



ISSN: 2676-7309



Lorestan University

Bioinformatic Identification of miRNA and Expression Analysis of Some miRNA Target Genes in Response to Corms Infected With *Fusarium oxysporum*

Atefeh Seyfifar | Farhad Nazarian-Firouzabadi* | Mitra Khademi

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

*Corresponding author ✉: nazarian.f@lu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received: April 13, 2025;
Received in revised form: May 23, 2025;
Accepted: May 30, 2025;
Available online: June 30, 2025

Keywords:
Pathogen,
Saffron transcriptome,
Sequencing,
Biological data processing,
miRNA

ABSTRACT

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a triploid ($2n = 3x = 24$) and self-incompatible; it is unable to produce seeds and hence propagates exclusively through corms. Since corms remain in the field soil for several years, various diseases, including saffron corm rot, cause significant reductions in yield and quality. MicroRNAs (miRNAs), small non-coding RNA molecules, play an important role in regulating plant responses to pathogens. In this study, a computational approach was applied using BLASTx to compare the transcriptome of saffron corms infected with *Fusarium oxysporum* against the miRBase database, to identify miRNAs and their target genes. Fourteen miRNAs were identified, among which three miRNAs including miR160, miR393, and miR11108 showed significant differential expression. Functional analysis indicated that the target genes of miR160 are involved in key metabolic processes, including carbohydrate biosynthesis, stomatal opening and closure, drought response, biotic stress response, and phytohormone transport. Expression analysis further revealed that the genes *Mpg1*, *RabE1c*, and *AbcG* were differentially regulated upon infection with *F. oxysporum*. Among these, *Mpg1* and *AbcG* showed the highest and the lowest expression after infection, respectively. Overall, the findings demonstrate that target genes of regulatory miRNAs in the saffron transcriptome undergo expression changes in response to corm rot disease. These results provide valuable insights that may support breeding strategies aimed at developing resistance to saffron corm rot.



Cite this article: Seyfifar, A., Nazarian-Firouzabadi, F. and Khademi, M. (2025). Bioinformatic identification of miRNA and expression analysis of some miRNA target genes in response to corms infected with *Fusarium oxysporum*. *Plant Genetic Research*, 12(1): 167-182.

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2066027.1006>



© Author(s) retain the copyright.

Homepage: <https://www.pgr.lu.ac.ir> | Publisher: Lorestan University

Introduction

Saffron (*Crocus sativus* L.), a sterile triploid ($2n = 3x = 24$) of the Iridaceae family, is among the most valuable medicinal and aromatic crops worldwide. Cultivated mainly in arid and semi-arid regions of Iran and beyond, its economic importance derives from the stigmas that produce the spice. Propagation depends exclusively on corms due to the species' self-incompatibility and triploid nature, which preclude seed formation. Since corms remain in the field soil for several years, they are highly susceptible to soil-borne diseases, with *Fusarium oxysporum* induced corm rot being the most destructive, severely reducing yield and quality. MicroRNAs (miRNAs), small endogenous non-coding RNAs (20–24 nt), have emerged as crucial regulators in plant-pathogen interactions. Through mRNA cleavage or translational inhibition, miRNAs fine-tune resistance (R) genes, transcription factors, and hormone signaling pathways, thereby coordinating multilayered defense networks that shape the outcome of infection.

Materials and Methods

In this study, the transcriptome of saffron corms infected with *Fusarium oxysporum* was analyzed to identify and characterize microRNAs (miRNAs) and their target genes. Conserved miRNAs were predicted from mature miRNA sequences of saffron using publicly available databases transcriptome data generated by our Biotechnology Laboratory. Bioinformatics pipelines were applied to predict and analyze candidate miRNAs and their putative targets. Key target genes were then identified, and their expression levels were validated and compared through quantitative real-time PCR (qPCR).

Results and Discussion

Comprehensive transcriptomic analysis identified 69 conserved miRNAs in the saffron corm transcriptome. Comparative expression profiling between infected and healthy samples revealed that 14 of these miRNAs were significantly differentially expressed (DEGs), suggesting their involvement in the host immune response. Notably, three miRNAs displayed highly pronounced expression changes, indicating their potential role as key regulators in defense against *Fusarium*. Bioinformatic prediction and functional annotation of DEGs miRNAs target genes indicated roles in diverse biological processes, including carbohydrate biosynthesis and metabolism, regulation of stomatal closure, responses to abiotic stresses such as drought, general biotic stress responses, and phytohormone transport and signaling pathways involving jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) pathways. qRT-PCR validation further supported the regulatory roles of these miRNAs. Expression analysis of three key target genes including *Mpg1*, *RabE1c*, and *AbcG* revealed marked transcriptional changes following infection. *Mpg1*, associated with fungal penetration and plant recognition, showed the strongest upregulation, suggesting an active defensive response. *RabE1c*, a small GTPase linked to vesicle trafficking and hormone-mediated signaling, was also significantly modulated. In contrast, *AbcG*, an ATP-binding transporter implicated in antimicrobial compound transport, displayed the weakest induction, possibly reflecting pathogen-mediated suppression or temporal regulation. Together, these findings highlight a complex miRNA-mediated regulatory network that fine-tunes the expression of defense-related genes, enabling saffron to mount an effective response against *Fusarium oxysporum*.

Conclusions

In conclusion, this study presents the first comprehensive analysis of miRNAs involved in the defense response of saffron corms against corm rot caused by *F. oxysporum*. We identified a set of DEG miRNAs and functionally characterized their target genes, highlighting their central roles in critical defense pathways. The validated expression changes in *Mpg1*, *RabE1c*, and *AbcG* emphasize the importance of post-transcriptional regulation in saffron immunity. Collectively, these findings provide new insights into the molecular basis of saffron's defense mechanisms and establish a valuable foundation of miRNA-based genetic resources.

Author Contributions

Atefeh Seyfifar performed the experiments. Farhad Nazarian-Firouzabadi designed the experiments, supervised the thesis, and wrote and revised the final manuscript. Mitra Khademi drafted the original manuscript and contributed to performing several experiments.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors would like to thank anonymous reviewers their valuable suggestions, which greatly improved the quality of this manuscript.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Funding

No funding was received for this study.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

شناسایی بیوانفورماتیکی miRNA و بررسی بیان برخی از ژن‌های هدف آن‌ها در پاسخ به عامل بیماری

پوسیدگی بنه زعفران *Fusarium oxysporum*

عاطفه سیفی فر^{ID} | فرهاد نظریان فیروزآبادی*^{ID} | میترا خادمی^{ID}

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

چکیده

اطلاعات مقاله

زعفران (*Crocus sativus* L.) یک گیاه تریپلوئید ($2n=3x=24$) است که به دلیل خودناسازگاری قادر به تولید بذر نیست و تکثیر آن از طریق بنه انجام می‌شود. به دلیل ماندگاری چندین سال بنه‌ها در خاک، بیماری‌های متعددی از جمله پوسیدگی بنه زعفران باعث کاهش عملکرد و کیفیت آن می‌شود. ریز RNAها (miRNAs)، مولکول‌های RNA کوچک غیرکدکننده‌ای هستند که نقش مهمی در تنظیم پاسخ گیاه به بیمارگرها ایفا می‌کنند. در این مطالعه، با به‌کارگیری رویکرد محاسباتی مبتنی و با استفاده از ابزار Blastx، همسانی‌های ترنسکرپتوم بنه‌های آلوده به بیمارگر *Fusarium oxysporum* در برابر پایگاه داده miRBase جستجو شد تا ریز RNAها و ژن‌های هدف آن‌ها شناسایی شوند. از میان، تعداد ۱۴ ریز RNA شناسایی شده، سه ریز RNA، miR160، miR393 و miR11108 دارای بیان افتراقی معنی‌دار بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن‌های هدف miR160، در فرآیندهای متابولیکی مهمی از جمله بیوسنتز کربوهیدرات‌ها، باز و بسته شدن روزنه‌ها، پاسخ به تنش خشکی، پاسخ به تنش‌های زیستی و نقل و انتقال فیتوهورمون‌ها نقش دارند. نتایج بررسی بیان این ژن‌ها نشان داد که ژن‌های *RabE1c*، *Mpg1* و *AbcG* در اثر آلودگی با قارچ *F. oxysporum* تغییر بیان نشان دادند. ژن *Mpg1* بالاترین و ژن *AbcG* کمترین بیان را پس از آلودگی به بیمارگر نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن‌های هدف ریز RNA تنظیم‌کننده در ترنسکرپتوم زعفران تحت تأثیر بیماری پوسیدگی بنه، تغییر بیان نشان می‌دهند. یافته‌های این پژوهش می‌تواند در انتخاب روش‌های به‌ترتیب برای مقابله با بیماری پوسیدگی بنه زعفران مفید باشد.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

بیمارگر،

ترنسکرپتوم زعفران،

توالی‌یابی،

ریز RNA

داده‌پردازی زیستی

مقدمه

همچون خوابیدگی بوته، مرگ گیاهچه، زردی و پژمردگی ساقه و پوسیدگی بنه را از خود نشان می‌دهند (Abedi et al., 2021; Joshi, 2018; Nürnberger and Kemmerling, 2006; Steinkellner et al., 2008). اگر چه اخیراً تعداد زیادی از ژن‌های پاسخ دهنده به بیمارگر فوزاریوم در زعفران شناسایی شده‌اند که در فرآیندهای متابولیکی و بیوستز متابولیت‌های ثانویه نقش دارند، اما مطالعات بسیاری محدودی در مورد ریز RNA پاسخ دهنده به این بیمارگر در زعفران گزارش شده است.

ریز RNA، در واقع RNAs کوچک ۱۹ تا ۲۴ نوکلئوتیدی هستند که در تنظیم بیان ژن‌های هدف خود در سطح رونویسی و یا پس از رونویسی نقش دارند (Jodder, 2020; Yu and Wang, 2020). به‌طور کلی، تنظیم ژن‌های هدف توسط این مولکول‌های کوچک از طریق دو مکانیسم اصلی برش مستقیم mRNA ژن هدف و مهار فرآیند ترجمه ژن‌های اصلی انجام می‌شود (Dong et al., 2022; Pal, 2001; Bhadra et al., 2002; Sijen et al., 2001). تاکنون، بیش از ۴۰۰۰ مولکول ریز RNA در پایگاه داده‌های miRBase (<http://www.mirbase.org>) ثبت شده است. ریز RNA های متعددی از ۴۳ گونه مختلف گیاهی با استفاده از روش‌های محاسباتی (مانند تحلیل ژنوم مقایسه‌ای) و روش‌های تجربی (از جمله همسانسازی مستقیم و توالی‌یابی عمیق) شناسایی شده‌اند (Addo-Quaye et al., 2008). شواهد علمی نشان می‌دهند که ریز RNAها نقش‌های کلیدی در حفظ هموستازی مواد مغذی گیاه و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی محیطی ایفا می‌کنند (Jodder, 2020; Yu and Wang, 2020). علاوه بر این، ریز RNAها با مداخله در شبکه‌های تنظیمی پیچیده، بر فرآیندهای بیولوژیکی و متابولیکی از جمله زمان‌بندی رشد، نمو و تکامل بافت، و نگهداری و تمایز سلول‌های بنیادی تأثیر می‌گذارند (Jodder, 2020; Yu and Wang, 2020). پارک و همکاران (Park et al., 2002)، برای اولین بار نقش ریز RNAهای گیاهی را در گیاه آراییدوپسیس مورد بررسی قرار دادند. سپس مطالعات متعددی با به‌کارگیری روش‌های

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی تریپلوئید ($2n=3x=24$)، عقیم، چندساله و متعلق به خانواده زنبق‌ها (*Iridaceae*) است که در آب و هوای مدیترانه‌ای، غرب آسیا و همچنین در مناطق خشک ایران با زمستان‌های سرد و تابستان‌های گرم رشد می‌کند (Golmohammadi, 2014). از نظر گیاه‌شناسی، قسمت خوراکی و ارزشمند گیاه زعفران، کلاله سه شاخه و سرخ رنگ آن می‌باشد که به دلیل برخورداری از ترکیبات ارزشمند و خواص منحصر به فرد دارویی - غذایی به طلای سرخ معروف است (Grilli-Caiola, 2004). زعفران حاوی ترکیبات زیست‌فعال ارزشمندی از جمله کروسین، پیکروکروسین و سافرانال است که به ترتیب عامل رنگ، طعم و عطر متمایز آن می‌باشند. مطالعات متعددی، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدافسردگی این ترکیبات را تأیید کرده‌اند (Frusciante et al., 2021; Mentis et al., 2014; al., 2014). گیاه زعفران دارای یک ساقه زیرزمینی و پیاز توپر به نام بنه است و تکثیر آن به دلیل عقیم بودن، فقط به وسیله کشت بنه و ایجاد بنه دختری از بنه مادری صورت می‌گیرد (Bhagat et al., 2022; Mansotra et al., 2023). بیش از ۸۹ درصد سطح زیر کشت زعفران دنیا به ایران تعلق دارد، اما میانگین عملکرد این محصول در ایران در مقایسه با سایر کشورهای تولید کننده، بسیار پایین است (Dehbashi et al., 2022). بیمارگرهای گیاهی از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده تولید زعفران محسوب می‌شوند و در بین این عوامل، قارچ‌های خاکزی از اهمیت زیادی برخوردارند. برای مثال، بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *Gladioli* (Gupta et al., 2021). بیماری پژمردگی فوزاریومی بنه زعفران که باعث کاهش شدید عملکرد این محصول می‌شود، به نام‌های مختلف دیگری مانند، پوسیدگی خشک و پوسیدگی قهوه‌ای معروف است. علائم اصلی این بیماری در طول دوره گلدهی بروز می‌کند (Abedi et al., 2021; Joshi, 2018; Nürnberger and Kemmerling, 2006; Steinkellner et al., 2008). گیاهان آلوده نشانه‌هایی

بیوانفورماتیکی برای شناسایی ریزRNAها در سایر گیاهان صورت گرفت. در همین راستا، یو و همکاران (Yu et al., 2015) نشان دادند که پروتئین فاکتور رونویسی SPL9، یکی از اهداف یک ریز RNA به نام miR156 است که مستقیم به پیشبر یک ژن کدکننده پروتئین ترین سنتاز متصل (Terpene synthases) شده و رونویسی آن را به طور مثبت تنظیم می‌کند و به این ترتیب منجر به تنظیم مثبت سنتز پروتئین سسکوئنی ترین (Sesquiterpene) می‌شود. بعضی از اعضای خانواده‌ی miR394 بیان ژن‌های F-box و P450 را کنترل می‌کنند بر روی رشد و نمو و پاسخ به بیماری‌ها نقش دارند (Chand et al., 2016). برای مثال، افزایش بیان miR394 در گیاه سیر سبب کاهش بیان ژن‌های F-box و P450 و افزایش مقاومت علیه بیماری‌گر *Fusarium oxysporum f. sp. cepae* شد (Chand et al., 2016).

در حال حاضر، ژنوم مرجع زعفران در دسترس نیست و بیشتر مطالعات به کمک پژوهش‌ها و راهکارهای مبتنی بر آمیک صورت می‌گیرد (Sohrabi et al., 2020). در همین راستا، در پژوهش حاضر، برای اولین بار به مطالعه جامع ریز RNAهای محافظت شده در داده‌های ترنسکریپتومی گیاه زعفران پرداخته شد. هدف از این مطالعه، شناسایی ریز RNAها جدید در گیاه زعفران و بررسی بیان برخی از ژن‌های هدف آن‌ها با تأکید بر نقش تنظیمی‌شان در مقاومت به بیماری فوزاریوم بنه زعفران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پردازش داده‌های خام: در این مطالعه از داده‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکریپتوم بنه زعفران آلوده به *F. oxysporum* با کد دسترسی PRJNA866873 (Luo et al., 2023) و همچنین داده‌های حاصل از مطالعه درویشیان و همکاران (Darvishian et al., 2025) استفاده شد. به منظور بررسی کیفیت خوانش‌های خام از نرم‌افزار FastQC (نسخه ۰/۱۱/۶) استفاده شد. برای انجام فرآیند پردازش (تریمینگ) شامل حذف توالی آداپتور باقی‌مانده در توالی‌های موجود، توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phred score کمتر از ۳۰)، توالی‌های با میزان بالای

نوکلئوتیدهای خوانش نشده (N) و توالی‌های با اندازه کمتر از ۱۰۰ جفت باز از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۰) استفاده شد. سرهم‌بندی (اسمبلی) خوانش‌های تمیز شده (clean reads) با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۰) بر اساس پارامترهای پیش فرض انجام شد.

شناسایی ریزRNAهای حفاظت شده: پس از مرحله سرهم‌بندی نوپدید و حذف رونوشت‌های تکراری با استفاده از نرم‌افزار CD-HIT-EST، رونوشت‌های حاصل به‌عنوان منبعی برای شناسایی ریز RNAها حفاظت شده استفاده شدند. به این منظور، توالی ریز RNAهای بالغ ثبت شده در پایگاه miRbase دریافت شدند. برای شناسایی رونوشت‌هایی با بیشترین شباهت با توالی ریز RNAهای بالغ از ابزار BLASTn با پارامترهای E-value ≤ 10 و mismatch < 4 استفاده شد. آستانه طول ریز RNAها بالقوه بین ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید تعیین گردید. در نهایت برای تعیین توالی‌های غیرمزمگذار از ابزار BLASTx و پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری (Non-redundant protein: NR) استفاده شد.

پیش‌بینی ساختار دوم ریزRNAها: شباهت بالای یک رونوشت با توالی ریز RNAها بالغ به‌تنهایی دلیل کافی بر صحت شناسایی دقیق یک ریز RNA نمی‌باشد. به‌همین منظور در این پژوهش پارامترهای همچون ساختار دوم با تاخوردگی مناسب شامل ساختار ساقه حلقه، وجود توالی ریز RNA بالغ در یک بازو در ناحیه ساقه، عدم شکستگی در حلقه ساختار ریز RNAها، حداکثر ۶ جفت نوکلئوتید غیرمنطبق در ساختار ریز RNA محتوای ۳۰ تا ۷۰ درصدی بازهای آدنین و اوراسیل (AU)، حداکثر اندازه گپ در ساختار ریز RNA و حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy: MFE)، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی تصحیح شده (Adjusted minimal free energy: AMFE)، میزان شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (Minimal free energy index: MFEI)، حداقل انرژی آزاد تاخوردگی (ΔG) و درصد بازهای گوانین و

نمونه‌برداری از بافت بنه‌ها انجام شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی آغازگرها: جهت بررسی بیان ژن‌های هدف ریز RNAها از بنه‌های زعفران تلقیح شده با بیمارگر به همراه بنه‌های عاری از آلودگی به عنوان شاهد، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA صورت گرفت. برای استخراج RNA از کیت ترایزول (شرکت NEB به شماره T2010S) و مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتوفوتومتری (Eppendorf D30) صورت گرفت. به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی موجود در نمونه‌ها، از آنزیم DNase I استفاده شد. جهت سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت سیناکلون (Cat:No:RT5201) مطابق با شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد.

به‌منظور طراحی آغازگرها، ابتدا توالی ناحیه کدکننده ژن‌های انتخاب شده از فایل اسمبلی استخراج و سپس به منظور طراحی آغازگرها برای تکثیر بخشی از ژن‌های مذکور از نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶) استفاده شد. مشخصات آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد

استفاده در واکنش qRT-PCR

Table 1. Name, sequence and annealing temperature of primers used in qRT-PCR reactions

Primer	توالی آغازگر (3' → 5')	طول قطعه دمای تکثیری اتصال (جفت‌باز) (°C)	
		Ta	Amplicon size (bp)
Mpg1	F:TAGTGATGATGGATGAGGAG R:TTCTATCGTTCGCAATTCG	53.7	180
RabE1c	F:TTGGGTCAATATCTGGGATG R:GGAATCGCCGCTTGTG	53	175
AbcG	F:TCCGCATTCTACGCAATC R:TGAAGCCAATCCATACAAGG	54.1	126
elf1-a	F:TGAACCATCCAGGACAGATTG R:TCTTAACCATACCAGCATCACC	57	171

سیتوزین (GC%) با استفاده از وب سرور miRNA-dis طبق روابط زیر محاسبه و بررسی شدند.

$MFE = -\Delta G$ (kcal/mol); $AMFE = (MFE \div miRNA \text{ sequence length} \times 100)$; $MFEI = AMFE \div (\%GC)$
از ریز RNAها با $MFEI \leq -0.8$ kcal/mol برای افزایش دقت در فیلتر و شناسایی ریز RNAها بالقوه استفاده شد (Xie et al., 2005; Padmashree and Ramachandraswamy, 2016).

شناسایی ژن‌های هدف ریز RNAها: به‌منظور پیش‌بینی ژن‌های هدف ریز RNA از وب سایت psRNATarget آدرس <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget> استفاده شد. این ابزار بر اساس محاسبه میزان جفت‌شوندگی توالی‌های ریز RNA و توالی هدف، تحلیل ساختار ثانویه و محاسبه قابلیت اتصال این دو توالی، ساختار ثانویه و محاسبه قابلیت اتصال این دو توالی، ژن‌های هدف را پیش‌بینی می‌کند. مستندسازی عملکرد ژن‌های هدف ریز RNAها با استفاده از ابزار BLASTx و پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری (NR) با $E \leq 1.0 \times 10^{-5}$ انجام شد.

تهیه و ضدعفونی بنه‌ها زعفران: بنه‌های زعفران از مزارع کشت زعفران در مشهد تهیه و سپس ضدعفونی شدند. بدین منظور ابتدا بنه‌ها به مدت یک دقیقه در محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون، شستشو شدند و پس از آن بنه‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرتبه با مقدار کافی آب مقطر شستشو داده شدند.

مایه‌زنی بنه‌های زعفران با فوزاریوم: از جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* ۱۰^۶ اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی بنه‌ها استفاده شد. به‌منظور اعمال تیمار، ابتدا با استفاده از نوک یک سوزن استریل، منافذی برای تلقیح سوسپانسیون قارچ ایجاد و سپس مقدار پنج میکرولیتر از محلول سوسپانسیون قارچ توسط سرنگ به بنه‌ها تزریق شد. شایان ذکر است در نمونه‌های شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. بنه‌های گروه تیمار و شاهد در سه تکرار جداگانه در ظروف شیشه‌ای قرار داده شدند و سپس در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان‌های ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار

بررسی الگوی بیان ژن‌های هدف: بررسی بیان ژن‌های منتخب، به کمک روش qRT-PCR و با استفاده از کیت SinaSYBR Blue IIS-qPCRMix (2x) شرکت سیناکلون صورت گرفت. ترکیب و مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط آماده Master Mix (2x) PCR، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت هر یک با غلظت ۱۰ پیکومول، هشت میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۲/۵ میکرولیتر cDNA بود. واکنش‌ها در دستگاه Rotor-Gene Q شرکت Qiagen انجام گرفت. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن‌ها شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به الگو به مدت ۲۰ ثانیه (دمای این مرحله از چرخه بسته به ترکیب آغازگر بر اساس جدول ۱ و برای هر جفت آغازگر متغیر بود) و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در این آزمایش ژن کنترل داخلی *elf1-α* جهت نرمال‌سازی مقادیر بیان ژن‌ها استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001). این آزمایش در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی انجام گردید. بررسی کارایی آغازگرها و تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش به ترتیب با استفاده از نرم افزار LinRegPCR و Microsoft Excel (نسخه ۲۰۲۰) انجام شد.

نتایج و بحث

به منظور سرهم‌بندی خوانش‌ها و تهیه یک سرهم‌بندی De novo، خوانش‌هایی با کیفیت پایین همراه توالی‌های آدپتور حذف شدند. در نتیجه، آماده‌سازی فایل ترنسکرپتوم سرهم شده بر اساس تلفیق خوانش‌های با کیفیت بالا صورت گرفت. نتایج این قسمت از مطالعه منجر به شناسایی تعداد ۶۳۳۲۶ توالی در ترنسکرپتوم بنه زعفران گردید حجم کل پروفایل بیانی در حدود ۶۴/۶۵ Mb بود. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که شاخص N50 آن دارای طولی برابر یا بیشتر از ۱۴۱۳ جفت‌باز بود.

شناسایی ریز RNA در ترنسکرپتوم بنه زعفران: از توالی‌های ترنسکرپتومی به‌عنوان بخشی از توالی ژن‌های بیان شونده برای شناسایی و بررسی بیان ریز RNA با استفاده از روش‌های محاسباتی در گیاهانی از جمله آراییدوپسیس، ذرت

و برنج استفاده شده است (Zhang et al., 2006). از آنجا که اکثر ریز RNAها گیاهی حفظ شده هستند، شناسایی از طریق همسانی کمک مؤثری در پیدا کردن ریز RNAها می‌کند. عملیات شناسایی از طریق هم‌ردیفی ریز RNAها شناخته شده با توالی خوانش‌ها انجام می‌گیرد. بررسی ساختار ثانویه ریز RNAها حفظ شده بالقوه با MFEI کمتر از ۰/۸- و انجام BLASTn علیه توالی‌های موجود در پایگاه‌های داده مربوط و همچنین تمام ریز RNAهای بالغ ثبت‌شده در پایگاه miRbase منجر به شناسایی تعداد ۶۹ توالی حفاظت‌شده شد. با انجام BLASTx برای شناسایی و حذف توالی‌های کدکننده پروتئین، در نهایت تعداد ۱۴ ریز RNA شناسایی شدند. از بین این ۱۴ ریز RNA با بیان افتراقی، ۳ ریز RNA برای مطالعه بیشتر بر اساس شواهد تجربی انتخاب شدند (جدول ۲). نتایج حاصل از بیان افتراقی، منجر به تأیید سه ریز RNA جدید شد که به نظر می‌رسید در جریان آلودگی بنه به قارچ فوزاریوم نقش داشته باشند.

بر اساس نتایج به‌دست آمده کمترین میزان انرژی (MFE) برابر با ۸/۸ و بیشترین آن ۴۸۷ می‌باشد. پیش‌سازهای ریز RNAها بایستی بالاترین انرژی MFE و کمترین انرژی MFEI را برای تشکیل ساختار ثانویه نسبت به ریز RNAها و سایر RNAهای غیرکدکننده داشته باشند (Bonnet et al., 2004). در نتایج این مطالعه، بالاترین انرژی (MFEI) برابر با ۱/۱۵ و کمترین آن ۰/۳۷ می‌باشد. مقادیر به‌دست آمده شاخص MFEI در مقایسه با tRNA (-۰/۶۴)، rRNA (-۰/۵۹) و mRNA (-۰/۶۶) کمتر بود که نشان می‌دهد پیش‌ساز ریز RNAها شناسایی شده ریز RNAها واقعی هستند. بیشترین و کمترین طول پیش‌سازهای ریز RNAها به ترتیب ۲۴ و ۱۹ نوکلئوتید در miR6117 و miR11592 مشاهده شد. مطالعه پروفایل بیانی بنه‌های زعفران آلوده به بیمارگر فوزاریومی توسط لیو و همکاران (Luo et al., 2023) به‌منظور شناسایی ژن‌های درگیر در پاسخ به این بیمارگر قارچی در سه و شش روز پس از آلودگی به بیمارگر انجام شد. نتایج این مطالعه منجر به شناسایی تعداد ۸۴۵۴۴ یونی ژن و مستندسازی ۳۹۹۶۲ ژن گردید که از این میان تعداد ۱۴۲۶۳ ژن در روز سوم و تعداد ۱۶۳۹۷ ژن در روز ششم پس از آلودگی، بیان افتراقی داشتند (Luo et al., 2023). همچنین نتایج مطالعه مذکور حاکی از آن است که

در شکل ۱ نمونه‌ای از ساختار ثانویه پیش‌ساز تعدادی از ریزRNAها شناسایی شده در گیاه زعفران نشان داده شده است. بخش‌های ریزRNA و مکمل آن‌ها در تصویر با رنگ بنفش مشخص شده است. همانطوری که مشاهده می‌شود پیش‌سازهای lamiRNA (Pre-miRNA) دارای ساختار ثانویه سنجاق سری هستند. همچنین، محتوای نوکلئوتیدهای AU در این پیش‌ساز در مقایسه با محتوای GC بالاتر است. ساختار ثانویه ریزRNAهای شناسایی شده با هشت معیار اجباری شناسایی ریزRNAها در گیاهان مطابقت داشت (Farhadi et al., 2023).

شناسایی ریزRNAها با بیان افتراقی در بنه زعفران: از بین ۱۴ مولکول ریزRNAها شناسایی شده مندرج در جدول ۲، تنها ۳ توالی ریزRNAها دارای بیان افتراقی در بنه‌های سالم و آلوده بودند (جدول ۳). همانطوری که در این جدول مشاهده می‌شود، ریزRNAها شناسایی شده در بنه زعفران با ریزRNAها شناسایی شده در گیاهان گندم‌نیا (*Aegilops ovata*)، آمبروسیا (*Ambrosia artemisiifolia*) و آهوماش ژاپنی (*Lotus japonicus*) همولوگ هستند.

بنه زعفران پس از آلودگی مسیر بیوسنتز متابولیک فنیل پروپانوئید را فعال کرده و باعث تقویت دیواره سلولی و سنتز فنل‌ها و فلاونوئیدها شد که در نتیجه آن رشد قارچ مهار گردید (Luo et al., 2023).

در مطالعه‌های دیگر، توسط طاهری-دهکردی و همکاران (Taheri-Dehkordi et al., 2021) به شناسایی و بررسی تعداد ژن‌های هدف ریزRNA در مسیر متابولیک پروپانوئید در زعفران پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تعداد ۶۶ مولکول ریزRNAها متعلق به ۱۹ خانواده مختلف شناسایی شد که ۲۸۸۰ ژن هدف از جمله چندین فاکتور رونویسی موثر در مرحله گذر به گل‌دهی را تنظیم می‌کنند (Taheri-Dehkordi et al., 2021). این نتایج بیانگر یک سازکار تنظیم پس از رونویسی منحصر به فرد در زعفران است (Taheri-Dehkordi et al., 2021). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، پروفایل بیانی ایجاد شده از نظر حجم و تعداد رونوشت مطابقت بالایی با دیگر پروفایل بیانی گزارش شده زعفران دارد (Luo et al., 2023; Taheri-Dehkordi et al., 2021).

جدول ۲- مشخصات ریزRNAها شناسایی شده در ترنسکرپتوم بنه زعفران.

Table 2. Characteristics of miRNAs identified in the saffron corm transcriptome

Name	miR_seq توالی ریزRNAها 5'-3'	E-value ارزش	AU(%) درصد AU	GC(%) درصد GC	MFE حداقل	AMFE انرژی آزاد تاخوردگی انرژی آزاد تصحیح تاخوردگی شده	MFEI شاخص حداقل انرژی آزاد تاخوردگی
Cs-miR393	UUGGACUGAAGGAGCUCCCU	1.29E-05	55.93	44.07	29.8	50.51	1.15
Cs-miR160	UGGCAUACAGGAGCACGCGA	4.89E-05	46.34	53.66	48.7	59.39	1.11
Cs-miR319	UUGGACUGAAGGAGCUCCCU	4.89E-05	41.18	58.82	19.7	38.63	0.66
Cs-miR7829	ACACAGAAACUCCAAGCCACC	0.000186	64.38	35.62	17.2	23.56	0.66
Cs-miR11108	ACAUUGGAGAUAGUGAGUUGG	0.000703	65.00	35.00	24	30.00	0.86
Cs-miR399	UGCCAAAAGAAUUUGCCUG	0.000704	60.47	39.53	8.8	20.47	0.52
Cs-miR6117	GGUUAGGUUGAUCGGGUUGAAGAC	0.001	48.08	51.92	12.6	24.23	0.47
Cs-miR482	UCUUGCCUACUCCUCCAUU	0.002	52.75	47.25	23.6	25.93	0.55
Cs-miR11592	GAACCGACCCGAACCGAAA	0.002	48.78	51.22	21.1	51.46	1.00
Cs-miR414	UCAUCUUAUCAUCAUCGUCA	0.003	55.70	44.30	20.4	25.82	0.58
Cs-miR3630	UGUGGGAAUCCUCCUGAUGCUU	0.003	61.67	38.33	20.9	34.83	0.91
Cs-miR5240	ACCUGGCUCUGAUACCAUJACC	0.003	50.00	50.00	14.3	26.48	0.53
Cs-miR7124	CACCAAUAUCCAACUUUAUUUG	0.003	59.74	40.26	11.6	15.06	0.37

MFE: Minimum Free Energy, AMFE: Corrected Minimum Free Energy, and MFEI: Minimum Free Energy Index

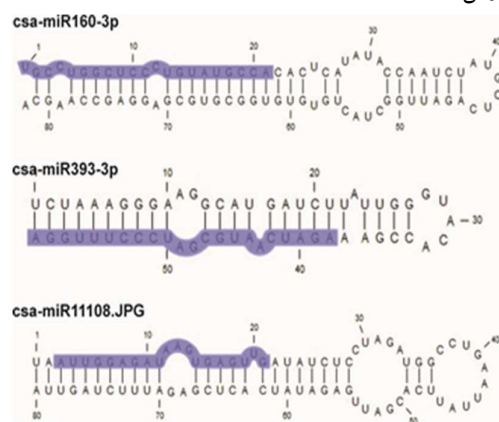
جدول ۳- مشخصات ریز RNAها شناسایی شده در ترنسکرپتوم بنه زعفران با بیان افتراقی

Table 3. Characteristics of miRNAs identified in the saffron corm transcriptome with differential expression

Name	نزدیکترین گونه همولوگ	کد کانتینگ
نام	Closest homolog species	Contig code
Cs-miR393	<i>Aegilops ovata</i>	Trinity_out_dir.trinity_conting_47658
Cs-miR160	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Trinity_out_dir.trinity_conting_47803
Cs-miR11108	<i>Lotus japonicus</i>	Trinity_out_dir.trinity_conting_3217

شناسایی ژن‌های هدف ریز RNAها: بررسی ژن‌های هدف Cs-miR160-3p نشان داد که در مجموع ۳ ژن توسط این ریز RNAها شناسایی شده در ترنسکرپتوم زعفران، تنظیم می‌شوند که متعلق به چندین خانواده ژنی با عملکردهای زیستی متفاوت هستند. مشخصات تعدادی از ژن‌های هدف برای ریز RNAهای در جدول ۴ آورده شده است. با توجه به نتایج هستی شناسی ژن‌های هدف Cs-miR160-3p، ژن‌های هدف شناسایی شده در اغلب فرآیندهای زیستی و متابولیسی همچون بیوسنتز کربوهیدرات‌ها، باز و بسته شدن روزنه‌ها و پاسخ به تنش خشکی و پاسخ به تنش‌های زیستی و نقل و انتقال فیتوهورمون‌ها نقش مهمی ایفا می‌کنند. از جمله ژن‌های هدفی که برای این ریز RNAها شناسایی شدند، می‌توان به پروتئین‌های کوچک متصل شونده به GTP مربوط به RasRabE1c و برخی پروتئین‌های ABC اشاره کرد. در مطالعه‌ای مشابه، زیتی و همکاران (Zinati et al., 2016) به شناسایی و بررسی نقش ریز RNAها در تنظیم مسیر بیوسنتز کاروتنوئید/آپوکاروتنوئیدها در گیاه زعفران پرداختند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که miRNA414 و miRNA837-5b با هدف قرار دادن شش عامل رونویسی و یک پروتئین کیناز در مسیر بیوسنتز کاروتنوئید/آپوکاروتنوئید دخیل هستند. ژن‌های کاندید شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند مبنایی برای طراحی راهکارهای مهندسی متابولیک به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند در این گیاه فراهم نمایند (Zinati et al., 2016). مقایسه مطالعه حاضر و سایر مطالعات قبلی نشان می‌دهند که ریز RNAها، بیان ژن را از طریق جفت شدن کامل یا تقریباً کامل با ژن‌های ژن‌های هدفشان و تخریب یا سرکوب کردن آن‌ها انجام می‌دهند. ریز RNAهای گیاهی، درجه بالای از جفت شدن با اهدافشان نشان می‌دهند که این امر، پیشگویی ژن‌های هدف آن‌ها را ممکن می‌سازد (Devi et al., 2016).

ساختار دوم پیش‌سازهای سه ریز RNAها کاندید متمایز در نرم‌افزار Bedtools ترسیم شد (شکل ۱). همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بخش بالغ ریز RNAهای گیاه زعفران در پیش‌ساز ریز RNAها قرار گرفته‌اند که یکی از شروط اساسی در ترسیم ساختار ثانویه در Bedtools است می‌باشد. نتایج نشان داد که باز یوراسیل به عنوان باز غالب در موقعیت ۵' قسمت بالغ ریز RNAها بود که با یافته‌های مطالعات پیشین مطابقت دارد. در همه ریز RNAهای پیش‌بینی شده، درصد بالای نوکلئوتیدهای آدینین و یوراسیل (A+U) که غنی از پیوند هیدروژنی هستند، منجر به پایداری و ثبات ساختارهای پیش‌ساز ریز RNAها می‌شوند. همچنین یک دامنه وسیع از طول پیش‌ساز ریز RNAها مشاهده شد که این تنوع در طول پیش‌ساز ریز RNAها در مطالعات قبلی توسط طاهری-دهکردی و همکاران (Taheri-Dehkordi et al., 2021) نیز گزارش شده است.



شکل ۱- ساختار ثانویه پیش‌ساز ریز RNAهای شناسایی شده در بنه زعفران. توالی ریز RNAها بالغ با رنگ بنفش مشخص شده است

Figure 1. Secondary structure of the precursor miRNAs identified in saffron corm. The mature miRNA sequence is highlighted in purple

miR319-3p و miR396B-3p) در روزهای یک، دو، سه و هفت روز بعد از تلقیح بیان افتراقی داشتند (Joshi *et al.*, 2025). در همین راستا و در مطالعه‌ی دیگری، فریرا و همکاران (Ferreira *et al.*, 2025) با هدف شناسایی ریزRNAها حفاظت شده در گیاه آرابیدوپسیس علیه بیمارگر *Fusarium graminearum* در بازه زمانی سه و چهار روز بعد از تلقیح پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که از مجموع ۴۲۸ تعداد ریزRNAها شناسایی شده تعداد ۹۳ مولکول ریزRNA بیان افتراقی داشتند که از این میان تعداد ۵۳ مولکول ریزRNA دارای بیان افزایشی و تعداد ۴۰ مولکول ریزRNA بیان کاهش‌ی نشان دادند (Ferreira *et al.*, 2025). همچنین نتایج این مطالعه یاد شده نشان داد که در هر دو بازه زمانی پس از تلقیح با بیمارگر بیماری‌زا، تعداد ۵۳ مولکول ریزRNA بیان افتراقی داشتند. بیشترین میزان بیان ریزRNA در miR842، miR855، miR834، miR165a، miR5028، miR397b، miR5651، miR3434، miR5648، miR398a، miR839، miR866 و miR3933 مشاهده شد. ژن‌های هدف این ریزRNAها، بیشتر در مراحل رشد و نمو گیاه، کنترل فرآیندهای مختلف گیاه، بیوسنتز لیگنین، توپولین، ریتم شبانه روزی، پاسخ به آبسزیک اسید، پاسخ دمای و مرگ برنامه ریزی شده سلول دخالت دارند (Ferreira *et al.*, 2025). نتایج مطالعه مذکور نشان می‌دهد که در مراحل اولیه آلودگی با بیمارگر، گیاهان آرابیدوپسیس با تغییر بیان برخی از ریزRNAها و از طریق تشکیل کمپلکس‌های برهم‌کنشی، بیان پروتئین‌های موثر در مهار نفوذ بیمارگر به بافت گیاهی را تنظیم می‌کنند. این مکانیسم، منجر بروز پاسخ فوق‌حساسیت (Hypersensitive Response) در گیاه علیه بیمارگر می‌شود. یافته‌های این تحقیق حاکی از آن است که ریزRNAها به‌عنوان نخستین خط دفاعی گیاهان در مقابله با تنش‌ها زیستی عمل می‌کنند (Ferreira *et al.*, 2025).

روش‌های محاسباتی به‌عنوان یک رویکرد کارآمد تاکنون سبب پیش‌بینی صدها ریزRNA در بسیاری از گونه‌های گیاهی شده است. ریزRNAهای بالقوه شناخته شده در این

مطالعه دارای خصوصیات متنوعی را در بین خانواده‌های مختلف نشان می‌دهند. خانواده miR160 یک خانواده بسیار حفاظت شده از ریزRNAها هستند که در طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی و فیزیولوژیکی در گیاهان نقش دارند (Hao *et al.*, 2022). این خانواده به‌طور کلی شامل چندین عضو در گیاهان است که ممکن است عملکرد متفاوتی از خود نشان دهند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در بنه‌های زعفران تلقیح شده با بیمارگر قارچی، بیان ژن‌های هدف miR160 به‌طور معنی‌داری تغییر کرده است. به نظر می‌رسد که miR160 به مکان‌های حفاظت شده موجود در نواحی غیرترجمه شونده ژن‌های هدف متصل شده و بیان آن‌ها را تنظیم می‌نماید و از این طریق باعث افزایش مقاومت علیه تنش‌های مختلف می‌شوند که با نتایج تحقیقات گذشته مطابقت دارند (Cheng *et al.*, 2019; Xue and Yi, 2018). پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که miR160 با هدف قرار دادن فاکتورهای پاسخ دهنده به اکسین (ARF)، پاسخ دفاعی در گیاهان از جمله آرابیدوپسیس، موز و کاساوا علیه بیمارگرهای مختلف را تنظیم می‌کنند (Cheng *et al.*, 2019; Pinweha *et al.*, 2011; Xue and Yi, 2018; Zhang *et al.*, 2015). همچنین miR160 با کاهش سطح بیان ژن‌های ARF و مهار بیان ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین (GH-like, AXR3/IAA17 و BDL/IAA12)، منجر به افزایش رسوب کالوز و فعال‌سازی دفاع اولیه ناشی از ایمنی PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) می‌شود (Stork *et al.*, 2010). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مسیر سیگنالینگ هدایت‌شده توسط ریزRNAها نقش اساسی در القای مکانیسم‌های دفاعی در طیف گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی ایفا می‌کند (Stork *et al.*, 2010).

نتایج مطالعه حاضر حاکی از این است که miR160 آنزیم کلیدی مانوز-۱-فسفات گوانیل ترانسفراز (GTP) را فعال می‌کند. مانوز-۱-فسفات گوانیل ترانسفراز (با نام‌های GMPPB یا Mpg1) آنزیمی حیاتی در مسیر متابولیک تولید GDP-مانوز است. این ترکیب، پیش‌ساز ضروری برای سنتز

گلکان‌ها محسوب می‌شود که در تشکیل گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها نقش دارند (Zhang *et al.*, 2025). این آنزیم که با نام‌های پیروفسفوریلاز GDP-مانوز یا مانوز-1-فسفات گوآنیل ترانسفراز نیز شناخته می‌شود، واکنش تبدیل مانوز-1-فسفات به GDP-مانوز را کاتالیز می‌کند (Conklin *et al.*, 1999; Reiter, 2008). علاوه بر این، GDP-مانوز یک محصول واسطه مهم مرتبط با طیف گسترده‌ای از مسیرهای متابولیکی در گیاهان، مانند گلیکوزیلاسیون N و سنتز اسید آسکوربیک (AsA) و پلی‌ساکاریدها است (Barth *et al.*, 2010; Benton *et al.*, 1996).

در مطالعه‌ای در همین راستا، وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2011) با فوق بیان ژن GDP-D-مانوز پیروفسفوریلاز (GMPase=D-mannose pyrophosphorylase) از گوجه به گیاه تنباکو به بررسی بیان این ژن تحت تنش‌های گرمایی طی دوره‌های زمانی مختلف پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان اسید آسکوربیک در برگ‌های گیاهان تنباکوی تراریخته به‌طور قابل توجهی دو تا چهار برابر افزایش یافت. همچنین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX)، سرعت فتوسنتز خالص (Pn) و حداکثر راندمان فتوشیمیایی (PSII (Fv/Fm) در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد افزایش و در مقابل میزان H₂O₂ و O₂ کاهش یافت (Wang *et al.*, 2011). یکی از پیامدهای تنش دمایی این است که به دلیل تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن، مانند ROS، باعث انفجار اکسیداتیو می‌شود. اسید آسکوربیک نقش مهمی در حذف ROS برای محافظت از گیاهان در برابر آسیب اکسیداتیو ایفا می‌کند. یافته‌ها نشان می‌دهد که فوق بیان از ژن GMPase میزان اسید آسکوربیک را افزایش داد و در نتیجه منجر به افزایش تحمل به تنش‌ها در گیاهان تراریخت می‌شود (Barth *et al.*, 2010; Benton *et al.*, 1996).

نتایج حاصل از آنالیز بررسی بیان ژن‌های هدف miR160 نشان می‌دهد که میزان بیان ژن *Mpg1* در بافت بنه زعفران بیشتر از سایر ژن‌های دیگر بود. الگوی بیان متفاوت این ژن در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان مختلف، همسو با یافته‌های سایر مطالعات است (He *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2017). در اغلب مطالعات، بیان ریز RNA تحت شرایط تنش تنها در یک بافت مورد بررسی قرار گرفته است. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که الگوی بیان ژن‌های هدف miR160 می‌تواند در بافت‌های مختلف گیاهی متفاوت باشد. به‌طوریکه در یک تنش خاص، یک ریز RNA در یک بافت بیان می‌شود، اما در بافت دیگر فاقد بیان باشد و در بافت سومی در همان تنش افزایش بیان نشان دهد.

در گیاهان، ژن‌های متعددی در پاسخ به بیمارگر فعال یا خاموش می‌شوند و همچنین ممکن است بیان آن‌ها افزایش یا کاهش پیدا کند. تغییرات در سطح بیان این ژن‌ها نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی بنه زعفران علیه عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند. در همین راستا مطالعاتی توسط همت پور و همکاران (Hematpour *et al.*, 2025)، حاتمی و همکاران (Hatami *et al.*, 2024) به آنالیز گسترده ژنومی ژن‌های RLP، RLK و NBS-LRR در بازه زمانی ۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی با بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* پرداختند. نتایج این پژوهش‌ها نشان دادند که با گذشت زمان از شروع آلودگی تا روز سوم، فعالیت مسیرهای انتقال پیام هورمونی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، واکنش فوق حساسیت و بیان ژن‌های دخیل در مقاومت PTI افزایش می‌یابند (Hatami *et al.*, 2024; Hematpour *et al.*, 2025).

ترانسپورتهای ABC (ABC transporter) یکی از بزرگترین خانواده‌های چند ژنی هستند که در فرآیندهای زیستی متنوعی نقش دارند. این پروتئین‌ها با استفاده از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP، انتقال طیف وسیعی از مولکول‌ها را در عرض غشا و درون سلول تسهیل می‌کنند. در مطالعه حاضر با توجه به نتایج مطالعات پیشین ذکر شده، بیان ژن ABC transporter G از ژن‌های هدف miR160 در بازه زمانی ۷۲ ساعت پس از آلودگی با قارچ فوزاریوم بررسی شد. نتایج حاصل از واکنش Real time qRT-PCR نشان داد که بیان این ژن در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش یافت که احتمالاً نشان‌دهنده نقش مهم آن در فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی گیاه است. با بررسی نتایج

مطالعه مذکور و دیگر مطالعات مشابه بر روی ترنسکریپتوم زعفران تلقیح شده با بیمارگر فوزاریومی، مشخص می‌شود که واکنش‌های گیاهان نسبت به حمله بیمارگر با پیچیدگی‌های زیادی همراه است و در آن ژن‌های زیادی که در فرآیندهای دفاعی دخیل هستند، تحریک می‌شوند. این یافته‌ها حاکی از آن است که یک شبکه تنظیمی ژنی در تعامل گیاه با عوامل بیماری‌زا دخیل است و در این میان ریز RNAها با تنظیم مثبت و منفی بیان ژن‌ها، نقش کلیدی در سازگاری گیاه با شرایط تنش ایفا می‌کنند.

استاین و همکاران (Stein et al., 2006) نشان دادند که ترانسپورترهای ABCG در گیاه آرابیدوپسیس در پاسخ به عوامل بیماری‌زا نقش دارند. جهش‌های ناک‌اوت این ژن‌ها منجر به بروز فنوتیپ‌های متنوعی شد که تأکید کننده نقش چندگانه این پروتئین‌ها در فیزیولوژی گیاه است. چین و همکاران (Chen et al., 2021) نیز نقش پروتئین‌های کوچک متصل شونده به GTP (مانند RabE1c) را در پاسخ به تنش خشکی بررسی کردند. این پروتئین با تنظیم سیگنالینگ اسید آسبزیک (ABA) و کنترل باز و بسته شدن روزنه‌ها، به گیاه در مقابله با تنش کمک می‌کند.

یکی دیگر از اهداف miR160 پروتئین‌های کوچک گوانوزین تری فسفاتاز (GTPaseهای کوچک) که

به صورت مونومری به GTP متصل می‌شوند. در این مطالعه، بیان نسبی ژن گوانوزین فسفاتاز نیز مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج داده‌های این مطالعه نشان داد که این پروتئین‌ها که در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ نقش دارند در مواجهه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش بیان پیدا داشتند. این یافته‌ها با پژوهش‌های پیشین همخوانی دارد و نشان می‌دهد که GTPaseها از طریق تعامل با فاکتورهای پایین دست، اثرات نامطلوب ناشی از تنش‌های محیطی و عوامل بیماری‌زا را تعدیل می‌کنند. علاوه بر این، این پروتئین‌ها با مداخله در مکانیسم‌های سیگنالینگ سلولی از جمله تنظیم فعالیت روزنه‌ها، نقش اساسی در ایجاد پاسخ‌های دفاعی گیاه در مواجهه با انواع تنش‌ها ایفا می‌نمایند.

به‌طور کلی، با توجه به نقش حیاتی ریز RNAها در رشد و توسعه گیاهان و سازگاری آن‌ها به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، امروز مطالعات گسترده‌ای در زمینه شناسایی و شناخت عملکرد این RNAهای تنظیمی در گونه‌های مختلف گیاهی با روش‌های متنوع در حال انجام است. این پژوهش نیز با شناسایی ریز RNAهای زعفران زراعی علاوه بر تأیید بخشی از یافته‌های مطالعات پیشین، بستری برای مطالعات آینده با هدف درک بهتر عملکرد این مولکول‌های تنظیمی فراهم می‌کند.

References

- Abedi, A., Hajiahmadi, Z., Kordrostami, M., Esmaeel, Q. and Jacquard, C. (2021). Analyses of lysin-motif receptor-like kinase (lysm-rlk) gene family in allotetraploid *brassica napus* L. and its progenitor species: an in silico study. *Cells*, 11: 37. <https://doi.org/10.3390/cells11010037>
- Addo-Quaye, C., Eshoo, T.W., Bartel, D.P. and Axtell, M.J. (2008). Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome. *Current Biology*, 18: 758-762. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.042>
- Barth, C., Gouzd, Z.A., Steele, H.P. and Imperio, R.M. (2010). A mutation in GDP-mannose pyrophosphorylase causes conditional hypersensitivity to ammonium, resulting in Arabidopsis root growth inhibition, altered ammonium metabolism, and hormone homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 61: 379-394. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp310>
- Benton, B.K., Plump, S.D., Roos, J., Lennarz, W.J. and Cross, F.R. (1996). Over-expression of *S. cerevisiae* G1 cyclins restores the viability of *alg1* N-glycosylation mutants. *Current genetics*, 29: 106-113. <https://doi.org/10.1007/BF02221573>
- Bhagat, N., Mansotra, R. and Patel, K. (2022). Saffron-Fusarium oxysporum R1 dual transcriptomics unravels the defense mechanism of saffron and robust pathogenicity of Fusarium oxysporum R1. *Research Square*, 3: 1-48. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2132821/v1>
- Bonnet, E., Wuyts, J., Rouzé, P. Van de Peer, Y. (2004). Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics*, 20: 2911-2917. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth374>
- Chand, S.K., Nanda, S. and Joshi, R.K. (2016). Regulation of miR394 in response to Fusarium oxysporum f. sp. cepae (FOC) infection in garlic (*Allium sativum* L). *Frontiers in Plant Science*, 7: 258. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00258>

- Chen, D., He, L., Lin, M., Jing, Y., Liang, C., Liu, H., Gao, J., Zhang, W. and Wang, M. (2021). A Ras-related small GTP-binding protein, RabE1c, regulates stomatal movements and drought stress responses by mediating the interaction with ABA receptors. *Plant Science*, 306: 110858. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110858>
- Cheng, C., Liu, F., Sun, X., Tian, N., Mensah, R.A., Li, D. and Lai, Z. (2019). Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4) responsive miRNAs in banana root. *Scientific Reports*, 9: 13682. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50130-2>
- Conklin, P.L., Norris, S.R., Wheeler, G.L., Williams, E.H., Smirnov, N. and Last, R.L. (1999). Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 4198-4203. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4198>
- Darvishian, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Ismaili, A. and Darvishnia, M. (2025). Saffron corm transcriptome analysis reveals genes associated with corm rot disease. *Plant Gene*, 41: 100488. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2024.100488>
- Dehbashi, M., Rajaei, A. and KardanMoghadam, H. (2022). Locating and recognizing of saffron flowers using image processing. *Saffron Agronomy and Technology*, 10: 227-260. <https://doi.org/10.22048/jsat.2022.290185.1427>
- Devi, K.J., Chakraborty, S., Deb, B. and Rajwanshi, R. (2016). Computational identification and functional annotation of microRNAs and their targets from expressed sequence tags (ESTs) and genome survey sequences (GSSs) of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Gene*, 6: 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2016.03.001>
- Dong, Q., Hu, B. and Zhang, C. (2022). microRNAs and their roles in plant development. *Frontiers in Plant Science*, 13: 824240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.824240>
- Farhadi, L., Arminian, A. and Rashidi-Monfared, S. (2023). Identification of miRNAs and their target genes in (*Camelina sativa* L.) transcriptome. *Crop Biotechnology*, 13(43):55-64 (In Persian). <https://doi.org/10.30473/cb.2023.69951.1935>
- Ferreira, S.S., Pandey, S., Hemminger, J., Bozdog, S. and Antunes, M.S. (2025). Early changes in microRNA expression in Arabidopsis plants infected with the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *PloS One*, 20: e0318532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0318532>
- Frusciante, S., Diretto, G., Bruno, M., Ferrante, P., Pietrella, M., Prado-Cabrero, A. and Rubio-Golmohammadi, F. (2014). Saffron and its farming, economic importance, export, medicinal characteristics and various uses in South Khorasan Province-East of Iran. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3: 566-596.
- Golmohammadi, F. (2014). Saffron and its farming, economic importance, export, medicinal characteristics and various uses in South Khorasan Province-East of Iran. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3: 566-596.
- Grilli-Caiola, M. (2004). Saffron reproduction biology. *Acta Horticulture*, 650: 25-39. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.650.1>
- Gupta, V., Sharma, A., Rai, P.K., Gupta, S.K., Singh, B., Sharma, S.K., Singh, S.K., Hussain, R., Razdan, V.K. and Kumar, D. (2021). Corm rot of saffron: epidemiology and management. *Agronomy*, 11: 339. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020339>
- Hao, K., Wang, Y., Zhu, Z., Wu, Y., Chen, R. and Zhang, L. (2022). miR160: an indispensable regulator in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13: 833322. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.833322>
- Hatami F., Nazarian-Firouzabadi F., Sohrabi S.S. and M. K. (2024). Identification and Expression Analysis of RLP and RLK Gene Family Members in Transcriptome of Saffron Infected with *Fusarium Oxysporum* Corm Rot. *Plant Genetic Research*, 11: 121-136 (In Persian). <https://doi.org/10.22034/PGR.11.1.8>
- He, C., Yu, Z., Teixeira da Silva, J.A., Zhang, J., Liu, X., Wang, X., Zhang, X., Zeng, S., Wu, K. and Tan, J. (2017). DoGMP1 from *Dendrobium officinale* contributes to mannose content of water-soluble polysaccharides and plays a role in salt stress response. *Scientific Reports*, 7: 41010. <https://doi.org/10.1038/srep41010>
- Hematpour, N., Nazarian-Firouzabadi, F., Sohrabi, S.S. and Khademi, M. (2025). Identification and expression analysis of genes involved in the ETI defense pathway in saffron corms infected with corm rot disease (*Fusarium oxysporum*). *Crop Biotechnology*, 14: 53-66 (In Persian). <https://doi.org/10.30473/cb.2025.72010.1981>
- Jodder, J. (2020). miRNA-mediated regulation of auxin signaling pathway during plant development and stress responses. *Journal of Biosciences*, 45: 91. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00062-1>
- Joshi, P., Sharma, V., Pandey, A.K., Nayak, S.N., Bajaj, P., Sudini, H.K., Sharma, S., Varshney, R.K. and Pandey, M.K. (2025). Identification of miRNAs associated with *Aspergillus flavus* infection and their targets in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology*, 25: 345. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06322-2>
- Joshi, R. (2018). A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 6: 112-115. <https://doi.org/10.22271/plants.2018.v6.i3b.07>
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25: 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luo, J., Zhang, A., Tan, K., Yang, S., Ma, X., Bai, X., Hou, Y. and Bai, J. (2023). Study on the interaction mechanism between *Crocus sativus* and *Fusarium oxysporum* based on dual RNA-seq. *Plant Cell Reports*, 42: 91-106. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02938-y>
- Mansotra, R., Ali, T., Bhagat, N. and Vakhlu, J. (2023). Injury and not the pathogen is the primary cause of corm rot in *Crocus sativus* (saffron). *Frontiers in Plant Science*, 14: 1074185. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1074185>
- Mentis, A.F.A., Dalamaga, M., Lu, C. and Polissiou, M.G. (2021). Saffron for “toning down” COVID-19-related cytokine storm: Hype or hope? A mini-review of current evidence. *Metabolism Open*, 11: 100111. <https://doi.org/10.1016/j.metop.2021.100111>

- Nürnberg, T. and Kemmerling, B. (2006). Receptor protein kinases–pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends in Plant Science*, 11: 519-522. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.09.005>
- Padmashree, D and Ramachandraswamy, N. (2016). Identification and characterization of conserved miRNAs with their target mRNA in *Trichinella Spiralis*. *Bioinformatics*, 12: 279-284. <https://doi.org/10.6026/97320630012279>
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. and Birchler, J.A. (2002). RNAi-related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 9: 315-327. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00440-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00440-9)
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12: 1484-1495. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01017-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01017-5)
- Pinweha, N., Asvarak, T., Viboonjun, U. and Narangajavana, J. (2015). Involvement of miR160/miR393 and their targets in cassava responses to anthracnose disease. *Journal of Plant Physiology*, 174: 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.09.006>
- Qiu, Z., Li, X., Zhao, Y., Zhang, M., Wan, Y., Cao, D., Lu, S. and Lin, J. (2015). Genome-wide analysis reveals dynamic changes in expression of microRNAs during vascular cambium development in Chinese fir, *Cunninghamia lanceolata*. *Journal of Experimental Botany*, 66: 3041-3054. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv103>
- Reiter, W.D. (2008). Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.009>
- Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N. and Kooter, J.M. (2001). Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology*, 11: 436-440. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00116-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00116-6)
- Stein, M., Dittgen, J., Sánchez-Rodríguez, C., Hou, B.H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V. and Somerville, S. (2006). *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP-binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *The Plant Cell*, 18: 731-746. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038372>
- Steinkellner, S., Mammerler, R. and Vierheilig, H. (2008). Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *European Journal of Plant Pathology*, 122: 395-401. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9306-1>
- Stork, J., Harris, D., Griffiths, J., Williams, B., Beisson, F., Li-Beisson, Y., Mendu, V., Taheri-Dehkordi, A., Naderi, R., Martinelli, F. and Salami, S.A. (2021). Computational screening of miRNAs and their targets in saffron (*Crocus sativus* L.) by transcriptome mining. *Planta*, 254: 1-22. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03761-7>
- Sohrabi, S.S., Sohrabi, S.M., Mousavi, S.K. and Mohammadi, M. (2020). Identification, sequencing and stability evaluation of eight reference genes in saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant Genetic Research*, 7(1):127-144 (In Persian). <https://doi.org/10.52547/pgr.7.1.8>
- Taheri-Dehkordi, A., Naderi, R., Martinelli, F. and Salami, S.A. (2021). Computational screening of miRNAs and their targets in saffron (*Crocus sativus* L.) by transcriptome mining. *Planta*, 254: 117. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03761-7>
- Wang, H.S., Yu, C., Zhu, Z.J. and Yu, X.C. (2011). Overexpression in tobacco of a tomato GMPase gene improves tolerance to both low and high temperature stress by enhancing antioxidation capacity. *Plant Cell Reports*, 30: 1029-1040. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1009-y>
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S.A. and Carrington, J.C. (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA Genes. *Plant Physiology*, 138: 2145-2154. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062943>
- Xue, M. and Yi, H. (2018). Enhanced *Arabidopsis* disease resistance against *Botrytis cinerea* induced by sulfur dioxide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 523-529. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.011>
- Yu, S. and Wang, J.W. (2020). The crosstalk between microRNAs and gibberellin signaling in plants. *Plant and Cell Physiology*, 61: 1880-1890. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa079>
- Yu, Z.X., Wang, L.J., Zhao, B., Shan, C.M., Zhang, Y.H., Chen, D.F. and Chen, X.Y. (2015). Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and *Pogostemon cablin* by the miR156-targeted SPL transcription factors. *Molecular Plant*, 8: 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.002>
- Zhang, B., Pan, X., Cannon, C.H., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. (2006). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*, 46: 243-259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.02697.x>
- Zhang, C., Xu, Y., Li, L., Wu, M., Fang, Z., Tan, J., Rollins, J.A., Lin, H., Huang, X. and Mansfield, S.D. (2025). A GDP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase as a potential HIGS target against *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathogens*, 21: e1013129. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1013129>
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Chellappan, P., Chen, Z., Zhou, X., Zhang, X., Fromuth, N., Coutino, G. and Coffey, M. (2011). Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Molecular Biology*, 75: 93-105. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9710-8>
- Zinati, Z., Shamloo-Dashtpajardi, R. and Behpour, A. (2016). In silico identification of miRNAs and their target genes and analysis of gene co-expression network in saffron (*Crocus sativus* L.) stigma. *Molecular Biology Research Communications*, 5: 233.