

## Conserved MicroRNAs and Their Target Genes in *Quercus infectoria*

Forough Joudaki<sup>1</sup>, Ahmad Ismaili<sup>2,\*</sup>, Seyed Sajad Sohrabi<sup>3</sup>, Seyedeh Zahra Hosseini<sup>1</sup>

and Hadi Ahmadi<sup>4</sup>

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

2- Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

4- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

\* Corresponding author ✉: [ismaili.a@lu.ac.ir](mailto:ismaili.a@lu.ac.ir)

**Citation:** Joudaki, F., Ismaili, A., Sohrabi, S.S., Hosseini, S.Z. and Ahmadi, H. (2024). Conserved microRNAs and their target genes in *Quercus infectoria*. *Plant Genetic Researches*, 10(2): 103-118. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.2.8>

(Received: November 2, 2023; Final revised: February 12, 2024; Accepted: February 20, 2024; Published online: March 17, 2024)

### Extended abstract

#### Introduction

Gall oak (*Quercus infectoria*) is one of the extraordinary tree species with functional medicinal properties within the oak family. Various studies have confirmed the presence of numerous secondary metabolites with therapeutic properties in this plant. Despite the significance of gall oak, its genetic structure remains elusive. Therefore, unraveling the genetic structure of gall oak may provide valuable insights into its potential applications across diverse industries. MicroRNAs emerge as pivotal genetic elements implicated in the biosynthesis of crucial metabolites across a wide range of different plant species. Despite the significant role of miRNAs in plants, as of yet, no miRNAs have been reported in *Q. infectoria*. To this end, in the present study, after assembling the transcriptome of *Q. infectoria*, conserved microRNAs were identified.

#### Materials and methods

During the summer season, leaf and root samples of *Q. infectoria* were collected from trees in the Shineh region, and 2-year-old seedlings were grown from mature oaks in Khorramabad (Lorestan Province, Iran). Collected samples were immediately frozen in liquid nitrogen, transferred to the laboratory, and stored at -80° C. Total RNA was extracted from roots and leaves using the Djami-Tchatchou method. After sequencing by the Illumina HiSeq 2500 platform and checking the quality of all the generated reads, the adapter sequences were removed, and the high-quality reads were assembled using Trinity package with default settings. To identify miRNAs and their target genes, all plant miRNAs sequences were downloaded from the miRbase database. The BLASTn algorithm was employed to identify the highest similarity between unigenes and mature plant miRNAs. Furthermore, BLASTx was used to search against the non-redundant proteins (NR) database to remove protein-coding unigenes. The investigation of miRNA second-structure prediction involved assessing the similarity between potential unigenes and mature miRNA sequences using the mfold web tool. Identification of miRNA target genes and gene ontology (GO) was performed using the psRNAtarget web-tool and OmicsBox software, respectively.



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

## Results and discussion

In total, 276,852,255 clean reads of high quality were obtained from leaf and root samples. After assembling the transcriptome and removing redundant sequences, 89,335 unigenes were generated with an average length of 1043.27 bp. miRNA precursors from non-protein-coding unigenes were selected. Finally, following a range of strict filtering criteria, four miRNAs belonging to conserved miRNAs families were identified, including qin-miR156, qin-miR399, qin-miR160, and qin-miR172. We also identified a total of 521 target genes for these miRNAs. KEGG pathway analysis showed the unigene targets were classified in the citrate cycle (TCA cycle) pathway. Examining miRNA target genes in *Q. infectoria* and analyzing their interaction network, finally led to the identification of three hub genes. Identified miRNA target genes were associated with the biosynthesis of various enzyme groups, suggesting that most of miRNAs regulating hydrolases, transferases, and oxidoreductases. MiRNAs play a pivotal role in the production and accumulation of secondary metabolites by targeting genes encoding enzymes involved in their biosynthesis. In plants, miRNAs regulate genes associated with biotic and abiotic stresses. *Q. infectoria* leaves contain tannins, quercetin, and catechin are the phenolic compounds. Various enzymes, including oxidoreductases, ligases, and transferases, are involved in the biosynthesis of these compounds. The results of this study showed that numerous miRNAs, including miR160, miR172, and miR156, exert influence on the expression of genes involved in the biosynthesis of *Q. infectoria* compounds. There seem to be significant correlation between the activity of such miRNAs and their target genes involved in the biosynthesis *Q. infectoria* compounds.

## Conclusions

Gall oak is an endangered and rare three species with important medicinal properties within the oak family. Multiple individual studies have reported the presence of numerous secondary metabolites with therapeutic activities in gall oak. Despite the significance of gall oak, its genetic structure remains elusive, limiting our comprehensive understanding of its potential applications. Understanding the genetic structure of gall oak may shed light into its potential applications across various industries. In this study, the gall oak transcriptome was used to identify conserved microRNAs. Using bioinformatics methods, the sequence of 4 conserved microRNAs including miR156, miR399, miR160, and miR172 was identified. This is the first report identifying microRNAs in gall oak. Further analysis was carried out to establish the relationship between the identified microRNAs and their target genes. Given the role of microRNAs in regulating transcription factors and their impact on genes involved in secondary metabolite biosynthesis, future breeding programs in *Q. infectoria* may benefit from the potential of such regulatory elements as a guide and key.

**Keywords:** Gall oak, Tannin, Secondary metabolite, miRBase

**ریز RNAهای محافظت شده و ژنهای هدف آن در *Quercus infectoria***

فرغ جودکی<sup>۱</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۲\*</sup>، سید سجاد سهرابی<sup>۳</sup>، سیده زهرا حسینی<sup>۱</sup> و هادی احمدی<sup>۴</sup>

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

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

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

۴- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۱؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸)

**چکیده**

بلوط گالزا (*Quercus infectoria*) یکی از گونه‌های کمیاب با خواص دارویی کاربردی از خانواده بلوط است. مطالعات مختلف وجود متابولیت‌های ثانویه متعدد با خواص درمانی را در این درخت تأیید کرده‌اند. با وجود اهمیت این گیاه، ساختار ژنتیکی آن مبهم باقی مانده است. بنابراین شناخت ساختار ژنتیکی این گیاه می‌تواند بینش ارزشمندی در مورد کاربردهای بالقوه آن در صنایع مختلف ارائه دهد. ریز RNAها یکی از مهم‌ترین عناصر ژنتیکی هستند که در بیوستتر متابولیت‌های مهم در گونه‌های مختلف گیاهی نقش مؤثری دارند. علی‌رغم نقش مهم ریز RNAها در گیاهان، تا به امروز هیچ عضوی از این عناصر تنظیمی کوچک در *Q. infectoria* گزارش نشده است. بنابراین، در مطالعه حاضر، پس از توالی‌یابی و سرهم‌بندی نوپدید پروفایل بیانی *Q. infectoria*، اقدام به شناسایی ریز RNAهای محافظت شده گردید. بدین منظور از برگ و ریشه درختان بلوط گالزا در منطقه شینه قلابی و نهال‌های دوساله در خرم‌آباد نمونه‌برداری شد. برای استخراج RNA کل از روش Djami-Tchatchou استفاده شد. پس از توالی‌یابی RNA با استفاده از پلتفرم Illumina HiSeq 2500 و کیفیت‌سنجی خوانش‌های ایجاد شده، توالی آداپتورها حذف و خوانش‌های با کیفیت بالا با استفاده از بسته نرم‌افزاری Trinity سرهم‌بندی شدند. برای شناسایی ریز RNAها و ژنهای هدفشان، تمام توالی‌های ریز RNA گیاهی از پایگاه داده miRbase دانلود شدند. الگوریتم BLASTn برای شناسایی بالاترین شباهت بین یونی‌ژن‌ها و ریز RNAهای بالغ گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این، برای جستجوی پایگاه داده پروتئین‌های غیر تکراری برای حذف یونی‌ژن‌های کدکننده پروتئین استفاده شد. بررسی پیش‌بینی ساختار دوم ریز RNA شامل ارزیابی شباهت بین ژنهای بالقوه و توالی‌های ریز RNA بالغ با استفاده از ابزار تحت وب mfold صورت گرفت. شناسایی ژنهای هدف ریز RNA هستی‌شناسی ژن به ترتیب با استفاده از ابزار تحت وب psRNA target و نرم‌افزار OmicsBox انجام شد. پس از پالایش دقیق و سختگیرانه، چهار ریز RNA متعلق به خانواده‌های ریز RNAهای حفاظت‌شده، از جمله qin-miR156، qin-miR399، qin-miR160 و qin-miR172 شناسایی شدند. تجزیه و تحلیل مسیر KEGG نشان داد که اهداف یونی ژن در مسیر چرخه سیترات نقش دارند. بررسی ژنهای هدف ریز RNA در *Q. infectoria* و تجزیه و تحلیل شبکه برهم‌کنشی آنها، در نهایت به شناسایی سه ژن هاب منجر شد. ژنهای هدف ریز RNAهای شناسایی شده با بیوستتر گروه‌های آنزیمی مختلف مرتبط بودند، که نشان می‌دهد اکثر ریز RNAها هیدرولازها، ترانسفرازها و اکسیدوردوکنازها را تنظیم می‌کنند. با توجه به نقش ریز RNAها در تنظیم بیان عوامل رونویسی و تأثیر آنها بر ژنهای دخیل در بیوستتر متابولیت‌های ثانویه، می‌توان از پتانسیل چنین عناصر تنظیمی به عنوان راهنما و کلید در برنامه‌های به‌ترتیب بلوط گالزا بهره برد.

**واژگان کلیدی:** بلوط گالزا، تانن، متابولیت‌های ثانویه، miRbase

## مقدمه

در جنگل‌های زاگرس که حدود چهل درصد از مناطق جنگلی ایران را شامل می‌شود، گونه‌های بلوط ایرانی، لبنانی و بلوط گال‌زا بیشترین پراکنش را به خود اختصاص داده‌اند (Mir Drikvand and Samiei, 2020; Ahmadi *et al.*, 2018). بلوط گال‌زا با نام علمی *Quercus infectoria* یکی از درختان یا درختچه‌های بومی ایران (Yusof and Abdullah, 2020) با گل‌های تک جنسی و برگ‌های سخت و ضخیم (Ahmad, 2016) و نورپسند (Giron *et al.*, 2016) است که بیشترین پراکنش آن در جنوب زاگرس از جمله در استان لرستان مشاهده می‌شود (Askari *et al.*, 2023). بلوط گال‌زا به‌عنوان یک گیاه با ارزش، از نظر زیست‌محیطی، درمانی و اقتصادی، یکی از مهمترین گونه‌هایی است که به دلیل داشتن دامنه وسیعی از خواص دارویی به طور سنتی به‌عنوان گیاه دارویی شناخته و مورد استفاده قرار گرفته است (Kumar *et al.*, 2021; Mehrnia *et al.*, 2013). وجود متابولیت‌های ثانویه فراوان از جمله ترکیبات فنولی مانند تانن‌ها در اندام‌های این گیاه به‌ویژه گال‌ها، این گونه را از سایر گونه‌های خویشاوندش از نظر پزشکی متمایز نموده است (Tayel *et al.*, 2018). مطالعات متعددی وجود متابولیت‌های ثانویه را در این گونه و نقش آن‌ها را در فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد التهابی تأیید نموده است (Banc *et al.*, 2023; Kaur *et al.*, 2018; Tayel *et al.*, 2004). در گذشته از گال‌های این درخت به‌منظور رنگ‌آمیزی و تهیه نقشه و نقاشی بر روی سنگ و همچنین جهت رنگ‌آمیزی نخ‌ها و افزایش استحکام آن‌ها در تهیه فرش استفاده می‌شده است (Askari *et al.*, 2020; Banc *et al.*, 2023). در طب سنتی گال‌های بلوط گال‌زا در درمان بیماری‌های التهابی و در داروسازی مدرن به‌عنوان ماده‌ای با خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، لارو کشی و ضد دیابت استفاده می‌شود (Elham *et al.*, 2020; Tayel *et al.*, 2018). در شرایط محیطی متفاوت، گیاهان طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه را به‌عنوان یکی از ارکان مکانیسم دفاعی خود تولید می‌کنند. قرار گرفتن سلول‌های گیاهی در

معرض تنش‌های زیستی و غیرزیستی، آغازگر آبشارهای واکنشی (Cascades reaction) است که در نتیجه منجر به تولید و تجمع این ترکیبات می‌شود (Khare *et al.*, 2020) که علاوه بر نقش مهمی که در سیستم دفاعی گیاهی و پاسخ به تنش‌های مختلف دارند، در توسعه داروهای گیاهی نیز اهمیت فراوانی دارند (Loke *et al.*, 2017). با توجه به وجود طیف گسترده‌ای از خواص بیولوژیکی و دارویی متابولیت‌های ثانویه گیاهی، مطالعه مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها اهمیت زیادی دارد (Jeena *et al.*, 2022). در بررسی شبکه‌های ژنی پیچیده در غیاب ژنوم مرجع می‌توان از داده‌های حاصل از ترنسکرپتوم در جهت شناسایی ژن‌های مرتبط و عناصر تنظیمی درگیر در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد (Vashisht *et al.*, 2015). ریز RNAها (miRNA, microRNA) یکی از مهم‌ترین عناصر تنظیمی در شبکه بیان ژن‌ها در اغلب مسیرهای زیستی به‌شمار می‌روند. ریز RNAها، مولکول‌های RNA تک رشته و غیرکدکننده‌ای هستند که با هدف قرار دادن انواع مختلفی از mRNAها بیان ژن را کنترل کرده و در گیاهان نقش تنظیمی مهمی پس از رونویسی ایفا می‌کنند (Hossain *et al.*, 2022; Marcela *et al.*, 2019). RNAها نقش مؤثری در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی داشته و به‌عنوان ابزارهای به‌ترتیب مولکولی، پتانسیل بالایی دارند (Zhang *et al.*, 2022). در مطالعه دنگ و لو (Deng and Lu, 2017) نقش سه ریز RNA شامل miR828 و miR858 دو ریز RNAها در تنظیم بیوسنتز فنیل پروپانویید گیاهان مختلف مورد تأیید قرار گرفت. در برنج مشخص شده است که miR396 با تنظیم بیان ژن OsF3H بر بیوسنتز فلاونوئیدها تأثیر می‌گذارد (Li *et al.*, 2021). تحقیقات در گیاه دارویی باریجه (*Ferula gummosa*) نشان داد که miR5658، miR5021، miR838، miR5251، miR2919 با مسیر بیوسنتز ترپن‌ها مرتبط بوده و تعدادی از عوامل رونویسی مانند SPL7، SPL11 و ATHB13 را تنظیم می‌کنند (Marcela *et al.*, 2019). در گیاه دارویی *Podophyllum hexandrum* نیز مشخص شد که miR1438 و

سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از مقایسه روش‌های مختلف استخراج RNA در آزمایش‌های اولیه، از روش Djami-Tchatchou به منظور استخراج RNA استفاده شد (Djami-Tchatchou and Straker, 2012). کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از هر نمونه با استفاده از اسپکتروفتومتر Pico200 Microliter و الکتروفورز-ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

**توالی‌یابی RNA، پردازش و سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌ها**  
از پلتفرم Illumina HiSeq2500 برای توالی‌یابی RNA به صورت از دوسو خوانش با طول ۱۵۰ نوکلئوتید استفاده شد. پس از کنترل کیفیت همه خوانش‌های بدست آمده و از بین بردن خطای احتمالی موجود در آن‌ها، توالی‌های آداپتور حذف و سرهم‌بندی نوپدید (De novo assembly) خوانش‌های کوتاه با تنظیمات پیش فرض با استفاده از نرم‌افزار Trinity (v2.4.0) انجام گرفت. در نهایت از یونی‌ژن-های حاصل در جهت شناسایی ریز RNAها محافظت شده استفاده شد.

#### شناسایی ریز RNAها محافظت شده

برای شناسایی ریز RNAها محافظت شده، یونی‌ژن‌های حاصل از سرهم‌بندی به‌عنوان پایگاه مورد جست‌وجو و کلیه توالی‌های ریز RNAها بالغ دریافت شده از پایگاه miRBase به آدرس <http://www.mirbase.org>، به‌عنوان ورودی (query) استفاده شد. برای این منظور پس از دریافت توالی‌های ریز RNAها بالغ از ۸۸ گونه گیاهی ثبت شده در این پایگاه از ابزار BLASTn (E-) mismatch < 4 و value ≤ 10 در جهت جست‌وجو بیشترین شباهت یونی‌ژن‌ها با ریز RNAها بالغ (Griffiths-Jones, 2006) و از BLASTx (E-value ≤ 0.001) به‌منظور جست‌وجو علیه پایگاه پروتئین‌های غیرتکراری (Non-Redundant proteins: NR) و حذف یونی‌ژن‌های دارای انطباق با توالی‌های پروتئینی این پایگاه داده استفاده شد (Numnark et al., 2012).

#### پیش‌بینی ساختار دوم ریز RNAها

با توجه به اینکه، تشابه یونی‌ژن‌های کاندید با توالی‌های ریز RNAهای بالغ، به تنهایی برای اعتبار سنجی ریز RNAها

miR1873 مسیرهای متابولیکی مختلفی به ویژه بیوسنتز لیگنین و فلاونوئید را تنظیم می‌کنند (Hossain et al., 2022). به‌طور کلی، شناسایی ریز RNAها در گیاهان دارویی اطلاعات ارزشمندی را فراهم می‌کند تا علاوه بر توسعه داده‌های ژنومی، بتوان مکانیسم تنظیم مربوط به یک فرآیند خاص، مانند سنتز یک متابولیت ثانویه را درک کرد. یکی از رویکردهای اصلی در مطالعه تغییرات بیان و شناسایی مکانیسم‌های مولکولی درگیر در تنظیم بیان ژن استفاده از فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید (Next Generation Sequencing: NGS) می‌باشد (Liu et al., 2015). توالی‌یابی RNA (RNA-Seq) از مهمترین پلتفرم‌های توالی‌یابی نسل جدید می‌باشد که به‌عنوان جایگزینی مناسب برای روش‌های سنتی تهیه پروفایل بیانی در موجودات مختلف شناخته می‌شود. از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA می‌توان در شناسایی ریز RNAهای حفاظت شده در ترنسکرپتوم استفاده نمود (Ramezani et al., 2022; Sohrabi et al., 2020; Mir Drikvand et al., 2019; Martin and Wang, 2011).

علی‌رغم اهمیت زیست‌محیطی و درمانی بلوط گال‌زا، اطلاعات ژنتیکی کمی از آن در دسترس محققان قرار دارد که این امر به‌عنوان چالشی بزرگ در مسیر بررسی و مطالعه ژنتیکی این گونه به‌شمار می‌آید. از این‌رو، هدف از پژوهش حاضر بررسی ترنسکرپتوم درخت بلوط گال‌زا و همچنین شناسایی و تعیین خصوصیت ریز RNAهای حفاظت شده در آن با استفاده از فناوری توالی‌یابی RNA-Seq، می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه گیاهی و استخراج RNA

شینه قلابی از جنگل‌های زاگرس با ۱۵۵۰ متر ارتفاع از سطح دریا و طول و عرض جغرافیایی ۴۷ درجه و ۵۴ دقیقه و ۳۲ درجه و ۴۷ دقیقه، از زیستگاه‌های مهم بلوط گال‌زا می‌باشد (Pirbaluti et al., 2017). نمونه‌های گیاهی برگ و ریشه از درختان منطقه شینه و از نهال‌های ۲ ساله حاصل از کاشت بذر حاصل از درختان این منطقه در نهالستان خرم‌آباد انتخاب و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و پس از انتقال به آزمایشگاه، تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه

کارکرد یونی ژنهای هدف ریز RNAها با استفاده از BLASTx انجام گرفت و در نهایت این یونی ژنها در مقابل پایگاههای دادههای پروتئینی غیر تکراری قرار گرفتند. از ابزار OmicsBox جهت تحلیل هستی شناسی و شناسایی مسیرهای متابولیکی غنی شده توسط ژنهای هدف ریز RNAها استفاده شد.

### نتایج و بحث

**توالی یابی و سرهم بندی نوپدید:** با توجه به پیچیدگی ژنوم درختان، تا به امروز تنها ژنوم تعداد محدودی از درختان جنگلی توالی یابی شده اند (Ye et al., 2019). در سالهای اخیر و با کمک فناوریهای توالی یابی نسل جدید، مطالعه و بررسی گونههای جنگلی افزایش یافته (López de Heredia and Vázquez-Poletti, 2016) و به طور گسترده از این فناوریهای نوین به منظور تکمیل نقشههای ژنتیکی، بررسی بیان ژن، تجزیه و تحلیل شبکههای هم بیانی ژنها و شناسایی ژنهای درگیر در مسیرهای مهم متابولیتی استفاده می شود (Negi et al., 2022). برای موجوداتی که ژنوم مرجع آنها در دسترس نیست سرهم بندی نوپدید ترنسکریپتوم گزینه مناسبی برای مطالعه پروفایل بیانی آن موجود به حساب می آید (Garg and Jain, 2013). بررسیها نشان می دهند که اطلاعات ژنتیکی که بتوان از آنها در پیش برد برنامههای ژنتیکی بلوط گالزا استفاده نمود وجود نداشته و تولید یک ترنسکریپتوم مرجع و مجموعه ای از دادههای منحصربه فرد برای بلوط گالزا با هدف تولید محتوای ژنتیکی برای این گونه، زمینه مناسبی را برای مطالعات کاربردی در زمینههای مختلف فراهم می کند که می تواند برای بررسی مسیرهای زیستی بسیار ارزشمند باشد.

در این تحقیق به عنوان اولین گزارش از ترنسکریپتوم بلوط بلوط گالزا، در مجموع از تمامی نمونههای منتخب برای توالی یابی، تعداد ۲۹۲۹۷۲۰۴۸ خوانش خام (Raw reads) حاصل از توالی یابی ایجاد شد. پس از کیفیت سنجی اولیه خوانشهای با کیفیت پایین حذف و در نهایت ۲۷۶۸۵۲۲۵۵ خوانش تمیز (Clean Reads) به دست آمد. از

شناسایی شده کافی و مورد قبول نمی باشد، علاوه بر شباهت بالای یونی ژنهای کاندید با توالی های ریز RNAهای بالغ، نحوه تاخوردگی و میزان انرژی آزاد ساختار ریز RNAهای اولیه نیز طبق پارامترهای پیش فرض با کمک ابزار تحت وب Mfold و شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy) (index: MFEI) مورد بررسی قرار گرفت (Gutiérrez-García et al., 2021). محدوده ۱۰۰ نوکلئوتیدی در بالادست و پایین دست ریز RNA شناسایی شده به منظور بررسی و اطمینان از قرارگیری توالی ریز RNA بالغ در محل و جهت صحیح احتمالی با استفاده از ابزار Bedtools استخراج شد. درصد GC/AU تعیین و پارامترهای نظیر ساختار ثانویه ساقه و حلقه با تاخوردگی مناسب، قرار گرفتن توالی های ریز RNAهای بالغ در یک بازو، نبود شکستگی در ساختار حلقه، حفظ حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy) و حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده (Adjusted minimal free energy: AMFE) (محاسبه شده از طریق رابطه های ۱ تا ۳)، وجود کمتر از ۷ جفت نوکلئوتید غیر منطبق، حداکثر اندازه فاصله ۳ نوکلئوتید در ساختار ریز RNAها و در نهایت میزان شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی بیشتر از ۸۵ کیلوکالری بر مول برای انتخاب ریز RNAهایی با پتانسیل بالا مورد استفاده قرار گرفت (Vashisht, et al., 2015).

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

رابطه ۲ حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده  $100 \times (\text{طول میرنای پیش ساز} / \text{MFE}) =$

رابطه ۳  $/ =$  شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده (GC%)

### شناسایی و تفسیر کارکردی ژنهای هدف ریز RNAهای

شناسایی شده: پیش بینی ژنهای هدف ریز RNAها با استفاده از ابزار تحت وب psRNA target انجام شد و توالی ریز RNAهای شناسایی شده علیه یونی ژنهای موجود مورد تحلیل و بررسی قرار گرفتند. مستندسازی و تفسیر

و ریشه بیان شده‌اند که بیان تمامی ریز RNAها در بافت برگ بالاتر از میزان بیان آنان در ریشه بود. در حال حاضر از دو رویکرد استفاده از EST و فناوری‌های مبتنی بر توالی‌یابی نسل جدید برای مطالعه ریز RNAها استفاده می‌شود (Luo et al., 2015). در مطالعه‌ای بر روی درخت کاری (*Murraya koenigii*) در مجموع ۱۴۲ ریز RNA محافظت شده با استفاده از فناوری RNA-seq شناسایی شد (Gutiérrez-García et al., 2021). در مطالعه لی و همکاران (Li et al., 2021) در ۹ بافت مختلف گیاه چای در مجموع ۲۷۲ ریز RNA با بیان افتراقی به دست آمد که شامل ۱۹۸ ریز RNA محافظت شده و ۷۴ ریز RNA جدید بود. یکی از اصول اصلی رویکردهای محاسباتی برای شناسایی ریز RNAها بر این واقعیت استوار است که همه pre-ریز RNAها در ساختار ثانویه خود یک ساختار ساقه-حلقه دارند، اما وجود این ساختار نمی‌تواند به‌عنوان یک ویژگی اختصاصی برای شناسایی ریز RNAها عمل کند. توالی‌های پیش ساز ریز RNAها پیوندهای هیدروژنی و جفت‌بازهای بیشتری را نسبت به سایر RNAها تشکیل می‌دهند که وجود این پیوند های هیدروژنی بیشتر، ساختار سنجاق سری پیش‌سازها را پایدارتر می‌کند که در انتقال آن‌ها از هسته به سیتوپلاسم و همچنین در تشخیص آن‌ها در فرآیند تبدیل پیش‌ساز به توالی‌های بالغ موثر می‌باشد. همچنین مقدار MFEI در ریز RNAها نسبت به سایر RNAها بیشتر است که نشان می‌دهد که MFEI می‌تواند به راحتی برای تشخیص ریز RNAها از سایر RNAهای غیرکدکننده و کدکننده استفاده شود و به‌عنوان معیاری منحصر به فرد برای تشخیص ریز RNAها به حساب می‌آید. مقدار کمینه شاخص MFEI برای ریز RNAها ۰/۸۵ کیلوکالری بر مول در نظر گرفته شده است و هنگامی که MFEI بیش از آن باشد، توالی به احتمال بسیار زیاد متعلق به یکی از خانواده‌های ریز RNAها می‌باشد (Zhang et al., 2006). نتایج بررسی ساختار ثانویه ریز RNAهای شناسایی شده در این مطالعه نشان داد که میانگین AU برای این عناصر ۵۵ درصد و میانگین مقدار MFEI ۱/۰۴ کیلوکالری بر مول بود. مقایسه مقادیر ارائه شده برای ریز

سرهم‌بندی خوانش‌های با کیفیت، تعداد ۸۹۳۳۵ یونی‌ژن با طول متوسط ۱۰۴۳/۲۷ جفت‌باز و شاخص N50 معادل ۱۲۸۲ جفت‌باز ایجاد شد.

**شناسایی ریز RNAهای محافظت شده:** در گونه‌های گیاهی، ریز RNAها و siRNAs دو نوع مهم از RNAهای تنظیمی کوچک هستند که از نظر عملکرد و مسیر تکاملی متفاوت هستند. در گیاهان و جانوران، این RNAهای تنظیمی کوچک بسیار حفاظت شده بوده و بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. استفاده از فن‌آوری‌های توالی‌یابی RNA تصویری وسیع از اجزاء رونوشت غیرکدکننده ارائه می‌کند و امکان شناسایی و حاشیه‌نویسی جامع همه RNAهای غیرکدکننده را در بین نمونه‌ها فراهم می‌کند (Vivek and Kumar, 2021). نتایج هم‌ردیفی نشان داد که از مجموع ۸۹۳۳۵ یونی‌ژن مورد بررسی، ۴۳۳۲ یونی‌ژن با ریز RNAهای بالغ گیاهی مطابقت داشتند که پس از آن رونوشت‌های با رکورد مشابه در پایگاه Nr، حذف شدند. رهیافت‌های مختلفی برای شناسایی ریز RNAها وجود دارد. جست‌وجو از طریق بررسی همولوژی، یکی از راهکارهای شناسایی آن‌ها است (Mehta et al., 2016) اما به‌تنهایی کافی نیست. به‌همین دلیل از بررسی ساختار ثانویه ریز RNAها از طریق ابزار تحت وب mFold به‌عنوان معیار تکمیل‌کننده در شناسایی ریز RNAهای محافظت‌شده استفاده شد (Mehta et al., 2016). پس از بررسی ساختار ساقه و حلقه در ساختار ثانویه توالی‌های مورد نظر و بررسی مجدد محل قرارگیری توالی ریز RNA بالغ در ساختار ثانویه، توالی‌های نامطلوب از نظر مقدار حداکثر فضای خالی و تعداد نوکلئوتید غیرمنطبق در ساختار، حذف و در نهایت با بررسی پارامترهای درصد AU و MFEI، ۴ ریز RNA محافظت شده متعلق به خانواده‌های miR156، miR399، miR160 و miR172 شناسایی شدند (شکل ۱). سطوح بیان یونی‌ژن‌های انتخاب شده بر اساس مقادیر FPKM مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که این یونی‌ژن‌ها در سطوح مختلف در هر دو بافت برگ

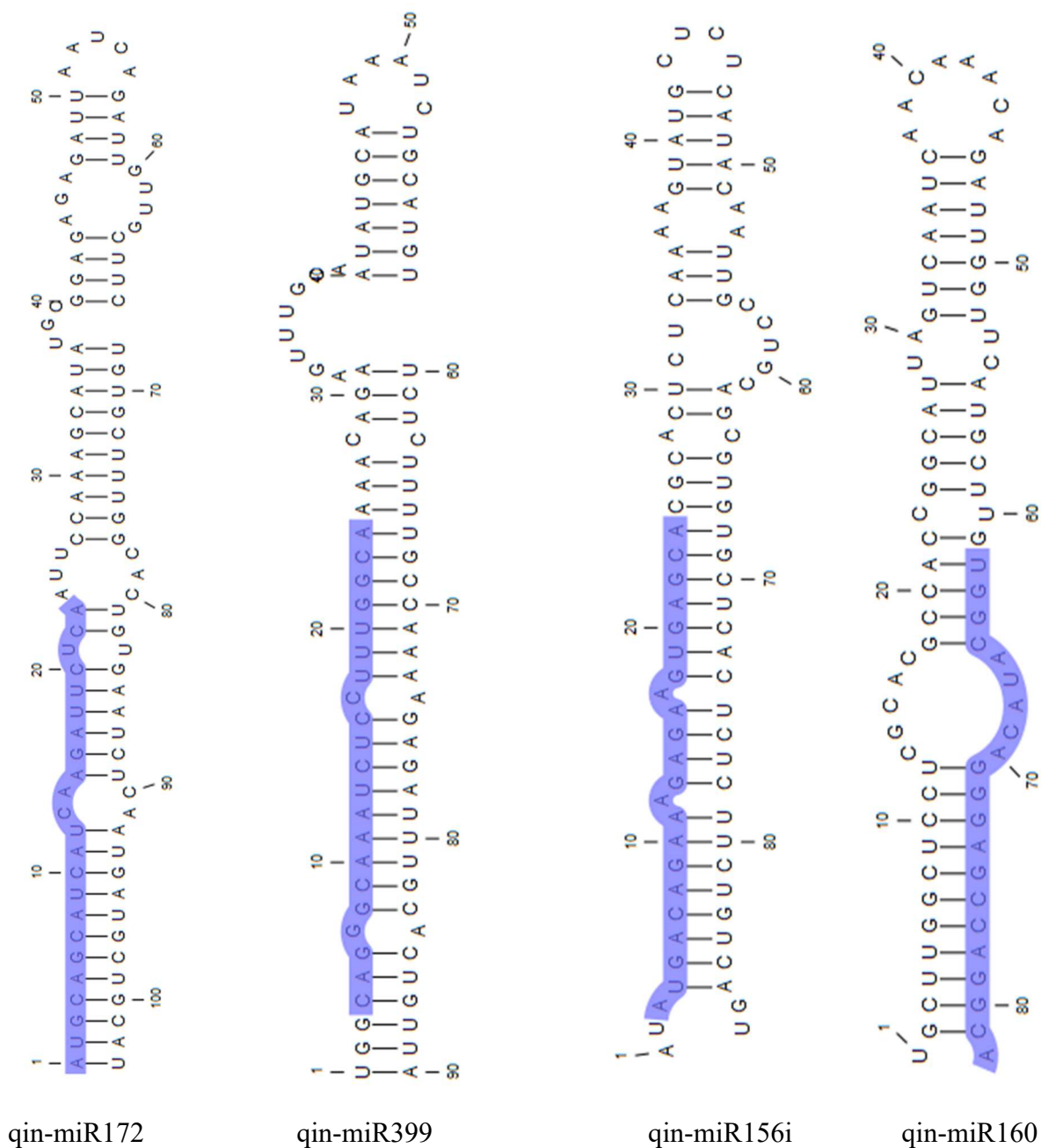
RNAهای حاصل در این مطالعه با سایر منابع، صحت ساختار

ثانویه توالی شناسایی شده را تأیید می‌نماید.

جدول ۱- ویژگی‌های ریز RNAهای شناسایی شده در بلوط گالزا

Table 1. Characteristics of identified microRNAs in *Q. infectoria*

ویژگی‌ها Feature	نام ریز RNA بالغ Name of mature microRNAs			
	qin-miR172	qin-miR399	qin-miR156i	qin-miR160
نام یونیژن Unigene name	evgLocus_159374	Contig3380	evgLocus_35663	evgLocus_120402
طول یونیژن Unigene length	517	1245	646	1166
مختصات توالی ریز RNA بالغ روی یونیژن Sequence coordinates of mature microRNA on Unigene	230..252	294..314	142..163	1091..1111
تعداد نوکلئوتیدهای غیر منطبق Number of mismatch nucleotides	0	0	0	0
ارزش مورد انتظار E-value	3.93E-06	4.85E-05	1.49E-05	4.85E-05
طول توالی پیش‌ساز ریز RNA (جفت‌باز) Pre-microRNA sequence length (bp)	103	90	88	82
توالی ریز RNA شناسایی شده (جفت‌باز) Sequence of identified microRNA	AUGCAGCAUCAU CAAGAUUCUCA	UGCCAAAGGAGAUU UGCCUG	UGCUCACUUCUCU UUCUGUCAU	GGCAUACAGGGA GCCAGGCA
طول ریز RNA شناسایی شده (جفت‌باز) Length of identified microRNA (bp)	23	21	22	20
درصد GC GC%	40.78	38.89	45.45	53.66
درصد AU AU%	59.22	61.11	54.55	46.34
حداقل انرژی آزاد تاخوردگی MFE (kcal/mol)	-45.00	-40.00	-39.40	-42.50
شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی AMFE	-43.69	-44.44	-44.77	-51.83
حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده MFEI	1.07	1.14	0.99	0.97



شکل ۱- ساختار پیش‌ساز چهار ریز RNA شناسایی شده در ترنسکریپتوم بلوط گال‌زا. توالی ریز RNA بالغ با رنگ آبی مشخص شده است.

Figure 1. Predicted pre-microRNAs secondary structure of four microRNAs identified in *Q. infectoria*. The blue highlights correspond to the mature microRNA sequence.

طریق تخریب mRNA انجام می‌گردد. بیشترین یونی‌ژن هدف مربوط به خانواده qin-miR160 و کمترین آن مربوط به qin-miR172 بود. در بررسی‌های گذشته نقش ریز RNAها در تنظیم فرآیندهای رشدی مانند رشد ثانویه در بلوط چوب پنبه (*Q. suber*) مورد مطالعه قرار گرفته است

در جدول ۲ فراوانی ژن‌های هدف احتمالی که تحت کنترل ریز RNAهای شناسایی شده قرار می‌گیرند و نحوه کنترل بیان آنها توسط آنها ارائه شده است. در مجموع ۵۲۱ یونی‌ژن توسط ریز RNAهای شناسایی شده در این مطالعه کنترل می‌شوند که فرآیند غالب در کنترل این ژن‌ها از

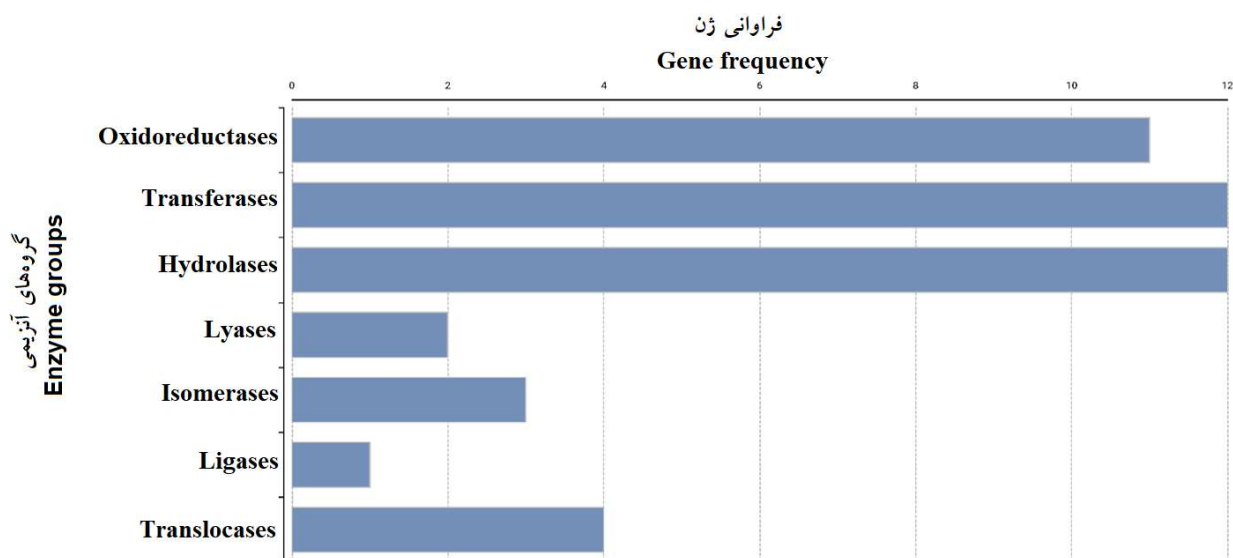
(2016). مطالعه لی و همکاران (Li *et al.*, 2021) نشان داد که در گیاه چای نیز محتوای برخی از آنتی اکسیدانها با بیان miR156 همبستگی معنی دار و منفی اما با بیان miR166 و miR172 همبستگی مثبت نشان می دهد. فراوانی یونی ژنهای درگیر در سنتز گروههای مختلف آنزیمی که هدف ریز RNAهای شناسایی شده در بلوط گالزا هستند نیز مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲). بیشتر ژنها مربوط به سه گروه آنزیمی هیدرولاز، ترانسفراز و اکسیدوردوکتازها بودند. وجود ترکیبات فنلی مختلفی مانند تانن ها، کوئرستین و کاتچین در بلوط گالزا گزارش شده اند (Tayel *et al.*, 2018). ژنهای DFR, CYP73A, F3H, CCR و LAR از گروه آنزیمی اکسیدوردوکتاز هستند که در مسیر سنتز این ترکیبات فنیل پروپانوییدی نقش دارند. در گیاه چای، miR156 بیان ژن DFR را تنظیم می کند و miR529d و miR156g-3p به ترتیب با ژنهای هدف CHI و F3H همبستگی منفی دارند (Li *et al.*, 2021). این آنزیمها در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها منجر به تشکیل لوکوآنتوسیانیدینها می شود که در تولید واحدهای مونومری متداول پروآنتوسیانیدینها مؤثر هستند (He *et al.*, 2008). miR156 و miR858 در گیاهان و در مسیر سنتز پروآنتوسیانیدینها نقش تنظیمی دارند (Zhang *et al.*, 2022). مشخص شده است که در گیاه *Podophyllum peltatum* miR172i همراه miR829 با هدف قرار دادن آنزیم 4CL (4-coumarate--CoA ligase) و *CHS* (Chalcone synthase) در بیوسنتز فلاونوئید نقش دارند (Hossain *et al.*, 2022).

(Chaves *et al.*, 2014). در بررسی عوامل تنظیم کننده زمان گلدهی در *Q. suber*، سطوح بیان ماژول miR156-SPL-miR172 در درختان یکساله و چندساله مورد مطالعه قرار گرفت. این ماژول ژنی به طور گسترده ای به عنوان نشانگر در تعیین شایستگی گیاه برای گلدهی استفاده شده است. در بلوط چوب پنبه ای، سطوح miR156 در درختان جوان بالا و در درختان بالغ شناسایی نشد، در حالی که miR172 الگوی بیان مخالف آن را نشان داد (Sobral *et al.*, 2020). miR156 SPL (به عنوان ژنهای هدف آن) به شدت در قلمرو گیاهی محافظت شده اند و با هم یک شبکه تنظیم کننده ژنی گسترده ای را تشکیل می دهند که جنبه های مختلف رشد و نمو را در گیاه کنترل می کنند (Aung *et al.*, 2015). miR156 یکی از ریز RNAهای بسیار محافظت شده در گیاهان است که گروههای مختلفی از عوامل رونویسی را هدف قرار می دهد. همچنین این ریز RNA در تحمل تنش های غیر زیستی و بیان بالای آن در تحریک متابولیسم ثانویه نقش دارد. مطالعه ژنگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2022) نشان داد که اکثر ریز RNAها در بیوسنتز متابولیت های ثانویه گیاهی نقش دارند. ریز RNAها با کنترل سطوح بیان عوامل رونویسی نقش کلیدی در سنجش اولیه و انتقال واکنش های تنشی، در پاسخ سریع به تغییرات ایجاد شده ایفا کنند (Pagano *et al.*, 2021). مطالعه ریز RNAها و نقش آنها در تنظیم و تولید متابولیت های ثانویه در گونه های نعنای (*Mentha spp.*) نشان داد که miR156 در بیوسنتز فلاون، فلاونول و بیوسنتز ترپنوئیدها شرکت می کند و در تنظیم عامل رونویسی bHLH نقش دارند (Singh *et al.*, 2022).

جدول ۲- فراوانی ژنهای هدف ریز RNAهای شناسایی شده و مکانیسم عمل آنها در تنظیم بیان ژنهای هدف در ترنسکرپتوم بلوط گالزا

Table 2. Frequency of identified microRNA target genes and mechanism of regulation of target genes expression present in gall oak transcriptome.

نام Name	بازدارندگی Inhibition		مجموع Total
	تخریب mRNA mRNA degradation	ممانعت از ترجمه Inhibition of translation	
	qin-miR156	122	
qin-miR160	131	21	152
qin-miR172	84	14	98
qin-miR399	124	11	135



شکل ۲ - توزیع فراوانی ژن‌های کدکننده گروه‌های مختلف آنزیمی که توسط ریز RNAهای شناسایی شده در ترنسکریپتوم بلوط گال‌زا تنظیم می‌شوند.

Figure 2. Frequency distribution of genes encoding different groups of enzymes being regulated by identified miRNAs in the gall oak transcriptome.

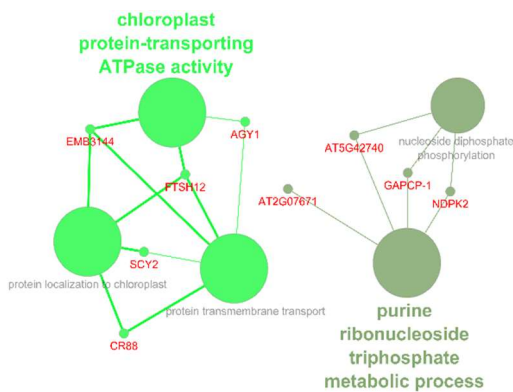
علاوه بر سنتز مولکول‌ها برای تحمل تنش، با القای ژن‌های هسته‌ای موجب ارائه پاسخ انعطاف‌پذیر در مقابل تنش‌ها می‌شوند. کلروپلاست‌ها به‌عنوان اندامک‌های حیاتی سلول گیاهی عمل می‌کنند و علاوه بر فتوسنتز، تولید و ذخیره‌سازی مجموعه‌ای از مولکول‌های زیستی را نیز انجام می‌دهند. آن‌ها توانایی سنتز انواع رنگدانه‌ها، متابولیت‌های ثانویه و فیتوهورمون‌ها را دارند که به مقاومت و تحمل سلول‌های گیاهی در شرایط نامطلوب کمک می‌کنند (Song *et al.*, 2021). بررسی ترنسکریپتوم گیاه *Ginkgo biloba* نشان داد که ریز RNAهای مختلف و ژن‌های هدف آن‌ها در توسعه کلروپلاست و متابولیسم هورمون‌های تنظیم‌کننده رنگ برگ‌ها می‌تواند مؤثر باشند (Li *et al.*, 2019). برخی از ریز RNAها می‌توانند فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، محتوای قند، محتوای پرولین و محتوای مالون دی آلدئید را نیز افزایش دهند (Owusu Adjei *et al.*, 2021). نور بر تنظیم فعالیت ریز RNAها تأثیر می‌گذارد. درک محرک‌های نوری توسط کلروپلاست‌ها با ایجاد سیگنال‌ها و انتقال آن‌ها از کلروپلاست به هسته، بیان ژن‌های هسته‌ای را تغییر می‌دهد (Barczak-Brzyżek *et al.*, 2022). در مطالعه آگویر و پیلون (Aguirre and Pilon, 2016) نقش ریز

تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های هدف به منظور تعیین نقش این گروه از ژن‌ها در فرآیندهای زیستی با استفاده از نرم افزار OmicsBox انجام گرفت و یونی‌ژن‌های هدف در سه گروه عملکرد مولکولی (Molecular Function, MF)، فرآیندهای زیستی (Biological Processes, BP) و اجزای سلولی (Cellular Components, CC) قرار گرفتند (شکل ۳، A-C). در گروه عملکرد مولکولی و فرآیندهای زیستی GO ترم فعالیت ATPase انتقال دهنده پروتئین کلروپلاست (Chloroplast protein transporting) (ATPase activity) فراوانی بالایی از ژن‌های هدف ریز RNAها را به خود اختصاص دادند. زیرواحد بزرگ ریبوزوم سیتوزولی (cytosolic large ribosomal subunit)، غشای داخلی پلاستیدها (plastids inner membrane) و غشای داخلی کلروپلاست (membrane inner membrane) نیز بیشترین اهداف ریز RNAهای شناسایی شده در گروه اجزای سلولی بودند. پلاستیدها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های محوری پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ظاهر شده‌اند. آن‌ها با هسته و سایر اندامک‌های سلولی برای زنده ماندن در شرایط نامساعد ارتباط برقرار می‌کنند. همچنین به‌عنوان حسگرهای محیطی

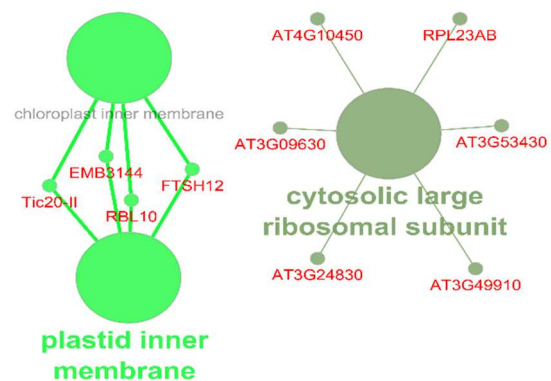
عوامل تنش‌زای مختلفی باعث آسیب گسترده به گیاهان می‌شوند. در سناریوی پیچیده پاسخ و سازگاری گیاهان با این عوامل، ریز RNA نقش نظارتی اساسی دارند و شواهد قابل توجهی در مورد تنظیم توسط ریز RNAها در سطوح سلولی و بافتی گزارش شده است. آنچه که از بررسی‌های مختلف به دست آمده نشان می‌دهد که ریز RNAها ممکن است با مسیرهای خاصی بسته به گونه‌های گیاهی، مرحله فیزیولوژیکی، اندام یا بافت‌ها و یا نوع خاصی از تنش مرتبط باشند. طبق نتایج هستی‌شناسی ژنهای هدف و همچنین مسیرهایی زیستی که ژنهای هدف ریز RNAهای شناسایی شده در آن درگیر بوده‌اند، می‌توان گفت که سیستم فتوسنتز کننده بیشتر تحت تأثیر قرار گرفته است.

RNAهای مختلف از جمله miR156 در پاسخ به تنش اکسیداتیو، فعالیت فتوسنتزی و جابجایی فلزات سنگین و انتقال عناصر در سطح غشای تیلاکوئید در کلروپلاست گزارش شده است. بررسی مسیرهای غنی شده KEGG به منظور شناسایی ژنهای هدف ریز RNAها تنها یک مسیر غنی شده (چرخه سترات) را نشان داد (شکل ۳-د). چرخه سترات، که به عنوان چرخه TCA نیز شناخته می‌شود، یک مسیر حیاتی برای متابولیسم انرژی و چرخه کربن در سلول‌ها بود و همچنین متابولیسم آسپاراتات و گلوتامات را به هم متصل می‌کند. فعالیت بالای چرخه سترات با فراهم کردن انرژی و مواد اسمزی می‌تواند به حفظ باز شدن مداوم روزنه‌ها کمک کند. این مسیر در پاسخ به تنش سرمایی نیز نقش دارند (Wu et al., 2023).

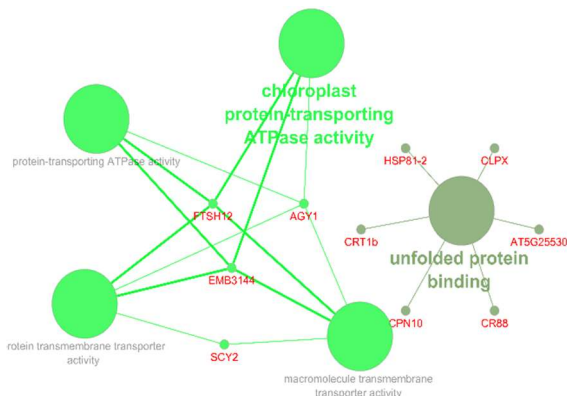
A\_الف



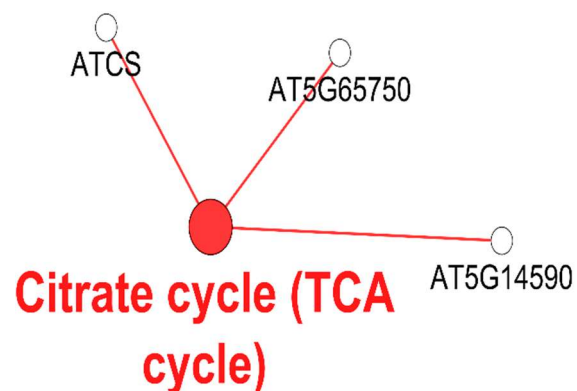
B\_ب



C\_ج



D\_د



شکل ۳- تحلیل غنی‌سازی عملکردی ژنهای هدفی که توسط ریز RNAهای شناسایی شده در بلوط گال‌زا تنظیم می‌شوند. الف: گروه فرآیندهای زیستی؛ ب: گروه جایگاه سلولی؛ ج: گروه عملکرد مولکولی؛ د: مسیرهای متابولیکی

Figure 3. Functional enrichment analysis of target genes that are regulated by microRNAs identified in *Q. infectoria*. A: Biological processes; B: cellular components; C: Molecular functional group; D: Metabolic pathways



شده متعلق به چهار خانواده شامل miR156, miR399, miR160 و miR17 شناسایی شدند. این در حالی بود که تا کنون هیچ گزارشی در خصوص ریز RNAها در این گونه از بلوط ارائه نشده است. با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های پایین‌دستی ارتباط منطقی بین ریز RNAهای شناسایی شده و ژنهای هدف آنها مورد شناسایی شد. با توجه به نقش ریز RNAها در تنظیم عوامل رونویسی و تأثیر آنها بر ژنهای درگیر در سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌توان از پتانسیل این عناصر تنظیمی شناسایی شده به‌عنوان راهنما و کلیدی در برنامه‌های ژنتیکی آینده در بلوط گال‌زا استفاده نمود.

بلوط گال‌زا یکی از گونه‌های کمیاب با خواص دارویی مهم از خانواده بلوط به‌شمار می‌رود. وجود متابولیت‌های ثانویه فراوان با خاصیت درمانی در این درخت در مطالعات مختلف مورد تأیید قرار گرفته است. غلی رغم اهمیت و نقش این گیاه تاکنون اطلاعات ژنتیکی کمی از آن در دسترس است. توالی‌یابی RNA امکان بررسی بیان ژن‌ها را برای چنین گونه‌هایی که فاقد توالی ژنومی تعیین‌شده هستند فراهم می‌کند. در این مطالعه از رفرنس ترنسکرپتوم ایجاد شده جهت شناسایی ریز RNAهای محافظت شده استفاده شد و برای اولین بار در این گیاه با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، توالی چهار ریز RNA محافظت

## References

- Aguirre, G. and Pilon, M.** (2016). Copper delivery to chloroplast proteins and its regulation. *Frontiers in Plant Science*, **6**: 174909.
- Ahmad, W.** (2016). Ethnopharmacology of *Quercus infectoria* Olivier galls: A review. *Hippocratic Journal of Unani Medicine*, **11**: 105-18.
- Ahmadi, E., Kowsari, M., Azadfar, D. and Jouzani, G.S.** (2018). Rapid and economical protocols for genomic and metagenomic DNA extraction from oak (*Quercus brantii* Lindl.). *Annals of Forest Science*, **75**: 1-14.
- Askari, F., Azadi, A., Namavar-Jahromi, B., Tansaz, M., Mirzapour Nasiri, A. and Mohagheghzadeh, A.** (2020). A Comprehensive review about *Quercus infectoria* G. Olivier Gall. *Research Journal of Pharmacognosy*, **7**: 69-77.
- Aung, B., Gruber, M.Y. and Hannoufa, A.** (2015). The microRNA156 system: a tool in plant biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **4**: 432-442.
- Banc, R., Rusu, M.E., Filip, L. and Popa, D.-S.** (2023). Phytochemical profiling and biological activities of quercus sp. galls (Oak galls): a systematic review of studies published in the last 5 years. *Plants*, **12**: 3873.
- Barczak-Brzyżek, A., Brzyżek, G., Koter, M., Siedlecka, E., Gawroński, P. and Filipecki, M.** (2022). Plastid retrograde regulation of miRNAs expression in response to light stress. *BMC Plant Biology*, **22**: 150.
- Chaves, L., Lin, Y.C., Pinto-Ricardo, C., Van de Peer, Y. and Miguel, C.** (2014). miRNAs profiling in leaf and cork tissues of *Quercus suber* reveals novel miRNAs and tissue-specific expression patterns. *Tree genetics & Genomes*, **10**: 721-737.
- Clément, M., Leonhardt, N., Droillard, M.J., Reiter, I., Montillet, J.L., Genty, B., Lauriere, C., Nussaume, L. and Noël, L.D.** (2011). The cytosolic/nuclear HSC70 and HSP90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **156**: 1481-1492.
- Devis, D., Firth, S.M., Liang, Z. and Byrne, M.E.** (2015). Dosage sensitivity of RPL9 and concerted evolution of ribosomal protein genes in plants. *Frontiers in Plant Science*, **6**: 168975.
- Deng, Y. and Lu, S.** (2017). Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **36**: 257-290.
- Djami-Tchatchou, A.T. and Straker, C.J.** (2012). The isolation of high quality RNA from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill.). *South African Journal of Botany*, **78**: 44-46.
- Elham, A., Arken, M., Kalimanjan, G., Arkin, A. and Iminjan, M.** (2020). A review of the phytochemical, pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological evaluation of *Quercus infectoria* galls. *Journal of Ethnopharmacology*, **237**: 113592.
- Garg, R. and Jain, M.** (2013) RNA-Seq for transcriptome analysis in non-model plants. In: Jain, M. and Garg, R., Eds., *Legume Genomics: Methods and Protocol*, pp. 43-58, Springer, New York, USA.
- Giron, D., Huguet, E., Stone, G.N. and Body, M.** (2016). Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. *Journal of Insect Physiology*, **84**: 70-89.

- Griffiths-Jones, S.** (2006). miRBase: the microRNA sequence database. In: Ying, S.Y. ed., *MicroRNA Protocols*, pp. 129-138, Totowa, Humana Press, New Jersey, USA.
- Gutiérrez-García, C., Ahmed, S.S., Ramalingam, S., Selvaraj, D., Srivastava, A., Paul, S. and Sharma, A.** (2021). Identification of microRNAs from medicinal plant *Murraya koenigii* by high-throughput sequencing and their functional implications in secondary metabolite biosynthesis. *Plants*, **11**: 46.
- Hao, K., Wang, Y., Zhu, Z., Wu, Y., Chen, R. and Zhang, L.** (2022). miR160: An indispensable regulator in plant. *Frontiers in Plant Science*, **13**: 833322.
- He, F., Pan, Q.H., Shi, Y. and Duan, C.Q.** (2008). Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules*, **13**: 2674-2703.
- Hossain, R., Quispe, C., Saikat, A.S.M., Jain, D., Habib, A., Janmeda, P., Islam, M.T., Daştan, S.D., Kumar, M. and Butnariu, M.** (2022). Biosynthesis of secondary metabolites based on the regulation of microRNAs. *BioMed Research International*, **2022**: 9349897.
- Jeena, G.S., Singh, N. and Shukla, R.K.** (2022). An insight into microRNA biogenesis and its regulatory role in plant secondary metabolism. *Plant Cell Reports*, **41**(8): 1-21.
- Karami, S., Shiran, B., Ravash, R. and Fallahi, H.** (2023). A comprehensive analysis of transcriptomic data for comparison of plants with different photosynthetic pathways in response to drought stress. *PLoS One*, **18**: e0287761.
- Kaur, G., Hamid, H., Ali, A., Alam, M.S. and Athar, M.** (2004). Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*. *Journal of Ethnopharmacology*, **90**: 285-292.
- Khare, S., Singh, N., Singh, A., Hussain, I., Niharika, K., Yadav, V., Bano, C., Yadav, R.K. and Amist, N.** (2020). Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. *Journal of Plant Biology*, **63**: 203-216.
- Kumar, M., Prakash, S., Kumari, N., Pundir, A., Punia, S., Saurabh, V., Choudhary, P., Changan, S., Dhumal, S. and Pradhan, P.C.** (2021). Beneficial role of antioxidant secondary metabolites from medicinal plants in maintaining oral health. *Antioxidants*, **10**: 1061.
- Li, H., Lin, Q., Yan, M., Wang, M., Wang, P., Zhao, H., Wang, Y., Ni, D. and Guo, F.** (2021). Relationship between secondary metabolism and miRNAs for important flavor compounds in different tissues of tea plant (*Camellia sinensis*) as revealed by genome-wide miRNAs analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**: 2001-2012.
- Li, W., He, Z., Yang, S., Ye, Y., Jiang, H. and Wang, L.** (2019). Construction and analysis of a library of miRNAs in gold-coloured mutant leaves of *L. Folia Horticulturae*, **31**: 81-92.
- Liu, M.-H., Yang, B.R., Cheung, W.F., Yang, K.Y., Zhou, H.F., Kwok, J.S.L., Liu, G.C., Li, X.F., Zhong, S. and Lee, S.M.Y.** (2015). Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in ginsenoside and alkaloid biosynthesis. *BMC Genomics*, **16**: 1-12.
- Loke, K.K., Rahnamaie-Tajadod, R., Yeoh, C.C., Goh, H.H., Mohamed-Hussein, Z.A., Zainal, Z., Ismail, I. and Noor, N.M.** (2017). Transcriptome analysis of *Polygonum minus* reveals candidate genes involved in important secondary metabolic pathways of phenylpropanoids and flavonoids. *PeerJournal*, **5**: e2938.
- López de Heredia, U. and Vázquez-Poletti, J.** (2016). RNA-seq analysis in forest tree species: bioinformatic problems and solutions. *Tree Genet. Genomes*, **12**: 30.
- Luo, Y., Zhang, X., Luo, Z., Zhang, Q. and Liu, J.** (2015). Identification and characterization of microRNAs from Chinese pollination constant non-astringent persimmon using high-throughput sequencing. *BMC Plant Biology*, **15**: 1-18.
- Marcela, V.-H., Gerardo, V.M., Agustín, A.R.C., Antonio, G.M.M., Oscar, R., Diego, C.P. and Cruz-Hernández, A.** (2019). MicroRNAs associated with secondary metabolites production. In: Soto-Hernández, M., García-Mateos, R. and Palma-Tenango, M. Eds., *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*, pp. 51-64, BoD-Books on Demand, Norderstedt, GER.
- Martin, J.A. and Wang, Z.** (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, **12**: 671-682.
- Mehrnia, Mohamad, Nejadstari, taheer, Asadi, Mostafa, Mehregan and Iraj** (2013). The introduction of *Quercus infectoria* as a medicinal plant In the Zagros mountains and determination its DNA Barcoding. **15**: 111-120.
- Mehta, A., Gupta, H., Rawal, R., Mankad, A., Tiwari, T., Patel, M. and Ghosh, A.** (2016). In silico microRNA identification from *stevia rebaudiana* transcriptome assembly. *European Journal of Medicinal Plants*, **15**: 1-14.
- Mir Drikvand, R. and Samiei, K.** (2020). Evaluation and Comparison of the efficiency of different molecular markers in estimating genetic distance of different persian oak (*Quercus brantii* Lindl.) populations in Lorestan province, Iran. *Plant Genetic Researches*, **7**: 33-46 (In Persian).

- Mir Drikvand, R., Sohrabi, S.S., ُSohrabi, S.M. and Samiei, K.** (2019). Identification and characterization of conserved miRNAs of *Coriandrum sativum* L. using next-generation sequencing data. *Crop Biotechnology*, 9(25):59-74 (In Persian).
- Moin, M., Bakshi, A., Madhav, M. and Kirti, P.** (2017). Expression profiling of ribosomal protein gene family in dehydration stress responses and characterization of transgenic rice plants overexpressing RPL23A for water-use efficiency and tolerance to drought and salt stresses. *Frontiers in Chemistry*, 5: 97.
- Negi, A., Shukla, A., Jaiswar, A., Shrinet, J. and Jasrotia, R.S.** (2022). Applications and challenges of microarray and RNA-sequencing. In: Singh, D.B. and, Rajesh Kumar Pathak, R.K., Ed., *Bioinformatics Methods and Applications*, pp. 91-103, Academic Press address, Cambridge, UK.
- Numnark, S., Mhuantong, W., Ingsriswang, S. and Wichadakul, D.** (2012). C-mii: a tool for plant miRNAs and target identification. Paper presented at the *BMC Genomics*, 13: 1-10.
- Owusu Adjei, M., Zhou, X., Mao, M., Rafique, F. and Ma, J.** (2021). MicroRNAs roles in plants secondary metabolism. *Plant Signaling & Behavior*, 16: 1915590.
- Pagano, L., Rossi, R., Paesano, L., Marmioli, N. and Marmioli, M.** (2021). miRNAs regulation and stress adaptation in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 184: 104369.
- Pasandideh Arjmand, M., Samizadeh Lahiji, H., Biglouei, M.H. and Mohsenzadeh Golfazani, M.** (2021). In silico identification of drought responsive miRNAs target genes in Canola (*Brassica napus*). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 36(2): 110-126 (In Persian).
- Pirbaluti, F.G., Saravi, A.T. and Arani, A.M.** (2017). Karyotypic analysis of *Quercus infectoria* G.Olive Iranian *Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25(2): 324-336 (In Persian).
- Ramezani, M., Nazarian-Firouzabadi, F., Ismaili, A. and Sohrabi, S.S.** (2022). De novo transcriptome assembly and conserved microRNAs identification of medicinal plant, *Kelussia odoratissima* Mozaff. *Crop Biotechnology*, 11(37): 55-76 (In Persian).
- Ramsøe, A., Clark, M.S. and Sleight, V.A.** (2020). Gene network analyses support subfunctionalization hypothesis for duplicated hsp70 genes in the Antarctic clam. *Cell Stress and Chaperones*, 25: 1111-1116.
- Singh, N., Srivastava, S., Shasany, A.K. and Sharma, A.** (2016). Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of *Mentha* spp. *Computational Biology and Chemistry*, 64: 154-162.
- Sobral, R., Silva, H.G., Laranjeira, S., Magalhães, J., Andrade, L., Alhinho, A.T. and Costa, M.M.R.** (2020). Unisexual flower initiation in the monoecious *Quercus suber* L.: a molecular approach. *Tree Physiology*, 40: 1260-1276.
- Sohrabi, S.S., Ismaili, A., Nazarian, F. and Hossein, F.** (2020). Identification and characterization of conserved miRNAs in lentil. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 32(4): 432-444 (In Persian).
- Song, Y., Feng, L., Alyafei, M.A.M., Jaleel, A. and Ren, M.** (2021). Function of chloroplasts in plant stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24): 13464.
- Tayel, A.A., El-Sedfy, M.A., Ibrahim, A.I. and Moussa, S.H.** (2018). Application of *Quercus infectoria* extract as a natural antimicrobial agent for chicken egg decontamination. *Revista Argentina de Microbiologia*, 50: 391-397.
- Vashisht, I., Mishra, P., Pal, T., Chanumolu, S., Singh, T.R. and Chauhan, R.S.** (2015). Mining NGS transcriptomes for miRNAs and dissecting their role in regulating growth, development, and secondary metabolites production in different organs of a medicinal herb, *Picrorhiza kurroa*. *Planta*, 241: 1255-1268.
- Vivek, A. and Kumar, S.** (2021). Computational methods for annotation of plant regulatory non-coding RNAs using RNA-seq. *Briefings in Bioinformatics*, 22: bbaa322.
- Wu, F., Du, Z., Hu, Z., Gan, L., Khaldun, A.B.M., Amombo, E., Huang, X. and Fan, J.** (2023). Metabolomic analysis of arabidopsis ost1-4 mutant revealed the cold response regulation mechanisms by OPEN STOMATA 1 (OST1) at metabolic level. *Agronomy*, 13: 2567.
- Ye, G., Zhang, H., Chen, B., Nie, S., Liu, H., Gao, W., Wang, H., Gao, Y. and Gu, L.** (2019). De novo genome assembly of the stress tolerant forest species *Casuarina equisetifolia* provides insight into secondary growth. *The Plant Journal*, 97: 779-794.
- Yusof, W.N.S.W. and Abdullah, H.** (2020). Phytochemicals and cytotoxicity of *Quercus infectoria* ethyl acetate extracts on human cancer cells. *Tropical Life Sciences Research*, 31: 69.
- Zhang, B., Pan, X., Cox, S., Cobb, G. and Anderson, T.** (2006). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63: 246-254.
- Zhang, S., Wu, Y., Huang, X., Wu, W., Lyu, L. and Li, W.** (2022). Research progress about microRNAs involved in plant secondary metabolism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 216: 820-829.