

Identification and investigation of the expression of some conserved microRNAs involved in the biosynthesis pathway of Withanolides in Ashwagandha

S. Mohammadnejad¹, M.R. Naghavi^{2*}, N. Khosravi-Dehaghi³ and J. Nasiri⁴

¹ M.Sc. Graduated, Dept. Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran.

^{2*} 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

³ Assist Prof. Dept. Pharmacognosy, School of Pharmacy, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

⁴ Assist Prof. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, Karaj, Iran

Extended Abstract

Background and purpose:

Withania somnifera, known as Indian ginseng, is a small evergreen shrub that grows in tropical and subtropical regions and belongs to the Solanaceae family. The major constituents of *W. somnifera* are withanolides, including withafrin A, withanolide D, withanolide A, and withanones. Withanolide A and withanones are primarily synthesized in the roots, while withafrin A and withanones are mainly produced in the leaves. The genes responsible for the appropriate metabolic pathways, such as farnesyl pyrophosphate (FPP), cycloartenol synthase (CAS), sterol methyltransferase (SMT1), and hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) along with non-coding RNAs are essential for the biosynthesis of these compounds. These non-coding RNAs play critical roles in controlling gene expression and enzyme activity. In general, miRNAs are a class of small regulatory RNAs which negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level by binding target mRNAs for mRNA cleavage or inhibition of mRNA translation. Many investigations have shown that miRNAs play an essential role in various biological and metabolic processes in plants. This study was aimed to the identification and investigation of the expression of some conserved microRNAs involved in the biosynthesis pathway of Withanolides in *W. somnifera*.

Methodology:

For HPLC analysis, a high-performance liquid chromatography system coupled with an ELSD detector, model C-650, was employed. Conserved miRNAs in *W. somnifera* were identified using BLASTn with a criterion of up to four mismatches and an E-value < 10, based on RNA-seq data and homology analysis conducted by C-mii software. The secondary structure of several miRNAs was determined using Mfold software. The target genes of these potential miRNAs were predicted using psRNATarget, applying the following criteria: In order to determine the function of the target genes, the BLASTx program was used against the protein database with the following parameters: E-value < 1.0E-5, a range of missing central bases between 10 and 11 nucleotides. Samples were collected from leaf and root tissues of three genotypes of *W. somnifera* (W1 - 7629245, W3 - 7629241, and W4 - 7629244) during the flowering stage. Three technical and biological replicates were used for data collection. The expression levels of miRNA5021 and its target gene *SMT1* and miRNA5140 were analyzed using real-time PCR. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was employed to analyze the expression data.

Results:

According to the statistical analysis of the HPLC data, there was no statistically significant difference in the amounts of withaferin-A among the three genotypes (W1, W3, and W4). Among the examined tissues, the leaf of W3 exhibited the highest amount, while the root of W1 had the lowest amount. To identify the miRNAs in *W. somnifera*, the transcriptome sequences were compared to plant miRNAs using the miRbase website for BLAST homology search. The results obtained from the RT-qPCR method showed that the relative expression levels of miR5021 in W1 roots were 1.16, 1.37, and 1.17 times higher compared to the control (W1 leaf tissue), while they were 1.3 and 3.7 times lower in W3 and W4 leaves, respectively. In the roots of the three genotypes of *W. somnifera*, the expression of the *SMT1* gene decreased by 7.7, 2.8, and 4.0 fold, respectively. However, in the leaves of genotypes W3 and W4, the expression increased by 2.48 and 1.82 times, respectively, compared to the control. The statistical analysis for miRNA5021 and miRNA5140 revealed that in the leaves of W3, the relative expression of miR5140 was 1.57, while in W4, it remained unchanged. In the roots of W1, W3, and W4, there was a decrease in miR5140 expression by seven, nine, and three times, respectively, compared to the control.

Conclusion:

In general, regarding the regulatory role of the identified miRNAs in the present study, these genes could be used to better and more accurately identify the withanolides biosynthetic pathway.

Keywords: miRNA, Transcriptome, Target gene, Withaferin A.

شناسایی و بررسی بیان برخی از microRNAهای حفاظت شده دخیل در مسیر بیوسنتز ویتانولیدها در پنیرباد

*(Withania somnifera)*سعادت محمدنژاد^۱، محمدرضا نقوی^{۲*}، نفیسه خسروی دهقی^۳ و جابر نصیری^۴^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج^{۲*} نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، پست‌الکترونیک: mnaghavi@ut.ac.ir^۳ استادیار، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی البرز، کرج^۴ استادیار، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج

خلاصه

سابقه و هدف: پنیرباد (*Withania somnifera*) متعلق به خانواده سیب‌زمینی، به صورت یک درختچه کوچک همیشه سبز با ریشه‌های غده‌ای بزرگ است و در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری وجود دارد. ترکیبات اصلی پنیرباد، ویتانولیدها هستند که شامل ویتافرین A، ویتانولید D، ویتانولید A و ویتانون‌ها می‌باشند. ویتافرین A و ویتانون‌ها بیشتر در برگ‌های پنیرباد وجود دارند، در حالی که ویتانولید A عمدتاً در ریشه تولید می‌شود. بیوسنتز این متابولیت‌ها به ژن‌های فارنسیل پیروفسفات (*FPP*)، سیکلوآرتنول سنتاز (*CAS*)، استرول‌متیل ترانسفراز (*SMTI*) و هیدروکسی متیل گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز (*HMGR*)، مرتبط با مسیرهای متابولیک مربوط بستگی دارد و RNAهای غیرکدکننده مانند miRNAها در تنظیم بیان این ژن‌ها و آنزیم‌ها نقش دارند. ژن‌های miRNAها، RNAهای کوچک با طول ۱۸-۲۴ نوکلئوتید هستند که هیچ پروتئینی کد نمی‌کنند و بروز ژن را در گیاهان و حیوانات تنظیم می‌کنند. این گروه از RNAهای غیررمزکننده نقش مهمی در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی ایفا می‌کنند و به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی بیان ژن در یوکاریوت‌ها فعالیت دارند. این تحقیق با هدف شناسایی و بررسی بیان برخی miRNAهای حفاظت شده دخیل در بیوسنتز ویتانولیدها در گیاه پنیرباد اجرا گردید.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، برای انجام آنالیز HPLC از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا متصل به آشکارساز ELSD، مدل C-650 استفاده شد. به منظور شناسایی miRNAهای حفاظت شده در گیاه پنیرباد از داده‌های RNA-seq مبتنی بر همولوژی توسط نرم‌افزار C-mii از BLASTn با معیارهای تا چهار عدم تطابق و $E\text{-value} < 10$ استفاده شد. ساختار ثانویه miRNAهای متمایز به وسیله نرم‌افزار Mfold تعیین شد. ژن‌های هدف miRNAهای نامزد با استفاده از psRNATarget بر اساس پارامترهای زیر شامل: $E\text{-value} < 1.0E^{-5}$ ، تعداد جایگاه‌های مورد هدف برابر ۲، محدوده نداشتن بازهای مرکزی بین ۱۰-۱۱ نوکلئوتید، بیشترین عدم تشابه برابر ۲ و بدون هیچ گونه فاصله انتخاب گردیدند و برای پی بردن به عملکرد ژن‌های هدف از ابزار BLASTx علیه پایگاه داده پروتئینی استفاده شد. در مرحله گلدی نمونه‌برداری از دو بافت برگ و ریشه سه ژنوتیپ W1 (7629245)، W3 (7629241) و W4 (7629244) با سه تکرار تکنیکی و سه تکرار بیولوژیکی انجام گردید. از Real-time PCR برای ارزیابی بیان miRNA5021 و ژن هدف آن *SMTI* و miRNA5140 استفاده شد و تجزیه داده‌های حاصل از بیان با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد.

یافته‌ها: با توجه به تجزیه‌های آماری داده‌های حاصل از HPLC، بین مقدار ویتافرین‌آ در سه ژنوتیپ W1، W3 و W4 از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در بین بافت‌های مورد مطالعه بیشترین میزان مربوط به برگ W3 و کمترین به ریشه W1 اختصاص داده شده است. برای شناسایی miRNAها ساختار دوم توالی‌ها با سرور mfold پیش‌بینی شد. حداقل انرژی آزاد پیچش (MFE) از -۱۵ تا -۱۳۰/۴ kcal.mol متفاوت بود و میانگین آن ۴۲/۹۸ - kcal.mol محاسبه گردید. نتایج حاصل از روش RT-qPCR نشان داد که میزان بیان نسبی miR5021 در ریشه W1، W3 و

W4 نسبت به شاهد (بافت برگ W1)، ۱/۱۶، ۱/۳۷ و ۱/۱۷ به ترتیب افزایش بیان و در برگ W3 و W4 به ترتیب ۳/۱ و ۳/۷ برابر کاهش بیان مشاهده شد. الگوی بیان برای ژن *SMT1* در سه ژنوتیپ *W. somnifera* برای ریشه W1، W3 و W4 به ترتیب ۷/۷، ۲/۸ و ۴ برابر کاهش و در برگ W3 و W4 به ترتیب ۲/۴۸ و ۱/۸۲ برابر افزایش بیان نسبت به شاهد مشاهده شد. همچنین بیان نسبی miR5140 در برگ W3، ۱/۵۷ و برای W4 بدون تغییر و در ریشه W1، W3 و W4 نسبت به شاهد به ترتیب هفت، نه و سه برابر کاهش بیان دیده شد که طبق آنالیزهای آماری برای miRNA5021 و miRNA5140 در بین سه ژنوتیپ برای هر یک از این ژن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: در مجموع با توجه به نقش تنظیمی miRNAهای شناسایی شده در این مطالعه، می‌توان از این ژن‌ها در شناسایی بهتر و دقیق‌تر مسیر بیوسنتز ویتانولیدها استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: miRNA، ترانسکرپتوم، ژن هدف، ویتافرین A

مقدمه

(Ha et al., 2022). این ویتانولیدها در بافت‌های مختلف گیاه (ریشه، برگ، ساقه و پوست) به‌طور مستقل تولید می‌شوند (Pal et al., 2011; Siriwardane, et al., 2013). توزیع و پخش متابولیت‌های ثانویه با توجه به بافت‌های مختلف، مرحله رشد و کموتایپ‌های مختلف متفاوت است و ویتافرین A و ویتانول‌ها بیشتر در برگ‌ها و بعد در پوست، ساقه و ریشه بالاترین مقدار گزارش شده است، در حالی که ویتانولید A عمدتاً در ریشه تولید می‌شود (Tripathi et al., 2018). بنابراین، هم برگ و هم ریشه از اجزای مهم این گیاه برای تولید ویتانولیدها هستند.

بیوسنتز این متابولیت‌ها به ژن‌های فارنسیل پیروفسفات (*FPP*)، اسکوالن سینتاز (*SqS*)، سیکلوآرتنول سنتاز (*CAS*)، استرول‌متیل ترانسفراز (*SMT1*) و هیدروکسی متیل گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز (*HMGR*)، مرتبط با مسیرهای متابولیک مربوطه بستگی دارد (Bhat et al., 2012) و مولکول‌های زیستی مختلف مانند پروتئین‌های عوامل رونویسی و RNAهای غیرکدکننده در تنظیم بیان این ژن‌ها و آنزیم‌ها نقش دارند. RNAهای غیرکدکننده از اعضای مختلف با اندازه‌ها و نحوه عملکرد متفاوت تشکیل شده‌اند، یکی از این RNAهای غیرکدکننده، microRNAها هستند. miRNAها، sRNAهای تنظیمی و غیرکدکننده ۲۴-۱۸ نوکلئوتیدی‌اند که نقش مهمی در بیان ژن‌ها در سطح رونویسی از طریق القای متیلاسیون DNA و در سطح پس

بنیرباد (*Withania somnifera*) متعلق به خانواده سیب‌زمینی (سولاناسه) و به نام آشواگاندها (*Ashwagandha*) معروف است که به صورت یک درختچه کوچک همیشه سبز با ریشه‌های غده‌ای بزرگ می‌باشد. این گیاه دارای گل‌های کوچک، سبز متمایل به زرد و میوه‌های صاف و گرد با دندانه‌های متعدد است و در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله آفریقای جنوبی، هند، چین و نواحی جنوبی ایران وجود دارد (Dar et al., 2015). در هند به عنوان یک گیاه دارویی رشد می‌کند و هر یک از بخش‌های مختلف آن برای خواص دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند و تاکنون ۲۳ گونه از این جنس شناسایی و معرفی شده است (Lopresti et al., 2019; Mehmood et al., 2020). داروهای بدست آمده از ریشه در درمان درد روماتیسم، التهاب مفاصل، اختلالات عصبی، سرماخوردگی، ضدافسردگی، آرام‌بخش، جوان‌کننده، افزایش طول عمر، تقویت حافظه و تقویت‌کننده جنسی نقش دارد (Divisha et al., 2018; Kaur et al., 2022; Saleem et al., 2020., Shilpashree et al., 2022).

ترکیبات اصلی بنیرباد، ویتانولیدها هستند و بیش از ۴۰ ویتانولید مختلف، ۱۲ آلکالوئید و چند سیتوآپتوزید از آنها جدا شده‌اند، به طوری که ترکیبات شیمیایی اصلی آن ویتافرین A، ویتانولید D، ویتانولید A و ویتانول‌ها می‌باشند

از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا سرکوب ترجمه ایفا می‌کنند و در سراسر قلمرو گیاهی حفاظت شده هستند (Yang et al., 2020; Zhou et al., 2020).

miRNAها نقش کلیدی در شکل ظاهری گیاهی، تغییر مرحله از رشد رویشی به زایشی، توسعه برگ و سیستم ریشه‌ای گیاه، کنترل صفات زراعی مهم گیاهان، تنظیم مریستم جنینی ریشه، انتقال سیگنال و پاسخ به شرایط محیطی مانند پاسخ به تنش‌های گوناگون زیستی و غیر زیستی را دارند (Kuruville et al., 2019; Wang et al., 2021). در مطالعه Karimi و همکاران (2022) در گل قاصدک (*Taraxacum spp*) مشاهده شد که miR1436 و miR1533 در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها و miR5015b در مسیر بیوسنتز نشاسته و ساکارز نقش داشتند (به ترتیب در بافت‌های گل و ساقه دارای بیشترین میزان بیان بودند). بیان miR1533 در کاسنی (*Cichorium endivia*)، در برگ نسبت به گل دارای بیان بیشتری بود (Chaharbonicheh Faraji et al., 2021). همچنین نقش miRNAها در شبدر قرمز (Naghavi & Karimi., 2018)، تنش سرما و تنش گرما و خشکی (Zhou et al., 2020) در گوجه فرنگی بررسی شده است.

miRNAها نقش کلیدی در شکل ظاهری گیاهی، تغییر مرحله از رشد رویشی به زایشی، توسعه برگ و سیستم ریشه‌ای گیاه، کنترل صفات زراعی مهم گیاهان، تنظیم مریستم جنینی ریشه، انتقال سیگنال و پاسخ به شرایط محیطی مانند پاسخ به تنش‌های گوناگون زیستی و غیر زیستی را دارند (Kuruville et al., 2019; Wang et al., 2021). در مطالعه Karimi و همکاران (2022) در گل قاصدک (*Taraxacum spp*) مشاهده شد که miR1436 و miR1533 در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها و miR5015b در مسیر بیوسنتز نشاسته و ساکارز نقش داشتند (به ترتیب در بافت‌های گل و ساقه دارای بیشترین میزان بیان بودند). بیان miR1533 در کاسنی (*Cichorium endivia*)، در برگ نسبت به گل دارای بیان بیشتری بود (Chaharbonicheh Faraji et al., 2021). همچنین نقش miRNAها در شبدر قرمز (Naghavi & Karimi., 2018)، تنش سرما و تنش گرما و خشکی (Zhou et al., 2020) در گوجه فرنگی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

آنالیز HPLC ژنوتیپ‌های پنی‌باد برای انجام آنالیز HPLC از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا متصل به آشکارساز ELSD، مدل C-650، در شرکت باریج اسانس اصفهان استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر عصاره استخراجی به ستونی با مشخصات Shodex Asahipac NH2P-50 به طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۵ میلی‌متر با قطر ذرات ۵ میکرومتر در حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد تزریق گردید. حلال شستشو شامل ۷۵٪ استونیتریل و ۲۵٪ آب خالص بودند که به صورت گرادینت (۰-۱۰:۲۵:۵۰:۵۰:۲۵:۵۰-۳۰:۵۰:۳۰-۵۰، ۳۰-۳۵:۷۵-۲۵) اعمال شدند. سرعت شستشو ۱ میلی‌متر در دقیقه بود. پیک‌های خروجی بر اساس زمان بازداری با نمونه‌های استاندارد ویتافین آ تعیین گردید. نتایج به دست آمده و اطلاعات مربوط به سطح زیر منحنی‌های نمونه و

از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا سرکوب ترجمه ایفا می‌کنند و در سراسر قلمرو گیاهی حفاظت شده هستند (Yang et al., 2020; Zhou et al., 2020).

miRNAها نقش کلیدی در شکل ظاهری گیاهی، تغییر مرحله از رشد رویشی به زایشی، توسعه برگ و سیستم ریشه‌ای گیاه، کنترل صفات زراعی مهم گیاهان، تنظیم مریستم جنینی ریشه، انتقال سیگنال و پاسخ به شرایط محیطی مانند پاسخ به تنش‌های گوناگون زیستی و غیر زیستی را دارند (Kuruville et al., 2019; Wang et al., 2021). در مطالعه Karimi و همکاران (2022) در گل قاصدک (*Taraxacum spp*) مشاهده شد که miR1436 و miR1533 در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها و miR5015b در مسیر بیوسنتز نشاسته و ساکارز نقش داشتند (به ترتیب در بافت‌های گل و ساقه دارای بیشترین میزان بیان بودند). بیان miR1533 در کاسنی (*Cichorium endivia*)، در برگ نسبت به گل دارای بیان بیشتری بود (Chaharbonicheh Faraji et al., 2021). همچنین نقش miRNAها در شبدر قرمز (Naghavi & Karimi., 2018)، تنش سرما و تنش گرما و خشکی (Zhou et al., 2020) در گوجه فرنگی بررسی شده است.

miRNAهای گیاهی در سراسر ژنوم وجود دارند و منشأ پیش‌سازها از ژن‌های MIR هستند که توسط RNA پلیمراز II رونویسی شده و با پلی‌آدنیل شدن RNAهای غیرکدکننده ساختارهای سنجاق‌سری تاخوردی ایجاد می‌کنند و از طریق پروتئین شبه دایسر (DCL1) از طریق شکستگی‌های متوالی miRNAهای بالغ ایجاد می‌شود (Lukan et al., 2022; Yang et al., 2020). پردازش miRNAهای بالغ توسط پروتئین‌های ارگونات از طریق روش‌های وابسته به همولوژی توالی‌هاست که به‌طور منفی اهداف miRNA را تنظیم می‌کنند. هم miRNAهای حفاظت شده و هم اختصاصی در بسیاری از گونه‌های جانوری و گیاهی وجود دارد. مطالعات نشان داده‌اند که miRNAهای حفاظت‌شده ویژگی‌های عمومی را کنترل و miRNAهای اختصاصی ویژگی‌های متمایز را تنظیم می‌کنند

تعیین ساختار ثانویه **miRNA** های متمایز به وسیله نرم افزار **Mfold**

از میان توالی های نامزد مورد نظر، توالی هایی به عنوان **miRNA** انتخاب می شوند که ساختار ثانویه آنها به صورت ساقه- حلقه باشد. برای یافتن **miRNA** های بالقوه در پنبیرباد و تعیین ساختار ثانویه توالی های مورد مطالعه از الگوریتم تاخوردگی Zuker در پایگاه **mfold** استفاده شد

<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>. توالی هایی که دارای ساختار ساقه- حلقه مناسب و توالی **miRNA** بالغ در یکی از بازوها بودند به عنوان **miRNA** های احتمالی بررسی شدند (Zuker, 2003). به منظور تعیین صحت ساختار **miRNA** های احتمالی پارامترهای درصد **GC/AU**، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (**Minimal Free Energy, MFE**)، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده (**Adjusted Minimal Free Energy, AMFE**) و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (**Minimal free Energy Index, MFEI**) از روش ذکر شده در (Ramachandraswamy, Padmashree and 2016) استفاده شد.

پیش بینی ژن های هدف **miRNA** های نامزد

برای شناسایی رونوشت ها و ژن های هدف، از تشابه مکمل معکوس بین **miRNA** و رونوشت هدف استفاده می-شود. ژن های هدف این **miRNA** ها در وبسایت **psRNATarget** به نشانی <https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>، بر اساس پارامترهای زیر شامل: $E\text{-value} < 1.0E^{-5}$ ، تعداد جایگاه-های مورد هدف برابر ۲، محدوده نداشتن بازهای مرکزی بین ۱۰-۱۱ نوکلئوتید، بیشترین عدم تشابه برابر ۲ و بدون هیچ گونه فاصله انتخاب شدند (Karimi, et al., 2018) و برای پی بردن به عملکرد ژن های هدف از ابزار **BLASTx** علیه پایگاه داده پروتئینی استفاده شد.

زمان بازسازی هر یک با کمک نرم افزار **Clarity ver. 3.0.5.505** ثبت شد. غلظت ویتافین آ موجود در هر عصاره با توجه به منحنی استاندارد و زمان بازسازی، محاسبه شد.

جمع آوری داده های **RNA-seq** و کنترل کیفی داده ها مجموعه داده های حاصل از توالی یابی **RNA-seq** (RNA-seq) گونه گیاهی *W. somnifera* از پایگاه داده **NCBI** بخش **SRA** دریافت گردید و از ابزار **Fastq-dump** موجود در بسته نرم افزاری **SRA-Toolkit** برای تبدیل به قالب «**fastq**» استفاده شد. ارزیابی و کنترل کیفیت توالی های خام با استفاده از نرم افزار **fastq123** انجام شد و بعد توالی های با کیفیت پایین و آلودگی ها توسط همین ابزار حذف شدند (Sewe et al., 2022).

سرهم بندی نوپدید خوانش ها

از خوانش های با کیفیت بالا حاصل از مرحله قبلی به عنوان توالی های ورودی برای سرهم بندی ترانسکریپتوم پنبیرباد با استفاده از ابزار **Trinity** و از ابزار **Cap3** برای حذف کاتیگ های اضافی و سرهم بندی دوباره استفاده شد (Smith-Unna et al., 2016).

شناسایی **miRNA** های حفاظت شده

به منظور شناسایی **miRNA** های حفاظت شده در پنبیرباد از نرم افزار **C-mii** از **BLASTn** برای جست و جوی همولوژی بین کاتیگ ها در برابر **miRNA** شناسایی شده در سایر گیاهان با معیارهای توالی ها، حد آستانه، تا چهار عدم تطابق و $E\text{value} < 10$ استفاده شد (Numnark et al., 2012) و توالی های دارای **miRNA** بالغ برای بررسی در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از ابزار **BLASTx** توالی های حاصل از هم ردیفی در برابر پایگاه داده پروتئین های غیر تکراری (**Non-Redundant protein database, NR**) مورد هم ردیفی قرار گرفت و توالی های کدکننده پروتئین حذف شدند.

مواد گیاهی

بذرهای پنیرباد از شرکت IPK آلمان تهیه شد، به طوری که دارای سه ژنوتیپ W1 (7629245)، W3 (7629241) و W4 (7629244) بودند. تمامی مراحل انجام آزمایش در آزمایشگاه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. برای ایجاد گیاهچه-های سترون از بذرهای تهیه شده، ابتدا بذرها با الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و بعد با هیپوکلریت ۲/۵٪ به مدت ۶-۷ دقیقه ضدعفونی شدند. بذرها ۳ بار با آب مقطر دو بار سترون شستشو داده شده، سپس بذرهای ضدعفونی شده را به محیط کشت 1/2 MS فاقد هورمون با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار در ظرف سترون کشت شده و به اتاق کشت با دمای 23 ± 2 درجه سانتیگراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شد. جوانه زنی بذرها پس از ۱۴ روز آغاز شد. سپس گیاهچه‌ها پس از ۱۰-۱۲ سانتی متری به گلدان‌هایی حاوی مخلوطی از پرلیت، کوکوپیت، خاک و پیت‌ماس انتقال داده شدند و پس از ۳ ماه به مرحله کامل گلدهی رسیده و نمونه برداری انجام شد؛ به طوری که برگ‌ها و ریشه‌ها پس از شستشوی کامل با آب دو بار استریل شده در فویل‌های دو بار اتوکلاو شده قرار داده شد و سریع در ازلت مایع منجمد شده و به فریزر -80 منتقل گردیدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی پرایمر

استخراج RNA از بافت‌های برگ و ریشه سه ژنوتیپ (W1، W3، W4) در مرحله گلدهی، با سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی با استفاده از محلول تریزول (TRIzol) شرکت Invitrogen طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با نانودراپ (نسبت A260/A280) و ژل آگارز ۱٪ (w/v) تعیین و از تیمار DNaseI برای از بین بردن DNA ژنومی بر اساس روش

پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد و تیوپ‌ها برای نگهداری طولانی مدت در دمای -80 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای سنتز cDNA، ابتدا آغازگرهای ساقه-حلقه و نیز آغازگرهای اختصاصی رفت (Forward) و عمومی برگشت (Reverse) برای miRNAها طبق روش (Varkonyi-Gasic et al., 2007) با استفاده از نرم افزار MiRNA Primer Designer طراحی شدند. سپس آزمایش رونویسی معکوس miRNA با استفاده از سیستم سنتز رشته اول Superscript III (Invitrogen) انجام شد (Kiani et al., 2023). به منظور بررسی بیان ژن‌های هدف نیز cDNA هر نمونه با استفاده از آغازگر عمومی الیگو dT سنتز گردید. آغازگرهای اختصاصی هر ژن هدف نیز با استفاده از ابزار Primer3 طراحی شد، جزئیات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

انجام Real Time PCR

انجام واکنش Real time-PCR با استفاده از دستگاه Rotor Q-gene شرکت Qiagen در گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام و از کیت SYBR® Green Real Time PCR Master Mix شرکت Takara طبق دستورالعمل استفاده شد. هر مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۵ میکرولیتر سایبرگرین (TaKaRa) (2X)، ۲ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت و ۱۱ میکرولیتر آب با حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر بود. شرایط دمایی شامل ۹۵ درجه برای ۱۵ دقیقه، ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه انجام شد. از ژن اکتین (*Actin*) به عنوان ژن خانه دار استفاده گردید و تجزیه داده‌های حاصل از بیان ژن‌های miRNA5021، miRNA5140 و *SMT1* با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ انجام شد (Noormohammadi et al., 2022).

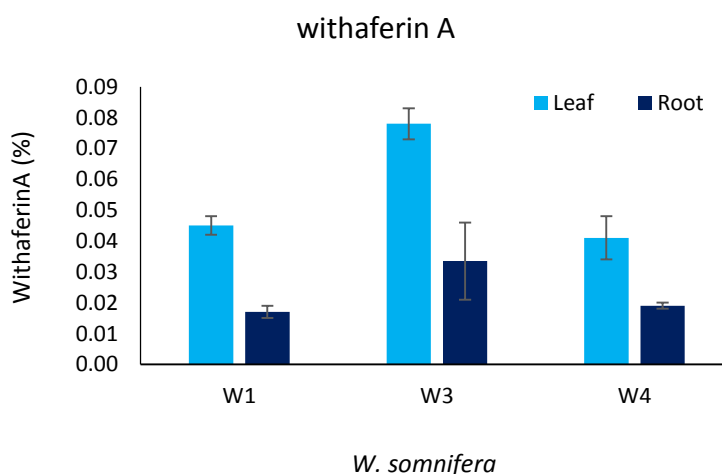
جدول ۱- توالی آغاگرها برای miRNA در *Withania somnifera*

| Primer | sequences |
|------------|---------------------------------|
| miR5140-F | TGTTCAACTAGTCCAGATCAAGC |
| miR5140- R | CCAGTTCGGTTTTCTTCAA |
| miR5021-R | GTTGCTCTGTCAAGTGAGATTCCACAGAGCC |
| miR5021-F | AGAGCCAGAGCCAACCTTTTC |
| SMT1-F | CAAATGACGCAGAGCAGAAA |
| SMT1-R | AGGCAAGTACCATGAAACAGG |
| Actin- F | GTATCCATGAGACCACCTACAAC |
| Actin-R | GTCAGCAATACCAGGGAACATA |

نتایج

ارزیابی مقدار ویتافرین آ در سه ژنوتیپ پنیرباد پس از بهینه کردن شرایط استخراج و آنالیز ویتافرین آ برای یکی از نمونه‌ها، استخراج و آنالیز ویتافرین آ برای نمونه‌های برگ و ریشه تمام ژنوتیپ‌های پنیرباد در مرحله گلدهی انجام شد و با محاسبه سطح زیر پیک مربوط به ناحیه جذب

نور یووی در طول موج ۲۱۵ نانومتر مقدار ویتافرین آ موجود در هر نمونه محاسبه گردید. با توجه به آنالیزهای آماری داده‌های حاصل از HPLC، بین مقدار ویتافرین آ در سه ژنوتیپ (W1، W3، W4) از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۱). در بین بافت‌های مورد مطالعه بیشترین میزان مربوط به برگ W3 و کمترین به ریشه W1 اختصاص داده شده است.



شکل ۱- مقدار ویتافرین A در برگ و ریشه سه ژنوتیپ پنیرباد.

Figure 1. The value of withaferin A in the leaf and root tissues of three genotypes of *W. somnifera*.

در حالی که ۵۰۰ miRNA شناسایی شدند (Zuker, 2003). حداقل انرژی آزاد پیچش (MFE) از -۱۵ تا -۱۳۰/۴ kcal.mol متفاوت بود و میانگین آن -۴۲/۹۸ kcal.mol محاسبه شد. محتوای AU و GC خانواده‌های miRNA های بالغ پیش‌بینی شده در محدوده ۲۳/۸۱ تا ۷۵/۷۱ و ۱۷/۰۵ تا ۸۰/۱۹ به ترتیب با میانگین ۵۸/۳۸ و ۴۱/۶۱ بود. در جدول ۲ خصوصیات تعدادی از miRNA ها آورده شده است. از بین miRNA های پیش‌بینی شده در پنبیرباد فراوانی miR164, miR156, miR167 و miR5303 به ترتیب ۵۱، ۷۱، ۹۰ و ۵۱ بود. این موضوع نشان‌دهنده فراوانی ژن‌های کدکننده این miRNA در ژنوم پنبیرباد می‌باشد و تعداد miRNA های مربوط به هر خانواده در (شکل ۲) آورده شده است.

شناسایی بیوانفورماتیکی miRNA های پنبیرباد در این مطالعه برای شناسایی miRNA ها در پنبیرباد ۲۴۱۵۳۲۴۸ توالی ترانسکرپتوم در مقابل miRNA های گیاهی سایت miRbase برای جستجوی همولوژی BLAST n شدند و ۱۰۹۹۵ رونوشت بدست آمد و از BLASTx به منظور حذف توالی‌های کدکننده پروتئینی و باقی ماندن توالی‌های بالغ miRNA های غیرکدکننده استفاده شد. سپس ساختار دوم توالی‌ها با سرور mfold پیش‌بینی گردید. ساختارهای ساقه حلقه‌ای شناسایی شده هنگامی برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفتند که دو شرط اولیه یعنی ۱- قرارگیری miRNA های بالغ در ناحیه بازوی ساختار ساقه حلقه و ۲- حداکثر میزان انرژی ساختار ثانویه که به وسیله mfold تخمین زده شده است، kcal.mol -۱۸- باشند،

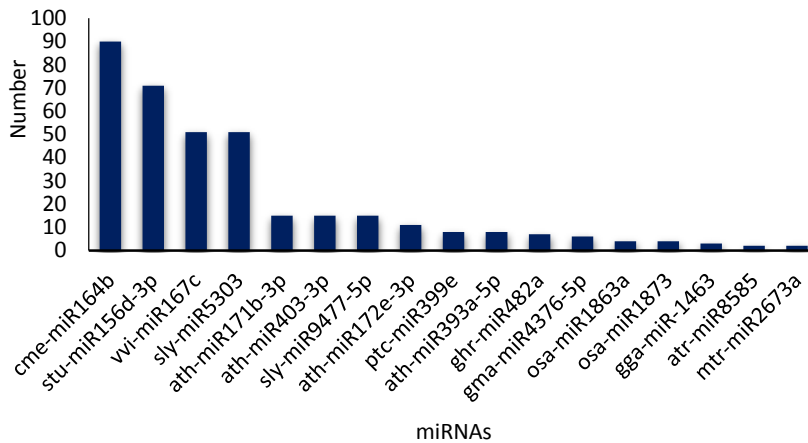
جدول ۲- ویژگی‌های miRNA های بالغ شناسایی شده در پنبیرباد

Table 2. Characteristics of mature miRNAs identified in *W. somnifera*

| miRNA family | miRNA membrane | Predicted mature miRNA | Length (bp) | MFE (-kcal/mol) | MFEI (kcal/mol) | AU | GC |
|--------------|----------------|-----------------------------|-------------|-----------------|-----------------|-------|-------|
| 164 | miR164b,c,d | 5':AGGAGAAGCAAGGCACAUCUU:3' | 21 | -20.31 | -0.62 | 52.38 | 47.62 |
| 5303 | miR5303 | 5':UUUUUGAAGGUUCGAACAAC:3' | 21 | -51 | -1.214 | 61.67 | 33.33 |
| 1132 | miR1132 | 5':AAUUGUGGACCGGAAGGAG:3' | 19 | -30.8 | -0.628 | 47.37 | 52.63 |
| 1134 | miR1134 | 5':CAACAAGGAGAAGAAGAAGAU:3' | 24 | -45.7 | -0.692 | 62.50 | 37.50 |
| | miR156a | 5':UGACAGAAGAUAGAGAGCACU:3' | 21 | -32.2 | -0.894 | 57.14 | 42.86 |
| 156a | miR156a | 5':UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC:3' | 21 | -32.2 | -0.9 | 57.14 | 42.86 |
| | miR156a | 5':UGACAGAAGAUAGAGAGCAC:3' | 20 | -32.2 | -0.894 | 55.00 | 45.00 |
| | miR156b | 5':UGACAGAAGAUAGAGAGCACU:3' | 21 | -32.2 | -0.894 | 57.14 | 42.86 |
| 156b | miR156b | 5':UGACAGAAGAUAGAGAGCAC:3' | 20 | -32.2 | -0.894 | 55.00 | 45.00 |
| | miR156b | 5':UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC:3' | 21 | -32.2 | -0.9 | 57.14 | 42.86 |
| | miR172 | 5':UGGAUCCUGCUGAUGCUGCAG:3' | 21 | -21.2 | -0.894 | 57.14 | 42.86 |
| 172 | miR172 | 5':UGGAUCCUGCUGAUGCUGCGG:3' | 20 | -18.2 | -0.894 | 55.00 | 45.00 |
| | miR172 | 5':UGUAUUUUGAUGAUGAUGCAU:3' | 21 | -80 | -0.9 | 57.14 | 42.86 |
| | miR172 | 5':UGUAUUUUGAUGAUGAUGCAU:3' | 20 | -16.2 | -0.894 | 55.00 | 45.00 |

MFE: حداقل انرژی آزاد تاخوردگی؛ MFEI: شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی؛ AU: درصد بازهای A و U؛ GC: درصد بازهای G و C

MFE: Minimal Free Energy, MFEI: Minimal free Energy Index



شکل ۲ - تعداد miRNAهای مربوط به هر خانواده در پنیرباد.

Figure 2. The number of miRNAs belonging to each family in *W. somnifera*.

ژن *DWF1 / DHCR24* را در مسیر بیوستز استروئیدها، miR172 ژنهای مربوط به مسیر جینجرول (gingerol)، دی اریل هپتانوئید و استیل بنوئید، miR5303 ژن *bglB* در مسیر فنیل پروپانوئید، miR5658 ژنهای مسیر ایزوکینولین، یوبی کینون، miR477 ژن *UGT73C* در مسیر گلیکوزیل ترانسفرازها، miR142 ژن *4CL* در مسیر یوبیکوئینون و فنیل پروپانوئیدها، miR530 ژن *ABA2* در مسیر کاروتنوئیدها و miR5079 ژن *CYP82G1* را در مسیر دی ترینوئیدها هدف قرار می دهند. برخی از ژنهای هدف پیش بینی شده دیگر نیز در جدول ۳ آورده شده است.

پیش بینی بیوانفورماتیکی ژنهای هدف miRNA برای پی بردن به نقش miRNAها در عملکردهای مختلف سلولی، شناسایی ژنهای هدف مرحله مهمی است. برای شناسایی ژنهای هدف، در این مرحله از پایگاه psRNATarget استفاده شد (Dai, 2011). نتایج نشان داد که برخی از miRNAها با دارا بودن مشخصاتی مانند طول کوتاه و اتصال ناکامل به هدف می توانند بیان ژن در چندین هدف را تنظیم کنند ولی معمولاً این ژنها که توسط اعضای یک خانواده miRNA بیان شان تنظیم می شود دارای کارکرد بیولوژیکی مشابهی هستند. بر اساس پیش بینی ژن هدف، miRNA159 دو

جدول ۳- پیش بینی ژنهای هدف miRNAهای پنیرباد

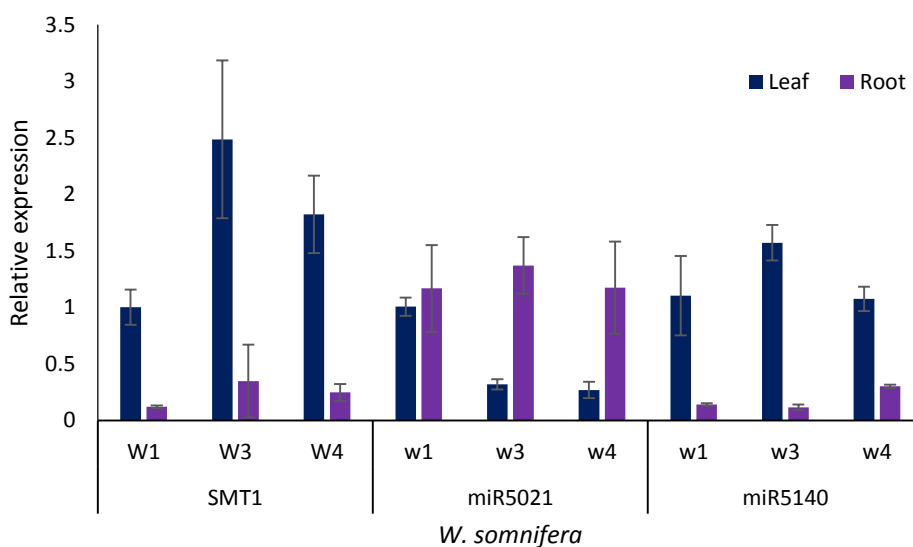
Table 3. Predict target genes for miRNAs identified in *W. somnifera*

| MiRNA | Target gene |
|------------|---|
| miR156a | squamosa promote protein |
| miR171b | transcription factor family GRAS |
| miR172e | AP2-like ethylene-responsive transcription factor |
| miR403-3p | lipid-transfer protein Non-specific |
| miR403-3p | Protein argonaute |
| miR167 | Auxin response factor |
| miR9477-5p | Unknown Protein |

(بافت برگ W1)، ۱/۱۶، ۱/۳۷ و ۱/۱۷ به ترتیب افزایش بیان و در برگ W3 و W4 به ترتیب ۳/۱ و ۳/۷ برابر کاهش بیان مشاهده شد. الگوی بیان برای ژن *SMT1* در سه ژنوتیپ پنیرباد برای ریشه W1، W3 و W4 به ترتیب ۷/۷، ۲/۸ و ۴ برابر کاهش و در برگ W3 و W4 به ترتیب ۲/۴۸ و ۱/۸۲ برابر افزایش بیان نسبت به شاهد مشاهده گردید. همچنین بیان نسبی *miR5140* در برگ W3، ۱/۵۷ و برای W4 بدون تغییر و در ریشه W1، W3 و W4 نسبت به شاهد به ترتیب هفت، نه و سه برابر کاهش بیان دیده شد که طبق تحلیل‌های آماری برای *miR5140* و *miR5021* در بین سه ژنوتیپ برای هر یک از این ژن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳).

شناسایی *miRNA*های دخیل در مسیر بیوسنتزی ویتانولیدها برای شناسایی ژن‌های هدف در این مرحله، از روش بیوانفورماتیکی مبتنی بر جست‌وجوی همسانی بین *miRNA*های پیش‌بینی شده در پنیرباد و ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی ویتانولیدها در این گیاه استفاده گردید. در این مطالعه دو *miR5140* و *miR5021* برای بررسی آنالیز بیان qPCR انتخاب شدند و بعد ژن *SMT1* به عنوان هدف *miR5021* پیش‌بینی شد.

نتایج بررسی الگوی بیان *miR5021*، *SMT1* (استرول متیل ترانسفراز) و *miR5140* در سه ژنوتیپ پنیرباد نتایج حاصل از روش RT-qPCR نشان داد که میزان بیان نسبی *miR5021* در ریشه W1، W3 و W4 نسبت به شاهد



شکل ۳- تجزیه و تحلیل بیان نسبی *miR5021*، *SMT1* و *miR5140* در دو بافت (برگ و ریشه) در سه ژنوتیپ پنیرباد

Figure 3. Analysis of the relative expression of *miR5021*، *SMT1*، and *miR5140* in the two tissues (leaf and root) of three genotypes of *W. somnifera*.

استخراج، شناسایی و جداسازی شده‌اند. گونه‌های مختلف جنس ویتانیا عمدتاً بدلیل دارا بودن لاکتون‌های استروئیدی (ویتانولیدها) و آلکالوئیدهای استروئیدی در صنایع دارویی استفاده می‌شوند. تا کنون ۱۲ نوع آلکالوئید، ۳۵ نوع

بحث

شیمی گونه‌های پنیرباد به‌طور گسترده‌ای بررسی شده و چندین گروه از ترکیبات شیمیایی شامل لاکتون‌های استروئیدی، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و غیره،

شناسایی miRNAها

روش‌های بیوانفورماتیکی رایج عموماً جستجو را برای شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده در سایر گیاهان بر اساس همولوژی آنها و یا شباهت ساختاری‌شان انجام می‌دهند. خانواده‌های miRNAها به میزان زیادی در گیاهان مختلف حفاظت‌شده هستند و این miRNAها فعالیت‌های تنظیمی مشابهی دارند. برخی از خانواده‌های miRNAهای با حفاظت‌شدگی بالا شامل miRNA156، miRNA166، miRNA169 و miRNA171 به‌طور نسبی در تعداد زیادی از گونه‌ها شناسایی شده‌اند. در چندین مطالعه گزارش شده که این miRNAها نقش بسیار مهمی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، نمو گیاهان، باروری و تکثیر سلولی دارند. با توجه به این حقیقت که تعداد کمی از miRNAها به‌طور وسیعی گسترده شده‌اند، در حالی که برخی دیگر فقط محدود به گونه‌های خاص گیاهی هستند، از این رو miRNAهای گیاهی به دو گروه miRNAهای حفاظت‌شده و miRNAجدید یا اختصاصی گونه تقسیم می‌شوند (Bavelloni et al., 2017; Çakır et al., 2021). طول و نوکلئوتید انتهایی ۵' نقش مهمی در انتخاب آرگونات مناسب و در نهایت عملکرد miRNA ایفا می‌کند. در این مطالعه نیز توالی‌هایی با طول ۲۱ عمدتاً دارای نوکلئوتید U در انتهای ۵' خود هستند، بنابراین احتمالاً این miRNAها نقش خود را در سطح رونویسی و از طریق متیله کردن DNA انجام می‌دهند. همچنین حضور باز یوراسیل در سر ۵' باعث افزایش عمر miRNA در سلول و جلوگیری از تجزیه شدن آن می‌شود (Gebert and MacRae, 2019). در این مطالعه miRNA5021 و ژن هدف آن SMT1 و miRNA5140 برای بررسی آنالیز بیان qPCR انتخاب شدند.

نتایج بررسی الگوی بیان miRNA5021 در گیاه پنیرباد برمبنای نتایج حاصل از روش RT-qPCR، برای miRNA5021 در ریشه و برگ هر سه ژنوتیپ به ترتیب افزایش بیان و کاهش بیان مشاهده شد که بیشترین میزان

ویتانولید و تعدادی گلیکوپیتانولید به نام سیتوایندوزید (ویتانولید دارای یک مولکول قند در موقعیت کربن ۲۷) از برگ، ریشه و میوه گونه‌های مختلف ویتانیا جداسازی، شناسایی و اثرهای ضد میکروبی، ضد تشنجی، ضد سرطان، آنتی‌اکسیدانتی، ضد التهابی، ضد پیری و آژایمر برای آنها گزارش شده است. در بین ویتانولیدهای موجود، ترکیب ویتافرین آ به دلیل ویژگی بازدارندگی رشد سلول‌ها و تومورهای سرطانی در صنایع دارویی از ارزش بالایی برخوردار می‌باشد (Choudhary et al, 2019; Kaushik, 2020). اندازه‌گیری کمی ویتافرین آ در فراورده‌های دارویی و عصاره‌های گیاهی پنیرباد با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC) گزارش شده است (Kaushik, 2020; Sharma et al., 2007).

ارزیابی مقدار ویتافرین A در سه ژنوتیپ پنیرباد با توجه به داده‌های حاصل از HPLC، در بین بافت‌های مورد مطالعه بیشترین میزان مربوط به برگ W3 و کمترین به ریشه W1 تعلق داشت. همانطور که قبلاً ذکر شد محل اصلی سنتز ویتافرین A در برگ‌ها و بیشترین میزان آن در مرحله گلدهی گزارش شده است. در تحقیق پیش‌رو و در تأیید گزارش‌های قبلی (Gupta et al., 2013; Tripathi et al., 2018)، بیشترین مقدار ویتافرین A در برگ در مرحله گلدهی اندازه‌گیری شد که می‌تواند به عنوان منبعی برای صنایع دارویی معرفی شود. Singh و همکاران (۲۰۱۵) مقدار ویتافرین A را در هر دو بافت برگ و ریشه به میزان قابل توجهی گزارش کردند. مرور منابع علمی نشان می‌دهد که مقدار ویتافرین A در نمونه‌های گیاهی گونه پنیرباد از هندوستان بین ۰/۲۲ تا ۳/۳۸ درصد (وزن خشک) با میانگین ۱/۰۹۹ در برگ‌ها و در ریشه‌ها از ۰/۰۰۲۸ تا ۰/۷۵ درصد با میانگین ۰/۱۲۴۲ می‌باشد (Kaushik, 2020) و در جمعیت‌های گیاهی پنیرباد از آفریقا ۰/۸۶ درصد بر اساس وزن خشک گزارش شده است.

نتایج بررسی الگوی بیان ژن *SMT1* در سه ژنوتیپ پنیرباد نتایج حاصل از qRT-PCR برای ژن *SMT1* مشخص کرد که این ژن در برگ هر سه ژنوتیپ پنیرباد افزایش بیان و در ریشه هر سه ژنوتیپ کاهش بیان دارد، بیشترین میزان بیان مربوط به برگ W3 و کمترین میزان بیان به ریشه W1 مربوط است.

ویتانولیدها گروهی از استروئیدهای ۲۸ کربنه هستند و ایزوپرنوئیدها پیش‌ساز ویتانولیدها هستند که از طریق دو مسیر مولونات سیتوسولی و متیل اریتریتول فسفات پلاستییدی مشتق می‌شوند، به طوری که مسیر دوم حدود ۲۵٪ نقش دارد (Singh et al., 2015) و به سنتر ۲۴- متیلن کلاسترول که یک ترپنوئید ۳۰ کربنه می‌باشد منجر می‌شود. این مولکول مرکزی از طریق واکنش‌های مختلف بیوشیمیایی مانند هیدروکسیلاسیون و گلیکوزیلاسیون منجر به تولید ویتانولیدهای مختلف می‌شود. در این مسیر تبدیل سیکلوآرتنول به ۲۴ متیلن کلاسترول به *SMT1* اختصاص داده شده است که بخش مهمی از مسیر ویتانولیدها بوده و در برگ‌ها بیان زیاد دارد که این مورد نیز با مطالعه ما مطابقت دارد. در لاین‌های سلولی ترانسفورم شده با آگروباکتریوم افزایش ۴ برابری در فعالیت این ژن و ۲/۵ برابری در میزان ویتانولیدها مشاهده شده و این افزایش در برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها بیشتر بوده است. میزان سیکلوآرتنول، بتاسیتواسترول و ستیگما استرول در گیاه برنج بعد از ۷۲ ساعت تیمار با BPH افزایش و بیان *SMT1* به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است (Zhang et al., 2018).

در ریشه موپین‌های پنیرباد تیمار شده با ۱۵ میکرومولار متیل جاسمونات بعد از ۴ ساعت، تجمع حداکثر ویتانولیدها را به همراه داشت، به طوری که میزان ویتانولید A حدود ۵/۶ برابر و ویتافرین A حدود ۳/۹ برابر افزایش پیدا کرد. همچنین ۳ درصد CHP برای ۴۸ ساعت، افزایش ۲/۷ برابر ویتانولید A و ۲/۵ برابر ویتافرین A را به همراه داشت (Saxena et al., 2017).

بیان مربوط به ریشه W3 و کمترین مربوط به برگ W4 می‌باشد. نقش miRNA5021 در گونه‌های مختلف گیاهی بررسی شده است. در مطالعه انجام شده توسط (Pani and Mahapatra, 2013)، چندین هدف برای miRNA5021 در گیاه *Catharanthus roseus* پیش‌بینی شد که یکی از ژن‌های هدف آن UDP گلوکز ایریدوئید گلوکز ترانسفراز (UDP-glucose iridoid glucosyltransferase) است. این آنزیم مسئول مرحله گلوکوزیلاسیون در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه ایریدوئید در گیاهان است و حدواسط-های اصلی در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای ایندول مونوترپنوئید به‌شمار می‌آیند. آنزیم استریکتوسیدین سنتاز و پروتئین‌های GCPE که در فرایند بیوسنتزی ترپنوئیدها نقش دارند توسط این miRNA هدف قرار می‌گیرند. در مطالعه‌ای (Xie et al., 2016)، بیان miRNA5021 را در چهار بافت مختلف ریشه، برگ، گل و میوه انگور فرنگی بررسی و مشاهده کردند که در ریشه‌ها دارای بیشترین میزان بیان و در سه بافت دیگر بیان کمتری مشاهده شد. همچنین ایزوپنتنیل دی فسفات به عنوان مولکول پیش‌ساز برای مشتقات ترپنوئیدها عمل می‌کند و ایزوپنتنیل دی فسفات و ایزوپنتنیل ایزومراز هم آنزیم‌های کلیدی درگیر در تشکیل ایزوپنتنیل پیروفسفات هستند که توسط miRNA5021 تنظیم می‌شود. در مطالعه انجام شده بر روی نعناع (*Mentha spp.*) گزارش شده که miRNA5021 ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز را که در مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) تولید رایحه نقش دارد هدف قرار می‌دهد (Singh et al., 2016). در مطالعه بر روی گل قاصدک، miRNA5021 فراوان‌ترین بود که ژن هیدروکسی متیل گلوکاریل کوانزیم آرداکتاز (HMGCR) را هدف قرار داده که با افزایش سطح بیان miRNA5021، بیان ژن هدف کاهش پیدا کرده است، از آنجایی که مسیر مولونات منبع اصلی ایزوپنتنیل پیروفسفات است که در سنتر لاستیک طبیعی استفاده می‌شود، miRNA5021 با تنظیم بیان آنزیم HMGCR نقش مهمی در تولید لاستیک طبیعی دارد (Karimi et al., 2022).

miRNA5140 مشاهده شد ولی اگر بخواهیم یک حالت مقایسه‌ای بین بافت‌ها داشته باشیم در هر سه رقم بیان در برگ‌ها بیشتر از ریشه می‌باشد که شاید این اختلاف در نتایج به دلیل اختلاف در زمان نمونه‌برداری باشد. بر اساس آنالیز HPLC که برای ویتافرین A انجام شده است و رابطه تنظیمی مثبت بین miRNA5140 و ژن هدف آن CAS بر اساس مطالعات قبلی، با این موضوع مطابقت دارد که افزایش بیان miRNA5140، افزایش بیان ژن هدف را به همراه داشته در نتیجه میزان ویتافرین A هم در برگ‌ها افزایش پیدا می‌کند.

نتایج HPLC نشان‌دهنده افزایش ویتافرین A در برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها بود. ارزیابی بیان ژن SMT1 که یکی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی ویتانولیدها می‌باشد بیان بیشتری در برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها نشان داد. ژن SMT1 همچنین به عنوان هدف miR5021 در این مطالعه پیش‌بینی شد و دارای رابطه تنظیمی منفی با miRNA5021 می‌باشد، به طوری که با افزایش بیان این miRNA میزان بیان ژن SMT1 کاهش پیدا می‌کند و بعکس. همچنین miRNA5140 ژن سیکلوارتنول سنتاز (CAS) را هدف قرار داده که رابطه تنظیمی الگوی مثبت بین آنها برقرار است.

در مجموع با توجه به نقش تنظیمی miRNAهای شناسایی شده در مطالعه حاضر، می‌توان از این ژن‌ها در شناسایی بهتر و دقیق‌تر مسیر بیوسنتز ویتانولیدها استفاده کرد.

منابع

- Anjali, N., Nadiya, F., Thomas, J., and Sabu, K. 2019. Identification and characterization of drought responsive microRNAs and their target genes in cardamom (*Elettaria cardamomum Maton*). *Plant Growth Regulation* **87**, 201-216.
- Bavelloni, A., Ramazzotti, G., Poli, A., Piazzini, M., Focaccia, E., Blalock, W., and Faenza, I. 2017. MiRNA-210: a current overview. *Anticancer research* **37**, 6511-6521.
- Bhat, W. W., Lattoo, S. K., Razdan, S., Dhar, N., Rana, S., Dhar, R. S., Khan, S., and Vishwakarma, R. A. 2012. Molecular cloning, bacterial expression

در این مطالعه نیز ژن SMT1 به عنوان هدف miRNA5021 پیش‌بینی شد و طبق نتایج qRT-PCR مشخص شد که رابطه الگوی تنظیمی منفی بین آنها وجود دارد، به طوری که با افزایش بیان miRNA5021 در ریشه کاهش بیان ژن SMT1 و با کاهش بیان miRNA5021 در برگ، افزایش بیان ژن SMT1 مشاهده شده است. با توجه به نتایج HPLC که حداکثر ویتافرین A در برگ‌ها و در ریشه میزان کمتری را نشان داد، می‌توان به نقش مهم ژن SMT1 در این مسیر پی برد. با توجه به رابطه الگوی تنظیمی منفی کاهش بیان miRNA5021 در برگ، افزایش بیان ژن SMT1 را به همراه داشته که در نتیجه آن میزان تولید ویتافرین A هم افزایش پیدا کرده و افزایش بیان miRNA5021 کاهش تولید ویتافرین A را به همراه داشته و در مرور منابع نشان داده شده است که ویتافرین A متابولیت اصلی یافت شده در برگ‌ها می‌باشد.

نتایج بررسی الگوی بیان miRNA5140 در سه ژنوتیپ پنیرباد الگوی بیان حاصل از qRT-PCR برای miRNA5140 نشان می‌دهد که بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. نقش miRNA5140 در گیاهان زیاد مطالعه نشده است و تحقیقات انجام شده درباره آن محدود است، بنابراین جزء miRNA حفاظت‌نشده به شمار می‌آید. در گیاه *Rehmannia glutinosa* این miRNA5140 شناسایی شده که چندین هدف برای آن پیش‌بینی شده است، این اهداف شامل ژن‌های کدکننده پروتئین انتقال دهنده منیزیم خانواده CorA، پروتئین کینازها، مالات سنتاز (MLS) و پروتئین‌های مقاوم به بیماری (CC-NBS-LRR class) هستند (Yang et al., 2011). در مطالعه انجام شده توسط (Srivastava et al., 2018) در پنیرباد، مشاهده شد که این miRNA فقط در بافت ریشه بیان داشته و ژن CAS (سیکلوارتنول سنتاز) را که یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی ویتانولیدها می‌باشد به عنوان هدف قرار می‌دهد و رابطه الگوی تنظیمی مثبت بین آنها برقرار است؛ در حالی که در مطالعه ما علاوه بر ریشه، در بافت برگ هم بیان

- genes in *Papaver somniferum*. *Iranian Journal of Field Crop Science* **48**. (In Persian)
- Kaur, K., Dolker, D., Behera, S., and Pati, P. K. 2022. Critical factors influencing in vitro propagation and modulation of important secondary metabolites in *Withania somnifera* (L.) dunal. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture (PCTOC)* **149**, 41-60.
 - Kaushik, N. 2020. HPLC analysis of *Withania somnifera* (Linn.) Dunal reveals two chemotypes in Indian germplasm and seasonal and genetic variability in Withaferin A-Content. *BioRxiv*, 2020.07.31.231316.
 - Kiani, H. S., Sabokdast Noudehi, M., Naghavi, M. R., Shokrpoor, M., & Yazdanfar, N. 2023. Identification of conserved miRNAs and their target genes in the damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **30**(2), 175-191. (In Persian)
 - Kuruvilla, L., Sathik, M., Luke, L. P., and Thomas, M. 2019. Identification and validation of drought-responsive microRNAs from *Hevea brasiliensis*. *Acta Physiologiae Plantarum* **41**, 1-15.
 - Lopresti, A. L., Smith, S. J., Malvi, H., and Kodgule, R. 2019. An investigation into the stress-relieving and pharmacological actions of an ashwagandha (*Withania somnifera*) extract: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Medicine* **98**.
 - Lukan, T., Veillet, F., Križnik, M., Coll, A., Mahkovec Povalej, T., Pogačar, K., Stare, K., Chauvin, L., Chauvin, J.-E., and Gruden, K. 2022. CRISPR/Cas9-mediated fine-tuning of miRNA expression in tetraploid potato. *Horticulture research* **9**.
 - Mehmood, F., Shahzadi, I., Ahmed, I., Waheed, M. T., and Mirza, B. 2020. Characterization of *Withania somnifera* chloroplast genome and its comparison with other selected species of Solanaceae. *Genomics* **112**, 1522-1530.
 - Naghavi, M. R., & Karimi, A. A. 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)
 - Noormohammadi, N., Ismaili, A., Sobhani Najafabadi, A., & Nazarian-Firouzabadi, F. 2022. Identification of conserved miRNAs of *Hypericum perforatum* using next-generation sequencing (NGS) data. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **30**(1), 72-85 (In Persian)
 - and promoter analysis of squalene synthase from *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Gene* **499**, 25-36.
 - Çakır, Ö., Arıkan, B., Karpuz, B., and Turgut-Kara, N. 2021. Expression analysis of miRNAs and their targets related to salt stress in *Solanum lycopersicum* H-2274. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **35**, 275-282.
 - Chaharbonicheh Faraji, M., Naghavi, M. R., Sabokdast Nodehi, M., & Nasiri, J. 2021. Identification of conserved microRNAs and their targets in *Cichorium intybus* and *Cichorium endivia*. *Iranian Journal of Field Crop Science*, **52**(3), 1-10
 - Choudhary, S., Kaur, I. P., and Malik, J. 2019. Development and validation of a novel, rapid gradient HPLC method for simultaneous estimation of bioactive marker compounds in a mixture of *Convolvulus pluricaulis*, *Withania somnifera* and *Bacopa monnieri* extracts. *Journal of Chromatographic Science* **57**, 920-930.
 - Dar, N. J., Hamid, A., and Ahmad, M. 2015. Pharmacologic overview of *Withania somnifera*, the Indian Ginseng. *Cellular and molecular life sciences* **72**, 4445-4460.
 - Divisha, R., Ranganathan, V., Vijayakaran, K., Elamaram, A., and Senthil, K. 2018. Quantifying phytophenols in *Andrographis paniculata* and *Withania somnifera* leaf extract. *J Pharam* **7**, 477-479.
 - Gebert, L. F., and MacRae, I. J. 2019. Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews Molecular cell biology* **20**, 21-37.
 - Gupta ,P., Goel, R., Pathak, S., Srivastava, A., Singh, S. P., Sangwan, R. S., Asif, M. H., and Trivedi, P. K. 2013. De novo assembly, functional annotation and comparative analysis of *Withania somnifera* leaf and root transcriptomes to identify putative genes involved in the withanolides biosynthesis. *PLoS One* **8**, e62714.
 - Ha, J. W., Yu, J. S., Lee, B. S., Kang, D.-M., Ahn, M.-J., Kim, J. K., and Kim, K. H. 2022. Structural Characterization of Withanolide Glycosides from the Roots of *Withania somnifera* and Their Potential Biological Activities. *Plants* **11**, 767.
 - Karimi, A., Naghavi, M., Peyghambari, S., Sobhani, A., and Rasoulnia, A. 2022. Identification of miRNAs and Their Target Genes in *Taraxacum* spp. *Journal of Agricultural Science and Technology* **24**, 1457-1471. (In Persian)
 - Karimi, A. A., Naghavi, M., and Nasiri, J. 2018. Identification of miRNAs and their related target

- Mentha spp. Computational Biology and Chemistry* **64**, 154-162.
- Singh, P., Guleri, R., Singh, V., Kaur, G., Kataria, H., Singh, B., Kaur, G., Kaul, S. C., Wadhwa, R., and Pati, P. K. 2015. Biotechnological interventions in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **31**, 1-20.
 - Siriwardane, A., Dharmadasa, R., and Samarasinghe, K. 2013. Distribution of withaferin A, an anticancer potential agent, in different parts of two varieties of *Withania somnifera* (L.) Dunal. grown in Sri Lanka. *Pak J Biol Sci* **16**, 141-144.
 - Smith-Unna, R., Bournsnel, C., Patro, R., Hibberd, J. M., and Kelly, S. 2016. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome research* **26**, 1134-1144.
 - Srivastava, S., Sanchita, Singh, R., Srivastava, G., and Sharma, A. 2018. Comparative Study of Withanolide Biosynthesis-Related miRNAs in Root and Leaf Tissues of *Withania somnifera*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **185**, 1145-1159.
 - Srivastava, S., Singh, N., Srivastava, G., and Sharma, A. 2017. MiRNA mediated gene regulatory network analysis of *Cichorium intybus* (chicory). *Agri Gene* **3**, 37-45.
 - Tripathi, N., Shrivastava, D., Mir, B. A., Kumar, S., Govil, S., Vahedi, M., and Bisen, P. S. 2018. Metabolomic and biotechnological approaches to determine therapeutic potential of *Withania somnifera* (L.) Dunal: A review. *Phytomedicine* **50**, 127-136.
 - Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., and Hellens, R. P. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods* **3**, 1-12.
 - Wang, Y., Dai, J., Chen, R., Song, C., Wei, P., Cai, Y., Wang, Y., and Han, B. 2021. miRNA-based drought regulation in the important medicinal plant *Dendrobium huoshanense*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-10.
 - Xie, X., Li, X., Tian, Y., Su, M., Zhang, J., Han, X., Cui, Y., and Bian, S. 2016. Identification and characterization of microRNAs and their targets from expression sequence tags of *Ribes nigrum*. *Canadian Journal of Plant Science* **96**, 995-1001.
 - Yang, Y., Chen, X., Chen, J., Xu, H., Li, J., and Zhang, Z. 2011. (Differential miRNA expression in *Rehmannia glutinosaplants* subjected to continuous cropping. *BMC Plant Biology* **11**, 1-11.
 - Yang, Z., Zhu, P., Kang, H., Liu, L., Cao, Q., Sun, J., Dong, T., Zhu, M., Li, Z., and Xu, T. 2020. High-Numnark, S., Mhuantong, W., Ingriswang, S., and Wichadakul, D. 2012. C-mii: a tool for plant miRNA and target identification. In "BMC genomics", Vol. 13, pp. 1-10. BioMed Central.
 - Padmashree, D., and Ramachandraswamy, N. 2016. Identification and characterization of conserved miRNAs with its targets mRNA in *Trichinella Spiralis*. *Bioinformatics* **12**, 279.
 - Pal, S., Singh, S., Ashutosh, K. S., Madan, M. G., Suman, P. K., and Ajit, K. S. 2011. Comparative withanolide profiles, gene isolation, and differential gene expression in the leaves and roots of *Withania somnifera*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **86**, 391-397.
 - Pani, A., and Mahapatra, R. K. 2013. Computational identification of microRNAs and their targets in *Catharanthus roseus* expressed sequence tags. *Genomics data* **1**, 2-6.
 - Saleem, S., Muhammad, G., Hussain, M. A., Altaf, M., and Bukhari, S. N. A. 2020. *Withania somnifera* L.: Insights into the phytochemical profile, therapeutic potential, clinical trials, and future prospective. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **23**, 1501.
 - Saxena, P., Ahlawat, S., Ali, A., Khan, S., and Abdin, M. Z. 2017. Gene expression analysis of the withanolide biosynthetic pathway in hairy root cultures of *Withania somnifera* elicited with methyl jasmonate and the fungus *Piriformospora indica*. *Symbiosis* **71**, 143-154.
 - Sewe, S. O., Silva, G., Sicat, P., Seal, S. E., and Visendi, P. 2022. Trimming and validation of illumina short reads using Trimmomatic, Trinity assembly, and assessment of RNA-seq data. In "Plant bioinformatics: Methods and protocols", pp. 211-232. Springer.
 - Sharma, L. K., Madina, B. R., Chaturvedi, P., Sangwan, R. S., and Tuli, R. 2007. Molecular cloning and characterization of one member of 3 β -hydroxy sterol glucosyltransferase gene family in *Withania somnifera*. *Archives of biochemistry and biophysics* **460**, 48-55.
 - Shilpashree, H., Sudharshan, S., Shasany, A. K., and Nagegowda, D. A. 2022. Molecular characterization of three CYP450 genes reveals their role in withanolides formation and defense in *Withania somnifera*, the Indian Ginseng. *Scientific Reports* **12**, 1602.
 - Singh, N., Srivastava, S., Shasany, A. K., and Sharma, A. 2016. Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of

- Zhou, R., Yu, X., Ottosen, C.-O., Zhang, T., Wu, Z., and Zhao, T. 2020. Unique miRNAs and their targets in tomato leaf responding to combined drought and heat stress. *BMC plant biology* **20**, 1-10.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* **31**, 3406-3415.
- Zhang, J., Li, Y., Guo, J., Du, B., He, G., Zhang, Y., Chen, R., and Li, J. 2018. Lipid profiles reveal different responses to brown planthopper infestation for pest susceptible and resistant rice plants. *Metabolomics* **14**, 1-13.
- throughput deep sequencing reveals the important role that microRNAs play in the salt response in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *BMC genomics* **21**, 1-16.