

شناسایی miRNAهای حفاظت شده گل راعی (*Hypericum perforatum*) با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید

نقیسه نورمحمدی^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، احمد سبحانی نجف‌آبادی^۳ و فرهاد نظریان فیروزآبادی^۲

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

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

پست الکترونیک: ismaili.a@lu.ac.ir

۳- دانش‌آموخته دکتری، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی-شاخه اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۲۳

چکیده

ژن‌های (miRNAs) دسته مهمی از تنظیم‌کننده‌های بیان ژنی می‌باشند که نسبت به تنش‌های محیطی، پاسخ‌های متنوعی دارند و نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن‌ها در مراحل پس از رونویسی ایفا می‌کنند. گل راعی (*Hypericum perforatum*) بیشترین کاربرد را در درمان افسردگی به دلیل تأثیر هایپرسیپین و هایپرفورین دارد. پژوهش حاضر به منظور شناسایی miRNAهای حفاظت شده و ژن‌های هدف آن‌ها در محتوی رونوشت (Transcriptome) گل راعی صورت گرفت. ابتدا نمونه‌های حاصل از توالی‌یابی RNA گل راعی از بانک اطلاعاتی (EMBL-EBI (ENA دریافت شدند، سپس ترنسکرپتوم این گیاه سرهم‌بندی گردید و رونوشت‌های غیر کدکننده به پروتئین شناسایی و به عنوان توالی‌های کاندید پیش‌ساز miRNA در نظر گرفته شدند. در نهایت از بین توالی‌های کاندید با استفاده از نرم‌افزار C-mii شش miRNA با نام‌های Hp-miR395، Hp-miR845d، Hp-miR414، Hp-miR159، Hp-miR159e و Hp-miR156c پس از اعمال فیلترهای سخت‌گیرانه شناسایی شدند. بررسی شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین ارتباط ژن‌های هدف با پروتئین‌های هدف به‌ویژه عوامل رونویسی را مشخص کرد. در مرحله بعد جهت تأیید ژن‌های هدف برای miRNAهای شناسایی شده محلول‌پاشی با غلظت‌های صفر (شاهد) و ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات بر روی گل راعی انجام شد و الگوی تغییرات بیان دو ژن هدف بررسی گردید. در بررسی تغییرات میزان بیان qRT-PCR در زمانهای ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات، افزایش سطح بیان نسبی برای رونوشت‌های Hyp-1 (DN121523_c1_g4_i2) و HD-Zip (DN121003_c0_g1_i1) پس از ۷۲ ساعت از کاربرد با متیل‌جاسمونات مشاهده شد. در مجموع با توجه به نقش تنظیمی miRNAهای شناسایی شده در مطالعه حاضر، می‌توان از این ژن‌ها در شناسایی بهتر و دقیق‌تر مسیر بیوسنتزی هایپرسیپین و هایپرفورین استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز گسترده ترنسکرپتوم، گل راعی، متیل‌جاسمونات، qRT-PCR

مقدمه

که به دلیل داشتن ترکیباتی مانند نفتادیانتورون‌ها،

گل راعی (*Hypericum perforatum*) از خانواده Hypericaceae گیاهی تتراپلوئیدی ($2n=4x=32$) می‌باشد

هسته به سیتوپلاسم وارد شده و با اتصال و تشکیل کمپلکس خاموشی القا شده توسط RNA-induced silencing complex ساختار تک رشته و بالغ (Mature miRNA) را ایجاد می‌کند (Du et al., 2005).

شواهد نشان می‌دهد که miRNAها نقش‌های کلیدی در پاسخ‌های گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. همچنین در مطالعات بسیاری، تغییر بیان برخی از miRNAها طی تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی تأیید شده است، از جمله می‌توان به miRNAهای miR159، miR168، miR169، miR171، miR393 اشاره کرد (Shahidi et al., 2019). علاوه بر این، شواهد نشان می‌دهد که به محض مواجهه با شرایط تنش، miRNAها از طریق تنظیم میزان بیان خود، یا با ایجاد کمپلکس‌های برهم‌کنشی نیز سبب تنظیم زمان و میزان بیان ژن‌های هدفشان می‌شوند. بیشتر تنظیم ژنی که به دلیل miRNAها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی اتفاق می‌افتد در سطح پس از ترجمه به وقوع می‌پیوندد (Li et al., 2016). طی سال‌های اخیر با پیشرفت علم بیوانفورماتیک، ابزارهای متعددی برای شناسایی این عناصر تنظیمی معرفی شده که با استفاده از الگوریتم‌های خاص، توالی miRNA و ژن‌های هدف آنها را شناسایی می‌کنند (Akhtar et al., 2015). محرک متیل‌جاسمونات می‌تواند سیگنال‌های دفاعی مستقیم یا غیرمستقیم و همچنین واکنش‌های بیوشیمیایی بعدی را به صورت آبخاری در گیاه القا کند که منجر به تغییرات گسترده در پروفایل بیان می‌شود (Ho et al., 2020)؛ بنابراین انتخاب یک محرک مناسب می‌تواند گامی مهم برای انجام یک پژوهش کاربردی باشد. تجزیه و تحلیل بیان ژن در بسیاری از زمینه‌های تحقیقات بیولوژیکی از اهمیت بالایی برخوردار است، به طوری که بررسی میزان رونویسی به عنوان روشی مؤثر برای شناسایی ژن‌ها در مسیرهای متابولیکی شناخته شده است (Rastogi et al., 2014).

با توجه به شناسایی نشدن هیچ‌گونه توالی miRNA و توالی هدف آنها در گل راعی، هدف این پژوهش این بود که ابتدا miRNAهای حفاظت‌شده گل راعی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید شناسایی شود و بعد شبکه

هایپرسیسین^۱، سودوموهایپرسیسین^۲ و هایپرفورین^۳ و ویژگی‌های ضدویروسی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطان یکی از مهمترین جنس‌های گیاهان دارویی است (Scholz et al., 2020). امروزه بیشترین کاربرد گل راعی در درمان افسردگی می‌باشد و با وجود کاربردهای فراوان در صنعت داروسازی، مطالعات کاملی بر روی ژنوم این گیاه تاکنون انجام نشده است (Scholz et al., 2020). تحلیل ترنسکرپتوم برای تفسیر عناصر عملکردی ژنوم و همچنین درک بهتر سازوکار مولکولی دخیل در پاسخ به محرک‌های درونی و بیرونی و سنتز انواع متابولیت‌ها، ضرورت دارد (Naghavi & Karimi, 2018). عناصر تنظیمی یکی از مهمترین عوامل دخیل در بیان ژن‌ها در مسیرهای متابولیکی به‌شمار می‌روند. ژن‌های miRNA به عنوان یکی از کلیدی‌ترین عناصر تنظیمی در شبکه بیان ژن به‌شمار می‌روند (Naghavi & Karimi, 2018).

miRNAها با طول تقریبی ۲۴-۲۱ نوکلئوتید به عنوان یکی از اجزای مهم شبکه تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی به حساب می‌آیند و در تنظیم شبکه‌های ژنی در موجودات مختلف نقش مؤثری دارند (Naghavi & Karimi, 2018). این گروه از RNAهای غیرکدکننده، بیان بسیاری از ژن‌ها را از طریق فرایند تداخل RNA-RNA (interference) در سطوح مختلف شامل رونویسی، پردازش، پایداری RNA و ترجمه تنظیم می‌کنند (Jung et al., 2009). توالی miRNA اولیه (pri-miRNA) گیاهی، معمولاً دارای یک ساختار ساقه-حلقه است که در مرحله اول پردازش توسط آنزیم Dicer-like1 (DCL1) برش خورده و ساختار دیگری به نام pre-miRNA را ایجاد می‌کند. در دومین مرحله از پردازش، حلقه انتهایی برش خورده و توالی دو رشته‌ای با طول متوسط ۱۸-۲۴ نوکلئوتیدی ایجاد می‌شود. در مرحله نهایی، ساختار دو رشته‌ای از

۱ Hypericin

۲ Pseudohypericin

۳ Hyperforin

تعیین گردید. در نهایت برای تعیین توالی‌های غیر رمزگذار از ابزار BLASTx و پایگاه داده پروتئین‌های غیر تکراری (Non redundant protein: NR) استفاده شد.

پیش‌بینی ساختار دوم miRNA

شباهت بالای یک رونوشت با توالی miRNA بالغ به‌تنهایی دلیل کافی بر صحت شناسایی دقیق یک miRNA نمی‌باشد. به همین منظور در این پژوهش، پارامترهای:

ساختار دوم با تاخوردگی مناسب شامل ساختار ساقه حلقه

وجود توالی miRNA بالغ در یک بازو در ناحیه ساقه

عدم شکستگی در حلقه ساختار miRNA

حداکثر ۶ جفت نوکلئوتید غیر منطبق در ساختار miRNA

محتوای ۳۰ تا ۷۰ درصدی بازهای آدنین و اوراسیل (AU) حداکثر اندازه گپ در ساختار miRNA ۳ نوکلئوتید 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 سیتوزین (%GC) با

استفاده از ابزار C-mii طبق روابط زیر بررسی شدند.

$$MFE = -\Delta G \text{ (kcal/mol)}$$

$$AMFE = (MFE \div \text{miRNA sequence length}) \times 100$$

$$MFEI = AMFE \div (\%GC)$$

از miRNAهایی با $MFEI \leq -0.6 \text{ kcal/mol}$ برای

افزایش دقت در فیلتر و شناسایی miRNAهای بالقوه استفاده شد.

شناسایی ژن‌های هدف miRNA

برای شناسایی ژن‌های هدف miRNA از ابزار برخط

تحت وب psRNA Target استفاده شد (Sobhani &

Naghavi, 2018). این ابزار بر اساس محاسبه میزان

جفت‌شوندگی توالی‌های miRNA و توالی هدف، تحلیل

برهم‌کنش پروتئینی مورد بررسی قرار گیرد. در نهایت برای تأیید ژن‌های هدف، الگوی تغییرات بیان دو ژن هدف، تحت تأثیر محرک متیل‌جاسمونات بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و کیفیت‌سنجی داده‌ها

در این تحقیق از ۲۱ مجموعه داده موجود در بانک اطلاعاتی (EMBL-EBI (ENA برای داده‌کاوی استفاده شد (جدول ۱). از آنجا که ژنوم مرجع برای گل راعی وجود ندارد، در این تحقیق در قدم اول سعی بر تولید یک ترنسکرپتوم جامع بوده است. برای تعیین کیفیت خوانش‌ها از نرم‌افزار FastQC و برای فیلتر و پردازش توالی‌ها از نرم‌افزار FASTX-Toolkit (v.0.013) استفاده شد. نوکلئوتید یا خوانش‌های با معیار کیفیت (Phred score) کمتر از ۳۰ با استفاده از بسته نرم‌افزاری FASTX-Toolkit حذف شدند.

سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه

پس از پیش‌پردازش، داده‌های تمیز شده روی هم ریخته شد و برای سرهم‌بندی نوپدید و تهیه نسخه ترنسکرپتوم مرجع، از نرم‌افزار Trinity (v.2.2.1) استفاده گردید (Haas *et al.*, 2013). کمیت‌سنجی ترنسکرپتوم سرهم‌بندی شده با تعیین آماره‌هایی مانند تعداد رونوشت، طول بزرگ‌ترین خوانش، N50 و طول متوسط رونوشت‌ها انجام شد.

شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده

پس از مرحله سرهم‌بندی نوپدید و حذف رونوشت‌های تکراری، از رونوشت‌های حاصل به‌عنوان منبعی برای شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده استفاده شد. به این منظور، کلیه توالی‌های miRNA بالغ ثبت شده در پایگاه mirbase (<http://www.mirbase.org>) دریافت شدند. برای شناسایی رونوشت‌ها با بیشترین شباهت با توالی‌های miRNAهای بالغ از نرم‌افزار C-mii با پارامترهای E-value ≤ 10 و BLASTn با mismatch < 4 استفاده شد. آستانه طول miRNAهای بالقوه بین ۱۸ تا ۲۷ نوکلئوتید

کاملاً تصادفی با دو سطح تیمار غلظتی متیل جاسمونات صفر (شاهد)، ۲۰۰ میکرومولار و تیمار در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در سه تکرار (هر گلدان یک تکرار) انجام شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی آغازگر استخراج RNA کل از برگ‌های تیمار شده با متیل جاسمونات و گروه شاهد با استفاده از کیت YEKTA TAJHIZ بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس با استفاده از ابزار NCBI Primer-BLAST طراحی آغازگرها برای ژن‌های هدف (HD_Zip و Hyp-1) انجام شد (جدول ۲). کارآمدی آغازگرهای طراحی شده با استفاده از PCR استاندارد و ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. برای ساخت کتابخانه cDNA (Complementary DNA) از یک میکروگرم RNA و کیت Revert Aid First-Strand cDNA Synthesis kit استفاده گردید. واکنش qRT-PCR با استفاده از سیستم (Applied Biosystems) One Step انجام شد. واکنش PCR با واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه آغاز و در ۴۰ چرخه (هر چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش آنزیمی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه) در سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی انجام گردید. در نهایت تحلیل داده‌های Real-time PCR با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. ژن مرجع در این آزمایش کاتالاز (MK934828) در نظر گرفته شد.

ساختار ثانویه و محاسبه قابلیت اتصال این دو توالی، ژن‌های هدف را پیش‌بینی می‌کند. مستندسازی عملکرد ژن‌های هدف miRNAها، با استفاده از ابزار BLASTx و پایگاه داده پروتئین‌های غیر تکراری (NR) با حد آستانه $Evalue \leq 1.0 \times 10^{-5}$ انجام شد.

بررسی برهم‌کنشی پروتئین‌ها

شبکه‌های برهم‌کنشی پروتئین-پروتئین یک عنصر مهم برای درک فرایندهای سلولی هستند. پروتئین‌ها عمدتاً به صورت شبکه‌ای، در تعامل با یکدیگر عمل می‌کنند، به این ترتیب برای ترسیم شبکه برهم‌کنشی پروتئین‌ها از پایگاه داده STRING استفاده شد. این پایگاه داده حاوی اطلاعات منابع متعددی از جمله داده‌های تجربی، روش‌های پیش‌بینی محاسباتی است که مرتب به روز می‌شوند. برای تبدیل ID ژن‌ها برای استفاده در STRING، از ابزار BLASTx موجود در پایگاه اطلاعاتی TAIR10 (<http://arabidopsis.org>)، با حد آستانه $Evalue \leq 1.0 \times 10^{-5}$ استفاده شد و ژن‌ها با بیشترین همولوژی در مراحل بعد در ترسیم شبکه مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد گیاهی و اعمال تیمار

گیاهچه‌های *Hypericum perforatum* در گلدان و در محیط گلخانه با دمای 24 ± 2 سانتی‌گراد و شرایط نور طبیعی نگهداری شدند. محلول‌پاشی متیل جاسمونات با غلظت‌های صفر (شاهد) و ۲۰۰ میکرومولار (حل شده در اتانول ۰/۲ درصد) بر روی گیاهان انجام گردید، همچنین محلول‌پاشی گیاهان شاهد با اتانول (V/V) ۰/۲ درصد انجام شد. از برگ‌های شاخه‌های انتهایی برای بررسی میزان بیان ژن در زمان‌های مشخص شده پس از تیمار نمونه برداری شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح

جدول ۱- شماره‌های دسترسی داده‌ها، نوع نمونه و پلتفرم توالی‌یابی در گل راعی *H. perforatum*

Table 1: The accession numbers of the data along with the sample types, sequencing platforms in *H. perforatum*

ردیف Number	شماره دسترسی SRA code	پلتفرم Method(platform)	بافت Plant tissue
1	ERR2040370	Illumina paired end sequencing	Whole leaves
2	SRR2062465	Illumina paired end sequencing	Leaf-dark nodules
3	SRR2062467	Illumina paired end sequencing	Leaf- dark nodules
4	SRR2062466	Illumina paired end sequencing	Leaf- non nodules
5	SRR2062468	Illumina paired end sequencing	Leaf- non nodules
6	SRR202947	Illumina x paired end sequencing	Leaf, Bud immature (25-75%),
7	SRR202948	Illumina paired end sequencing;	Flower, Anthers, Buds Immature
8	SRR202949	Illumina paired end sequencing	Root- elongating zone (young),
9	SRR202950	Illumina paired end sequencing	Stem- Apical (upper 25%), Basal
10	SRR342029	Illumina paired end sequencing	Leaf -gland
11	SRR202096	RNA-Seq (HPA_AI)	Whole mid aged leaves
12	SRR202097	RNA-Seq (HPA_AJ)	Whole old leaves/leaf mature
13	SRR202098	RNA-Seq (HPA_AK)	Young leaf (<25% expanded)
14	SRR202936	RNA-Seq (HPA_AL)	Young leaf (<25% expanded)
15	SRR202937	RNA-Seq (HPA_AM)	Portion of old leaves
16	SRR202938	RNA-Seq (HPA_AN)	Portion of young leaves
17	SRR202939	RNA-Seq (HPA_AO)	Portion of old leaves
18	SRR202943	RNA-Seq (HPA_AS)	Floewer ptals- dark glands
19	SRR202946	RNA-Seq (HPA_AT)	Flower petals
20	SRR1646951	RNA-Seq (HPA_AT)	Flower transcriptome
21	SRR1646955	RNA-Seq (HPA_AT)	Flower transcriptome

جدول ۲- نام ژن، شماره دسترسی و توالی آغازگرها برای ژن‌های هدف انتخاب شده در گل راعی برای qRT-PCR

Table 2: Gene names, annotations and primers used for qPCR analysis of the selected target genes in *H. perforatum*

نام ژن Gene name	توالی آغازگر (۵'-۳')	شماره دسترسی Unigene
Hyp-1	F:AGGAGGAAGCAAGGGTAAGATTA R: CCCGATCTTGACTTCTTCTTCATT	DN121523_c1_g4_i2
HD_Zip	F: GAGCAGCCAAGACAGGAAGA R: ATTTTCCGGTCAGGGTTCGAG	DN121003_c0_g1_i1
Catalase (Reference gene)	F: GAGAGGATTCCTGAGCGTGT R: TGAAGTGGAGAATCGAACAA	

نتایج

تک تک نوکلئوتیدها، میانگین کیفیت رونوشت‌ها، درصد هر یک از نوکلئوتیدها و میانگین درصد GC از وضعیت مطلوبی برخوردار هستند (داده‌ها آورده نشده‌اند).

نتایج ارزیابی کیفیت داده‌های جمع‌آوری شده در این مطالعه، نشان داد که کیفیت نمونه‌ها از نظر میانگین کیفیت

طول ۶۳۲ جفت‌باز بود. آماره N50 ترنسکرپتوم سرهم‌بندی شده ۱۲۱۴ جفت‌باز و درصد GC آن برابر با ۴۹/۶۴ گزارش شد (جدول ۳).

نرم‌افزار Trinity (v 2.2.1) برای سرهم‌بندی ترنسکرپتوم مورد استفاده قرار گرفت و پروفایل بیانی سرهم‌بندی شده شامل ۲۹۲۷۵۲ رونوشت با میانگین

جدول ۳- مشخصات کمی و کیفی سرهم‌بندی ایجاد شده از داده‌های ترنسکرپتومی گل راعی *H. perforatum*

Table 3. Quantitative and qualitative characteristics of de novo assembly from florescence transcriptome of *H. perforatum*

ویژگی Characteristics	مقادیر Quantity
Number	292752
(bp) N50	1214
میانگین (bp)	892.53
Mean (bp)	
طول بزرگ‌ترین توالی (bp)	15156
Longest sequence (bp)	
طول کوچک‌ترین توالی (bp)	201
Smallest sequence (bp)	
محتوای GC (درصد)	49.64
GC content (%)	

شده، ۶ توالی به‌عنوان miRNA حفاظت‌شده در گل راعی شناسایی شدند.

بررسی ژن‌های هدف شش miRNA شناسایی شده با استفاده از psRNATarget نشان داد که در مجموع ۵۹۴ ژن توسط این miRNAهای بالقوه تنظیم می‌شوند. نتایج نشان داد که تعداد ژن‌های هدف برای توالی‌های miR845d, miR159, miR159e, miR414, miR156c و miR395 به ترتیب ۹۷، ۱۹۱، ۴۸، ۱۴۲، ۱۱۸، ۴۶ و ۹۴ یونی‌ژن بود. در این بررسی بیوانفورماتیکی ژن‌های هدف مشخص شده برای شش miRNA شناسایی شده در دو گروه عوامل رونویسی و ژن‌های بیوسنتزی قرار گرفتند. miRNAهای گیاهی بیان ژن را از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه تنظیم می‌کنند. مشخص شد که miR395, miR845d, miR159e, miR156c و miR414 سازوکار تجزیه و miR159 و miR414 از طریق مهار ترجمه بر روی ژن‌های هدف عمل می‌کنند. عوامل رونویسی شامل Dof Zinc Finger و HD-Zip به‌عنوان

نتایج BLASTn ترنسکرپتوم سرهم‌بندی شده علیه مجموعه miRNAهای ثبت شده در پایگاه mirbase نشان داد که از ۲۹۲۷۵۲ رونوشت مورد جستجو، ۴۰۹۳۶ رونوشت به‌صورت منحصربه‌فرد با miRNAهای گیاهی مطابقت داشتند. برای حذف رونوشت‌هایی که دارای رکورد مشابه با پایگاه پروتئین‌های غیرتکراری بودند، از نتایج BLASTx رونوشت‌ها علیه این پایگاه استفاده شد. از میان رونوشت‌های کاندید، برای ۱۰۳۶ مورد در پایگاه داده‌های پروتئین‌های غیرتکراری رکوردی یافت نشد. علاوه‌براین، توالی پیش‌ساز miRNAهای بالقوه تحت بررسی‌های پیش‌بینی ساختار ثانویه و حداقل شاخص انرژی آزاد تاخوردگی قرار گرفتند. محاسبات نشان داد که نسخه‌های اولیه قادر به تشکیل ساختارهای ثانویه ثابت بودند. شاخص‌های MFEI در محدوده -۰/۶۰۵ تا -۱/۲۲- کیلوکالری بر مول محاسبه شد (Sobhani & Naghavi, 2018). در نهایت پس از اعمال فیلتر بر اساس تمام ویژگی‌های ذکر

اکسیدوردوکتاز تأثیرگذار بود. miR395 در عملکرد ژن هدف Pleiotropic drug resistance دخیل و miR845d بر ژن مالات دهیدروژناز اثرگذار بود (جدول ۴ و شکل ۱).

ژن های هدف برای miR414 شناسایی شدند. همچنین نتایج نشان داد که miR156c بر روی عامل رونویسی bHLH اثرگذار است. در گروه ژن های بیوستزی، miR159 بر میزان بیان ژن های MYB، Hyp-1 و فلاوین

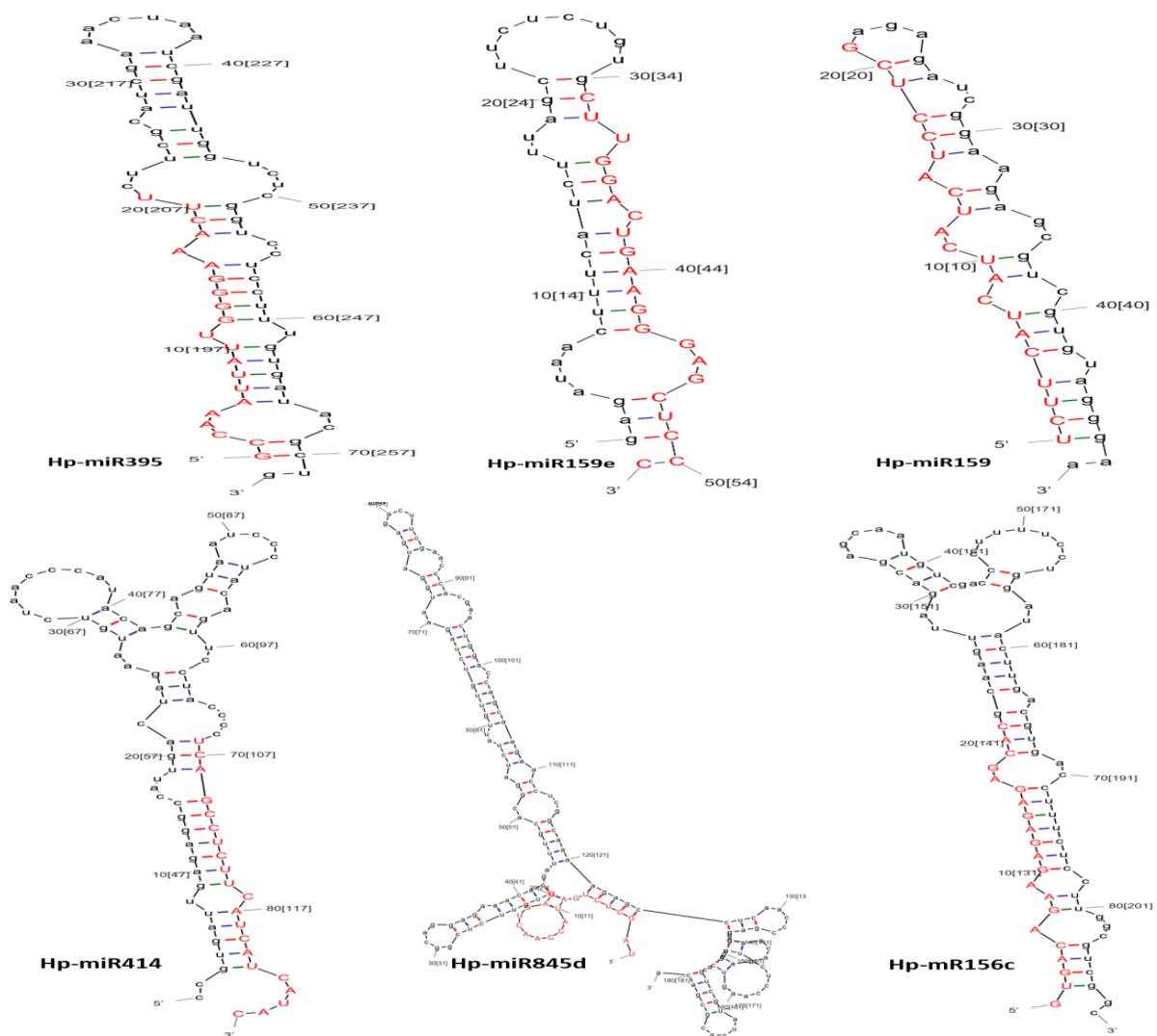
جدول ۴- ویژگی های miRNA های شناسایی شده در گل راعی *H. perforatum*

Table 3: Characteristics of identified miRNAs in *H. perforatum*

نام رونوشت	miRNA name					
Transcript name	Hp-miR156c	Hp-miR414	Hp-miR159	Hp-miR159e	Hp- miR845d	Hp-miR395
	TRINITYDN121003_c0_g1_i1	TRINITY_DN122078_c1_g1_i4	TRINITY_DN118134_c3_g1_i1	TRINITY_DN121523_c1_g4_i2	TRINITY_DN127118_c1_g1_i7	TRINITY_DN123995_c1_g2_i4
Bit score	213	75	214	1499	120	383
توالی miRNA miRNA sequence	gugacagaag agagagacac	ucagccuccu caucaucauc	cuuggacuga agggagcucc	ucucaucauc aucauccug	uagcucucau accaacuga	gccaaaauau uggggaaaacuu
درصد AU AU percent	91.61	39.53	62.47	15.57	15.57	15.57
MFEI (kcal mol ⁻¹)	-68	-22.1	-615	-741	-63	-605
نحوه عمل miRNA miRNA action	Cleavage	Translation	Cleavage	Translation	Cleavage	Cleavage

شده یا پیش بینی شده، مستقیم و غیرمستقیم پروتئین ها را نشان می دهد. ارتباط بین هر دو گره پروتئینی مبتنی بر اطلاعات موجود استخراج شده از پایگاه داده های مربوطه و مستندات است (شکل ۲).

درک شبکه های تنظیم کننده ژن مبتنی بر miRNAها نیاز به شناسایی ژن های هدف دارد. در این پژوهش برای بررسی شبکه برهم کنش پروتئین ها از پایگاه داده STRING استفاده شد که در شبکه حاصل از آن گره ها نمایانگر پروتئین ها هستند و اتصالات تعاملات شناخته

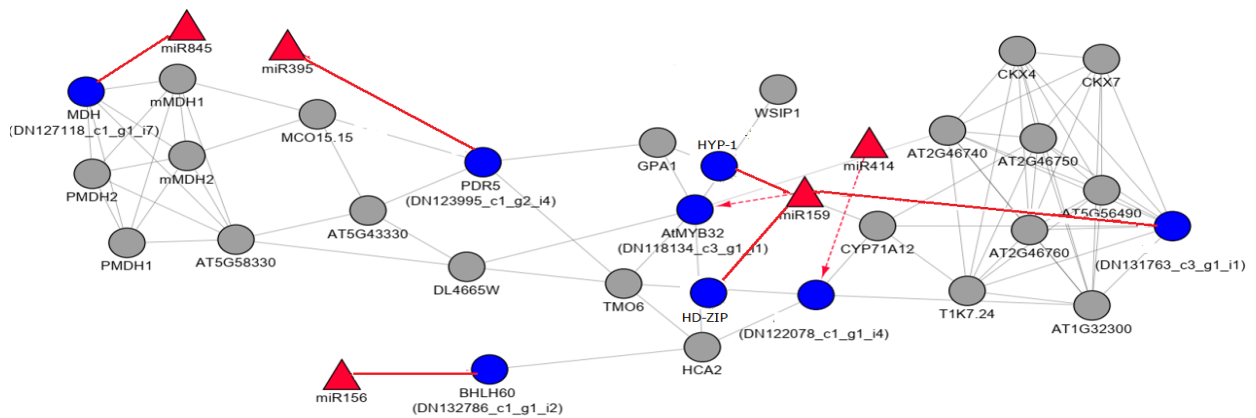


شکل ۱- ساختار پیش‌ساز برای شش miRNA شناسایی شده در *H. perforatum* (توالی miRNA بالغ با رنگ قرمز مشخص شده است).

Figure 1. Structure of identified pre-miRNA in *H. perforatum*. Mature miRNA were presented in red color

ژن Hyp-1 نیز تا ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار، بیان نسبی کاهش یافته بود، در حالی که ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار افزایش میزان بیان مشاهده شد (شکل ۳).

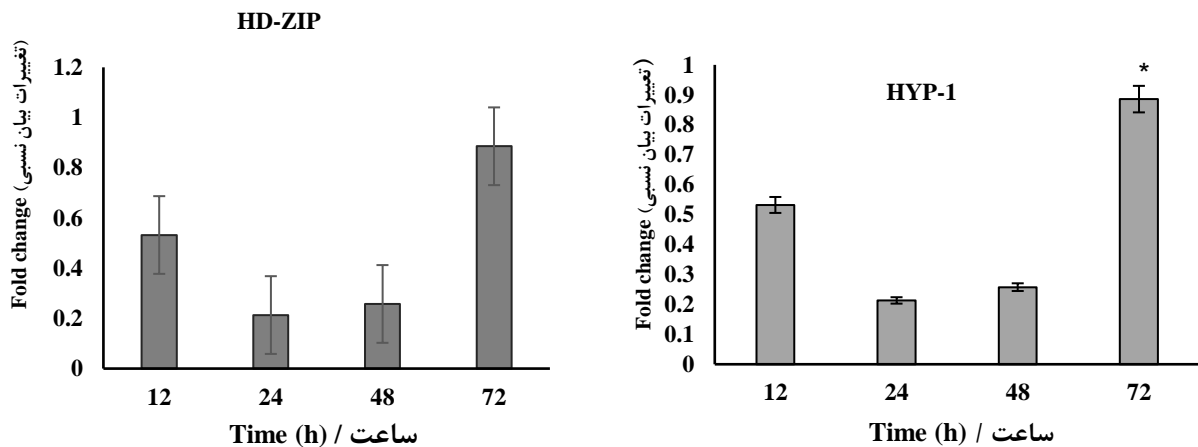
بررسی تغییرات بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از qRT-PCR شیب تغییرات در بیان نسبی عامل رونویسی HD-Zip از ۱۲ تا ۲۴ ساعت تدریجی کاهش بود و بیشترین سطح بیان در گروه ۷۲ ساعت به دست آمد (شکل ۳). در مورد



شکل ۲- شبکه برهم کنش پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING برای ژن های هدف شناسایی شده

▲ مثلث قرمز miRNA های شناسایی شده، ● دایره های آبی ژن های هدف miRNA ها و ● دایره های طوسی پروتئین های مرتبط با ژن های هدف و miRNA ها هستند. miRNA هایی که با فلش پیوسته به ژن هدف متصل شده اند دارای عملکرد تنظیمی برشی و miRNA هایی که با نقطه چین به ژن هدف اتصال دارند دارای عملکرد تنظیم ترجمه ای می باشند.

Figure 2. Protein-protein interaction network using STRING database for identified proteins. Red triangles of identified miRNAs. Blue circles are target genes of miRNAs and gray circles are proteins associated with target genes and miRNAs. The miRNAs connected to the target gene with an edges have a regulatory function, and the miRNAs connected to the target gene with a dotted line have a translational regulatory function.



شکل ۳- بیان نسبی ژن های HD-Zip و Hyp-1 تحت تأثیر محلول پاشی متیل جاسمونات (۲۰۰ میکرومولار) در گل راعی طی زمان های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (میله های نشان دهنده خطای استاندارد هستند).

Figure 2. Effect of MeJA (concentration 200 μ M) on qPCR analysis of target genes in leaf of *H. perforatum* at 12, 24, 48, and 72 hours. Error bars represent the standard error of the mean for three biological replications.

بحث

نشان داد که Hp-miR159، بر ژن فلاوین اکسیدوردوکتاز تأثیرگذار بوده، همچنین در شبکه برهم‌کنش پروتئینی مشاهده می‌شود که این miRNA با پروتئین‌های T1K7.24 و T1K7.20 نیز در ارتباط است که این دو پروتئین دارای فعالیت اکسیدوردوکتازی و در اتصال به کوفاکتور FAD نقش دارند.

ژن Hyp-1 در مسیر بیوسنتزی هایپرسیسین نقش دارد (He *et al.*, 2012). بیوسنتز هایپرسیسین در زنجیره اکتانکتید با یک مولکول استیل-CoA و یک مولکول مالونیل-CoA شروع می‌شود. سپس تحت تأثیر چرخش و دکربوکسیلاسیون، پیش‌ماده آمودین تشکیل شده و در نهایت با فعالیت یک جفت پروتئین فنلی به نام Hyp-1 هایپرسیسین تولید می‌شود (He *et al.*, 2012). در این پژوهش افزایش میزان بیان ژن Hyp-1 در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات مشاهده گردید. همچنین Hp-miR159، miRNA تأثیرگذار برای ژن Hyp-1 گزارش شد.

عوامل رونویسی DNA-binding Zinc Finger (Dof)، یکی از خانواده عوامل رونویسی اختصاصی گیاهی هستند که نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای اصلی گیاهان مانند فتوسنتز، پاسخ به تنش، جوانه‌زنی بذر، القا گلدهی و ریتم شبانه‌روزی دارند (Mahmoudi *et al.*, 2018). HD-Zip خانواده‌ای از عوامل رونویسی منحصر به گیاهان می‌باشند و شامل یک موتیف زیپ لوسین (LZ) مجاور به یک همودومین (HD) هستند که از یک موتیف ۶۰ اسیدآمینو حفاظت‌شده تشکیل شده است. LZ به‌عنوان یک موتیف دیمیریزاسیون عمل می‌کند، در حالی که HD مسئول اتصال خاص به DNA است. پروتئین‌های HD-Zip قادرند با میل ترکیبی بالا به DNA متصل شوند. عوامل رونویسی HD-Zip در عملکردهای مختلف گیاه مانند واکنش به شرایط محیطی، رشد اندام و آبکشی‌ها نقش دارند (Wang *et al.*, 2020).

مطالعه Han و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که miR414 نقش مهمی در تنظیم رونویسی پروتئین‌های

در سال‌های اخیر، با توجه به تأیید نقش مهم miRNA ها در تنظیم بیان ژن در گیاهان، این گروه از RNAهای غیر کدکننده به‌طور ویژه‌ای مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند (Wang *et al.*, 2019). با ظهور نسل جدید فناوری‌های توالی‌یابی و ترکیب آن با نرم‌افزارهای توسعه یافته و سریع بیوانفورماتیکی، روش‌هایی جدید برای مطالعه شبکه‌های تنظیمی پیچیده ایجاد شده است. امروزه از مطالعات miRNAهای گیاهی برای بهبود عملکرد محصول، مهندسی متابولیت و مهندسی ژنتیک به فراوانی استفاده می‌شود (Sabzehzari & Naghavi, 2019). عوامل رونویسی یکی از عناصر زیستی مورد هدف miRNAها بوده که با کنترل و تنظیم فرایند رونویسی نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن‌ها بر عهده دارند. miRNAها با تأثیر بر این گروه از پروتئین‌ها، به‌طور غیرمستقیم بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند (Sabzehzari & Naghavi, 2019).

در این مطالعه همان‌طور که در شبکه برهم‌کنش پروتئینی مشاهده می‌شود، عامل رونویسی MYB به‌وسیله miR159 تنظیم می‌گردد. نقش miR159 در انتقال مرحله رشدی گیاهان مشخص شده است، همچنین نقش آن در تنظیم ژن‌های MYB33 و MYB65 در شروع گلدهی به اثبات رسیده است (Schmiesing *et al.*, 2016). همچنین نتایج نشان داد که miR159 در شبکه برهم‌کنش پروتئینی با پروتئین‌های TMO6، WSIP، HCA2 و GPA1 در ارتباط است. پروتئین GPA1 در سنتز اسید آبسزیک (ABA) و انتقال سیگنال در تنش خشکی نقش دارد و پروتئین‌های WSIP، HCA2 و TMO6 در تنظیم عملکرد عوامل رونویسی دخیل هستند. در این بررسی نیز مشخص شد که Hp-miR159e نقش تنظیمی بر عامل رونویسی MYB دارد. در مطالعه Rizzo و همکاران (Rizzo *et al.*, 2019)، فلاونوئیدها به‌عنوان پیش‌ماده‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله هایپرسیسین در گل راعی گزارش شده‌اند. نتایج این مطالعه

احتمالاً بر پروتئین MCO15.15 که سیستم انتقال‌دهنده ATP-binding است و در انتقال پروتئین‌ها از غشاء به میتوکندری دخیل می‌باشد، تأثیرگذار است. وجود آنزیم مالات دهیدروژناز به‌طور گسترده‌ای در گیاهان گزارش شده است (Chen *et al.*, 2020). مالات دهیدروژناز نقش مهمی در پاسخ به تنش ایفا می‌کند که معمولاً همراه با تغییرات در تبادلات روزنه‌ای و قابلیت اسمزی و مؤثر در فتوسنتز می‌باشد (Chen *et al.*, 2020). هدف‌های ژنی miR845 بیشتر در فرایندهای پاسخ به تنش خشکی رشد و نمو و پاسخ‌های نورگرایی دخیل هستند. miR845 معمولاً ژن‌های کدکننده پروتئین‌های سیتوکروم P450 و فتوتروپین‌ها را مورد هدف قرار می‌دهد. سیتوکروم P450 پروتئین‌هایی هستند که در زنجیره انتقال الکترون نقش دارند (Çakır *et al.*, 2021). فتوتروپین‌ها پروتئین‌های گیرنده نوری هستند که واسطه پاسخ‌های نورگرایی و فتوسنتز در گیاهان می‌باشند. در این مطالعه ژن هدف مالات دهیدروژناز به‌عنوان ژن هدف پروتئین به‌دست آمده در این پژوهش تمام پروتئین‌هایی که به‌طور مستقیم با این ژن در ارتباط هستند (mMDH1, PMDH2) در واکنش دهیدروژناز وابسته به NAD در متابولیسم و تولید انرژی برای انتقال متابولیت‌های ثانویه در برگ گیاهان نقش دارند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه برای شناسایی miRNAها و ژن‌های هدف آنها در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های هایپرسیسین و هایپرفورین در گل راعی انجام شد. در این تحقیق از داده‌های توالی‌یابی موجود و ابزارهای بیوانفورماتیک مختلف برای شناسایی miRNAها و رسم شبکه برهم‌کنش پروتئینی برای این گیاه استفاده گردید. در مجموع، نتایج مطالعه ما وجود ۶ miRNAی حفاظت‌شده در گل راعی را برای اولین بار اثبات کرد. با توجه به اینکه miRNAهای شناسایی شده در این مطالعه دارای نقش

zinc finger, SNF2 و خانواده F-Box دارد (Han *et al.*, 2014). نتایج شبکه برهم‌کنش پروتئینی در این پژوهش نیز نشان داد که miR414 و ژن‌های هدف آن dof zinc finger و HD-Zip با دو پروتئین HCA2 و TMO6 که نقش تنظیمی بر عوامل رونویسی DNA-binding دارند، در ارتباط هستند. علاوه بر این، در بررسی تغییرات سطح بیان، در این پژوهش افزایش سطح بیان HD-Zip (DN121003_c0_g1_i1) در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد.

نتایج مطالعه ما نشان داد که Hp-miR156c احتمالاً در تنظیم ژن هدف bHLH مؤثر باشد. bHLH دارای ساختار ماریچ-حلقه-ماریچ (bHLH) می‌باشد و گروه بزرگی از خانواده عوامل رونویسی هستند که به‌طور گسترده در یوکاریوت‌ها پراکنده شده‌اند (Wu *et al.*, 2021). نقش bHLH در دامنه وسیعی از فرایندهای گیاهی شناخته شده است. نتایج مطالعه Wu و همکاران (Wu *et al.*, 2021)، افزایش بیان ژن‌های bHLH در پاسخ به تنش، نمو گیاه و بیوسنتز متابولیت‌ها را تأیید کرد. این در حالی است که miR156 در آرکیدوپسیس و برنج بر عوامل رونویسی دیگری به نام SPL که در کنترل بسیاری از فرایندهای گیاه به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم از جمله افزایش دوره رویشی و تأخیر در گلدهی نقش دارد، مؤثر می‌باشد (Feyissa *et al.*, 2021). در شبکه پروتئینی این مطالعه نیز miR156 علاوه بر bHLH بر روی پروتئین HCA2 که بر عملکرد عوامل رونویسی که بیشتر نیز اشاره شد اثرگذار است.

در گیاهان چندین سیستم انتقال‌دهنده ترکیبات و سم‌زدایی از سیتوزول به واکوئل وجود دارد که یکی از آنها ATP-binding cassette (ABC) است (Rizzo *et al.*, 2019). یکی از ژن‌های دخیل در این سیستم Pleiotropic drug resistance می‌باشد (Rizzo *et al.*, 2019). نتایج بررسی ما نشان داد که Hp-miR395 احتمالاً بر بیان ژن Pleiotropic drug resistance اثرگذار می‌باشد؛ علاوه بر این نتایج نشان داد که miR395

- their targets in *Phaseolus vulgaris*. *Genet Mol Res*, 13(1), 310-322.
- He, M., Wang, Y., Hua, W., Zhang, Y., & Wang, Z. 2012. De novo sequencing of *Hypericum perforatum* transcriptome to identify potential genes involved in the biosynthesis of active metabolites. *PloS one*, 7(7), e42081.
 - Ho, T.-T., Murthy, H. N., & Park, S.-Y. 2020. Methyl Jasmonate Induced Oxidative Stress and Accumulation of Secondary Metabolites in Plant Cell and Organ Cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 716-727.
 - Jung J H, Seo PJ, Park CM. 2009. MicroRNA biogenesis and function in higher plants. *Plant Biotechnology Reports*, 3: 111-126.
 - Li, H., Zhang, X., Wang, F., Zhou, L., Yin, Z., Fan, J., Nie, X., Wang, P., Fu, X.-D., & Chen, C. 2016. MicroRNA-21 lowers blood pressure in spontaneous hypertensive rats by upregulating mitochondrial translation. *Circulation*, 134(10), 734-751.
 - Mahmoudi, A., Aalami, A., Hasani Komleh, H., Esfehiani, M & Shirzadian, M. 2018. Assessment of NAC2, MYB and CBF14 genes expression in susceptible. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 26(1), 244-252. (In Persian)
 - Naghavi, M., & Karimi, A. 2018. Identification of miRNAs and their target genes in red clover (*Trifolium pratense*). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 26(2), 155-163. (In Persian)
 - Rastogi, S., Meena, S., Bhattacharya, A., Ghosh, S., Shukla, R. K., Sangwan, N. S., Lal, R. K., Gupta, M. M., Lavania, U. C., & Gupta, V. 2014. De novo sequencing and comparative analysis of holy and sweet basil transcriptomes. *BMC genomics*, 15(1), 588-600.
 - Rizzo, P., Altschmied, L., Stark, P., Rutten, T., Gündel, A., Scharfenberg, S., Franke, K., Bäumlein, H., Wessjohann, L., & Koch, M. 2019. Discovery of key regulators of dark gland development and hypericin biosynthesis in *St. John's Wort* (*Hypericum perforatum*). *Plant Biotechnology Journal*, 17(12), 2299-2312.
 - Sabzehzari, M., & Naghavi, M. 2019. Phyto-miRNA: a molecule with beneficial abilities for plant biotechnology. *Gene*, 683, 28-34.
 - Schmiesing, A., Emonet, A., Gouhier-Darimont, C., & Reymond, P. 2016. Arabidopsis MYC transcription factors are the target of hormonal salicylic acid/jasmonic acid cross talk in response to *Pieris brassicae* egg extract. *Plant Physiology*, 170(4), 2432-2443.

مهمی در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های مهم گل راعی بودند، می‌توان از آنها به‌عنوان عوامل تنظیمی در شناسایی بهتر و دقیق‌تر مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های مهم گل راعی از جمله هایپرسیین و هایپرفورین استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مساعدت‌های مسئولان محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور (اصفهان) برای در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و راهنمای‌های علمی، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Akhtar, S., Hartmann, P., Karshovska, E., Rinderknecht, F.-A., Subramanian, P., Gremse, F., Grommes, J., Jacobs, M., Kiessling, F. & Weber, C. 2015. Endothelial hypoxia-inducible factor-1 α promotes atherosclerosis and monocyte recruitment by upregulating microRNA-19a. *Hypertension*, 66(6), 1220-1226.
- Çakır, Ö., Arıkan, B., Karpuz, B., & Turgut-Kara, N. 2021. Expression analysis of miRNAs and their targets related to salt stress in *Solanum lycopersicum* H-2274. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 283-290.
- Chen, Y., Fu, Z., Zhang, H., Tian, R., Yang, H., Sun, C., Wang, L., Zhang, W., Guo, Z., & Zhang, X. 2020. Cytosolic malate dehydrogenase 4 modulates cellular energetics and storage reserve accumulation in maize endosperm. *Plant biotechnology Journal*, 18(12), 2420-2435.
- Du T, Zamore PD 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132: 4645-4652.
- Feyissa, B. A., Amyot, L., Nasrollahi, V., Papadopoulos, Y., Kohalmi, S. E., & Hannoufa, A. 2021. Involvement of the miR156/SPL module in flooding response in *Medicago sativa*. *Scientific reports*, 11(1), 1-16.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., & Lieber, M. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols*, 8(8), 1494-1512.
- Han, J., Xie, H., Kong, M., Sun, Q., Li, R., & Pan, J. 2014. Computational identification of miRNAs and

- X., Li, H., Mu, W., Li, F., & Liu, P. 2020. Functional characterization of a HD-ZIP IV transcription factor NtHDG2 in regulating flavonols biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 259-268.
- Wang, M., Yin, H., Zhou, Y., Sui, C., Wang, Y., Meng, X., Waterhouse, G. I., & Ai, S. 2019. Photoelectrochemical biosensor for microRNA detection based on a MoS₂/g-C₃N₄/black TiO₂ heterojunction with Histostar@ AuNPs for signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 128, 137-143.
- Wu, H., Ren, Z., Zheng, L., Guo, M., Yang, J., Hou, L., Qanmber, G., Li, F., & Yang, Z. 2021. The bHLH transcription factor GhPAS1 mediates BR signaling to regulate plant development and architecture in cotton. *The Crop Journal*, 9(5), 1049-1059.
- Scholz, I., Liakoni, E., Hammann, F., Grafinger, K. E., Duthaler, U., Nagler, M., Krähenbühl, S., & Haschke, M. 2020. Effects of *Hypericum perforatum* (St John's wort) on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in humans. *British Journal Clinical Pharmacology*, 87(3), 1466-1474.
- Shahidi, B., Ahmadi, J., & Ourang, S. 2019. The Study of microRNAs expression pattern involved in drought stress tolerance in ancestors and wild-domestic relatives of wheat. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 27(1), 1-13. (In Persian)
- Sobhani, A., & Naghavi, M. 2018. Mining *Ferula gummosa* transcriptome to identify miRNAs involved in the regulation and biosynthesis of terpenes. *Gene* 645, 41-47.
- Wang, Z., Wang, S., Xiao, Y., Li, Z., Wu, M., Xie,

Identification of conserved miRNAs of *Hypericum perforatum* using next-generation sequencing (NGS) data

N. Noormohammadi¹, A. Ismaili^{2*}, A. Sobhani Najafabadi³, F. Nazarian-Firouzabadi²

1- Ph.D. graduated, Dept. Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran.

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

3- Ph.D. graduated, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran - Isfahan Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, I.R. Iran.

Received: 04.10.2021

Accepted: 13.12.2021

Abstract

miRNA genes consider as an important class of gene expression regulators that have diverse responses to environmental stresses and play a key role in regulating gene expression during post-transcriptional regulation. *Hypericum perforatum*, is well-known medicinal plant for its application in the treatment of depression due to the effects of its bioactive compounds named hypericin and hyperforin. The present study was performed to identify the conserved miRNAs and their target genes in the transcriptome of *H. perforatum*. First, RNA-seq data were obtained from the European Nucleotide Archive (ENA) of EMBL-EBI database and then the transcriptome (RNA) sequences were assembled. The non-coding transcripts were identified and considered as miRNA precursors candidate sequences. Finally, six miRNAs named Hp-miR395, Hp-miR845d, Hp-miR414, Hp-miR159, Hp-miR159e, and Hp-miR156c were identified from the candidate sequences using of C-mii software after applying strict filters. Investigation of the protein-protein interaction network determined the relationships between the target genes and target proteins especially in transcription factors. In the next step, to confirm the target genes for the identified miRNAs, the foliar application of Methyl Jasmonate (MJ) with concentrations of 0 (control) and 200 μ M was performed on *H. perforatum* plants and the expression pattern of two target genes was investigated. In the analysis of qRT-PCR expression changes at 12, 24, 48 and 72 hours after applying MJ, the relative expression level of Hyp-1 (DN121523_c1_g4_i2) and HD-Zip (DN121003_c0_g1_i1) transcripts increased after 72 hours of application of MJ. In general, regarding to the regulatory role of the identified miRNAs in the present study, these genes could be used to better and more accurately identify the biosynthetic pathway of hypericin and hyperforin.

Keywords: Transcriptome-wide analysis, *Hypericum perforatum*, Methyl Jasmonate, qRT-PCR