت شرایط تنش، منجر به بازسازی کارآمد ماشین‌های سنتز پروتئین در سلول‌ها می‌شود (Moin *et al*., 2021). چندین ژن پروتئین ریبوزومی از جمله *PRS4*، *PRS7*، *PRS8*، *PRS9*، *PRS10*، *PRS19* و *PRS26*؛ *PRL2*، *PRL5*، *PRL18* و *PRL44* جمله ژن‌های اولیه پاسخگو به تنش شوری بودند که در طی تنش شوری در برنج متحمل به شوری افزایش بیان داشتند و افزایش بیان وابسته به تنش شوری ژن پروتئین ریبوزومی پلاستیدی، PRPL11 در بهبود عملکرد فتوسنتزی در طول فاز اولیه تنش شوری نقش داشت (Sahi *et al*., 2006). این تحلیل‌ها به این واقعیت اشاره می‌کنند که سنتز ریبوزوم‌ها و افزایش سطح رونوشت ژن‌های پروتئین‌های ریبوزومی برای گردش کارآمد پروتئین و بازسازی ماشین‌های سنتز پروتئین تحت تنش به‌عنوان یک پیامد فوری در تنش شوری و خشکی مورد نیاز است (Moin *et al*., 2021).

بررسی مسیر عملکردی ژن‌های هدف miRNAها در اسپلایسوزوم[1]

با توجه به شکل ۲ که مسیر KEGG اسپلایسوزوم را نشان می‌دهد ژن‌های پروتئین خانواده متصل شونده به RNA (موتیف RRM/RBD/RNP)[2] (RS31)، پروتئین غنی از SER/ARG3 34A (SR34a)[3]، پروتئین خانواده ریبونوکلئوپروتئین هسته‌ای کوچک[4] (LSM2)، پروتئین وابسته به شوک حرارتی[5] (HSC70-1)، پروتئین شبه فاکتور پیرایشی غنی از سرین/آرژنین[6] (SC35) به ترتیب توسط miR396، miR396، miR395، miR156، miR156 مورد هدف قرار گرفتند. پردازش و اصلاحات RNA به‌طور عمده توسط عوامل پیرایشی انجام می‌شود، این عوامل شامل گروهی از RBPها است که کمپلکس اسپلایسوزوم را تشکیل می‌دهند. پروتئین خانواده متصل شونده به RNA (RS31) از جمله این پروتئین‌هاست که توسط miR396 تنظیم می‌شود با توجه به افزایش بیان این miRNA در طی تنش خشکی و شوری (Jian *et al*., 2016) به نظر می‌رسد که بیان ژن هدف آن افزایش داشته باشد.

اسپلایسوزوم یک کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین[7]

1. Spliceosome
2. RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
3. SER/ARG-rich protein 34A
4. Small nuclear ribonucleoprotein family protein
5. Heat shock cognate protein 70-1
6. Serine/arginine-rich splicing factor-like protein
7. Ribonucleoprotein

(RNP) بزرگ شامل RNAهای هسته‌ای کوچک و صدها پروتئین است. در یوکاریوت‌ها، اسپلایسوزوم پردازش ضروری RNA را انجام می‌دهد. این عمل با حذف اینترون‌ها از pre-mRNA برای تشکیل mRNA بالغ صورت می‌گیرد. به‌طور کلی، ترکیب بسیار پویای اسپلایسوزوم و RNPها، تغییرات رونوشت را در طول رشد، توسعه و در پاسخ به عوامل برون‌زا هماهنگ می‌کند (Köster *et al*., 2017). اسپلایسوزوم RNAها را از حالت پیش‌ساز RNA به mRNAبالغ پردازش می‌کند و در دسترسی RNA برای ترجمه، مکان‌یابی و جابجایی آن تأثیر می‌گذارد. اسپلایسوزوم شامل ساختارهای پیچیده حاوی پروتئین‌های متصل شونده به RNA [1] (RBPs) است که برای کنترل بیان ژن پس از رونویسی ضروری است. رونویسی و تنظیم ژن پس از رونویسی[2] (PTGR) اولین و اصلی‌ترین هدف در کنترل بیان ژن است. شبکه‌های تنظیمی PTGR شامل پردازشRNA، اصلاح، تثبیت، ذخیره‌سازی، مکان‌یابی[۳]، ترجمه و تخریب است (Marondedze *et al*., 2020). این فرآیندها تا حدی توسط پروتئین‌های متصل شونده به RNA[۴] (RBPs) به شدت کنترل می‌شوند.

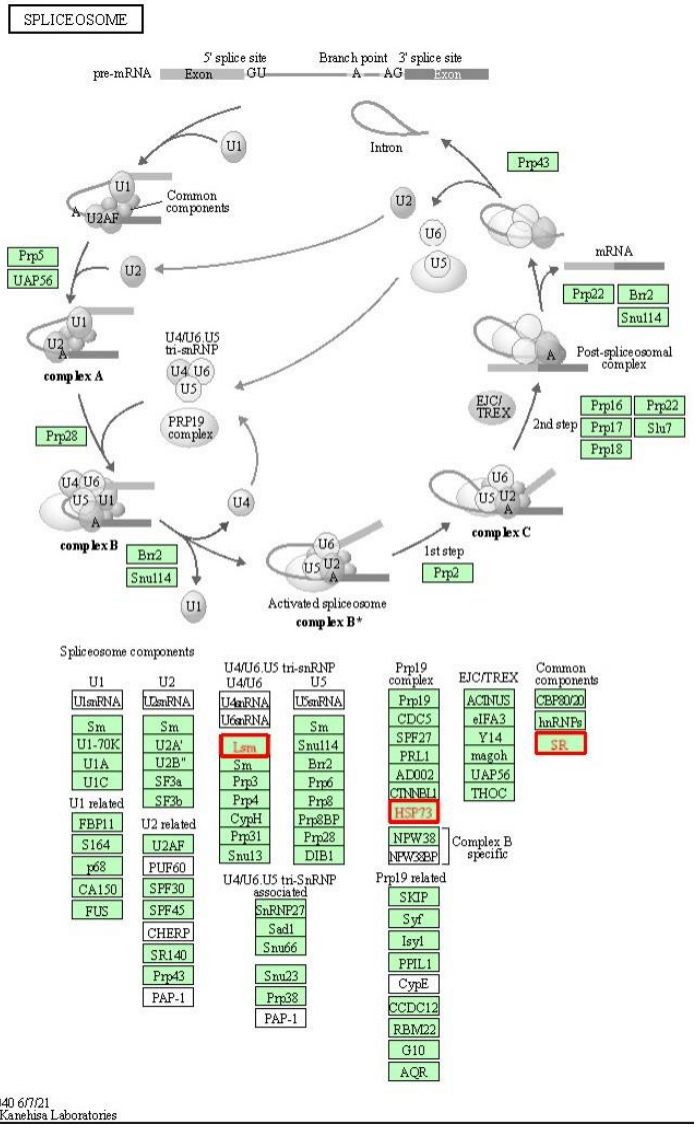
در یک مطالعه به‌منظور شناسایی ژن‌هایی که می‌توانند تحمل شوری در چغندر را بهبود بخشند، شش ژن شناسایی شد که پروتئین‌های متصل شونده به RNA کد می‌کنند و قادر به افزایش تحمل شوری هستند. دو تا از این ژن‌ها به نام‌های *BvSATO3* و *BvU2AF35b* در پیرایش RNA شرکت می‌کنند. چهار ژن دیگر *BvSATO6*، *BvSATO4*، *BvSATO2*، *BvSATO1* احتمالاً در سایر فرآیندهای متابولیسم RNA نقش دارند (Rosa Téllez *et al*., 2020). در مطالعه‌ای که اخیرا بر روی ۴۴ پروتئین مؤثر در اسپلایسوزوم صورت گرفت مشخص شد که تغییراتی در فعالیت آن‌ها در طی تنش خشکی صورت گرفته است (Marondedze *et al*., 2020). مطالعات همچنین نشان داده که پروتئین‌های سرین/آرژنین در طی تنش فعال می‌شوند. بررسی‌ها مشخص کرد که یک پروتئین شبه سرین/آرژنین (SR)[5] با توالی حفاظت شده با نام *SR45a*، به‌عنوان جزئی از اسپلایسوزوم، در تنظیم پس از رونویسی برای تحمل به شوری در آرابیدوپسیس نقش داشت. علاوه بر این، *SR45a* برای بلوغ[6] و mRNA چندین ژن تحمل به شوری مورد نیاز بود. دو واریانت پیرایش‌شده *SR45a*[۷] (*SR45a-1a* و *SR45a-1b*) توسط تنش شوری القا شدند و لاین‌های با افزایش بیان *SR45a-1a* و *SR45a-1b* به تنش شوری حساس بودند (Li *et al*., 2021). گیاهان باید فرآیندهای رشدی و فیزیولوژیکی خود را برای مقابله با تنش شوری و خشکی تنظیم کنند. اگرچه ظرفیت انطباق درنهایت به ژنوم بستگی دارد، تطبیق پذیری در تنظیم ژن توسط پیرایش جایگزین (AS)[8] به‌کمک اسپلایسوزوم رخ می‌دهد و برای این فرآیندهای تطبیقی ضروری است. به‌عنوان نمونه، در آرابیدوپسیس پروتئین اسپلاسوزومال *AtU1A*، در کنترل AS از pre-mRNA ها تحت تنش شوری و تحمل تنش شوری مؤثر است. جهش یافته *atu1a* به تنش شوری حساس بود و انواع اکسیژن فعال بیشتری نسبت به نوع وحشی تحت تنش شوری انباشته کرد (Gu *et al*., 2018). بنابراین، به نظر می‌رسد دستگاه پیرایش mRNA در گیاهان به پاسخ‌های تنش شوری در سطح پس از رونویسی کمک می‌کند و ارتباطی بین پیرایش

1. RNA-binding proteins
2. Post-transcriptional gene regulation
3. Localization
4. RNA-binding proteins
5. Serine/arginine-rich (SR)-like
6. Maturation
7. Spliced variants
8. Alternative splicing

جایگزین و تحمل به تنش فراهم می‌کند. در یک مطالعه دیگر، یک تجزیه و تحلیل ژنومی از AS در ریشه‌های سویا (*Glycine max*) که تحت شرایط مختلف خشکی رشد کرده بودند مشخص کرد، تنظیم AS نقش حیاتی در پاسخ به خشکی ریشه سویا داشت (Song *et al.*, 2020). بنابراین به نظر می‌رسد با تحقیقات عمیق بیشتر در مورد عملکرد اسپلایسوزوم و مکانیسم AS در فرآیند تنش غیرزیستی، می‌توان یک استراتژی جدید برای افزایش تحمل به تنش گیاهان ارائه کرد.

بررسی مسیر عملکردی ژن‌های هدف miRNAها در پروتئازوم

با توجه نتایجی که در شکل ۳ نشان داد شده در مسیر KEGG پروتئازوم برخی از زیر واحدهای مهم توسط miRNAها مورد هدف و تنظیم قرار می‌گیرند.



شکل ۲. مسیر KEGG مرتبط با سپلایسوزوم، این مسیر با استفاده از جستجوی فهرست ژن‌های هدف miRNAها در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی DAVID و KEGG شناسایی شده است. آن دسته از ژن‌های مرتبط با سپلایسوزوم هدف miRNAها که در این مسیر تحت تأثیر قرار می‌گیرد با مستطیل قرمز نشان داده‌شده‌اند.
SR: RS31/ SR34a/ SC35, LSM: LSM2, HSP73: HSC70-1

بر این اساس، زیرواحد تنظیم‌کننده غیر ATPase 26S پروتئازوم[1] (RPN11)، توسط miR156 مورد هدف قرار گرفت. این زیر واحد مربوط به بخش تنظیمی(RP)/ 19S است. در واقع RPN11 نوعی آنزیم DUBs[2] مرتبط با پروتئازوم است که با حذف یوبیکوئیتین از پروتئین شرایط را برای دیوبیکوئیتینه شدن فراهم می‌کند (Stone, 2019). miR156 نقش تنظیمی در بیان ژن *RPN11* به‌عنوان عامل دیوبیکوئیتینه دارد. در پژوهشی موتاسیون اجزای *RP* در پروتئازوم سبب کاهش تحمل به تنش در آرابیدوپسیس شد. گیاهان موتانت *RPN10* تحمل کم‌تری نسبت به شوری، گرما و پرتو UV داشتند (Smalle *et al*., 2003). همچنین موتانت *RPN1a* به تنش شوری و گرما حساس بود (Wang *et al*., 2009a).

تنش‌های زیستی و غیر زیستی معمولاً باعث اختلال در عملکرد پروتئین می‌شوند و پروتئین‌های نابجا خطرات قابل‌توجهی را برای زنده‌ماندن سلول نشان می‌دهند. فرآیندهای سلولی مختلف به شدت تحت تأثیر پروتئین‌های ناهنجار یا آسیب‌دیده قرار می‌گیرند. برای اطمینان از بقای سلول در شرایط تنش، برای سلول‌های گیاهی مهم است که پروتئین‌ها را در ساختار عملکردی مربوطه خود حفظ کنند. پروتئازوم‌ها[3] برای عمل در محیط سلولی طراحی شده‌اند و مسئول تخریب پروتئین‌هایی با تاخوردگی اشتباه یا آسیب‌دیده در داخل سلول هستند. در طول انواع مختلف شرایط تنش، سطوح پروتئین‌های نادرست تا شده یا سرگردان که توسط پروتئازوم 26S تجزیه می‌شوند، افزایش می‌یابد. این امر به سلول‌ها اجازه می‌دهد تا تنظیمات بازخوردی را برای سیگنال‌های سطح سلولی حفظ کنند و با شرایط محیطی تغییریافته سازگار شوند (Ali & Baek, 2020). حفظ یک سیستم کاملاً هماهنگ و بسیار خاص برای تخریب پروتئین‌ها برای بقای هر موجود زنده ای حیاتی است. در یوکاریوت ها، این کار با برچسب زدن پروتئین‌های هدف با یوبیکوئیتین[4] برای شناسایی و تخریب بعدی توسط پروتئازوم 26S انجام می‌شود (Delauré *et al*., 2008). در طول دوره رشد گیاه از جوانه زنی تا پیری، مورفولوژی و متابولیسم گیاه به‌طور چشمگیری تغییر می‌کند، که منجر به تجمع بسیاری از پروتئین‌های منسوخ و ساختارهای سلولی می‌شود که باید تجزیه شوند. علاوه بر این، گیاهان به‌عنوان ارگانیسم‌های بی‌تحرک باید خود را با شرایط محیطی که دائماً در حال تغییر هستند وفق دهند (Ali & Baek, 2020). از نظر ساختاری، 26S پروتئازوم (26SP) در گیاهان از یک بخش هسته 20S/(CP) پروتئازوم (20SP) و یک بخش تنظیمی 19S /(RP) پروتئازوم تشکیل شده است. 20SP در تخریب پروتئین‌ها نقش دارد، در حالی که 19S وابستگی به ATP و یوبیکوئیتین (Ub) را به پروتئاز می‌دهد. CP یک پروتئاز بشکه ای شکل مستقل از ATP و Ub است که از چهار حلقه یعنی دو حلقه داخلی و دو حلقه بیرونی ساخته شده است. حلقه‌های داخلی از هفت زیر واحد β (β1 تا β7) تشکیل شده است در حالی که حلقه‌های بیرونی دارای هفت زیر واحد α (α1 تا α7) هستند. این حلقه‌ها دسترسی پروتئین‌ها به محفظه پروتئولیتیک را فراهم می‌کنند. از طرف دیگر بخش تنظیم‌کننده از دو زیرمجموعه درب[5] و بدنه[6] تشکیل شده است. بدنه شامل شش RP Triple-A ATPase (RPTs) به همراه سه زیر واحد RP Non-ATPase (RPN) یک، دو و ۱۰ است. درب RP از هشت RPN (۳، ۵ تا ۹، ۱۱ و ۱۲) تشکیل شده است. RPTها پروتئین‌های هدف را باز[7] می‌کنند و ورودی 20SP را می‌گشایند.

1. 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit
2. Deubiquitinating enzymes
3. Proteasomes
4. Ubiquitin
5. Lid
6. Base
7. Unfold

زیر واحدهای RPN یک، دو و ۱۰ به‌عنوان محل اتصال برای پروتئین‌های مختلف عمل می‌کنند (Díaz-Villanueva *et al*., 2015).

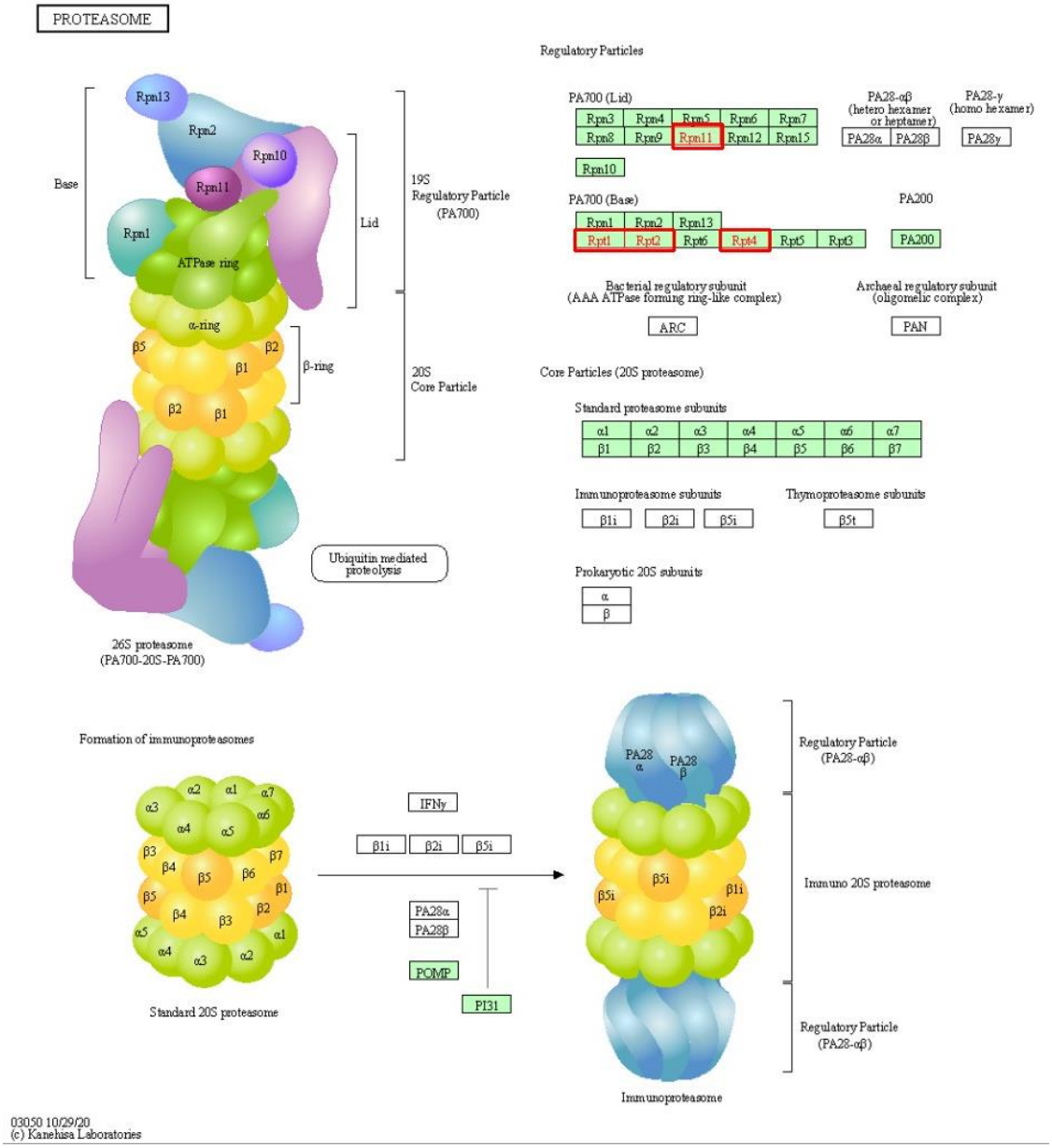
گیاهان جهش‌یافته آرابیدوپسیس *rpn1a-4*، *rpn1a-5* و *rpn10-1* تحمل محدودی نسبت به تنش شوری نشان می‌دهند (Wang *et al*., 2009b). سه ژن هدف دیگر نیز مرتبط با بخش تنظیمی پروتئازوم هستند، بخش تنظیمی تریپل A ATPase[1] 2a (RPT2a) و بخش تنظیمی تریپل A ATPase 4a (RPT4a) توسط miR396 تنظیم می‌شوند و بخش تنظیمی تریپل ATPase A 1a (RPT1a) توسط miR172 مورد هدف قرار گرفت. این زیر واحدهای RPT با قابلیت ATPase تاخوردگی‌های پروتئین را باز می‌کنند و نقش مهمی در قابلیت پروتئولیز پروتئازوم دارند. برخی از شواهد حاکی از افزایش بیان ژن و افزایش فعالیت پروتئازها در پاسخ به عوامل تنش‌زای غیر زیستی و زیستی است (Ali & Baek, 2020). نقش محافظتی پروتئازها در طول تنش‌های محیطی و تهاجم پاتوژن در مطالعات دیگر مورد بررسی قرار گرفت (Ali & Baek, 2020; Baek & Choi, 2008). همچنین مطالعه دیگری نشان داد که زیر واحد RPT4 می‌تواند در برابر تنش زیستی ویروسی در گیاه گوجه‌فرنگی نقش داشته باشد (Sahu *et al*., 2016). همچنین موتانت *RPN1a* به تنش شوری و گرما حساس بود (Wang *et al*., 2009b). در پژوهش دیگر موتاسیون در *RPN12a* و *RPT2a* سبب کاهش تحمل تنش گرما و موتاسیون در *RPT5a* سبب کاهش تحمل کمبود روی شد (Sakamoto *et al*., 2011). تغییرات در فراوانی پروتئازوم که تحت تأثیر توسعه و محیط قرار می‌گیرد برای رشد و بقای گیاه در شرایط نامطلوب مهم است (Kurepa *et al*., 2009). از آنجایی‌که تکثیر سلولی در گیاهان به فعالیت بهینه پروتئازوم 26S بستگی دارد، بنابراین به‌نظر می‌رسد عوامل تنش‌زا که مستقیماً بر فعالیت پروتئازوم 26S تأثیر می‌گذارند، به‌طور غیرمستقیم تکثیر سلولی را کاهش می‌دهند. تنش غیرزیستی می‌تواند فعالیت پروتئازوم 26S تحت تأثیر قرار دهد. به‌عنوان نمونه، تنش اکسیداتیو مستقیماً منجر به مهار پروتئازوم 26S می‌شود (Amm *et al*., 2014). به نظر می‌رسد تنظیم پروتئازوم نقش مهمی در تحمل و یا واکنش به شرایط تنش‌زا دارد بر عهده دارد. از رو گیاه سعی می‌کند از مسیرهای مختلفی ازجمله mRNAها فعالیت آن‌ها را تحت کنترل و تنظیم قرار دهد.

بررسی مسیر عملکردی ژن‌های هدف miRNAها در متابولیسم پورین، متابولیسم سلنوکامپاند و متابولیسم سولفور

در این پژوهش بررسی‌ها نشان داد که برخی از ژن‌های هدف شناسایی‌شده به‌صورت مشترک در برخی از مسیرهای زیستی دخیل بود. به این صورت که ATP سولفوریلاز۱ (APS1)[2]، ATP سولفوریلاز ۳ (APS3)، ATP سولفوریلاز ۴ (APS4)، که توسط miR395 تنظیم می‌شوند به‌صورت مشترک در دو مسیر متابولیسم پورین، متابولیسم سلنوکامپاند و متابولیسم سولفور وجود داشتند، با این تفاوت که علاوه بر ژن‌های اشاره‌شده، ژن پروتئین سنتاز مستقل از کوبالامین۱ (ATMS1)[3] که توسط miR396 تنظیم می‌شود، در متابولیسم سلنوکامپاند وجود داشت (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).

1. Regulatory particle triple-A

2. ATP sulfurylase
3. Cobalamin-independent synthase 1



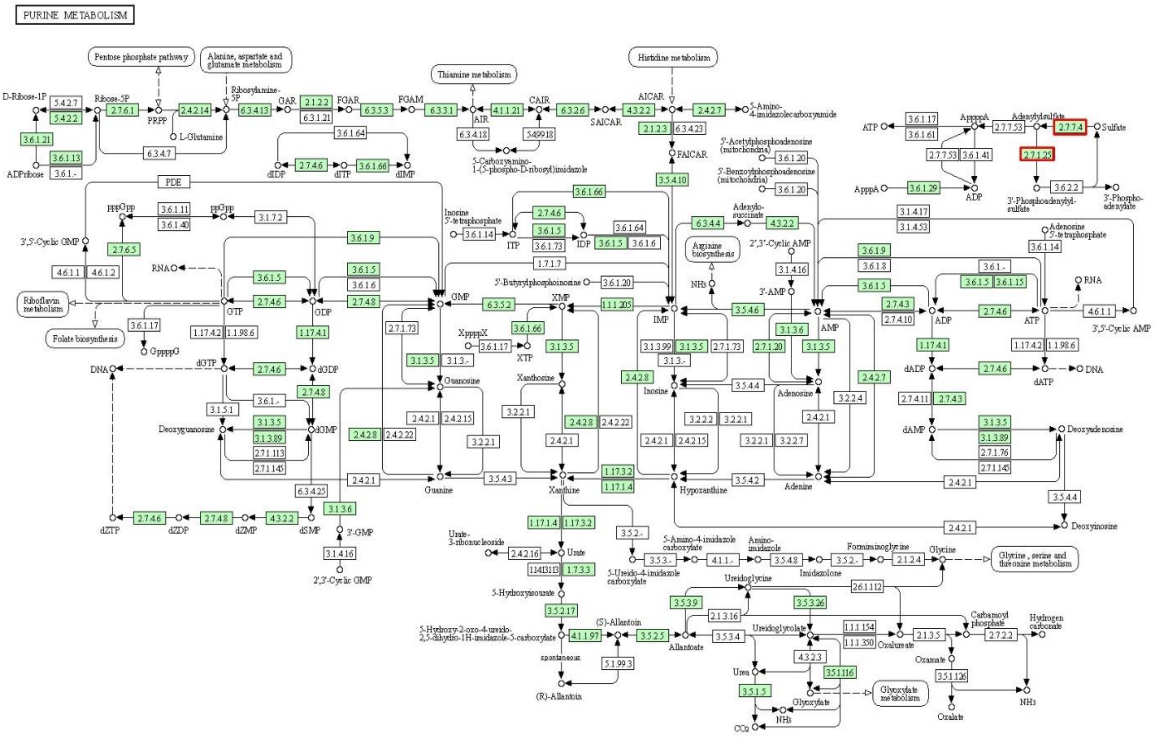
شکل ۳. مسیر KEGG مرتبط با پروتئازوم، این مسیر با استفاده از جستجوی فهرست ژن‌های هدف miRNAها در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی DAVID و KEGG شناسایی شده است. آن دسته از ژن‌های مرتبط با پروتئازوم هدف miRNAها که در این مسیر تحت تأثیر قرار می‌گیرد با مستطیل قرمز نشان داده‌شده‌اند.

Rpn11, Rpt1, Rpt2, Rpt4

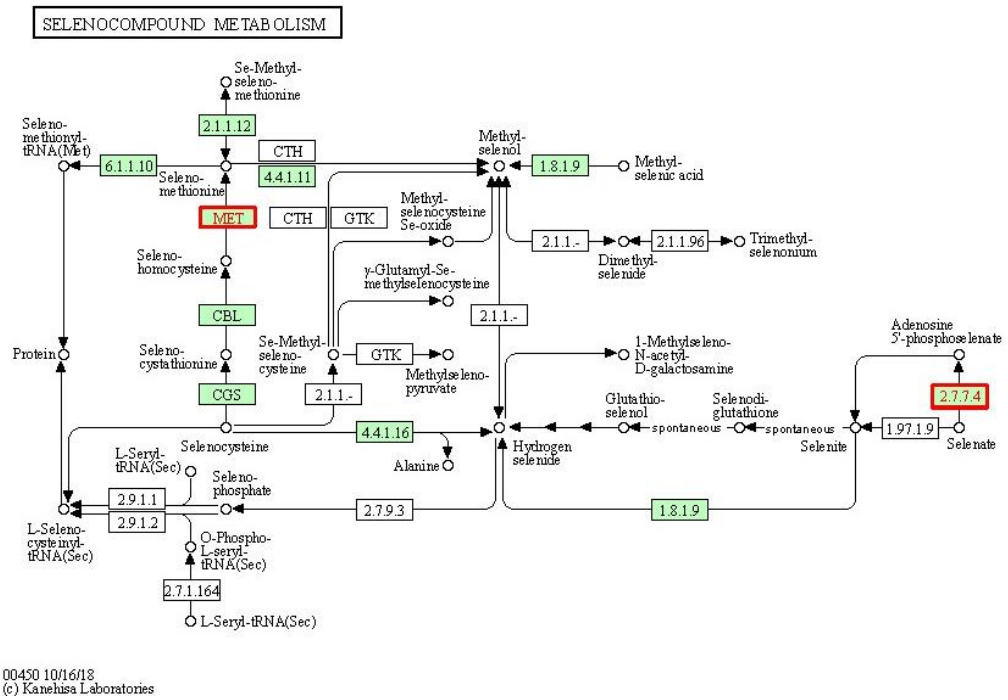
ترکیبات پورین نه‌تنها اجزای حیاتی اسیدهای نوکلئیک، نوکلئوتیدها و نوکلئوزیدها هستند، بلکه به‌عنوان انبارهای ذخیره انرژی درون‌سلولی، تنظیم‌کننده‌های متابولیک و واسطه‌های واکنش متابولیک نیز عمل می‌کنند. این نقش‌های حیاتی در مسیرهای بیوشیمیایی مختلف متابولیسم‌های اولیه و ثانویه برای تعدادی از فرآیندهای سلولی ضروری است. در موجودات زنده، پورین‌ها و مشتقات آن‌ها به‌طور متوالی تشکیل و جدا می‌شوند (Watanabe *et al.*, 2010). در مسیر تخریب اکسیداتیو، گزانتین به‌عنوان ترکیب اولیه رایج عمل می‌کند که در ابتدا به اسید اوریک و سپس به آلانتوئین، دو محصول نهایی

اصلی در حیوانات، اکسید می‌شود. برعکس، گیاهان دارای مجموعه‌ای از آنزیم‌ها هستند که ترکیبات پورینی را بیشتر تجزیه می‌کنند و درنهایت CO_2 و NH_3 را به‌عنوان کاتابولیت‌های معدنی آزاد می‌کنند (Zrenner *et al.*, 2006). برای انجام فرآیندهای ضروری سلولی، هم به پورین‌ها و هم پیریمیدین‌ها و در سلول به مقادیر مشابه موردنیاز است. هنگامی‌که پورین‌ها تشکیل می‌شوند، آنزیم‌های موردنیاز تشکیل بیشتر پورین را مهار می‌کنند. این خود بازداری زمانی رخ می‌دهد که آنزیم‌های مورد نیاز برای تشکیل پیریمیدین را نیز فعال می‌کنند. پیریمیدین به‌طور هم‌زمان پورین را به روشی مشابه مهار و فعال می‌کند. به همین دلیل، تقریباً مقدار مساوی از هر دو ماده در سلول همیشه وجود دارد (Watanabe *et al.*, 2010). بنابراین تنظیم هومئوستازی این فرآیند اهمیت بالایی دارد. تجزیه و تحلیل شبکه‌ای از ژن‌های افتراقی و متابولیت‌ها نشان داد که مسیرهای متابولیسم پورین و بیوسنتز فنیل پروپانوئید ممکن است نقش مهمی در پاسخ به خشکی در *Dendrobium sinense* ایفا کند (Zhang *et al.*, 2021). همچنین نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد که متابولیسم پورین به‌صورت کاملاً کاربردی در سازگاری به خشکی در آرابیدوپسیس نقش داشت (Watanabe *et al.*, 2010).

عنصر سلنیوم (Se) یک عامل اساسی در ساختار حیات آلی است. بسیاری از اشکال حیات، ازجمله انسان، به مقدار کمی Se نیاز دارند زیرا جزء ضروری اسیدآمینه سلنوسیستئین (SeCys) است. در غلظت‌های پایین Se اثرات مفیدی بر گیاهان ازجمله افزایش رشد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مقاومت در برابر تنش‌ها دارد (Anjum *et al.*, 2015).

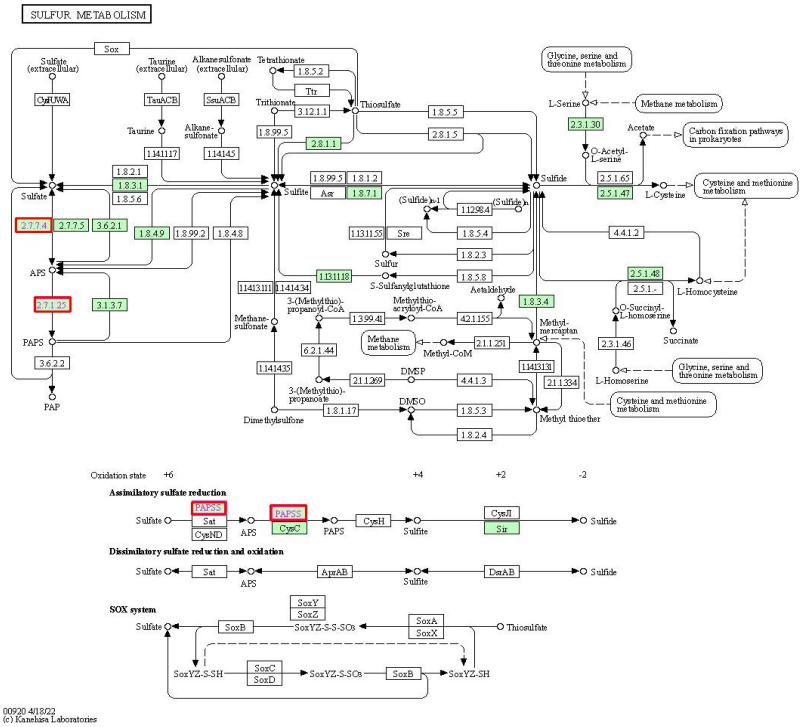


شکل ۴. مسیر KEGG مرتبط با متابولیسم پورین، این مسیر با استفاده از جستجوی فهرست ژن‌های هدف miRNAها در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی DAVID و KEGG شناسایی شده است. آن دسته از ژن‌های مرتبط با پورین هدف miRNAها که در این مسیر تحت تأثیر قرار می‌گیرد با مستطیل قرمز نشان داده‌شده‌اند.
2.7.7.4/ 2.7.1.25: APS1, 3, 4



شکل ۵. مسیر KEGG مرتبط با متابولیسم سلنوکامپاند، این مسیر با استفاده از جستجوی فهرست ژن‌های هدف miRNAها در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی DAVID و KEGG شناسایی شده است. آن دسته از ژن‌های مرتبط با سلنوکامپاند هدف miRNAها که در این مسیر تحت تأثیر قرار می‌گیرد با مستطیل قرمز نشان داده‌شده‌اند.

MET: ATMS1, 2.7.7.4: APS1,3,4



شکل ۶. مسیر KEGG مرتبط با متابولیسم سولفور، این مسیر با استفاده از جستجوی فهرست ژن‌های هدف miRNAها در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی DAVID و KEGG شناسایی شده است. آن دسته از ژن‌های مرتبط با متابولیسم سولفور هدف miRNAها که در این مسیر تحت تأثیر قرار می‌گیرد با مستطیل قرمز نشان داده‌شده‌اند.

PAPSS/ 2.7.7.4/ 2.7.1.25: APS1,3,4

سلنات (SeO_4^{2-}) و سلنیت (SeO_3^{2-}) دو شکل اصلی سلنیوم زیستی موجود در خاک هستند که سلنات در خاک‌های حاوی اکسیژن و سلنیت غالباً در خاک‌های بدون اکسیژن هستند. ترکیبات سلنو آلی مانند سلنوآمینو اسیدها نیز در غلظت‌های قابل‌توجهی در برخی خاک‌ها وجود دارند و می‌توانند توسط ریشه گیاه وارد شوند. گیاهان قادر به جذب یون سلنات و سلنیت در ریشه هستند. سلنات از طریق انتقال‌دهنده‌های سولفات[1] (SULTRs) و سلنیت توسط ناقل‌های فسفات و آکواپورین‌ها جذب می‌شود. سلنیت پس از جذب به‌سرعت متابولیزه می‌شود. با این‌حال، سلنات را می‌توان در سراسر گیاه یافت. فرض مرسوم این است که SULTRهای مختلف مسئول این توزیع سلنات هستند (Trippe & Pilon-Smits, 2021).

اگرچه جذب Se و گوگرد (S) ممکن است در ریشه یا اندام هوایی رخ دهد، بیشتر سلنات جذب‌شده توسط گیاه به اندام هوایی منتقل می‌شود. مسیرهای جذب S و Se سپس به شاخه‌های سیتوزولی و پلاستید تقسیم می‌شوند. در سیتوزولی، سولفات توسط ایزوفرم سیتوزولی آنزیم آدنوزین تری فسفات سولفوریلاز[2] (ATPS2) به آدنوزین ۵'–فسفوسولفات[3] (APS) فعال می‌شود (Bohrer *et al*., 2014). مطالعات بروی آنزیم ATPS مخمر نشان داده است که بروی سولفات عمل می‌کند و همچنین سلنات را به آدنوزین ۵'–فسفوسلنات[4] (APSe) تبدیل می‌کند (Trippe & Pilon-Smits, 2021). علاوه بر این، بیان بیش‌ازحد ATPS1 در گونه‌های گیاهی *Brassica juncea* و *A. thaliana* واکنش سلنات به APSe را افزایش داد (Raspor *et al*., 2003). در مرحله بعد، APS توسط APS کیناز[5] (APK) به فسفوآدنوزین– فسفوسولفات (PAPS)[6] فسفریله می‌شود. PAPS به‌عنوان اهداکننده S برای متابولیت‌های سولفاته عمل می‌کند (Bohrer *et al*., 2014). سلنات، احتمالاً می‌تواند از طریق SULTRهای گروه سه وارد کلروپلاست سلول‌های برگ شود. در کلروپلاست، سولفات و سلنات به ترتیب به سیستئین (Cys) و سلنوسیستئین (SeCys) احیا می‌شوند (Chen *et al*., 2019). مشاهده‌شده که محتوای گلوتاتیون (GSH) و Cys نقش محافظتی در برابر تحمل به شوری در گیاهان دارند. همچنین نقش عمده‌ای در حذف ROS از طریق چرخه AsA-GSH (آسکوربات–گلوتاتیون) دارد (Khan *et al*., 2014). رومرو و همکاران گزارش کردند که تنش شوری باعث افزایش تنظیم سنتز Cys در آرابیدوپسیس می‌شود و به‌نوبه خود باعث افزایش محتوای GSH می‌شود (Romero *et al*., 2001). در یک مطالعه مشخص شد، افزایش سطح بیان بالاتر ژن‌های *ATPS* در گیاه سورگوم ممکن است با پاسخ به تنش شوری مرتبط باشد (Akbudak and Filiz, 2019). در *A. thaliana*، چهار ایزو فرم *ATPS1-4* در مکان‌های مختلف کروموزوم شناسایی شد (Leustek *et al*., 1994). در دانه‌های سویا، دمای پایین باعث افزایش تنظیم بیان ژن *ATPS* شد (Phartiyal *et al*., 2006).

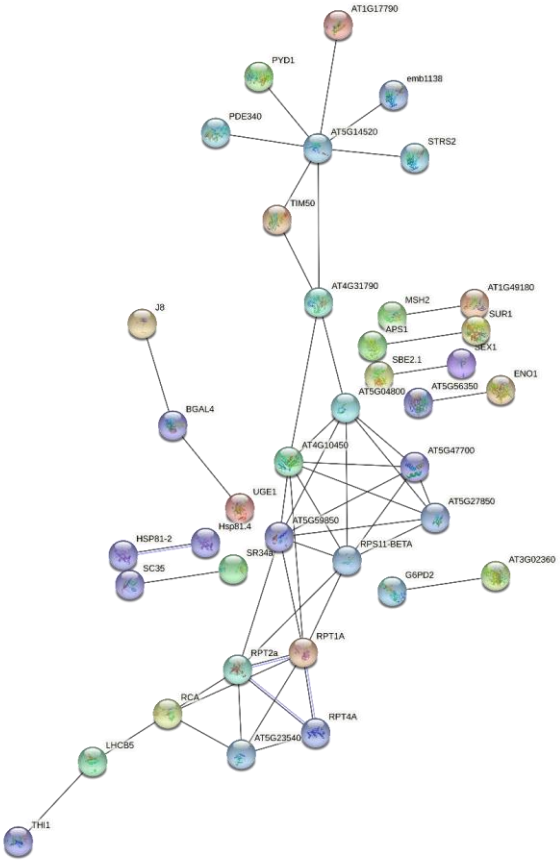
تنظیم ژن *ATPS* در گیاهان مختلف موردتوجه قرارگرفته است. مطالعات قبلی تأیید می‌کند که ژن‌های *APS1*، *APS3* و *APS4* توسط miR395 مورد هدف قرار می‌گیرند (Liang *et al*., 2010; Liang & Yu, 2010). در گیاه تراریخته *APS4-RNAi* *A thaliana*، از دست دادن عملکرد ژن‌های *APS1* و *APS4* منجر به تجمع پنج برابری سولفات (SO_4^{2-}) در اندام هوایی در مقایسه با گیاهان وحشی شد

1. Sulfate transporters
2. Adenosine triphosphate sulfurylase
3. Adenosine 5′-phosphosulfate
4. Adenosine 5′-phosphoselenate
5. APS kinase
6. 3′-phosphoadenosine 5′-phosphosulfate

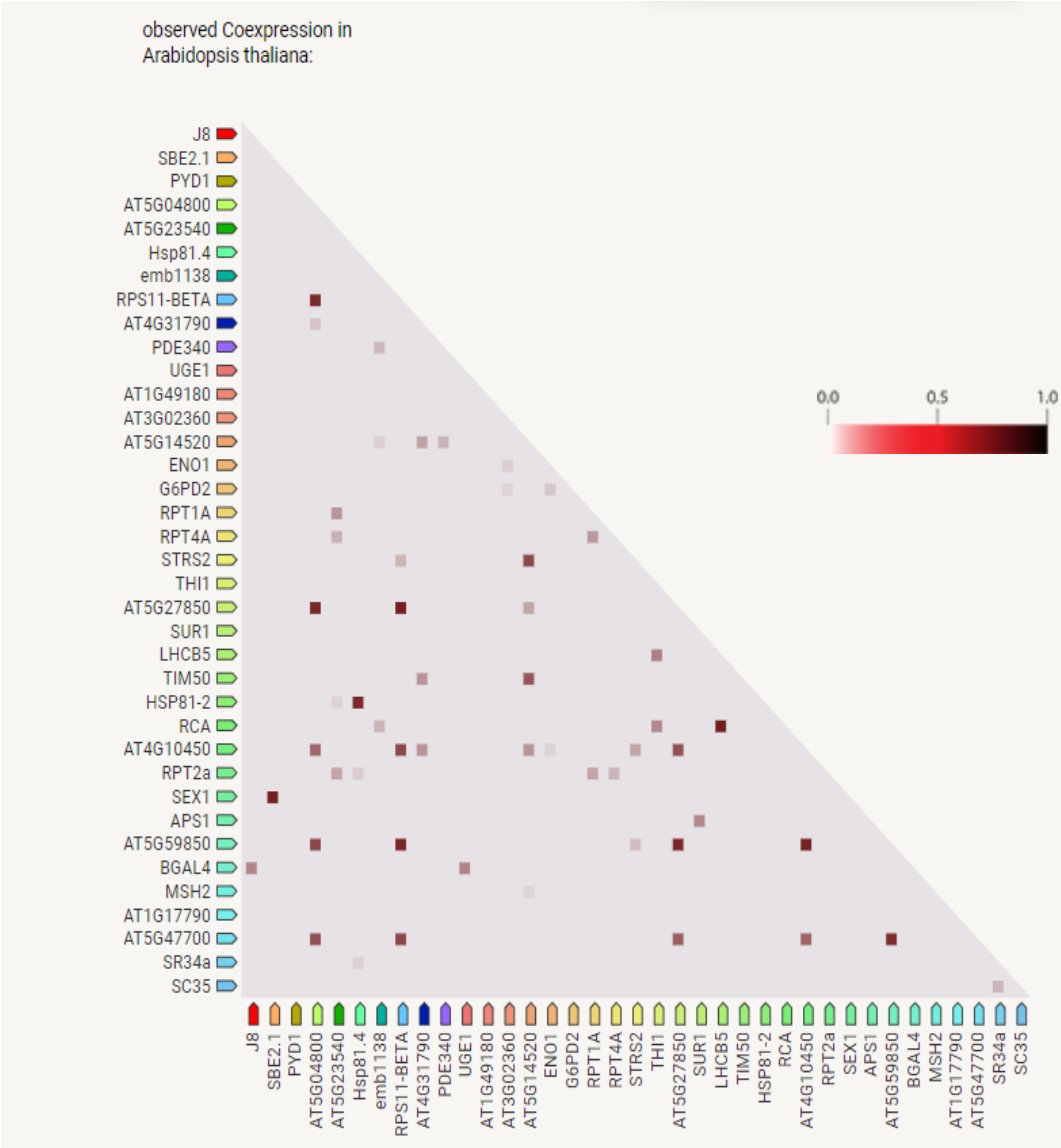
(Liang *et al.*, 2010). مشاهده شد که بیان *APS1* و *APS3* را می‌توان از طریق miR395 تنظیم کرد (Liang & Yu, 2010). همچنین miR395 می‌تواند mRNAهایی را که ایزوفرم‌های *ATPS1* و *ATPS4* را کد می‌کنند، مورد هدف قرار دهد. با این وجود، *ATPS1* و *ATPS4* به‌عنوان اهداف اصلی miR395، هم در برگ و هم در ریشه مشخص شدند (Kawashima *et al.*, 2009). ارتباط بین فعالیت ATP-S، محتوای GSH، سطح اتیلن، و کاهش اثرات تنش کادمیوم در *Triticum aestivum*گزارش شد (Khan *et al.*, 2014). با این وجود، miR395 می‌تواند در تنظیم بهینه سطوح رونوشت‌های *ATPS* در گیاهانی که تحت تنش قرار می‌گیرند مؤثر باشد (Kawashima *et al.*, 2011).

شبکه پروتئینی

بررسی شبکه پروتئینی به منظور شناسایی ژن‌های هم بیان انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که در بین ۲۲۵ ژن هدف شناسایی شده ۳۷ ژن به صورت هم بیان وجود داشتند (شکل ۷). وجود این ژن‌های هم بیان مشاهده شده می‌تواند زمینه‌ای برای مطالعات تجربی و بررسی همزمان بیان آنها در گیاهان براسیکا در طی تنش‌های غیر زیستی باشد. همچنین در شکل ۸ ماتریس ژن‌های هم بیان شناسایی شده توسط پایگاه داده STRING دیده می‌شود. در این ماتریس مثلث، شدت رنگ، سطح اطمینانی که دو پروتئین از نظر عملکردی مرتبط هستند را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل دیده می‌شود ۱۷ ژن دارای سطح اطمینان نزدیک به یک می‌باشند.



شکل ۷. شبکه تعامل پروتئین- پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING که نشان‌دهنده پروتئین هایی است که ژن‌های آن‌ها به صورت هم بیان دیده شده است. گره‌های رنگی نشان‌دهنده پروتئین‌ها هستند و خطوط رنگی سیاه متصل کننده ژن‌های هم بیان با یکدیگر است.



شکل ۸. ماتریس ژن‌های هم بیان شناسایی شده توسط پایگاه داده STRING. در ماتریس مثلث بالا، شدت رنگ، سطح اطمینانی که دو پروتئین از نظر عملکردی مرتبط هستند را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر سعی شد تا ارتباط مولکول‌های miRNA دخیل در تنش شوری و خشکی با تغییراتی که در فرآیندهای زیستی در طی این تنش رخ می‌دهد، بررسی شود. با توجه به نتایج یافته‌های این مطالعه به نظر می‌رسد تنش منجر به فعال‌شدن سیستم‌ها و مسیرهای مختلف زیستی و تغییر در بیان ژن‌ها همراه با فعال شدن ماشین پروتئین‌سازی و تغییر در محتوای پروتئینی می‌شود و در نتیجه گیاه کلزا برای محافظت از خود و تحمل و یا ایجاد سازگاری به شرایط موجود و حفظ هموئستاز پروتئینی از طریق فعال‌کردن تنظیم ژن پس از رونویسی[1] (PTGR) مانند فرآیند پیرایش و استفاده از miRNAها مکانیزم‌ها و تغییرات پس از ترجمه[2] (PTMs) مانند یوبی کوئیتیناسیون، فسفوریلاسیون، متیلاسیون و استیلاسیون، فراوانی، فعالیت‌ها، تقسیم‌بندی درون‌سلولی و انتقال

1. Post-transcriptional gene regulation
2. Post-translational modifications

پروتئین‌های تنظیم‌کننده درگیر در فرآیندهای مختلف رشد و همچنین پاسخ‌دهی به تنش را تنظیم می‌کند. به همین دلیل تعاملات گسترده و درهم‌تنیده بین این سیستم‌ها مورد انتظار است. بنابراین بررسی نقش miRNAها و ژن‌های هدف مربوط به آن‌ها و همچنین سیستم‌هایی که باعث تغییرات پس از ترجمه می‌شوند منجر به ایجاد به افق دید وسیع‌تری در ارتباط با تنش‌های شوری و خشکی و اثر آن بر مسیرهای درگیر در فرآیندهای سلولی خواهد شد و ابعاد گسترده پاسخ به تنش‌ها را آشکار خواهد کرد.

REFERENCES

Akbudak, M. A., & Filiz, E. (2019). Genome-wide analyses of ATP sulfurylase (ATPS) genes in higher plants and expression profiles in sorghum (*Sorghum bicolor*) under cadmium and salinity stresses. *Genomics, 111*(4), 579-589.

Ali, M.S., & Baek, K.-H. (2020). Protective Roles of Cytosolic and Plastidal Proteasomes on Abiotic Stress and Pathogen Invasion. *Plants, 9*(7), 1-17.

Alqurashi, M., Chiapello, M., Bianchet, C., Paolocci, F., Lilley, K. S., & Gehring, C. (2018). Early Responses to Severe Drought Stress in the *Arabidopsis thaliana* Cell Suspension Culture Proteome. *Proteomes, 6*(4). 38.

Amm, I., Sommer, T., & Wolf, D. H. (2014). Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1843*(1), 182-196.

Anjum, N. A., Gill, R., Kaushik, M., Hasanuzzaman, M., Pereira, E., Ahmad, I., ... Gill, S. S. (2015). ATP-sulfurylase, sulfur-compounds, and plant stress tolerance. *Frontiers in Plant Science, 6*. 210.

Aukerman, M. J., & Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The plant cell, 15*(11), 2730-2741.

Baek, K. H., & Choi, D. I. (2008). Roles of Plant Proteases in Pathogen Defense. *Plant Pathol J, 24*(4), 367-374.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell, 116*(2), 281-297.

Bohrer, A. S., Yoshimoto, N., Sekiguchi, A., Rykulski, N., Saito, K., & Takahashi, H. (2014). Alternative translational initiation of ATP sulfurylase underlying dual localization of sulfate assimilation pathways in plastids and cytosol in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci, 5*, 750.

Chen, Z., Zhao, P. X., Miao, Z. Q., Qi, G. F., Wang, Z., Yuan, Y., ... Xiang, C. B. (2019). SULTR3s Function in Chloroplast Sulfate Uptake and Affect ABA Biosynthesis and the Stress Response. *Plant physiology, 180*(1), 593-604.

Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic acids research, 46*(1), 49-54.

Delauré, S. L., Van Hemelrijck, W., De Bolle, M. F. C., Cammue, B. P. A., & De Coninck, B. M. A. (2008). Building up plant defenses by breaking down proteins. *Plant Science,174*(4), 375-385.

Díaz-Villanueva, J. F., Díaz-Molina, R., & García-González, V. (2015). Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences, 16*(8). 17193-17230.

Gu, J., Xia, Z., Luo, Y., Jiang, X., Qian, B., Xie, H., ... Wang, Z.-Y. (2018). Spliceosomal protein U1A is involved in alternative splicing and salt stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nucleic acids research, 46*(4), 1777-1792.

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols, 4*(1), 44.

Hulm, J. L., McIntosh, K. B., & Bonham-Smith, P. C. (2005). Variation in transcript abundance among the four members of the *Arabidopsis thaliana* RIBOSOMAL PROTEIN S15a gene family. *Plant Science, 169*(1), 267-278.

Jian, H., Wang, J., Wang, T., Wei, L., Li, J., & Liu, L. (2016). Identification of Rapeseed MicroRNAs Involved in Early Stage Seed Germination under Salt and Drought Stresses. *Frontiers in Plant Science, 7*, 658.

Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., ... Bohnert, H. J. (2001). Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant cell, 13*(4), 889-905.

Kawashima, C. G., Matthewman, C. A., Huang, S., Lee, B.-R., Yoshimoto, N., Koprivova, A., ... Kopriva, S. (2011). Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis. *The Plant Journal, 66*(5), 863-876.

Kawashima, C. G., Yoshimoto, N., Maruyama-Nakashita, A., Tsuchiya, Y. N., Saito, K., Takahashi, H., & Dalmay, T. (2009). Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *The Plant Journal, 57*(2), 313-321.

Khan, N. A., Khan, M. I. R., Asgher, M., Fatma, M., & Masood, A. J. J. P. B. P. (2014). Salinity tolerance in plants: revisiting the role of sulfur metabolites. *2*(120), 1-18.

Kim, K. Y., Park, S. W., Chung, Y. S., Chung, C. H., Kim, J. I., & Lee, J. H. (2004). Molecular cloning of low-temperature-inducible ribosomal proteins from soybean. *Journal of Experimental Botany, 55*(399), 1153-1155.

Köster, T., Marondedze, C., Meyer, K., & Staiger, D. (2017). RNA-Binding Proteins Revisited – The Emerging Arabidopsis mRNA Interactome. *Trends in Plant Science, 22*(6), 512-526.

Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., & Smalle, J. (2009). Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior, 4*(10), 924-927.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *science, 294*(5543), 853-858.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell, 75*(5), 843-854.

Leustek, T., Murillo, M., & Cervantes, M. (1994). Cloning of a cDNA Encoding ATP Sulfurylase from Arabidopsis thaliana by Functional Expression in Saccharomyces cerevisiae. *Plant physiology, 105*(3), 897-902.

Li, Y., Guo, Q., Liu, P., Huang, J., Zhang, S., Yang, G., ... Yan, K. (2021). Dual roles of the serine/arginine-rich splicing factor SR45a in promoting and interacting with nuclear cap-binding complex to modulate the salt-stress response in Arabidopsis. *New Phytologist, 230*(2), 641-655.

Liang, G., Yang, F., & Yu, D. (2010). MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal, 62*(6), 1046-1057.

Liang, G., & Yu, D. (2010). Reciprocal regulation among miR395, APS and SULTR2;1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior, 5*(10), 1257-1259.

Liu, X.-D., Xie, L., Wei, Y., Zhou, X., Jia, B., Liu, J., ... Brakhage, A. A. (2014). Abiotic Stress Resistance, a Novel Moonlighting Function of Ribosomal Protein RPL44 in the Halophilic Fungus Aspergillus glaucus. *Applied and Environmental Microbiology, 80*(14), 4294-4300.

Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., & Carrington, J. C. (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The plant cell*, *14*(7), 1605-1619.

Marondedze, C., Thomas, L., Lilley, K. S., & Gehring, C. (2020). Drought Stress Causes Specific Changes to the Spliceosome and Stress Granule Components, *6*, 163.

Mazahar, M., Achala, B., Anusree, S., & Kirti, P.J.P. (2019). Ribosomal proteins and their extra ribosomal functions in abiotic stress tolerance of plants, *12*(7), 1024-1038.

Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M., & Samizadeh Lahiji, H. (2022). Bioinformatics identification of hub genes involved in osmotic stress of Arabidopsis. *Agricultural Biotechnology Journal*, *14*(1), 155-174.

Mohsenzadeh Golfazani, M., Taghvaei, M. M., Samizadeh Lahiji, H., Ashery, S., & Raza, A. (2022). Investigation of proteins' interaction network and the expression pattern of genes involved in the ABA biogenesis and antioxidant system under methanol spray in drought-stressed rapeseed. *3 Biotech. 12*, 217.

Moin, M., Bakshi, A., Madhav, M. S., & Kirti, P. B. (2017). Expression Profiling of Ribosomal Protein Gene Family in Dehydration Stress Responses and Characterization of Transgenic Rice Plants Overexpressing RPL23A for Water-Use Efficiency and Tolerance to Drought and Salt Stresses. *Front Chem, 5*, 97.

Moin, M., Bakshi, A., Saha, A., Dutta, M., Madhav, S. M., & Kirti, P. B. (2016). Rice Ribosomal Protein Large Subunit Genes and Their Spatio-temporal and Stress Regulation. *7*, 1284.

Moin, M., Bakshi, A., Saha, A., Udaya Kumar, M., Reddy, A. R., Rao, K. V., ... Kirti, P. B. (2016). Activation tagging in indica rice identifies ribosomal proteins as potential targets for manipulation of water-use efficiency and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Environ*, *39*(11), 2440-2459.

Moin, M., Saha, A., Bakshi, A., Madhav, M.S., & Kirti, P. B. (2021). Constitutive expression of Ribosomal Protein L6 modulates salt tolerance in rice transgenic plants. *Gene, 789*, 145670.

Nishimura, T., Wada, T., & Okada, K. (2004). A key factor of translation reinitiation, ribosomal protein L24, is involved in gynoecium development in Arabidopsis. *Biochem Soc Trans*, *32*(4), 611-613.

Pasandideh, M., Samizadeh, H.-A., & Mohsenzadeh, M. (2018). The effect of drought stress on some morphological and physiological characters in canola seedling (*Brassica napus*). *Iranian Journal of Seed Sciences and Research, 5*(2), 95-108.

Phartiyal, P., Kim, W.-S., Cahoon, R. E., Jez, J. M., & Krishnan, H. B. (2006). Soybean ATP sulfurylase, a homodimeric enzyme involved in sulfur assimilation, is abundantly expressed in roots and induced by cold treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 450*(1), 20-29.

Ramezanzadeh Bishegahi, S., Mohsenzadeh, M., & Samizadeh, H. (2021). Effect of methanol foliar application on expression changes of some mitochondrial genes in canola under drought stress. *Iranian Journal of Field Crop Science, 52*(3), 113-128.

Raspor, P., Fujs, Š., Banszky, L., Maraz, A., & Batič, M. (2003). The involvement of ATP sulfurylase in Se(VI) and Cr(VI) reduction processes in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Applied Microbiology and Biotechnology, 63*(1), 89-95.

Rogalski, M., Schöttler, M. A., Thiele, W., Schulze, W. X., & Bock, R. (2008). Rpl33, a Nonessential Plastid-Encoded Ribosomal Protein in Tobacco, Is Required under Cold Stress Conditions *The Plant cell*, *20*(8), 2221-2237.

Romero, L. C., Domínguez-Solís, J. R., Gutiérrez-Alcalá, G., & Gotor, C. (2001). Salt regulation of O-acetylserine(thiol)lyase in *Arabidopsis thaliana* and increased tolerance in yeast. *Plant Physiology and Biochemistry, 39*(7), 643-647.

Rosa Téllez, S., Kanhonou, R., Castellote Bellés, C., Serrano, R., Alepuz, P., & Ros, R. (2020). RNA-Binding Proteins as Targets to Improve Salt Stress Tolerance in Crops. *Agronomy, 10*(2).

Sahi, C., Singh, A., Kumar, K., Blumwald, E., & Grover, A. (2006). Salt stress response in rice: genetics, molecular biology, and comparative genomics. *Functional & Integrative Genomics, 6*(4), 263-284.

Sahu, P. P., Sharma, N., Puranik, S., Chakraborty, S., & Prasad, M. (2016). Tomato 26S Proteasome subunit RPT4a regulates ToLCNDV transcription and activates hypersensitive response in tomato. *Scientific Reports, 6*(1), 27078.

Sakamoto, T., Kamiya, T., Sako, K., Yamaguchi, J., Yamagami, M., & Fujiwara, T. (2011). Arabidopsis thaliana 26S Proteasome Subunits RPT2a and RPT5a Are Crucial for Zinc Deficiency-Tolerance. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75*(3), 561-567.

Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology, 14*(2), 194-199.

Shiraku, M. L., Magwanga, R. O., Cai, X., Kirungu, J. N., Xu, Y., Mehari, T. G., ... Liu, F. (2021). Knockdown of 60S ribosomal protein L14-2 reveals their potential regulatory roles to enhance drought and salt tolerance in cotton. *Journal of Cotton Research, 4*(1), 27.

Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T. J., Babiychuk, E., Kushnir, S., & Vierstra, R. D. (2003). The Pleiotropic Role of the 26S Proteasome Subunit RPN10 in Arabidopsis Growth and Development Supports a Substrate-Specific Function in Abscisic Acid Signaling. *The Plant cell, 15*(4), 965-980.

Song, L., Pan, Z., Chen, L., Dai, Y., Wan, J., Ye, H., ... Chen, H. (2020). Analysis of Whole Transcriptome RNA-seq Data Reveals Many Alternative Splicing Events in Soybean Roots under Drought Stress Conditions. *Genes, 11*(12). 1520.

Stone, S. L. (2019). Chapter Three - Role of the Ubiquitin Proteasome System in Plant Response to Abiotic Stress. In L. Galluzzi (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology,343,* 65-110.

Szklarczyk, D., Gable, A. L., 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 research, 47*(1), 607-613.

Taghvaei, M. M., Lahiji, H. S., & Golfazani, M. M. (2022). Evaluation of expression changes, proteins interaction network, and microRNAs targeting catalase and superoxide dismutase genes under cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.). *OCL, 29*.

Trippe, R. C., 3rd, & Pilon-Smits, E. A. H. (2021). Selenium transport and metabolism in plants: Phytoremediation and biofortification implications. *J Hazard Mater, 404*(Pt B), 124178.

Verma, S., Nizam, S., & Verma, P. K. (2013). Biotic and Abiotic Stress Signaling in Plants. In M. Sarwat, A. Ahmad, & M. Z. Abdin (Eds.), *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, 1,* 25-49.

Wang, R., Zou, J., Meng, J., & Wang, J. (2018). Integrative analysis of genome-wide lncRNA and mRNA expression in newly synthesized Brassica hexaploids. *Ecol Evol*, *8*(12), 6034-6052.

Wang, S., Kurepa, J., & Smalle, J. A. (2009). The Arabidopsis 26S proteasome subunit RPN1a is required for optimal plant growth and stress responses. *Plant & cell physiology*, *50*(9), 1721-1725.

Wang, S., Kurepa, J., & Smalle, J. A. (2009). The Arabidopsis 26S Proteasome Subunit RPN1a is Required for Optimal Plant Growth and Stress Responses. *Plant and Cell Physiology*, *50*(9), 1721-1725.

Warner, J. R., & McIntosh, K. B. (2009). How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell*, *34*(1), 3-11.

Watanabe, S., Nakagawa, A., Izumi, S., Shimada, H., & Sakamoto, A. (2010). RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in Arabidopsis. *FEBS Letters*, *584*(6), 1181-1186.

Yu, X., Wang, H., Lu, Y., de Ruiter, M., Cariaso, M., Prins, M., ... He, Y. (2012). Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in Brassica rapa. *Journal of Experimental Botany*, *63*(2), 1025-1038.

Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*, *46*(2), 243-259.

Zhang, C., Chen, J., Huang, W., Song, X., & Niu, J. (2021). Transcriptomics and Metabolomics Reveal Purine and Phenylpropanoid Metabolism Response to Drought Stress in Dendrobium sinense, an Endemic Orchid Species in Hainan Island. *Frontiers in Genetics*, *12*. 692702.

Zhang, Y., Zhang, A., Li, X., & Lu, C. (2020). The Role of Chloroplast Gene Expression in Plant Responses to Environmental Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6082.

Zolfaghari Khutbehsera, N., Mohsenzadeh Golfazani, M., Taghvaei Mohammad, M., & Samizadeh Lahiji, H. (2022). Study of miRNAs involved in drought and salt stress stresses and ontology of target genes in *Brassica species*. *Agricultural Biotechnology Journal*, Accept.

Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., & Boldt, R. J. A. R. P. B. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *57*, 805-836.