

## شناسایی miRNAهای حفاظت شده و ژنهای هدف آنها در گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

هدی سادات کیانی<sup>۱</sup>، منیژه سبکدست نودهی<sup>۲</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۳\*</sup>، مجید شکرپور<sup>۴</sup> و نجمه یزدانفر<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۳- نویسنده و مسئول مکاتبات، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

پست الکترونیک: mnaghavi@ut.ac.ir

۴- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۵- استادیار، پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی، کرج

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۹

### چکیده

ژنهای (miRNAs)، عناصر تنظیم کننده‌ای هستند که نقش اصلی آنها کاهش بیان ژن در سطح mRNAها است. miRNA همچنین در چندین مسیر گیاهی مرتبط با فعالیت‌های مهم سلولی مانند رشد، تکثیر، تمایز، مورفوزن، آپوپتوز و پاسخ به تنش‌های غیر زیستی و زیستی نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند. این تحقیق به منظور شناسایی miRNAهای حفاظت شده و ژنهای هدف آنها با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید در گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) انجام شد. اگرچه روش‌های بیوانفورماتیک به‌عنوان کارآمدترین راهبرد برای شناسایی miRNA هدف توسعه یافته‌اند، راهبردهای آزمایشی با کارایی بالا هنوز بسیار مورد تقاضا هستند. برای شناسایی miRNAهای جدید، پیش‌بینی و تعیین هستی‌شناسی ژنهای هدف درگیر در مسیر تولید رایحه و رنگ در گل محمدی به ترتیب از ابزارهای بیوانفورماتیکی Cmi, psRNA Target, WEGO و Blast2GO به‌علاوه روش آزمایشگاهی (Real-time PCR) استفاده شد. با استفاده از داده‌های EST و RNA-seq مبتنی بر همولوژی گیاه *Rosa luciae* در نهایت چهار خانواده miRNA، شامل: miR5021، miR2673، miR156 و miR838 به‌عنوان miRNAهای نامزد انتخاب شدند. در مرحله بعد برای ارزیابی کمی Real-time PCR برای اعتبارسنجی سطح بیان miR5021 منتخب در دو نمونه (سفید و صورتی) و مرحله بیولوژیکی (جوان و غنچه) گل محمدی، محلول‌پاشی با غلظت‌های صفر (شاهد) و ۳۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به مدت ۴۸ ساعت بیشترین بیان نسبی miR5021 متعلق به نمونه صورتی‌رنگ را در مرحله نمو جوان نشان داد. این یافته‌ها مطالعات چشم‌انداز آینده را در مورد سازوکارهای تنظیمی miRNAها در *Rosa damascena* سرعت می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: EST، MicroRNA، RNA-seq، بیوانفورماتیک، RNA غیررمزآور، ژنهای هدف

### مقدمه

پیدایش اولیه این گیاه ایران بوده است که به دیگر نقاط جهان پراکنش کرده است (Khosh-khui, 2014). به‌عنوان هیبریدی از *R. gallica* L. و *R. moschata* J. Herm (برای گل محمدی تابستانی) یا *R. gallica* L. و *R. phenicia* Boiss. (برای گل محمدی پاییزی) است

گل محمدی با نام علمی *R. damascena* Mill. یک گونه آلوتراپلوئید ( $2n = 4x = 28$ ) متعلق به خانواده *Rosaceae* و زیر تیره *Rosoideae* با عطر و بوی گل و ویژگی‌های رنگی عالی است (Bendahmane et al., 2013). منشأ

miRNA های شناسایی شده (<http://www.mirbase.org>) با پایگاه‌های داده ارگانیزم هدف (مانند پایگاه داده رونوشت) برای شناسایی miRNA های بالقوه حفاظت شده استفاده می‌شوند (Tian et al., 2015).

miRNA ها یک گروه از RNA های غیرکدکننده پروتئینی با طول ۱۹-۲۵ نوکلئوتید هستند که در فرایندهایی مانند تنظیم پس از رونویسی شکستن mRNA های هدف یا سرکوب ترجمه آنها دخیل بوده و نقش مهمی در طیف وسیعی از فرایندهای زیستی مانند رشد و نمو گیاهی و پاسخ به تنش‌ها در سطح رونویسی و پس‌از آن دارند (Sabzehzari and Naghavi, 2019; Zhang et al., 2015). در گیاهان، miRNA ها تنظیم‌کننده‌های پس از رونویسی بیان ژن مربوط به رشد، نمو و تنش هستند که در مراحل مختلف رشد گیاه میزبان بیان متفاوت دارند (Pareek et al., 2015; Budak et al., 2015). miRNA ها علاوه بر رشد و نمو گیاه، این عناصر تنظیمی نقش محوری در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه ایفا می‌کنند (Biswas et al., 2022). بیش از نصف miRNA ها دارای منشأ اینترونی بوده و از ژن‌های اختصاصی ایجاد نمی‌شوند و احتمالاً از واحدهای رونویسی مستقل با پیش‌برهای اختصاصی رونویسی می‌شوند (Mallory et al., 2006). miRNA ها بیان ژن‌های درون‌زاد را در گیاهان و جانوران سرکوب می‌کنند (Samavatian et al., 2023). miRNA ها از RNA های تک‌رشته‌ای (ssRNA) طویل که تاخوردگی پیدا کرده‌اند و تشکیل یک ساختار سنجاق سری ناقص را می‌دهند، مشتق می‌شوند (Ha et al., 2014). جایگاه‌های اتصال به miRNA معمولاً در ناحیه غیرترجمه‌ای (3'UTR) mRNA ها قرار دارند. دُمین موجود در انتهای 5' miRNA که فاصله مشخصی از نوکلئوتید ۲ تا ۷ دارد، برای تشخیص هدف بسیار ضروری است و «هسته miRNA» نامیده می‌شود (Ha et al., 2014). miRNA های گیاهی معمولاً از طریق مکمل بودن کامل، اهداف خود را تنظیم می‌کنند (Cai et al., 2009). برخی از miRNA ها برای پاسخ به شرایط تنش تنظیم شده‌اند، از جمله متیل جاسمونات

(Baydar et al., 2016). اندام گلبرگ به‌عنوان بخش اقتصادی مورد استفاده برای تولید گلاب و عطر در گل محمدی است. روغن فرار حاصل از گلبرگ رز با نام «رزاتو» به‌عنوان یک محصول ارزشمند در صنایع آرایشی-بهداشتی کاربرد اساسی دارد (Boskabady et al., 2011). همچنین در فرایندهای ضد عفونی‌کننده، ضد افسردگی، آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد میکروبی بسیار مؤثر است (Akhtar et al., 2019). رایحه و رنگ اصلی گل محمدی مانند ۲-فنیل اتانول (2-PE) و آتوسیانین از مسیر شیکیمات مشتق شده است (Bendahmane et al., 2013).

به‌منظور تفسیر عناصر عملکردی ژنوم و درک بهتر تمام فرایندهای سلولی از جمله پاسخ به محرک‌های درونی و بیرونی و سنتز انواع متابولیت‌ها، تحلیل ترانسکریپتوم ضرورت دارد (Naghavi & Karimi, 2018; Foladvand et al., 2016). یکی از مهمترین عوامل دخیل در کنترل بیان ژن‌ها در مسیرهای متابولیکی، عناصر تنظیمی هستند (Noormohammadi et al., 2021). miRNA ها عناصر تنظیمی کلیدی و مؤثر در تنظیم شبکه‌های ژنی در گیاهان هستند (Samad et al., 2017). کشف miRNA ها در گیاهان برای نخستین بار در سال ۲۰۰۲ انجام شد (Park et al., 2002). توسعه اخیر رویکردهای تجربی با کارایی بالا و در دسترس بودن رو به رشد داده‌های بیان ژن، امکان مطالعات عملکردی جامع miRNA ها را فراهم کرده است (Chang et al., 2023). به‌طور کلی، از سه روش شبیه‌سازی مستقیم، روش‌های ژنتیک مستقیم و بیوانفورماتیک محاسباتی برای شناسایی miRNA ها استفاده می‌شود، در حالی که از سه روش بیوانفورماتیک، بیوشیمی و روش‌های مبتنی بر omics برای شناسایی ژن‌های هدف استفاده می‌شود. در این میان روش‌های محاسباتی سریع‌تر و بسیار کم‌هزینه‌تر از روش‌های دیگر هستند و برای شناسایی miRNA های حفاظت شده بالقوه بسیار کاربرد دارند (Karimi et al., 2022; Li et al., 2010). روش‌های محاسباتی، مبتنی بر همسانی و مقایسه پایگاه داده‌های

توالی‌یابی نسل دوم، می‌توان سطوح بیان miRNA را در بافت‌های مورد نظر اندازه‌گیری کرد (Li *et al.*, 2019). مجموعه داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA (RNA-Seq) گونه گیاهی هم‌خانواده آن یعنی *R. lucieae* از پایگاه داده NCBI بخش SRA دریافت شدند؛ سپس به منظور تبدیل قالب SRA به "Fastq" از ابزار Fastq-dump موجود در بسته نرم‌افزاری SRA-Toolkit استفاده شد. ارزیابی و کنترل کیفیت اولیه توالی‌های خام (de Sena Brandine *et al.*, 2019)، با استفاده از نرم‌افزار Fastqc (version 0.11.9) انجام شد (FastQC\_Manual). سپس توالی‌های با کیفیت پایین و آلودگی‌های لینکری احتمالی بوسیله نرم‌افزار Trimmomatic (version 0.39) حذف شدند (Sewe *et al.*, 2022; Bolger *et al.*, 2014).

#### سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌ها

پس از فرایند تریمنینگ (Trimming)، از خوانش‌های با کیفیت بالا به‌عنوان توالی‌های ورودی برای سرهم‌بندی ترانسکریپتوم *R. lucieae* استفاده شد. سرهم‌بندی نوپدید با استفاده از نرم‌افزار Trinity (V 2.14.0) انجام شد. برای ارزیابی رونوشت‌های سرهم‌بندی شده de novo یا به عبارتی تعیین کیفیت ترانسکریپتوم حاصل از نرم‌افزار Transrate (v 1.0.3) استفاده شد (Smith-Unna *et al.*, 2016). علاوه بر این از نرم‌افزار Cap3 برای حذف کانتینگ‌های اضافی و سرهم‌بندی دوباره استفاده شد (Huang and Madan 1999).

#### شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده

پس از حذف کانتینگ‌های تکراری، از کانتینگ‌های حاصل با فرمت fasta برای شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده استفاده شد. برای پیشگویی miRNAها از نرم‌افزار C-mii بر مبنای جستجوی همولوژی بین کانتینگ‌ها و ESTها در برابر miRNAهای شناسایی‌شده در سایر گیاهان استفاده شد (Numnark *et al.*, 2012). این نرم‌افزار با استفاده از ابزار BLASTn با E-value  $\leq 10$  و mismatch  $\leq 4$  شناسایی

(MeJA)، اسید سالیسیلیک (SA)، اسید آبسزیک (ABA)، ملاتونین و ویروس راه‌راه برنج (RSV) نشان می‌دهد که miRNAها تنظیم پس از رونویسی ژن‌های هدف مربوطه خود را برای پاسخ به تنش هدایت می‌کنند (Shen *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2010). اسید جاسمونیک (JA) و مشتقات آن مولکول‌های پیام‌رسان کلیدی هستند و نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای زیستی مانند مهار رشد، پیری و دفاع گیاه دارند (Wasternack *et al.*, 2013). متیل جاسمونات به‌عنوان مشتقات JA، برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق برانگیختن پاسخ‌های دفاعی در بسیاری از گونه‌ها، مانند ترپنوئیدهای فرار در *Amomum villosum* (Wang *et al.*, 2014)، تری‌ترین در *Euphorbia pekinensis* (Zhang *et al.*, 2015) و آلکالوئیدهای تروپان در *Hyoscyamus niger* (Zhang *et al.*, 2007) استفاده شده است.

این تحقیق به منظور شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده و ژن‌های هدف آنها با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید در گل محمدی انجام شد. در این مطالعه از پایگاه داده EST و RNASeq گیاه *R. lucieae* برای شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده و ژن‌های هدف درگیر در مسیر تولید عطر و رنگ گل محمدی استفاده شد. شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده بر اساس جستجوی همولوژی بین داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI و سایت miRBase با انجام BLASTn انجام گردید. برای شناسایی عملکرد و نقش این miRNAها در تنظیم متابولیت‌های ثانویه، ژن‌های هدف miRNAها در برابر بانک‌های اطلاعاتی UniProt، NR، TreMble و KEGG جستجوی همسانی شدند. در نهایت برای اعتبارسنجی miRNAهای شناسایی‌شده و اهداف آنها تحت تأثیر محرک متیل جاسمونات از qPCR قرار گرفتند.

#### مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌های RNAseq و کنترل کیفیت داده‌ها با استفاده از Illumina RNA-Seq و یک فناوری مبتنی بر

از ابزار Blast2GO و WEGO انجام شد. از نرم افزار Blast2GO برای به دست آوردن الگوهای هستی شناسی ترانسکریپتوم مرجع و ژن های هدف miRNA ها استفاده شد (Conesa *et al.*, 2005). از نرم افزار WEGO نیز برای ترسیم الگوهای GO استفاده شد ( $p < 0.05$ ). برای این منظور، هستی شناسی کل ژن های هدف miRNA های *R. lucieae* در برابر ترانسکریپتوم گونه تجزیه و تحلیل شدند.

#### تأیید آزمایشگاهی miRNA ها

نمونه برداری در فاصله ۱۰ روز از ماه اردیبهشت سال ۱۴۰۱ به صورت دو مرحله نمودی غنچه و جوان از دو نمونه (سفید و صورتی) گل محمدی ژنوتیپ آذربایجان شرقی در مزرعه آموزشی- پژوهشی گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در مهرشهر کرج (استان البرز) انجام شد. تیمار متیل جاسمونات نیز به صورت محلول در اتانول، در دو سطح صفر (Ma *et al.*, 2017)، ۳۰۰ میکرومولار بود (Salimi *et al.*, 2012). برای مطالعه، تأثیر آنها بر بیان miRNA اعمال شد. برای تهیه غلظت ۳۰۰ میکرومولار مقدار معین از استوک ۰/۰۱ مولار MeJA با حلال اتانول و آب مقطر به حجم رسانیده شد. گیاهان شاهد با استفاده از آب مقطر حاوی چند قطره اتانول اسپری شدند و برداشت نمونه ها ۴۸ ساعت بعد از محلول پاشی انجام شد. استخراج ریبونوکلیک اسید کل از بافت های گلبرگ گل جوان و غنچه با استفاده از روش دستی CTAB طبق دستورالعمل (Khan *et al.*, 2007) با کمی تغییر انجام گردید. برای رفع آلودگی ژنومی با DNaseI (company) تیمار شدند. کمیت RNA استخراج شده با نانودراپ (نسبت A260/280) و کیفیت آن نیز با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. برای سنتز cDNA از miRNA، ابتدا آغازگر اختصاصی ساقه-حلقه (Stem loop RT-primer) و آغازگر اختصاصی ژن برای real-time PCR برای miR5021 طراحی شد (Chen *et al.*, 2005). سپس آزمایش رونویسی معکوس miRNA با استفاده از سیستم سنتز

رونوشت هایی با بیشترین شباهت به توالی های miRNA های بالغ را انجام می دهد. سپس توالی های حاصل از هم ردیفی با استفاده از ابزار BLASTx در برابر پایگاه داده پروتئین های غیر تکراری (Non-Redundant protein database, NR) با  $E\text{-value} \leq 10^{-5}$  مورد هم ردیفی قرار گرفته و توالی های کد کننده پروتئینی حذف شدند. معیار انتخاب miRNA های کاندید بر اساس قرارگیری miRNA بالغ بر روی Hairpin، حداکثر شش باز غیر مشابه با رشته مقابل و نداشتن هیچ ساختار لوپ، ۳۰ تا ۷۰ درصد بودن محتوای A+U و منفی بالا بودن حداقل انرژی آزاد تا خوردگی و شاخص (MFEI) آن امکان پذیر است (Zhang *et al.*, 2006).

#### شناسایی ژن های هدف miRNA ها

شناسایی ژن های هدف miRNA ها به وسیله ابزار psRNATarget با جستجوی همولوژی بین miRNA های شناسایی شده کاندید هر گیاه با کانتینگ و EST های همان گیاه بر اساس معیارهای زیر انجام شد:

- ۱) بین miRNA و ژن هدف آن بیشتر از ۴ باز غیر مشابه وجود نداشته باشد.
- ۲) حداقل انرژی آزاد تا خوردگی (MFE) باید دارای یک مقدار منفی باشد.
- ۳) فقط یک باز غیر مشابه در موقعیت ۹-۱ وجود داشته باشد.
- ۴) هیچ نوع باز غیر مشابهی در موقعیت ۱۰ و ۱۱ وجود نداشته باشد.
- ۵) بیشتر از دو باز غیر مشابه متوالی وجود نداشته باشد (Singh *et al.*, 2016).

مستندسازی و تفسیر عملکردی رونوشت های هدف miRNA ها در نرم افزار C-mii با استفاده از ابزار BLASTx در برابر پایگاه Uniprot-TrEMBL با  $E\text{-value} \leq 10^{-5}$  انجام شد.

#### تحلیل شبکه و هستی شناسی ژن ها

برای ارزیابی بیشتر عملکرد رونوشت های هدف در مقایسه با رونوشت مرجع، تجزیه و تحلیل هستی شناسی ژن با استفاده

ویژگی‌های مهم (Hairpin و Hetero-Dimer, Self-Dimer) و دمای اتصال آغازگر آزمون شدند. آغازگرها توسط شرکت سیناکلون سنتز گردید. ژن مرجع در این آزمایش اکتین (KT965025.1) در نظر گرفته شد. جفت آغازگرها برای ژن اکتین به‌عنوان ژن خانه‌دار و توالی‌های آغازگر برای miRNAها به ترتیب در جدول ۱ و ۲ آورده شده است.

رشته اول Superscript III (Invitrogen) انجام شد (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007).

#### طراحی آغازگرها

با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی آغازگرها برای ژن اکتین (مرجع) و miRNA انجام گردید. آغازگرهای پیشنهادی با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Oligo Analyzer از نظر دارا بودن

جدول ۱- نام، توالی و شماره دسترسی ژن بتا اکتین

Table1- Name, sequence and accession number of beta-actin gene

Name	Sequence in 5'-3' direction	Accession Number (Gene Bank)
Actin F:	GTATCCATGAGACCACCTACAAC	KT965025.1
Actin R:	GTCAGCAATACCAGGGAACATA	

جدول ۲- توالی‌های آغازگر برای miRNA در گیاه *R. damascena*

Table 2- Primer sequences for miRNA in *R. damascena* plant

(5'→3') miRNA
miR5021 stem-loop RT-primer: GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACcagagccaACTTTTCT Forward: CCATTGTTAATCGAGTGAGAAGAAGAAGA Universal Reverse: GTGCAGGGTCCGAGGT

#### تجزیه و تحلیل Real-time PCR

از کیت SYBR® Green Real Time PCR Master Mix شرکت pars tous که دارای رنگ فلورسنت Syber-green است برای انجام آزمایش qRT-PCR استفاده گردید. انجام واکنش Real-time PCR، با استفاده از دستگاه Rotor Q-gene از شرکت Qiagen واقع در گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران طبق دستورالعمل کیت انجام شد. ژن خانه‌دار اکتین به‌عنوان کنترل داخلی و برای نرمال‌سازی داده‌ها در نظر گرفته شد. برنامه واکنش شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه بود. تمام واکنش‌ها حداقل سه تکرار بیولوژیکی و هریک توسط دو تکرار فنی برای تجزیه و تحلیل آماری تکرار شدند و بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد (Pfaffl *et al.*, 2002).

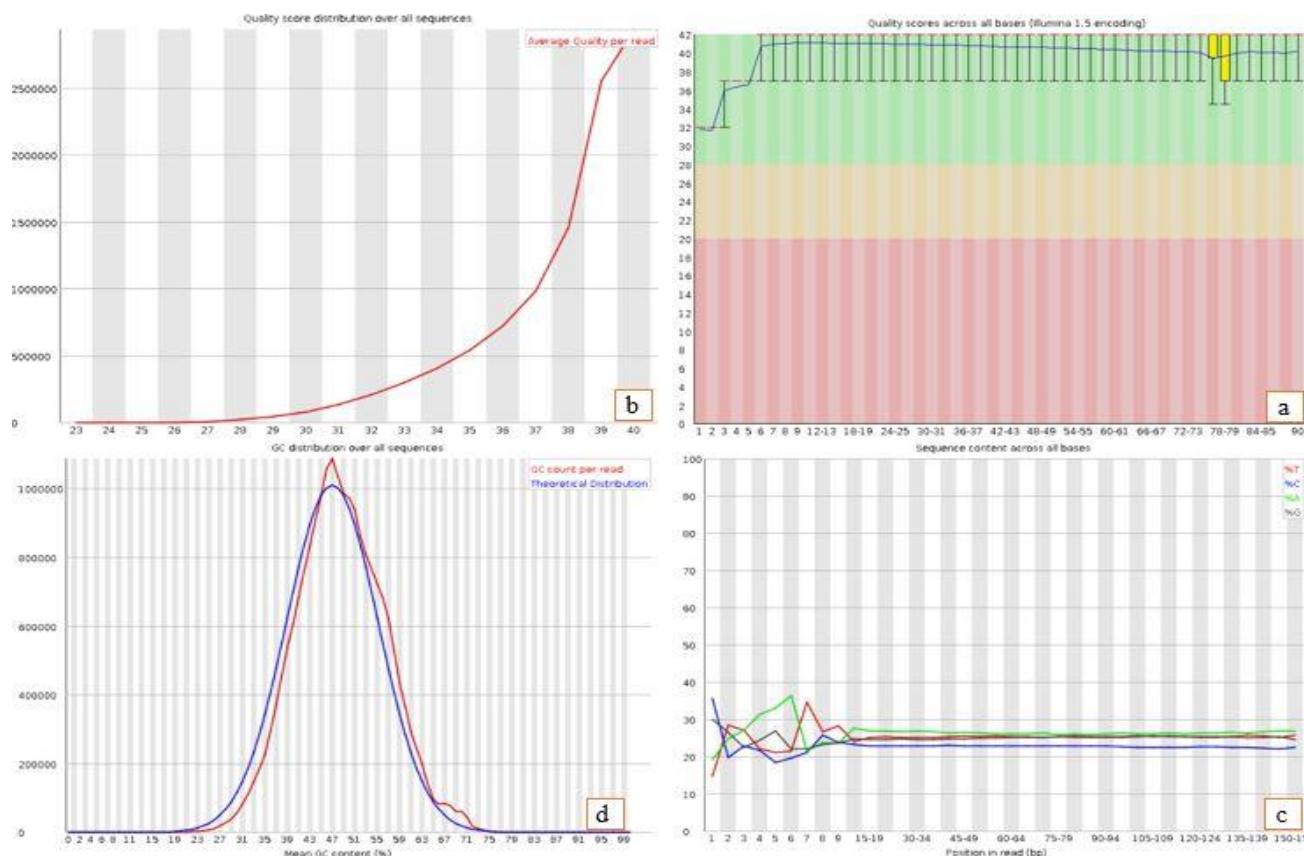
#### نتایج

آماده‌سازی داده‌ها، شناسایی miRNAها و پیش‌بینی ژن‌های هدف

در این مطالعه، بعد از ادغام تمام مجموعه داده‌های RNASeq گیاه *R. luciae* خوانش‌هایی با کیفیت بالا به دست آمد. نتایج ارزیابی کیفیت داده‌های جمع‌آوری شده نشان داد که به‌دنبال تعیین کیفیت اولیه و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین مواردی از قبیل میانگین کیفیت نوکلئوتیدها، میانگین کیفیت رونوشت‌ها، فراوانی هر یک از نوکلئوتیدها و میانگین درصد GC از وضعیت مطلوبی برخوردار هستند (شکل ۱). برای بازچینش ترانسکرپتوم از نرم‌افزار Trinity (V 2.14.0) استفاده شد و پروفایل بیانی سرهم‌بندی شده شامل ۲۴۵۴۲۱ رونوشت با میانگین طول ۸۹۸/۴۷ جفت باز بود. آماره N50 ترانسکرپتوم سرهم‌بندی شده ۱۵۹۱ جفت باز و درصد GC آن برابر با ۴۳ گزارش شد (جدول ۳). بعد از حذف

حذف توالی‌های کد کننده پروتئین، ساختارهای ثانویه رونوشت‌های حاوی miRNA های احتمالی توسط نرم-افزار UNAFold در C-mii ترسیم شد.

توالی‌های تکراری توسط نرم‌افزار Cap3، تعداد کانتینگ‌ها در *R. luciae* به ۱۶۴۰۷ کاهش یافت. EST ها و contig ها در نرم‌افزار Cmi برای شناسایی miRNA ها بارگذاری شدند. پس از انجام BLASTx و



شکل ۱. نتایج تعیین کیفیت خوانش‌ها. a: میانگین کیفیت نوکلئوتیدها، b: میانگین کیفیت خوانش‌ها، c: فراوانی هر یک از نوکلئوتیدها، d:

میانگین درصد GC خوانش‌ها

**Figure 1. The results of determining the quality of reads. a: Per base sequence quality, b: Per sequence quality scores, c: Per base sequence content, d: Per sequence GC content**

جدول ۳. مشخصات کمی و کیفی کانتینگ‌های ایجاد شده در *R. luciae*

**Table 3. Summary statistics on de novo assembly of *R. luciae***

ویژگی‌ها	Characteristics	Quantity مقادیر
تعداد کل رونوشت	Total number of transcripts	245421
N50	N50	1591
میانگین طول (bp)	Average length (bp)	898.47
کوتاه‌ترین اندازه رونوشت (bp)	The shortest transcript size (bp)	201
بلندترین اندازه رونوشت (bp)	Longest transcript size (bp)	73442
تعداد رونوشت‌های دارای قاب خوانش	Number of transcripts with open reading frames	5371
محتوای GC (درصد)	GC content (%)	43

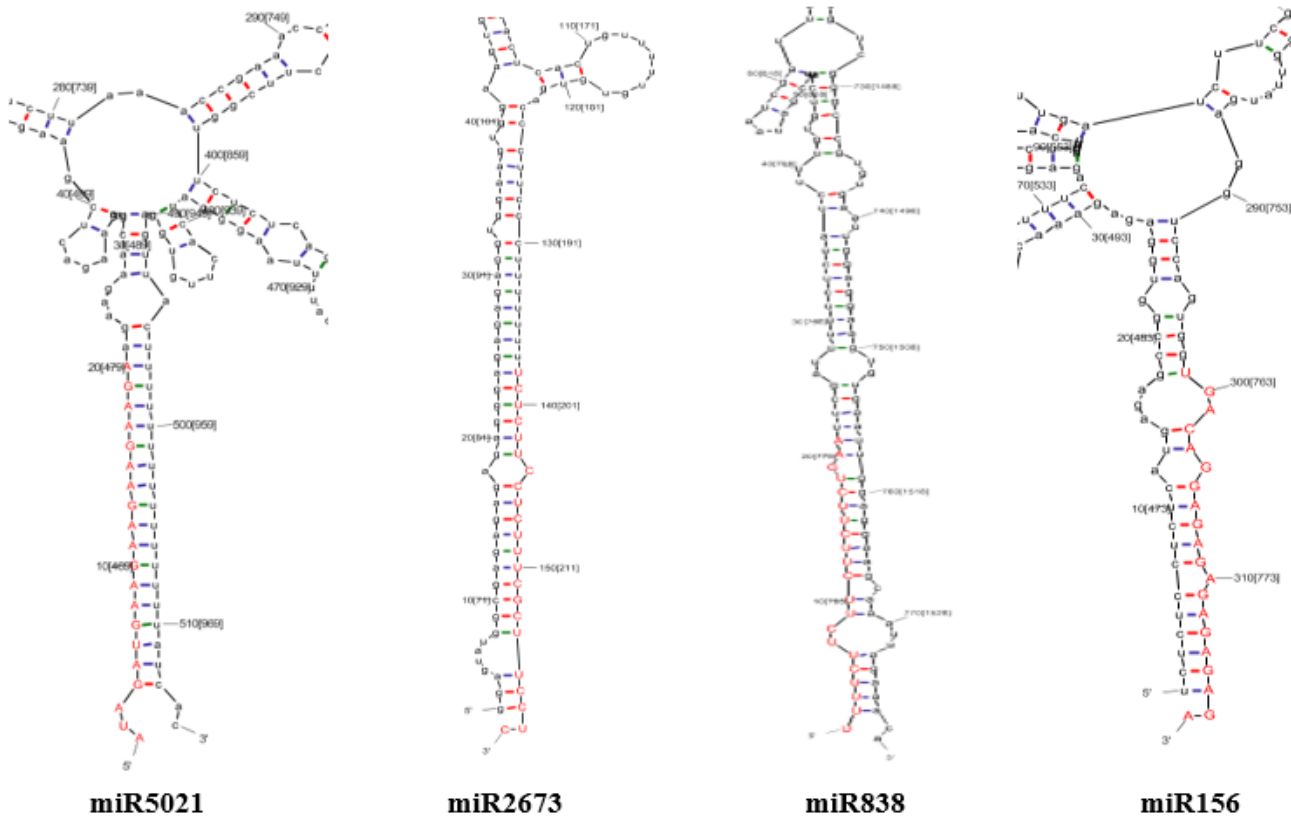
به‌عنوان miRNAهای حفاظت‌شده انتخاب شدند؛ مشخصات انحصاری هریک در جدول ۴ قابل مشاهده است. ساختارهای ثانویه پیش‌ساز ساقه-حلقه miRNAهای شناسایی‌شده به‌عنوان کاندید توسط نرم‌افزار UNAFold در C-mii با مشخصات منحصر به فرد ترسیم شد (شکل ۲). با توجه به شکل ۲ شرط مهم و اساسی ترسیم ساختار ثانویه کاملاً رعایت شده و قسمت بالغ miRNAها دقیقاً در قسمت حلقه ساختار ثانویه پیش‌ساز miRNA قرار داشت.

miRNAهای حفاظت‌شده در *R. luciae* بر اساس درصد GC و MFEI شناسایی شدند. مطالعه ما نشان داد با استفاده از داده‌های EST و کانتینگ‌ها در مجموع ۱۲۹ miRNA از ۶۴ خانواده بر اساس جستجوی همولوژی شناسایی شد. در نهایت پس از اعمال پالایه بر اساس تمام مشخصه‌های بیان‌شده، چهار خانواده miRNA (شامل: miR5021، miR2673، miR156 و miR838) که همولوژی بالایی با miRNAهای گیاهان عالی داشتند

جدول ۴. ویژگی‌های miRNAهای جدید شناسایی‌شده در *R. luciae*

Table 4. Characteristics of newly identified miRNA in *R. luciae*

miRNA	طول توالی Sequence length	تعداد نوکلئوتید Nucleotide content					NM	GC%	MFE (Kcal/mol)	MFEI (Kcal/mol)	موقعیت هدف Hit positions
		A	U	G	C	N					
miR5021	515	162	160	114	79	0	4	37.47	-188.566	-0.97	460-479
miR2673	159	31	48	44	36	0	4	51.31	-76.672	-0.95	199-220
miR838	779	163	339	160	117	0	4	35.55	-241.26	-0.87	759-779
miR156	318	58	113	84	63	0	4	46.22	-128.151	-0.87	762-781



شکل ۲. ساختار ثانویه ساقه-حلقه miRNAهای محافظت‌شده در *R. luciae* (توالی miRNAهای بالغ با رنگ قرمز مشخص شده است)

Figure 2. Secondary stem-loop structure of newly identified precursor *R. luciae* miRNAs putatively. (The sequence of mature miRNAs is marked in red.)

۷/۵- تا ۴۶/۴- کیلوکالری بر مول (kcal/mol) در *R. luciae* متغیر بود. پیشگویی ژن‌های هدف به وسیله miRNAهای گیاهی به دلیل درجه بالایی از جفت‌شدگی با ژن‌های هدفشان انجام می‌شود (Devi et al., 2018). هستی‌شناسی ژن و عملکرد زیستی پروتئین‌های هدف برای چهار miRNA شناسایی شده در جدول ۵ نشان داده شده است.

شناسایی ژن‌های هدف miRNA بر اساس جستجوی همسانی بین miRNAهای شناسایی شده بالغ در برابر رونوشت با BLASTx در برابر پایگاه داده Uniprot-TrEMBL (E-value  $\leq 10^{-5}$ ) توسط نرم‌افزار Cmi انجام شد. بر اساس معیارهای بیان شده، ۱۴ ژن هدف برای چهار miRNA در *R. luciae* شناسایی شد. MFE ساختارهای ثانویه ژن‌های هدف miRNA محاسبه شد و نتایج از دامنه

جدول ۵. فهرست پروتئین‌های هدف برای miRNAهای شناسایی شده در *R. luciae*

Table 5. List of target proteins for miRNAs identified in *R. luciae*

miRNA	پروتئین هدف Target protein	عملکرد زیستی Biological function	شناسایی هدف Target ID	هستی‌شناسی ژن GO ontology	
				فعالیت مولکولی Molecular function	فعالیت بیولوژیکی Biological function
Ath-miR5021	Elongation factor G, chloroplastic	کاتالیز انتقال ریبوزومی Ribosomal transfer catalysis	D7KU74	فعالیت حامل الکترون Electron carrier activity	جوانه‌زنی بذر Seed germination
	Fructokinase-1	تنظیم بیوسنتز عطرمايه و متابولیت‌های ثانویه Regulation of essential oil biosynthesis and secondary metabolites	Q6XZ7	فعالیت عامل شروع ترجمه Translation initiation factor activity	سازمان‌دهی کلروپلاست Chloroplast organization
	Protein kinase domain	حفظ شار کربن Maintaining carbon flux	A9PF28	فعالیت ترانسفراز Transferase activity	
Aly-miR838	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	پیشرفت چرخه سلولی progress of cell cycle	B9RTW5	فعالیت کانال یونی خارج سلولی-گلو تامات Extracellular-glutamate-gated ion channel activity	پروتئولیز Proteolysis
		کاهش فعالیت گیرنده‌های آستروئیدی reduction of activity of steroid receptors		فعالیت بیپتیداز از نوع سیستئین activity cysteine-type peptidase	تزریق پروتئین Protein neddylation
Ath-miR156	PICALM DNA binding protein	ترمیم DNA DNA repair	B9RI61	فعالیت اتصال DNA DNA binding	فرایند اصلاح پروتئین Protein modification process
	Clathrin assembly protein	واسطه پاسخ به استرس Stress response mediator	B9T128	اتصال کلاترین Clathrin binding	
mtr-miR2673	PBPe domain-containing protein	بیوسنتز آلکالوئیدها Biosynthesis of alkaloids	A5BEC0	فعالیت حمل و نقل Transporter activity	
		سنتز دیواره سلولی Cell wall synthesis		فعالیت کانال یونی گیرنده لیگاند Ligand-gated ion channel activity	
		رشد و تقسیم سلولی Cell growth and division			
		پاسخ به استرس Response to stress			



Binding (۷۹ درصد)، Transferase activity (هشت درصد) و فعالیت کیناز و دهیدروژناز (۱۱ درصد) بیشترین فراوانی را داشتند. این در حالی است که در گروه فرایندهای بیولوژیکی، در زمینه فرایندهای متابولیکی (۳۳ درصد)، فرایندهای سلولی (۲۵ درصد) و تنظیم فرایندهای بیولوژیکی (۲۴ درصد) بود. در گروه ترکیبات سلولی نیز کلروپلاست (۲۵ درصد)، گلزی (۱۷ درصد) و کلاترین (۱۲ درصد) بودند. رسم نمودار با نرم‌افزار برخط WEGO انجام شد (شکل ۳).

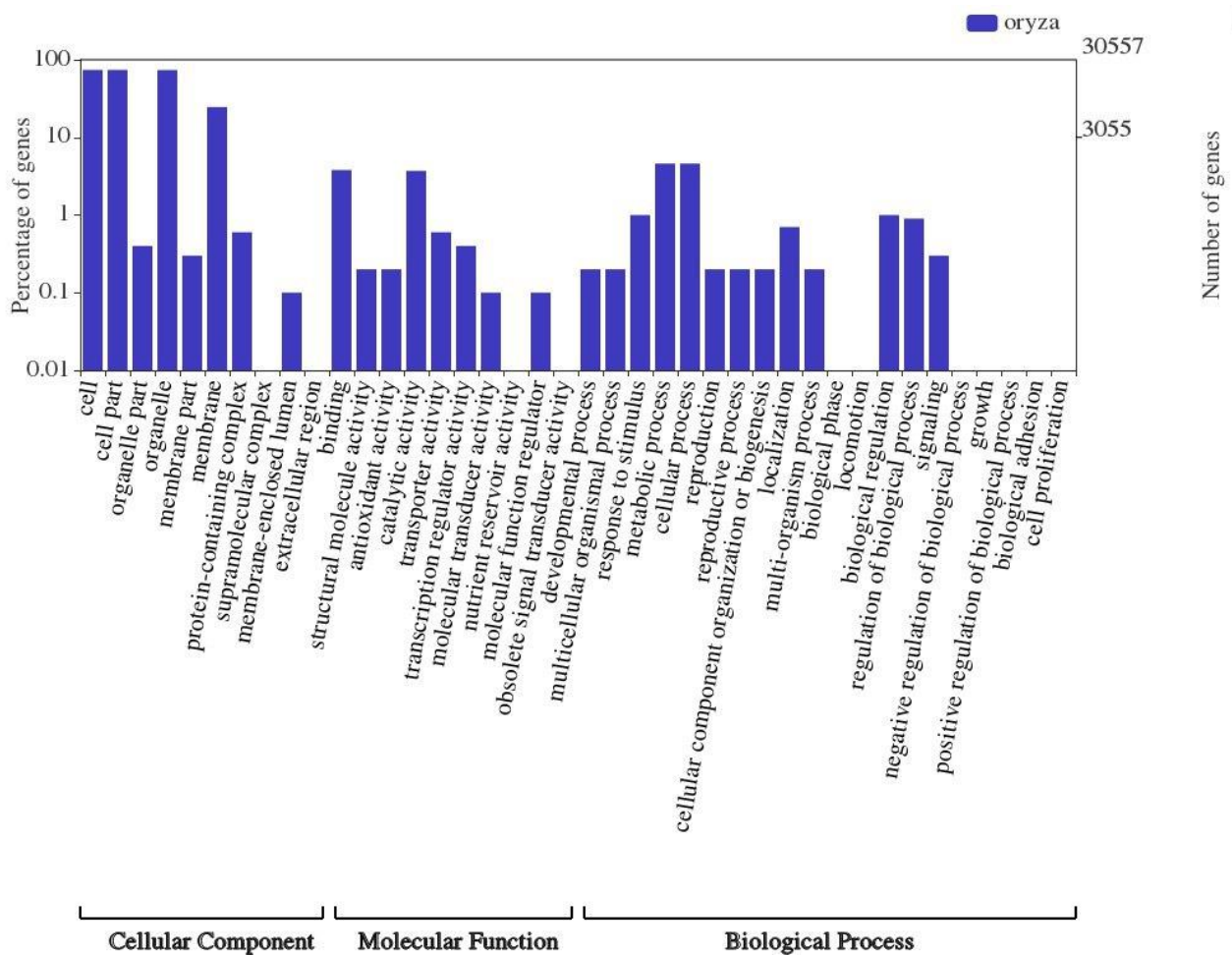
با استفاده از جستجوی BLASTn در برابر پایگاه داده NCBI با  $value \leq 10^{-5}$  توالی بالغ miRNA ذکر شده با توالی ژن‌ها کلیدی مسیر بیوستنز ترینوئیدها و فنیل پروپانوئیدها BLAST گردید. بر اساس نتایج، درصد ژن‌هایی را که همولوگ معنی‌داری داشتند برای بررسی محاسبات مولکولی می‌توان در نظر گرفت. ناحیه 3'UTR که در واقع قسمت غیرقابل ترجمه (none coding) ژن‌های DXR و فنیل استالدهید ردوکتاز در گل محمدی است با miR5021 چسبندگی بسیار خوبی نشان دادند. نتیجه Blast n حکایت از میزان شباهت ۱۰۰ درصد، 80 query cover درصد و میزان e-value 0.056 داشت (جدول ۶). طی بررسی به‌عمل‌آمده، بین توالی ژن آنتوسیانین سنتاز (ANS)، فلاونول سنتاز (FLS)، ژرانیل دی فسفات سنتاز (GGPPS) و کاروتنوئیداکسیژناز (CCDI) درگیر در تولید رنگ گلبرگ با mir-5021 چسبندگی و شباهت خوبی مشاهده شد. از این رو، نتیجه حاصل شد که این miRNA روی رنگ گل نیز تأثیرگذار است. توالی mRNA ژن GGPPS و CCDI در *R. Damascena* با miR5021 چسبندگی خوبی نشان داد (جدول ۶). این دو ژن با میزان رنگ‌دانه کاروتنوئید در گلبرگ مرتبط است (Karimi et al., 2022).

پروتئین‌های هدف miR5021 از گونه گیاهی *Arabidopsis thaliana* در جدول ۵ توسط نرم‌افزار cmii شناسایی شدند. نتایج GO و پروتئین‌های هدف برای miR5021 شامل: زیر واحد ۶ سوکسینات دهیدروژناز، پروتئین اتصال-RNA، PTST homolog 2، ریبوزوم ۵ فسفات ایزومراز ۲، اینوزیتول ۴،۳،۱-تری فسفات ۶،۵ - کیناز بودند که نقش بسزایی در فرایندهای بیولوژیکی و عملکرد سلولی داشتند.

پروتئین‌های متصل شونده به DNA و پروتئین موتناژ کلاترین در miR156 از گونه گیاهی آراییدوپسیس نیز شناسایی شدند. اطلاعات هستی‌شناسی ژن‌های هدف مربوطه، حکایت از عملکرد زیستی و فعالیت مولکولی داشته است.

پروتئین هدف miR838 از گونه گیاهی (*Arabidopsis lyrata*) با شماره دسترسی B9RTW5 به نام NEDD8-enzyme E1 catalytic subunit activating شناسایی شد. پروتئین هدف mtr-miR2673 از گونه گیاهی یونجه سربریده (*Medicago truncatula*) با شماره دسترسی PBPe domain-containing (A5BEC0) به نام پروتئین protein شناسایی شد. این گروه از پروتئین‌ها دارای میل اتصال به پنی‌سیلین هستند. معمولاً در هر ارگانیزم تعداد زیادی پروتئین متصل به پنی‌سیلین وجود دارد که آنها هم به‌صورت غشایی و هم سیتوپلاسمی یافت می‌شوند.

برای آنالیز بیشتر، تفسیر عملکردی ژن‌های هدف توسط نرم‌افزار Blast2GO با استفاده از ابزار BLASTx در برابر پایگاه داده NR با  $E-value \leq 10^{-5}$  انجام شد. بر مبنای آنالیز GO، ژن‌های هدف رز لوسیا متعلق به یکی از سه گروه عملکردهای مولکولی (شش درصد)، زیستی (شش درصد) و ترکیبات سلولی (۸۸ درصد) بودند. در گروه عملکردهای مولکولی، ژن‌های مربوط به



شکل ۳. آنالیز هستی شناسی ژن های هدف برای miRNA های شناسایی شده در گیاه *R. lucifera*

Figure 3. Gene Ontology analysis of target genes for miRNAs identified in *R. lucifera*

جدول ۶. درصد شباهت (همولوگ) miR5021 با توالی ژن های هدف مرتبط با عطر و رنگ گل محمدی

Table 6. Percentage homolog of miR5021 with the sequence of target genes related to the scent and color in *R. damascena*

Gene name	Query cover	E value	Per. Identity
RhPAR	90%	0.16	100%
RhANS	35%	0.36	100%
MYB	80%	0.17	100%
GGPPS	65%	0.67	100%
DXR	80%	0.056	100%
CHS	75%	0.90	100%
CCD1	100%	0.065	100%
FLS	100%	0.22	100%

PAR: phenylacetaldehyde reductase, ANS: anthocyanidin synthase, MYB: transcription factor MYB1, GGPPS: geranylgeranyl diphosphate synthase, DXR: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, CHS: chalcone synthase, CCD1: carotenoid cleavage dioxygenase 1, FLS: flavonol synthase

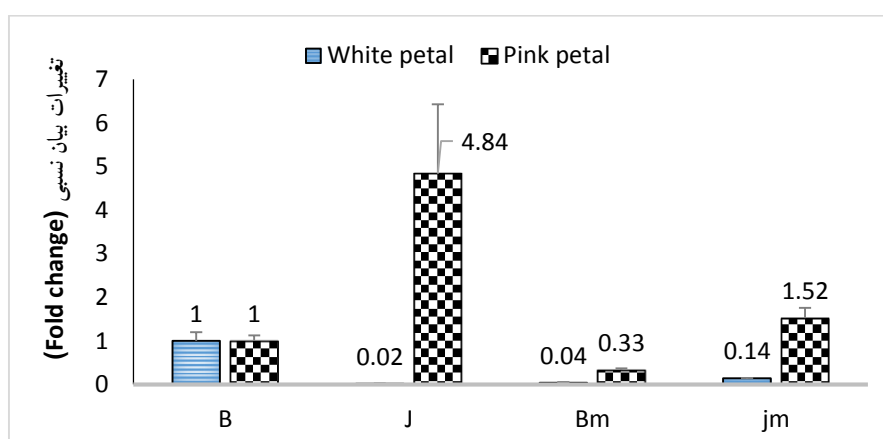
بیان نسبی miR5021 (کانتینگ ۱۶۳۴۳) استفاده شد. نتایج تحلیل بیان نسبی miR5021 درگیر در مسیر تولید عطر و رنگ *R. damascena* در دو حالت شاهد (بدون اعمال

تجزیه و تحلیل بیان miRNA کاندید پیش بینی شده با Real-time PCR

در این تحقیق از Real-time PCR برای تأیید سطح

در مرحله غنچه گلبرگ گل سفید منجر به کاهش ۲۵ برابری نسبت به شاهد و در مرحله جوان با مقدار نسبی ۰/۱۴ نیز منجر به کاهش هفت برابری بیان نسبت به شاهد شده است. تأثیر این محرک در گلبرگ گل صورتی در مرحله غنچه منجر به کاهش سه برابری و در مرحله جوان منجر به افزایش جزئی نسبت به شاهد شده است.

تیمار متیل جاسمونات) و حالت تحت تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۳۰۰ میکرومولار ۴۸ ساعت پیش از برداشت، نشان داد (شکل ۴) که میزان بیان نسبی miR5021 در مرحله رشدی جوان نمونه سفید و صورتی رنگ به ترتیب حدود ۰/۰۲ و ۴/۸۴ برآورد شده که نسبت به شاهد تقریباً حدود پنج برابر کاهش یافته است؛ اما تأثیر متیل جاسمونات



شکل ۴. تجزیه و تحلیل بیان نسبی miR5021 در اندام گلبرگ دو مرحله نموی (غنچه و جوان) گل محمدی (B: غنچه (شاهد)، J: جوان، Bm: غنچه متیل دار، jm: جوان متیل دار)

Figure 4. Analysis of the relative expression of miR5021 in the petal organ of two developmental stages (bud and young) of *R.damascena*. (B: bud (control), J: young, Bm: methylated bud, jm: methylated young)

همولوژی برای شناسایی miRNAهای جدید استفاده شد و تمام ویژگی‌های اصلی miRNAها مانند ساختار ثانویه سنجاق‌سری، سطح بالای حفاظت‌شدگی برای برخی از miRNAها و حداقل شاخص انرژی آزاد فولدینگ (MFEI) کاملاً در نظر گرفته شده است (Karimi et al., 2018). شاخص برتر برای تعیین ساختار ثانویه اسیدهای نوکلئیک و جلوگیری از پیش‌بینی اشتباه miRNA از دیگر RNAهای کوچک به ترتیب MFE (حداقل انرژی آزاد فولدینگ) و MFEI است. البته هرچه مقدار MFE کمتر (منفی‌تر) باشد منجر به افزایش پایداری ساختار ثانویه توالی‌های RNA و DNA می‌گردد (Karimi et al., 2017; Bonnet et al., 2004).

در مطالعات مشابه که هدف آن شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده در *Stevia rebaudiana* و *Taraxacum spp.*

## بحث

با استفاده از نسل جدید فناوری‌های توالی‌یابی و بیوانفورماتیک پیشرفته، مطالعه مربوط به miRNA برای گونه‌های گیاهی غیر مدل صرف شده است و تعداد miRNAهای شناسایی شده به‌طور چشمگیری در سال‌های گذشته افزایش یافته است. miRNAها تقریباً در تمام فرایندهای بیولوژیکی و متابولیک نقش مهمی دارند و یک راهبرد منحصربه‌فرد برای بهبود گیاهان ارائه می‌دهند. افزایش زیست‌توده گیاهی از طریق کنترل توسعه گیاه و تغییر فاز یکی از دستاوردهای بیوتکنولوژی مبتنی بر miRNA بوده است. تحمل گیاه به تنش غیر زیستی و زیستی نیز با تنظیم بیان یک miRNA منحصربه‌فرد به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (Wang et al., 2019).

در این مطالعه از روش داده‌های زیستی مبتنی بر

است کنترل شود (Singh et al., 2016). در برگ *Ananas comosus* var. *Bracteatus* حدود ۴۳ آنزیم رمزگذاری شده یونی ژن از طریق تجزیه و تحلیل رونویسی شناسایی شده که در بیوسنتز ترینوئیدها نقش دارند. علاوه بر این، miR-2919، miR-5251، miR-838، miR-5021 و miR-5658 از کنترل *Ferula gummosis* برای بیوسنتز ترینوها نیز نقش دارند. باین حال، فاکتورهای رونویسی SPL7، SPL11 و ATHB13 از *Arabidopsis* که در بیوسنتز ترینوئیدی عمل می کنند، احتمالاً توسط miR-5021 و miR-5658 تنظیم می شوند (Owusu Adjei et al., 2021; Najafabadi and Naghavi, 2018).

مشخص شده است که نعناع (*Mentha*) دارای miR-414، 156، miR-5021 و miR-156 بیوسنتز اسانس هستند. باین حال، miR156 به طور خاص برای مشارکت در بیوسنتز فلاون و آلکالوئیدها آشکار شده است. در پژوهش دیگر نیز به اثبات رسید که تأثیر miR156 بر گلدهی پیچیده و شامل مسیرهای مختلف است که هنوز کشف نشده اند. حیاتی ترین فعل و انفعالات در ژن SPL-miR156 منجر به انتقال گیاه از مرحله رویشی به زایشی می شود (Ahmad et al., 2022).

miR838 نیز در *A. thaliana* توسط استرس گرمایی القا می شود (Arif et al., 2022). miR2673 نقش مهمی در رشد سلولی، سیگنال دهی سلول به سلول و فعال سازی سلول دارد (Yuan et al., 2022). miR2673 ممکن است ژن پیرویین-۵-کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR) را تنظیم کند و در تنظیم تجمع پرویین در پاسخ به استرس نیز نقش دارد (Yang et al., 2013).

برخی از ژن های کلیدی مسیر بیوسنتز ترینوئیدها و فنیل پروپانوئیدها در پایگاه KEEG که در تولید عطر و رنگ به خصوص در گل محمدی دخیل بودند (Zhang et al., 2022; Glagoleva et al., 2022) بررسی و انتخاب شدند. نتایج BLASTn نشان داد که miR5021 با mRNA ژن *DXR* (مؤثر در میزان افزایش اسانس و میزان ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گل) در گل محمدی، فنیل استالدهید

بود، کارایی بالایی با استفاده از داده های RNA-seq و مونتاژ جدید آنها برای شناسایی miRNA های حفاظت شده نشان داده شد (Karimi et al., 2022; Mehta et al., 2016). در مطالعه سمندری و همکاران (Samandari et al., 2022)، بازچینش رونوشت زیره سیاه ایرانی به وسیله نرم افزار Trinity و تفسیر عملکردی توالی های دربرگیرنده ریزماهوره توسط پایگاه داده WEGO نشان داد که ژن های منفرد حاوی نشانگرهای ریزماهوره طیف گسترده ای از فعالیت های زیستی گیاه زیره سیاه ایرانی را پوشش می دهند و ژن های درگیر در نمو دانه، حد بالایی از بیان را دارند.

با شناسایی یک miRNA جدید، همواره شناسایی ژن هایی که هدف این miRNA هستند ضروریست. در این مهم نیز، بیوانفورماتیک کمک شایانی در پیش بینی ژن های هدف یک miRNA کرده است. در واقع شناسایی ژن های هدف miRNA یک مرحله خیلی مهم برای پی بردن به نقش miRNA متمایز کاندید در عملکرد سلولی و فرایندهای بیولوژیکی است (Karimi et al., 2018).

پروتئین های هدف miR5021 از جمله فاکتور افزایش طول EF-G کلروپلاست موضعی، در سنتز پروتئین در پلاستیدها نقش دارد. پروتئین فروکتوکیناز نیز ممکن است نقش مهمی در حفظ شار کربن به سمت تشکیل نشاسته در آندوسپرم داشته باشد. تأثیر این miRNA بر پروتئین های کینازی نیز به طور مستقیم تقریباً در تمام جنبه های فیزیولوژی از قبیل تنظیم فرایند داخل سلولی و فعالیت های سلولی از زمان رشد تا هنگام مرگ، انتقال سیگنال و فسفریله کردن پروتئین که منجر به خاموشی آن می شود و گام ضروری در برخی از سرطان ها و بیماری های التهابی است دخالت داشته باشد (Modi et al., 2022). طبق پیش بینی فان و همکاران، miR-5021 برای تنظیم بیوسنتز رکن ترینوئید triterpenoid عمل می کنند (Fan et al., 2015). گزارش Singh، نشان داد با توجه به نقش miR156 و miR5021 در تنظیم مسیرهای متابولیک ثانویه در *Mentha* spp. سیستم تنظیم کننده ژن بیوسنتز اسانس ممکن

miRNAها معمولاً بیان ژن‌ها را تنظیم منفی می‌کنند، بنابراین بر اساس پژوهش وی و همکاران (Wie *et al.*, 2015) انتظار می‌رود که افزایش سطوح miR5021 در *PNS* (*Panax notoginseng*) ژن‌های بیوسنتزی را در مسیر saponins هدف قرار می‌دهد، با سطوح PNS همبستگی معکوس داشته باشد؛ اما در مقایسه بین مرحله بیولوژیکی بیشترین بیان در نمونه سفیدرنگ متعلق به مرحله غنچه بوده و در نمونه صورتی‌رنگ بیان ژن در مرحله جوان مشهود است. در مطالعه‌ای دیگر بر روی *R. damascena* افزایش بیان miR169e در غلظت ۱ میلی‌مولار اسید جاسمونیک کاهش قابل توجهی در بیان ژن DXR نشان داد (Nouri *et al.*, 2017). با این حال، به دلیل تأثیر منفی miR5021 بر روی ژن هدف آن، از فناوری dsRNA در مهندسی ژنتیک (karimi *et al.*, 2022) می‌توان برای خاموش کردن miR5021 برای بهبود کمیت و کیفیت رایحه و رنگ در *R. damascena* استفاده کرد.

#### منابع مورد استفاده

- Ahmad, A., Khan, H. A., & Kazmi, M. N. A. 2022. Bloom or not to bloom: Understanding the MiR-156 based regulation of flowering genes in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Pure and Applied Agriculture*, 7(2), 73-82.
- Akhtar, G., Jaskani, M. J., Farooq, A., Byrne, D. H., Rajwana, I. A., Sajjad, Y., ... & Awan, F. S. 2019. Genetic plasticity among genotypes of *Rosa centifolia* and *R. damascena* from Pakistan, USA and Iran. *International Journal of Agriculture and Biology*, 21(3), 513-519.
- Arif, M. A., Top, O., Csicsely, E., Lichtenstern, M., Beheshti, H., Adjabi, K., & Frank, W. 2022. DICER- LIKE1a autoregulation based on intronic microRNA processing is required for stress adaptation in *Physcomitrium patens*. *The Plant Journal*, 109(1), 227-240.
- Baydar, H., ERBAŞ, S., & Kazaz, S. 2016. Variations in floral characteristics and scent composition and the breeding potential in seed-derived oil-bearing roses (*Rosa damascena* Mill.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(4), 560-569.
- Bendahmane, M., Dubois, A., Raymond, O., & Bris, M. L. 2013. Genetics and genomics of flower

ردوکتاز که از مهمترین آنزیم‌های درگیر در مسیر تولید 2-phenyl ethanol همچنین مهمترین ترکیب تشکیل‌دهنده عطر گل است (Rasouli *et al.*, 2018)، در گونه‌های *R. Rosa chinensis*، *R. rugosa*، *R. damascena* و *moschata* شباهت و query cover بسیار خوبی با میزان E-value پایین نشان داد.

از نرم‌افزار psRNATarget برای شناسایی اثر miRNA متمایز کاندید مربوط به ترپنوئیدها، بر روی ژن‌های هدف آنها استفاده شد (Dai and Zhao, 2011) و نتایج نشان داد که همه miRNAها با برش رونوشت‌های هدف، آنها را هدف قرار می‌دهند. miR5021 نسبت به بقیه miRNAها فراوانی بیشتر داشت و به‌عنوان miRNA منتخب که در بیوسنتز رایحه گل با تأثیر بر روی ژن‌های دخیل در مسیر ترپنوئیدی (*DXR*, *PAR*, *MYB*, *CHS*) و همچنین رنگ گل با تأثیر بر ژن‌های منتخب درگیر در سنتز آنتوسیانین و کارتنوئیدها (*GGPPS*, *CCDI*, *FLS*, *ANS*) مورد تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی قرار گرفت. بالاترین بیان miR5021 نسبت به شاهد متعلق به نمونه صورتی‌رنگ گل محمدی در مرحله گلبرگ جوان بود که بیانگر تأثیر بیشتر و مهارکنندگی بر ژن‌های هدف است. این تأثیر منفی منجر به کاهش رایحه و اسانس و تولید رنگ برای مصارف مختلف در صنعت می‌گردد. این نتیجه حکایت از آن دارد که با فرض تأثیر منفی miR5021 بر روی ژن‌های مرتبط با عطر و رنگ گل محمدی، کاهش بیان و فعالیت این miRNA تأثیر مثبت و افزایشی در بیان ژن‌های مربوطه خواهد داشت؛ بنابراین تیمار غنچه صورتی‌رنگ و هر دو مرحله نموی (غنچه و جوان) گل سفید رنگ با اعمال غلظت ۳۰۰ میکرومولار هورمون متیل جاسمونات در افزایش بیان ژن‌های مورد نظر می‌تواند مؤثر واقع شود. در مطالعه نورمحمدی و همکاران به دلیل تأیید ژن‌های هدف برای شش miRNA شناسایی شده توسط نرم‌افزار Cmi از محلول‌پاشی محرک متیل‌جاسمونات با غلظت ۲۰۰ میکرومولار استفاده شد و افزایش بیان نسبی پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد (Noormohammadi *et al.*, 2022).

- Huang, X., & Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*, 9(9), 868-877.
- Karimi, A. A., Naghavi, M. R., Peyghambari, S. A., Sobhani, A., & Rasoulnia, A. 2022. Identification of miRNAs and Their Target Genes in *Taraxacum* spp. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 24(6), 1457-1471.
- Karimi, A. A., Naghavi, M., & Nasiri, J. 2018. Identification of miRNAs and their related target genes in *Papaver somniferum*. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 48(4). (In Persian)
- Karimi, L., Mansoori, B., Mohammadi, A., Aghapour, M., & Baradaran, B. 2017. Function of microRNA-143 in different signal pathways in cancer: New insights into cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 121-131. (In Persian)
- Khosh-Khui, M. 2014. Biotechnology of scented roses: a review. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 1(1), 1-20.
- Li, P., Tian, Z., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, M., Fang, X., ... & Cai, X. 2019. MicroRNAome Profile of *Euphorbia kansui* in Response to Methyl Jasmonate. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1267.
- Li, Y., Zhao, H., Wilkins, K., Hughes, C., & Damon, I. K. 2010. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. *Journal of virological methods*, 169(1), 223-227.
- Ma, C., Zhou, D., Wang, H., Han, D., Wang, Y., & Yan, X. 2017. Elicitation of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) cell suspension culture for enhancement of inulin production and altered degree of polymerisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 88-94.
- Mallory, A. C., & Vaucheret, H. 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature genetics*, 38(Suppl 6), S31-S36.
- Mehta, R., Otgonsuren, M., Younoszai, Z., Allawi, H., Raybuck, B., & Younossi, Z. 2016. Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *BMJ open gastroenterology*, 3(1), e000096.
- Modi, A., Purohit, P., Gadwal, A., Ukey, S., Roy, D., Fernandes, S., & Banerjee, M. 2022. In-silico analysis of differentially expressed genes and their regulating microRNA involved in lymph node metastasis in invasive breast carcinoma. *Cancer Investigation*, 40(1), 55-72.
- Naghavi, M. R., & Karimi, A. A. 2018. Identification of miRNAs and their target genes in red clover (*Trifolium pretense*). *Iranian Journal of initiation and development in roses. Journal of experimental botany*, 64(4), 847-857.
- Biswas, S., Hazra, S., & Chattopadhyay, S. 2022. Deep sequencing unravels methyl jasmonate responsive novel miRNAs in *Podophyllum hexandrum*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 31(3), 511-523.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Bonnet, E., Wuyts, J., Rouz e, P., & Van de Peer, Y. 2004. Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics*, 20(17), 2911-2917.
- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. 2009. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 7(4), 147-154.
- Chang, L., & Xia, J. 2023. MicroRNA Regulatory Network Analysis Using miRNet 2.0. In *Transcription Factor Regulatory Networks* (pp. 185-204). Humana, New York, NY.
- Dai, X., & Zhao, P. X. 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids research*, 39(suppl\_2), W155-W159.
- de Sena Brandine, G., & Smith, A. D. 2019. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Research*, 8.
- Devi, K. J., Saha, P., Chakraborty, S., & Rajwanshi, R. 2018. Computational identification and functional annotation of microRNAs and their targets in three species of kiwifruit (*Actinidia* spp.). *Indian Journal of Plant Physiology*, 23, 179-191.
- Fan, R., Li, Y., Li, C., & Zhang, Y. 2015. Differential microRNA analysis of glandular trichomes and young leaves in *Xanthium strumarium* L. reveals their putative roles in regulating terpenoid biosynthesis. *PLoS One*, 10(9), e0139002.
- Fooladvand, Z., & Fazelinasab, B. 2016. Study the genomes expressed in leaf nodes cells of *Salvia fruticosa* herb to identify important genomic elements. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 6(23), 77-86.
- Glagoleva, A. Y., Vikhorev, A. V., Shmakov, N. A., Morozov, S. V., Chernyak, E. I., Vasiliev, G. V., ... & Shoeva, O. Y. 2022. Features of Activity of the Phenylpropanoid Biosynthesis Pathway in Melanin-Accumulating Barley Grains. *Frontiers in Plant Science*, 13.
- Ha, M., & Kim, V. N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 509-524.

- chamomile (*Matricaria chamomilia* L.). Iranian Plant Biology, 4(11), 27-38
- Samad, A. F., Sajad, M., Nazaruddin, N., Fauzi, I. A., Murad, A. M., Zainal, Z., & Ismail, I. 2017. MicroRNA and transcription factor: key players in plant regulatory network. *Frontiers in plant science*, 8, 565.
  - Samandari-Bahraseman, M. R., Ismaili, A., Esmaili-Mahani, S., Ebrahimie, E., & Loit, E. 2022. *Bunium Persicum* Seeds Extract in Combination with Vincristine Mediates Apoptosis in MCF-7 Cells through Regulation of Involved Genes and Proteins Expression. *Modern Genetics Scientific Quarterly*, 17(3), 273-281. (In Persian).
  - Samavatian, H., Soltani, B. M., Yousefi, F., Jashni, M. K., & Mehrabi, R. 2023. Susceptible and resistant wheat cultivars show different miRNAs expression patterns in response to *Zymoseptoria tritici*. *Journal of Plant Pathology*, 1-11
  - Sewe, S. O., Silva, G., Sicat, P., Seal, S. E., & Visendi, P. 2022. Trimming and validation of illumina short reads using Trimmomatic, Trinity assembly, and assessment of RNA-seq data. In *Plant Bioinformatics* (pp. 211-232). Humana, New York, NY.
  - Shen, J., Deng, Y., Jin, X., Ping, Q., Su, Z., & Li, L. 2010. Thiolated nanostructured lipid carriers as a potential ocular drug delivery system for cyclosporine A: Improving in vivo ocular distribution. *International journal of pharmaceutics*, 402(1-2), 248-253.
  - Singh, N., Srivastava, S., Shasany, A. K., & Sharma, A. 2016. Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of *Mentha* spp. *Computational Biology and Chemistry*, 64, 154-162.
  - 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.
  - Tian, T., Wang, J., & Zhou, X. 2015. A review: microRNA detection methods. *Organic & biomolecular chemistry*, 13(8), 2226-2238.
  - Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods*, 3(1), 1-12.
  - Wang, J., Lewis, D., Shi, R., McGhie, T., Wang, L., Arathoon, S., ... & Zhang, H. 2022. The colour variations of flowers in wild *Paeonia delavayi* plants are determined by four classes of plant pigments. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 50(1), 69-84.
  - Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 26(2). (In Persian)
  - Najafabadi, A. S., & Naghavi, M. R. 2018. Mining *Ferula gummosa* transcriptome to identify miRNAs involved in the regulation and biosynthesis of terpenes. *Gene*, 645, 41-47. (In Persian)
  - Nouri Jahangirloo, A. M. 2017. Identify and evaluation of miRNA and DXR involved in oil rose (*Rosa damascena* Mill) treated with gibberellic and jasmonic acid (Doctoral dissertation, University of Zabol). (In Persian)
  - Numnark, S., Mhuantong, W., Ingsriswang, S., & Wichadakul, D. 2012, December. C-mii: a tool for plant miRNA and target identification. In *BMC genomics* (Vol. 13, No. 7, pp. 1-10). BioMed Central.
  - Nurmohammadi, N., Esmaili, A., Sobhani Najafabadi, A. & Nazarian Firouzabadi, F. 2022. Identification of conserved miRNAs of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) using next-generation sequencing data. *Genetic research and improvement of pasture and forest plants of Iran*, 30, 72-85. (In Persian)
  - Owusu Adjei, M., Zhou, X., Mao, M., Rafique, F., & Ma, J. 2021. MicroRNAs roles in plants secondary metabolism. *Plant Signaling & Behavior*, 16(7), 1915590.
  - 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*. *Current biology*, 12(17), 1484-1495.
  - Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
  - Rasouli, O., Ahmadi, N., & Monfared, S. R. 2020. Molecular characterization and expression pattern of RhPAR, RhMYB1 and RhANS genes involving in scent and color production in *Rosa damascena*. *Scientia Horticulturae*, 272, 109399.
  - Rasouli, O., Ahmadi, N., Monfared, S. R., & Sefidkon, F. 2018. Physiological, phytochemicals and molecular analysis of color and scent of different landraces of *Rosa damascena* during flower development stages. *Scientia Horticulturae*, 231, 144-150.
  - Sabzehzari, M., & Naghavi, M. R. 2019. Phyto-miRNA: a molecule with beneficial abilities for plant biotechnology. *Gene*, 683, 28-34. (In Persian)
  - Salimi, Shekari, & Farid. 2012. Effect of methyl jasmonate and salinity stress on some morphological characteristics and flower performance in German

- related to proline accumulation under drought stress in potato. *Computational Biology and Chemistry*, 46, 48-54.
- Yuan, J., Chao, Y., & Han, L. 2022. Uncovering a Phenomenon of Active Hormone Transcriptional Regulation during Early Somatic Embryogenesis in *Medicago sativa*. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8633.
  - Zhang, B. H., Pan, X. P., Cox, S. B., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. 2006. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63, 246-254.
  - Zhang, B., & Wang, Q. 2015. MicroRNA- based biotechnology for plant improvement. *Journal of cellular physiology*, 230(1), 1-15.
  - Zhang, G., Wang, H., Zhang, Z., Verstrepen, K. J., Wang, Q., & Dai, Z. 2022. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for terpenoids production: advances and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(4), 618-633.
  - Wang, J., Mei, J., & Ren, G. 2019. Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in plant science*, 10, 360.
  - Wasternack, C., & Hause, B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany*, 111(6), 1021-1058.
  - Wei, R., Qiu, D., Wilson, I. W., Zhao, H., Lu, S., Miao, J., ... & Tang, Q. 2015. Identification of novel and conserved microRNAs in *Panax notoginseng* roots by high-throughput sequencing. *BMC genomics*, 16(1), 1-10.
  - Yang, J., Zhang, F., Li, J., Chen, J. P., & Zhang, H. M. 2016. Integrative analysis of the microRNAome and transcriptome illuminates the response of susceptible rice plants to the rice stripe virus. *PLoS one*, 11(1), e0146946.
  - Yang, J., Zhang, N., Ma, C., Qu, Y., Si, H., & Wang, D. 2013. Prediction and verification of microRNAs



## Identification of conserved miRNAs and their target genes in the damask rose (*Rosa damascena* Mill.)

H. S. Kiani<sup>1</sup>, M. Sabokdast Noudehi<sup>2</sup>, M.R. Naghavi<sup>\*3</sup>, M. Shokrpour<sup>4</sup>, N. Yazdanfar<sup>5</sup>

1- Ph.D. Student, Dept. Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran.

2- Assist. Prof., Dept. Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran.

3\*- Corresponding author, Prof., Dept. Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran. Email: mnaghavi@ut.ac.ir

4- Assoc. Prof., Dept. Agriculture and Plant Breeding, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran.

5- Assist. Prof., Chemical Industries Development Research Institute, Karaj, I.R. Iran.

Received: 30.11.2022

Accepted: 11.03.2023

### Abstract

miRNAs genes are regulatory elements that their main role is to downregulate gene expression at the mRNAs level. miRNAs also play important roles in several plant pathways related to important cellular activities such as growth, reproduction, differentiation, morphogenesis, apoptosis and, response to abiotic and biotic stresses. This research was conducted to identify conserved miRNAs and their target genes using next generation sequencing data in the damask rose (*Rosa damascena* Mill.). Although bioinformatics methods have been developed as the most efficient strategy for target miRNA identification, high-throughput experimental strategies are still in high demand. Bioinformatics tools (Cmii, psRNATarget, WEGO, Blast2GO) and laboratory method (real-time PCR) were used to identify new miRNAs, predict and determine the ontology of the target genes involved in the production of scent and color in the damask rose, respectively. Using EST and RNA-seq data based on *Rosa lucieae* homology, four miRNA families, including: miR5021, miR2673, miR156, and miR838, were selected as candidate miRNAs. In the next step, for the quantitative evaluation of the real-time PCR to validate the expression level of the selected miR5021 in two samples (white and hot-pink) and the biological stage (young and bud) of the damask rose, foliar spraying with the concentrations of zero (control) and 300  $\mu$ M of methyl Jasmonate for 48 hours was made. Result showed the highest relative expression of miR5021 belonging to the pink sample on the young development stage. These findings accelerate future prospective studies on the regulatory mechanisms of miRNAs in *Rosa damascena*.

**Keywords:** EST, MicroRNA, RNA-seq, bioinformatics, non-coding RNA, target genes