

## «مقاله پژوهشی»

شناسایی microRNA و ژن‌های هدف مرتبط در گیاه دارویی *Trachyspermum ammi* L.علیرضا پی‌ریز<sup>۱</sup>، لیلا نژادصادقی<sup>۲\*</sup>، داریوش نباتی‌احمدی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳. دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۶)

Identification of miRNAs and their target genes in *Trachyspermum ammi*Alireza Payriz<sup>1</sup>, Leila Nejadsadeghi<sup>2\*</sup>, Daryoosh Nabati Ahmadi<sup>3</sup>

1. M. Sc. Student of Plant Breeding, Production Engineering and Plant Genetic Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Assistant Professor, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3. Associate Professor, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Received: Dec. 18, 2021 - Accepted: Mar. 17, 2022)

## Abstract

MicroRNAs are main groups of small, non-coding molecules that regulate gene expression in animals and plants. *Ajwain (Trachyspermum ammi)* is plants known for their medicinal properties. To date, no miRNAs have been identified in *T. ammi*. Therefore, in the present study, a computational approach based on homology search through Blastx algorithm against mirbase database was used to predict miRNA and their target genes. The parameters of GC percentage, minimum folding free energy, minimum folding free energy index and secondary structure were determined and the sequences of miRNA precursor candidate were identified. In order to investigate the expression of selected genes using Real time PCR, an experiment was performed in a completely randomized design on the *ajwain Arak ecotype* at three levels of 0, 12 and 24 hours after methyl jasmonate application. A total of nine miRNAs including miR156, miR160, miR166, miR168, miR171, miR172, miR396, miR477 and miR827 were identified. It was estimated that they regulate 931 of *T. ammi* genes, which belong to several gene families with different biological functions. Jasmonate and its derivatives are plant signaling molecules. Therefore, miR160 and miR166 expression was evaluated by Real time PCR technique. The results showed that pri-miR160 and pri-miR166 was up-regulated in response to methyl jasmonate treatment, that indicated pri-miR160 and pri-miR166 were associated with hormone transfer.

**Keywords:** Methyl jasmonate, microRNA, *Trachyspermum ammi*, Transcriptome.

E-mail: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir

## چکیده

microRNA (میکروارنا)، دسته‌ای از مولکول‌های کوچک و غیر کد کننده بوده که بیان ژن را در حیوانات و گیاهان تنظیم می‌کند. *زنیان (Trachyspermum ammi)*، گیاه شناخته شده‌ای از نظر خواص دارویی می‌باشد. تاکنون گزارشی از شناسایی میکروارنا برای گیاه دارویی *زنیان* در پایگاه داده mirbase ثبت نشده است. از این رو در مطالعه حاضر به منظور پیش‌بینی میکروارنا و ژن‌های هدف، از رویکرد محاسباتی مبتنی بر جستجوی همسانی از طریق الگوریتم Blastx در برابر پایگاه داده mirbase استفاده شد. پارامترهای درصد باز GC، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی، شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی و ساختار ثانویه صورت گرفت و توالی‌های کاندید پیش‌ساز میکروارنا شناسایی شدند. به منظور بررسی بیان ژن‌های منتخب با استفاده از Real time PCR یک آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلدان روی اکوتیپ *اراک زنیان* در سه سطح صفر، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال متیل جاسمونات صورت گرفت. در مجموع تعداد نه میکروارنای miR156، miR160، miR166، miR168، miR171، miR172، miR396، miR477 و miR827 شناسایی شد. نتایج تخمینی نشان داد که آنها ۹۳۱ ژن متعلق به چندین خانواده ژنی با عملکردهای بیولوژیکی متفاوت در *زنیان* را تنظیم می‌کنند. جاسمونات و مشتقات آن مولکول‌های سیگنال دهنده گیاهی هستند. از این رو، بیان miR160 و miR166 با تکنیک Real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که pri-miR160 و pri-miR166 در پاسخ به تیمار متیل جاسمونات افزایش پیدا می‌کنند. این موضوع نشان می‌دهد که pri-miR160 و pri-miR166 با انتقال هورمون مرتبط است.

**واژه‌های کلیدی:** ترنسکرپتوم، *زنیان*، متیل جاسمونات، میکروارنا.

\* نویسنده مسئول: لیلا نژادصادقی

### مقدمه

گیاه دارویی زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* گیاهی علفی و یک‌ساله از تیره چتریان (Apiaceae) است. میوه زنیان، کوچک و تخم‌مرغی شکل به رنگ زرد تیره بوده و بوی معطر اسانس تیمول دارد. اندام دارویی این گیاه را میوه یا به عبارتی بذر آن تشکیل می‌دهد (Hedge and Lamond, 1987). میوه این گیاه دارای دو تا نه درصد اسانس بوده که نزدیک به ۶۰ درصد اسانس را مونوترپن تیمول و مابقی آن را مونوترپن‌های گاماترپین، پاراسیمن، و کارواکرول تشکیل می‌دهد. سه ماده اصلی ترکیب اسانس حاصل از عصاره زنیان تیمول، گاماترپین و پاراسیمن که بیش از ۸۵ درصد اسانس را به خود اختصاص می‌دهند (Zarshenas et al., 2014). این گیاه بومی آسیاست و در کشور ایران به‌طور خودرو می‌روید (Akbarinia et al., 2005). دامنه انتشار و محل رویش این گیاه در ایران شامل استان‌های سیستان و بلوچستان، آذربایجان، اصفهان، خوزستان، یزد، فارس، کرمان و خراسان است (Hedge and Lamond, 1987). اسانس موجود در میوه گیاه زنیان دارای خواص دارویی گوناگونی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی، ضد درد، ضد فشارخون، ضد اسپاسم، ضد سرفه، ضد انگل و ضد کرم می‌باشد (Mirzahosseini et al., 2017). زنیان به‌صورت خوراکی به‌عنوان ضد درد، ضد آسم، ضد تهوع و خلط‌آور و به‌صورت موضعی در درمان دردهای روماتیسمی استفاده می‌شود (Haghiroalsadat et al., 2012).

متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌دلیل نقش دفاعی آنها در برابر آفات، حشرات با اهمیت هستند. این مواد از نظر فواید دارویی شناخته شده هستند. با توجه به اهمیت بی‌نظیر این مواد شیمیایی، درک نحوه تنظیم مسیر بیوسنتز آنها بسیار مهم است. در گذشته‌ی نه چندان دور، پیشرفت در فن‌آوری‌های مولکولی ما را قادر به درک بهتر مسیرهای بیوسنتزی ژن‌های

درگیر تولید ترکیبات ثانویه مختلف کرده است (Ncube et al., 2015).

میکروارناهای بالغ مولکول‌های RNA غیر کد کننده کوچکی با طول ۲۰ تا ۲۲ نوکلئوتید هستند که از طریق برش رونوشت‌های هدف حاوی توالی‌های مکمل، باعث خاموش یا سرکوب شدن ژن پس از رونویسی می‌شوند. آنها توانایی تنظیم بیان ژن را در سطح پس از رونویسی دارند (Li et al., 2010). با وجود دانش موجود از نقش تنظیمی میکروارناها، دخالت آنها در تنظیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی هنوز بخوبی درک نشده است. کارایی به‌کارگیری روش‌های بیوانفورماتیکی برای شناسایی میکروارناها در سایر گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است (Wang et al., 2012). بر پایه مطالعات یو و همکاران (۲۰۱۵)، فاکتور رونویسی SPL9، هدف mir156 مستقیماً به پروموتور ژن ترپن سنتز ۲۱ (TPS21) متصل شده و رونویسی آن را به‌طور مثبت تنظیم می‌کند و بدین ترتیب منجر به تنظیم مثبت سنتز سسکوئی‌ترپنوئید می‌شود (Yu et al., 2015). در گیاه *Picrorhiza kurroa*، miR-4995 تنظیم آنزیم ۳-deoxy-7-phosphoheptulonate سنتز را که در مسیر بیوسنتز پیکروساید نقش دارد، مورد هدف قرار می‌دهد (Vashisht et al., 2015). افزون بر این، سیفی و همکاران (۲۰۱۵)، یازده میکروارنا را که در مسیر بیوسنتز استیویل گلیکوزید نقش دارند را در گیاه استویا استخراج و ارتباط آنها را با سطح بیان mRNA هدف آنها و همچنین محتوای استیویل گلیکوزید اعتبارسنجی کردند (Saifi et al., 2015). با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل جدید، چندین میکروارنا درگیر در مسیر بیوسنتز سسکوئی‌ترپنوئید در گیاه زردینه (X. strumarium) شناسایی شده‌اند. به‌عنوان مثال نقش miR7539، miR5021 و miR1134 در هدف قراردادی mRNA آنزیم بالادستی در مسیرهای بیوسنتز ترپنوئید، از جمله ۱-دئوکسی-D-زیلوز ۵-فسفات سنتز (DXS)، ۳-هیدروکسی-۳-متیل

بافر TRIzol® Reagent شرکت invitrogen آمریکا طبق پروتوکل کشور سازنده استفاده گردید. بررسی کیفیت و غلظت RNA به روش اسپکتروفتومتری انجام گردید. در ابتدا با ۱۰۰ میکرولیتر از آب مقطر، طول موج‌های A<sub>280</sub> و A<sub>260</sub> صفر شده که نشان می‌دهد دستگاه کالیبره شده است. سپس نمونه‌ها به نسبت ۹۸ میکرولیتر آب و ۲ میکرولیتر از RNA در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ مورد آزمایش قرار گرفتند. توالی miRNAها با روش Stem-Loop تبدیل به cDNA گردید که از محصول cDNA برای تعیین میزان بیان miRNAها با استفاده از Quantitative Real-time PCR استفاده گردید.

#### گردآوری داده‌ها

در این پژوهش، از داده خام گل آذین گیاه زنیان اکوتیپ اراک با کد دسترسی پروژه PRJNA362991، آزمایش SRX2454474 و کد اجرای SRR5137050 از پایگاه داده SRA سایت NCBI استفاده شد (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**کیفیت سنجی، پیرایش و سرهم‌بندی داده‌ها**  
به‌منظور بررسی کیفیت قرائت توالی‌های اولیه ابتدا نرم افزار FastQC از طریق فرمان *conda install bioconda fastqc* دانلود و نصب و سپس تحت محیط لینوکس استفاده شد (Andrews et al., 2010). به‌منظور حذف آداپتورها، توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین phred Score کمتر از ۳۰) و توالی‌های با میزان بالای نوکلئوتید مبهم (N) از نرم افزار Trimmomatic-0.36 تحت لینوکس استفاده شد (Bolger et al., 2014). کلیه آنالیزها از طریق وصل شدن برنامه AnyDesk به سرور ابری تحت سیستم لینوکس با مشخصات ۱۲ عدد هسته، حجم حافظه ۲۰ گیگابایت و حجم دیسک ۱۴۰ گیگابایت

گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMGR)، ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP)/دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) سنتاز (IDS) و ایزوپنتنیل دی فسفات ایزومراز (IDI) پیش‌بینی شده است (Fan et al., 2015). از روش‌های بیوانفورماتیک برای پیش‌بینی میکروارنای درگیر در متابولیسم ترپنوئید در گیاه نعنای استفاده شده است (Singh et al., 2016).

باتوجه به در دسترس نبودن ژنوم گیاه زنیان و نبود هیچ‌گونه اطلاعاتی درمورد میکروارنای این گیاه، این مطالعه، اولین بررسی این‌سیلیکو از جایگاه شناسایی میکروارنای حافظت شده از طریق جستجو در داده‌های ترنسکرپتومی گیاه زنیان می‌باشد و می‌تواند برای تحقیقات آینده بر روی این گیاه ارزشمند مفید باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### کشت گیاه زنیان

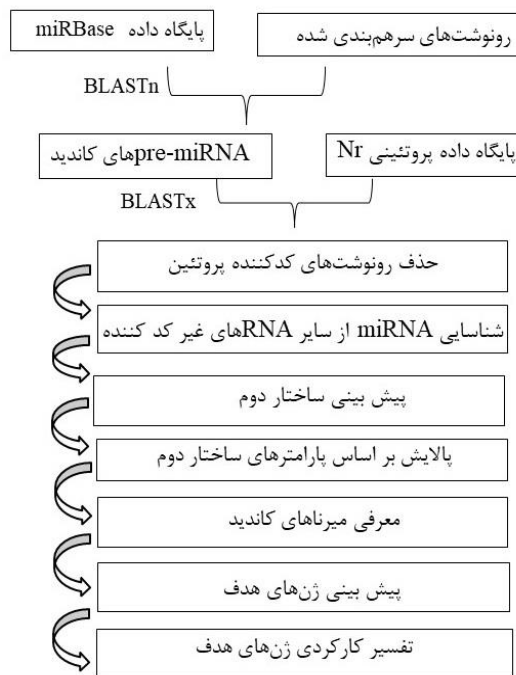
برای انجام این پژوهش بذر گیاه دارویی زنیان اکوتیپ اراک از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذر در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در خردادماه ۱۴۰۰ به‌عنوان کشت تابستانه در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلدان کشت شدند. غلظت ۱۰۰ میکرومولار هورمون متیل جاسمونات بر روی گیاه پاشیده و ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، نمونه‌برداری از بافت گل آذین انجام گردید.

افت خاک، شنی رسی لومی و EC آن ۲/۵ دسی زیمنس و pH حدود ۸/۵ بود. تمامی مراحل کشت، نگه‌داری و پرورش گیاهان در شرایط کنترل گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفت. آبیاری بر اساس نیاز گیاه انجام شد.

##### استخراج RNA و ساخت رشته cDNA

جهت لیز کردن دیواره سلولی و استخراج RNA از

miRNA در یک جدول نمایش داده شده است که هر ردیف مربوط به یک pre-miRNA و هر ستون مربوط به یک ویژگی خاص است. در شکل ۱ نمای شماتیک از مراحل کار نشان داده شده است.



شکل ۱. نمای شماتیک مراحل کار شناسایی میکروارنا و ژن‌های هدف در گیاه زینان

### پیش‌بینی ساختار ثانویه میکروارناها

ساختارهای ثانویه پیش‌ساز میکروارناها از طریق RNAlfold برآورد شد تا صحت میکروارناهای شناسایی شده بررسی گردد. شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) کم‌تر از  $0/6$  - کیلوکالری بر مول و تعداد نوکلئوتید اشتباه حداکثر چهار عدد در نظر گرفته شد. ثبات دابلکس میکروارنا-میکروارنا\* توسط miRdup (<http://www.cs.mcgill.ca/~blanchem/>) (mirdup/Real Pre-) شناسایی میکروارناهای واقعی (miRNA-dis) توسط وب سرور miRNA (<http://bioinformatics.hitsz.edu.cn/miRNA-dis/>) مورد بررسی قرار گرفتند.

### پیش‌بینی ژن‌های هدف میکروارنا

واقع در مرکز پردازش سریع دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد. نرم افزار Trinity از طریق فرمان *conda install -c bioconda trinity* دانلود و نصب و سپس تحت محیط لینوکس توالی‌های پیرایش شده با در نظر گرفتن پارامترهای پیش فرض به روش *De novo* سرهم‌بندی شد (Haas et al., 2013).

### شناسایی میکروارناهای محافظت‌شده

پس از سرهم بندی نوپدید، شناسایی رونوشت‌های با بیشترین شباهت با میکروRNAهای محافظت‌شده از طریق همسانی توالی‌های مورد نظر با توالی میکروارناهای بالغ گیاهی (شامل ۸۸ گونه گیاهی مختلف) موجود در پایگاه mirbase (<http://www.mirbase.org>) از طریق BLASTn انجام شد. رونوشت‌های حاصل با استفاده از الگوریتم BLASTx (E-value کوچک‌تر یا مساوی  $0/001$ ) در برابر پایگاه داده پروتئین‌های غیر تکراری (Non-Redundant protein database, NR) هم‌ردیفی قرار گرفته و رونوشت‌های دارای نتیجه فیلتر شدند. به‌منظور شناسایی میکروارنا از دیگر میکروارناهای غیر کدکننده پروتئینی، پیش‌بینی ژن‌های tRNA با tRNAscan-SE و پیش‌بینی ژن‌های rRNA با rRNAmmer انجام شد و رونوشت‌های دارای نتیجه حذف شدند. توالی‌های نهایی با استفاده از وب سرور miRkwood (<http://bioinfo.cristal.univ-lille.fr/mirkwood>) مورد جستجو قرار گرفتند (Guigon et al., 2019). برای این منظور کیفیت پیش‌سازهای miRNA کاندید مورد ارزیابی قرار گرفت. معیار ۱: پایداری پیش‌ساز سنجاق‌سر این معیار زمانی برآورده می‌شود که MFEI سازه کوچکتر از  $0/8$  - باشد. معیار ۲: تعداد خوانش‌ها معیار ۳: وجود miRNA، معیار ۴: صحت پردازش پیش‌ساز، معیار ۵: وجود دابلکس \*miRNA:miRNA، معیار ۶: پایداری دابلکس. نتایج miRkwood به‌صورت یک صفحه وب ارائه می‌شود که در آن پیش‌سازهای

میکرولیتر پرایمر برگشت، ۱ میکرولیتر cDNA (۵ بار رقیق شده) و ۸ میکرولیتر ddH<sub>2</sub>O انجام شد. شرایط qPCR شامل دناتورسازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ثانیه بود. آزمایش در سه تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش مقایسه‌ای Ct استفاده شد.

mir160 و ژن هدف آن ARF17 و میکروارنای دیگر mir166 به همراه ژن هدف ARF6 مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از روش وارکونیه پرایمر رفت اختصاصی و پرایمر برگشت عمومی<sup>۲</sup> از روی miRNA بالغ و Stem-Loop متصل آن طراحی گردید (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007). بر این اساس سه نوع آغازگر برای بررسی بیان miRNAها طراحی گردید. این آغازگرها عبارتند از: آغازگر RT<sup>3</sup> SL در سنتز cDNA از miRNAها (جدول ۱)، آغازگر رفت و آغازگر عمومی برای تکثیر miRNAها (جدول ۲).

از ژن ۱۸s rRNA به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. آغازگرهای رفت و عمومی در جدول ۲ نشان داده شده است.

آغازگرهای طراحی شده رفت و برگشت ژنهای هدف در جدول ۳ نشان داده شده است. ژن SAND که به استناد مطالعات قبلی مرتبط با گیاه دارویی زنیان که به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شده است، به عنوان ژن رفرنس در نظر گرفته شد (Soltani *et al.*, 2018). کلیه معیارهای صحت طراحی آغازگر با استفاده از Primer 3 بررسی شدند.

به منظور پیش‌بینی ژنهای هدف میکروارناها با استفاده از وبسایت psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>)، توالی میکروارناهای شناسایی شده علیه رونوشت‌های گیاه *Arabidopsis thaliana* با در نظر گرفتن پارامترهای پیش‌فرض مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Dai and Zhao, 2011).

### مستندسازی و تفسیر کارکردی<sup>۱</sup> ژنهای هدف میکروارنا

پیش‌بینی عملکرد ژنهای هدف میکروارناها تحت BLASTX در برابر پایگاه داده NR انجام شد (Mir Drikvand *et al.*, 2019). هستی شناسی (Gene ontology) ژنهای هدف میکروارنا با استفاده از وب سرور g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler>) با در نظر گرفتن حد آستانه FDR کم‌تر از ۰/۰۱ انجام گردید (Reimand *et al.*, 2016).

### اعتبارسنجی با qRT PCR

تجزیه و تحلیل qRT PCR با استفاده از واکنش Real-time PCR از طریق دستگاه Corbett- RT 6000 انجام شد. به منظور الیسیتور از هورمون متیل‌جاسمونات استفاده شد. غلظت ۱۰۰ میکرومولار عامل هورمون متیل‌جاسمونات بر روی گیاه پاشیده شد. ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، نمونه‌برداری از بافت گل‌آذین هر بوته انجام گردید. شرایط بدون تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. qPCR در یک سیستم واکنش ۲۰ میکرولیتر با استفاده از TaKaRa SYBR® Green Permixon از ExTaq™ II حاوی ۱۰ میکرولیتر qPCR Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت، ۰/۵

2. Universal Reverse Primer  
3. Stem Loop-

1. Functional annotation

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای RT در میرناهای انتخاب شده

نام miRNA	RT آغازگرهای (۵' به ۳')
Mir160	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCGGCAT
Mir166	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGCGCGACTAGATC

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای رفت و برگشت عمومی miRNAها

نام miRNA	آغازگر رفت (۵' به ۳')
Mir160	CGATGCCTGGCTCCCTGT
Mir166	CACCCACTTTTCGACCCCTAAACTCGCTCCA
Universal reverse primer	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

جدول ۳. مشخصات آغازگرهای رفت و برگشت ژن‌های هدف

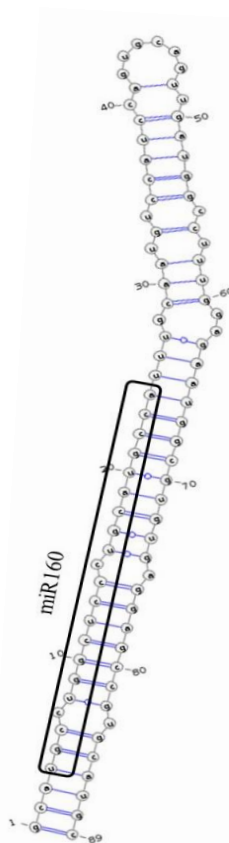
ژن هدف	آغازگر رفت (۵' به ۳')	آغازگر برگشت (۳' به ۵')
ARF17	CGAGGACATCTTCTCTCCACTG	CACGCTGATGAGTATTCTCGC
ARF6	CAAAGTTTAGCAGCTACCACGA	ACGTCGTTCTCTCGGTCACGAC
SAND	TTGTAAGCTGAGTCTGTAATCCATC	CCTAAAGTGACCAGAAACACAAG

## نتایج و بحث

### سرهم‌بندی نوپدید و شناسایی میکروارنا

پس از پیرایش خوانش‌های با کیفیت پایین و حذف توالی‌های آدپتور، در مجموع تعداد ۴۲۷۸۷۳۱۸ خوانش ۱۵۰ جفت بازی رفت و برگشت ذخیره و ۳۲۹۸۶۴۶ (۷/۱۶ درصد) خوانش حذف گردید. پس از پالایش کردن و حذف قرائت‌های بی‌کیفیت در مجموع، ۹۲/۸۴ درصد از خوانش‌های دوطرفه برای تجزیه و تحلیل بعدی در نظر گرفته شدند. خوانش‌های کوتاه با کیفیت به روش *De novo* توسط نرم افزار Trinity سرهم‌بندی شدند. در مجموع، ۴۰۵ یونی‌ژن از طریق جستجوی همسانی با میکروارناهای گیاهی کاندید شدند. از آنجا که اکثر میکروارناهای گیاهی محافظت شده هستند. شناسایی از طریق همسانی کمک موثری در پیدا کردن میکروارنا می‌باشد (Zhang et al., 2006a). پس از انجام BLASTx، توالی‌های کد کننده پروتئینی حذف شدند. بررسی ساختار ثانویه به منظور حذف نتایج مثبت کاذب در شناسایی میکروارناهای حفاظت شده بالقوه مورد استفاده قرار گرفت. از هم ردیفی پیش‌ساز میکروارنا با RNAlfold تنها ۱۰۲ توالی حائز شرایط لازم بود. در مرحله بعد پیش‌ساز میکروارناهای

با MFEI کمتر از ۰/۸- انتخاب شدند. بر اساس مطالعات پیشین بیش از ۹۶ درصد از پیش‌سازهای میکروارنای گیاهی دارای MFEI کمتر از ۰/۶- هستند (Bonnet et al., 2004). به منظور کاهش نتایج مثبت کاذب و افزایش دقت، توالی‌های با شاخص MFEI کمتر از ۰/۸- در نظر گرفته شدند از این رو در این مرحله تنها ۳۰ توالی حائز شرایط لازم بود و مابقی توالی‌ها حذف شدند. مکان میکروارنا بالغ حاصل از هم‌ردیفی با miRdup بررسی و ثبات دوبلکس در ۱۹ توالی تایید شد (جدول ۱). پس از حذف رونوشت‌های مشابه در مجموع، ۹ میکروارنا کاندید نهایی شد. نتایج ارزیابی توالی‌های کاندید توسط وب سرور miRNA-dis نشان داد که کلیه توالی‌های نهایی، پیش‌سازهای میکروارناهای واقعی هستند. شاخص MFEI در مطالعه حاضر در دامنه ۰/۸۰- تا ۰/۱۵- (کیلوکالری بر مول) با میانگین مقدار ۰/۹۸- بود (جدول ۱). از آنجا که میکروارناها نسبت به دیگر RNA غیر رمزگذار، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی کمتری دارند (Bonnet et al., 2004). مقادیر به دست آمده شاخص MFEI در مقایسه با tRNA (۰/۶۴-)، rRNA (۰/۵۹-) و mRNA (۰/۶۶-) کمتر بود (Zhang et



شکل ۲. توالی per-miRNA به همراه موقعیت miR160 بر روی آن به‌عنوان نمونه‌ای از بررسی ساختار ثانویه

(*al.*, 2006b) و نشان می‌دهد که پیش‌ساز میکروارناهای شناسایی شده به احتمال میکروارناهای واقعی هستند. دامنه طولی بین ۸۱ تا ۱۷۱ نوکلئوتید در پیش‌سازهای میکروارناهای شناسایی شده گیاه زنیان تعیین شد (جدول ۴). توزیع طول پیش‌ساز میکروارناهای مطالعه حاضر در مقایسه با توزیع طول پیش‌سازهای میکروارناهای گیاهان در مطالعات پیشین (Patanun *et al.*, 2013) مطابقت دارد.

پیش‌ساز میکروارناها در ساختار ثانویه دارای ساختار سنجاق سری هستند. محتوای AU نیز در پیش‌ساز میکروارناها در مقایسه با محتوای GC بالاتر بود که در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Dhandapani *et al.*, 2011). ساختار ثانویه میکروارناهای شناسایی شده با هشت معیار اجباری شناسایی میکروارنا در گیاهان (Axtell *et al.*, 2011) مطابقت داشت. در شکل ۲ نمونه‌ای از توالی per-miRNA به همراه موقعیت miRNA بر روی آن نشان داده شده است (شکل ۲).

جدول ۴. ویژگی میکروارناهای شناسایی شده در گیاه دارویی زنیان

نام میکروارنای بالغ	شماره ژن	qstart	qend	sstart	send	درصد GC	MFE (kcal/mol)	MFEI	AMFE
mi156d-3p	4096_c0_g3_i1	214	235	1	22	42.55	-46.1	-1.15	-49.04
miR160d	67671_c0_g1_i1	11	31	1	21	57.3	-48	-0.94	-53.93
miR166-3p	82152_c0_g1_i1	103	122	1	20	41.73	-59.3	-1.02	-42.66
miR168c-5p	19357_c0_g1_i1	170	190	21	1	43.44	-54.7	-1.03	-44.84
miR171a	46413_c0_g1_i1	122	142	21	1	40	-41.6	-0.99	-39.62
miR172	11985_c0_g1_i4	191	211	1	21	36.51	-49.2	-1.07	-39.05
miR396a	49537_c0_g1_i1	206	226	21	1	44.44	-28.9	-0.8	-35.68
miR477e-5p	65701_c0_g1_i1	1	19	3	21	39.36	-37.9	-1.02	-40.32
miR827	46748_c0_g1_i1	70	90	21	1	32.16	-55.8	-1.01	-32.63

MFE: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی؛ AMFE: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده؛ MFEI: شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی

جدول ۴. ویژگی میکروارناهای شناسایی شده در گیاه دارویی زنیان

نام میکروارنای بالغ	طول پیش‌ساز میکروارنا (bp)	طول میکروارنا (bp)	E value	توالی میکروارنای شناسایی شده
mi156d-3p	94	21	6.64E-05	5'GCUCUCUAUGCUUCUGUCAUCA3'
miR160d	89	21	0.000018	5'UGCCUGGCUCUCCUGCAUGCCA3'
miR166-3p	139	20	8.82E-05	5'AUUUCGGACCAGGCUUCAUU3'
miR168c-5p	122	21	1.86E-05	5'CCCGCCUUGCAUCAAUUGAAU3'
miR171a	105	20	1.93E-05	5'GGAUAUUGGUCCGGUCCAUAU3'
miR172	126	21	5.48E-05	5'AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU3'
miR396a	81	21	2.01E-05	5'CAGUUCAAGAAAGCCGUGGAA3'
miR477e-5p	94	19	0.000552	5'UCUCCUCAAGGGCUUCUG3'
miR827	171	21	4.37E-05	5'UGUUUGUUGAUGGUAUCUAA3'

MFE: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی؛ AMFE: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده؛ MFEI: شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی

## پیش‌بینی ژن هدف و چگونگی مهار آنها

بررسی ژن‌های هدف نه میکروارنای شناسایی شده نشان داد که در مجموع ۹۳۱ ژن توسط این میکروارنای بالقوه، تنظیم می‌شوند که متعلق به چندین خانواده ژنی با عملکردهای زیستی متفاوت هستند. نتایج نشان داد که ۷۶۶ ژن با عمل تخریب شدن (Cleavage) و ۱۶۵ ژن با عدم ترجمه تنظیم می‌شوند. تعداد ژن‌های هدف برای توالی‌های miR156، miR160، miR166، miR168، miR171، miR172، miR396، miR477 و miR827 به ترتیب ۱۰۷، ۴۴، ۱۳۰، ۵۴، ۱۱۲، ۱۲۳، ۸۰ و ۱۴۹ ژن بود (جدول ۵).

## هستی شناسی و تفسیر کارکردی ژن‌های هدف میکروارنا

تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژن‌های هدف در دسته عملکرد مولکولی در شکل ۳ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژن‌های هدف نشان داد که در دسته عملکرد مولکولی (Molecular Function)، گروه فعالیت فاکتور رونویسی متصل به DNA (GO:0003700) و فعالیت تنظیم‌کننده رونویسی (GO:0140110) بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. در دسته فرآیند زیستی (Biological Processes) به ترتیب گروه تنظیم فرآیند بیوسنتز RNA (GO:2001141)

و فرآیند بیوسنتزی RNA (GO:0032774) نسبت به سایر گروه‌ها بیشترین اهداف میکروارنای شناسایی شده را به خود اختصاص دادند. با توجه به نتایج هستی‌شناسی ژن‌های هدف، میکروارنای شناسایی شده در اغلب فرآیندهای زیستی و متابولیکی همچون تمایز، رشد و نمو، انتقال از مرحله رویشی به زایشی، انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، نقش مهمی ایفا می‌کنند.

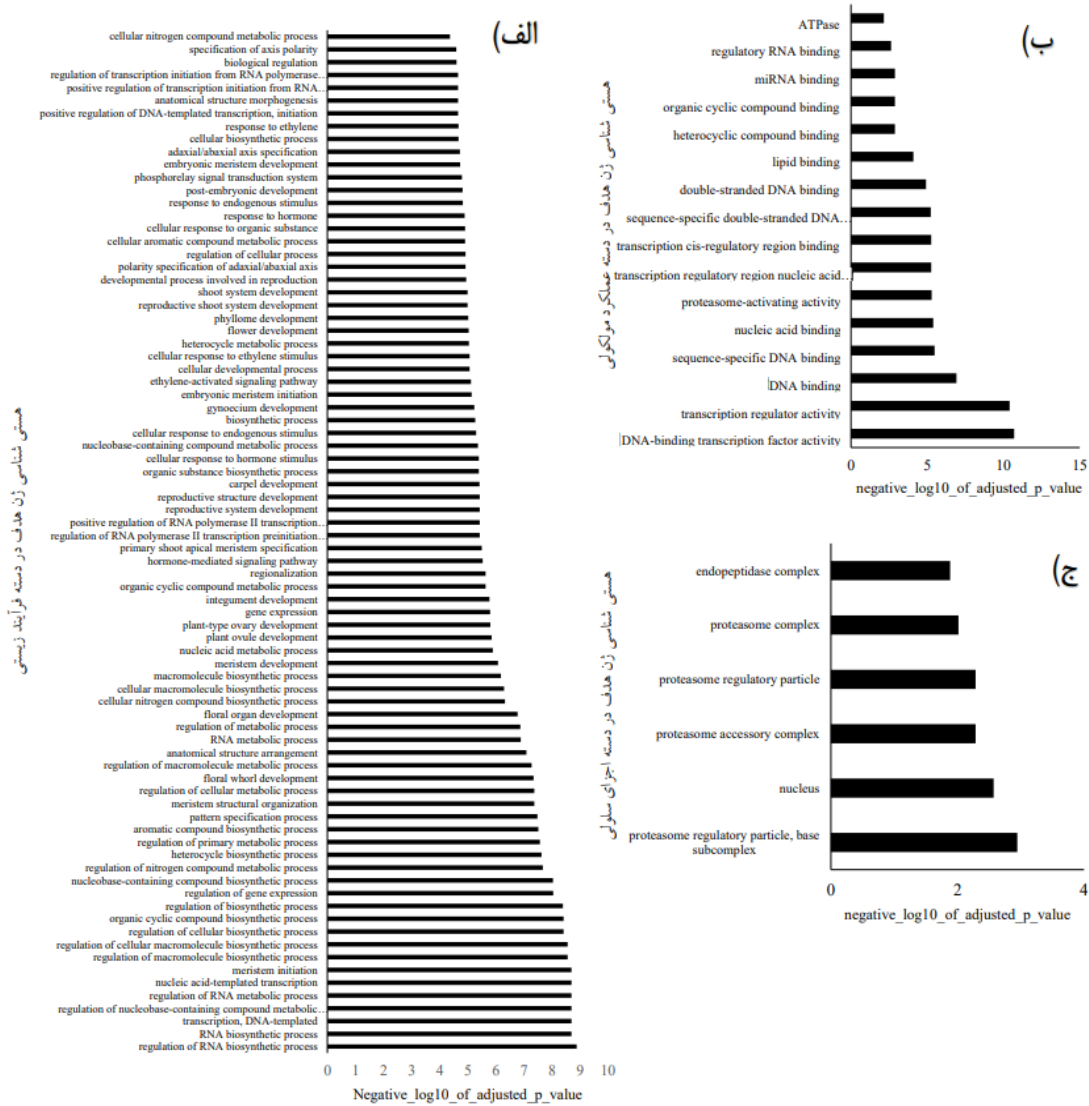
ژن‌های پاسخ‌دهنده اکسین مانند ARF10، ARF16 و ARF17 به‌عنوان ژن‌های هدف miR160 عمل می‌کنند که با تحقیقات گذشته که نشان دادند miR160-ARF10/16/17 به‌صورت یک پیوند مولکولی در افزایش طول هیپوکوتیل عمل می‌کند (Dai *et al.*, 2021) مطابقت دارد.

ژن‌های خانواده پروتئینی ZIP به‌عنوان ژن‌های هدف miR166 شناسایی شدند. miR166 یک خانواده بسیار حافظت شده از miRNA است که در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای سلولی و فیزیولوژیکی در گیاهان نقش دارد. خانواده miR166 به‌طور کلی شامل چندین عضو در گیاهان است که ممکن است عملکرد متفاوتی از خود نشان دهند (Li *et al.*, 2017). miR166 ژن‌های IIIHD-ZIP را در طیف گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی هدف قرار می‌دهند و ممکن است درجه بالایی از افزایش عملکرد را نشان دهند (Ko *et al.*, 2006).

جدول ۵. مشخصات ژن‌های هدف میکروارنای شناسایی شده

خانواده میکروارنا	شماره دسترسی ژن هدف	عمل میکروارنا	ژن هدف	عملکرد ژن هدف
miR156	AT1G31280.1	Cleavage	AGO2	Argonaute family protein
miR160	AT1G77850	Cleavage	ARF17	Auxin response factor 17
miR160	AT2G28350	Cleavage	ARF10	Auxin response factor 10
miR160	AT4G30080	Cleavage	ARF16	Auxin response factor 16
miR166	AT5G42910	Cleavage	bZIP	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein
miR166	AT1G30330	Cleavage	ARF6	Auxin response factor 6
miR171	AT2G37650	Cleavage	GRAS	GRAS family transcription factor
miR172	AT4G36920	Cleavage	AP2	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
miR396	AT3G57800	Cleavage	bHLH	Basic helix-loop-helix DNA-binding superfamily protein
miR396	AT5G38480	Cleavage	GRF3	Growth-Regulating Factor
miR477	AT1G03800	Translation	ERF10	ERF domain protein 10
miR827	AT3G54220	Cleavage	SCR	GRAS family transcription factor
miR827	At1G02860	Cleavage	NLA	Nitrogen limitation asaptation





شکل ۳. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژن‌های هدف شناسایی شده؛ الف) عملکرد مولکولی ب) فرآیند زیستی ج) ترکیبات سلولی

(2020).  
 miR156 ژن‌های خانواده SPL را کنترل می‌کنند (Li et al., 2020). خانواده ژنی PL (پروتئین SQUAMOSA متصل به پروتئین) نوعی فاکتور رونویسی در گیاه است که عملکرد مهمی برای رشد و نمو گیاه دارد، آنها انتقال فاز بین رویشی و تولیدمثل را کنترل می‌کنند، که در موفقیت باروری گیاه بسیار مهم است (Zhang et al., 2011). افزون بر این، رونوشت‌های SPL در هموستاز مس و پاسخ به سیگنالینگ GA (اسیدهای جیبرلین) نیز نقش دارند

میکروارنایهای دیگر، MiR172، ژن AP2 را هدف قرار داده و بیان آنها را کنترل می‌کنند که با تحقیقات گذشته مطابقت دارد (François et al., 2018). miR477 فاکتور رونویسی ERF را هدف قرار داده و بیان آنها را کنترل می‌کنند. خانواده فاکتورهای رونویسی ERF به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم چندین تنش غیر زنده معرفی شده و به هورمون‌های گوناگونی پاسخ می‌دهند. در مطالعات پیشین نشان داده شد که miR477 عامل رونویسی ERF را هدف قرار داده است (Jannesar et al.,

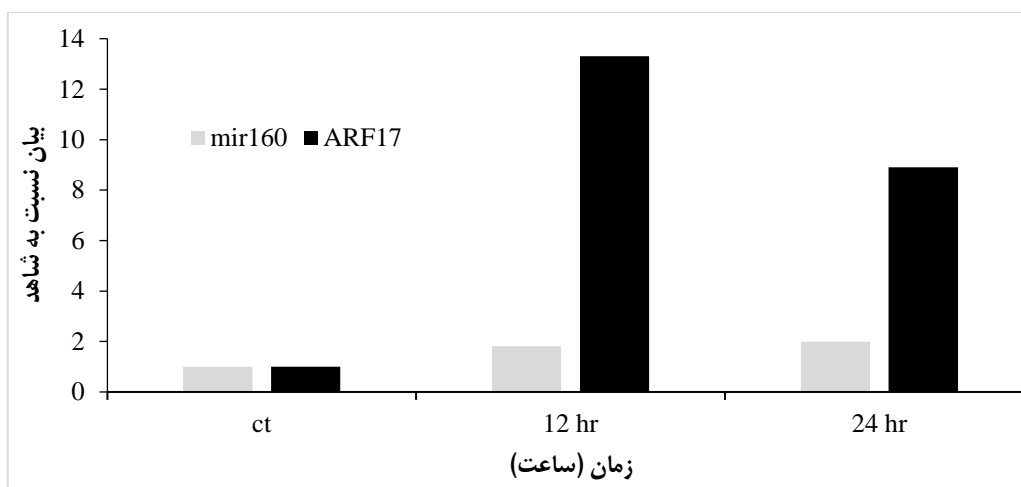
۵). عدم تطابق کلی می‌تواند به این دلیل باشد که میکروارناها علاوه بر تنظیم mRNAها، می‌توانند ترجمه اهداف mRNAهای خود را نیز مهار کنند. از سوی دیگر، میکروارناها ممکن است بیان mRNAها را در پاسخ به MeJA تنظیم کنند. با این حال، مطالعات بیشتری در آینده مورد نیاز خواهد بود.

اعضای خانواده miR160 به محرک‌هایی مانند نور، اسید آسبیزیک، اسید سالیسیلیک (SA) و استرس گرمایی پاسخ می‌دهند. pri-miR160 در پاسخ به SA کاهش، اما توسط تیمار اسید جیبرلیک، اتیلن و متیل جاسمونات افزایش پیدا می‌کند، این موضوع نشان می‌دهد که pri-miR160 با انتقال هورمون مرتبط است (Zhang, 2015).

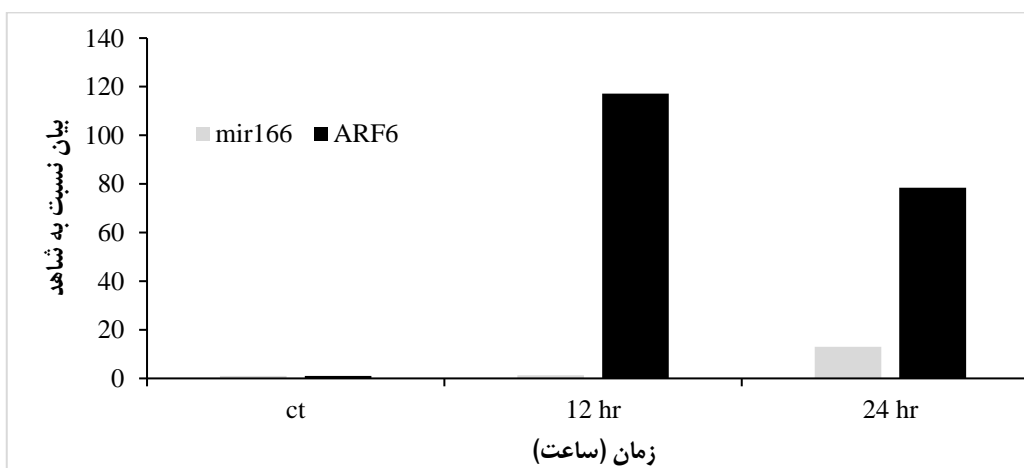
(Xing *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2007).

miR396 اهداف متعلق به خانواده عوامل رونویسی GRF (Growth-Regulating Factor) را تنظیم می‌کند. miR827 به‌عنوان تنظیم‌کننده ژن هدف NLA عمل می‌کند. ژن هدف NLA، یک آنزیم E3 یوبیکوتین لیگاز را رمزگذاری می‌کند (Hewezi *et al.*, 2016).

آنالیز نتایج تأثیر متیل جاسمونات بر mir160 و mir166 و ژن هدف آن ARF17 و ARF6 نتایج بررسی بیان میکروارنای mir160 و mir166 و ژن‌های هدف آنها در پاسخ به متیل جاسمونات بر روی گیاه دارویی زنیان نشان داد که میکروارناها ممکن است در پاسخ گیاه به MeJA دخیل باشند (شکل‌های ۴ و



شکل ۴. تأثیر محلول پاشی متیل جاسمونات بر بیان mir160 و ژن هدف آن در طی زمان



شکل ۵. تأثیر محلول پاشی متیل جاسمونات بر بیان *mir166* و ژن هدف آن در طی زمان

داده شد که *miR166*، *miR167* و *miR319* که به ترتیب تنظیم‌کننده‌های بیوسنتز *ARF6/8* و *TCP2/4/10* را هدف قرار می‌دهند، پس از تیمار *MeJA* کاهش یافتند (Wilkinson *et al.*, 2021). همچنین *miR156* و *miR168* در سرخدار چینی تحت تیمار *MeJA* کاهش یافتند (Roy *et al.*, 2021). در مطالعه دیگر ثابت شد که *miR160* و ژن هدف آن *ARF* نقش کلیدی در پاسخ به *MeJA* در گیاه دارویی رزماری ایفا می‌کند (Yao *et al.*, 2021). در گیاه اوفوریا ار تیره فرفیون نتایج نشان داد که میکروارناها در پاسخ به *MeJA* دخیل هستند که در این بین خانواده *miR156*، *miR166*، *miR171* و *miR395* فراوانی بیان بالایی نشان دادند (Li *et al.*, 2019).

#### نتیجه‌گیری کلی

تحقیق حاضر شامل شناسایی *miRNA*ها در گیاه *Trachyspermum ammi* از طریق رویکرد محاسباتی بوده است و دو *miRNA* به منظور بررسی سطوح بیانی در پاسخ با متیل جاسمونات مورد ارزیابی قرار گرفتند. این بررسی نخستین گزارش از شناسایی میرنا در گیاه دارویی زنیان بوده و نتایج آن نقطه عطفی در شناسایی میرنا و نقش آنها در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در این گیاه خواهد بود همچنین نتایج اعتبارسنجی نشان می‌دهد که چندین *miRNA* از جمله اعضای خانواده‌های *miR160* و *miR166* در پاسخ به *MeJA* در گیاه زنیان نقش دارند. هرچند برای درک بهتر اینکه چگونه میکروارناها پاسخ به متیل‌جاسمونات را تنظیم می‌کنند، تحلیل بیشتری از مسیر بیوسنتز *JA* و سیگنال‌دهی مورد نیاز است. این نتایج یک مبنای نظری برای آشکارسازی بیشتر مکانیسم تنظیمی

خانواده بسیار حفاظت‌شده *miR160*، *ARF10*، *ARF16* و *ARF17* از خانواده *ARF* را به طور منفی تنظیم و سرکوبگر می‌کند (Mallory *et al.*, 2005). از این رو این خانواده نقش مهمی در حفظ فرآیند جوانه‌زنی بذر و برنامه‌های رشد طبیعی جنین، ریشه، ساقه، برگ‌ها و اندام‌های گل دارد. خانواده‌های *miR156*، *miR160*، *miR168*، *miR171*، *miR172*، *miR397* و *miR398* (Montes *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای بر روی آرابیدوپسیس مشخص شد که *miR160* با اثر بر روی *ARF17* تنظیم‌کننده منفی تجمع *JA* می‌باشد (Gutierrez *et al.*, 2012). هر چند در مطالعه دیگر بر روی صنوبر انتظار می‌رفت که عملکرد مشابهی مانند آرابیدوپسیس و گوجه‌فرنگی مشاهده شود، با این حال، تغییرات متناظری در سطوح بیان *ARFs* که اهداف شناخته شده *miR166*، *miR319* یا *miR160* هستند، پیدا نشد (Wilkinson *et al.*, 2021). افزون بر این مشخص شد که سطوح *JA* در پوست تیمار شده با *MeJA* پس از زخم شدن به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد، اما در پوست سالم تیمار شده با *MeJA* افزایش نمی‌یابد (Mageroy *et al.*, 2020). بنابراین، مشخص نیست که چگونه *miRNA*ها بیوسنتز *JA* در صنوبر نروژ را تنظیم می‌کنند.

خانواده‌های *miR162*، *miR167*، *miR319*، *miR396* و *miR529* شدت در بین گیاهان حفاظت شده‌اند، میکروارناها در گیاهان به طور متفاوتی به *MeJA* پاسخ می‌دهند. در گونه‌های خانواده کاج به نظر می‌رسد *miR1313* چندین *miRNA* تنظیم‌کننده‌های مسیر *JA* را هدف قرار می‌دهند (Axtell *et al.*, 2007)، در تجزیه و تحلیل Wilkinson و همکاران (۲۰۲۱) نشان

عملکرد در ژن‌های هدف فراهم می‌کند.

miRNA در پاسخ به متیل جاسمونات و تایید

## REFERENCES

- Akbarinia A, Sefidkon F, Ghalavand A, Tahmasebi Sarvestani Z and Sharifi Ashorabadi A (2005) A study on chemical composition of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) essential oil produced in Qazvin. *Journal of Inflammatory Diseases*. 9(3): 22-25
- Akbarinia, A., Sefidkon, F., Ghalavand, A., Tahmasbi, S. Z., & Sharifi, A. E. (2005). A study on chemical composition of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) essential oil produced in Qazvin. *J. Qazvin Univ. Med. Sci* 9: 22-26. (In Persian).
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Axtell, M. J., Snyder, J. A., & Bartel, D. P. (2007). Common functions for diverse small RNAs of land plants. *The Plant Cell*, 19(6), 1750-1769.
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, 12(4), 1-13.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Bonnet, E., Wuyts, J., Rouzé, P., & Van de Peer, Y. (2004). Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics*, 20(17), 2911-2917.
- Dai, X., Lu, Q., Wang, J., Wang, L., Xiang, F., & Liu, Z. (2021). MiR160 and its target genes ARF10, ARF16 and ARF17 modulate hypocotyl elongation in a light, BRZ, or PAC-dependent manner in Arabidopsis: miR160 promotes hypocotyl elongation. *Plant Science*, 303, 110686.
- Dai, X., & Zhao, P. X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids research*, 39(suppl\_2), W155-W159.
- Dhandapani, V., Ramchiary, N., Paul, P., Kim, J., Choi, S. H., Lee, J., ... & Lim, Y. P. (2011). Identification of potential microRNAs and their targets in *Brassica rapa* L. *Molecules and Cells*, 32(1), 21-37.
- Fan, R., Li, Y., Li, C., & Zhang, Y. (2015). Differential microRNA analysis of glandular trichomes and young leaves in *Xanthium strumarium* L. reveals their putative roles in regulating terpenoid biosynthesis. *PLoS One*, 10(9), e0139002.
- François, L., Verdenaud, M., Fu, X., Ruleman, D., Dubois, A., Vandenbussche, M., ... & Bendahmane, M. (2018). A miR172 target-deficient AP2-like gene correlates with the double flower phenotype in roses. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11.
- Guigon, I., Legrand, S., Berthelot, J. F., Bini, S., Lanselle, D., Benmounah, M., & Touzet, H. (2019). miRkwood: a tool for the reliable identification of microRNAs in plant genomes. *BMC Genomics*, 20(1), 1-9.
- Gutierrez, L., Mongelard, G., Floková, K., Păcurar, D. I., Novák, O., Staswick, P., ... & Bellini, C. (2012). Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *The Plant Cell*, 24(6), 2515-2527.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., ... & Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols*, 8(8), 1494-1512.
- Haghiroalsadat, B. F., Vahidi, A. R., Azimzadeh, M., Kalantar, S. M., Bernard, F., Hokm, E. F., (2012) Chemical Assessment of Active

- Ingredients, Anti-oxidant and Anti-microbial Effects of *Trachyspermum Copticum*'s Seeds harvested in Yazd Province. 21th International Congress of Microbiology of Iran, 197-206.
- Hedge, I.C., Lamond JM (1987) *Trachyspermum*. *FloraIranica* 162: 336-8.
- Hewezi, T., Piya, S., Qi, M., Balasubramaniam, M., Rice, J. H., & Baum, T. J. (2016). Arabidopsis miR827 mediates post-transcriptional gene silencing of its ubiquitin E3 ligase target gene in the syncytium of the cyst nematode *Heterodera schachtii* to enhance susceptibility. *The Plant Journal*, 88(2), 179-192.
- Jannesar, M., Seyedi, S. M., Moazzam Jazi, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., & Botanga, C. (2020). A genome-wide identification, characterization and functional analysis of salt-related long non-coding RNAs in non-model plant *Pistacia vera* L. using transcriptome high throughput sequencing. *Scientific Reports*, 10(1), 1-23.
- Ko, J. H., Prassinos, C., & Han, K. H. (2006). Developmental and seasonal expression of PtaHB1, a *Populus* gene encoding a class III HD-Zip protein, is closely associated with secondary growth and inversely correlated with the level of microRNA (miR166). *New Phytologist*, 169(3), 469-478.
- Li, L., Xu, J., Yang, D., Tan, X., & Wang, H. (2010). Computational approaches for microRNA studies: a review. *Mammalian Genome*, 21(1), 1-12.
- Li, P., Tian, Z., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, M., Fang, X., ... & Cai, X. (2019). MicroRNAome Profile of *Euphorbia kansui* in Response to Methyl Jasmonate. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1267.
- Li, S., Li, L., Jiang, Y., Wu, J., Sun, H., Zhao, M.,... & Zhang, M. (2020). SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like (SPL) Gene Family: Transcriptome-Wide Identification, Phylogenetic Relationship, Expression Patterns and Network Interaction Analysis in *Panax ginseng* CA Meyer. *Plants*, 9(3), 354.
- Li, X., Xie, X., Li, J., Cui, Y., Hou, Y., Zhai, L., ... & Bian, S. (2017). Conservation and diversification of the miR166 family in soybean and potential roles of newly identified miR166s. *BMC Plant Biology*, 17(1), 1-18.
- Mageroy, M. H., Wilkinson, S. W., Tengs, T., Cross, H., Almvik, M., Pétriacq, P., ... & Krokene, P. (2020). Molecular underpinnings of methyl jasmonate-induced resistance in Norway spruce. *Plant, Cell & Environment*, 43(8), 1827-1843.
- Mallory, A. C., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2005). MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *The Plant Cell*, 17(5), 1360-1375.
- Mir Drikvand, R., Sohrabi, S. S., Sohrabi, S. M., & Samiei, K. (2019). Identification and characterization of conserved miRNAs of *Coriandrum sativum* L. using next-generation sequencing data. *Crop Biotechnology*, 9(25), 59-74.
- Mirzahosseini, S. M., Noori, S. A. S., Amanzadeh, Y., Javid, M. G., & Howyzeh, M.S. (2017). Phytochemical assessment of some native ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) ecotypes in Iran. *Industrial Crops and Products*, 105, 142-147.
- Chavez Montes, R. A., Rosas-Cárdenas, D. F. F., De Paoli, E., Accerbi, M., Rymarquis, L. A., Mahalingam, G., ... & De Folter, S. (2014). Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. *Nature Communications*, 5(1), 1-15.

- Ncube, B., & Van Staden, J. (2015). Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. *Molecules*, 20(7), 12698-12731.
- Patanun, O., Lertpanyasampatha, M., Sojikul, P., Viboonjun, U., & Narangajavana, J. (2013). Computational identification of microRNAs and their targets in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Molecular Biotechnology*, 53(3), 257-269.
- Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H., & Vilo, J. (2016). g: Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W83-W89.
- Roy, S., Chakraborty, A.P., & Chakraborty, R. (2021). Understanding the potential of root microbiome influencing salt-tolerance in plants and mechanisms involved at the transcriptional and translational level. *Physiologia Plantarum*, 173(4), 1657-1681.
- Saifi, M., Nasrullah, N., Ahmad, M. M., Ali, A., Khan, J. A., & Abdin, M. Z. (2015). In silico analysis and expression profiling of miRNAs targeting genes of steviol glycosides biosynthetic pathway and their relationship with steviol glycosides content in different tissues of *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 57-64.
- Singh, N., Srivastava, S., Shasany, A. K., & Sharma, A. (2016). Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of *Mentha* spp. *Computational Biology and Chemistry*, 64, 154-162.
- Soltani Howyzeh, M., Sadat-Noori, S.A., Shariati, J. (2018) Essential oil profiling of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) industrial medicinal plant. *Ind Crops Prod*, 119, 255-259.
- Vashisht, I., Mishra, P., Pal, T., Chanumolu, S., Singh, T.R., & Chauhan, R.S. (2015). Mining NGS transcriptomes for miRNAs and dissecting their role in regulating growth, development, and secondary metabolites production in different organs of a medicinal herb, *Picrorhiza kurroa*. *Planta*, 241(5), 1255-1268.
- Wang, M., Wang, Q., & Wang, B. (2012). Identification and characterization of microRNAs in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.). *PLoS One*, 7(4), e33696.
- Wilkinson, S. W., Vivian-Smith, A., Krokene, P., & Mageroy, M. H. (2021). The microRNA response associated with methyl jasmonate-induced resistance in Norway spruce bark. *Plant Gene*, 27, 100301.
- Xing, S., Salinas, M., Höhmann, S., Berndtgen, R., & Huijser, P. (2010). miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(12), 3935-3950.
- Yao, D., Zhang, Z., Chen, Y., Lin, Y., Xu, X., & Lai, Z. (2021). Transcriptome Analysis Reveals Differentially Expressed Genes That Regulate Biosynthesis of the Active Compounds with Methyl Jasmonate in Rosemary Suspension Cells. *Genes*, 13(1), 67.
- Yu, Z. X., Wang, L. J., Zhao, B., Shan, C.M., Zhang, Y.H., Chen, D.F., & Chen, X.Y. (2015). Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and *Patchouli* (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors. *Molecular Plant*, 8(1), 98-110.
- Zarshenas, M. M., Samani, S. M., Petramfar, P., & Moein, M. (2014). Analysis of the essential oil components from different *Carum copticum* L. samples from Iran. *Pharmacognosy Research*, 6(1), 62.
- Zhang, B. (2015). MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *Journal of experimental botany*, 66(7), 1749-1761.

- 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, B. H., Pan, X. P., Cox, S. B., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(2), 246-254.
- Zhang, X., Zou, Z., Zhang, J., Zhang, Y., Han, Q., Hu, T., ... & Ye, Z. (2011). Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. *FEBS letters*, 585(2), 435-439.
- Zhang, Y., Schwarz, S., Saedler, H., & Huijser, P. (2007). SPL8, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 63(3), 429-439.