

«مقاله پژوهشی»

سره‌م‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم و شناسایی ریز RNAهای محافظت‌شده *Kelussia odoratissima* Mozaff.

مریم رمضانی^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۲*}، احمد اسماعیلی^۲، سید سجاد سهرابی^۳

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۲. استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۳. دکترا، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۱)

De novo transcriptome assembly and conserved microRNAs identification of *Kelussia odoratissima* Mozaff.

Maryam Ramezani¹, Farhad Nazarian-Firouzabadi^{2*}, Ahmad Ismaili², Seyed Sajad Sohrabi³

1. Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2. Prof., Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

3. Ph.D., Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

(Received: Mar. 31, 2022 - Accepted: Jul. 23, 2022)

Abstract

Kelus (*Kelussia odoratissima* Mozaff.), a medicinal plant rich in active pharmaceutical ingredients with therapeutic effects, is found only in central Zagros Mountains, west of IRAN. Despite being in danger of extinction, there are no genetic evidences regarding kelus Omics as well as valuable compounds biosynthesis pathways. MicroRNAs (miRNAs) play an important role in different processes such as growth and development, cell proliferation, response to stresses and biosynthesis metabolite. As far as the bioinformatic data are concern, the genome/transcriptome of kelus has not been sequenced. The present study was performed to identify the conserved miRNAs and their target genes in the kelus leaf transcriptome. After pair-end sequencing with the Illumina HiSeq 2500 platform, clean reads were assembled. In total, 4658 unigenes were found to contain potential miRNAs sequences. Following strict filtering criteria, five miRNAs belonging to five conserved miRNA families (miR156-3P, miR408, miR169, miR171 and miR398) were identified among candidate sequences. Results of this study revealed that the target genes of the identified miRNAs were involved in various metabolic pathways, including butanoate metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, starch and sucrose metabolism, carbon fixation in photosynthetic organisms, peroxisome degradation, and fatty acid degradation. By affecting genes associated with six metabolic pathways, miR408 was identified as the most influential conserved microRNA in the kelus leaf transcriptome. In general, given the regulatory roles of identified miRNAs on broad spectrum of gene networks and biological processes of kelus, these miRNAs can be used as candidate genes for breeding kelus quantitative and qualitative traits.

Keywords: Gene network, Kelus, miR408, Secondary metabolites

چکیده

گیاه دارویی کلوس یا کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff.) منبعی غنی از مواد فعال دارویی با اثرات درمانی است که به‌صورت انحصاری در رشته‌کوه‌های زاگرس مرکزی ایران یافت می‌شود. با وجود خطر انقراض این گونه گیاهی، اطلاعاتی درباره ژنوم / ترنسکرپتوم و بیوسنتز ترکیبات ارزشمند این گیاه وجود ندارد. در بین مولکول‌های حیاتی، اگرچه مولکول‌های microRNA (miRNAs) نقش مهمی در فرآیندهای مختلف زیستی به‌ویژه در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی دارند، در حال حاضر، هیچ گزارشی از وضعیت miRNAها در گیاه کلوس منتشر نشده است. مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی miRNAهای محافظت‌شده و ژن‌های هدف آن‌ها در ترنسکرپتوم برگ کلوس انجام شد. پس از توالی‌یابی RNA با پلتفرم Illumina HiSeq 2500، خوانش‌های کوتاه پردازش شده سرهم‌بندی شدند. در این مطالعه، تعداد ۴۶۵۸ یونی‌ژن حاوی توالی miRNAهای بالقوه شناسایی شدند. پس از پالایه کردن دقیق، پنج توالی miRNA (miR156-3P، miR408، miR169، miR171 و miR398) از میان توالی‌های نامزد شناسایی و ژن‌های هدف آن‌ها مشخص شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که miRNAها در مسیرهای متابولیسمی مختلفی از جمله متابولیسم بوتانوات، متابولیسم گلیکوزیلات و دی‌کربوکسیلات، متابولیسم نشاسته و ساکارز، تثبیت کربن در اندامک‌های فتوسنتزی، تخریب پراکسی‌زوم و تخریب اسیدهای چرب درگیر بودند. miR408 با تنظیم ژن‌های شش مسیر متابولیسمی، به‌عنوان تأثیرگذارترین miRNA محافظت‌شده در پروفایل بیانی کلوس شناخته شد. به‌طور کلی، با توجه به نقش تنظیمی miRNAهای شناسایی‌شده بر روی طیف گسترده‌ای از شبکه‌های ژنی و فرآیندهای بیولوژیکی گیاه کلوس در مطالعه حاضر، می‌توان از این miRNAها به‌عنوان ژن‌های نامزد برای بهبود صفات کمی و کیفی این گیاه استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: کلوس، شبکه ژنی، متابولیت‌های ثانویه، miR408

مقدمه

کرفس کوهی با نام علمی *Kelussia odoratissima* Mozaff. و نام محلی کلوس، گیاهی معطر، چندساله، دیپلوئید ($2n = 2x = 22$) و متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) می‌باشد (Akkafi et al., 2014; Khanavi et al., 2021; Muzaffarian, 2007). این گیاه تنها گونه شناخته‌شده‌ی جنس *Kelussia* است که به‌صورت انحصاری در منطقه زاگرس مرکزی رویش دارد (Mozaffaian, 2003). سازگاری با ارتفاع بیش از ۲۵۰۰ متر از سطح دریا و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد از جمله شرایط اقلیمی محدودکننده پراکنش این گیاه دارویی به‌شمار می‌روند (Salimi et al., 2010). شایان‌ذکر است که کلوس یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی ایران به‌شمار می‌رود که به‌طور سنتی در درمان بیماری‌هایی نظیر سرماخوردگی، فشار خون بالا، دیابت استفاده می‌شود؛ علاوه‌بر این از کلوس به‌عنوان یک فرآورده غذایی نیز استفاده می‌گردد (Ahmadi et al., 2007).

ارزش اقتصادی بالای کلوس را می‌توان به ویژگی‌های فارماکولوژیکی اسانس و عصاره آن شامل، اثرات ضد درد، ضد التهاب و اضطراب، ضد دیابت، ضد سرطان، محافظت‌کننده عروق و دستگاه گوارش مرتبط دانست (Torki et al., 2018; Akbarian et al., 2019; Javani and Asadi-Mirzaei et al., 2020; Khadijeh et al., 2019; Khanavi et al., 2021). سپس - لیگوستیلید (Z-ligustilide) و بوتیل فتالید (Butylphthalide)، اجزای اصلی اسانس *K.odoratissima* می‌باشند که شواهدی از تأثیر مثبت آن‌ها بر سیستم عصبی، فشارخون و کلسترول در انسان مورد تأیید قرار گرفته‌است (Kuang et al., 2004; Song et al., 2008). هرچند کلوس در گذشته از پراکنش مناسبی در منطقه زاگرس مرکزی برخوردار بوده‌است، ولی متأسفانه در سال‌های اخیر، به‌دلیل

ارزش اقتصادی بالای این محصول دارویی، رویشگاه‌های طبیعی آن با برداشت بی‌رویه تخریب‌شده و هم‌اکنون این گیاه به‌عنوان یک گونه‌ی در معرض انقراض شناخته می‌شود (Ahmadi et al., 2019; Ahmadi et al., 2021).

مطالعات اکولوژیکی، فیزیولوژیکی و به‌طور ویژه مطالعات ژنتیکی گیاهان در معرض انقراض از جمله کلوس به محققان کمک خواهد کرد تا اطلاعات لازم برای حفظ این گونه‌ها را به‌دست آورند و با استفاده از این اطلاعات بهترین روش به‌نژادی جهت محافظت و افزایش بهره‌وری از پتانسیل این گیاهان ارزشمند را تسهیل نمایند (Mercati et al., 2019; Ren et al., 2021; Schluttenhofer and Yuan, 2017; Wang et al., 2021).

با توجه به اینکه تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و سایر موجودات زنده، از طریق شبکه پیچیده‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شود، استفاده از روش‌های سنتی به‌نژادی گیاهان به‌تنهایی برای افزایش یا کاهش این متابولیت‌ها کارساز نبوده و انتخاب مناسبی نخواهد بود. به همین علت در سال‌های اخیر، با پیشرفت‌های قابل‌توجهی که در ژنومیکس گیاهی و حجم اطلاعات موجود به وجود آمده‌است، بررسی و شناسایی ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و همچنین شبکه‌های تنظیمی آن‌ها مورد توجه قرار گرفته‌است و با سرعت بالایی در حال انجام است. توالی‌یابی با کارایی بالا (High throughput sequencing)، با تولید داده در مقیاس وسیع، زمینه مناسبی برای شناسایی ژن‌ها و همچنین بازسازی شبکه‌های ژنی فراهم نموده‌است (Bae et al., 2021; Guo et al., 2021; Hu et al., 2020; Liu et al., 2021).

ریز RNAها (miRNAs) عناصر کلیدی و مؤثری در تنظیم شبکه‌های ژنی در موجودات مختلف هستند (Ma et al., 2022; Pirí et al., 2016; Yang et al., 2019; Zhao et al., 2017). این عناصر

کلوس را با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید (Next generation sequencing, NGS) شناسایی و پروفایل بیانی برگ کلوس را بررسی نماید. در پژوهش حاضر برای اولین بار، ترنسکرپتوم برگ کلوس توالی‌یابی شد و با کنکاش در داده‌های توالی‌یابی شده، ریز RNAهای محافظت‌شده این گیاه شناسایی و تعیین خصوصیت شدند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پس از تهیه بذور کلوس از رویشگاه‌های طبیعی شهرستان شهرکرد، روستای دره سیدی، بذرها با قارچ‌کش بنومیل (به نسبت یک و نیم در هزار) ضدعفونی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک‌ماه نگهداری شدند. پس از سرمادهی (۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ روز)، نمونه‌های گیاهی به گلدان‌های پلاستیکی منتقل و در مهرماه در ارتفاعات بالای ۱۸۰۰ متر از سطح دریا (مزرعه دره بهمن، روستای خان آباد، شهرستان الیگودرز، استان لرستان) کشت شدند. در اواخر اسفندماه از برگ تازه گیاهان نمونه‌برداری صورت گرفت و پس از فریز شدن در ازلت مایع، تا زمان استخراج RNA در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA، تهیه کتابخانه cDNA و توالی‌یابی
استخراج RNA کل با استفاده از محلول ترایزول (Trizol reagent) طبق پروتکل شرکت سازنده (Invitrogen, life technology) برای همه نمونه‌ها انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. پس از آماده‌سازی کتابخانه‌های cDNA با استفاده از کیت سنتز Illumina TruSeq™ RNA Sample Preparation، از پلتفرم Illumina

تنظیمی غیر کدکننده از طریق فرآیند تداخل RNA (RNA interference)، بیان بسیاری از ژن‌ها را در سطوح مختلف رونویسی، پردازش، پایداری RNA و ترجمه را کنترل می‌کنند. Park *et al.* (2002) اولین ریز RNA گیاهی را در گیاه *Arabidopsis thaliana* شناسایی و نقش آن را تعیین کردند. از آن زمان تاکنون، تعداد زیادی ریز RNA و ژن‌های هدفشان در گونه‌های مختلف گیاهی مانند عدس (Sohrabi *et al.*, 2020)، گشنیز (Mir Drikvand *et al.*, 2019)، سیب (Gleave *et al.*, 2008) و استویا (Mehta *et al.*, 2016) شناسایی شده است.

به‌طور کلی، برای شناسایی ریز RNAها از سه روش همسانه‌سازی مستقیم، ژنتیک مستقیم و روش‌های بیوانفورماتیکی استفاده می‌شود؛ در حالی که برای شناسایی ژن‌های هدف آن‌ها سه روش بیوانفورماتیکی، بیوشیمیایی و روش‌های مبتنی بر امیکس (Omics) مورد استفاده قرار می‌گیرند (Li *et al.*, 2010). در این بین، روش‌های بیوانفورماتیکی سریع و بسیار کم‌هزینه‌تر از سایر روش‌ها بوده و از ویژگی محافظت‌شدگی بالای ریز RNAها برای شناسایی آن‌ها بهره می‌برند. روش‌های بیوانفورماتیکی، با استفاده از رهیافت مبتنی بر همولوژی و با مقایسه پایگاه داده‌های ریز RNAهای شناسایی‌شده (<http://www.mirbase.org>) با پایگاه‌های داده ارگانسم مورد نظر (مانند پایگاه داده‌های ترنسکرپتومی) به شناسایی ریز RNAهای محافظت‌شده بالقوه، می‌پردازند (Gleave *et al.*, 2008; Mir Drikvand *et al.*, 2019; Sunkar Jagadeeswaran, 2008; Mehta *et al.*, 2016). با توجه به اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهان دارویی کشور و با عنایت به این مسئله که گیاه کلوس در معرض انقراض می‌باشد و همچنین با در نظر گرفتن این موضوع که اطلاعاتی از ژنوم گیاه کلوس و ریز RNAهای آن در اختیار محققان قرار ندارد، این مطالعه سعی دارد تا ریز RNAهای محافظت‌شده

شناسایی ریز RNA های محافظت شده

پس از سرهم‌بندی نوپدید و حذف کانتیگ‌های تکراری، از یونی‌ژن‌های حاصل برای شناسایی ریز RNA های محافظت شده استفاده شد. به این منظور، کلیه‌ی توالی‌های ریز RNA ی ثبت شده برای ۸۸ گونه گیاهی شامل ۱۰۴۱۱ توالی ریز RNA ی بالغ، از پایگاه ^۲ mirbase دریافت شدند. شناسایی یونی‌ژن‌های با بیشترین شباهت با توالی‌های ریز RNA ی بالغ با استفاده از ابزار BLASTn و پارامترهای E-value $\leq 10^{-4}$ و mismatch ≤ 4 صورت گرفت. ریز RNA های بالغ دریافت شده به‌عنوان ورودی (Query) و یونی‌ژن‌های ایجاد شده به‌عنوان پایگاه مورد جستجو (Subject) مورد استفاده قرار گرفتند. آستانه طول ریز RNA های بالقوه شناسایی شده بین ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید تعیین شد. توالی‌های حاصل از بلاست با ابزار BLASTn، علیه پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری (non-redundant protein database, NR) با استفاده از ابزار BLASTx با E-value ≤ 0.001 مورد جستجو قرار گرفته و توالی‌های دارای نتیجه مشابه با این پایگاه، حذف شدند.

پیش‌بینی ساختار دوم ریز RNA ها

شباهت بالای یک یونی‌ژن با توالی ریز RNA بالغ به‌تنهایی برای تعیین صحت یک ریز RNA شناسایی شده کافی نیست. به همین علت، نوع تاخوردگی و میزان انرژی آزاد ساختار ریز RNA ی اولیه با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench ver.22 بررسی شد. به‌منظور ایجاد اطمینان از قرارگیری توالی ریز RNA ی بالغ در محل و جهت صحیح احتمالی خود در ساختار پیش‌ساز ریز RNA، یک ناحیه ۱۰۰ نوکلئوتیدی در بالادست و پایین‌دست ریز RNA ی شناسایی شده از توالی یونی‌ژن‌های انتخابی با استفاده از ابزار Bedtools استخراج شد (Quinlan, 2014).

HiSeq2500 برای فرآیند توالی‌یابی استفاده شد. قطعات از دو طرف (Paired-end) و با طول ۱۵۰ جفت‌باز خوانش شدند.

پردازش داده‌ها

با توجه به تأثیر کیفیت داده‌های ورودی بر نحوه سرهم‌بندی (Assembly) ترنسکریپتوم، کیفیت اولیه توالی‌های خام (Raw reads) برای همه نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC (Version 0.11.6) سنجیده شد (Andrews *et al.*, 2020). برای از بین بردن خطای احتمالی موجود در توالی‌ها، زدودن توالی آداپتور باقی‌مانده در خوانش‌های کوتاه و همچنین حذف توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phred score کمتر از ۳۰)، توالی‌هایی با میزان بالای نوکلئوتیدهای خوانش نشده (N) و توالی‌های با اندازه کمتر از ۷۵ جفت‌باز از نرم‌افزار Trimmomatic (version 0.27) استفاده شد (Bolger *et al.*, 2014).

سرهم‌بندی نوپدید (De novo assembly) خوانش‌ها

پس از فرآیند پردازش (Trimming) داده‌های حاصل از توالی‌یابی، از خوانش‌های با کیفیت بالا (Clean reads) به‌عنوان توالی‌های ورودی برای سرهم‌بندی ترنسکریپتوم برگ کلوس استفاده شد. سرهم‌بندی نوپدید با استفاده از نرم‌افزار Trinity (v2.1.1) طبق پارامترهای پیش‌فرض نرم‌افزار انجام شد (Grabherr *et al.*, 2011). به‌منظور حذف کانتیگ‌های اضافی از بسته نرم‌افزاری EvidentialGene^۱ (V2013.07.27) استفاده شد (Gilbert, 2016). علاوه بر این، کمیت سرهم‌بندی نوپدید با تعیین آماره‌های تعداد کانتیگ، طول بزرگ‌ترین کانتیگ، N50 و طول متوسط کانتیگ‌ها توسط نرم‌افزار Transrate (v1.0.3) سنجیده شد (Smith-Unna *et al.*, 2016).

2. <http://www.mirbase.org>

1. <http://arthropods.eugenec.org/EvidentialGene>

شناسایی ژن‌های هدف ریز RNA با استفاده از ابزار^۱ psRNATarget، تحت پارامترهای پیش‌فرض این ابزار صورت گرفت (Dai and Zhao, 2011). مستندسازی و تفسیر عملکردی (Functional annotation) ژن‌های هدف ریز RNAها، با استفاده از ابزار BLASTx موجود در پایگاه NCBI انجام شد (Altschul *et al.*, 1997). یونی‌ژن‌های هدف ریز RNAها علیه پایگاه NR با در نظر گرفتن حد آستانه $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ مورد هم‌ردیفی محلی (Local Blast2GO) قرار گرفتند. تحلیل هستی‌شناسی (Gene ontology, GO) ژن‌های هدف ریز RNAهای شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار Blast2GO انجام شد.

نتایج و بحث

کنترل کیفیت و سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌ها امروزه با تلفیق روش‌های به‌نژادی کلاسیک و روش‌های مبتنی بر زیست‌فناوری و مهندسی ژنتیک، تشخیص جامع همه ژن‌ها و عوامل درگیر در بروز یک صفت، یکی از گام‌های مهم در طراحی برنامه‌های به‌نژادی به‌شمار می‌رود. در سال‌های اخیر هم‌زمان با ظهور فناوری‌های مبتنی بر NGS، تولید داده‌های امیکس در گیاهان به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است (Slatko *et al.*, 2018)، به‌طوری‌که برای اغلب گیاهان مدل، ژنوم مرجع به‌صورت کامل مستندسازی شده یا در حال مستندسازی است (Younessi-Hamzekhanlu *et al.*, 2022). در گیاهان غیر مدل اعم از گیاهان دارویی یا گیاهانی که دارای اندازه ژنوم بزرگی هستند (Preston, 2020)، سرهم‌بندی ترنسکرپتوم با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA، امکان شناسایی اغلب ژن‌ها و عوامل دخیل در شبکه‌های زیستی از جمله ریز RNAها را، بدون نیاز به یک توالی ژنوم مرجع، فراهم می‌سازد (Bae *et al.*,

توالی‌هایی که دارای ساختار ساقه-حلقه مناسب بوده و همچنین در یکی از بازوها شامل توالی ریز RNA بالغ نیز بودند، به‌عنوان ریز RNAهای احتمالی شناخته شده و مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور تعیین صحت ساختار ریز RNAهای احتمالی از پارامترهای درصد GC/AU، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy, MFE Adjusted minimal free energy, AMFE) و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy index, MFEI) استفاده شد (روابط ۱، ۲ و ۳) (Padmashree and Ramachandraswamy, 2016; Xie *et al.*, 2005).

$$\text{رابطه ۱)} \quad = \text{حداقل انرژی آزاد تاخوردگی} \\ -\Delta G \text{ (kcal/mol)}$$

$$\text{رابطه ۲)} \quad = \text{حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده} \\ \times 100 \frac{\text{حداقل انرژی آزاد تاخوردگی}}{\text{پیش‌ساز RNA}}$$

$$\text{رابطه ۳)} \quad = \text{حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده} \\ \frac{\text{حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده}}{\text{درصد GC محتوای}}$$

در پایان، ریز RNAهای احتمالی با بررسی مواردی همچون: تاخوردگی مناسب و وجود ساختار ساقه-حلقه، وجود توالی ریز RNA بالغ در یک بازو در ناحیه ساقه، عدم شکستگی در حلقه ریز RNA، حداکثر ۶ جفت نوکلئوتید غیر منطبق در ساختار ریز RNA، محتوای ۳۰ تا ۷۰ درصدی AU، حداکثر اندازه فاصله در ساختار ریز RNA ۳ نوکلئوتید و حداقل انرژی آزاد تاخوردگی، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده و میزان شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی بیشتر از ۸۵ کیلوکالری بر مول (Zhang *et al.*, 2006b)، پالایش و شناسایی شدند.

شناسایی و مستندسازی ژن‌های هدف ریز RNA

نشان داد ۷۰/۳۶ درصد از ترنسکرپتوم برگ کلوس با این پایگاه داده دارای رکورد مشابه می‌باشد. علاوه بر این نتایج بلاست نشان داد که گیاه هویج (*Daucus carota* subsp. *sativus*) بیشترین شباهت را به کلوس دارد و پس از آن *Lupinus albus* و *Tanacetum cinerariifolium* بیشترین همولوژی را نشان دادند.

با توجه به اینکه پروفایل بیانی ایجاد شده در مطالعه حاضر نخستین گزارش برای کلوس می‌باشد، بنابراین، این مرجع ترنسکرپتومی ظرفیت بالایی جهت شناسایی ژن‌ها و عوامل ژنتیکی دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و همچنین شبکه‌های تنظیمی آن‌ها در کلوس دارد. در مطالعات مشابه، اهمیت ایجاد پروفایل بیانی برای گیاهان غیر مدل، از جمله گیاهان دارویی، جهت بهره‌برداری بیشتر از پتانسیل ژنتیکی آن‌ها مورد تأیید قرار گرفته است (Khanavi *et al.*, 2021; Konrath *et al.*, 2021; Joshi *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2021; Younessi-Hamzekhanlu *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2022). همچنین مقایسه نتایج پروفایل بیانی برگ کلوس با مطالعات مشابه در برخی از گونه‌های *Apiaceae* مانند هویج (Iorizzo *et al.*, 2011)، زنیان (Amiripour *et al.*, 2019) و کرفس (*Fu et al.*, 2013)، نشان می‌دهد که اسمبلی ایجاد شده در این مطالعه کیفیت قابل‌قبولی برای تحلیل و بررسی‌های بعدی دارد.

خانواده چتریان یکی از مهم‌ترین خانواده‌های گیاهان گل‌دار است که برای مصارف غذایی، طعم‌دهنده، معطر، پزشکی و صنعتی استفاده می‌شوند (Palumbo *et al.*, 2021). با این حال علی‌رغم اندازه چشمگیر این خانواده، به دلیل کمبود منابع ژنومی و ترنسکرپتومی، برنامه‌های به‌نژادی مولکولی در این خانواده محدود به چند عضو مهم شده است. به نظر می‌رسد که مشارکت بیشتر پژوهشگران و تولید محتوای ژنتیکی بیشتر برای اعضای این

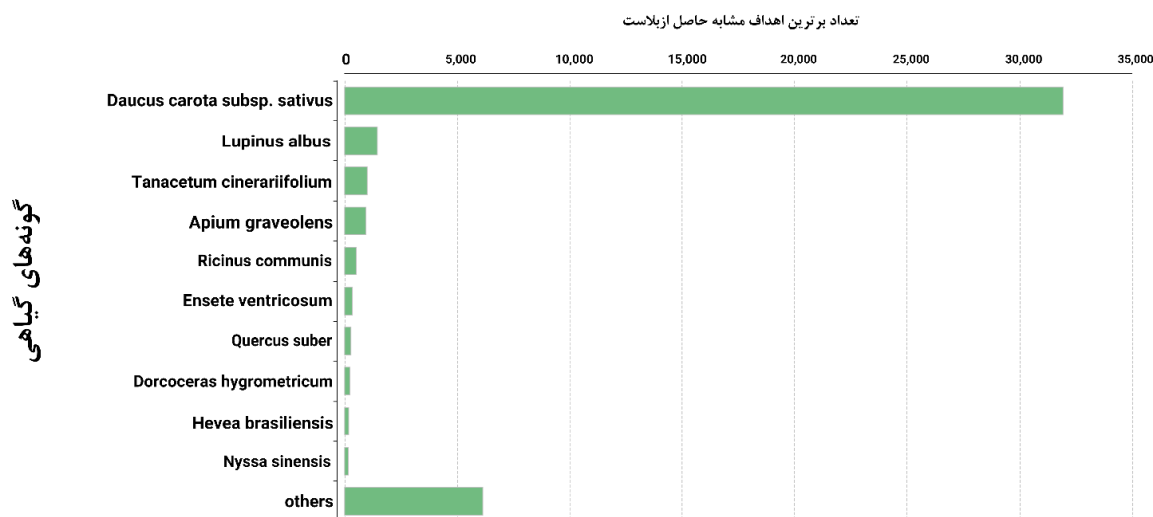
2021; Guo *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021).

در مطالعه حاضر، پس از ادغام مجموعه داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA برگ کلوس و به‌دنبال آن تعیین کیفیت اولیه و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین، تعداد ۱۲۱۲۸۰۰۳۴ خوانش با کیفیت بالا حاصل شد (جدول ۱). درصد توالی‌های با کیفیت بالاتر از Q30، در تمامی نمونه‌ها بیشتر از ۹۵ درصد بود که نشان‌دهنده کیفیت مناسب داده‌های ورودی برای سرهم‌بندی ترنسکرپتوم بود. از سرهم‌بندی خوانش‌های تمیز شده، ۱۸۳۳۶۵ رونوشت حاصل شد که این تعداد، پس از حذف توالی‌های تکراری با استفاده از بسته نرم‌افزاری Evidential Gene، به ۶۱۶۶۴ رونوشت منحصربه‌فرد (یونی‌ژن) تقلیل یافت. مقایسه پارامترهای کمی و کیفی سرهم‌بندی نهایی و اولیه نشان داد که Evidential Gene موجب افزایش محسوس پارامتر N50 از ۱۲۷۳ به ۱۶۴۲ شده است (جدول ۱). تفاوت کارکرد حذف توالی‌های تکراری توسط Evidential Gene نسبت به سایر نرم‌افزارهای رایج مانند CD-HIT-EST در این مورد خلاصه می‌گردد که Evidential Gene نه تنها از شباهت بین توالی‌های خام استفاده می‌کند، بلکه قاب خوانش باز و توالی پروتئینی احتمالی را برای ایجاد خوشه‌های ژنی و در نهایت کاهش افزونگی کانتیگ‌ها (Redundancy) در نظر می‌گیرد (Gilbert, 2016). وجود کانتیگ‌های اضافی، فرآیند تجزیه و تحلیل‌های مقایسه‌ای با هدف تشخیص ژن‌های با بیان افتراقی (Differentially expressed genes, DEGs) را با خطا همراه می‌کند، از این‌رو انتخاب نرم‌افزار با کارایی مناسب در تشخیص کانتیگ‌های اضافی نقش مؤثری در افزایش اعتبار نتایج تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA خواهد داشت (Ono *et al.*, 2015). محتوای GC برای ترنسکرپتوم برگ کلوس ۴۶/۵۱ درصد تخمین زده شد. همچنین نتایج BLASTx علیه پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری (شکل ۱)

خانواده مهم گیاهی در مطالعات آینده با هدف توسعه ابزارهای مولکولی، به تقویت برنامه‌های به‌نژادی در گیاهان زراعی از خانواده چتریان کمک خواهد نمود.

جدول ۱. مشخصات کمی و کیفی سرهم‌بندی ترنسکرپتوم برگ کلوس

ویژگی	مقادیر	
	Trinity	Trinity+Evidential Gene
خوانش خام	۱۴۹۴۹۱۹۴۶	۱۴۹۴۹۱۹۴۶
خوانش تمیز شده	۱۲۱۲۸۰۰۳۴	۱۲۱۲۸۰۰۳۴
تعداد رونوشت	۱۸۳۳۶۵	۶۱۶۶۴
کوتاه‌ترین اندازه رونوشت (نوکلئوتید)	۲۰۱	۲۰۱
بلندترین اندازه رونوشت (نوکلئوتید)	۷۳۳۹۹	۷۳۳۹۹
تعداد کل نوکلئوتید	۱۳۶۶۳۶۸۲۳	۶۴۰۳۲۴۱۲
میانگین طول (نوکلئوتید)	۷۴۵/۱۶۳	۱۰۳۸/۴۰۸
تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱ کیلوباز (نوکلئوتید)	۳۵۰۲۱	۱۹۹۱۳
تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱۰ کیلوباز (نوکلئوتید)	۵۶۵	۳۱۲
رونوشت‌های دارای قاب خوانش باز	۴۵۲۶۱	۲۸۰۵۶
N90 (nt)	۲۸۵	۳۹۹
N70 (nt)	۵۹۸	۹۷۹
N50 (nt)	۱۲۷۳	۱۶۴۲
N30 (nt)	۲۱۷۹	۲۵۴۶
N10 (nt)	۶۵۹۷	۸۲۲۱
%GC	۴۴/۳۷	۴۶/۵۱



شکل ۱. توزیع برترین گونه‌های گیاهی مرتبط با ترنسکرپتوم برگ کلوس مبتنی بر نتایج BLASTx علیه پایگاه داده NR.

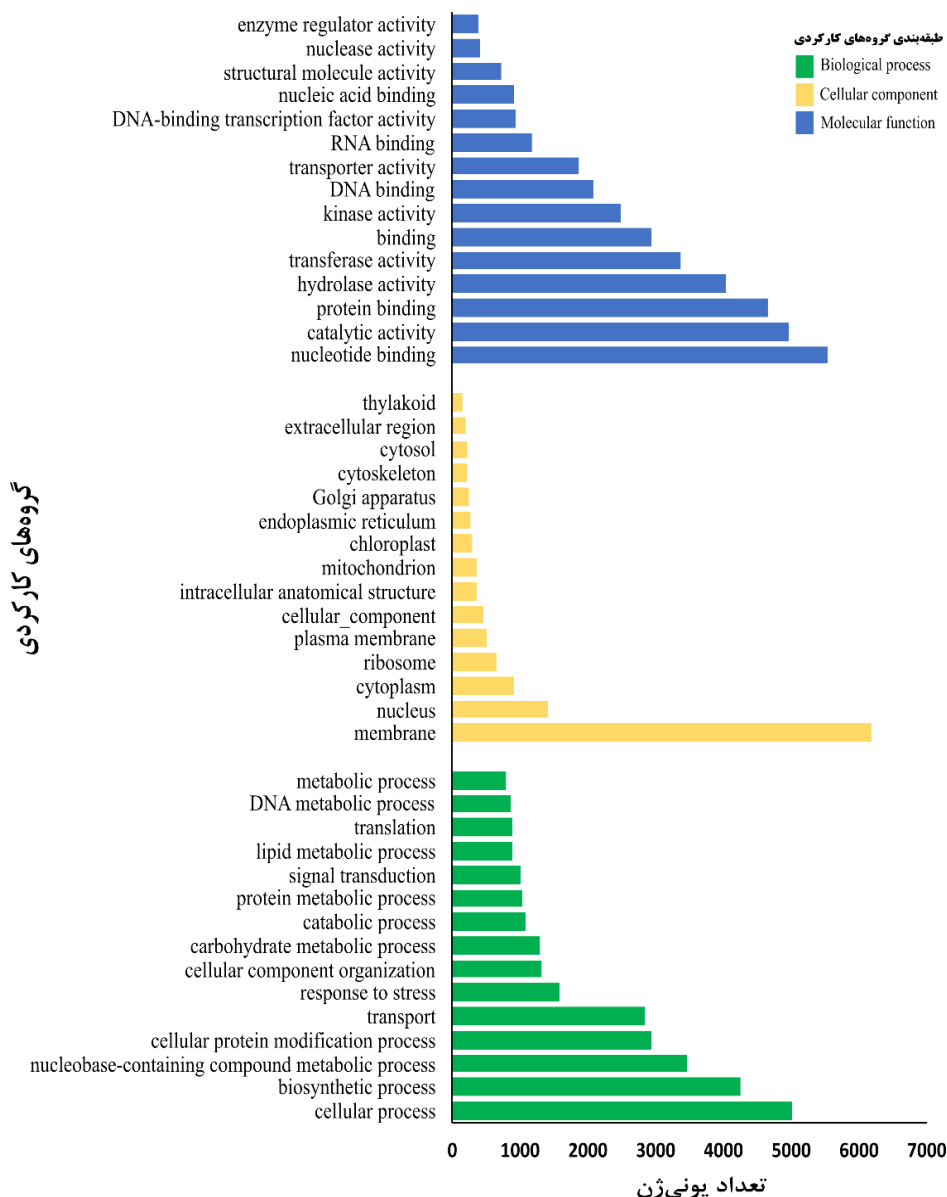
برگ کلوس با استفاده نرم‌افزار Blast2GO (شکل ۲) نشان داد که در زمینه عملکرد مولکولی (Molecular Function, MF) گروه‌های اتصال نوکلئوتیدی،

تحلیل هستی‌شناسی ترنسکرپتوم سرهم‌بندی‌شده کلوس

تحلیل غنی‌سازی گروه‌های کارکردی ترنسکرپتوم

بیش‌ترین فراوانی ژنی در زمینه اجزای سلولی (Cellular Components, CC) را به خود اختصاص دادند. نتایج هستی‌شناسی رونوشت‌های کلوس با نتایج مطالعه مشابه بر روی زنیان دیگر عضو خانواده چتریان مطابقت دارد (Amiripour *et al.*, 2019).

فعالیت کاتالیزوری و اتصال پروتئین به ترتیب بیش‌ترین فراوانی را به خود اختصاص داده‌اند. این در حالی بود که در زمینه فرآیند زیستی (Biological Processes, BP) گروه‌های فرآیند سلولی و فرآیند بیوسنتزی بیشتر از سایر گروه‌ها تحت‌تأثیر قرار می‌گیرند. تعداد ژن‌های اختصاص یافته به گروه غشاء



شکل ۲. تحلیل هستی‌شناسی ترنسکریپتوم برگ کلوس. در هر گروه کارکردی ۱۵ گروه برتر نمایش داده شده است. ستون‌های سبز، زرد و آبی به ترتیب گروه‌های عملکردی فرآیندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی را نشان می‌دهند.

اطلاعاتی زیستی است که مجموعه ژن‌های یک ژنوم را به کارکردهای سلول و موجود مرتبط می‌کند

تحلیل مسیرهای متابولیکی ترنسکریپتوم برگ کلوس پایگاه KEGG یکی از پرکاربردترین پایگاه‌های

و این کار را به‌طور ویژه از طریق نقشه‌های مسیر KEGG انجام می‌دهد. در این مطالعه از سرور KASS به‌منظور نقشه‌یابی مسیرهای KEGG استفاده شد. در مجموع ۱۵۶ مسیر متابولیکی شناسایی شدند که رونوشت‌های کلوس در آن‌ها دخیل بودند. ده مسیر برتر متابولیکی با بیشترین تعداد یونی ژن و آنزیم دخیل در جدول ۲ ارائه شده است. دو مسیر "متابولیسم نشاسته و ساکارز" و "متابولیسم پورین" به ترتیب بیشترین فراوانی تعداد یونی ژن و آنزیم را به خود اختصاص دادند. علاوه‌بر این مسیر بیوستنز فنیل پروپانوئید، یکی از ده مسیر بیوستنزی برتر شناسایی شده در کلوس بود.

گیاهان دارویی از جمله کلوس عمدتاً به‌دلیل وجود مواد مؤثره متعدد مانند ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، تریپنوئیدها و کاروتنوئیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی طبیعی بوده و امروزه نسبت به ترکیبات شیمیایی آنتی‌اکسیدانی از مقبولیت بالاتری برخوردار هستند (Jeshvaghani *et al.*, 2015). ژن‌های مسیر فنیل پروپانوئید/ فلاونوئید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه حیاتی را به‌عنوان منبع آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی تولید می‌کنند (González-Mendoza

و این کار را به‌طور ویژه از طریق نقشه‌های مسیر KEGG انجام می‌دهد. در این مطالعه از سرور KASS به‌منظور نقشه‌یابی مسیرهای KEGG استفاده شد. در مجموع ۱۵۶ مسیر متابولیکی شناسایی شدند که رونوشت‌های کلوس در آن‌ها دخیل بودند. ده مسیر برتر متابولیکی با بیشترین تعداد یونی ژن و آنزیم دخیل در جدول ۲ ارائه شده است. دو مسیر "متابولیسم نشاسته و ساکارز" و "متابولیسم پورین" به ترتیب بیشترین فراوانی تعداد یونی ژن و آنزیم را به خود اختصاص دادند. علاوه‌بر این مسیر بیوستنز فنیل پروپانوئید، یکی از ده مسیر بیوستنزی برتر شناسایی شده در کلوس بود.

گیاهان دارویی از جمله کلوس عمدتاً به‌دلیل وجود مواد مؤثره متعدد مانند ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، تریپنوئیدها و کاروتنوئیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی طبیعی بوده و امروزه نسبت به ترکیبات شیمیایی آنتی‌اکسیدانی از مقبولیت بالاتری برخوردار هستند (Jeshvaghani *et al.*, 2015). ژن‌های مسیر فنیل پروپانوئید/ فلاونوئید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه حیاتی را به‌عنوان منبع آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی تولید می‌کنند (González-Mendoza

جدول ۲. مشخصات ده مسیر برتر متابولیکی مرتبط با ترنسکرپتوم کلوس

نام مسیر	مشخصه مسیر	تعداد یونی ژن	تعداد آنزیم
متابولیسم نشاسته و ساکارز	KO00500	۵۵۱	۴۸
گلیکولیز / گلوکونوژنز	KO00010	۴۱۱	۳۹
متابولیسم پیرووات	KO00620	۳۹۳	۴۹
متابولیسم پورین	KO00230	۳۸۱	۶۹
بیوستنز فنیل پروپانوئید	KO00940	۳۵۱	۱۴
متابولیسم قند آمینه و قند نوکلئوتیدی	KO00520	۳۴۵	۶۰
متابولیسم تریپتوفان	KO00380	۳۱۷	۳۴
متابولیسم سیستئین و متیونین	KO00270	۳۱۷	۵۲
تبدیل پنتوز و گلوکورونات	KO00040	۳۱۱	۳۱
تخریب اسیدهای چرب	KO00071	۲۸۷	۲۰

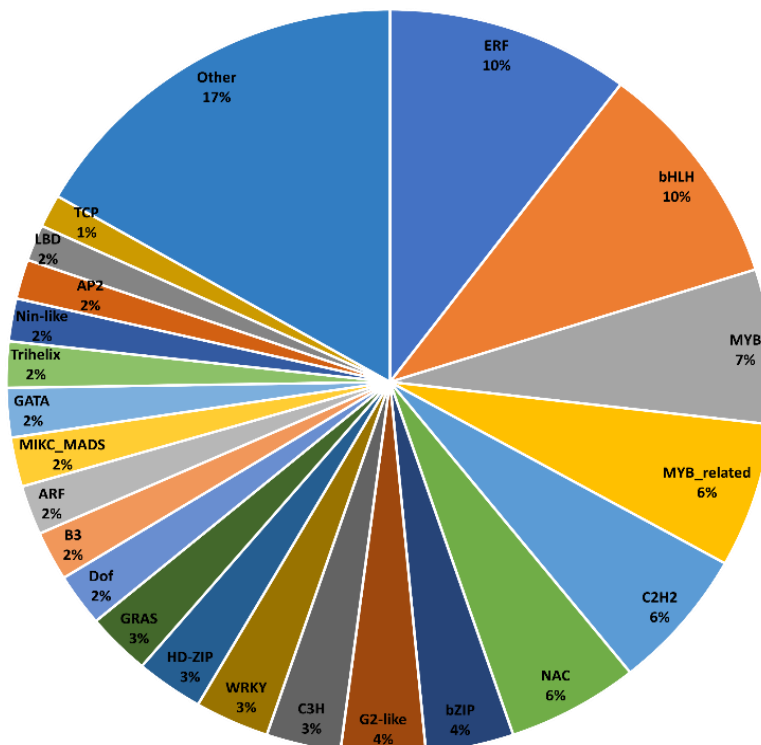
پاسخ به انواع مختلف تنش‌های محیطی (خانواده MYB، bZIP و WRKY) (Singh *et al.*, 2002)، تنظیم فرآیند تکثیر و تمایز سلولی (خانواده bHLH) (Heim *et al.*, 2003)، ارسال پیام دفاعی در مواجهه با بیمارگرها، بلوغ بذر و رشد گل (خانواده bZIP) و جنین‌زایی (خانواده C3H) (Li

پاسخ به انواع مختلف تنش‌های محیطی (خانواده MYB، bZIP و WRKY) (Singh *et al.*, 2002)، تنظیم فرآیند تکثیر و تمایز سلولی (خانواده bHLH) (Heim *et al.*, 2003)، ارسال پیام دفاعی در مواجهه با بیمارگرها، بلوغ بذر و رشد گل (خانواده bZIP) و جنین‌زایی (خانواده C3H) (Li

شناسایی ریز RNAهای محافظت‌شده

هم‌ردیف محلی ریز RNAهای گیاهی با رونوشت‌های ایجاد شده در خلال سرهم‌بندی ترنسکرپتوم برگ کلوس، منجر به شناسایی ۴۶۵۸ رونوشت شد که با توالی‌های ریز RNAی بالغ گیاهی مطابقت داشتند. پس از حذف رونوشت‌های کدکننده پروتئین (رونوشت‌هایی که دارای رکورد مشابهی با پایگاه پروتئین NR بودند)، تعداد ریز RNAهای احتمالی به ۵۶۶ توالی رسید. در مطالعه مشابهی که با هدف شناسایی ریز RNAهای محافظت‌شده در گیاه گشنیز (*Corindruna Sativum*) صورت گرفته بود، کارایی بالای داده‌های RNA-Seq و سرهم‌بندی نوپدید آن‌ها برای شناسایی ریز RNAهای محافظت‌شده تأیید شده است (Mir Drikvand *et al.*, 2019).

(and Thomas, 1998) از جمله نقش‌های حیاتی خانواده‌های مختلف TF در گیاهان می‌باشد. همچنین، بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای بیوسنتزی اغلب متابولیت‌های ثانویه گیاهی توسط عوامل رونویسی تنظیم می‌شود. bHLH, MYB و AP2/EREBP خانواده‌های تأثیرگذار TF هستند که شواهدی از فعالیت تنظیمی آن‌ها در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها، فیل‌پروپانوئیدها و ترپنوئیدها را تنظیم می‌کنند (Gantet and Memelink, 2002). علاوه بر این، خانواده‌های AP2 و WRKY در کنترل مسیرهای بیوسنتزی ترپن نیز نقش دارند (Spyropoulou *et al.*, 2014). شناسایی عوامل رونویسی دخیل در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه نقش مؤثری در بهینه‌سازی دست‌کاری‌های ژنتیکی احتمالی در گیاهان دارویی خواهد داشت.



شکل ۳. توزیع فراوانی خانواده عوامل رونویسی در ترنسکرپتوم برگ کلوس

رونوشت با ریز RNAهای بالغ تطابق یافته‌بودند (Mir Drikvand *et al.*, 2019). کارایی استفاده از روش‌های

نتایج مطالعه مذکور نشان داد که از ۵۱۹۹۶ رونوشت ایجاد شده توسط فرآیند سرهم‌بندی نوپدید، تعداد ۴۴۴۷

ژن‌های هدف پایین‌دست خود از جمله پروتئین‌های انتقال‌دهنده یون مس، تنظیم می‌کند که این فرآیند بر فتوسنتز تأثیر می‌گذارد و در نهایت باعث افزایش عملکرد دانه می‌شود. علاوه بر این، miR408 با تقویت آنتی‌اکسیدان‌های سلولی، تحمل به تنش را بهبود می‌بخشد و در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را افزایش می‌دهد (Gao *et al.*, 2022). مولکول miR169 یکی از مهم‌ترین ریز RNAهای محافظت‌شده در گیاهان محسوب می‌شود که مهم‌ترین ژن هدف آن NF-YA است که یک خانواده از عوامل رونویسی حفاظت‌شده می‌باشد (Mangukia *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). در گیاه آرابیدوپسیس، کاهش بیان miR169 در شرایط تنش خشکی و ABA منجر به افزایش بیان ژن هدف NFYA5 می‌شود که در تحمل به تنش خشکی بسیار حائز اهمیت است (Li *et al.*, 2008). همچنین نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهند که miR169 با سرکوب عامل رونویسی AtNF-YA گل‌دهی ناشی از تنش را تنظیم می‌کند (Xu *et al.*, 2014; Sorin *et al.*, 2014). خانواده miR171 به‌طور گسترده در طیف وسیعی از گونه‌ها گیاهی توزیع شده و از نظر تکاملی به‌شدت محافظت‌شده محسوب می‌شود. این خانواده از ریز RNA نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاه از طریق سرکوب بیان عوامل رونویسی SCARECROW-LIKE (SCL) ایفا می‌کنند. با این حال، اطلاعات کمی در مورد حفاظت تکاملی و تنوع عملکردی اعضای خانواده miRNA171 گزارش شده است (Zhu *et al.*, 2015). مولکول miR398 یکی از شناخته‌شده‌ترین miRNAهای پاسخگو به تنش است که از نظر تکاملی در سراسر قلمرو گیاهی محافظت‌شده است. افزایش بیان miR398 تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی مختلف از جمله تنش شوری، ABA، نور، گرما، غلظت ساکاروز، مس و آهن، کمبود نیتروژن، تنش اکسیداتیو و آلودگی باکتری، قارچ یا ویروس‌ها گزارش شده است (Cao *et al.*

محاسباتی برای شناسایی ریز RNAهای محافظت‌شده در سایر مطالعات مشابه نیز مورد تأیید قرار گرفته است (Mathiyalagan *et al.*, 2013; Mir Drikvand *et al.*, 2019; Sohrabi *et al.*, 2020).

با توجه به این نکته که انتخاب ریز RNAهای محافظت‌شده تنها بر اساس معیار همولوژی نتایج مطلوبی به‌همراه نخواهد داشت، ساختار ثانویه رونوشت‌های شامل ریز RNAهای احتمالی (۵۶۶ رونوشت) مورد بررسی قرار گرفت (Hammond, 2010; Xie *et al.*, 2015). ساختار ثانویه توالی‌های کاندید از نظر تناسب ساختار ساقه-حلقه و محل قرارگیری توالی ریز RNA بالغ در ساختار ثانویه پیش‌بینی شده، در مرحله نخست کنترل شد. در گام دوم، توالی‌هایی حذف شدند که از نظر مقدار حداکثر فاصله و تعداد نوکلئوتید غیرمنطبق در ساختار نامطلوب شناسایی شده بودند. از مجموع توالی‌های مورد بررسی تنها ۳۱ رونوشت حاوی ریز RNA بالغ دارای پارامترهای لازم بوده و از بقیه توالی‌ها در مراحل بعد چشم‌پوشی شد. در نهایت بر اساس پارامتر درصد AU و MFEI (جدول ۳)، ۵ ریز RNA محافظت‌شده با پتانسیل بسیار بالا متعلق به خانواده‌های miR156، miR408، miR169، miR171 و miR398 شناسایی شد (شکل ۴).

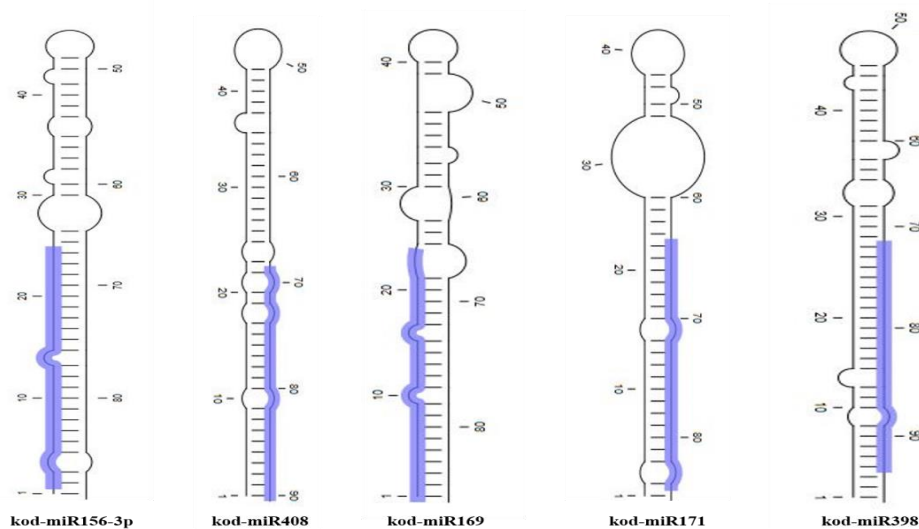
مطالعات متعدد در گیاهان یک‌ساله و چندساله نقش محافظه‌کارانه miR156 و اهداف آن، (ژن‌های SBP/SPL) را در هدایت و تغییر فاز رشد گیاهان از مرحله گیاهچه‌ای به مرحله بلوغ و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی را شناسایی کرده‌اند (Jeyakumar *et al.*, 2020; Wang and Wang, 2019; Zheng *et al.*, 2015). تجزیه و تحلیل تکاملی نشان می‌دهد که miR408 یک‌ریز RNA قدیمی و بسیار حفاظت‌شده است که به‌طور گسترده در ژنوم گیاهان مختلف توزیع شده است. مولکول miR408 رشد و نمو گیاهان مختلف را با تنظیم

باند‌های هیدروژنی و جفت شدن بازها اغلب باعث پایداری ساختار سنجاق سر ریز RNA می‌شوند (Zhang *et al.*, 2006c; Zhang *et al.*, 2006a). همچنین در مطالعات متعدد پارامتر MFEI به‌عنوان مناسب‌ترین معیار برای شناسایی ریز RNA گزارش شده است (Gleave *et al.*, 2008; Mandhan *et al.*, 2012). مقدار MFEI برای تشخیص و تمایز بین rRNA، tRNA، mRNA و microRNA، به ترتیب بیشتر از ۰/۵۹، ۰/۶۴، ۰/۶۲، ۰/۶۶ و ۰/۸۵ کیلوکالری بر مول گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2006c). میانگین پارامتر MFEI برای پنج ریز RNA شناسایی شده ۱/۰۵ کیلوکالری بر مول محاسبه شد که این میزان نیز صحت ساختار ثانویه توالی شناسایی شده را تایید می‌نماید (جدول ۳).

al., 2022; Lin *et al.*, 2022; Lu *et al.*, 2020; Salamon *et al.*, 2021).

شمار کمی از خانواده‌های miRNA بین خانواده‌های گیاهی محافظت شده‌اند، این در حالی است که شمار زیادی از آن‌ها متعلق به خانواده یا گونه‌های گیاهی خاصی هستند که نشان می‌دهد بیشتر ژن‌های شناخته شده miRNA اخیراً در زمان تکامل ایجاد شده‌اند. برخلاف miRNAهای باستانی بسیار حفاظت شده، miRNAهای جوان اغلب بیان بسیار پایینی دارند و از الگوی تغییر بیانی به نسبت خنثی در اغلب شرایط پیروی می‌کنند. همچنین، شواهد لازم برای تایید وجود miRNAهایی که بین حیوانات و گیاهان حفظ شده‌اند، بسیار اندک است که نشان می‌دهد احتمالاً miRNAهای حیوانی و گیاهی دارای یک نیای مشترک نیستند (Ding *et al.*, 2012).

میانگین درصد AU ریز RNAهای شناسایی شده بیشتر از ۵۰ بود که این موضوع ثبات و صحت ساختار ثانویه پیش‌ساز ریز RNAهای شناسایی شده را تایید می‌نماید. ساختار پیش‌ساز ریز RNAهای که درصد A+U بالایی دارند نسبت به دیگر فرم‌های RNA غنی از باندهای هیدروژنی می‌باشند.



شکل ۴. ساختار پیش‌ساز برای ۵ ریز RNA شناسایی شده در ترنسکریپتوم برگ کلوس

جدول ۳. ویژگی‌های ریز RNAهای شناسایی‌شده در برگ کلوس

ویژگی‌ها	نام ریز RNA بالغ		
	kod-miR156-3p	kod-miR408	kod-miR169
نام یونیژن	evgLocus_57071	evgLocus_134738	evgLocus_153097
طول یونیژن	۶۷۰	۴۷۷	۲۸۲
مختصات توالی ریز RNA بالغ روی یونیژن	۴۹۰..۵۱۱	۳۳۱..۳۴۱	۶۴..۸۵
ارزش مورد انتظار	۴/۳۴E-۰۵	۰/۰۰۰۱۳۷	۴/۳۴E-۰۵
bit score	۴۳	۴۱/۱	۴۳
طول توالی پیش‌ساز ریز RNA (جفت‌باز)	۸۹	۹۰	۸۶
توالی ریز RNA شناسایی‌شده (جفت‌باز)	۵'-UGAUGAC AGAAGCAUAGAGAGCA-۳'	۵'-AUGCACUGCCUCUUCCCCUGGCU-۳'	۵'-UAGCCAAGGAUGACUUGCCUGCU-۳'
رشته	-	+	+
طول ریز RNA شناسایی‌شده (جفت‌باز)	۲۳	۲۲	۲۳
درصد GC	۴۴/۹۴	۵۴/۴۴	۴۵/۳۵
درصد AU	۵۵/۰۶	۴۵/۵۶	۵۴/۶۵
MFE (kcal/mol)	-۴۶/۸۰	-۴۹/۵	-۳۸/۹
#AMFE	-۵۲/۵۸	-۵۵/۰۰	-۴۵/۲۳
£MFEI	۱/۱۷	۱/۰۱	۱/۰۰

*: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE); #: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده (AMFE); £: شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI)

ادامه جدول ۳. ویژگی‌های ریز RNAهای شناسایی‌شده در برگ کلوس

ویژگی‌ها	نام ریز RNA بالغ	
	kod-miR171	kod-miR398
نام یونیژن	evgLocus_179386	evgLocus_26082
طول یونیژن	۳۰۳	۷۲۶
مختصات توالی ریز RNA بالغ روی یونیژن	۱۳۰..۱۵۰	۱۲۷..۱۴۷
ارزش مورد انتظار	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۱۳۷
bit score	۳۵/۳	۴۱/۱
طول توالی پیش‌ساز ریز RNA (جفت‌باز)	۸۵	۹۶
توالی ریز RNA شناسایی‌شده (جفت‌باز)	۵'-UGAGCCGAACCAUUAUACUC-۳'	۵'-UGUGUUCUCAGGUCACCCUUU-۳'
رشته	+	+
طول ریز RNA شناسایی‌شده (جفت‌باز)	۲۱	۲۲
درصد GC	۴۱/۱۸	۵۱/۰۴
درصد AU	۵۸/۸۲	۴۸/۹۶
MFE (kcal/mol)	-۲۶/۳	-۵۱/۳
#AMFE	-۴۲/۷۱	-۵۳/۴۴
£MFEI	۱/۰۴	۱/۰۵

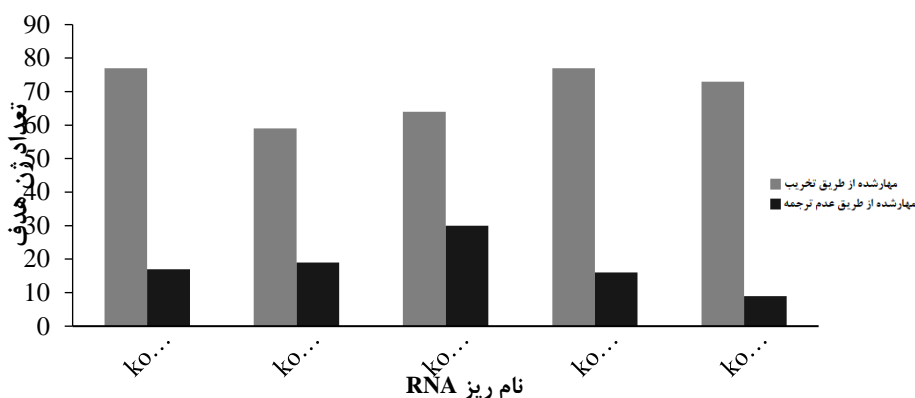
*: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE); #: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح‌شده (AMFE); £: شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI)

در مطالعه حاضر که با استفاده از ابزار psRNATarget صورت گرفت، نشان داد که در مجموع تعداد ۴۴۱

شناسایی ژن‌های هدف و تعیین نقش کارکردی آن‌ها نتایج بررسی ژن‌های هدف ریز RNAهای شناسایی‌شده

Kod- و Kod-miR398, Kod-miR171, miR169
miR408 به ترتیب ۹۴، ۷۸، ۹۴، ۹۳ و ۸۲ رونوشت بود
(شکل ۵).

رونوشت از ترنسکرپتوم برگ کلوس توسط این ریز
RNAها مورد هدف قرار می‌گیرند. تعداد ژن‌های هدف
برای ریز RNAهای Kod-miR156-3p، Kod-



شکل ۵. فراوانی یونی‌ژن‌های هدف ریز RNAهای شناسایی شده و نحوه کنترل بیان آن‌ها. ستون خاکستری و مشکی به ترتیب تعداد یونی‌ژن‌های تنظیم‌شده توسط ریز RNA از طریق تخریب mRNA و مهار ترجمه را نشان می‌دهد

(*et al.*, 2001). همچنین شواهد نشان می‌دهند که miR156 علاوه بر اینکه به‌عنوان یک عامل مهم در انتقال فاز رشد گیاهان عمل می‌کند، نقش مهمی نیز در تنظیم فضایی و زمانی بیوستت سسکوئی ترین دارد (*Yu et al.*, 2015). نقش چهار ژن هدف miR398 در مسیرهای پاسخ آنتی‌اکسیدانی و فرآیندهای بیوستت متابولیت‌های ثانویه مانند گلوکاتینون (GSH) و متابولیسم فنیل پروپانویید به‌عنوان اجزای اصلی در پاسخ به تنش کادمیم در مطالعه *Fu et al.* (2019) مشخص شد. در مطالعه‌ای دیگر نقش miR169 و ژن‌های هدف آن در بیوستت فلاونول‌ها و آنتوسیانیدین مورد تایید قرار گرفت (*Yang et al.*, 2015).

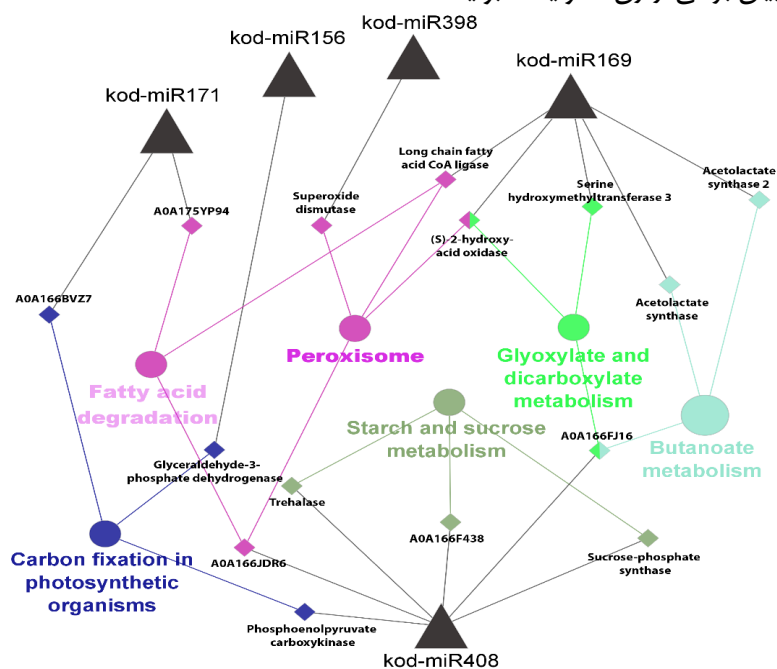
تقاضای جهانی برای داروهای گیاهی روزبه‌روز در حال افزایش است در نتیجه در سال‌های اخیر پژوهشگران با تمرکز بر گیاهان دارویی و محصولات ارزشمند آن‌ها در پی ارائه روشی مناسب برای افزایش بهره‌وری صنعتی از این گیاهان می‌باشند (*Gutiérrez-García et al.*, 2022; *Lu et al.*, 2018; *Robert-Seilaniantz et al.*, 2011). به‌طور کلی به‌دلیل ناشناخته ماندن جزئیات مسیر بیوستتزی اغلب متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی تغییر و دست‌ورزی این مسیرها محققان را با

از مجموع تعداد ۴۴۱ ژن هدف، تعداد ۳۵۰ ژن با تخریب شدن و تعداد ۹۱ ژن با عدم ترجمه شدن توسط ۵ ریز RNA شناسایی شده تنظیم می‌شوند. در این مطالعه، از پایگاه KEGG به‌منظور غنی‌سازی مسیرهای متابولیکی ژن‌های هدف ریز RNA استفاده گردید و در مجموع شش مسیر متابولیکی شامل، متابولیسم بوتانوات، متابولیسم گلیکوزیلات و دی‌کربوکسیلات، متابولیسم ساکاروز و نشاسته، مسیر تثبیت کربن در اندامک‌های فتوسنتزی، مسیر تجزیه اسیدهای چرب و پروکسیزوم شناسایی شدند. miR408 و پس از آن miR169 با نقش تنظیمی در ۶ و ۴ مسیر به‌ترتیب بیشترین میزان تأثیرگذاری در مسیرهای متابولیکی غنی‌شده توسط ژن‌های هدف را نشان دادند (شکل ۶).

مطالعه *Unver et al.* (2010) با هدف شناسایی miRNAها دخیل در تنظیم بیوستت آلکالوئیدها در خشخاش منجر به شناسایی گروهی از miRNAها از جمله miR408 شد. تلاش برای شناسایی miRNAهای احتمالی مؤثر بر بیوستت تاکسول، نشان داد که دو آنزیم بیوستتزی پاکیتاکسل (تاکسان ۱۳ آلفا هیدروکسیلاز و تاکسان ۲ آلفا-O-بزنوئیل ترانسفرز)، به‌ترتیب اهداف miR171 هستند (*Jennewein*

Lu *et al.*, 2018; Ražná *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2019).

چالش‌های جدی روبه‌رو ساخته‌است. miRNA یکی از مهم‌ترین اجزای تنظیمی در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در اغلب گیاهان به‌شمار می‌رود که می‌توانند با مهار بیان برخی از ژن‌ها تولید متابولیت



شکل ۶. شبکه مسیره‌های متابولیکی غنی‌شده مرتبط با اهداف ژنی ریز RNAهای شناسایی‌شده در ترنسکریپتوم برگ کلوس. اندازه دایره‌ها، معنی‌داری مسیره‌های متابولیکی غنی‌شده؛ مربع‌ها: ژن‌های هدف دخیل در مسیر بیوسنتزی و مثلث‌ها: ریز RNAهای محافظت‌شده در ترنسکریپتوم برگ کلوس را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری کلی
تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، از طریق شبکه پیچیده‌ای از ژن‌ها و عوامل کلیدی مانند ریز RNA کنترل می‌شود، از این‌رو استفاده از روش‌های به‌نژادی سنتی به‌تنهایی برای افزایش یا کاهش این متابولیت‌ها کارساز نبوده و انتخاب مناسبی نخواهد بود. گیاه کلوس نیز از جمله گیاهان دارویی است که برنامه‌های به‌نژادی آن به‌علت فقدان اطلاعات ژنتیکی با سرعت کم در حال پیشرفت است. در مطالعه حاضر به‌منظور افزایش محتوای اطلاعات ژنتیکی کلوس، پس از توالی‌یابی محتوای ترنسکریپتومی این گیاه، برای اولین بار مرجع ترنسکریپتومی جامعی برای این گیاه ارزشمند سرهم‌بندی شد. مرجع ترنسکریپتومی ایجاد شده در مطالعه حاضر منبع بسیار غنی برای بررسی و تعیین خصوصیات ریز RNAهای محافظت‌شده گیاه کلوس تشخیص داده شد، به‌طوری‌که برای اولین در این مطالعه توالی ۵ ریز RNA محافظت‌شده در گیاه کلوس شناسایی شدند. در میان microRNAهای شناسایی‌شده در این مطالعه miR408 با تنظیم بیان ژن‌های شش مسیر متابولیکی به‌عنوان تأثیرگذارترین microRNA محافظت‌شده در ترنسکریپتوم کلوس معرفی شد. درنهایت با توجه به نقش تنظیمی ریز RNAهای شناسایی‌شده در این مطالعه بر گروه وسیعی از عوامل ژنتیکی از جمله خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی و تأثیر بالقوه آن‌ها در تغییر طیف وسیعی از ژن‌های پایین‌دستی شبکه‌های ژنی، می‌توان از ریز

مطالعه حاضر منبع بسیار غنی برای بررسی و تعیین خصوصیات ریز RNAهای محافظت‌شده گیاه کلوس تشخیص داده شد، به‌طوری‌که برای اولین در این مطالعه توالی ۵ ریز RNA محافظت‌شده در گیاه کلوس شناسایی شدند. در میان microRNAهای شناسایی‌شده در این مطالعه miR408 با تنظیم بیان ژن‌های شش مسیر متابولیکی به‌عنوان تأثیرگذارترین microRNA محافظت‌شده در ترنسکریپتوم کلوس معرفی شد. درنهایت با توجه به نقش تنظیمی ریز RNAهای شناسایی‌شده در این مطالعه بر گروه وسیعی از عوامل ژنتیکی از جمله خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی و تأثیر بالقوه آن‌ها در تغییر طیف وسیعی از ژن‌های پایین‌دستی شبکه‌های ژنی، می‌توان از ریز

سیاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای بیژن صفری به‌دلیل همکاری در جمع‌آوری و ارسال بذره‌های مورد استفاده در این پژوهش تقدیر و تشکر می‌گردد.

RNAهای شناسایی‌شده در این مطالعه به‌عنوان ژن‌های کاندید در ارتقای صفات کمی و کیفی گیاه کلوس استفاده نمود.

REFERENCES

- Ahmadi, F., Kadivar, M., & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. [Article]. *Food Chemistry*, 105(1), 57-64. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.056
- Ahmadi, K., Omidi, H., Amini Dehaghi, M., & Naghdi Badi, H. (2019). A Review on the Botanical, Phytochemical and Pharmacological Characteristics of *Kelussia odoratissima* Mozaff. (*Kelussia odoratissima* Mozaff.]. *JMPIR*, 18(72), 30-45. doi: 10.29252/jmp.4.72.S12.30
- Ahmadi, K., Omidi, H., Amini Dehaghi, M., & Soltani, E. (2021). Evaluation of dormancy breaking treatments on seed germination and soluble compounds of *Kelussia odoratissima* Mozaff. seedling. [Article]. *Plant Physiology Reports*, 26(3), 513-525. doi: 10.1007/s40502-021-00594-0
- Akbarian, A., Rahimmalek, M., Sabzalian, M. R., & Hodaei, M. (2021). Sequencing and phylogenetic analysis of phenylalanine ammonia lyase (pal) and chalcone synthase (chs) genes in some Iranian endemic species of Apiaceae. *Gene Reports*, 23, 101147.
- Akbarian, A., Rahimmalek, M., Sabzalian, M. R., & Sarfaraz, D. (2019). Variation in essential oil composition, phenolic, flavonoid and antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff based on three model systems. [Article]. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 13. doi: 10.1016/j.jarmap.2019.100208
- Akkafi, H. R., Valivand, M., & Jenabi, T. (2014). Autecological, palynological and karyological characterization of *Kelussia odoratissima* Mozaff. (A case study in Dare Sepestan region from Fereydoon shahr in Isfahan province). *Iranian Journal of Plant Biology*, 6(19), 125-140.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Amiripour, M., Sadat Noori, S. A., Shariati, V., & Soltani Howyze, M. (2019). Transcriptome analysis of Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) inflorescence. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 28(4), 496-508. doi: 10.1007/s13562-019-00504-4
- Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., & Wingett, S. (2020). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Online]. 2010. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Accessed, 27.
- Bae, S. H., Oh, J. H., & Lee, J. (2021). Identification of Interspecific and Intraspecific Single Nucleotide Polymorphisms in *Papaver* spp. [Article]. *Plant Breeding and Biotechnology*, 9(1), 55-64. doi: 10.9787/PBB.2021.9.1.55
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Cao, B., Jiang, J., Bai, J., Wang, X., Li, Y., Shao, W., & Yu, X. (2022). miR398

- Attenuates Heat-Induced Leaf Cell Death via Its Target CSD1 in Chinese Cabbage. [Article]. *Horticulturae*, 8(4).
doi: 10.3390/horticulturae8040299
- Dai, X., & Zhao, P. X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W155-W159.
- Ding, J., Zhou, S., & Guan, J. (2012). Finding microRNA targets in plants: current status and perspectives. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 10(5), 264-275.
doi: 10.1016/j.gpb.2012.09.003
- Fu, N., Wang, Q., & Shen, H.-L. (2013). De Novo Assembly, Gene Annotation and Marker Development Using Illumina Paired-End Transcriptome Sequences in Celery (*Apium graveolens* L.). *PLOS ONE*, 8(2), e57686.
doi: 10.1371/journal.pone.0057686
- Fu, Y., Mason, A. S., Zhang, Y., Lin, B., Xiao, M., Fu, D., & Yu, H. (2019). MicroRNA-mRNA expression profiles and their potential role in cadmium stress response in *Brassica napus*. [Article]. *BMC Plant Biology*, 19(1).
doi: 10.1186/s12870-019-2189-9
- Gantet, P., & Memelink, J. (2002). Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *J Trends in Pharmacological Sciences*, 23(12), 563-569.
- Gao, Y., Feng, B., Gao, C., Zhang, H., Wen, F., Tao, L., & Xiong, J. (2022). The Evolution and Functional Roles of miR408 and Its Targets in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1).
doi: 10.3390/ijms23010530
- Gilbert, D. (2016). *Accurate & complete gene construction with EvidentialGene*. Paper presented at the Galaxy Community Conference.
- Gleave, A. P., Ampomah-Dwamena, C., Berthold, S., Dejnopratt, S., Karunairetnam, S., Nain, B., & MacDiarmid, R. M. (2008). Identification and characterisation of primary microRNAs from apple (*Malus domestica* cv. Royal Gala) expressed sequence tags. *Tree Genetics & Genomes*, 4(2), 343-358.
- González-Mendoza, D., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T., Grimaldo-Juarez, O., Cecena-Duran, C., Duran-Hernandez, D., & Gutierrez-Miceli, F. (2018). Changes in the phenylalanine ammonia lyase activity, total phenolic compounds, and flavonoids in *Prosopis glandulosa* treated with cadmium and copper. *J Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 1465-1472.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., & Zeng, Q. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29(7), 644-652.
- Guo, J., Huang, Z., Sun, J., Cui, X., & Liu, Y. (2021). Research Progress and Future Development Trends in Medicinal Plant Transcriptomics. [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 12.
doi: 10.3389/fpls.2021.691838
- Gutiérrez-García, C., Ahmed, S. S. S. J., Ramalingam, S., Selvaraj, D., Srivastava, A., Paul, S., & Sharma, A. (2022). Identification of microRNAs from medicinal plant *Murraya Koenigii* by high-throughput sequencing and their functional implications in secondary metabolite biosynthesis. [Article]. *Plants*, 11(1).
doi: 10.3390/plants11010046
- Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 3-14.
doi: 10.1016/j.addr.2015.05.001
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., & Bailey, P.

- C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular biology*, 20(5), 735-747.
- Hu, T., Gao, Z. Q., Hou, J. M., Tian, S. K., Zhang, Z. X., Yang, L., & Liu, Y. (2020). Identification of biosynthetic pathways involved in flavonoid production in licorice by RNA-seq based transcriptome analysis. [Article]. *Plant Growth Regulation*, 92(1), 15-28. doi: 10.1007/s10725-020-00616-1
- Iorizzo, M., Senalik, D. A., Grzebelus, D., Bowman, M., Cavagnaro, P. F., Matvienko, M., & Simon, P. W. (2011). De novo assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity. *BMC Genomics*, 12, 389. doi: 10.1186/1471-2164-12-389
- Javani, R., & Asadi-Gharneh, H. A. (2020). Mineral composition in populations of Iranian wild celery. [Article]. *International Journal of Vegetable Science*, 26(1), 55-61. doi: 10.1080/19315260.2019.1604603
- Jennewein, S., Rithner, C. D., Williams, R. M., & Croteau, R. B. (2001). Taxol biosynthesis: Taxane 13-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. 98(24), 13595-13600. doi:10.1073/pnas.251539398
- Jeshvaghani, Z. A., Rahimmalek, M., Talebi, M., Goli, S. A. H., & Products. (2015). Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in different *Salvia* species using three model systems. *Industrial Crops*, 77, 409-414.
- Jeyakumar, J. M. J., Ali, A., Wang, W. M., & Thiruvengadam, M. (2020). Characterizing the role of the miR156-SPL network in plant development and stress response. [Review]. *Plants*, 9(9), 1-15. doi: 10.3390/plants9091206
- Joshi, B. C., Juyal, V., Sah, A. N., Verma, P., & Mukhija, M. (2022). Review on Documented Medicinal Plants used for the Treatment of Cancer. [Review]. *Current Traditional Medicine*, 8(2), 2-158. doi: 10.2174/2215083807666211011125110
- Khadijeh, A., Heshmat, O., Majid, A. D., & Hasanali, N. B. (2020). A review on the botanical, phytochemical and pharmacological characteristics of *Kelussia odoratissima* Mozaff. [Article]. *Journal of Medicinal Plants*, 18(72).
- Khanavi, M., Ghadami, S., Sadaghiani-Tabrizi, G., & Delnavazi, M. R. (2021). Phytochemical constituents of the fruits of *Kelussia odoratissima* Mozaff., an aromatic plant endemic to Iran. [Article]. *Journal of Medicinal Plants*, 20(79), 1-13. doi: 10.52547/jmp.20.79.1
- Konrath, E. L., Arbo, M. D., Arbo, B. D., Hort, M. A., Elisabetsky, E., & Leal, M. B. (2021) Plants with Anti-Addictive Potential. Vol. 1308. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 185-215).
- Kuang, X., Du, J.-R., Liu, Y.-X., Zhang, G.-Y., & Peng, H.-Y. (2008). Postischemic administration of Z-Ligustilide ameliorates cognitive dysfunction and brain damage induced by permanent forebrain ischemia in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 88(3), 213-221. doi: https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.08.006
- Li, L., Xu, J., Yang, D., Tan, X., & Wang, H. (2010). Computational approaches for microRNA studies: a review. *Mammalian Genome*, 21(1), 1-12. doi: 10.1007/s00335-009-9241-2
- Li, W.-X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.-J., Wu, J.-M., Iida, K., & Zhu, J.-K. (2008). The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote

- drought resistance. *The Plant Cell*, 20(8), 2238-2251.
- Li, Z., & Thomas, T. L. (1998). PEI1, an embryo-specific zinc finger protein gene required for heart-stage embryo formation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(3), 383-398.
- Lin, K. Y., Wu, S. Y., Hsu, Y. H., & Lin, N. S. (2022). MiR398-regulated antioxidants contribute to Bamboo mosaic virus accumulation and symptom manifestation. [Article]. *Plant Physiology*, 188(1), 593-607. doi: 10.1093/plphys/kiab451
- Liu, H., Shi, J., Wu, M., & Xu, D. (2021). The application and future prospect of RNA-Seq technology in Chinese medicinal plants. [Review]. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 24. doi: 10.1016/j.jarmap.2021.100318
- Lu, Q., Guo, F., Xu, Q., & Cang, J. (2020). LncRNA improves cold resistance of winter wheat by interacting with miR398. [Article]. *Functional Plant Biology*, 47(6), 544-557. doi: 10.1071/FP19267
- Lu, Y., Gao, W., & Huang, L. Q. (2018). Synthesis and regulation of secondary metabolites by microRNA in medicinal plants. [Article]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 43(9), 1806-1811.
- Ma, X., Tang, K., Tang, Z., Dong, A., Xiao, H., Meng, Y., & Wang, P. (2022). An organ-specific transcriptomic atlas of the medicinal plant *Bletilla striata*: Protein-coding genes, microRNAs, and regulatory networks. [Article]. *Plant Genome*, 15(2). doi: 10.1002/tpg2.20210
- Mandhan, V., Kaur, J., & Singh, K. (2012). smRNAome profiling to identify conserved and novel microRNAs in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC plant biology*, 12(1), 1-15.
- Mangukia, N., Rao, P., Patel, K., Pandya, H., & Rawal, R. M. (2022). Unveiling the nature's fruit basket to computationally identify *Citrus sinensis* csi-mir169-3p as a probable plant miRNA against Reference and Omicron SARS-CoV-2 genome. [Article]. *Computers in Biology and Medicine*, 146. doi: 10.1016/j.combiomed.2022.105502
- Mathiyalagan, R., Subramaniam, S., Natarajan, S., Kim, Y. J., Sun, M. S., Kim, S. Y., & Yang, D. C. (2013). Insilico profiling of microRNAs in Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer). *Ginseng Res*, 37(2), 227-247. doi: 10.5142/jgr.2013.37.227
- Mehta, A., Gupta, H., Rawal, R., Mankad, A., Tiwari, T., Patel, M., & Ghosh, A. (2016). In silico microRNA identification from *stevia rebaudiana* transcriptome assembly. *European Journal of Medicinal Plants*, 1-14.
- Mercati, F., Fontana, I., Gristina, A. S., Martorana, A., El Nagar, M., De Michele, R., & Carimi, F. (2019). Transcriptome analysis and codominant markers development in caper, a drought tolerant orphan crop with medicinal value. [Article]. *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-46613-x
- 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. doi: 10.30473/cb.2019.42829.1754
- Mirzaei, F., Norouzi, R., Siyatpanah, A., Mitsuwan, W., Nilforoush-zadeh, M., Maleksabet, A., & Hejazi, S. H. (2020). Butanol Fraction of *Kelussia odoratissima* Mozaff Inhibits the Growth of *Leishmania major* Promastigote and Amastigote.

- [Article]. *World's Veterinary Journal*, 10(2), 254-259.
doi: 10.36380/scil.2020.wvj33
- Muzaffarian, W. (2007). *Umbelliferae. Flora of Iran: Forests and Rangelands Research Institute.*
- Ono, H., Ishii, K., Kozaki, T., Ogiwara, I., Kanekatsu, M., & Yamada, T. (2015). Removal of redundant contigs from de novo RNA-Seq assemblies via homology search improves accurate detection of differentially expressed genes. *BMC genomics*, 16(1), 1-13.
- Padmashree, D., & Ramachandraswamy, N. (2016). Identification and characterization of conserved miRNAs with its targets mRNA in *Trichinella Spiralis*. *Bioinformation*, 12(5), 279.
- Palumbo, F., Vannozzi, A., & Barcaccia, G. (2021). Impact of Genomic and Transcriptomic Resources on Apiaceae Crop Breeding Strategies. 22(18), 9713.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 12(17), 1484-1495. doi: 10.1016/s0960-9822(02)01017-5
- Pirí, S., Zanella, L., Kenzo, M., Montesano, C., Minutolo, A., Potesta, M., & Galgani, A. (2016). MicroRNA from *moringa oleifera*: Identification by high throughput sequencing and their potential contribution to plant medicinal value. [Article]. *PLoS ONE*, 11(3).
doi: 10.1371/journal.pone.0149495
- Preston, J. C. (2020). Insights into the evolution of plant reproduction using next-generation sequencing approaches. *Journal of Experimental Botany*, 72(5), 1536-1545.
doi: 10.1093/jxb/eraa543
- Quinlan, A. R. (2014). BEDTools: the Swiss-army tool for genome feature analysis. *Current protocols in bioinformatics*, 47(1), 11.12. 11-11.12. 34.
- Ražná, K., Bežo, M., Hlavacková, L., Žiarovská, J., Miko, M., Gažo, J., & Habán, M. (2016). MicroRNA (miRNA) in food resources and medicinal plant. [Article]. *Potravinarstvo*, 10(1), 188-194.
doi: 10.5219/583
- Ren, Q., Liu, X. Q., Zhou, X. W., Zhou, X., Fang, G., Wang, B., & Li, X. T. (2021). Effects of Huatan Jiangzhuo decoction on diet-induced hyperlipidemia and gene expressions in rats. [Article]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 19(2), 100-111.
doi: 10.1016/S1875-5364(21)60011-0
- Robert-Seilaniantz, A., MacLean, D., Jikumaru, Y., Hill, L., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., & Jones, J. D. G. (2011). The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. [Article]. *Plant Journal*, 67(2), 218-231.
doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04591.x
- Salamon, S., Žok, J., Gromadzka, K., & Błaszczuk, L. (2021). Expression patterns of mir398, mir167, and mir159 in the interaction between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and pathogenic *Fusarium culmorum* and beneficial *Trichoderma* fungi. [Article]. *Pathogens*, 10(11).
doi: 10.3390/pathogens10111461
- Salimi, M., Ebrahimi, A., Shojaee Asadieh, Z., & Saei Dehkordi, S. (2010). Essential oil composition of *Kelussia odoratissima* Mozaff. *Iranian Journal of Medicinal Aromatic Plants Research*, 26(2), 147-156.
- Schluttenhofer, C., & Yuan, L. (2017). Challenges towards Revitalizing Hemp: A Multifaceted Crop. [Review]. *Trends in Plant Science*, 22(11), 917-929.
doi: 10.1016/j.tplants.2017.08.004
- Singh, K. B., Foley, R. C., & Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription

- factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 430-436.
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*, 122(1), e59. doi: 10.1002/cpmb.59
- Smith-Unna, R., Bournnell, C., Patro, R., Hibberd, J. M., & Kelly, S. (2016). TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome research*, 26(8), 1134-1144.
- Sohrabi, S. S., Ismaili, A., Nazarian, F., & Hossein, F. (2020). Identification and characterization of conserved miRNAs in lentil. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 32(4), 432-444.
- Song, Z. H., Ji, Z. N., Lo, C. K., Dong, T. T., Zhao, K. J., Li, O. T., & Tsim, K. W. (2004). Chemical and biological assessment of a traditional chinese herbal decoction prepared from Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis: orthogonal array design to optimize the extraction of chemical constituents. *Planta Med*, 70(12), 1222-1227. doi: 10.1055/s-2004-835855
- Sorin, C., Declerck, M., Christ, A., Blein, T., Ma, L., Lelandais-Brière, C., & Hartmann, C. (2014). A mi R 169 isoform regulates specific NF-YA targets and root architecture in A rabidopsis. *New Phytologist*, 202(4), 1197-1211.
- Spyropoulou, E. A., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2014). RNA sequencing on Solanum lycopersicum trichomes identifies transcription factors that activate terpene synthase promoters. *BMC genomics*, 15(1), 1-16.
- Sunkar, R., & Jagadeeswaran, G. (2008). In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC plant biology*, 8(1), 1-13.
- Torki, A., Hosseinabadi, T., Fasihzadeh, S., Sadeghimanesh, A., Wibowo, J. P., & Lorigooini, Z. (2018). Solubility of calcium oxalate and calcium phosphate crystallization in the presence of crude extract and fractions from Kelussia odoratissima Mozaff. [Article]. *Pharmacognosy Research*, 10(4), 379-384. doi: 10.4103/pr.pr_68_18
- Unver, T., Parmaksiz, I., & Dündar, E. (2010). Identification of conserved micro-RNAs and their target transcripts in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Plant Cell Rep*, 29(7), 757-769. doi: 10.1007/s00299-010-0862-4
- Wang, H., & Wang, H. (2015). The miR156/SPL module, a regulatory hub and versatile toolbox, gears up crops for enhanced agronomic traits. [Review]. *Molecular Plant*, 8(5), 677-688. doi: 10.1016/j.molp.2015.01.008
- Wang, J., Zhou, Z., Tao, Q., Chen, X., Shui, C., Ren, X., & Liang, M. (2022). Brassica napus miR169 regulates BnaNF-YA in salinity, drought and ABA responses. [Article]. *Environmental and Experimental Botany*, 199. doi: 10.1016/j.envexpbot.2022.104882
- Wang, X., Chen, S., Ma, X., Yssel, A. E. J., Chaluvadi, S. R., Johnson, M. S., & Van Deynze, A. (2021). Genome sequence and genetic diversity analysis of an under-domesticated orphan crop, white fonio (*Digitaria exilis*). [Article]. *GigaScience*, 10(3). doi: 10.1093/gigascience/giab013
- Xie, F., Frazier, T. P., & Zhang, B. (2010). Identification and characterization of microRNAs and their targets in the bioenergy plant switchgrass (*Panicum virgatum*). *Planta*, 232(2), 417-434.

- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., & Carrington, J. C. (2005). Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant physiology*, 138(4), 2145-2154.
- Xu, M. Y., Zhang, L., Li, W. W., Hu, X. L., Wang, M.-B., Fan, Y. L., & Wang, L. (2014). Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in Arabidopsis thaliana. *Journal of experimental botany*, 65(1), 89-101.
- Yang, R., Zeng, Y., Yi, X., Zhao, L., & Zhang, Y. (2015). Small RNA deep sequencing reveals the important role of microRNAs in the halophyte *Halostachys caspica*. *Plant Biotechnol J*, 13(3), 395-408.
doi: 10.1111/pbi.12337
- Yang, Y., Li, M., & Yi, Y. (2017). The miRNAomes in *Rehmannia glutinosa* roots exposed to different levels of replanting disease pressure. [Article]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(1), 77-84.
doi: 10.17957/IJAB/15.0244
- Younessi-Hamzekhanlu, M., Ozturk, M., Jafarpour, P., & Mahna, N. (2022). Exploitation of next generation sequencing technologies for unraveling metabolic pathways in medicinal plants: A concise review. [Review]. *Industrial Crops and Products*, 178.
doi: 10.1016/j.indcrop.2022.114669
- Yu, D., Lu, J., Shao, W., Ma, X., Xie, T., Ito, H., & Meng, Y. (2019). MepmiRDB: A medicinal plant microRNA database. [Article]. *Database*, 2019(1).
doi: 10.1093/database/baz070
- 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.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.002>
- Zhang, B., Pan, X., & Anderson, T. A. (2006a). MicroRNA: a new player in stem cells. *Journal of cellular physiology*, 209(2), 266-269.
- Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006b). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*, 46(2), 243-259.
- Zhang, B., Pan, X., Cox, S., Cobb, G., & Anderson, T. (2006c). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(2), 246-254.
- Zhao, L., Chen, C., Wang, Y., Shen, J., & Ding, Z. (2019). Conserved MicroRNA act boldly during sprout development and quality formation in pingyang tezaocha (*camellia sinensis*). [Article]. *Frontiers in Genetics*, 10(MAR).
doi: 10.3389/fgene.2019.00237
- Zheng, C., Ye, M., Sang, M., & Wu, R. (2019). A regulatory network for mir156-spl module in arabidopsis thaliana. [Review]. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24).
doi: 10.3390/ijms20246166
- Zhu, X., Leng, X., Sun, X., Mu, Q., Wang, B., Li, X., & Fang, J. (2015). Discovery of Conservation and Diversification of miR171 Genes by Phylogenetic Analysis based on Global Genomes. *The Plant Genome*, 8(2), plantgenome2014.2010.0076.
doi: <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.10.0076>