

ORIGINAL ARTICLE

Identification and analysis of miRNAs in various Thymus species

Aboozar Soorni*, Sepehr Meratian Esfahani, Badraddin Ebrahim Sayed-Tabatabaei

Department of Biotechnology,
College of Agriculture, Isfahan
University of Technology, Isfahan,
Iran.

Correspondence

Aboozar Soorni
Email: soorni@iut.ac.ir

How to cite

Soorni, A., Meratian Esfahani, S., & Sayed-Tabatabaei, B. E. (2023). Identification and analysis of miRNAs in various Thymus species. *Crop Biotechnology*, 13(43), 1-10.

ABSTRACT

Today, medicinal plants are used in the treatment of many diseases because of their secondary metabolites. Thyme as one of these plants contains a wide range of secondary metabolites such as terpenes. Various methods have been developed to increase these materials. In classical methods, environmental factors are changed to produce the most effective substance in medicinal plants, but in newer approaches that are based on plant genetics, higher yields are observed. One of these approaches is the use of miRNAs. These miRNAs control gene expression after transcription by mRNA analysis or inhibition of their translation, and play different roles in biological and metabolic processes in plants and animals. One of the simplest and least expensive methods for identifying miRNAs is the use of bioinformatics tools and methods. To identify distinct miRNA in different species of thyme, a study based on homology search was conducted using transcriptomic data of thyme. First, this information was refined and then alignment performed against all known miRNAs in the miRBase database. After screening of results based on factors such as length and e-value level, the secondary structure of miRNAs was analyzed with UNAFold tool. Target genes were identified using psRNATARGET tool and phylogenetic relationships were investigated using maximum likelihood method and RaxML tool. In total 64 distinct candidate's miRNAs were identified in different species of thymus and 14 miRNAs included miR172 and miR396 played an important role in terpenes synthesis and it has been proven in previous studies. The phylogenetic tree was able to show the relationship between miRNAs in different species.

KEYWORDS

Thyme, Bioinformatics, Terpenes, Secondary metabolites, NGS.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

شناسایی و تجزیه و تحلیل miRNAs در گونه‌های مختلف آویشن

ابوذر سورنی*، سپهر مرآتیان اصفهانی، بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی

گروه زیست‌فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

امروزه گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن متابولیت‌های مؤثر، در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه و استفاده همگان قرار گرفته‌اند. یکی از این گیاهان آویشن است که حاوی گستره وسیعی از متابولیت‌های ثانویه مانند ترپن‌ها می‌باشد. روش‌های مختلفی برای افزایش این مواد ابداع شده است. در روش‌های کلاسیک از تغییر عوامل محیطی جهت افزایش تولید ماده مؤثره استفاده می‌گردد. در حالی که در روش‌های نوین از دست‌ورزی‌های ژنتیکی که بازده بالاتری نیز دارند بهره گرفته می‌شود. از جمله این رویکردها استفاده از نقش و عملکرد miRNAs می‌باشد. این RNAs بیان ژن را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها کنترل کرده و نقش‌های متنوعی را در فرآیندهای بیولوژیکی و متابولیکی در گیاهان و جانوران بازی می‌کنند. روش‌های متعددی برای شناسایی miRNAs موجود می‌باشد که یکی از ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین آن‌ها، استفاده از ابزارها و روش‌های بیوانفورماتیکی است. لذا به منظور شناسایی miRNAs متمایز در گونه‌های مختلف آویشن، مطالعه‌ای مبتنی بر جستجوی همولوژی با استفاده از اطلاعات ترانسکریپتومی گیاه آویشن انجام گرفت. ابتدا این اطلاعات پالایش و سپس همدردی در برابر تمام miRNAs شناخته‌شده موجود در بانک اطلاعاتی miRBase انجام شد. بعد از غربالگری نتایج بر اساس شاخص‌هایی همچون طول و سطح e-value ساختار ثانویه miRNAs با ابزار UNAFold مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی ژن‌های هدف با استفاده از ابزار psRNATARGET و بررسی روابط فیلوژنتیکی به روش حداکثر احتمال و ابزار RaxML انجام شد. در مجموع ۶۴ miRNAs کاندید متمایز در گونه‌های مختلف آویشن شناسایی شدند که از این تعداد ۱۴ عدد در مسیر سنتز ترپن‌ها قرار داشتند. از مهم‌ترین این miRNAs می‌توان به miR172 و miR396 اشاره کرد که در مطالعات پیشین نقش آن‌ها در مسیر سنتز ترپنوئیدها به اثبات رسیده است. درخت فیلوژنتیک توانست ارتباط میان miRNAs در گونه‌های مختلف را به خوبی نشان دهد.

واژه‌های کلیدی

آویشن، بیوانفورماتیک، ترپن‌ها، متابولیت‌های ثانویه، NGS.

نویسنده مسئول:

ابوذر سورنی

رایانامه: soomi@iut.ac.ir

استناد به این مقاله:

سورنی، ابوذر، مرآتیان اصفهانی، سپهر و سید طباطبایی، بدرالدین ابراهیم (۱۴۰۲). شناسایی و تجزیه و تحلیل miRNAs در گونه‌های مختلف آویشن. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۳(۴۲)، ۱-۳.

مقدمه

جنس آویشن (*Thymus*) در سال ۱۷۳۵ میلادی توسط لینه شناسایی و طبقه‌بندی شد. این جنس متعلق به خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) است که دارای ۲۰۰ جنس و بیش از ۸۰۰ گونه‌ی گیاهی می‌باشد. آویشن، گیاهی دولپه‌ای، چندساله با گل‌هایی به رنگ سفید تا ارغوانی است. کاسه‌ی گل در آویشن از کرک‌های غده‌ای حاوی اسانس پوشیده شده است (Morales, 2002). از این جنس ۱۴ گونه در ایران شناسایی شده که چهار گونه *Thymus. Thymus. persicus Thymus. armanicus* و *Thymus. lancifolius* و *Thymus. daenensis* بومی ایران هستند.

مواد شیمیایی تشکیل‌دهنده آویشن عمدتاً به دو گروه فلاونوئیدها و اسانس‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند. فلاونوئیدها شامل تیموسین^۱، ایزوتیمونین^۲، فلاونول‌ها^۳ و لوتئولین^۴ بوده و ترکیبات اصلی اسانس فرار در آویشن مونوترپن‌های آروماتیک هستند که شامل تیمول^۵، کارواکرول^۶، پی-سیمن^۷، گاماترپین^۸ و کامفور^۹ می‌باشند. البته از سایر مواد تشکیل‌دهنده آویشن، می‌توان به تانن‌ها^{۱۰} و رزمارینیک اسید نیز اشاره کرد (Behnia et al, 2008; Braga et al, 2008; Hummelbrunner et al, 2001; Isman, 2000; Ozguven and Tansi, 1998; Sedy and Koschier, 2003).

بنابراین، با توجه به نیاز روزافزون استفاده از گیاهان دارویی، روش‌ها و تکنیک‌های فراوانی در رابطه با تولید، کنترل و افزایش ماده‌ی مؤثر آن‌ها به وجود آمده است. محققین در روش‌های کلاسیک با افزایش ماده مغذی مورد نیاز گیاه و به‌طور کلی فراهم آوردن شرایط محیطی مناسب میزان ماده مؤثر این گیاهان را تغییر می‌دهند. روش‌های کلاسیک تا حدودی می‌توانند میزان تولید ماده مؤثر گیاه را تغییر دهند؛ اما به دلیل وقت‌گیر بودن، داشتن رویکرد آزمایشی و آماری (سعی و خطا) در طی مراحل و همچنین محدود بودن پتانسیل بهینه‌سازی شرایط محیطی، رویکردهای جدیدتری جایگزین روش‌های کلاسیک شدند.

نتایج مطالعات نشان می‌دهد عوامل مختلفی در کیفیت و کمیت مواد مؤثره گیاهان دارویی تأثیرگذار هستند. این عوامل را

می‌توان به دو دسته کلی درونی و بیرونی تقسیم کرد. عوامل بیرونی شامل شرایط آب و هوایی، تنوع جغرافیایی، تغییرات فصلی، نور، آلودگی، بیماری‌ها و عوامل خاکی است؛ اما عوامل تعیین‌کننده درونی اصولاً مبتنی بر ژنتیک گیاه هستند که در تقابل و تعامل با شرایط محیطی، فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و متابولیسمی را تنظیم می‌کنند (Srivastava, 2002)؛ این عوامل خود می‌توانند به پتانسیل ژنتیکی گیاه، سطح بیان ژن‌ها و تغییرات پس از بیان تقسیم شوند. علاوه بر پتانسیل ژنتیکی، میزان بیان ژن در تولید ماده مؤثره اهمیت فراوان دارد. میزان بیان یک ژن خود به عوامل مختلفی بستگی دارد، از جمله این عوامل می‌توان به تعداد نسخه‌های یک ژن اشاره کرد، هنگامی که تعداد کپی یک ژن بیشتر باشد بیان ژن مورد نظر افزایش خواهد یافت. همچنین وجود یک پروموتور قوی که در ارتباط با یک ژن است می‌تواند رونویسی آن ژن و در نهایت بیان ژن را افزایش دهد. عامل مهم دیگر در میزان بیان ژن‌ها، فاکتورهای رونویسی (TF) هستند. فاکتورهای رونویسی پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ی بیان هستند که به DNA متصل می‌شوند و تحت تأثیر عوامل مختلف مانند سیگنال‌های بین سلولی باعث کاهش و یا افزایش بیان ژن در طول زندگی یک سلول می‌شوند (Arora et al, 2013). یکی دیگر از عوامل که جز تغییرات پس از رونویسی قرار دارد، miRNAs می‌باشند که اثر قابل قبولی در کاهش و یا افزایش میزان ماده مؤثره گیاهان دارند. در واقع miRNAs، مولکول‌های RNA حفاظت‌شده‌ی غیر کد کننده و تک‌رشته‌ای کوتاهی به طول ۱۶ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که از طریق کنترل بیان ژن‌های مختلف به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ها بعد از رونویسی شناخته می‌شوند. در گیاهان miRNAs در فرآیندهای مختلفی از جمله رشد و نمو، متابولیسم، مورفوژنز، انتقال سیگنال، تعیین زمان گلدهی و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده دخیل هستند (Davison et al, 2006). miRNAs تقریباً یک درصد ژنوم را در برمی‌گیرند اما هرکدام از آن‌ها صدها ژن را مورد هدف می‌دهند (Bentwich et al, 2005; Lim et al, 2003).

این miRNAs بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها، کنترل می‌کنند (و Vahid et al, 2010). رونوشت‌های اولیه miRNA طی دو مرحله پردازش تبدیل به مولکول بالغ کوتاه‌تر می‌شوند. ابتدا miRNAs در هسته سلول از روی نواحی بین ژنی یا درون ژنی به‌وسیله RNA پلیمراز II به فرم miRNA اولیه (pri-miRNA) با طول ۱ تا ۳ کیلو باز، رونویسی می‌شوند. در ادامه این pri-miRNAs در

1. Thymosin
2. Isotimonin
3. Flavonols
4. Luteolin
5. Thymol
6. Carvacrol
7. P.cymene
8. γ .Terpinene
9. Camphor
10. Tanan

عملکردی مهم در طول این تنش‌ها بودند (Pegler *et al.*, 2019). نجاچی و همکاران miRNAs را شناسایی کرد که سطح آن‌ها در اثر کمبود شدید آب در *Tripogon loliiformis*، گیاهی که می‌تواند از حالت خشک شده دوباره زنده شود، تغییر می‌کند (Njaci *et al.*, 2018). مطالعات گسترده‌ای بروی نقش و عملکردی بسیاری از متابولیت‌های ثانویه انجام شده است. از جمله این مطالعات که توسط یو زی-ایکس و همکارانش انجام شده نشان داد بیان بیش از حد mir156 با اثر بروی فاکتور رونویس SPL اثر مستقیم بروی کاهش سنتز ترپن‌ها به خصوص سسکوئی‌ترین‌ها موجود در آرابیدوپسیس دارد (Gou *et al.*, 2011). مطالعات صورت گرفته بروی زنجبیل توسط نوپور سنگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر تنظیمی miRNAs مانند miR5021 و miR805 بر پیش‌سازهای ترپن‌های را به اثبات رساند (Singh *et al.*, 2016). ژائو و یانگ در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که برخی از miRNAs بر فاکتورهای رونویسی مسیر ترپن‌ها مانند mir3632 بر MYC2 و miR33418 بر MYB در چای اثر مستقیم دارند (Zhao *et al.*, 2018).

روش شناسایی پژوهش

اطلاعات ترنسکرپتومی مربوط به گونه‌های مختلف آویشن حاصل از توالی یابی ترنسکرپتوم بافت برگ گونه‌های آویشن *T. persicus*, *T. vulgaris*, *T. daenensis*, *T. aremeniacus*, *T. pubescens*, *T. lancifolius* به ترتیب با ۶۰/۹۸، ۶۴/۹۹، ۶۱/۸۱، ۶۲/۲۰ و ۶۵/۸۵ میلیون خوانش به کمک دستگاه Illumina HiSeq 4000 در مطالعه سورنی و همکاران (۲۰۱۹)، از بانک اطلاعاتی NCBI به شماره دسترسی PRJNA481444 دریافت شد (Soorni *et al.*, 2019).

کنترل کیفیت و سرهم‌بندی قرائت‌ها

کنترل و کیفیت خوانش‌های خام حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار FastQC انجام شد (Aparicio-Puerta *et al.*, 2020). به منظور کاهش خطای خوانش حاصل از وجود توالی‌های آداپتورها و حذف توالی بی کیفیت از Trimmomatic استفاده شد (Bolger *et al.*, 2014). جهت سرهم‌بندی توالی‌ها از نرم‌افزارهای Trinity و rnaSPades استفاده شد (Grabherr *et al.*, 2011). در نهایت جهت حذف توالی‌های تکراری از نرم‌افزار cd-hit-est با مقادیر پیشفرض استفاده شد (Badapanda and Rathore, 2018).

هسته به ساختارهای ساقه حلقه با طول تقریبی ۷۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید که pre-miRNA نامیده می‌شوند، شکسته می‌شوند (Bartel, 2004). در نهایت این ساختار مجدد دستخوش تغییر قرار گرفته و یک miRNAs بالغ به طول ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید حاصل می‌شود (Millar, 2005; Zhang *et al.*, 2018, and Waterhouse).

مکانیسم‌ها عمل miRNAs به دو صورت است: در حالت اول miRNA بالغ به mRNA می‌چسبد و با ایجاد ساختار ۲ رشته‌ای باعث تجزیه mRNA می‌شود. در این حالت جفت‌شدگی کامل بین miRNA و mRNA هدف ایجاد می‌شود. در حالت دوم کمپلکس miRNA به همراه RISC به‌عنوان یک سرکوبگر و یا یک ممانعت‌کننده عمل می‌کند و مانع ترجمه mRNA در ریبوزوم می‌شود، در این حالت بین miRNA و توالی هدف آن اتصال ناقص وجود دارد (Zhang *et al.*, 2006). با توجه به اهمیت شناسایی miRNAs در گیاهان و عدم وجود مطالعه و تحقیقی در این زمینه در گیاه آویشن، در این مطالعه از اطلاعات ترنسکرپتومی چند گونه مختلف آویشن با کمک ابزارهای بیوانفورماتیک برای شناسایی miRNA استفاده شد و در نهایت پیش‌بینی عملکرد آن‌ها در مسیرهای مختلف بیولوژیکی این گیاه نیز مورد بررسی قرار گرفت.

پژوهش

مولکول‌های miRNA اولین بار توسط لی و همکاران در سال ۱۹۹۳ در *caenorhabditis elegans* هنگام بررسی کاهش سطح پروتئین LIN-4 که در مرحله‌ای از پیشرفت لاروی از مرحله L1 به L2 ضروری بود گزارش شد (Lee *et al.*, 2003). ابتدا تصور می‌شد این روش تنظیم بیان ژنی پدیده‌ای منحصر به *C. elegans* است، اما در سال‌های بعد اولین miRNAs گیاهی در سال ۲۰۰۲ در آرابیدوپسیس شناسایی شدند. مطالعات بعدی روی miRNAs در گیاهان اثر کنترلی آن‌ها روی رشد برگ و گل را اثبات کرد (Aukerman and Sakai, 2003; Palatnik *et al.*, 2003). در سال‌های بعد از اطلاعات ترنسکرپتومی جهت شناسایی miRNAs استفاده شد. پلگر و همکاران از اطلاعات ترنسکرپتومی برای تعیین فراوانی miRNAs در آرابیدوپسیس تحت شرایط گرما، خشکسالی و تنش شوری استفاده کردند. این بررسی بسیاری از miRNAs را با تغییرات ساختاری در سطح بالا در این شرایط شناسایی کرد. در واقع محققین در این مطالعه miRNAs را شناسایی کردند که کاندیدای ایفای نقش‌های

مature جمع‌آوری شده و سپس با کمک ابزار MUSCEL هم‌ردیف شدند. نتیجه حاصل شده به‌عنوان ورودی اولیه برای ساخت درخت تبارزایی استفاده شد (Barik *et al*, 2014). درخت تبارزایی با استفاده از maximum likelihood با maximum bootstrap ۵۰۰ به کمک ابزار RaxML تولید شد (Stamatakis, 2014).

یافته‌های پژوهش

نتایج سرهم‌بندی قرائت‌ها و بررسی کیفیت آن

به‌طور کلی، شاخص‌های مختلفی برای ارزیابی کیفیت سرهم‌بندی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، شمار کانتیگ‌ها (شمار ترانسکرپت‌های پیش‌بینی‌شده) و اندازه کل سرهم‌بندی‌ها به‌عنوان مهم‌ترین معیارها مورد بررسی قرار گرفتند. در اکثر نمونه‌ها بیشترین تعداد کانتیگ (دامنه از ۸۵۰۷۸ تا ۱۳۱۶۵۷) و اندازه کل سرهم‌بندی توسط نرم‌افزار Trinity حاصل شد. درحالی‌که تعداد کانتیگ‌های شناسایی‌شده توسط نرم‌افزار Trinitypades (دامنه از ۵۷۸۳۵ تا ۱۰۸۶۳۰) کمتر از ابزار Trinity بود. اندازه کل ترانسکرپتوم به‌دست‌آمده نیز تفاوت معنی‌داری با ابزار Trinity داشت. در اغلب موارد شمار بالای کانتیگ‌های به‌دست‌آمده، تکه‌تکه^۲ بودن ترانسکرپتوم مرجع و شباهت بالای بسیاری از ترانسکرپت‌ها را نشان می‌دهد. این در حالی است که گاه افزایش اندازه‌ی کل، باعث ایجاد یک سرهم‌بندی پیوسته‌تر با پوشش بیشتر می‌شود.

افزایش شمار کانتیگ‌ها می‌تواند به علت وجود خطاهای توالی‌یابی و عدم هم‌پوشانی قطعات به وجود آید. از طرف دیگر سطح بیان ژن‌ها در اطلاعات ترانسکرپتومی، تأثیر بسزایی روی تعداد کانتیگ‌های حاصل از سرهم‌بندی دارد. در واقع ابزارهایی که سرهم‌بندی را از ترانسکرپت‌هایی با بیان بالا ایجاد می‌کنند، سرهم‌بندی پیوسته‌تر با اندازه بزرگ‌تر را تولید می‌کنند.

انجام blast برای شناسایی miRNAs، غربالگری و بررسی ساختار ثانویه

شناسایی miRNAs با استفاده از بلاست ترانسکرپتوم حاصل از خروجی cd-hit در مقابل اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی miRbase انجام شد. برای این کار از مجموعه blastall و ابزار Blastn استفاده شد (گراهبر، هاس و یاسور، ۲۰۱۱). نتایج حاصل از بلاست، بر اساس درصد ۱۰۰-۹۵، طول هم‌ردیفی ۲۰-۲۳، حداکثر عدم تطابق ۴، گپ صفر و E.value 10^{-5} غربالگری شدند و نتایج دارای مقادیر پایین‌تر از شاخص‌های تعریف شده حذف شدند (Zhang *et al*, 2018). جهت بررسی ساختار ثانویه، ۲۰۰ نوکلئوتید در بالادست نقطه شروع و ۲۰۰ نوکلئوتید در پایین‌دست نقطه‌ی پایان miRNA بالغ با استفاده از ابزار Bedtools جداسازی شد. کمترین جایگاه در بالادست نوکلئوتید شماره ۱ توالی در نظر گرفته شد و در پایین‌دست با توجه به طول مخصوص هر توالی بیشترین مقدار ممکن در نظر گرفته شد (Quinlan, 2014). بعد از انجام Blastx جهت حذف توالی‌های کد کننده، ساختار ثانویه ترانسکرپت‌های باقی مانده مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ساختار ثانویه با کمک نرم‌افزار UNAFold (http://www.unafold.org) انجام شد. در این نرم‌افزار به‌صورت پیش‌فرض میزان درصد بازهای نوکلئوتیدی A و U محاسبه‌شده و همچنین میزان MFE کمتر از -20 kcal/mol حذف می‌شود. همچنین جهت بررسی مجدد ساختار ثانویه (ساقه-حلقه) miRNA از اسکریپت^۱ SUMirFold، SUMirfind نیز استفاده شد. این اسکریپت به همراه unafold و پکیج‌های مورد نیاز آن‌ها به‌طور صحیح گزینش مناسب را انجام می‌دهند (Alptekin *et al*, 2017). بعد از شناسایی نواحی گزینش‌شده‌ی مورد نظر از bedtools برای جداسازی توالی از روی داده‌های ترانسکرپتوم استفاده شد.

شناسایی ژن‌های هدف و ساخت درخت تبارزایی

به منظور شناسایی ژن‌های هدف از ابزار psRNATARGET استفاده شد (Dai *et al*, 2018). در این آنالیز توالی miRNAs با توالی مسیر ترپن‌ها مقایسه شدند. برای ساخت درخت تبارزایی، تمام miRNAs شناسایی‌شده به‌صورت

جدول ۱. خوانش‌های چپ و راست، قبل از فرآیند حذف

گونه	<i>T. armeniacus</i>	<i>T. lancifolius</i>	<i>T. persicus</i>	<i>T. pubescens</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. daenensis</i>
شمار خوانش‌ها قبل از فیلتر	۱۲۷۶۶۰۶۰۰	۶۵۸۵۹۴۵۶	۶۱۸۱۰۳۴۴	۶۲۲۰۹۱۱۸	۶۴۹۹۷۲۳۲	۶۰۹۸۲۲۱۲

Trinity در اکثر گونه‌ها مطلوب‌تر است، به همین علت در مراحل بعدی آنالیزها، از سرهم‌بندی‌های حاصل از Trinity استفاده شد.

نتایج حاصل از cd-hit، بلاست و بررسی ساختار ثانویه

برای حذف توالی‌های تکراری از ابزار cd-hit-est برای هرگونه استفاده شد. به‌طور کلی تعداد توالی‌های خوشه‌بندی شده دامنه‌ای بین ۸۵۰۷۸ متعلق به گونه‌ی *T. persicus* تا ۱۳۱۶۵۷ متعلق به گونه‌ی *T. daenensis_M* داشتند. بیشترین و کمترین میزان کاهش در تعداد توالی‌ها به ترتیب متعلق به گونه‌های *T. armeniacus* و *T. persicus* بودند.

نتایج حاصل از بلاست نوکلئوتیدی بین توالی‌های گونه‌های مختلف آویشن و تمام miRNAs شناخته شده موجود در پایگاه داده mirBase نشان دهنده وجود ۱۳۹ تا ۲۹۸ miRNAs احتمالی در گونه‌های مختلف بود.

در گونه *T. armeniacus*، miRNAs متعلق به ۵ خانواده ژنی شامل (miR167، miR164، miR156، miR160، miR172) یافت شدند. همچنین یافته‌ها نشان داد که تعداد miRNAs در مرحله بلاست از ۲۹۸ عدد به ۱۶ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه کاهش یافتند.

برای اکثر نمونه‌ها (به‌استثنای گونه *T. daenensis*)، بیش‌ترین مقدار N_{50} و بالاترین طول میانگین کانتیگ‌ها توسط نرم‌افزار Trinity تولید شد. از نظر تئوری، سرهم‌بندی‌های بهتر می‌بایست کانتیگ‌های طویل‌تر با ارزش N_{50} بالاتر داشته باشند. البته اهمیت پارامتر N_{50} هنوز مورد بحث بسیاری از محققین است، چرا که N_{50} بزرگ‌تر لزوماً به معنی تولید سرهم‌بندی بهتر نیست و ممکن است نشان‌دهنده‌ی کایمریسم^۱ (ادغام دو یا تعداد بیشتری ترانسکریپت در یک کانتیگ در طول سرهم‌بندی) بالاتر باشد، اما مطالعات قبلی نشان داده است که N_{50} بالاتر می‌تواند به‌طور مصنوعی منعکس‌کننده‌ی کیفیت بالای سرهم‌بندی باشد. در تفسیر نتایج سرهم‌بندی، هم‌ردیفی بیش از ۹۱ درصد خوانش‌ها به ترانسکریپتوم مرجع نشان‌دهنده‌ی کیفیت مطلوب ترانسکریپتوم‌های حاصل از سرهم‌بندی است.

به علت وجود مشکلات و خطاهای مختلف در زمینه‌ی سرهم‌بندی که به دلایل مختلفی از جمله، تکه‌تکه بودن خوانش‌ها، و حضور ایزوفرم‌ها رخ می‌دهد، در مطالعات مختلف، بر اساس نوع هدف و گونه یا جنس گیاه مورد مطالعه، سرهم‌بندی به‌دست‌آمده توسط یکی از این نرم‌افزارهای موجود انتخاب می‌شود. در این مطالعه چنین به نظر می‌رسد که نتایج نرم‌افزار

جدول ۲. نتایج حاصل از Trinity و rnaSPades

ابزارها	اندازه‌ی Kmer	گونه‌ها	شمار کانتیگ‌ها	طول میانگین (bp)	حداقل طول (bp)	حداکثر طول (bp)	مجموع بازها
Trinity	25	<i>T. armeniacus</i>	126163	1011.870358	201	20222	127660600
		<i>T. daenensis</i>	89972	708.6183924	201	14381	63755814
		<i>T. daenensis_M</i>	131657	942.9280023	201	12209	124143072
		<i>T. lancifolius</i>	129683	689.8232922	201	11739	89458354
		<i>T. persicus</i>	85078	798.4041938	201	12221	67926632
		<i>T. pubescens</i>	85867	699.796243	201	11713	60089404
		<i>T. vulgaris</i>	116275	683.4869834	201	12233	79472449
rnaSPades	25	<i>T. armeniacus</i>					
		<i>T. daenensis</i>	108630	740.4439658	49	14853	80434428
		<i>T. daenensis_M</i>	108630	740.4439658	49	14853	80434428
		<i>T. lancifolius</i>	80601	609.0374561	79	39310	49089028
		<i>T. persicus</i>	59134	720.6155849	188	20536	42612882
		<i>T. pubescens</i>	57835	645.8514394	84	13832	37352818
		<i>T. vulgaris</i>	72874	618.8600598	74	12663	45098808

دیگر از miRNAs همانند mir172 فقط در ۱ گونه شناسایی شدند.

جدول ۳. کلی نتایج حاصل از آنالیز miRNAs بدست آمده در مسیر ترپنئیدها

نام میکرو. آران. ای	گونه‌ی هدف	مسیر شناسایی شده
miR12112	<i>T. daenensis</i>	DXR
miR12112	<i>T. daenensis</i>	ISPG
miR12112	<i>T. daenensis_M</i>	DXR
miR12112	<i>T. lancifolius</i>	DXR
miR12112	<i>T. lancifolius</i>	GDS
miR12112	<i>T. lancifolius</i>	ISPH
miR12112	<i>T. vulgar</i>	DXR
miR12112	<i>T. vulgar</i>	DXS
miR171	<i>T. daenensis</i>	DXS
miR171	<i>T. daenensis_M</i>	DXS
miR171	<i>T. lancifolius</i>	DXS
miR159	<i>T. daenensis_M</i>	DXS
miR159	<i>T. daenensis_M</i>	GGPPS
miR159	<i>T. vulgar</i>	DXS
miR159	<i>T. vulgar</i>	GGPPS
miR160	<i>T. daenensis</i>	ISPG
miR160	<i>T. daenensis</i>	GGPPS
miR160	<i>T. pubescense</i>	ISPG
miR160	<i>T. pubescense</i>	GGPPS
miR160	<i>T. pubescense</i>	DXS
miR408	<i>T. persicus</i>	ISPF
miR408	<i>T. lancifolius</i>	IDL
miR172	<i>T. armeniacus</i>	ISPF
miR172	<i>T. armeniacus</i>	ISPD
miR172	<i>T. armeniacus</i>	DXR
miR164	<i>T. daenensis_M</i>	ISPG
miR397	<i>T. daenensis_M</i>	GDS
miR397	<i>T. daenensis_M</i>	DXS
miR397	<i>T. daenensis_M</i>	ISPH
miR169	<i>T. daenensis_M</i>	GDS
miR169	<i>T. daenensis_M</i>	ISPH
miR399	<i>T. daenensis_M</i>	GDS
miR396	<i>T. persicus</i>	GGPPS
miR396	<i>T. persicus</i>	DXS
miR396	<i>T. persicus</i>	DXR
miR11604	<i>T. vulgar</i>	ISPD
miR11604	<i>T. vulgar</i>	CML
miR395	<i>T. vulgar</i>	CML

بررسی درخت فیلوژنتیکی

با توجه به نتایج حاصل از نرم افزار RaxML، بیشترین فاصله بین miR12112 با miR169 و miR399 بود. کمترین اختلاف تبارزایی متعلق به miR12112 متعلق به گونه‌های *T. vulgar*، *T. daenensis* بودند که البته اختلاف قابل توجهی نسبت به miR12112 موجود در گونه *T. lancifolius* نشان داد. همچنین miR159 از گونه‌ی *T. vulgar* با miR397 از گونه *T. danensis* نیز شباهت بالایی نشان داد.

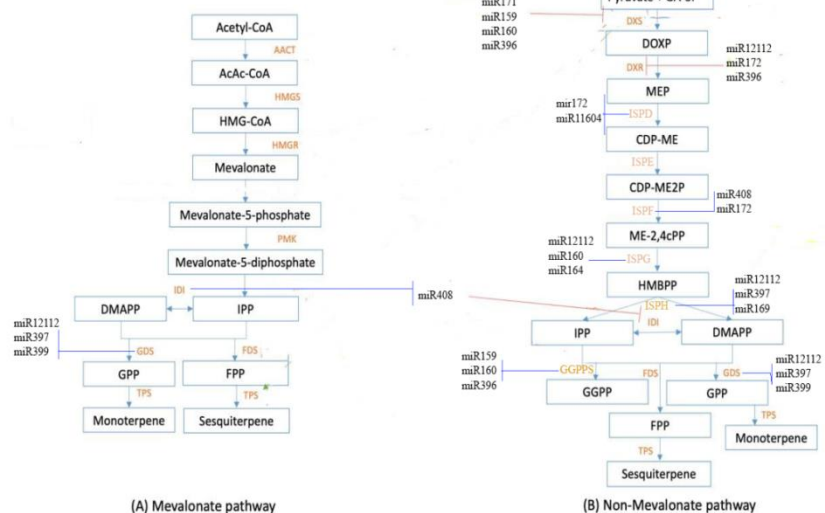
عامل اصلی این تغییرات حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE)، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده (AMFE) و میزان شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) هستند. در گونه *T. daenensis*، تعداد miRNAs از ۱۶۱ عدد به ۴ عدد در مرحله گزینش ساختار مناسب ساقه-حلقه کاهش یافت که این ۴ miRNAs متعلق به ۳ خانواده (miR171، miR160 و miR12112) بودند. در گونه *T. daenensis_M* تعداد miRNAs از ۲۸۳ عدد در مرحله بلاست به ۱۳ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه کاهش یافت که شامل ۸ خانواده مختلف (miR397، miR171، miR169، miR164، miR159، miR160، miR399 و miR12112) بودند. در گونه *T. lancifolius* تعداد miRNAs از ۱۹۴ عدد در مرحله بلاست به ۱۰ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه رسید که شامل ۵ خانواده (miR399، miR408، miR171، miR156، miR12112) بود. در گونه *T. persicus* تعداد miRNAs از ۱۵۵ عدد در مرحله بلاست به ۳ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه تقلیل یافت که شامل ۳ خانواده (miR408، miR394، miR396) بودند. در گونه *T. pubescense*، miRNAs متعلق به ۲ خانواده ژنی شامل (miR160، miR156) یافت شدند. همچنین یافته‌ها نشان داد که تعداد miRNAs در مرحله بلاست از ۱۳۹ به ۴ عدد در مرحله گزینش ساختار ثانویه کاهش یافت. و در نهایت در گونه *T. vulgar*، miRNAs متعلق به ۷ خانواده (miR160، miR156، miR159، miR11604، miR12112، miR395، miR408) یافت شدند. تعداد miRNAs در این گونه در مرحله بلاست ۱۷۳ و در بررسی ساختار ثانویه ۱۴ عدد بود.

نتایج حاصل از psRNA target

در مرحله آخر ژن‌های هدف تمام miRNAs پیشنهادی که ساختار ساقه-حلقه مناسب داشتند با کمک نرم‌افزار psRNA target در برابر توالی ژن‌های شناسایی شده مسیر ترپن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. به طور کلی ۱۴ miRNAs از خانواده‌های مختلف در ۶ گونه آویشن در مسیر سنتز ترپن‌ها یافت شدند.

اطلاعات نشان داد برخی از miRNAs شناسایی شده مانند miR159، miR408، miR171، miR12112 و miR160 در چندین گونه مشترک است در حالی که برخی

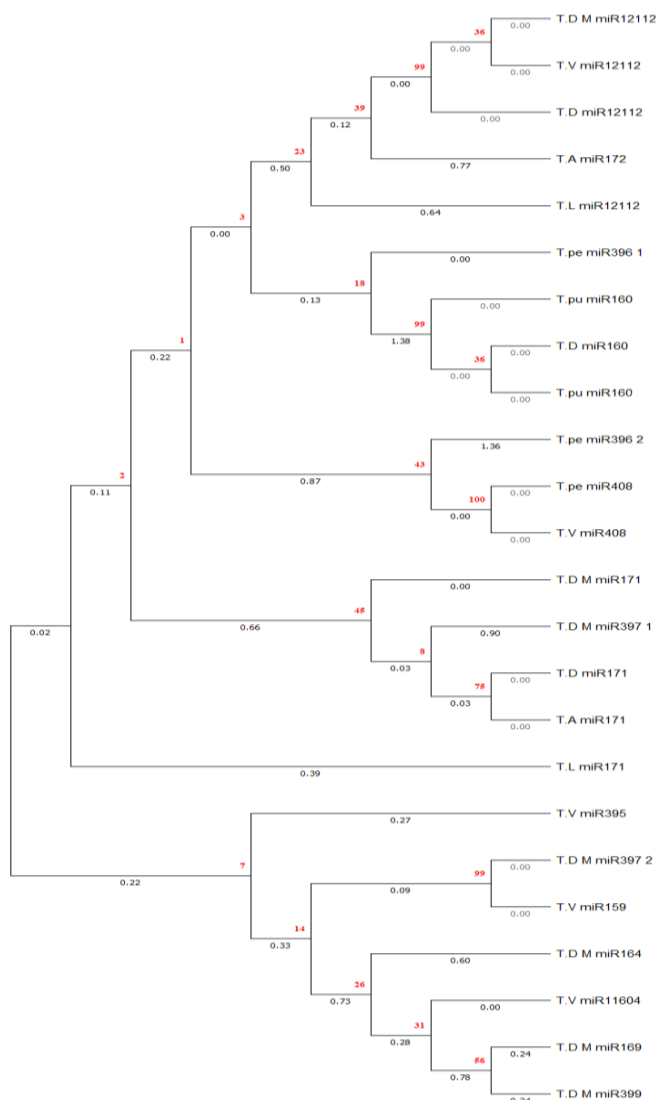
Involvement of miRNAs in Terpenoid Biosynthesis



(A) Mevalonate pathway

(B) Non-Mevalonate pathway

شکل ۱. miRNAs شناسایی شده در مسیرهای بیوسنتزی ترپن‌ها. ژن‌های هدف به رنگ قرمز و miRNAs کاندید شناسایی شده برای هر ژن به رنگ مشکی در مقابل نام ژن ذکر شده است



شکل ۲. درخت تبارزایی miRNAs شناسایی شده در مسیر ترپن‌ها به روش حداکثر احتمال با استفاده از ابزار RaxML

گونه‌های مختلف آویشن، کنترل کیفیت آن‌ها با ابزار FastQC، و سرهمبندی با استفاده از Trinity، شناسایی miRNAs انجام شد. در مراحل بعدی blastn بین داده‌های ترانسکریپتومی و تمام miRNAs بالغ شناسایی شده موجود در سایت miRBase انجام شد. در مراحل بعدی ساختار ثانویه به منظور انتخاب و شناسایی ساختار ساقه-حلقه miRNAs به کمک ابزارهای UNAFold، SUMirFind و SUMirFold انجام شد که منجر به شناسایی miRNAs گیاه آویشن شد. در این پژوهش علاوه بر شناسایی miRNAs مختلف، سنجشی برای دخیل بودن miRNAs در مسیرهای سنتزی شناسایی شده‌ی ترپین‌ها به کمک ابزار psRNAtarget صورت گرفت. نتایج نشان داد که ۱۴ miRNAs از خانواده‌های ژنی مختلف در مسیرهای سنتزی ترپین‌ها نقش دارند. همچنین تعدادی از miRNAs شناسایی شده در گونه‌های مختلف باهم مشترک بوده‌اند. بعد از انجام آنالیزهای مورد هدف این مطالعه برای درک و شناسایی روابط تبارزایی بین miRNAs شناسایی شده در گونه‌های مختلف آویشن دخیل در مسیرهای سنتزی ترپین‌ها درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد.

References

- Alptekin, B., Akpınar, B. A., & Budak, H. (2017). A comprehensive prescription for plant miRNA identification. *Frontiers in plant science*, 7, 2058.
- Aparicio-Puerta, E., Gómez-Martín, C., Giannoukakos, S., Medina, J. M., Marchal, J. A., & Hackenberg, M. (2020). mirnaQC: a webserver for comparative quality control of miRNA-seq data. *Nucleic acids research*, 48(W1), W262-W267.
- Arora, S., Rana, R., Chhabra, A., Jaiswal, A., & Rani, V. (2013). miRNA-transcription factor interactions: a combinatorial regulation of gene expression. *Molecular genetics and genomics*, 288, 77-87. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00438-013-0734-z>
- 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.
- Badapanda, C., & Rathore, A. (2018). Discovering microRNAs and their targets in the red flour beetle *Tribolium castaneum* from expressed sequence tags. *Meta Gene*, 17, 61-67.

به طور کلی نتایج حاصل را می‌توان به ۵ زیرگروه تقسیم کرد: گروه اول شامل؛ miR1212 متعلق به گونه‌های *T. daenensis* و همچنین miR172 متعلق به گونه‌ی *T. vulgaris* است که اختلاف جزئی با miR12112 *T. armeniacus* گونه‌های *T. daenensis* و *T. vulgaris* نشان می‌دهد. همچنین miR12112 متعلق به گونه *T. lancifolius* در این گروه قرار دارد که همانطور که ذکر شد با دوگونه باغی و دنیایی اختلاف معنی‌داری دارد. در گروه دوم مشخص شد که miR396_1 متعلق به آویشن ایرانی بیشترین شباهت را به miR160 موجود در سایر گونه‌ها دارد. نکته حائز اهمیت این است که miR396_2 متعلق به آویشن ایرانی بیشتر شبیه به miR408 موجود در سایر گونه‌ها است.

نتیجه‌گیری

هدف اولیه این پژوهش شناسایی miRNAs موجود در گونه‌های مختلف آویشن بومی ایران با کمک اطلاعات ترانسکریپتومی موجود بود. لذا در این مطالعه بعد از جمع‌آوری اطلاعات اولیه ترانسکریپتومی

- Barik, S., SarkarDas, S., Singh, A., Gautam, V., Kumar, P., Majee, M., & Sarkar, A. K. (2014). Phylogenetic analysis reveals conservation and diversification of micro RNA166 genes among diverse plant species. *Genomics*, 103(1), 114-121.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297.
- Behnia, M., Haghghi, A., Komeylizadeh, H., Tabaei, S.-J. S., & Abadi, A. (2008). Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. *The Korean journal of parasitology*, 46(3), 153.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., & Meiri, E. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics*, 37-770-766,(7).
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Braga, P. C., Culici, M., Alfieri, M., & Dal Sasso, M. (2008). Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 31(5), 472-477.
- Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis

- server (2017 release). *Nucleic acids research*, 46(W1), W49-W54.
- Davison, T. S., Johnson, C. D., & Andruss, B. F. (2006). [2] Analyzing Micro-RNA Expression Using Microarrays. *Methods in enzymology*, 411, 14-34.
- Gou, J.-Y., Felippes, F. F., Liu, C.-J., Weigel, D., & Wang, J.-W. (2011). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor. *The Plant Cell*, 23(4), 1512-1522.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., & Zeng, Q. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29(7), 644-652.
- Hummelbrunner, L. A., & Isman, M. B. (2001). Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 49(2), 715-720.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19 (8-10), 603-608.
- 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.
- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science*, 299(5612), 1540-1540.
- Millar, A. A., & Waterhouse, P. M. (2005). Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Functional & integrative genomics*, 5, 129-135.
- Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. *Thyme: the genus Thymus*, 1, 1-43.
- Njaci, I., Williams, B., Castillo-González, C., Dickman, M. B., Zhang, X., & Mundree, S. (2018). Genome-wide investigation of the role of microRNAs in desiccation tolerance in the resurrection grass *Triposgon loliiformis*. *Plants*, 7(3), 68.
- ÖZGÜVEN, M., & Tansi, S. (1998). Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. *Turkish journal of agriculture and forestry*, 22(6), 537-542.
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425(6955), 257-263.
- Pegler, J. L., Oultram, J. M. J., Grof, C. P. L., & Eamens, A. L. (2019). Profiling the Abiotic Stress Responsive microRNA Landscape of Arabidopsis thaliana. *Plants (Basel)*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/plants8030058>
- Quinlan, A. R. (2014). BEDTools: the Swiss-army tool for genome feature analysis. *Current protocols in bioinformatics*, 47(1), 11.12. 11-34.11.12.
- Roselló, J. A. E. (1981). Cytotaxonomic and evolutionary studies in "Thymus" ("Labiatae"): relationships of the members of section "Thymus" Jalas. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*.
- Sedy, K., & Koschier, E. (2003). Bioactivity of carvacrol and thymol against *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci*. *Journal of Applied Entomology*, 127(6), 313-316.
- Singh, N., Srivastava, S., & Sharma, A. (2016). Identification and analysis of miRNAs and their targets in ginger using bioinformatics approach. *Gene*, 575(2), 570-576.
- Soorni, A., Borna, T., Alemardan, A., Chakrabarti, M., Hunt, A. G., & Bombarely, A. (2019). Transcriptome landscape variation in the genus *Thymus*. *Genes*, 10(8), 620.
- Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. Elsevier.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(11), 1231-1243.
- 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, Y., Yun, Z., Gong, L., Qu, H., Duan, X., Jiang, Y., & Zhu, H. (2018). Comparison of miRNA evolution and function in plants and animals. *Microrna*, 7(1), 4-10.
- Zhao, S., Wang, X., Yan, X., Guo, L., Mi, X., Xu, Q., Zhu, J., Wu, A., Liu, L., & Wei, C. (2018). Revealing of microRNA involved regulatory gene networks on terpenoid biosynthesis in *Camellia sinensis* in different growing time points. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 66(47), 12604-12616.