

ORIGINAL ARTICLE

Identification of miRNAs and their target genes in (*Camelina sativa* L.) transcriptome

Leila Farhadi¹, Ali Arminian¹, Sajad Rashidi-Monfared^{2*}

¹Agronomy and plant breeding Department, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

²Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Correspondence

Sajad Rashidi-Monfared
Email: rashidims@modares.ac.ir

How to cite

Farhadi, L., Arminian, A., & Rashidi-Monfared, S. (2023). Identification of miRNAs and their target genes in (*Camelina sativa* L.) transcriptome. *Crop Biotechnology*, 13(43), 55-64.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous and noncoding small RNA molecules with a length of 19-24 nucleotides (nts) that regulate target genes at the post-transcriptional level in plants. In this study, several miRNAs in *Camelina* were identified, and their potential roles were reported. *Camelina* with its scientific name (*Camelina Sativa* L.) is an oil-medicinal plant belonging to the Brassicaceae family. First the RNA was extracted from *C. sativa* leaf and sent to the Beijing genome institute for RNA-sequencing. Then the data were assembled denovo with Trinity software after removing the reads with lower quality than the threshold level and trimming them. Detection of miRNAs was then performed by miRDeep2 software. Accordingly, we identified 33 miRNAs from the leaf dataset, and their secondary structures were evaluated. The target genes of the detected miRNAs were identified by the psRNAtarget website. Examining the target genes showed that a total of 1415 genes are regulated by these microRNAs, which belong to several gene families with different biological functions, including the genes of proteins that bind to the Squamusa promoter, the protein kinase family, etc. Comparing the expression of microRNA carrying genes (TPM) in the two studied doubled haploid lines, showed that except for miR296 and miR474 which were more expressed in line number 1, the other miRNAs had higher expression in line number 2. Considering the lower amount of oil production in line number 1 compared to line number 2, this indicates the relationship of these two microRNAs with oil production. miR483 was not expressed in any of the lines. miR113 and miR206 had the highest expression levels among all microRNAs. The higher expression of micro RNAs in line 2 probably indicates the higher activity of the silencing mechanism at the transcription level for the target genes in this line compared to line number 1.

KEY WORDS

Transcriptome, Doubled haploid, *Camelina*, Micro RNA

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/>

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

شناسایی میکرو RNAها و ژنهای هدف مرتبط در ترانسکرپتوم

گیاه *Camelina sativa L.*لیلا فرهادی^۱، علی آرمینیان^۱، سجاد رشیدی منفرد^{۲*}

^۱ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
^۲ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

میکرو RNAها (miRNAs) دسته‌ای از مولکول‌های ریز RNA، غیر کدکننده‌ی درون‌زا، با طولی بین ۱۹-۲۴ نوکلئوتید هستند که ژنهای هدف را در سطح پس از رونویسی در گیاهان کنترل می‌کنند. در این مطالعه تعدادی از میکرو RNAهای موجود در گیاه کاملینا با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA شناسایی و معرفی شدند. گیاه کاملینا با نام علمی (*Camelina Sativa L.*) گیاهی روغنی- دارویی و متعلق به خانواده‌ی شب‌بوئیان (*Brassicaceae*) است. در ابتدا استخراج RNA از بافت برگ گیاه صورت گرفت و RNA استخراج شده جهت توالی‌یابی ارسال شد. داده‌ها پس از حذف خوانش‌های با کیفیت پایین‌تر از سطح آستانه و نیز پیرایش آن‌ها، با نرم‌افزار Trinity به صورت *denovo* سرهم‌بندی شدند. سپس شناسایی میکرو RNAها با نرم‌افزار miRDeep2 انجام شد. با استفاده از داده‌های ترانسکرپتوم گیاه و توالی‌های میکرو RNAهای شناخته‌شده در سایر گیاهان تعداد ۳۳ میکرو RNA شناسایی و ژنهای هدف آن‌ها با استفاده از برنامه‌ی psRNAtarget مشخص شدند. بررسی ژنهای هدف نشان داد که در مجموع ۱۴۱۵ ژن توسط این میکرو RNAها، تنظیم می‌شوند که متعلق به چندین خانواده‌ی ژنی با عملکردهای زیستی متفاوت از جمله ژنهای پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور *Squamosa*، خانواده‌ی پروتئین کیناز و ... هستند. مقایسه‌ی بیان ژنهای حامل میکرو RNA در دو لاین دابلدهاپلوئید مورد مطالعه، نشان داد که به غیر از miR296 و miR474 که در لاین شماره‌ی ۱ بیان بیشتری داشتند، بقیه میکرو RNAها در لاین شماره‌ی ۲ بیان بالاتری داشتند. این موضوع با توجه به پایین‌تر بودن میزان تولید روغن در لاین شماره‌ی ۱ نسبت به لاین شماره‌ی ۲ نشان‌دهنده‌ی ارتباط این دو میکرو RNA با تولید روغن است. miR483 در هیچ کدام از لاین‌ها بیان نداشت. miR113 و miR206 بالاترین میزان بیان را در بین همه میکرو RNAها داشتند. بیان بالاتر میکرو RNAها در لاین ۲ احتمالاً نشانگر فعالیت بالاتر مکانیسم خاموشی در سطح رونویسی برای ژنهای هدف در این لاین نسبت به لاین شماره‌ی ۱ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

ترانسکرپتوم، دابلدهاپلوئید، کاملینا، میکرو RNA.

نویسنده مسئول:

سجاد رشیدی منفرد

رایانامه: rashidims@modares.ac.ir

استناد به این مقاله:

فرهادی، لیلا، آرمینیان، علی و رشیدی منفرد، سجاد (۱۴۰۲). شناسایی میکرو RNAها و ژنهای هدف مرتبط در ترانسکرپتوم گیاه کاملینا. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۳)، ۵۵-۶۴.

مقدمه

دانه‌های روغنی پس از غلات دومین ذخایر غذایی جهان را تشکیل می‌دهند. هدف از مصرف روغن‌ها تأمین انرژی، اسیدهای چرب ضروری و ویتامین‌های محلول در چربی است. روغن‌های گیاهی به علت کاهش کلسترول خون واسطه‌های خوبی برای پخت غذا به حساب می‌آیند. بر اساس آمارهای موجود بیش از ۹۵ درصد روغن مورد نیاز کشور، وارداتی است (Raziei et al., 2018). وابستگی شدید کشور به واردات روغن‌های گیاهی، افزایش سرانه مصرف روغن در کشور و کاهش تولید روغن در داخل کشور از جمله موضوعات قابل تأمل در سیستم کشاورزی و صنایع غذایی کشور می‌باشند. گیاه کاملینا با نام علمی *Camelina sativa* L. روغنی- دارویی و متعلق به خانواده شب‌بوئیان (Brassicaceae) است که بومی شمال اروپا است و با عنوان کتان کاذب شناخته شده است (حسنی بلیانی، تدین و فدایی‌تهرانی، ۱۳۹۸) و علاوه بر مصارف خوراکی و درمانی، در صنعت به عنوان سوخت زیستی (Moser, 2016; Yang et al., 2016; Hoseini et al., 2018) و در مواد آرایشی بهداشتی (Gomez-Monedero et al., 2015) کاربرد دارد. برای تأمین مواد غذایی جمعیت با حفظ محیط‌زیست، کشاورزی نیازمند راهکارهایی در جهت کاهش استفاده از نهاده‌های شیمیایی و یا بهبود بهره‌وری از منابع طبیعی است. کشت گیاهانی مانند گیاه دانه روغنی کاملینا که عملکرد مطلوبی با حداقل استفاده از آب، کود و آفت‌کش‌ها، نسبت به گیاهان دانه روغنی معمول دارد، می‌تواند یک راهکار بالقوه در جهت تأمین بخشی از نیاز روغن خوراکی کشور باشد (Kahrizi et al., 2018). اگرچه کاملینا هنوز به طور گسترده کشت نمی‌شود، اما به دلیل انعطاف پذیری آن به عنوان یک گونه، می‌توان آن را گیاه خواهر کلزا (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) دانست (Kahrizi et al., 2023). این گیاه منبع غنی از روغن (۲۸ تا ۴۰ درصد)، اسیدهای چرب امگا ۳ و اسید اروسیک نسبتاً کم است (Chesnais et al., 2015). کاملینا قبل از سال ۲۰۰۵ یک گیاه تجاری محسوب نمی‌شد، اما با شناخت اسیدهای چرب امگا ۳ در این گیاه، کشت آن افزایش یافت (Kahrizi et al., 2023). در سالهای اخیر گرایش عمومی به روغن‌های باکیفیت، میزان توجه به این گیاه را افزایش داد و باعث شد کاملینا در مقیاس وسیعی در ایالات متحده، کانادا، کشورهای اروپایی، چین و استرالیا برای تحقیقات، کاربردهای خوراکی و به دلیل کم هزینه بودن تولید آن به عنوان ماده اولیه سوخت زیستی کشت شود (Dharavath et al., 2016). امروزه کشت کاملینا به دلیل بروز بحران‌های ناشی از مصرف انرژی‌های فسیلی، علاوه بر مصارف خوراکی، با هدف تولید سوخت زیستی هم

مورد توجه قرار گرفته است (درویشی، صبری و علوی، ۱۳۹۹). تعدادی لاین هاپلوئید مضاعف شده از این گیاه در دسترس است. در طول دهه گذشته، RNA-Sequencing (RNA-Seq) به یک ابزار ضروری برای آنالیزهای ترانسکریپتوم تفاوت بیان ژن و تفاوت پیرایش mRNAها، تبدیل شده است (Stark et al., 2019). کاربردهای آتی RNA-Seq به واسطه داده‌های خروجی بسیار حجیم هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند و می‌توانند بسیار متنوع باشند. امروزه با استفاده از تکنولوژی NGS، امکان توالی‌یابی و شناسایی طیف بسیار گسترده‌ای از ژن‌ها در مدتی کوتاه و در میان ژنوم پیچیده و عظیم گیاهی فراهم آمده‌است (Wang et al., 2009). از سوی دیگر نرم‌افزارهای متعددی برای سرهم‌بندی خوانش‌های خام حاصل از توالی‌یابی به وسیله هم‌ردیفی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع معرفی شده که عمل شناسایی ژن را در محیط نرم‌افزاری انجام می‌دهند (Duan et al., 2012). اما ژنوم مرجع برای بسیاری از گونه‌ها از جمله گونه مورد مطالعه در این پژوهش (کاملینا) در دسترس نیست. با این وجود و با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای به‌روز و معرفی تکنیک‌های NGS امکان مطالعه برای گونه‌های فاقد نقشه ژنومی نیز فراهم آمده (Bräutigam et al., 2011)، که در این حالت سرهم‌بندی *de novo*، این امکان را ایجاد کرده تا توالی کاملی از ترانسکریپتوم موجود را بازسازی و ژن‌های بیان‌شده در یک بافت خاص را شناسایی، مقدارسنجی و دسته‌بندی کنیم (Zhao et al., 2011).

میکروRNAها، RNAهای کوچک ۲۴-۱۹ هستند که به عنوان عوامل تنظیمی مهمی در بیان ژن‌ها مطرح می‌باشند. آنها توانایی تنظیم بیان ژن را در سطح پس از رونویسی دارند (Li et al., 2010). با وجود دانش موجود از نقش تنظیمی میکروRNAها، دخالت آنها در تنظیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی هنوز به خوبی درک نشده‌است (Park et al., 2002). اولین میکروRNA گیاهی را در گیاه *Arabidopsis thaliana* شناسایی و نقش آن را تعیین کرد. کارایی به کارگیری روش‌های بیوانفورماتیکی برای شناسایی میکروRNAها در سایر گیاهان مورد بررسی قرار گرفته‌است (Wang et al., 2012). بر پایه مطالعات یو و همکاران (2015)، فاکتور رونویسی SPL9، هدف mi156، مستقیماً به پروموتور ژن ترپن سنتز ۲۱ (TPS21) متصل شده و رونویسی آن را به طور مثبت تنظیم می‌کند و بدین ترتیب منجر به تنظیم مثبت سنتز سسکوئی ترپنوئید می‌شود (Yu et al., 2015). سیفی و همکاران (۲۰۱۵)، یازده میکروRNA را

جدول زیر آورده شده است (جدول ۱).

استخراج RNA، تهیه کتابخانه cDNA و توالی یابی

RNA هر نمونه با استفاده از روش Triazol طبق پروتکل مربوط، استخراج شد. کمیت و کیفیت RNAها به وسیله اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۱ درصد تعیین گردید. متعاقباً RNAهای هر لاین از گیاهان جهت توالی یابی و آنالیز RNA-Seq به شرکت Beijing Genomes institute ارسال گردید.

بررسی کیفیت نتایج توالی یابی

با توجه به تأثیر کیفیت داده‌های ورودی بر نحوه سرهم‌بندی ترنسکریپتوم، داده‌های توالی یابی شده توسط نرم‌افزار FastP (v0.20.1) از لحاظ کیفیت بررسی شدند و خوانش‌هایی که کیفیت لازم را نداشتند حذف شدند و نیز عملیات پیرایش برای خوانش‌های با کیفیت در صورت لزوم انجام گرفت.

سرهم‌بندی *de novo* خوانش‌ها

پس از فرآیند پردازش داده‌های حاصل از توالی یابی، از خوانش‌های با کیفیت بالا به عنوان توالی‌های ورودی برای سرهم‌بندی ترنسکریپتوم برگ کاملینا استفاده شد. سرهم‌بندی خوانش‌ها به صورت *de novo* توسط نرم‌افزار Trinity (v2.6) با استفاده از پارامترهای کلیدی $K=32$ و میزان پوشش خوانش ۲۰۰ در محیط لینوکس انجام گرفت.

همردیفی خوانش‌های اولیه روی کاتینگ‌های حاصل از

سرهم‌بندی خوانش‌ها

خوانش‌های کنترل کیفی و پیرایش شده با استفاده از نرم‌افزار Bowtie2 (v2.3.2) بر روی فایل خروجی حاصل از سرهم‌بندی همردیف شدند.

که در مسیر بیوسنتز استریول گلیکوزید نقش دارند را در گیاه استویا استخراج و ارتباط آنها را با سطح بیان میکرو RNA هدف آنها و همچنین محتوای استیول گلیکوزید اعتبارسنجی کردند (Saifi *et al.*, 2015). با استفاده از فناوری توالی یابی نسل جدید، چندین میکرو RNA درگیر در مسیر بیوسنتز سسکوئیتروپنوئید در گیاه زردینه (*X.strumarium*) شناسایی شده‌اند. از روش‌های بیوانفورماتیک برای پیش بینی میکرو RNAهای درگیر در متابولیسم تربنوئید در گیاه نعناء استفاده شده است (Singh *et al.*, 2016).

این مطالعه، یک بررسی جامع از جایگاه شناسایی میکرو RNAهای حفظ شده از طریق جستجو در داده‌های ترنسکریپتومی گیاه کاملینا می‌باشد و هدف از آن شناسایی میکرو RNAهای جدید در گیاه کاملینا و بررسی بیان برخی از میکرو RNAهای احتمالی شناخته شده با تأکید بر نقش تنظیمی آنها در مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که می‌تواند برای تحقیقات آینده بر روی این گیاه ارزشمند مفید باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

ابتدا بذور دو لاین دابلدهاپلوئید انتخاب شده از گیاه کاملینا در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران در گلدان‌هایی به ابعاد ۱۴cm که با خاک پیت و ورمیکولیت پر شده، کشت گردید و مراقبت‌های لازم جهت رشد و نگهداری آنها صورت گرفت. زمانی که ارتفاع گیاهان به ۷-۶ cm رسید، اندام‌های هوایی از سه گیاه که به صورت تصادفی از هر لاین انتخاب شدند، جمع آوری شده و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA نگهداری شدند (در مجموع ۶ نمونه). دو لاین مورد مطالعه در این پژوهش و مشخصات آنها در

جدول ۱. خصوصیات دولاین مورد مطالعه از نظر محتوی توکوفرول ها و اسیدهای چرب

لاین	توکوفرول کل (ppm)	گاما توکوفرول (ppm)	دلتا توکوفرول (ppm)	بتا توکوفرول (ppm)	آلفا توکوفرول (ppm)	عملکرد روغن (kg/ha)	C22:1 (درصد)	C20:1 (درصد)	C18:3 (درصد)	C18:2 (درصد)	C18:1 (درصد)	C16:0 (درصد)	درصد پروتئین	درصد روغن
۱	۸۴۱/۶۹	۸۰۶/۲۸	۱۸/۰۲	۱/۷۹	۱۵/۶۰	۲۹۳/۲۴	۳/۱۵	۱۴/۶۶	۳۴/۷۸	۱۶/۶۵	۱۵/۴۲	۶/۰۰	۲۹/۳۶	۳۵/۰۴
۲	۷۰۵/۴۷	۶۶۵/۸۸	۱۸/۷۵	۲/۶۱	۱۸/۲۳	۳۰۲/۹۳	۲/۸۸	۱۵/۲۹	۲۹/۶۲	۱۸/۷۱	۱۷/۷۶	۶/۰۷	۲۷/۴۲	۳۷/۱۷

$$MFEI = [MFE / \text{sequence length} \times 100] / (G+C\%)$$

شناسایی ژن‌های هدف میکروRNAها

علاوه بر تشخیص عملکرد زیستی میکروRNAها، یکی از مهم‌ترین موضوعات شناسایی ژن‌هایی است که میکروRNAها کنترل می‌کنند. میکروRNAها دارای نقش‌های مهم تنظیمی در بیان ژن در سطح پس از رونویسی با اتصال به mRNAهای هدف از طریق سرکوب ترجمه یا تجزیه mRNA هستند، بنابراین با استفاده از این ویژگی هدف‌های میکروRNA شناسایی می‌شوند (Dai and Zhao, 2011). شناسایی و آنالیز هستی شناسی ژن‌های هدف میکروRNAها از طریق پایگاه psRNATarget² انجام شد. با توجه به اینکه این پایگاه فاقد اطلاعات برای گونه مورد مطالعه بود، از اطلاعات موجود برای گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی کیفیت نتایج توالی‌یابی

نتایج حاصل از توالی‌یابی شامل ۴۸.۱۹۲۲۵۲ میلیون خوانش به طول ۱۵۰ جفت باز برای لاین شماره ۱ و ۴۸.۲۰۰۸۲۲ میلیون خوانش برای لاین شماره ۲، در قالب فایل فست پی (FastP) از طرف شرکت ارسال گردید. بعد از فیلتراسیون این مقادیر به ۴۸.۱۳۹۶۶۰ میلیون خوانش برای لاین ۱ و ۴۸.۱۱۴۵۳۴ میلیون خوانش برای لاین ۲ کاهش یافت. درصد خوانش‌های با کیفیت در لاین ۱ برابر با ۹۹.۸۹٪ و در لاین ۲ برابر با ۹۹.۸۲٪ بود که نشان دهنده کیفیت بالای توالی‌ها می‌باشد. درصد محتوای GC در لاین شماره ۱ برابر با ۴۵ درصد و در لاین شماره ۲ برابر با ۴۶ درصد بود.

سرهم‌بندی *de novo* خوانش‌ها

پس از حذف خوانش‌های با کیفیت پایین، توالی‌های آداپتور و پیرایش خوانش‌ها، عملیات ساخت فایل ترنسکرپتوم سرهم شده بر اساس تلفیق خوانش‌های کنترل شده برای هر دو لاین مورد مطالعه به روش *de novo* توسط نرم‌افزار Trinity انجام شد. پس از پیرایش و حذف خوانش‌های بی‌کیفیت تعداد ۸۲۲۴۳ ژن و در مجموع ۱۸۲۰۲۱ ایزوفورم شناسایی شد. بیش از ۵۰ درصد از کانتیگ‌ها دارای طول برابر یا بیشتر از ۱۶۹۶bp بودند

برآورد میزان فراوانی رونوش‌های حاصل از

سرهم‌بندی

برای بررسی میزان فراوانی خوانش‌های هم‌مدیف شده روی کانتیگ‌های سرهم شده حاصل از برنامه Bowtie2 از ابزار Salmon (v1.10.2) استفاده شد که این فرآیند با شمارش تعداد خوانش‌ها برای هر کانتیگ و نرمال سازی اندازه کتابخانه و طول کانتیگ‌ها برای هر ژن محاسبه می‌گردد.

شناسایی میکروRNAهای حفظ‌شده

شناسایی میکروRNAها طبق روش‌های محاسباتی گزارش شده انجام شد (Zhang *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008; Unver and Budak., 2009). پس از سرهم‌بندی *de novo* کانتیگ‌های حاصل برای شناسایی میکروRNAهای حفظ‌شده استفاده شد و در نهایت miRNAها توسط نرم‌افزار miRDeep2 (v37) شناسایی شدند. دو پارامتر مهم در شناسایی میکروRNA عبارتند از حفظ شده بودن توالی پیش‌ساز میکروRNA در توالی‌های ترانسکرپتوم و داشتن ساختار ثانویه سنجاق‌سری مناسب. همولوژی توالی‌های پیش‌ساز میکروRNA با توالی‌های ترانسکرپتومی کاملینا به صورت با استفاده از هم‌مدیفی آنها انجام می‌گیرد. از پارامترهایی که برای بررسی همولوژی توالی‌های مورد نظر میکروRNAهای شناخته شده توسط برنامه در نظر گرفته می‌شود می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: (الف) بیش از دو تفاوت نوکلئوتیدی بین توالی miRNA و توالی ترانسکرپتومی وجود نداشته باشد (ب) در ناحیه بالغ میکروRNA و توالی ترانسکرپتوم نباید هیچ نوع حذف شدگی اتفاق بیافتد.

پیش‌بینی ساختار دوم میکروRNAها

برای پیش‌بینی *in silico* ساختار دوم توالی‌های ترانسکرپتوم انتخاب شده از پایگاه محاسباتی تحت وب MFOLD¹ بر مبنای الگوریتم زوکر (Zoker 2003) استفاده گردید. ساختار دوم پیش‌بینی شده بیشترین انرژی MFEI و کمترین انرژی MFE را دارد. هر دو این پارامترها برای تشخیص میکروRNAها از دیگر RNAهای کوچک مهم می‌باشند. انرژی MFE نشان دهنده انرژی آزاد شکل دهنده منفی (G) ساختارهای دوم پیش‌بینی شده است و مقدار انرژی MFEI طبق معادله زیر محاسبه می‌شود.

1. <http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>

2. <https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>

میکروRNAهای شناخته شده با توالی خوانش‌ها انجام می‌گیرد. سپس بررسی ساختار ثانویه به منظور حذف نتایج مثبت کاذب در شناسایی میکروRNAهای حفظ شده بالقوه مورد استفاده قرار گرفت. همه عملیات‌های بالا با استفاده از پکیج mirDeep2 انجام می‌گیرد. در مرحله بعد پیش‌ساز میکروRNAهای با MFEI کمتر از $-0/8$ انتخاب شدند. مطالعات پیشین نشان می‌دهد بیش از ۹۶ درصد از پیش‌سازهای میکروRNAهای گیاهی دارای MFEI کمتر از $-0/6$ هستند (Bonnet *et al.*, 2004). به منظور کاهش نتایج مثبت کاذب و افزایش دقت، توالی‌های با شاخص MFEI کمتر از $-0/8$ در نظر گرفته شدند و مابقی توالی‌ها حذف شدند. پس از حذف رونوشت‌های مشابه در مجموع، خروجی نرم افزار mirDeep تعداد ۳۳ miRNA بود که مشخصات آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

(N50=1696bp). میانگین طول کانتینگ‌ها نیز برابر با bp ۱۰۹۱.۱۶ بود.

شناسایی میکروRNAهای حفظ‌شده

توالی‌های ترانسکریپتومی به عنوان بخشی از توالی ژن‌های بیان شده در موجودات محسوب می‌شوند، که برای شناسایی و بیان میکروRNAهای پیش‌بینی شده با استفاده از روش‌های محاسباتی تاکنون در موجودات مختلفی از جمله آراییوپسیس، ذرت و برنج بکار رفته است (Zhang *et al.*, 2006). اکثر میکروRNAهای شناسایی شده، قبلاً در گونه‌های گیاهی مدل از قبیل آراییوپسیس، برنج و صنوبر گزارش شده‌اند.

از آنجا که اکثر میکروRNAهای گیاهی حفظ‌شده هستند، شناسایی از طریق همسانی کمک مؤثری در پیدا کردن میکروRNAها می‌باشد. عملیات شناسایی از طریق همردیفی

جدول ۲. miRNAهای شناسایی شده در گیاه *Camelina sativa* با استفاده از توالی‌های ترانسکریپتوم

نام miRNA	بالغ miRNA توالی	GC%	MFE	MFEI	LP
DN3705_c0_g1_i1_113	ucaauagauuggacuauauau	45.2%	-47	-1.42	73
DN3705_c0_g1_i2_121	ucaauagauuggacuauauau	46.6%	-47	-1.38	73
DN3705_c0_g1_i5_117	ucaauagauuggacuauauau	46.6%	-47	-1.38	73
DN14520_c0_g1_i1_206	ugacagaagagagugagcac	61.4%	-47.2	-1.1	70
DN14520_c0_g1_i2_202	ugacagaagagagugagcac	61.4%	-47.2	-1.1	70
DN14520_c0_g1_i4_208	ugacagaagagagugagcac	61.4%	-47.2	-1.1	70
DN14520_c0_g1_i5_204	ugacagaagagagugagcac	61.4%	-47.2	-1.1	70
DN14911_c1_g2_i1_261	ugacagaagaagagagcac	60.5%	-31.8	-0.65	81
DN14911_c1_g2_i2_259	ugacagaagaagagagcac	60.5%	-31.8	-0.65	81
DN17822_c0_g1_i1_302	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-41.1	-0.85	76
DN17822_c0_g1_i2_300	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-41.1	-0.85	76
DN17822_c0_g1_i4_304	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-41.1	-0.85	76
DN17822_c0_g1_i5_298	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-41.1	-0.85	76
DN17822_c0_g1_i6_306	uugagccgugccaauaucacg	63.2%	-42.4	-0.88	76
DN18166_c0_g1_i1_477	ugauugagccgugccaauauc	55.4%	-46.8	-1.14	74
DN18166_c0_g1_i2_481	ugauugagccgugccaauauc	55.4%	-46.8	-1.14	74
DN18166_c0_g1_i3_483	ugauugagccgugccaauauc	55.4%	-46.8	-1.14	74
DN18166_c0_g1_i4_479	ugauugagccgugccaauauc	55.4%	-46.8	-1.14	74
DN21203_c0_g1_i1_253	ugacagaagagagugagcac	63.2%	-48.4	-1.01	76
DN21203_c0_g1_i2_257	ugacagaagagagugagcac	63.2%	-48.4	-1.01	76
DN21203_c0_g1_i4_255	ugacagaagagagugagcac	63.2%	-48.4	-1.01	76
DN21473_c0_g1_i1_290	ucccaaauguagacaagca	59.2%	-43	-0.96	76
DN21473_c0_g1_i2_294	cuuugucuacaauuuggaaa	56.8%	-42.8	-1.02	74
DN21473_c0_g1_i3_292	cuuugucuacaauuuggaaa	56.8%	-42.8	-1.02	74
DN21473_c0_g1_i5_296	ucccaaauguagacaagca	59.2%	-43	-0.96	76
DN23144_c0_g1_i1_474	ugccuggcuccuguaugcca	53.7%	-41.9	-0.95	82
DN23242_c0_g1_i1_286	uugagaguuuuuagucac	55.7%	-43.2	-1.1	70
DN23242_c0_g1_i2_284	uugagaguuuuuagucac	55.7%	-43.2	-1.1	70
DN23242_c0_g1_i3_282	uugagaguuuuuagucac	55.7%	-43.2	-1.1	70
DN25977_c0_g2_i1_244	acgguaucucuccuacguaac	65.2%	-33.4	-0.74	69
DN37516_c0_g1_i1_428	ugccuggcuccuguaugcca	67.9%	-46.3	-0.87	78
DN37516_c0_g1_i2_424	ugccuggcuccuguaugcca	67.9%	-46.3	-0.87	78
DN38160_c0_g1_i1_5	ugacagaagagagugagcac	59.5%	-41.9	-0.84	84

شده است (Zhang *et al.*, 2006; Dhandapani *et al.*, 2011). ساختار ثانویه میکروRNAهای شناسایی شده با هشت معیار اجباری شناسایی میکروRNA در گیاهان مطابقت داشت (Axtell *et al.*, 2011). در شکل ۱ نمونه‌ای از ساختار ثانویه پیش‌ساز تعدادی از میکروRNAهای شناسایی شده در کاملینا نشان داده شده است. بخش میکرو RNA بال و مکمل آن به رنگ قرمز و آبی در تصویر مشخص شده است.

پیش‌بینی ژن‌های هدف و چگونگی مهار آنها

بررسی ژن‌های هدف ۳۳ میکروRNAی شناسایی شده نشان داد که در مجموع ۱۴۱۵ ژن توسط این میکروRNAها، تنظیم می‌شوند که متعلق به چندین خانواده ژنی با عملکردهای زیستی متفاوت هستند. نتایج نشان داد که ۱۰۸۱ ژن با عمل تخریب شدن (Cleavage) و ۳۳۴ ژن با عمل ترجمه تنظیم می‌شوند. مشخصات تعدادی از ژن‌های هدف برای میکروRNAها در جدول ۳ آورده شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده کمترین میزان انرژی (MFE) برابر با $-48/4\text{kcal/mol}$ و بیشترین آن $-31/8$ می‌باشد. پیش‌سازهای miRNAها بایستی بالاترین انرژی MFE و کمترین انرژی MFEI را برای تشکیل ساختار ثانویه نسبت به RNAهای غیرکدکننده و کدکننده داشته باشند (Bonnet *et al.*, 2004). در نتایج ما، بالاترین انرژی (MFEI) برابر با $-0/65$ و کمترین آن $-1/42$ می‌باشد (جدول ۲). مقادیر به دست آمده شاخص MFEI در مقایسه با tRNA ($-0/64$)، rRNA ($-0/59$) و mRNA ($-0/66$) کمتر بود (Zhang *et al.*, 2006) که نشان می‌دهد پیش‌ساز میکروRNAهای شناسایی شده میکروRNAهای واقعی هستند. بیشترین و کمترین طول پیش‌سازهای miRNA به ترتیب ۸۴ و ۶۹ نوکلئوتید می‌باشد که با سایر مطالعات مطابقت داشته است (Patanunet *et al.*, 2013). پیش‌ساز میکروRNAها در ساختار ثانویه دارای ساختار سنجاق‌سری هستند. محتوای AU نیز در پیش‌ساز میکروRNAها در مقایسه با محتوای GC بالاتر بود که در مطالعات قبلی نیز گزارش

جدول ۳. ژن‌های هدف شناسایی شده برای میکروRNAهای شناسایی شده در گیاه *Camelina sativa*

miRNA	عمل miRNA	ژن هدف	شماره شناسایی ژن هدف
DN3705_c0_g1_i1_113	cleavage	Ferrochelatase 1	AT5G26030.1
DN3705_c0_g1_i2_121	cleavage	RNA binding family protein	AT3G12640.1
DN3705_c0_g1_i5_117	cleavage	transmembrane protein-related	AT2G46060.2
DN14520_c0_g1_i1_206	cleavage	Squamosa promoter binding protein	AT2G33810.1
DN14520_c0_g1_i2_202	cleavage	Squamosa promoter	AT1G27360.2
DN14520_c0_g1_i4_208	cleavage	Squamosa promoter binding protein	AT5G50670.1
DN14520_c0_g1_i5_204	cleavage	Protein kinase superfamily protein	AT3G28690.1
DN14911_c1_g2_i1_261	Translation	Squamosa promoter binding protein	AT1G27370.1
DN14911_c1_g2_i2_259	Translation	Squamosa promoter	AT1G27360.4
DN17822_c0_g1_i1_302	cleavage	GRAS family transcription factor	AT4G00150.1
DN17822_c0_g1_i2_300	cleavage	HXXXX-type acyl-transferase family protein	AT3G47170.1
DN17822_c0_g1_i4_304	cleavage	Succinyl-CoA ligase	AT5G23250.1
DN17822_c0_g1_i5_298	Translation	transposable element gene	AT3G43156.1
DN17822_c0_g1_i6_306	Translation	RING/U-box superfamily protein	AT2G38195.2
DN18166_c0_g1_i1_477	cleavage	GAP-like zinc finger-containing protein	AT1G08680.4
DN18166_c0_g1_i2_481	Translation	Ankyrin repeat family protein	AT1G10340.2
DN18166_c0_g1_i3_483	cleavage	BAK1-interacting receptor-like kinase	AT5G48380.1
DN18166_c0_g1_i4_479	cleavage	glutamate receptor 5	AT2G32400.1
DN21203_c0_g1_i1_253	cleavage	Protein kinase superfamily protein	AT3G28690.1
DN21203_c0_g1_i2_257	cleavage	Phosphofruktokinase family protein	AT1G20950.1
DN21203_c0_g1_i4_255	cleavage	Homeodomain-like superfamily protein	At3g04450.2
DN21473_c0_g1_i1_290	cleavage	Pseudogene of pentatricopeptide repeat-containing protein	AT1G62860.1
DN21473_c0_g1_i2_294	cleavage	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	AT5G22080.1
DN21473_c0_g1_i3_292	cleavage	pseudogene similar to wall-associated kinase	AT1G16140.1
DN21473_c0_g1_i5_296	Cleavage	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	AT1G62860.1
DN23144_c0_g1_i1_474	cleavage	Auxin response factor 17	AT1G77850.1
DN23242_c0_g1_i1_286	cleavage	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	AT1G06580.1
DN23242_c0_g1_i2_284	cleavage	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	AT4G19440.1
DN23242_c0_g1_i3_282	cleavage	RNA processing factor	AT1G62670.1
DN25977_c0_g2_i1_244	cleavage	auxin response factor 10	AT4G03560.1
DN37516_c0_g1_i1_428	cleavage	auxin response factor 17	AT2G28350.1
DN37516_c0_g1_i2_424	cleavage	TPX2 C-terminal	AT1G77850.1
DN38160_c0_g1_i1_5	cleavage	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	KAG7604870.1

است. در شاخصه TPM هر اندازه مقدار آن بالاتر باشد به معنی بیان بالاتر خواهد بود. در این پژوهش مقایسه‌ی بیان ژن‌های حامل میکروRNA در دو لاین دابلدهاپلوئید مورد مطالعه، نشان داد که به غیر از miR296 و miR474 که در لاین شماره ۱ بیان بیشتری داشتند، بقیه میکروRNAها در لاین شماره ۲ بیان بالاتری داشتند، این موضوع با توجه به پایین تر بودن میزان تولید روغن در لاین شماره ۱ نسبت به لاین شماره ۲ نشان‌دهنده‌ی ارتباط این دو میکرو RNA با تولید روغن می‌باشد. miR483 در هیچکدام از لاین‌ها بیان نداشت. TPM میکروRNAهای miR261، miR483، miR290، miR428 و miR424 در لاین شماره ۱ برابر با صفر و میکروRNAهای miR474 و miR483 در لاین شماره ۲ برابر با صفر بود. miR113 و miR206 بالاترین میزان بیان را در بین همه میکروRNAها داشتند (جدول ۴). بیان بالاتر میکرو RNAها در لاین ۲ احتمالاً نشانگر فعالیت بالاتر مکانیسم خاموشی در سطح رونویسی برای ژن‌های هدف در این لاین نسبت به لاین شماره ۱ می‌باشد.

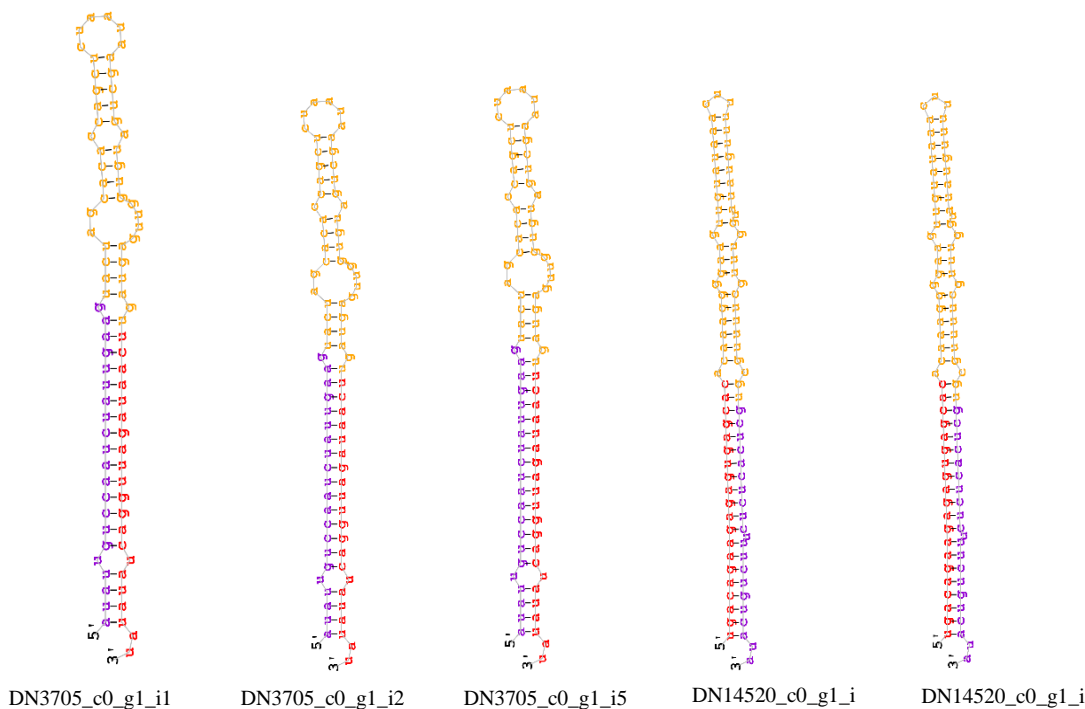
با توجه به نتایج هستی‌شناسی ژن‌های هدف، میکروRNAهای شناسایی شده در اغلب فرآیندهای زیستی و متابولیکی همچون تمایز، رشد و نمو، انتقال از مرحله رویشی به زایشی، انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نقش مهمی ایفا می‌کنند. از جمله هدف‌هایی که برای این میکروRNAها یافت شد، یکی پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور Squamusa و دیگری خانواده‌ی پروتئین کیناز هستند. پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور Squamusa، خانواده‌ی از فاکتورهای رونویسی هستند که با دمین اختصاصی متصل شونده به DNA شناخته می‌شوند.

بررسی بیان ژن‌های حامل میکروRNAها

بررسی بیان ژن‌های حامل میکروRNA با استفاده از شاخصه TPM (Transcript Per Millions) که بیانگر تعداد خوانش‌های نرمال همردیف شده به آن است و نیز تعداد خوانش‌های همردیف شده به هر کانتینگ (Counts) برآورد شده

جدول ۴. مقایسه بیان ژن‌های حامل میکروRNAها در دو لاین دابلدهاپلوئید گیاه *Camelina sativa*

ژن حامل miRNA	TPM	Counts	TPM	Counts
	لاین ۱	لاین ۱	لاین ۲	لاین ۲
DN3705_c0_g1_i1_113	3.348838	112	5.042535	157
DN3705_c0_g1_i2_121	3.804317	129	4.402651	139
DN3705_c0_g1_i5_117	3.723067	125	4.446943	139
DN14520_c0_g1_i1_206	1.723683	71	5.986439	230
DN14520_c0_g1_i2_202	1.505351	61	3.175338	120
DN14520_c0_g1_i4_208	0.191110	2	0.524956	5
DN14520_c0_g1_i5_204	0.606384	25	1.326222	51
DN14911_c1_g2_i1_261	0.000000	0	1.136626	3
DN14911_c1_g2_i2_259	1.001970	6	0.564513	3
DN17822_c0_g1_i1_302	0.535791	5	0.827527	7
DN17822_c0_g1_i2_300	0.554457	4	0.618492	4
DN17822_c0_g1_i4_304	0.774785	7	0.733549	6
DN17822_c0_g1_i5_298	0.280199	3	0.307638	3
DN17822_c0_g1_i6_306	1.448320	14	1.709714	15
DN18166_c0_g1_i1_477	0.237481	2	0.394586	3
DN18166_c0_g1_i2_481	0.297121	2	0.332606	2
DN18166_c0_g1_i3_483	0.000000	0	0.000000	0
DN18166_c0_g1_i4_479	0.629994	1	0.747529	1
DN21203_c0_g1_i1_253	0.360193	3	0.399172	3
DN21203_c0_g1_i2_257	0.228897	2	0.506336	4
DN21203_c0_g1_i4_255	0.326677	3	0.120204	1
DN21473_c0_g1_i1_290	0.000000	0	0.300922	1
DN21473_c0_g1_i2_294	0.321043	2	3.609178	20
DN21473_c0_g1_i3_292	0.780913	3	5.115676	17
DN21473_c0_g1_i5_296	0.368263	2	0.208759	1
DN23144_c0_g1_i1_474	0.606665	2	0.000000	0
DN23242_c0_g1_i1_286	0.186800	2	0.307638	3
DN23242_c0_g1_i2_284	0.358664	4	0.884868	9
DN23242_c0_g1_i3_282	0.144834	2	0.394657	5
DN25977_c0_g2_i1_244	0.821298	8	1.696204	15
DN37516_c0_g1_i1_428	0.000000	0	0.298755	2
DN37516_c0_g1_i2_424	0.000000	2	0.448132	3
DN38160_c0_g1_i1_5	0.188648	1	0.428456	2



شکل ۱. ساختار ثانویه پیش‌ساز تعدادی از میکروRNAهای شناسایی شده در *Camelina sativa*

عنوان ژن‌های هدف این میکروRNAها شناسایی شدند. در صورت بررسی دقیق عملکرد ژن‌های هدف میکروRNAها می‌توان از آنها برای مهندسی مسیرهای هدف و یا اصلاح اهداف مورد نظر بهره جست. امروزه این ابزار توانمندی بالایی خود برای نیل به این اهداف را در بسیاری از پروژه‌های مختلف انجام شده چه در گیاهان و چه در جانوان اثبات کرده است.

منابع

Brautigam, A., Mullick, T., Schliesky, S. and Weber, A.P.M. (2011). Critical assessment of assembly strategies for non-model species Mra-Seq data and application of next-generation sequencing to the comparison of C3 and C4 species. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3093-3102.

Chesnais, Q., Verzeaux, J., Couty, A., Le Roux, V., and Ameline, A. (2015). Is the Oil Seed Crop *Camelina sativa* a Potential host for aphid pests? *Bioenergy Research*, 8 (1), 91-99.

Darvishi, N., Sabri, M., & Alavi, M. (2021). Toward evaluation of the monolignol biosynthesis gene network with contemplation on the role of cinnamoyl coA reductase (CCR) gene family in *camelina sativa*. *Agricultural*

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر به منظور افزایش محتوای اطلاعات ژنتیکی کاملینا، پس از توالی‌یابی ترنسکرپتوم این گیاه، مرجع ترنسکرپتومی جامعی برای این گیاه ارزشمند سرهم‌بندی شد. مرجع ترنسکرپتومی ایجاد شده در مطالعه حاضر منبع بسیار غنی برای بررسی و تعیین خصوصیات میکروRNAهای حفظ‌شده گیاه کاملینا تشخیص داده شد، به طوری که در این مطالعه توالی ۳۳ میکروRNA حفظ‌شده در گیاه کاملینا شناسایی شدند.

میکروRNRها می‌توانند به عنوان ابزارهای اصلاحی جدید در بهبود ژنتیکی گیاهان عمل کرده و برخی از آنها تأثیر نیرومندی در تنظیم صفات عمده‌ی زراعی دارند. در این بررسی، برای تشخیص میکروRNAهای گیاه کاملینا، با یک رویکرد داده‌های زیستی مبتنی بر جستجوی همسانی، در ابتدا کانتیگ‌های سرهم شده بر اساس خوانش‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکرپتوم گیاه کاملینا در برابر میکروRNAهای شناخته شده‌ی پیشین، با استفاده از ابزار mirDeep2 همریف شدند و در نهایت ۳۳ میکروRNR نامزد متمایز در گیاه کاملینا شناسایی شد. این میکروRNAها نقش مهمی در مهار فرآیندهای زیستی مانند رشد و نمو، نور ساخت، سوخت و ساز و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. همچنین تعداد زیادی ژن از جمله ژن‌های پروتئین‌های متصل شونده به پروموتور *Squamusa* و ... به

- metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol*, 12(17), 1484-1495. doi: 10.1016/s09609822(02)01017-5.
- Raziei, Z., Kahrizi, D. and Rostami, A.H. (2018). Effects of climate on fatty acid profile in *Camelina sativa*. *Cellular and Molecular Biology*, 64(5), 91-96.
- Saifi, M., Nasrullah, N., Ahmad, M. M., Ali, A., Khan, J. A., & Abdin, M. Z. (2015). In silico analysis and expression profiling of miRNAs targeting genes of steviol glycosides biosynthetic pathway and their relationship with steviol glycosides content in different tissues of *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 57-64.
- Singh, N., Srivastava, S., Shasany, A. K., & Sharma, A. (2016). Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of *Mentha* spp. *Computational Biology and Chemistry*, 64, 154-162.
- Stark, R., Grzelak, M., Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews | Genetics*.
- Teimoori, N., Ghobadi M., Kahrizi D. 2023. Improving the Growth Characteristics and Grain Production of *Camelina (Camelina sativa L.)* under Salinity Stress by Silicon Foliar Application. *Agrotechniques in Industrial Crops*, 3(1), 1-13. 10.22126/ATIC.2023.8681.1081
- Wang, M., Wang, Q., & Wang, B. (2012). Identification and characterization of microRNAs in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.). *PLoS One*, 7(4), e33696.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10, 57-63.
- Yang, J., Caldwell, C., Corscadden, K., He, Q.S. and Li, J. (2019). An evaluation of biodiesel production from *Camelina sativa* grown in Nova Scotia. *Industrial Crops and products*, 81, 162-168.
- Yu, Z. X., Wang, L. J., Zhao, B., Shan, C.M., Zhang, Y.H., Chen, D.F., & Chen, X.Y. (2015). Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and *Patchouli (Pogostemon cablin)* by the miR156-targeted SPL transcription factors. *Molecular Plant*, 8(1), 98-110.
- Zhao, Q.-Y., Wang, Y., Kong, Y.-M., Luo, D., Li, X. and Hao, P. (2011). Optimizing de novo transcriptome assembly from short-read RNA-Seqdata: a comparative study. *BMC Bioinformatics*. 12: S2.
- Biotechnology Journal*, 12(4), 99-121. doi: 10.22103/jab.2020.16043.1245
- Dharavath, R. N., Singh, S., Chaturvedi, S., and Luqman, S. (2016). *Camelina sativa* Crantz a mercantile crop with speckled pharmacological activities. *Annals of Phytomedicine: An international journal*, 5(2), 6-26.
- Duan, J., Xia, C., Zhao, Jia, J. and Kong, X. (2012). Optimizing de novo common wheat transcriptome assembly using short-read RNA-Seq data. *BMC genomics*. 13, 392.
- Fallah, F., Kahrizi, D., Rezaeizad, A., Zebarzadi, A., & Zarei, L. (2020). Evaluation of Genetic Variation and Parameters of Fatty Acid Profile in Doubled Haploid Lines of *Camelina sativa* L. *Plant Genetic Researches*, 6(2), 79-96.
- Fereidooni L., Tahmasebi Z., Kahrizi D., Safari H., Arminian A. (2023). Evaluation of Drought Resistance of *Camelina (Camelina sativa L.)* Doubled Haploid Lines in the Climate Conditions of Kermanshah Province. *Agrotechniques in Industrial Crops* x(x): xx-xx. 10.22126/ATIC.2023.9570.1111
- Gomez-Monedero, B., Bimbela, F., Arauzo, J., Faria, J. and Ruiz, M.P. (2015). Pyrolysis of red eucalyptus, camelina straw wheat straw in an ablative reactor. *Energy & Fuel*, 29(3), 1766-1775.
- Hasani Balyani, M., Tadayon, M. R., & Fadaei Tehrani, A. A. (2020). Evaluation of some growth and yield traits of *Camelina sativa* L. under the influence of biological and chemical fertilizers. *Isfahan University of Technology-Journal of Crop Production and Processing*, 10(1), 39-51.
- Hoseini, S., Najafi, G., Ghobadian, B., Yusaf, T. and Ebadi, M. (2018). The effects of *Camelina Soheil* as a novel biodiesel fuel on the performance and emission characteristics of diesel engine. *Applied Sciences*, 8(6), 1010.
- Kahrizi, D. (2018). *Soheil* cultivar report of *Camelina* plant for cultivation in different regions of the country. Registration and certification of seeds and seedlings. Spring and summer 24-27. (in Persian).
- Li, L., Li, M., Qi, X., Tang, X., Zhou, Y. (2018). De novo transcriptome sequencing and analysis of genes related to salt stress response in *Glehnia littoralis*. *Peerj* 6: e5681;
- Moser, B.R. (2016). Fuel property enhancement of biodiesel fuels from common and alternative feed stocks via complementary blending. *Renewable Energy*, 85, 819-825.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA