

شناسایی ریز RNA و ژن‌های هدف مرتبط در گیاه دارویی مرزه خوزستانی

سمیه شمس^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۳ و حسن مومیوند^۴

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

پست الکترونیک: ismaili.a@lu.ac.ir

۳- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۷

چکیده

میرناها (microRNAها)، دسته‌ای از مولکول‌های تنظیم‌کننده کوچک و غیر کدکننده هستند که بیان ژن را از طریق تخریب رونویسی یا سرکوب ترجمه تنظیم می‌کنند. میرناها، در تنظیم گستره وسیعی از فرایندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان مشارکت دارند. خانواده نعناع به‌ویژه مرزه خوزستانی، گیاهان شناخته شده‌ای از نظر طعم، عطر و خواص دارویی هستند. تاکنون هیچ‌گونه گزارشی از شناسایی میرنا برای گیاه دارویی مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) ثبت نشده است. از این رو، در این مطالعه برای پیش‌بینی میرنا و ژن‌های هدفشان در مرزه خوزستانی، از رویکرد محاسباتی مبتنی بر جستجوی همسانی استفاده شد. یونی‌ژن‌های غیرکدکننده به‌عنوان توالی‌های کاندید پیش‌ساز میرنا در نظر گرفته شدند. در نهایت پس از ارزیابی پارامترهای عمومی درصد باز GC، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE)، شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) و ساختار ثانویه ۵۸ میرنا شناسایی شد که از بین آنها با اعمال معیارهای شناسایی اختصاصی گیاهان و پالایش میرناهای پیش‌بینی شده از چند رونوشت، در نهایت ۱۰ میرنا شناسایی شد. سپس ۹۳۰ رونوشت هدف با استفاده از وب‌سایت psRNATarget برای آنها پیش‌بینی و با استفاده از ابزار BLASTx نرم‌افزار NCBI Blast+ (v2.6.0) تفسیر کارکردی شد. بررسی ژن‌های هدف نشان داد که ژن‌های پاسخ‌دهنده اکسین، ژن‌های GRAS ((Argonaute 2 (AGO2 و ژن-های خانواده LACCASE (Laccase) از اهداف عمده میرناهای شناسایی شده در مرزه خوزستانی هستند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر در ژن‌های هدف نشان داد که مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه به‌طور معنی‌داری جزء اهداف میرناهای شناسایی شده هستند. این مطالعه، اولین گزارش از شناسایی میرنا در مرزه خوزستانی بوده که نقش آنها را در تنظیم ژن‌های هدف توصیف می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های هدف، مرزه خوزستانی، میرنا.

مقدمه

خوزستان در کشور ایران (Mirjani et al., 2018) و متعلق به خانواده نعناعیان است (Jamzad, 1994). مهمترین ترکیبات اسانس مرزه خوزستانی و رشینگری (Jamzad

مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) از گونه‌های انحصاری جنس مرزه در استان‌های لرستان و

برای شناسایی آنها بررسی شده است (Wang et al., 2012). در مطالعه‌ای مشابه که با هدف شناسایی میرناهای محافظت شده در گیاه برگ شیرین (*Stevia rebaudiana*) انجام شده است، کارایی بالای استفاده از داده‌های RNA-Seq برای شناسایی میرناهای محافظت شده بررسی شده است (Mehta et al., 2016). در تحقیقی دیگر با استفاده از داده‌های RNA-Seq، پنج میرنا متعلق به پنج خانواده حفاظت شده در گیاه عدس (*ssp. culinaris Medicus*) شناسایی شد (Sohrabi et al., 2019). شناسایی miRNAها و ژنهای هدف مرتبط با آنها در گیاه شبدر قرمز (*Trifolium pratense*) انجام شده است (Naghavi and Karimi, 2018). در گیاه عدس مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه جزء اهداف میرناها هستند. در مطالعه‌ای دیگر، یازده میرنا در گیاه دارویی نعناع (*spp*) (*Mentha*) شناسایی و ۱۳۰ ژن هدف برای آنها مشخص شد که در فرایندهای گوناگون تولیدمثل، سیگنال‌دهی و متابولیک تکاملی دخیل هستند (Singh et al., 2016). در گیاه نعناع کوهی (*Mentha x piperit*) نشان داده شد که miR5021 از طریق مسیر موالونات در بیوسنتز ترپنوئیدها دخالت می‌کند. از سویی، آنزیم‌های بالادستی در مسیرهای بیوسنتز ترپنوئیدها، از جمله ۱-دئوکسی-دی-زایلولوز ۵-فسفات سنتاز (DXS)، ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMGR)، ایزوپنتنیل دی فسفات سنتاز (IDS) و ایزوپنتنیل دی فسفات ایزومراز (IDI) توسط miR7539، miR5021 و miR1134 مورد هدف قرار می‌گیرند (Fan et al., 2015).

با توجه به اینکه میرناها از نظر تکاملی حفاظت شده هستند، در سال‌های اخیر روش‌های تشخیص و تجزیه و تحلیل میرناها به سرعت توسعه یافته است. چهار روش برای شناسایی میرنا وجود دارد: (۱) غربالگری ژنتیکی، (۲) شبیه‌سازی مستقیم پس از جداسازی RNA های کوچک، (۳) راهبرد محاسباتی و (۴) تجزیه و تحلیل توالی‌های EST (Li et al., 2010). در این بین، راهبرد محاسباتی سریع‌تر و بسیار کم هزینه‌تر از سایر روش‌ها بوده

شامل کارواکرول (بالای ۹۰ درصد)، پاراسیمین، آلفا ترپینن، لیمونن، ۱-۸-سینتول، یوگونول و میرسن می‌باشد. مرزه به علت مقدار کارواکرول بالا در اسانس و اسیدهای فنولی آزاد، به‌ویژه رزماریک اسید در عصاره برای اهداف تجاری بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Sefidkon et al., 2004). کارواکرول موجود در اسانس مرزه دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد انگلی است (Shariat et al., 2017).

با توجه به اینکه تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق شبکه پیچیده‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شوند، استفاده از روش‌های اصلاحی سنتی برای افزایش یا کاهش این متابولیت‌ها به تنهایی انتخاب مناسبی نخواهد بود (Goossens et al., 2003). با توجه به اهمیت بی‌نظیر این مواد شیمیایی، درک تنظیم مسیر بیوسنتز آنها بسیار مهم است (Dudareva et al., 2006). البته، مطالعات گذشته در شناسایی و توصیف خصوصیات ژن‌ها و آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز ترپنوئیدهای فرار پیشرفت چشمگیری داشته است (Gupta et al., 2017). با وجود دانش موجود از نقش تنظیمی میرناها، دخالت آنها در تنظیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی هنوز به‌خوبی درک نشده است. تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم می‌تواند در شناسایی ژن‌ها، مسیرهای متابولیکی و شبکه‌های تنظیمی آنها مفید باشد. توالی‌یابی با کارایی بالا یکی از جدیدترین روش‌های ژنومیکس است که شناسایی ژن‌ها و همچنین بازسازی شبکه‌های ژنی را ممکن کرده است (Hao et al., 2012).

میرناها توالی‌های تنظیمی و غیر کدکننده هستند که توانایی تنظیم بیان ژن را در سطح پس از رونویسی دارند (Li et al., 2010). میرناها در نمو گیاهی، انتقال سیگنال و پاسخ به تنش‌های محیطی موثرند (Zhang et al., 2006b). سازوکار عمل میرناها از طریق جفت‌شدگی با نواحی مکمل خود در توالی هدف است (Castel and Martienssen, 2013). تاکنون تعداد زیادی میرنا و ژن‌های هدفشان در گونه‌های مختلف گیاهی مانند آرابیدوسیس، تنباکو، پنبه و غیره شناسایی و کارایی استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی

سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز رویی دور ریخته شد و برای شستشو $100 \mu\text{l}$ اتانول ۷۵ درصد روی پلت اضافه و با دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه در دمای منفی ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. میکروتیوب حاوی پلت شفاف رنگ در زیر هود خشک گردید و RNA رسوب شده در ۳۰ میکرولیتر آب دیس حل شد.

غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودرآپ تعیین شد. خلوص نمونه‌های RNA استخراج شده، با بررسی نسبت‌های OD ارزیابی شد. ویژگی RNA Integrity Number (RIN) یک شاخص اندازه‌گیری دقیق از کیفیت RNA است. از این رو، میزان RIN نمونه‌های RNA با استفاده از Agilent Bioanalyzer تعیین شد. کیفیت RNA استخراجی توسط الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد تعیین گردید. سه کتابخانه cDNA برای هر نمونه با استفاده از کیت TruSeq™ RNA Sample Preparation Illumina بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آماده‌سازی و با استفاده از پلتفرم Illumina HiSeq ۲۵۰۰ به صورت طول خوانش ۱۵۰ جفت باز و دو طرفه (end-Paired) توالی‌یابی شد.

پردازش داده‌های RNA-Seq و سرهم‌بندی به روش نوپدید خوانش‌های خام با استفاده از نرم‌افزار FastQC کنترل کیفیت شدند. پیرایش با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic-0.36 انجام شد. سرهم‌بندی به روش نوپدید بر روی توالی‌های دارای کیفیت بالا (پس از حذف کانتینگ‌های اضافی) با استفاده از نرم‌افزار Trinity با تعیین k-mer مساوی ۲۵ انجام شد (Haas et al., 2013).

شناسایی میرناهای محافظت شده

پس از سرهم‌بندی نوپدید، از رونوشت‌های حاصل برای شناسایی میرناهای محافظت شده استفاده شد. با توجه به اینکه برخی از خانواده‌های میرناهای بالغ در طی تکامل بسیار حفاظت شده هستند، همسانی توالی‌های مورد نظر با میرناهای بالغ گیاهی موجود در پایگاه داده miRBase از

و از ویژگی محافظت‌شدگی بالای میرناها برای شناسایی آنها استفاده می‌کند.

با توجه به در دسترس نبودن ژنوم گیاه مرزه و نبود هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد میرناهای این گیاه، این مطالعه اولین چشم‌انداز از شناسایی میرناهای محافظت‌شده از طریق داده‌های ترنسکرپتومی گیاه مرزه خوزستانی می‌باشد و می‌تواند برای تحقیقات آینده روی این گیاه ارزشمند مفید باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاهچه‌های مرزه خوزستانی از شرکت تولید گیاهان دارویی و کشت و صنعت خرمان، شهر خرم‌آباد، استان لرستان (ایران) تهیه شدند. تمامی مراحل کشت، نگهداری و پرورش گیاهان در شرایط تحت کنترل گلخانه با دمای 25°C و شرایط نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی انجام شد. برگ‌ها در مرحله گلدهی جمع‌آوری شدند. همه نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استفاده در دمای منفی 80°C نگهداری شدند.

استخراج RNA، آماده سازی کتابخانه RNA-Seq و

توالی‌یابی ایلومینا

استخراج RNA کل با استفاده از ترايزول (Invitrogen) انجام شد. مقدار اندکی بافت تازه برگ گیاهی (۱۰۰ میلی‌گرم) در هاون چینی توسط ازت مایع کاملاً پودر شد. سپس به میکروتیوب با حجم ۲ml انتقال داده و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بافر ترايزول به نمونه اضافه شد و به مدت ده دقیقه ورتکس گردید. فاز رویی به تیوب ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شد و هم حجم محلول کلروفورم اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ در دمای منفی ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس فاز رویی به تیوب جدید منتقل و نصف حجم محلول به آن ایزوپروپانول اضافه گردید و در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از مدت ۱۰ دقیقه، میکروتیوب از فریزر خارج و با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای منفی ۴ درجه

بیشتر از ۸۵ کیلوکالری بر مول (Mehta et al., 2016)، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده (AMFE) و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFEI) بالاتر از انواع دیگر RNAها استفاده شد. ثبات دوبلکس میرنا-میرنا* توسط miRdup ارزیابی شد. میرناهای کاندید برای شناسایی میرناهای واقعی، بوسیله وب سرور miRNA-dis بررسی گردید.

پیش بینی ژن های هدف میرنا

برای پیش بینی ژن های هدف میرناها با استفاده از وب-سایت psRNATarget، توالی میرناهای شناسایی شده علیه رونوشت های گیاه *Arabidopsis thaliana* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Dai and Zhao, 2011). پارامترهای پیش فرض نسخه ۲۰۱۷ این وب سایت (به استثنای gap با در نظر گرفتن بدون هیچ فاصله) برای شناسایی ژن های هدف استفاده شد.

مستندسازی و تفسیر کارکردی (Functional annotation) ژن های هدف میرنا

برای مستندسازی و تفسیر کارکردی ژن های هدف میرناها از ابزار BLASTx نرم افزار (v2.6.0) Blast+ NCBI استفاده شد. از غنی سازی کارکردی مجموعه های ژنی هدف میرنا برای شناسایی طبقات عملکردی استفاده شد. غنی سازی مجموعه های ژنی و هستی شناسی (Gene Ontology یا GO) توسط وب سرور g:Profiler انجام گردید (Reimand et al., 2016).

نتایج

بررسی کیفیت RNA مرزه خوزستانی

محاسبه میزان RIN یک روش پیشرفته برای ارزیابی یکپارچگی و غلظت RNA است. نتایج حاصل از بررسی کیفیت RNA مرزه خوزستانی با استفاده از Bioanalyser Agilent نشان داد که نمونه استخراجی از عدد RIN مساوی ۸ می باشد.

طریق BLASTn انجام شد (<http://www.mirbase.org>). توالی های حاصل در برابر پایگاه داده پروتئینی غیر تکراری با استفاده از ابزار BLASTx با E-value کوچک تر یا مساوی ۰/۰۰۱ مورد هم ردیفی قرار گرفته و توالی های دارای نتیجه با این پایگاه حذف شدند. توالی های نهایی با استفاده از وب سرور miRkwood که به طور خاص برای میرناهای گیاهی طراحی شده است، جستجو شد (Guigon et al., 2019). پیش بینی ژن های tRNA با tRNAscan-SE و پیش بینی ژن های rRNA با RNAmmer انجام شد. توالی های دارای نتیجه tRNAها و rRNA از داده های ورودی حذف شدند.

پیش بینی ساختار دوم میرناها

ساختار پیش ساز میرناها از طریق سرور miRkwood پارامترهای پیش فرض بررسی شد. ساختارهای ثانویه پیش ساز میرناها از طریق RNALfold برآورد شد. پیش ساز میرناهای کاندید از نظر معیارهای

(۱) تاخوردگی مناسب در ساختار ساقه-حلقه

(۲) حضور توالی میرنا بر روی یکی از دو بازوی ساختار

ساقه-حلقه

(۳) عدم شکستگی و یا برآمدگی دوبلکس میرنا-میرنا*

(۴) عدم جفت شدگی بیش از ۶ و بیش از ۵ جفت شدگی

U:G بین دوبلکس میرنا-میرنا*

غریب شدند تا تشخیص پیش سازهای میرناها از pseudo-hairpins با دقت انجام شود. برای تعیین صحت ساختار پیش ساز میرناهای احتمالی از پارامترهای درصد بازهای AU/GC، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (MFE)

۱- در دومین مرحله از پردازش RNA، حلقه انتهایی بریده شده و توالی دو رشته ای (miRNA/miRNA*duplex) با متوسط طول ۱۸ الی ۲۴ نوکلئوتید ایجاد می گردد. این توالی دو رشته ای به طور کلی یک مولکول دوبلکس است که از یک رشته passenger و یک رشته mature (که به عنوان رشته راهنما نیز نامیده می شود) تشکیل شده و معمولاً به صورت miRNA:miRNA* نشان داده می شود. در این ترکیب رشته passenger به صورت miRNA* نام گذاری میشود.

سرهم‌بندی نوپدید و شناسایی میرنا

پس از پالایش و حذف قرائت‌های با کیفیت پایین، در مجموع سه تکرار، ۱۲۵۷۱۸۲۹۶ خوانش کوتاه با کیفیت بالا حاصل شد که برای انجام سرهم‌بندی استفاده شد. از سرهم‌بندی خوانش‌های کوتاه با طول ۱۵۰ جفت باز، ۱۷۷۱۵۴ رونوشت حاصل شد. میزان N50 در کانتیگ‌های ایجاد شده برای مرزه خوزستانی، ۱۸۰۲ bp بود.

نتایج حاصل از جستجوی همسانی نشان داد که ۵۳۱ یونی ژن با میرنا‌های گیاهی مطابقت داشتند. پس از انجام BLASTx، با شناسایی و حذف توالی‌های کدکننده پروتئینی، ۲۴۱ توالی غیر کدکننده پروتئینی متمایز باقی ماندند. با توجه به اینکه انتخاب میرنا‌های حفاظت‌شده تنها با معیار همسانی نتایج مثبت کاذب را افزایش می‌دهد، بنابراین بررسی ساختار ثانویه به‌عنوان معیار تکمیل‌کننده شناسایی میرنا‌های حفاظت‌شده بالقوه مورد استفاده قرار گرفت. از این‌رو، توالی‌های دارای این میرنا‌های بالغ برای تعیین ساختار ثانویه به سرور miRkwood انتقال داده شدند. وب‌سرور miRkwood، توالی ورودی را برای شناسایی ساختارهای ثانویه پیش‌ساز میرنا با RNALfold هم‌ردیف می‌کند. در این مرحله تنها ۱۲۹ توالی حائز شرایط لازم بود و بقیه توالی‌ها حذف شدند.

برای کاهش نتایج مثبت کاذب و افزایش دقت، تنها میرنا با MFEI کمتر از منفی ۰/۶ حائز شرایط لازم بود (Bonnet *et al.*, 2004) و از بقیه توالی‌ها در مراحل بعد چشم‌پوشی شد. در این مرحله تنها ۸۱ توالی حائز شرایط لازم بود و بقیه توالی‌ها حذف شدند. مکان میرنا بالغ (حاصل هم‌ردیفی با پایگاه miRBase) در توالی‌های باقی‌مانده توسط miRdup بررسی و ثبات دویبلکس میرنا-میرنا* در ۵۸ توالی تأیید شد.

با توجه به اینکه برخی از خانواده‌های میرنا اعضای زیادی (بیش از یک رونوشت مشابه پیش‌بینی شده)

داشتند، برای افزایش دقت، از ۵۸ توالی مورد تأیید، تنها میرنا‌های پیش‌بینی شده از یک رونوشت (۳۱ توالی) در نظر گرفته شدند و بقیه پالایش شدند (جدول ۱). با در نظر گرفتن معیارهای اختصاصی گیاه، ۱۰ توالی به‌عنوان توالی‌های پیش‌ساز میرنای نهایی در نظر گرفته شدند (جدول ۱). نتایج ارزیابی توالی‌های کاندید توسط وب‌سرور miRNA-dis نشان داد که کلیه توالی‌های کاندید، پیش‌سازهای میرنا‌های واقعی (Pre-miRNA Real) هستند. پیش‌سازهای میرنا‌های مرزه خوزستانی شناسایی شده در این مطالعه، دامنه طولی بین ۷۵ تا ۲۳۴ نوکلئوتید را نشان دادند (جدول ۱). MFEI محاسبه شده در این مطالعه در دامنه ۰-/۸۲ تا ۱-/۷۸ (کیلوکالری بر مول) با میانگین مقدار ۱-/۱۹ بود (جدول ۱). پیش‌ساز میرنا‌ها در ساختار ثانویه دارای ساختار سنجاق سری هستند. محتوای AU نیز در پیش‌ساز میرنا‌ها در مقایسه با محتوای GC بالاتر بود.

پیش‌بینی ژن هدف و چگونگی مهار آنها

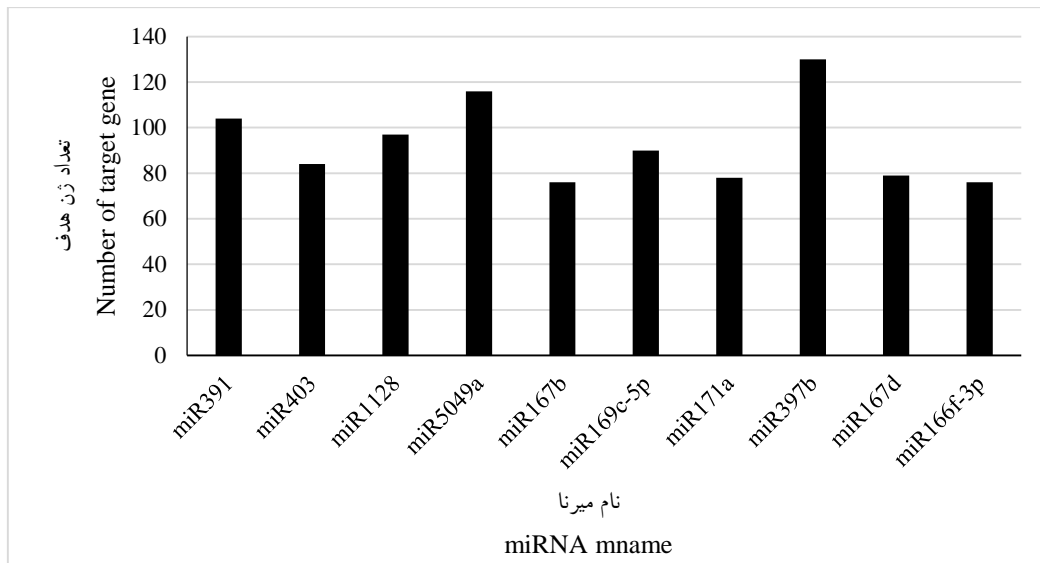
میرنا‌ها با اتصال به mRNA بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. میرنا‌ها می‌توانند چندین ژن را هدف قرار دهند. بررسی ژن‌های هدف ده میرنای شناسایی شده با استفاده از وبسایت psRNATarget نشان داد که در مجموع ۹۳۰ ژن توسط این میرنا‌های بالقوه، تنظیم می‌شوند که متعلق به چندین خانواده ژنی با عملکردهای زیستی متفاوت هستند. نتایج نشان داد که تعداد ژن‌های هدف برای توالی‌های miR5049a، miR1128، miR403، miR391، miR167b، miR171a، miR169c، miR167d و miR166f به ترتیب ۱۰۴، ۸۴، ۹۷، ۱۱۶، ۷۶، ۹۰، ۷۸، ۱۳۰، ۷۹ و ۷۶ ژن بود (شکل ۱). نتایج پیش‌بینی نشان داد که ۷۲۶ ژن با تخریب شدن (Cleavage) و ۲۰۴ ژن با عدم ترجمه تنظیم می‌شوند.

جدول ۱- ویژگی‌های می‌رناهای شناسایی شده در مرز خوزستانی

Table 1. Characteristics of miRNAs identified in *S. khuzistanica*

نام می‌رنا بالغ	نام یونی‌ژن	درصد GC	طول پیش‌ساز می‌رنا (جفت باز)	طول می‌رنا (جفت باز)	ارزش E	توالی می‌رنا شناسایی شده			
Mature miRNA name	Unigene name	GC Percent	MFE (kcal/mol)	MFEI	AMFE	Pre-miRNA length(bp)	miRNA length(bp)	E value	miRNA sequence identified
miR391	Dn27508	40.91	-51.5	-1.43	-58.52	88	19	0.001	5'ACGCAGGAGA GAUGAUGCC3'
miR403	Dn44525	37.74	-65.7	-1.09	-41.32	159	22	5.39E-06	5'UUAGAUUCACG CACAAAUCUGU3'
miR1128	Dn15524	40.18	-80.1	-1.78	-71.52	112	19	2.89E-04	5'UACUACUCCCU CCGUCCA3
miR5049	Dn63908	44.74	-49.6	-1.46	-65.26	76	21	2.71E-05	5'UCCUAAAUACU UGUUGUUGGG3'
miR167b	Dn50227	47.32	-43.4	-0.82	-38.75	112	22	8.90E-06	5'UGAAGCUGCCA GCAUGAUCUA3'
miR169	Dn17216	36.75	-70.92	-1.00	-36.67	234	21	2.80E-05	5'UAGCCAAGGAU GACUUGCCUA3'
miR171	Dn30225	45.92	-55.2	-1.23	-56.33	98	21	1.48E-04	5'UGAUUGAGCCG UGCCAUAUC3'
miR397	Dn29624	42.98	-48.0	-0.98	-42.11	114	21	0.000063	5'UCAUUGAGUGC AGCGUUGAUG3'
miR167d	Dn35116	50.94	-52.9	-0.98	-49.91	106	22	6.74E-06	5'UGAAGCUGCCA GCAUGAUCUUA3'
miR166	Dn14771	56.00	-49.2	-1.17	-65.60	75	22	7.27E-06	5'UCGGACCAGG CUUCAUUCCCU'

MFE: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی؛ AMFE: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده؛ MFEI: شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی
MFE: Minimum free energy; AMFE: Minimum Folding free Energy; MFEI: Minimum fold energy index

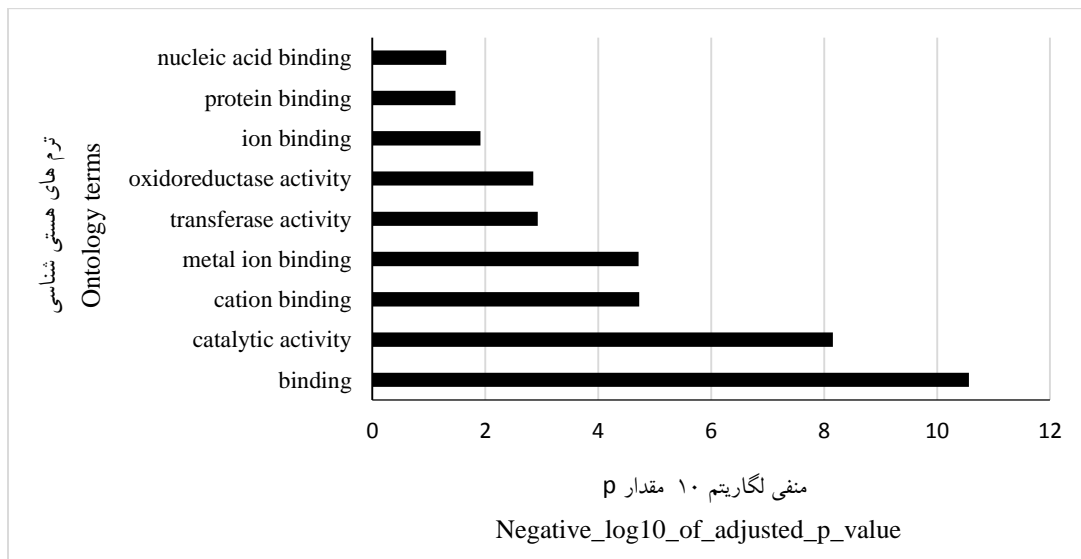


شکل ۱- میرناها و تعداد ژن هدف پیش‌بینی شده برای آنها توسط psRNATarget

Figure1. miRNAs and the number of target genes predicted for them by psRNATarget

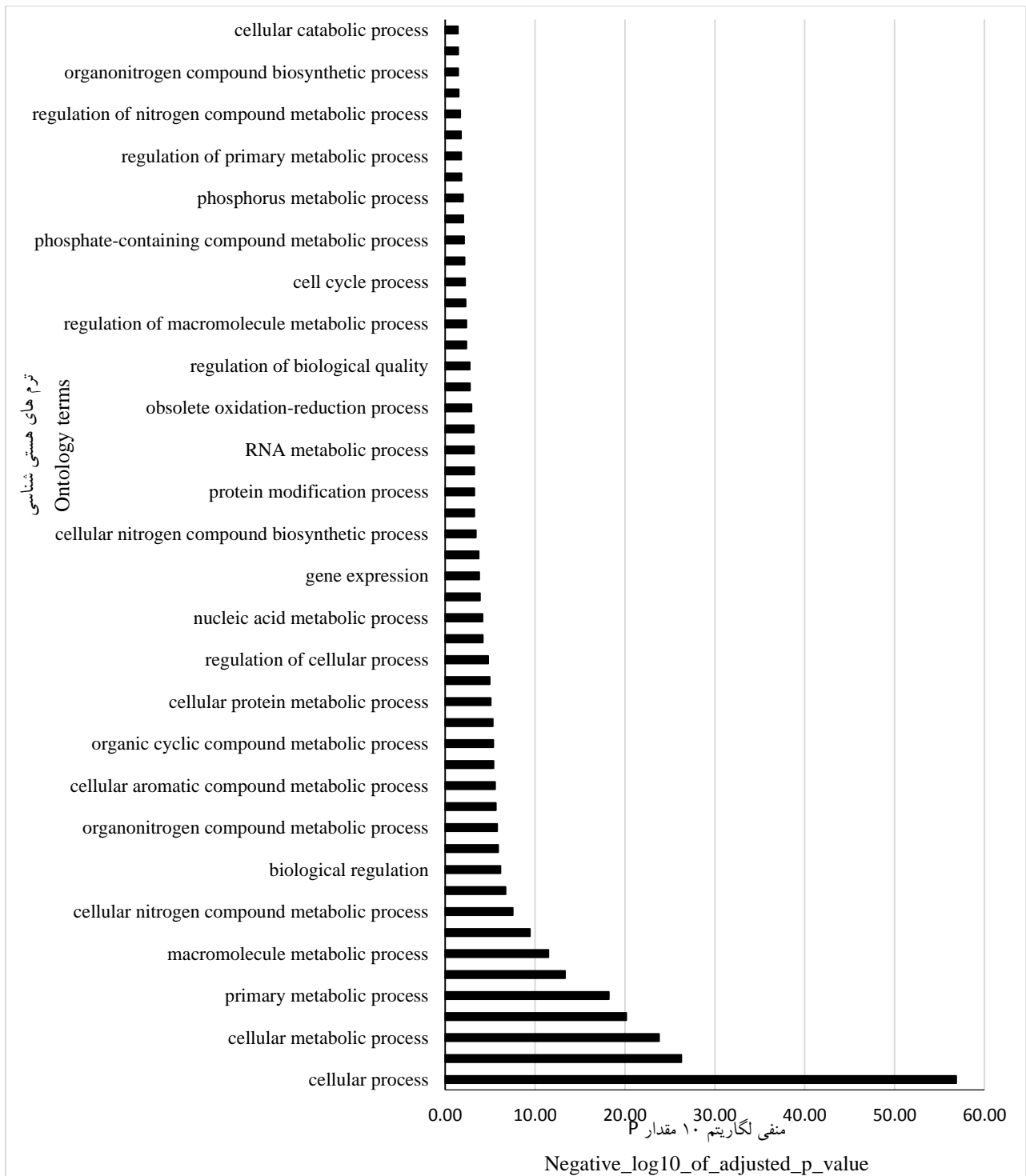
"اتصال" و "فعالیت فروکافتی" بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. در دسته فرایند زیستی (Biological Processes) به ترتیب گروه "فرایند سلولی" و "فرایند متابولیکی" نسبت به سایر گروه‌ها بیشترین اهداف میرناهای شناسایی شده را به خود اختصاص دادند.

تفسیر کارکردی و تجزیه و تحلیل مسیر در ژن‌های هدف میرنا تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژن‌های هدف در دسته عملکرد مولکولی در شکل ۲، فرایند زیستی در شکل ۳ و اجزای سلولی در شکل ۴ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژن‌های هدف نشان داد که در دسته عملکرد مولکولی (Molecular Function)، گروه



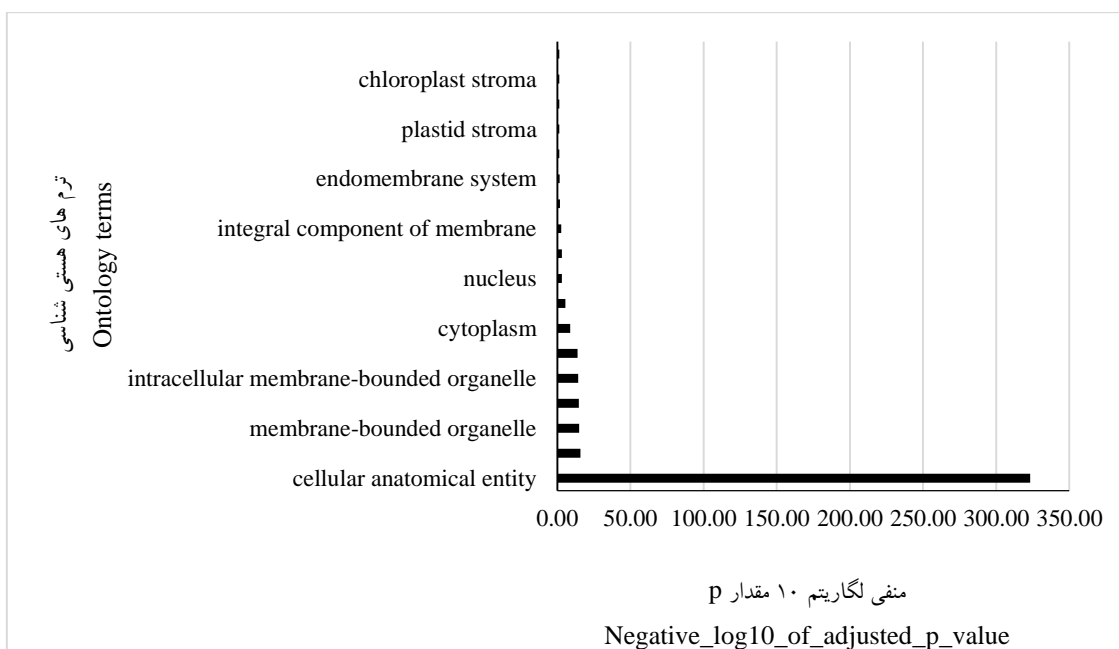
شکل ۲- تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژن‌های هدف در دسته عملکرد مولکولی ۱۰ میرنای شناسایی شده

Figure 2. Target genes set enrichment analysis in the molecular function category of 10 identified miRNAs



شکل ۳- تجزیه و تحلیل غنی سازی مجموعه ژن های هدف در دسته فرایند زیستی ۱۰ میرنای شناسایی شده

Figure 3. Target genes set enrichment analysis in the biological process category of 10 identified miRNAs

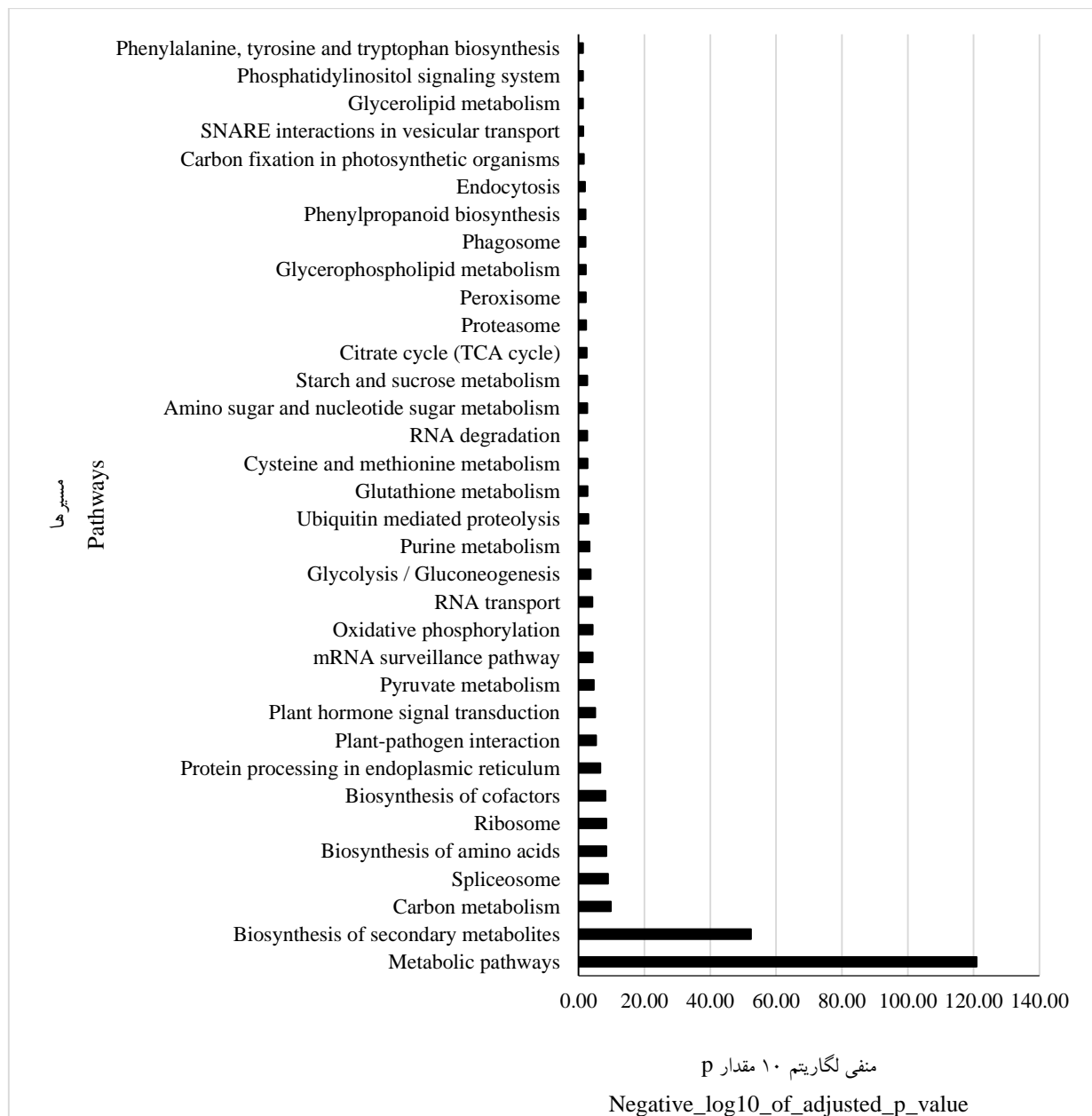


شکل ۴- تجزیه و تحلیل غنی سازی مجموعه ژنهای هدف در دسته ترکیبات سلولی ۱۰ میرنای شناسایی شده

Figure 4. Target genes set enrichment analysis in the cellular compounds category of 10 identified miRNAs

اهداف میرناهای شناسایی شده مرتبط بودند (شکل ۵). در این بین به ترتیب مسیرهای متابولیکی و بیوسنتز متابولیت-های ثانویه بیشترین مسیرهای مورد هدف میرناهای شناسایی شده را به خود اختصاص دادند. تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر در مجموعه های ژنی هدف نشان داد که مسیر بیوسنتز متابولیت های ثانویه به طور معنی داری جزء اهداف میرناهای شناسایی شده هستند؛ در مجموع ۱۴ مسیر بیوسنتز متابولیت های ثانویه با تجزیه و تحلیل غنی سازی مجموعه ژنهای هدف مشخص شدند. در این بین، بیشتر ژنهای هدف miRNA در مسیر متابولیتی، بیوسنتز ایزوکینولین آلکالوئید و مسیر بیوسنتز تریپتوفیل دخیل بودند. از این رو، محتمل است که تنظیم ژنهای درگیر در بیوسنتز اسانس توسط میرناهای شناسایی شده اداره شود. بنابراین تولید ترکیباتی که از متابولیت های ثانویه استخراج می شوند ممکن است به کمک میرناها قابل مدیریت باشد.

با توجه به نتایج هستی شناسی ژنهای هدف، میرناهای شناسایی شده در اغلب فرایندهای زیستی و متابولیکی مانند تمایز، رشد و نمو، انتقال از مرحله رویشی به زایشی، انتقال پیام و پاسخ به تنش های زیستی و غیرزیستی نقش مهمی ایفا می کنند. در بین ژنهای هدف، عوامل رونویسی بیشترین تعداد فراوانی را به خود اختصاص دادند. خانواده فاکتور رونویسی ARF (Auxin Response Factor) به عنوان یکی از این اهداف محسوب می گردد. ژنهای پاسخ دهنده اکسین مانند ARF6 و ARF8 به عنوان ژنهای اهداف miR167a و ژنهای فاکتور رونویسی GRAS به عنوان ژن هدف miR171b و ژنهای ARF16 و ARF17 به عنوان هدف miR391 شناسایی شدند. میرناهای دیگر، MiR403، ژن AGO2 و miR397 ژنهای LAC2، LAC4 و LAC17 را هدف قرار داده و بیان آنها را کنترل می کنند. بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر، تعداد ۳۵ مسیر با ژنهای



شکل ۵- غنی‌سازی مسیر با ژن‌های هدف ۱۰ میرنای شناسایی شده

Figure 5. Pathway Enrichment of the target genes of 10 identified miRNA

افزایش دقت، تنها پیش‌ساز میرناها با MFEI کمتر از منفی ۰/۶ حائز شرایط لازم بود و از بقیه توالی‌ها در مراحل بعد چشم‌پوشی شد. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که بیش از ۹۶ درصد از پیش‌سازهای میرنای گیاهی دارای MFEI کمتر از منفی ۰/۶ هستند، در حالی که توالی‌های شبه سنجاق سری (Pseudo-hairpins) مقادیر MFEI بزرگتری را نشان می‌دهند

بحث

هر توالی با میرناهای بالغ گیاهی (Viridiplantae) موجود در miRBase مقایسه شد. با توجه به اینکه اغلب میرناهای گیاهی به صورت حفاظت‌شده هستند. شناسایی میرناها از طریق همسانی می‌تواند بسیار کمک کننده باشد (Zhang *et al.*, 2006a). برای کاهش نتایج مثبت کاذب و

بیان ژنهای دخیل در گلدهی و باروری اشاره شده است (Mishra *et al.*, 2015). در مطالعه دیگر بر روی MiR403، نشان داد که این میرنا ژن AGO2 را مورد هدف قرار داده و بیان آن را کنترل می‌کند که نقش ضد ویروسی پروتئین آن نیز شناخته شده است (Harvey *et al.*, 2011). miR397 در بیشتر گونه‌های دو لپه‌ای و تک لپه‌ای محافظت شده است و به‌طور مستقیم ژنهای LAC2، LAC4 و LAC17 را هدف قرار می‌دهد (Wang *et al.*, 2014). هدف‌های ژنی miR397 بیشتر در فرایندهای پاسخ به تنش غیر زیستی مانند سرما، خشکسالی و شوری دخیل هستند (Shriram *et al.*, 2016). بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر، مسیرهای متابولیسمی و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه بیشترین مسیرهای مورد هدف میرنا‌های شناسایی شده را به خود اختصاص دادند که با مطالعات پیشین در مورد نقش میرناها در تنظیم مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مطابقت دارد (Gupta *et al.*, 2017). تولید ترکیبات بر پایه ترینوئیدها به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. دو مسیر بیوسنتزی برای بیوسنتز مونومرترین‌ها شامل مسیر مولونات و مسیر ۱-دئوکسی-د-زایلولوز ۵-فسفات است که در نهایت پیرووات به یکی از اجزای سازنده (ایزوپنتنیل پیروفسفات یا دی متیل آلیل پیروفسفات) تبدیل می‌شود. این واحدهای مونومر متعاقباً توسط پرنیل ترانسفرازهای مختلف ایجاد گرانیل پیروفسفات (GPP)، فارنسیل پیروفسفات (FPP) و گرانیل گرانیل پیروفسفات (GGPP) می‌کنند (Liang *et al.*, 2002). کاهش سوبستراهای غیرفعال مانند پرنیل پیروفسفات‌ها معمولاً شامل اکسیدورکتازهایی از خانواده گرانیل گرانیل ردوکتاز (GGR) هستند که این آنزیم (AT4G38460.1) مورد هدف میرنای miR5049 قرار می‌گیرد (Meadows *et al.*, 2018). انواع مختلف ترینوئیدها در مسیر بیوسنتز اجزا اسانس مشارکت می‌کنند. برای نمونه، در گیاهی از خانواده زیتون معطر (*frangans* *Osmanthus*)، miR160 و miR167 در مسیر بیوسنتز فلاونوئید دخالت می‌کنند. در گزارشی جامع بر روی گیاه دارویی پریوش (*Catharanthus roseus*) نشان داده شد که ARF‌های هدف miRNA به‌طور بالقوه در تنظیم مسیر بیوسنتز

(Bonnet *et al.*, 2004). بررسی ساختار ثانویه نشان داد که میرنا‌های شناسایی شده با هشت معیار اجباری شناسایی میرنا در گیاهان (Axtell *et al.*, 2011) مطابقت دارد. توزیع طول پیش‌ساز میرنا‌های این مطالعه، با توزیع طول پیش‌سازهای میرنا‌های گیاهان (Patanun *et al.*, 2013) که در مطالعات پیشین گزارش شده مطابقت دارد. میرنا‌های پیش‌ساز نسبت به سایر RNAهای غیررمزگذار، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی کمتری دارند (Bonnet *et al.*, 2004). MFEI محاسبه شده در این مطالعه در دامنه ۰-/-۸۲ تا ۰-/-۷۸ (کیلوکالری بر مول) با میانگین مقدار ۰-/-۱۹ بود (جدول ۱). مقادیر بدست‌آمده از میزان MFEI برای tRNA (۰-/-۶۴)، rRNA (۰-/-۵۹) و mRNA (۰-/-۶۶ تا ۰-/-۶۲) کمتر بود (Zhang *et al.*, 2006c) و نشان می‌دهد که میرنا‌های پیش‌ساز شناسایی شده احتمالاً میرنا‌های واقعی هستند. گروه‌های نوکلئوتیدی جفت نشده در ساختار سنجاق سری معمولاً برجستگی‌های نامتقارن ایجاد می‌کنند. حداقل اندازه این برآمدگی‌ها ویژگی مهمی برای میرنا‌های گیاهی است، زیرا ثبات ساختار را نشان می‌دهد. حداقل اندازه برآمدگی به‌ویژه در دوپلکس میرنا/میرنا* احتمال پیش‌بینی میرنا‌های معنی‌دار را افزایش می‌دهد (Axtell *et al.*, 2011). در مطالعه ارائه شده این گام تأیید می‌شود. محتوای AU نیز در پیش‌ساز میرناها در مقایسه با محتوای GC بالاتر بود که در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Dhandapani *et al.*, 2011). در بین ژنهای هدف، عوامل رونویسی بیشترین تعداد فراوانی را به خود اختصاص دادند. این گروه از پروتئین‌ها با تنظیم فرایند رونویسی نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها بر عهده دارند (Lan Thi Hoang *et al.*, 2017). خانواده فاکتور رونویسی ARF به‌عنوان یکی از این اهداف محسوب می‌گردد که در ریشه‌زایی، پاسخ به تنش خشکی و نمو گیاه و همچنین پاسخ به اکسین و سیگنالینگ اکسین نقش دارد (Gupta *et al.*, 2014). ژنهای پاسخ‌دهنده اکسین مانند ARF6 و ARF8 از جمله ژنهای اهداف miR167a، ژنهای GRAS هدف miR171b (Huang *et al.*, 2017) و ژنهای ARF16 و ARF17 هدف miR391 هستند (Yoon *et al.*, 2010). در بسیاری از مطالعات به نقش miR167 در گیاهان گلدار، تنظیم

- future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25: 417-440.
- Fan, R., Li, Y., Li, C. and 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), p.e0139002.
 - Goossens, A., Häkkinen, ST., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, AM., Söderlund, H. and Zabeau, M. 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100 (14): 8595-8600.
 - Guigon, I., Legrand, S., Berthelot, JF., Bini, S., Lanselle, D., Benmounah, M. and Touzet, H. 2019. miRkwood: a tool for the reliable identification of microRNAs in plant genomes. *BMC Genomics*. 20: 1-9.
 - Gupta, O., Sharma, P., Gupta, R. and Sharma, I. 2014. MicroRNA mediated regulation of metal toxicity in plants: present status and future perspectives. *Plant Molecular Biology*. 84: 1-18.
 - Gupta, OP., Karkute, SG., Banerjee, S., Meena, NL. and Dahuja, A. 2017. Contemporary understanding of miRNA-based regulation of secondary metabolites biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*. 8: 374.
 - Haas, BJ., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, PD., Bowden, J., Couger, MB., Eccles, D., Li, B. and Lieber, M. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*. 8: 1494-1512.
 - Hao, DC., Chen, SL., Xiao, PG. and Liu, M. 2012. Application of high-throughput sequencing in medicinal plant transcriptome studies. *Drug Development Research*. 73: 487-498.
 - Harvey, JJ., Lewsey, MG., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, JP. and Baulcombe, DC. 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS one*. 6: e14639.
 - Huang, W., Peng, S., Xian, Z., Lin, D., Hu, G., Yang, L., Ren, M. and Li, Z. 2017. Overexpression of a tomato miR171 target gene Sl GRAS 24 impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. *Plant Biotechnology Journal*. 15: 472-488.
 - Jamzad, Z. 1994. A new species of the genus *Satureja* (Labiatae) from Iran. *Iranian Journal of Botany*. 6: 215-8.
 - Lan Thi Hoang, X., Du Nhi, NH., Binh Anh Thu, N., Phuong Thao, N. and Phan Tran, LS. 2017. Transcription factors and their roles in signal

آلکالوئید ایندول ترپنوئید نقش دارند و میرناها با هدف ARF16 فعالیت پروموتورهای ژنهای کلیدی این مسیر را در سلولهای گیاهی سرکوب می‌کنند (Shen et al., 2017).

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه با رویکردی محاسباتی مبتنی بر جستجوی همسانی از طریق داده‌های ترانسکریپتوم به شناسایی میرناهای گیاه مرزه خوزستانی و نقش‌های احتمالی آنها در تنظیم مسیرهای بیوسنتزی مختلف پرداخته است. در مجموع ژنهای هدف میرناهای شناسایی شده عمدتاً در مسیرهای متابولیسمی و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه فعالیت می‌کنند و گروه فرایند سلولی و فرایند متابولیسمی به ترتیب بیشترین اهداف میرناهای شناسایی شده را در دسته فرایند زیستی به خود اختصاص دادند. این بررسی نخستین گزارش از شناسایی میرنا در گیاه دارویی مرزه بوده و نتایج آن نقطه عطفی در شناسایی میرنا و نقش آنها در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در این گیاه خواهد بود.

منابع مورد استفاده

- Axtell, MJ., Westholm, JO. and Lai, EC. 2011. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*. 12: 1-13.
- Bonnet, E., Wuyts, J., Rouzé, P. and Van de Peer, Y. 2004. Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics*. 20: 2911-2917.
- Castel, SE., Martienssen, RA., 2013. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 14: 100-112.
- Dai, X. and Zhao, PX. 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*. 39: W155-W159.
- Dhandapani, V., Ramchiary, N., Paul, P., Kim, J., Choi, SH., Lee, J., Hur, Y. and Lim, YP. 2011. Identification of potential microRNAs and their targets in *Brassica rapa* L. *Molecules and Cells*. 32: 21-37.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, DA. and Orlova, I. 2006. Plant volatiles: recent advances and

- and metabolite profiling in *Satureja khuzistanica* in response to drought stress. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 25(2): 232-246. (In Persian).
- Shen, E., Singh, S., Ghosh, J., Patra, B., Paul, P., Yuan, L. and Pattanaik, S. 2017. The miRNAome of *Catharanthus roseus*: identification, expression analysis, and potential roles of microRNAs in regulation of terpenoid indole alkaloid biosynthesis. Scientific reports. 7, 43027.
 - Shriram, V., Kumar, V., Devarumath, RM., Khare, TS. and Wani, SH. 2016. MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. Frontiers in Plant Science, 7: 817.
 - Singh, N., Srivastava, S., Shasany, A.K. and Sharma, A. 2016. Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of *Mentha* spp. Computational Biology and Chemistry, 64, pp.154-162.
 - Sohrabi, S., Ismaili, A., Nazarian firouz abadi, F. and Fallahi, H. 2019. Identification and characterization of conserved miRNAs in lentil. Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian Journal of Biology), 32(4): 606-616. (In Persian).
 - Wang, CY., Zhang, S., Yu, Y., Luo, YC., Liu, Q., Ju, C., Zhang, YC., Qu, LH., Lucas, WJ. and Wang, X. 2014. MiR397b regulates both lignin content and seed number in Arabidopsis via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. Plant Biotechnology Journal. 12: 1132-1142.
 - Wang, M., Wang, Q. and Wang, B. 2012. Identification and characterization of microRNAs in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.). PLoS One. 7: e33696.
 - Yoon, EK., Yang, JH., Lim, J., Kim, SH., Kim, SK. and Lee, WS. 2010. Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in Arabidopsis lateral root development. Nucleic Acids Research. 38: 1382-1391.
 - Zhang, B., Pan, X., Cannon, CH., Cobb, GP. and Anderson, TA. 2006a. Conservation and divergence of plant microRNA genes. The Plant Journal. 46: 243-259.
 - Zhang, B., Pan, X., Cobb, GP. and Anderson, TA. 2006b. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. Developmental Biology. 289: 3-16.
 - Zhang, B., Pan, X., Cox, S., Cobb, G. and Anderson, T. 2006c. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 63: 246-254.
 - transduction in plants under abiotic stresses. Current genomics. 18: 483-497.
 - Li, L., Xu, J., Yang, D., Tan, X. and Wang, H. 2010. Computational approaches for microRNA studies: a review. Mammalian Genome. 21: 1-12.
 - Liang, PH., Ko, TP. and Wang, AHJ. 2002. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. European Journal of Biochemistry. 269(14): 3339-54.
 - Mehta, A., Gupta, H., Rawal, R., Mankad, A., Tiwari, T., Patel, M. and Ghosh, A. 2016. In silico microRNA identification from *stevia rebaudiana* transcriptome assembly. European Journal of Medicinal Plants. 1-14.
 - Meadows, CW., Mingardon, F., Garabedian, BM., Baidoo, EEK., Benites, VT., Rodrigues, AV., Abourjeily, R., Chanal, A. and Lee, TS. 2018. Discovery of novel geranylgeranyl reductases and characterization of their substrate promiscuity. Biotechnology for Biofuels. 11: 340.
 - Mirjani, L., Salimi, A., Matinizadeh, M., Razavi, K. and Shahbazi, M. 2018. Effective factors on micropropagation of medicinal plant of *Satureja khuzistanica*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 26 (1): 53-62. (In Persian).
 - Mishra, AK., Duraisamy, GS., Týcová, A. and Matoušek, J. 2015. Computational exploration of microRNAs from expressed sequence tags of *Humulus lupulus*, target predictions and expression analysis. Computational Biology and Chemistry. 59: 131-141.
 - Naghavi, MR. and Karimi, AA. 2018. Identification of miRNAs and their target genes in red clover (*Trifolium pretense*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 26(2): 156-164. (In Persian).
 - Patanun, O., Lertpanyasampatha, M., Sojikul, P., Viboonjun, U. and Narangajavana, J. 2013. Computational identification of microRNAs and their targets in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Molecular Biotechnology. 53: 257-269.
 - Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H. and Vilo, J. 2016. g: Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). Nucleic acids research. 44: W83-W89.
 - Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Mirza, M. 2004. Chemical variation in the essential oil of *Satureja sahendica* from Iran. Food chemistry. 88: 325-328.
 - Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, MH. and Hadian, J. 2017. Variations of physiological indices

Identification of microRNAs and related target genes in *Satureja khuzistanica* Jamzad

S. Shams¹, A. Ismaili^{2*}, F. Nazarian Firouz-Abadi³, H. Mumivand⁴

1- PhD graduated, Dept. Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran.

2*- Corresponding author, Prof., Dept. Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran, E-mail: ismaili.a@lu.ac.ir

3- Prof., Dept. Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran.

4- Assist. Prof., Dept. Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran

Received: 13.06.2021

Accepted: 08.11.2021

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are one of the small and non-coding regulatory molecules, which regulate gene expression by transcriptional cleavage or translational suppression. miRNAs are involved in regulating a wide range of metabolic and physiological processes in plants. The Lamiaceae family plants, especially *Satureja khuzistanica*, are well known herbs for its flavor, fragrance and medicinal properties. To date, no miRNAs have been identified in *Satureja* species. In present study, a computational approach based on homology search was used to identify miRNAs and their targets of *Satureja khuzistanica*. Non-coding unigenes were identified and considered for candidates of miRNAs precursor. After evaluating the general parameters such as GC bases percentage, minimum folding free energy (MFE), minimum free energy index (MFEI) and secondary structure, 58 miRNAs were identified, which among them, by applying plant specific parameters and filtering the miRNAs from several transcripts, overall ten miRNAs were identified. Then, 930 target transcripts were predicted using psRNATarget website and the annotation of them was performed using BLASTx tools of NCBI Blast+ software (v2.6.0). Examination of target genes showed that auxin-responsive genes, GRAS ((Gibberlic-acid insensitive (GAI), Rspressor of GAI (RGA) and Scarerow (SCR), AGO2 (Argonaute 2) and LAC (Laccase) family genes are the main targets of the identified miRNAs in *S. khuzistanica*. Pathway enrichment analysis of the target genes revealed that the secondary metabolic pathway is significantly among the targets of the identified miRNAs. This is the first study describing miRNAs and their role in the regulation of target genes in *S. khuzistanica*.

Keywords: Target genes, *Satureja khuzistanica*, miRNA.