doi: 10.22124/cr.2020.16123.1585

(مقاله پژوهشی)

تحقیقات غلات

دوره دهم/ شماره دوم/ تابستان ۱۳۹۹ (۱۳۳-۱۲۱)

شناسایی بیوانفورماتیکی و بررسی بیان miRNA های دخیل در نمو دانه ارقام گندم ایرانی با کیفیت نانوایی متفاوت

رضا صمیمی‌فرد[1*]، بابک ربیعی[2]، بهرام ملکی زنجانی[3]، جلال صبا[4] و عباس بهاری[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۳۱

چکیده

کیفیت نانوایی گندم (*Triticum aestivum* L.) به‌شدت وابسته به حضور و ترکیب پروتئین‌های گلوتن در دانه است. در این مطالعه، کیفیت نانوایی چهار رقم گندم ایرانی (مروارید، سرداری، پارسی و سپاهان) بر اساس آنالیزهای فارینوگرافی و شیمیایی آرد و حجم ویژه نان به‌ترتیب از بیش‌ترین به کم‌ترین کیفیت رتبه‌بندی شد. به‌منظور شناسایی و مقایسه miRNA های دخیل در نمو دانه بین گندم‌های ایرانی با کیفیت نانوایی خوب و ضعیف، داده‌های RNA-seq هفت رقم گندم (چهار رقم با کیفیت خوب و سه رقم با کیفیت ضعیف) در دو مرحله نموی دانه از پایگاه اطلاعاتی NCBI پیاده‌سازی و آنالیز شدند. از miRNAهای شناسایی شده، پنج miRNA حفاظت‌شده انتخاب و الگوی بیان آن‌ها با استفاده از روش Real Time PCR در دو مرحله نموی دانه (۱۰ و ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی) در چهار رقم گندم ایرانی بررسی شد. نتایج نشان داد که الگوی بیان miR159a، miR164a، miR172a و miR827a طی نمو دانه در همه ارقام مورد بررسی روند افزایشی داشت، در حالی‌که الگوی بیان miR396c روندی کاهشی نشان داد. miR164a و miR396c بیش‌ترین و کم‌ترین بیان نسبی را به‌ترتیب در ارقام سپاهان و سرداری (به‌ترتیب با کم‌ترین و بیش‌ترین وزن هزار دانه) نشان دادند که می‌تواند در نتیجه نقش تنظیم‌کنندگی منفی آن‌ها بر اندازه دانه باشد. همچنین، با افزایش کیفیت نانوایی ارقام مورد بررسی، بیان نسبی miR172a و miR159a که به‌ترتیب در سنتز نشاسته و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه دخیل هستند، کاهش و بیان miR827a که در فرایند انتقال مجدد نیتروژن از برگ به دانه دخیل است، افزایش یافت که نشان‌دهنده آثار منفی miR172a و miR159a و مثبت miR827a بر کیفیت نانوایی ارقام گندم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: الگوی بیان miRNA، پروتئین‌های گلوتن، تجزیه‌های فارینوگرافی، qRT-PCR، RNA-seq

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۴- استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۵- استادیار، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

* نویسنده مسئول: samimifard@znu.ac.ir

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهم‌ترین غلات است که حدود ۱۷ درصد سطح زیر کشت سالانه محصولات زراعی دنیا را به‌خود اختصاص داده است. دانه گندم از دو ترکیب عمده شامل نشاسته و پروتئین گلوتن تشکیل شده است که به‌ترتیب در حدود ۸۰ و ۱۰ درصد وزن خشک دانه را تشکیل می‌دهند. تقریباً ۵۵ درصد کربوهیدرات مصرفی مردم دنیا از گندم تأمین می‌شود (Shewry *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2013). برخلاف سایر غلات، گندم دارای ویژگی‌های منحصر به‌فرد و پیچیده‌ای است که برای پخت نان مورد نیاز است. کیفیت خمیر گندم برای پخت نان به‌شدت وابسته به حضور و ترکیب پروتئین‌های گلوتن است، هر چند که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نشانسته نیز بر ویژگی‌های رئولوژیک خمیر و کیفیت پخت نان موثر است (Zi *et al.*, 2019). با وجود اهمیت اقتصادی گندم به‌عنوان سومین غله مهم بعد از برنج و ذرت در جهان سوم، اطلاعات در باره miRNA های گندم نسبت به برنج و ذرت، پیشرفت کم‌تری داشته است. محدودیت اصلی در شناسایی و بررسی فعالیت miRNAs در گندم می‌تواند اندازه (Gbp ۱۷)، پیچیدگی ژنوم هگزاپلوئید و عدم توالی‌یابی کامل ژنوم گندم باشد (Gasparis *et al.*, 2017). microRNAs (miRNAs)، RNA های کوچک تک‌رشته‌ای غیرکدکننده و تنظیمی با طولی بین ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که نقش مهمی را در تنظیم بیان ژن‌ها در گیاهان و حیوانات از طریق شکست یا ممانعت از ترجمه mRAN ایفا می‌کنند.

miRNAs از ژن‌های miRNAs (MIR) به‌وسیله RNA پلیمراز II نسخه‌برداری و در نتیجه رونوشت‌های اولیه miRNA (pre-miRNA) تشکیل می‌شوند. در گیاهان عالی، pre-miRNA طی دو مرحله به‌وسیله Dicer-Like1 (یک آنزیم RNaseIII) برش می‌خورد و در نهایت یک رشته miRNA سنس-آنتی‌سنس (miRNA/miRNA*) را تولید می‌کند. رشته miRNA بالغ به یک کمپلکس خاموشی القاشونده به‌وسیله RNA (RISC=RNA Induced Silence Complex) متصل می‌شود و سپس به mRNA هدف خود اتصال می‌یابد (Chu *et al.*, 2016). مطالعات در مورد miRNAs در گونه‌های مختلف گیاهی نشان داده است که آن‌ها نقش مهمی در نمو اندام، تمایز سلولی، پیام‌رسانی (سیگنالینگ) هورمون‌ها، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، یکپارچگی و حفاظت ژنوم و فرایندهای فیزیولوژیک مختلف دارند (Sun *et al.*, 2014). مطالعاتی به‌منظور شناسایی miRNA محافظت‌شده و جدید در تنظیم بیان ژن‌ها در نمو دانه برخی غلات مانند برنج، ذرت، جو و گندم با استفاده از روش توالی‌یابی با کارایی بالا (High-Throughput Sequencing) انجام شده است. نتایج این تحقیقات نشان داده است که نقش حیاتی miRNA در مرحله نمو دانه است. همچنین، از این روش برای شناسایی miRNA مخصوص دانه یا miRNAs با بیان متمایز در مراحل مختلف نمو دانه گندم استفاده شده است.

منگ و همکاران (Meng *et al.*, 2013)، ۱۰۴ miRNA مرتبط با پرشدن دانه را شناسایی و مشاهده کردند که فراوانی miRNAs در کل مرحله نموی دانه بعد از گرده‌افشانی متفاوت است. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که miRNAs در تنظیم فاز حیاتی تعیین عملکرد دانه دخالت دارند. مطالعه دیگری که به‌منظور شناسایی miRNAs در بافت‌های مختلف گندم از جمله دانه‌های در حال نمو انجام شد، نشان داد که ۵۱ miRNAs از ۳۶ خانواده به‌طور اختصاصی در مرحله نمو دانه بیان شدند و از این تعداد، ۲۸ miRNAs، به‌طور اختصاصی در گندم بیان شدند که نشان می‌دهد این miRNAs در مسیرهای خاص در مرحله نمو دانه گندم دخالت دارند (Sun *et al.*, 2014). همچنین، ژن‌های هدف miRNAs که دارای بیان متمایز در مدت نمو دانه گندم بودند، در فرایندهای پاسخ سلولی و متابولیک مختلف مانند تکثیر سلول، پیام‌رسانی اکسین، متابولیسم مواد غذایی و بیان ژن نقش داشتند (Li *et al.*, 2015). پیش‌بینی محاسباتی برای miRNAs جدید گندم بر اساس داده‌های EST (Expressed Sequence Tag) و سپس تعیین مقدار بیان این miRNAs در بافت‌های رویشی و زایشی نشان داد که سه miRNAs از ۱۹ مورد پیش‌بینی شده، بیش‌ترین بیان را در سنبله‌های جوان در مدت تولید میکروسپورها داشتند (Gasparis *et al.*, 2017). .هدف از این تحقیق، شناسایی و مقایسه miRNAs با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیک داده‌های RNA-Seq بین ارقام گندم با کیفیت نانوایی خوب و ضعیف در دو مرحله ۱۴ و ۳۰ روز بعد از گرده‌افشانی (DAA=Days After Anthesis) و سپس بررسی الگوی بیانی پنج miRNA انتخاب شده در ارقام گندم ایرانی با کیفیت نانوایی متفاوت در دو مرحله نموی دانه (۱۰ و ۲۰ روز بعد از گرده‌افشانی) با استفاده از qRT-PCR بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

چهار رقم گندم نان ایرانی (سپاهان، پارسی، سرداری و مروارید) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ایران تهیه شدند. تعداد ۱۲ عدد بذر از هر رقم در گلخانه تحقیقاتی کشت و سپس گیاهچه‌ها تحت شرایط نور طبیعی و دمای ۲۵/۲۰ سلسیوس شب/ روز نگه‌داری شدند. دانه‌ها در زمان ۱۰ و ۲۰ روز بعد از گرده‌افشانی از قسمت مرکزی سنبله‌ها جمع‌آوری و بلافاصله به نیتروژن مایع منتقل و سپس در دمای ۸۰- °C نگه‌داری شدند.

آنالیزهای شیمیایی و رئولوژیک

ویژگی‌های رئولوژیک خمیر با استفاده از دستگاه فارینوگراف (Brabender® GmbH & Co. KG, duisburg, Germany) اندازه‌گیری شدند (Song and Zheng, 2007). به‌منظور تهیه خمیر هر یک از ارقام مورد مطالعه، بر اساس روش توصیه شده انجمن شیمی غلات آمریکا (AACC) با شماره ۲۱-۵۴، ابتدا مقدار ۳۰۰ گرم آرد از هر رقم به‌وسیله آسیاب آزمایشگاهی (Perten Lab mill 3100, Sweden) تهیه و با درصد جذب آب مورد نیاز هر نمونه، سنجش‌شده به‌وسیله دستگاه فارینوگراف (جدول ۱)، مخلوط شد و سپس پارامترهای فارینوگراف و ویژگی‌های شیمیایی آرد (مقدار پروتئین، مقدار گلوتن مرطوب و ارزش رسوب زلنی) بر طبق روش‌های AACC (AACC, 2000) اندازه‌گیری شد.

پخت نان و ارزیابی حجم نان

نان حجیم بر اساس روش انجمن شیمی غلات آمریکا (گزارش شماره ۰۳-۱۰-۱۰) تهیه (AACC, 2000) و بعد از خنک شدن نان در دمای اتاق، حجم نان با روش Rapeseed Displacement اندازه‌گیری شد و سپس حجم ویژه نان از تقسیم حجم بر وزن نان به‌دست آمد (Barak *et al.*, 2013).

رتبه‌بندی ارقام از نظر کیفیت نانوایی

ارقام گندم مورد بررسی به‌صورت جداگانه برای هر یک از صفات بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار محافظت‌شده (PLSD = Protected Least Significant Difference) به‌روش آروناچالام و باندیوپادیا (Arunachalam and Bandyopadhyay, 1984) رتبه‌دهی و سپس مجموع رتبه‌های تمام صفات در هر رقم محاسبه و رتبه‌بندی نهایی ارقام از بالاترین به پایین‌ترین کیفیت نانوایی به‌ترتیب بر اساس بیش‌ترین به کم‌ترین مجموع رتبه‌های هر رقم تعیین شد.

آنالیز بیوانفورماتیک برای شناسایی miRNAs در ارقام گندم با کیفیت نانوایی خوب و ضعیف

در این تحقیق، خوانش‌های RNA-Seq (reads) از پلتفرم Illumina HiSeq™ 2000 چهار رقم گندم با کیفیت نانوایی خوب (Banks, Batavia, Gregory and Sunco) و سه رقم گندم با کیفیت نانوایی ضعیف (Gabo, Punjab7 and Qalbis) در زمان‌های ۱۴ و ۳۰ روز پس از گرده‌افشانی از پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره زیست‌پروژه PRJNA392390 تهیه و با استفاده از پکیج SRAtoolkit پیاده‌سازی شد. کیفیت نانوایی این ارقام بر اساس اطلاعات سالانه‌ای که طی آزمایش‌های ملی (National Variety Trials) توسط شرکت تحقیق و توسعه غلات (Grains Research and Development Corporation) کشور استرالیا منتشر می‌شود، طبقه‌بندی شد.

در مرحله اول تجزیه و تحلیل داده‌ها، داده‌های SRA با استفاده از SRA Toolkit به فرمت FastQ تبدیل شدند. سپس ارزیابی کیفیت خوانش‌ها به وسیله FastQC انجام و خوانش‌های با کیفیت پایین و نیز توالی آداپتوری آن‌ها حذف شد. آنالیز فراوانی خوانش‌های باقیمانده با نرم‌افزار CLC Genomics Workbench انجام شد و خوانش‌هایی که نمره کیفیت کم‌تر از پنج درصد داشتند، حذف شدند. سپس توالی‌های به‌دست آمده از مرحله قبل با داده‌های موجود در Rfam (http://rfam.sanger.ac.uk) و NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) از طریق BLASTN هم‌ردیف و توالی‌های منطبق با سایر RNA ها حذف شدند. آنگاه توالی‌های منحصر به فرد Small RNAs با توالی‌های miRNA شناخته شده در پایگاه اطلاعاتی miRBase (http://mirbase.org/) هم‌ردیف و miRNA ها در ارقام گندم با کیفیت نانوایی خوب و ضعیف با در نظر گرفتن معیارهایی مانند عدم تطابق (Mismatch) کم‌تر از سه (Wu *et al.*, 2016) انتخاب شدند. از miRNAs شناسایی شده، پنج miRNA حفاظت‌شده به‌منظور بررسی الگوی بیانی آن‌ها در دو مرحله نموی دانه (۱۰ و ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی) در ارقام گندم مورد مطالعه انتخاب شدند.

استخراج RNA و انجام Real Time PCR

RNA از دانه‌های ارقام گندم در دو مرحله شامل ۱۰ و ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی با کیت RiboExTM از شرکت GeneAll (کره‌جنوبی) استخراج شد. برای حذف آلودگی DNA ژنومی، نمونه‌های RNA استخراج‌شده با DNaseI (Thermo Fisher Scientific, USA) تیمار شدند. کیفیت و کمیت نمونه‌ها با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ اسپکتوفتومتر (Thermo Scientific, Germany) تعیین شد. سپس cDNA با استفاده از کیت HyperScriptTM RT master mix طبق دستورالعمل شرکت GeneAll با استفاده از آغازگرهای Stem-Loop ساخته شد. این آغازگرها و آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر در qRT-PCR برای هر miRNA طبق روش چن و همکاران (Chen *et al.,* 2005) طراحی شد (جدول ۳). واکنشqRT-PCR در سه تکرار زیستی برای هر نمونه و برای هر تکرار زیستی دو تکرار فنی با استفاده از 5x HOT FIREPol® Eva-Green® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Estonia) و با دستگاه Rotor- gene 3000 system (Corbett Research, Australia) انجام شد. برنامه دمایی-زمانی برای واکنش PCR شامل یک چرخه ۱۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ °C بود که با ۴۰ چرخه سه‌مرحله‌ای شامل ۹۵ °C به‌مدت ۲۰ ثانیه، ۵۵ °C به‌مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ °C به‌مدت ۱۵ ثانیه ادامه یافت. برای نرمال‌سازی نتایج qPCR از بیان ژن اکتین گندم به‌عنوان کنترل داخلی (Reference Gene) استفاده و میزان بیان نسبی miRNAs با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001).

آنالیز آماری داده‌ها

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس خطاهای آزمایشی با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ بررسی شد. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آنالیزهای رئولوژیک، فیزیکی و شیمیایی بر اساس طرح کاملاً تصادفی با چهار رقم و سه تکرار و آنالیزهای بیان miRNAs بر اساس آزمایش فاکتوریل با دو عامل رقم و زمان به‌ترتیب در چهار و دو سطح در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجامو سپس مقایسه میانگین تیمارها بر اساس روش LSD محافظت شده (PLSD) با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های آرد و نان

ویژگی‌های شیمیایی و رئولوژیک آرد چهار رقم گندم ایرانی در جدول ۱ ارایه شده است. رقم مروارید بیش‌ترین مقدار ظرفیت پروتئین، ارزش رسوب زلنی، زمان توسعه خمیر، عدد کیفی فارینوگراف و پایداری خمیر را داشت، در حالی‌که کم‌ترین مقدار این ویژگی‌ها به غیر از زمان توسعه در رقم سپاهان مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری بین زمان توسعه در سپاهان با پارسی وجود نداشت. ارتباط مثبت بین ویژگی‌های ظرفیت پروتئین، ارزش رسوب زلنی، زمان توسعه خمیر، عدد کیفی فارینوگراف و پایداری خمیر با کیفیت خوب نانوایی آرد گندم در چندین تحقیق گزارش شده است. همه این ویژگی‌ها تحت تأثیر مقدار پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه به‌ویژه مقدار گلوتنین و نسبت گلوتنین به گلیادین هستند (Khatkar *et al*., 1995; Dowell *et al.,* 2008; Denčić *et al.,* 2011; Barak *et al.,* 2014). حجم نان به‌عنوان یک شاخص مستقیم مهم در تعیین کیفیت نانوایی معرفی شده است (Weegels *et al.,* 1996; Ross and Bettge, 2009). اندازه‌گیری حجم ویژه نان در مطالعه حاضر نشان داد که رقم مروارید بیش‌ترین مقدار این ویژگی را داشت که اختلاف آن با رقم سرداری معنی‌دار نبود. کم‌ترین مقدار حجم ویژه نان نیز در رقم سپاهان مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با رقم پارسی نداشت (شکل ۱).

رتبه‌بندی کیفیت پخت نان در ارقام گندم

ماتریس رتبه‌بندی ارقام بر اساس ویژگی‌های شیمیایی، رئولوژیک و حجم ویژه نان در جدول ۲ ارایه شده است. در تحقیقات زیادی از ویژگی‌های رئولوژیک و حجم ویژه نان جهت تعیین کیفیت نانوایی آرد گندم استفاده شده است (Elangovan *et al.,* 2008; Dowell *et al.,* 2008; Gobaa *et al.,* 2008; Mutlu *et al.,* 2011; Barak *et al.,* 2013). نتایج رتبه‌بندی نهایی ارقام از نظر کیفیت نانوایی نشان داد که رقم مروارید، سرداری، پارسی و سپاهان به‌ترتیب رتبه‌های اول تا چهارم را به‌خود اختصاص دادند. آقاقلی‌زاده و همکاران (Aghagholizadeh *et al.,* 2017) نیز بر اساس ارزیابی‌های شیمیایی و رئولوژیک خمیر و ویژگی‌های حسی و بافتی نان در هشت رقم گندم ایرانی از جمله مروارید و سپاهان گزارش کردند که مروارید و سپاهان به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین کیفیت تکنولوژیک را داشتند.

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی، رئولوژیک و فیزیکی آرد گندم ارقام ایرانی مطالعه شده در این تحقیق

Table 1. Chemical, rheological and physical properties of wheat flour of the studied Iranian cultivars in this experiment. Each value is the mean (n= 3) ± SE. Values with different letters in each characteristic are significantly (P < 0.05) different according to PLSD test

Characteristic	Sepahan	Morvarid	Parsi	Sardari
Wet gluten (%)	31.77a ± 0.39	30.83b ± 0.20	28.13c ± 0.01	28.50c ± 0.20
Protein (%)	10.20d ± 0.17	12.20a ± 0.15	11.26c ± 0.12	11.77b ± 0.03
Zeleny sedimentation value (ml)	11.63c ± 0.31	20.06a ± 0.30	16.00b ± 0.57	16.80b ± 0.15
Water absorption (%)	78.90a ± 0.75	70.20c ± 1.20	75.05b ± 0.68	73.63b ± 0.37
Development time (min)	2.75c ± 0.03	3.32a ± 0.01	2.68c ± 0.92	3.05b ± 0.29
Stability (min)	1.22d ± 0.03	2.26a ± 0.04	1.37c ± 0.03	1.93b ± 0.04
Farinograph quality number	29.33d ± 0.88	46.83a ± 0.44	33.67c ± 0.33	42.73b ± 0.37
Loaf volume (ml)	580.67b ± 4.91	686.55a ± 2.58	567.7b ± 8.82	669.63a ± 2.02
Loaf weight	131a ± 0.55	125.45c ± 0.42	128.96b ± 0.2	126.9c ± 0.54
Specific loaf volume (ml g^{-1})	4.43b ± 0.12	5.47a ± 0.16	4.63b ± 0.15	5.27a ± 0.084

شکل ۱- نان تهیه شده از آرد ارقام گندم ایرانی

Figure 1. Bread derived from wheat flour of Iranian cultivars

جدول ۲- ماتریس رتبه‌بندی و رتبه‌های نهایی ارقام گندم ایرانی

Table 2. Ranking matrix and final ranks of the Iranian wheat cultivars

Characteristics	Sepahan	Morvarid	Parsi	Sardari
Wet gluten (%)	3	2	1	1
Protein (%)	1	4	2	3
Zeleny sedimentation value (ml)	1	3	2	2
Water absorption (%)	3	1	2	2
Development time (min)	1	3	1	2
Stability (min)	1	4	2	3
Farinograph quality number	1	4	2	3
Specific loaf volume (cm^3 g^{-1})	1	2	2	1
Sum of rank	12	23	14	17
Average rank	1.50	2.87	1.75	2.12
Final rank	4	1	3	2

انتخاب miRNAs از نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیک

نتایج آنالیز بیوانفورماتیک داده‌های RNA-Seq بین دو گروه ارقام گندم با کیفیت نانوایی خوب و ضعیف طی نمو دانه به‌منظور شناسایی miRNAs نشان داد که ۹۱ و ۵۵ miRNAs به‌ترتیب در ۱۴ و ۳۰ روز پس از گرده‌افشانی در هر دو گروه گندم وجود داشتند که نشان می‌دهد به‌طور کلی بیان miRNAs در مرحله آخر نمو دانه کاهش می‌یابد (Meng *et al.*, 2013). بیان متمایز و معنی‌دار (P- value ≤ 0.05, fold change ≥ 2.0) miRNA های شناسایی شده در این تحقیق بین دو گروه ارقام گندم به‌دلیل فراوانی

پایین خوانش‌ها میسر نبود. بنابراین از miRNA های شناسایی شده که در هر دو گروه ارقام گندم با کیفیت نانوایی خوب و ضعیف در دو مرحله نموی دانه وجود داشت، پنج miRNA حفاظت‌شده که نقش مهمی در نمو دانه دارند، انتخاب شد. miR159a و miR396c در اندازه دانه، miR172a و miR159a به‌ترتیب در سنتز نشاسته و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و miR827a در فرایند انتقال مجدد نیتروژن از برگ به دانه نقش دارند. از آنجایی‌که نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیک در این مطالعه و سایر تحقیقات (Meng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015) نشان دادند که بیان بسیاری از miRNAs در مرحله آخر نمو دانه کاهش می‌یابد، بنابراین دو مرحله اولیه و اواسط نمو دانه (به‌ترتیب ۱۰ و ۲۰ روز بعد از گرده‌افشانی) جهت بررسی الگوی بیانی miRNA های انتخابی در ارقام گندم ایرانی مورد مطالعه قرار گرفتند.

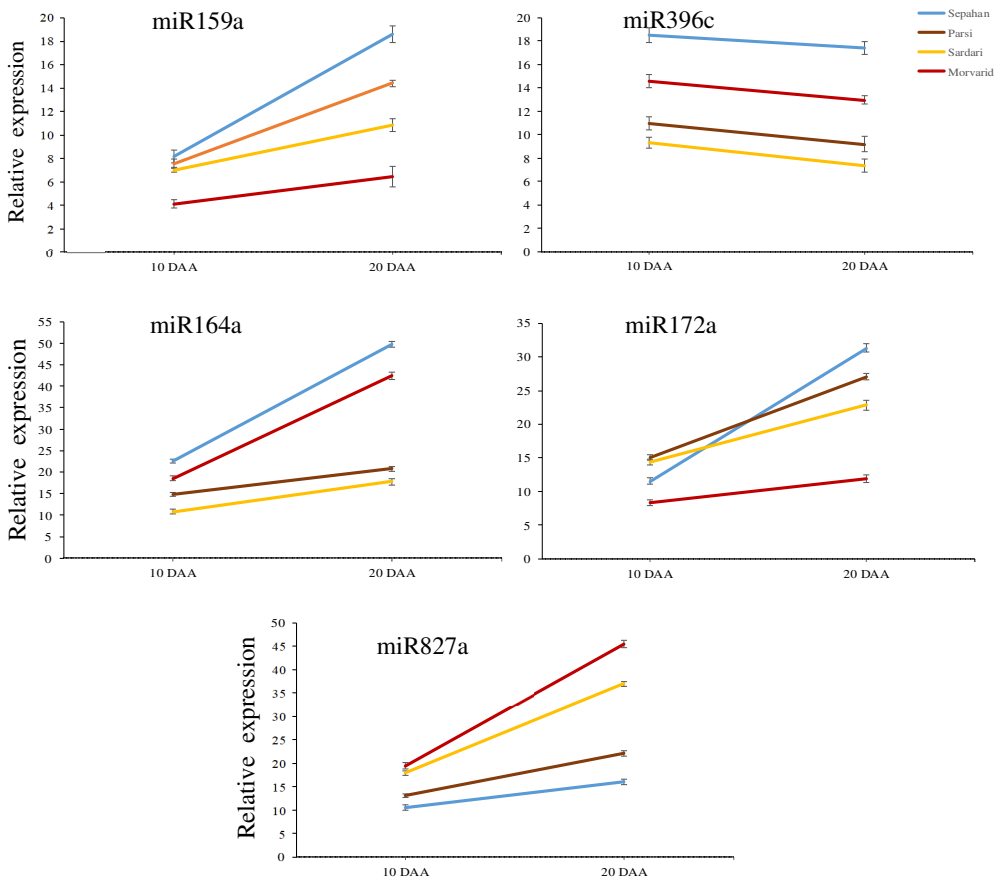
بررسی بیان miRNA های حفاظت شده در مدت نمو دانه گندم

در این مطالعه، بیان پنج miRNA حفاظت‌شده در گیاهان (Pandey *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014) در دو مرحله نمو دانه (۱۰ و ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی) در چهار رقم گندم ایرانی با کیفیت نانوایی متفاوت بررسی شدند. نتایج نشان داد که الگوی بیانی تمامی miRNA های مورد بررسی در مدت نمو دانه با یکدیگر متفاوت بود، به‌طوری که از مرحله ۱۰ تا ۲۰ روز، بیان miR396c در همه ارقام کاهش یافت، در حالی‌که بیان miR159a، miR164a، miR172a و miR827a افزایش یافت (شکل ۲). بررسی الگوی بیانی miRNAs از طریق توالی‌یابی با کارایی بالا و qRT-PCR در مراحل مختلف نمو دانه گندم در پژوهش‌های دیگر نیز مطالعه و چندین خوشه بیانی از miRNAs شناسایی شد که نشان می‌دهد miRNAs مراحل پرشدن دانهٔ گندم را در قالب رفتارهای زمانی موقت (Temporal Manner) کنترل می‌کنند (Meng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

نمو آندوسپرم دارای سه مرحله اصلی شامل نمو اولیه، تجمع مواد ذخیره‌ای و بلوغ یا خشک‌شدن دانه است (Nadaud *et al.*, 2010). بسیاری از فاکتورهای رونویسی در مراحل نمو آندوسپرم دانه درگیر هستند. miRNAs نقش مهمی در کنترل نمو دانه گیاه به‌وسیله تنظیم فاکتورهای رونویسی در سطح پس از رونویسی دارند (Jin *et al.*, 2015).

خانواده فاکتور رونویسی MYB ژن‌های هدف حفاظت شده برای miR159 است. miR159 تنظیم‌کننده منفی بیان ژن‌های *GAMYB* در سطح پس از رونویسی می‌باشد که این miRNA اولین بار به‌عنوان هدف سیگنالینگ پایین‌دست GA در سلول‌های آلورون جو و سپس در آندوسپرم نشاسته‌ای شناسایی شد (Diaz *et al.*, 2002). miR159 در فرایندهای مختلفی مانند زمان گلدهی، نمو بساک و پاسخ به تنش غیرزیستی نقش دارد. نتایج بررسی qRT-PCR در این مطالعه نشان داد که miR159a در ارقام مروارید (با بالاترین کیفیت نانوایی) و سپاهان (با کم‌ترین کیفیت نانوایی) به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین بیان را در دانه در زمان ۱۰ روز بعد از گرده‌افشانی داشت، در حالی‌که اختلاف معنی‌داری در بیان آن بین ارقام سپاهان، پارسی و سرداری مشاهده نشد (شکل ۲). بیان miR159a از ۱۰ تا ۲۰ روز بعد از گرده‌افشانی در ارقام مروارید (۱/۴۹ برابر)، سرداری (۱/۵۳ برابر)، پارسی (۱/۶۱ برابر) و سپاهان (۲/۲۷ برابر) افزایش یافت که با نتایج سایر مطالعات در ذرت و گندم که گزارش کردند الگوی بیان miR159a از ۵ تا ۱۰ روز بعد از گرده‌افشانی کاهش و از ۱۰ تا ۲۵ روز بعد از گرده‌افشانی افزایش می‌یابد (Meng *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016a) مطابقت داشت.

فاکتور رونویسی *GAMYB* عناصر تنظیمی حفاظت شده 5´-AACAA-3´ در پروموتر ژن‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه (مانند گلوتنین و گلیادین) را شناسایی می‌کند (Guo *et al.*, 2015). همچنین برهمکنش پروتئین GAMYB با یک فاکتور رونویسی متصل به عنصر تنظیمی Prolamine box موجب افزایش بیان ژن‌های اختصاصی آندوسپرم در مدت نمو دانه جو می‌شود (Diaz *et al.*, 2002). گوا و همکاران (Guo *et al.*, 2015) گزارش کردند که فاکتور رونویسی *TaGAMYB* می‌تواند باعث افزایش بیان ژن گلوتنین در مدت نمو دانه در گندم شود. کیفیت نانوایی گندم نان بیش‌تر تحت تأثیر مقدار پروتئین‌های گلوتن (گلوتنین و گلیادین) است. نتایج این تحقیق نشان داد که بیان miR159a رابطه منفی با کیفیت نانوایی ارقام گندم دارد، به‌طوری که افزایش بیان miR159a می‌تواند موجب کاهش بیان *TaGAMYB* و در نتیجه کاهش مقدار پروتئین گلوتن دانه گندم شود.



شکل ۲– میزان بیان نسبی پنج miRNA حفاظت‌شده در دو مرحله نمو دانه در چهار رقم گندم ایرانی. میزان رونویسی miRNAs از دانه در حال نمو در دو مرحله ۱۰ و ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی (DAA = Days After Anthesis) به وسیله qRT-PCR تعیین شد. ارقام دارای کیفیت نانوایی متفاوت بودند و از کم‌ترین به بیش‌ترین کیفیت به‌صورت سپاهان < پارسی < سرداری < مروارید رتبه‌بندی شدند. داده‌ها میانگین سه تکرار هستند و از ژن *actin* گندم به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی میزان بیان miRNA استفاده شد.

Figure 2. Relative expression levels of conserved miRNAs at two grain developmental stages in four Iranian bread wheat cultivars. The transcript levels of genes were determined in whole developing seed at 10 and 20 days after anthesis (DAA) by qRT-PCR. The cultivars had different quality of bread-making and were ranked from lower to higher quality as Sepahan < Parsi < Sardari < Morvarid. Data are mean of the three replications and *Actin* gene of wheat was used as internal control to normalize the expression level of genes.

خانواده‌های فاکتورهای رونویسی NAC (NAM; ATAF1,2; CUC2) و Growth-Regulating Factors (GRF) که در تکثیر سلولی دانه در حال نمو نقش دارند، به‌ترتیب به وسیله miR396 و miR164 تنظیم می‌شوند. خانواده فاکتورهای رونویسی NAC (NAM; ATAF1,2; CUC2) که توسط یک دوومین NAC بسیار حفاظت‌شده شناسایی می‌شود (Borrill *et al.*, 2017)، نقش‌های مهمی در فرایندهای نموی، سیگنالینگ اکسین، پاسخ به تنش‌های دفاعی و غیرزیستی و پیری برگ دارند (Uauy *et al.*, 2006). عملکرد miR164 در تنظیم پس از رونویسی ژن‌های NAC در بسیاری از گیاهان حفاظت شده است (Li *et al.*, 2016a). ژن *NAN-B1* از خانواده فاکتور رونویسی NAC در افزایش غلظت پروتئین، آهن و روی در دانه گندم از طریق تسریع پیری در برگ و افزایش انتقال مجدد (Remobilization) مواد مغذی از برگ به دانه نقش دارد (Waters *et al.*, 2009). افزایش بیان *NAC2* و یا کاهش بیان miR164b منجر به کاهش طول خوشه و عملکرد دانه در برنج می‌شود (Jiang *et al.*, 2018). همچنین، ژن‌های NAC در اندازه و وزن دانه‌های برنج و ذرت دخیل هستند (Mathew *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2019).

GRFها نیز اولین بار در نمو برگ و ساقه شناسایی شدند و نقش این فاکتورهای رونویسی در فرایندهای نموی مختلف مانند نمو ریشه، نمو اندام گل، اندازه دانه، طول عمر و پاسخ به تنش مشخص شده است (Li *et al.*, 2016b). بیش‌تر ژن‌های *GRF* در بافت‌های رشدی فعال (نوک ساقه، غنچه گل) بیان بیش‌تری نسبت به بافت‌های بالغ ساقه و برگ دارند. فعالیت *GRFs* پس از رونویسی به‌وسیله miR396، خانواده miRNA باستانی، کنترل می‌شود. جهش در *GFRs* یا افزایش بیان miR396 باعث کاهش تکثیر سلولی در برگ *Arabidopsis thaliana* شد که نشان‌دهنده نقش تنظیم‌کنندگی منفی miR396 در تکثیر سلولی است (Rodriguez *et al.*, 2010). همچنین، تحقیقات نشان داده است که افزایش بیان miR396c باعث کاهش بیان *OsGRF4*، کوچک‌شدن و کاهش تعداد سلول و در نهایت کوچک شدن اندازه دانه برنج می‌شود (Duan *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016b).

در این تحقیق، بیان miR396c در ارقام سرداری و پارسی (به‌ترتیب با وزن هزار دانه ۵۲/۵۱ و ۵۰/۹۵ گرم) نسبت به مروارید و سپاهان (به‌ترتیب با وزن هزار دانه ۴۲/۲۷ و ۴۰/۸۷ گرم) در ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود، در حالی‌که بیان این miRNA بین ارقام سرداری و پارسی اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) نداشت. همچنین در ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی، بیان miR396c در رقم مروارید به‌طور معنی‌داری کم‌تر از رقم سپاهان بود. بیان miR396c در همه ارقام در مدت نمو دانه از ۱۰ تا ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی، کاهش یافت که با نتایج تحقیقات دیگر در گندم (Meng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015) و ذرت (Zhang *et al.*, 2015) مطابقت داشت (شکل ۲).

نتایج بررسی qRT-PCR در این تحقیق نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ارقام مورد مطالعه از نظر بیان miR164a وجود داشت، به‌طوری که بیان این miRNA در هر دو مرحله نموی دانه (۱۰ و ۲۰ روز پس از گرده-افشانی) از بیش‌تر به کم‌تر به‌ترتیب در ارقام سپاهان، مروارید، پارسی و سرداری مشاهده شد. الگوی بیان miR164a از ۱۰ تا ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی در همه ارقام افزایش یافت (شکل ۲) که با نتایج آنالیز الگوی بیانی miR164 از طریق توالی‌یابی با کارایی بالا و qRT-PCR در مراحل نمو دانه ارقام مختلف گندم مطابقت داشت (Han *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018). در ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی، بیان کم miR396c و miR164a در ارقام با اندازه دانه بزرگ‌تر نسبت به اندازه دانه کوچک‌تر می‌تواند نشان‌دهنده افزایش بیان ژن‌های هدف آن‌ها (NAC و GRF) و تکثیر سلولی بیش‌تر و در نتیجه اندازه دانه بزرگ‌تر باشد. در مدت نمو دانه از ۱۰ تا ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی، الگوی بیانی miR396c و miR164a به‌ترتیب کاهشی و افزایشی بود. این نتایج پیشنهاد می‌دهد که الگوی بیانی متضاد miR396c و miR164a در مرحله نمو دانه می‌تواند در تنظیم تکثیر سلولی و اندازه دانه مهم باشد.

خانواده فاکتور رونویسی *APETALA2 (AP2)* که در تمامی اعضای خود دارای دوومین AP2 حفاظت شده هستند، در فرایندهایی مانند هویت اندام‌های گل و زمان گلدهی نقش دارند. افزایش بیان *GLOSSY15*، یک عضو از *AP2*، باعث تأخیر در انتقال فاز رویشی به زایشی در ذرت شد (Lee *et al.*, 2014). MiR172 تنظیم‌کننده بیان ژن‌های *AP2* است. همچنین فاکتور رونویسی Rice Starch Regulator1 (RSR1)، عضو خانواده AP2/EREBP و تنظیم‌کننده منفی سنتز نشاسته، ژن هدف miR172 است (Fu and Xue, 2010). RSR1 منجر به کاهش بیان ۱۵ و ۱۳ ژن سنتزکننده نشاسته به‌ترتیب در دانه‌های برنج و گندم شد (Fu and Xue, 2010; Kang *et al.*, 2013). در این مطالعه، بیش‌ترین و کم‌ترین بیان miR172a به‌ترتیب در ارقام پارسی و مروارید در ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی مشاهده شد، در حالی‌که بیان این miRNA بین ارقام پارسی و سرداری معنی‌دار نبود. در مدت نمو دانه از ۱۰ تا ۲۰ روز بعد از گرده‌افشانی، میزان بیان miR172a در مروارید (۱/۴۲ برابر)، سرداری (۱/۵۹ برابر)، پارسی (۱/۷۹ برابر) و سپاهان (۲/۷ برابر) افزایش یافت (شکل ۲). این الگوی بیانی با نتایج تحقیقات هان و همکاران (Han *et al.*, 2014) و سان و همکاران (Sun *et al.*, 2014) که گزارش کردند میزان بیان miR172a در مدت نمو دانه گندم از ۱۰ تا ۲۰ روز بعد از گرده‌افشانی و از ۹ تا ۱۵ روز بعد از گرده‌افشانی افزایش یافت، مطابقت داشت. کانگ و همکاران (Kang *et al.*, 2013) گزارش کردند که کاهش بیان RSR1 در مراحل نمو دانه گندم از ۱۰ تا ۲۵ روز بعد از گرده‌افشانی می‌تواند در نتیجه افزایش بیان miR172 در مدت نمو دانه گندم باشد. در دانه‌های برنج Knocking out *rsr1* مقدار آمیلوز دانه افزایش و ساختار آمیلوپکتین تغییر یافت و دانه‌های نشاسته گرد و با

بسته‌بندی آزادانه تشکیل شدند که منجر به کاهش درجه حرارت ژلاتینه شدن شد (Fu and Xue, 2010). ترکیبات نشاسته از آمیلوز (۳۰- ۲۰ درصد) و آمیلوپکتین (۸۰-۷۰ درصد) تشکیل شده است و مقدار نسبی آمیلوز، آمیلوپکتین و نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین در کیفیت پخت نان موثر هستند. نتایج آزمایش‌های زی و همکاران (Zi *et al.*, 2019) نشان داد که مقدار آمیلوز و نسبت آمیلوپکتین به آمیلوز در واریته با کیفیت نانوایی خوب نسبت به واریته با کیفیت نانوایی ضعیف به‌ترتیب کم‌تر و بیش‌تر است. در این تحقیق، بیان کم‌تر miR172a در ارقام گندم با کیفیت نانوایی خوب نسبت به کیفیت نانوایی ضعیف می‌تواند با کاهش مقدار آمیلوز و در نهایت افزایش کیفیت نانوایی این ارقام در ارتباط باشد.

برخی از miRNAs مانند miR827 در متابولیسم مواد مغذی در نمو دانه نقش دارند. ژن هدف miR827، *Nitrogen Limitation Adaptation* (*NLA*) است که یک پروتئین حاوی دوومین SPX (SYG1, Pho81 and XPR1) را کد می‌کند. پروتئین‌های SPX در تنظیم دورنی تجمع نیتروژن و هموستازی فسفات دخیل هستند (Li *et al.*, 2015).

در میان عناصر غذایی اصلی، نیتروژن از عناصر بسیار مهم برای رشد و نمو گیاه است و یک ترکیب کلیدی در ساختار سلولی مانند پروتئین، اسید نوکلئیک، کلروفیل و فیتوهورمون‌ها است (Nguyen *et al.*, 2015). مقدار انتقال مجدد نیتروژن از برگ به دانه در حال نمو با مقدار پروتئین در دانه رابطه مثبتی دارد (Uauy *et al.*, 2006). در این تحقیق، نتایج qRT-PCR نشان داد که کم‌ترین و بیش‌ترین بیان miR827a به‌ترتیب در ارقام سپاهان و مروارید در ۱۰ روز بعد از گرده‌افشانی مشاهده شد، در حالی‌که بیان این miRNA بین ارقام مروارید و سرداری و نیز بین ارقام سپاهان و پارسی اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در مدت نمو دانه از ۱۰ تا ۲۰روز بعد از گرده‌افشانی، الگوی بیانی miR827a در همه ارقام افزایشی بود و ارقام مروارید (۲/۳۳ برابر) و سپاهان (۱/۵۲ برابر) به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار افزایش بیان را نشان دادند (شکل ۲). نتایج بررسی الگوی بیانی miR827 از طریق توالی‌یابی با کارایی بالا و نیز qRT-PCR نشان‌دهنده افزایش بیان این miRNA طی پرشدن دانه گندم بود (Meng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). طی مدت پرشدن دانه، افزایش بیان miR827 باعث کاهش مقدار NLA و افزایش فعالیت nitrate transporters (NRTs) می‌شود که این فرایند انتقال مجدد نیتروژن به دانه را افزایش می‌دهد (Liu *et al.*, 2017). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مقدار پروتئین بیش‌تر در دانه ارقام با کیفیت نانوایی بالاتر می‌تواند به‌دلیل مقدار بیش‌تر اندوخته نیتروژن تنظیم‌شده به‌وسیله miR827 باشد.

جدول ۳- توالی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Table 3. The primer sequences used in this study

Name	Primer sequence (5′→3′)		
	Stem-loop qRT-PCR primer	Forward primer	Reverses primer
miR159a	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAA GAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTC TTTCCAGAGCTC	GCAGTTTGGA TTGAAGGGA	CGAGGAAGAAG ACGGAAGAAT
miR396c	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAA GAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTC TTTCTAGTTCAA	CAGTTCCACA GCTTTCTTGA	CGAGGAAGAAG ACGGAAGAAT
miR164a	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAA GAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTC TTTCTGCACGTG	GTGGAGAAGC AGGGCA	CGAGGAAGAAG ACGGAAGAAT
miR172a	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAA GAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTC TTTCTGCAGCAT	CGCAGAGAATC TTGATGATGC	CGAGGAAGAAG ACGGAAGAAT
miR827a	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAA GAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTC TTTCTGTTTGCT	GCAGTTAGATG ACCATCAGCA	CGAGGAAGAAG ACGGAAGAAT
actin		AAGATGACCCA GATTATG	AGAACGATACC AGTAGTA

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق miRNAs دخیل در نمو دانه در ارقام گندم با کیفیت نانوایی متفاوت با استفاده از آنالیز داده‌های RNA-seq از ارقام گندم با کیفیت نانوایی خوب و ضعیف در دو مرحله نموی دانه (۱۴ و ۳۰ روز پس از گرده‌افشانی) که از پایگاه اطلاعاتی NCBI بازیابی شده بود، شناسایی شدند. نتایج این آنالیزها نشان داد که بیان miRNAs در اواخر مرحله نمو دانه (۳۰ روز پس از گرده‌افشانی) نسبت به اواسط مرحله نمو دانه (۱۴ روز پس از گرده‌افشانی) کاهش می‌یابد. بر اساس این آنالیزها، پنج miRNAs حفاظت‌شده گیاهی miR159a، miR396c، miR164a، miR172a و miR827a، انتخاب و الگوی بیانی آن‌ها در چهار رقم گندم ایرانی با کیفیت نانوایی متفاوت در دو مرحله ۱۰ و ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی بررسی شدند. در هر چهار رقم گندم ایرانی مطالعه‌شده، الگوی بیانی miR396c روند کاهشی داشت، در حالی‌که الگوی بیانی سایر miRNA های مورد بررسی روندی افزایشی نشان داد. با توجه به نتایج بررسی بیان miR396c و miR164a که در تکثیر سلولی و اندازه دانه مؤثر هستند، مشاهده شد که miR164a اثر تنظیمی بیش‌تر در اندازه دانه ارقام گندم ایرانی دارد. همچنین در این مطالعه، نتایج الگوی بیانی miR159a، miR172a و miR827a که در سنتز پروتئین و نشاسته دخیل هستند، می‌تواند نشان‌دهنده نقش تنظیمی این miRNAs در کیفیت نانوایی گندم باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با کمک مالی شماره ۹۶۰۹۰۴ ستاد توسعه زیست‌فناوری کشور انجام شده است.

References

AACC, 2000. Approved methods of the American association of cereal chemists. 10th Ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.

Aghagholizadeh, R., Kadivar, M., Nazari, M., Mousavi, F., Azizi, M. H., Zahedi, M. and Rahiminezhad, M. R. 2017. Characterization of wheat gluten subunits by liquid chromatography-mass spectrometry and their relationship to technological quality of wheat. **Journal of Cereal Science** 76: 229-235.

Arunachalam, V. and Bandyopadhyay, A. 1984. Limits to genetic divergence for occurrence of heterosis-experimental evidence from crop plants. **Indian Journal of Genetics** 44: 548-554.

Barak, S., Mudgil, D. and Khatkar, B. S. 2013. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. **LWT-Food Science and Technology** 51: 211-217.

Barak, S., Mudgil, D. and Khatkar, B. S. 2014. Influence of gliadin and glutenin fractions on rheological, pasting and textural properties of dough. **International Journal of Food Properties** 17: 1428-1438.

Borrill, P., Harrington, S. A. and Uauy, C. 2017. Genome-wide sequence and expression analysis of the NAC transcription factor family in polyploid wheat. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 7: 3019-3029.

Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J. and Guegler, K. J. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 33: 179-186.

Chu, Z., Chen, J., Xu, H., Dong, Z., Chen, F. and Cui, D. 2016. Identification and comparative analysis of microRNA in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus derived from mature and immature embryos during in vitro culture. **Frontiers in Plant Science** 7: 1302.

Denčić, S., Mladenov, N. and Kobiljski, B. 2011. Effects of genotype and environment on breadmaking quality in wheat. **International Journal of Plant Production** 5: 71-82.

Diaz, I., Vicente-Carbajosa, J., Abraham, Z., Martínez, M., Isabel-La Moneda, I. and Carbonero, P. 2002. The GAMYP protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. **Plant Journal** 29: 453-464.

Dowell, F. E., Maghirang, E. B., Pierce, R. O., Lookhart, G. L., Bean, S. R., Xie, F. and Chung, O. K. 2008. Relationship of bread quality to kernel, flour, and dough properties. **Cereal Chemistry** 85: 82-91.

Duan, P., Ni, S., Wang, J., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y. and Li, Y. 2015. Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. **Nature Plants** 1: 1-5.

Elangovan, M., Rai, R., Dholakia, B. B., Lagu, M. D., Tiwari, R., Gupta, R. K. and Gupta, V. S.

2008. Molecular genetic mapping of quantitative trait loci associated with loaf volume in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Cereal Science** 47: 587-598.

Fu, F. F. and Xue, H. W. 2010. Coexpression analysis identifies rice starch regulator1, a rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator. **Plant Physiology** 154: 927-938.

Gasparis, S., Yanushevska, Y. and Nadolska-Orczyk, A. 2017. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum** 39: 1-13.

Gobaa, S., Brabant, C., Kleijer, G. and Stamp, P. 2008. Effect of the 1BL.1RS translocation and of the Glu-B3 variation on fifteen quality tests in a doubled haploid population of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Cereal Science** 48: 598-603.

Guo, W., Yang, H., Liu, Y., Gao, Y., Ni, Z., Peng, H. and Yao, Y. 2015. The wheat transcription factor TaGAMyb recruits histone acetyltransferase and activates the expression of a high-molecular-weight glutenin subunit gene. **Plant Journal** 84: 347-359.

Han, R., Jian, C., Lv, J., Yan, Y., Chi, Q., Li, Z. and Zhao, H. 2014. Identification and characterization of microRNAs in the flag leaf and developing seed of wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC Genomics** 15: 289.

Hu, J., Wang, Y., Fang, Y., Zeng, L., Xu, J., Yu, H. and Qian, Q. 2015. A rare allele of GS2 enhances grain size and grain yield in rice. **Molecular Plant** 8: 1455-1465.

Jiang, D., Chen, W., Dong, J., Li, J., Yang, F., Wu, Z. and Zhuang, C. 2018. Overexpression of miR164b-resistant OsNAC2 improves plant architecture and grain yield in rice. **Journal of Experimental Botany** 69: 1533-1543.

Jin, X., Fu, Z., Lv, P., Peng, Q., Ding, D., Li, W. and Tang, J. 2015. Identification and characterization of microRNAs during maize grain filling. **PLoS ONE** 10: e0125800.

Kang, G. Z., Xu, W., Liu, G. Q., Peng, X. Q. and Guo, T. C. 2013. Comprehensive analysis of the transcription of starch synthesis genes and the transcription factor RSR1 in wheat (*Triticum aestivum*) endosperm. **Genome** 56: 115-122.

Khatkar, B. S., Bell, A. E. and Schofield, J. D. 1995. The dynamic rheological properties of glutens and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. **Journal of Cereal Science** 22: 29-44.

Lee, Y. S., Lee, D. Y., Cho, L. H. and An, G. 2014. Rice miR172 induces flowering by suppressing OsIDS1 and SNB, two AP2 genes that negatively regulate expression of Ehd1 and florigens. **Rice** 7: 1-13.

Li, D., Liu, Z., Gao, L., Wang, L., Gao, M., Jiao, Z. and Kan, Y. 2016a. Genome-wide identification and characterization of microRNAs in developing grains of *Zea mays* L. **PLoS ONE** 11: 1-18.

Li, S., Gao, F., Xie, K., Zeng, X., Cao, Y., Zeng, J. and Li, P. 2016b. The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. **Plant Biotechnology Journal** 14: 2134-2146.

Li, T., Ma, L., Geng, Y., Hao, C., Chen, X. and Zhang, X. 2015. Small RNA and degradome sequencing reveal complex roles of miRNAs and their targets in developing wheat grains. **PLoS ONE** 10: e0139658.

Liu, W., Sun, Q., Wang, K., Du, Q. and Li, W. X. 2017. Nitrogen limitation adaptation (NLA) is involved in source-to-sink remobilization of nitrate by mediating the degradation of NRT1.7 in *Arabidopsis*. **New Phytologist** 214: 734-744.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods** 25: 402-408.

Mathew, I. E., Das, S., Mahto, A. and Agarwal, P. 2016. Three rice NAC transcription factors heteromerize and are associated with seed size. **Frontiers in Plant Science** 7: 1-16.

Meng, F., Liu, H., Wang, K., Liu, L., Wang, S., Zhao, Y. and Li, Y. 2013. Development-associated microRNAs in grains of wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC Plant Biology** 13: 19-21.

Mutlu, A. C., Boyaci, I. H., Genis, H. E., Ozturk, R., Basaran-Akgul, N., Sanal, T. and Evlice, A. K. 2011. Prediction of wheat quality parameters using near-infrared spectroscopy and artificial neural networks. **European Food Research and Technology** 233: 267-274.

Nadaud, I., Girousse, C., Debiton, C., Chambon, C., Bouzidi, M. F., Martre, P. and Branlard, G. 2010. Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. **Proteomics** 10: 2901-2910.

Nguyen, G. N., Rothstein, S. J., Spangenberg, G. and Kant, S. 2015. Role of microRNAs involved in plant response to nitrogen and phosphorous limiting conditions. **Frontiers in Plant Science** 6: 1-15.

Pandey, R., Joshi, G., Bhardwaj, A. R., Agarwal, M. and Katiyar-Agarwal, S. 2014. A comprehensive genome-wide study on tissue-specific and abiotic stress-specific miRNAs in *Triticum aestivum*. **PLoS ONE** 9: e95800.

Rodriguez, R. E., Mecchia, M. A., Debernardi, J. M., Schommer, C., Weigel, D. and Palatnik, J. F. 2010. Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. **Development** 137: 103-112.

Ross, A. S. and Bettge, A. D. 2009. Passing the test on wheat end-use quality. In: Carver, B. F. (Ed.). Wheat science and trade. Wiley-Blackwell, USA. pp: 455-493.

Shewry, P. R., Mitchell, R. A. C., Tosi, P., Wan, Y., Underwood, C., Lovegrove, A. and Ward, J. L. 2012. An integrated study of grain development of wheat (cv. Hereward). **Journal of Cereal Science** 56: 21-30.

Song, Y. and Zheng, Q. 2007. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. **Trends in Food Science and Technology** 18: 132-138.

Sun, F., Guo, G., Du, J., Guo, W., Peng, H., Ni, Z. and Yao, Y. 2014. Whole-genome discovery of miRNAs and their targets in wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC Plant Biology** 14: 142.

Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A. and Dubcovsky, J. 2006. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. **Science** 314: 1298-1301.

Wang, Y., Shi, C., Yang, T., Zhao, L., Chen, J., Zhang, N. and Chen, F. 2018. High-throughput sequencing revealed that microRNAs were involved in the development of superior and inferior grains in bread wheat. **Scientific Reports** 8: 1-18.

Waters, B. M., Uauy, C., Dubcovsky, J. and Grusak, M. A. 2009. Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. **Journal of Experimental Botany** 60: 4263-4274.

Weegels, P. L., Hamer, R. J. and Schofield, J. D. 1996. Functional properties of wheat glutenin. **Journal of Cereal Science** 23: 1-17.

Wu, F. Y., Tang, Ch. Y., Guo, Y. M., Yang, M. K., Yang, R. W., Lu, G. H. and Yang, Y. H. 2016. Comparison of miRNAs and their targets in seed development between two maize inbred lines by high-throughput sequencing and degradome analysis. **PLoS ONE** 11: e0159810.

Zhang, K., Shi, X., Zhao, X., Ding, D., Tang, J. and Niu, J. 2015. Investigation of miR396 and growth-regulating factor regulatory network in maize grain filling. **Acta Physiologiae Plantarum** 37: 28.

Zheng, L., Zhang, X., Zhang, H., Gu, Y., Huang, X., Huang, H. and Huang, Y. 2019. The miR164-dependent regulatory pathway in developing maize seed. **Molecular Genetics and Genomics** 294: 501-517.

Zi, Y., Shen, H., Dai, S., Ma, X., Ju, W., Wang, C. and Song, J. 2019. Food hydrocolloids comparison of starch physicochemical properties of wheat cultivars differing in bread- and noodle-making quality. **Food Hydrocolloids** 93: 78-86.

doi: 10.22124/cr.2020.16123.1585

University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

(Research Article)

Cereal Research
Vol. 10, No. 2, Summer 2020 (121-133)

Bioinformatic identification and expression analysis of microRNAs involved in grain development of Iranian wheat cultivars with different bread-making quality

Reza Samimifard[1*], Babak Rabiei[2], Bahram Maleki Zanjani[3], Jalal Saba[4] and Abbas Bahari[5]

Received: February 3, 2020 Accepted: May 20, 2020

Abstract

The bread wheat (*Triticum aestivum*) quality is highly dependent on the presence and composition of the gluten proteins in the grain. In this research, bread-making quality of four Iranian bread wheat cultivars (Morvarid, Sardari, Parsi, and Sepahan) was ranked from the highest to lowest based on farinographic and chemical analyses of the wheat flour and bread specific volume. To identify and compare miRNAs involved in grain development between Iranian wheat cultivars with good and poor bread-making quality, RNA-seq data of seven wheat cultivars (four cultivars with good quality and three with poor) at two grain developmental stages were downloaded and analyzed from the NCBI database. Five conserved miRNAs were selected from the identified miRNAs and their expression pattern at two grain developmental stages (10 and 20 days after anthesis) were evaluated in four Iranian wheat cultivars using Real Time PCR. The results showed that the expression pattern of miR159a, miR164a, miR172a and miR827a during grain development in all studied cultivars had an increasing trend, while the expression pattern of miR396c showed a decreasing trend. miR164a and miR396c showed the highest and lowest relative expression in Sepahan and Morvarid (with the lowest and highest 1000-grain weight), respectively, which can be due to their negative regulatory roles on grain size. Also, with increasing the baking quality of the studied cultivars, the relative expression of miR159a and miR172a involved in the synthesis of starch and grain storage proteins, respectively, reduced and the expression of miR827a involved in the remobilization of nitrogen from leaves to grains, increased indicating negative effects of miR159a and miR172a and positive effect of miR827a on the bread-making quality of wheat cultivars.

Keywords: Farinograph analyses, Gluten proteins, miRNA expression pattern, qRT-PCR, RNA-seq

1. Ph. D. Graduate, Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Prof., Dept. of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Assoc. Prof., Dept. of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
4. Prof., Dept. of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
5. Assist. Prof., Modern Biological Technologies Institute, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[*] Corresponding author: samimifard@znu.ac.ir