

**Bioinformatics study of Multi-layered regulatory mechanisms involved in tanshinone biosynthesis in the medicinal plant Chinese sage (*Salvia miltiorrhiza*)**Narges Yazarloo¹ , Mohammad Mahdi Taghvaei^{*2} , Mohammad Mohsenzadeh Golfazani³ , Habibollah Samizadeh Lahiji⁴

1. Ph.D. Student of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2*. Ph.D. Graduate of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Associate Professor of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

4. Professor of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

ARTICLE INFO**Article history**

Submitted: 2025-12-11

Revised: 2026-06-23

Accepted: 2026-07-18

KEYWORDSSalvia miltiorrhiza,
Tanshinone, MicroRNA,
Transcription factor, Promoter**ABSTRACT**

In modern societies, where immune disorders, inflammation, and chronic diseases are increasingly prevalent, the identification of natural sources containing bioactive compounds has become particularly important for promoting health. *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage), owing to its content of phenolic acids and tanshinones with antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties, is considered one of the most important medicinal plants with substantial therapeutic and research potential. This study aimed to elucidate the multilayered regulatory network controlling tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*, focusing on microRNA–gene interactions, transcription factors, and cis-regulatory elements. mRNA sequences of three key pathway genes (CPS1, KSL1, and CYP) were retrieved from the NCBI database, and microRNA sequences were collected from miRBase. Target prediction was performed using psRNATarget with an Expectation threshold of 5. Network architecture were visualized in Cytoscape. Promoter sequences (~2000 bp upstream) were extracted and analyzed for transcription factor binding sites using PlantRegMap and PlantCARE, with results processed for graphical representation in TBtools. A total of 252 microRNAs from 28 families were identified as targeting these three genes (CPS1: 84, KSL1: 90, CYP: 79). Dominant families included miR781/miR319/miR482 for CPS1, miR156/miR902 for KSL1, and miR2630/miR399 for CYP. Several microRNAs (e.g., miR7492 and miR482) targeted multiple pathway genes simultaneously, indicating cooperative regulatory activity and the potential for enhanced post-transcriptional repression. Transcription factor binding site analysis revealed high-frequency interactions (KSL1: 387, CPS1: 240, CYP: 159) involving WRKY, ERF, MYB, bZIP, and Dof families. Promoters were enriched in cis-elements responsive to light, ABA, MeJA, and gibberellin. These findings demonstrate that tanshinone biosynthesis is governed by a coordinated transcriptional and post-transcriptional network, allowing dynamic modulation and co-regulation in response to environmental and hormonal signals. The identified genes and microRNAs represent promising targets for experimental validation (e.g., ChIP-qPCR, EMSA) and metabolic engineering strategies, including CRISPR and RNAi, to enhance tanshinone production.

* Corresponding author: Mohammad Mahdi Taghvaei

✉ E-mail: Mahdi.taghvaei@gmail.com





مقاله پژوهشی

بررسی بیوانفورماتیکی مکانیزم‌های تنظیمی چندلایه‌ای دخیل در بیوسنتز تانن‌ها در گیاه دارویی مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza*)

نرگس یازلو^۱، محمد مهدی تقوایی^{۲*}، محمد محسن زاده گلفزانی^۲، حبیب الله سمیع زاده لاهیجی^۴

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲. دانش آموخته دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳. دانشیار بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۴. دکترای تخصصی، استاد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۴-۰۹-۲۰

بازنگری: ۱۴۰۵-۰۴-۰۲

پذیرش: ۱۴۰۵-۰۴-۲۷

واژگان کلیدی:

Salvia miltiorrhiza، تانن‌ها، MicroRNA، فاکتور رونویسی، پروموتور.

چکیده: در جوامع مدرن که اختلالات ایمنی، التهاب و بیماری‌های مزمن رو به افزایش است، شناسایی منابع طبیعی با ترکیبات زیست‌فعال برای تقویت سلامت اهمیت ویژه‌ای دارد. مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza*) به‌دلیل دارا بودن اسیدهای فنولیک و تانن‌ها با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی با پتانسیل بالای دارویی و تحقیقاتی محسوب می‌شود. هدف این مطالعه بررسی شبکه‌ی تنظیمی چندلایه حاکم بر بیوسنتز تانن‌ها در *Salvia miltiorrhiza* از منظر برهم‌کنش‌های ژن microRNA-، فاکتورهای رونویسی و عناصر سیس بود. توالی‌های mRNA سه ژن کلیدی مسیر (CPS1، KSL1 و CYP) از بانک اطلاعاتی NCBI بازیابی شد. مجموعه توالی‌های microRNA از miRBase گردآوری گردید و پیش‌بینی ژن‌های هدف با نرم‌افزار psRNA Target انجام شد. ساختار شبکه با Cytoscape ترسیم شد. توالی‌های پروموتور (~۲۰۰ جفت باز بالادست) استخراج و برای پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی به PlantRegMap و PlantCARE ارسال و نتایج برای نمایش گرافیکی در TBtools پردازش شد. تحلیل‌ها ۲۵۲ microRNA از ۲۸ خانواده را به‌عنوان هدف‌گیرنده‌ی این سه ژن شناسایی کرد (۸۴ CPS1، ۹۰ KSL1، ۷۹ CYP). خانواده‌های غالب شامل miR781/miR319/miR482 برای CPS1، miR156/miR902 برای KSL1 و miR2630/miR399 برای CYP معرفی شدند. برخی miRNAها (مثلاً miR482 و miR7492) هم‌زمان چند ژن مسیر را هدف گرفتند که نمایانگر همکاری miRNAها و قابلیت تقویت مهار پارونویسی است. پیش‌بینی جایگاه‌های فاکتور رونویسی نشان‌دهنده شمارگان بالای اتصال (۳۸۷: CPS1، KSL1، 240: CYP، 159) با حضور خانواده‌های WRKY، MYB، bZIP و Dof بود. عناصر سیس پاسخ‌دهنده به نور، MeJA، ABA و جیبرلین در پروموتورها فراوان بودند. یافته‌ها نشان می‌دهد بیوسنتز تانن‌ها تحت کنترل یک شبکه‌ی هماهنگ رونویسی و پارونویسی است که امکان تنظیم پویا و هم‌تنظیم پاسخ به سیگنال‌های محیطی و هورمونی را فراهم می‌آورد. ژن‌ها و miRNAهای شناسایی‌شده، اهداف مناسبی برای اعتبارسنجی تجربی (ChIP-qPCR، EMSA) و مهندسی متابولیک با ابزارهایی نظیر CRISPR/RNAi جهت افزایش تولید تانن‌ها ارائه می‌کنند.

✉ E-mail: Mahdi.taghvaei@gmail.com

Journal homepage: jmpb.znu.ac.ir

*نویسنده مسئول: محمد مهدی تقوایی



مقدمه

در جوامع مدرن، بخش قابل توجهی از جمعیت از سلامت مطلوبی برخوردار نیستند. پاسخ ایمنی طبیعی نقش مهمی در محافظت از بدن دارد؛ اما پاسخ ایمنی اکتسابی نیز برای مصونیت در برابر التهاب، عفونت و تومور ضروری است (Akiyama et al., 2020). مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza*) یکی از شناخته‌شده‌ترین گونه‌های تیره مریم‌گلی، گیاهی چندساله از خانواده نعنائیان است. این گیاه که به نام دانشن هم شناخته می‌شود، دارای ارزش اقتصادی، دانشگاهی و دارویی فراوان است (Lu, 2021). دو دسته اصلی از ترکیبات فعال زیستی در مریم‌گلی وجود دارد که شامل اسیدهای فنولیک آب‌دوست و تانن‌های چربی‌دوست است. اسیدهای فنولیک محلول در آب، مانند رزمارینیک اسید (RA)، سالویانولیک اسید (SAB) B، اسید سالویانولیک A (SAA) و اسید کافئیک (CA) دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی هستند. تانن‌های محلول در چربی، از جمله تانن‌های I (TI) و تانن‌های II (TIIA)، کریپتوتانن‌های (CT) و دی‌هیدروتانن‌های (DT)، ترپنوئیدهای فعال زیستی اصلی این گیاه هستند که عمدتاً از ریشه‌های خشک گیاه مریم‌گلی جدا می‌شوند (Hao et al., 2020). تانن‌های این گیاه از دی‌ترین‌کینون‌ها هستند که خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی دارند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات نشان داده است که آن‌ها قادرند رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند و استرس اکسیداتیو را کاهش دهند؛ سازوکاری که نقش مهمی در پیشگیری از آسیب‌های سلولی و کند کردن روند پیشرفت بیماری‌های مزمن ایفا می‌کند. علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانی، پژوهش‌های متعددی بر پتانسیل ضدسرطانی تانن‌های متمرکز شده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که این ترکیبات می‌توانند آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) را در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی القا کنند، چرخه سلولی را متوقف سازند و رگ‌زایی را مهار کنند (Jiang et al., 2019). مسیر MVA (مولونات) و مسیر MEP (متیل اریتریتول

فسفات)، هر دو در بیوسنتز ایزوپرنوئیدها بسیار مهم هستند. در مریم‌گلی، بیوسنتز تانن‌ها با تشکیل پیش‌سازهای ایزوپرنوئید جهانی (IPP و DMAPP) از طریق مسیرهای MVA یا MEP آغاز می‌شود، سپس با سنتز ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات (GGPP) به دی‌ترپنوئید ادامه پیدا می‌کند. یک آنزیم دی‌ترین سنتاز مانند Copalyl diphosphate synthase (CPS) GGPP را به کوپالیل دی‌فسفات (CPP) تبدیل می‌کند و سپس سیکلازهای مرتبط مانند Kaurene synthase-like (KSL) با چرخه‌سازی، CPP را به دی‌ترین تاخورده خاصی به نام میلی‌تیرادین تبدیل می‌کند. مرحله بعدی شامل یک‌سری مراحل آنزیمی است که گروه‌های عملکردی لازم را اضافه می‌کند. میلی‌تیرادین تحت چندین دور اکسیداسیون قرار می‌گیرد که معمولاً توسط Cytochrome P450s (CYPs) انجام می‌شود. این آنزیم‌ها مسئول معرفی گروه‌های هیدروکسیل و تشکیل بخش کینون ضروری برای تانن‌ها هستند. رویدادهای اکسیداسیون منجر به واسطه‌های مختلفی مانند فروژینول و در نهایت منجر به تولید تانن‌های مختلفی می‌شوند (Ma et al., 2015).

تنظیم بیان ژن یکی از سازوکارهای بنیادی در کنترل مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی است که عمدتاً از طریق تنظیم رونویسی و عناصر تنظیمی سیس فعال موجود در نواحی پروموتری ژن‌ها اعمال می‌شود. در گیاه *Salvia miltiorrhiza*، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی، بیوسنتز دی‌ترین‌های زیست‌فعال نظیر تانن‌ها وابسته به فعالیت هماهنگ آنزیم‌های کلیدی مسیر، از جمله CPS1 و KSL1 در مراحل ابتدایی و اعضای خانواده CYPs در مراحل پایانی و اصلاحات ساختاری این ترکیبات است (Cui et al., 2015). عناصر تنظیمی سیس موجود در پروموتور این ژن‌ها با ایفای نقش محوری خود در دریافت و ادغام سیگنال‌های محیطی و هورمونی، تعیین‌کننده شدت و

بررسی بیوانفورماتیکی مکانیزم‌های تنظیمی چندلایه‌ای دخیل در بیوسنتز تانیشنون در گیاه دارویی مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza*) / یازرلو، نرگس؛ تقوایی، محمد مهدی؛ محسن زاده گل‌فرانی، محمد؛ سمیع زاده لاهیجی، حبیب‌الله.

الگوی بیان ژن‌ها هستند و بدین ترتیب، بر میزان و تنوع متابولیت‌های ثانویه تولید شده اثر می‌گذارند. درک ساختار و عملکرد این عناصر تنظیمی می‌تواند شالوده‌ای برای تبیین مکانیسم‌های مولکولی حاکم بر کنترل مسیر بیوسنتز تانیشنون و توسعه راهبردهای مهندسی متابولیک هدفمند فراهم آورد. علاوه بر عناصر سیس پروموتری، تنظیم دقیق مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نیازمند عملکرد هماهنگ تنظیم‌کننده‌های بالادستی در سطوح مختلف بیان ژن است. فاکتورهای رونویسی (Transcription Factors; TFs) با اتصال اختصاصی به عناصر سیس پروموتری، نقش محوری در فعال‌سازی یا سرکوب رونویسی ژن‌های ساختاری مسیرهای متابولیکی ایفا می‌کنند و به‌عنوان واسطه‌ای میان سیگنال‌های رشدی، هورمونی و محیطی و پاسخ‌های متابولیکی عمل می‌نمایند (Guo et al., 2024). در گیاهان دارویی، خانواده‌های مختلف TF، از جمله MYB، bZIP، WRKY، ERF، bHLH/MYC، به‌طور گسترده‌ای در تنظیم مسیرهای ترپنوئیدی گزارش شده‌اند و افزایش یا کاهش بیان آن‌ها می‌تواند به تغییرات چشمگیر در تجمع متابولیت‌های ثانویه منجر شود (Ding et al., 2017). در کنار تنظیم رونویسی، شواهد فزاینده‌ای نشان می‌دهد که تنظیم پسارونویسی با واسطه microRNAها (miRNAs)، لایه کنترلی مکمل و ضروری برای تعدیل بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی محسوب می‌شود. miRNAها با هدف‌گیری اختصاصی mRNA ژن‌های ساختاری یا حتی برخی فاکتورهای رونویسی، از طریق تخریب mRNA یا مهار ترجمه، شدت و پایداری بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند (Xie et al., 2012). مطالعات انجام‌شده در گیاهان دارویی مختلف و به‌ویژه در *S. miltiorrhiza*، نشان داده‌اند که

miRNAهایی نظیر miR858 می‌توانند از طریق شبکه‌های miRNA-TF نقش مهمی در تنظیم بیوسنتز تانیشنون و اسیدهای فنولیک ایفا کنند (Zhu et al., 2024). مطالعات انجام‌شده در گیاهان دارویی مختلف نشان داده‌اند که miRNAهایی نظیر miR156، miR319 و miR858، در شکل‌دهی پاسخ‌های متابولیکی و تنظیم مسیرهای ترپنوئیدی نقش کلیدی دارند (Eom and Hyun, 2025).

هدف از انجام این مطالعه، ارائه تحلیلی جامع و یکپارچه از شبکه تنظیمی چندلایه حاکم بر بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز تانیشنون در *S. miltiorrhiza* با تمرکز بر تعامل هماهنگ عناصر سیس، فاکتورهای رونویسی و miRNAها است. در این پژوهش با استفاده از رویکردهای بیوانفورماتیکی، نواحی پروموتری ژن‌های *CYP*، *KSL1* و *CPS1* به‌منظور شناسایی عناصر سیس فعال و جایگاه‌های بالقوه اتصال فاکتورهای رونویسی بررسی شده و هم‌زمان شبکه‌های برهم‌کنش miRNA-mRNA پیش‌بینی گردیده‌اند. نوآوری اصلی این مطالعه در فراتر رفتن از تحلیل‌های تک‌لایه و ارائه مدل تنظیمی مفهومی یکپارچه است که به‌صورت سیستماتیک نشان می‌دهد چگونه تنظیم رونویسی و پسارونویسی به‌طور هماهنگ بیان ژن‌های مسیر تانیشنون را کنترل می‌کنند. نتایج این پژوهش نه‌تنها شکاف دانشی موجود در زمینه تنظیم مولکولی بیوسنتز تانیشنون را پر می‌کند، بلکه چارچوبی فرضیه‌ساز برای مطالعات عملکردی آینده و توسعه راهبردهای مهندسی متابولیک هدفمند در تولید تانیشنون‌ها فراهم می‌آورد.

مواد و روش‌ها

شناسایی miRNAهای مؤثر بر ژن‌های KSL1،

CYP و CPS1

در این تحقیق به بررسی بیوانفورماتیکی miRNAهای نقش‌آفرین در تنظیم برخی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز تانیشینون در گیاه مریم‌گلی چینی پرداخته شد. در مراحل اولیه، توالی‌های mRNA مربوط به ژن‌های هدف از طریق پایگاه داده NCBI استخراج و گردآوری شده‌اند تا زمینه لازم برای شناسایی دقیق miRNAهای مؤثر فراهم گردد. سپس با استفاده از پایگاه داده معتبر mirbase، توالی‌های miRNA گیاهی مورد نیاز برای انجام تحلیل‌های مقایسه‌ای دریافت شد تا امکان ارتباط‌گیری بین این توالی‌ها و mRNAهای ژن‌های هدف به وجود آید. فرایند شناسایی ارتباط میان miRNAها و ژن‌های مربوط از طریق نرم‌افزار psRNA Target 2017 با در نظر گرفتن Expectation=5 انجام شد. این نرم‌افزار توانست به‌طور خودکار تطبیق مورد نظر را بین توالی‌های دریافت‌شده برقرار کند. در نهایت، برای نمایش بصری و ترسیم نقشه‌ای جامع از روابط بین miRNAهای شناسایی‌شده و ژن‌های هدف در گیاه، از نرم‌افزار Cytoscape 3.10.3 بهره گرفته شد؛ به‌طوری‌که ساختارهای مولکولی و مسیرهای تنظیمی به‌دقت و با جزئیات کافی نشان داده شدند (Taghvaei et al., 2022).

شناسایی جایگاه‌های اتصال فاکتور رونویسی

CYP و CPS1، KSL1 ژن‌های

توالی‌های پروموتور مربوط به هریک از اعضای خانواده ژن‌های KSL1، CPS1 و CYP از پایگاه داده ژنوم گیاه *S.miltiorrhiza* استخراج گردید. برای هر ژن، یک بخش به طول تقریبی ۲۰۰۰ جفت باز از ناحیه بالادست ناحیه شروع رونویسی انتخاب شد تا به‌عنوان توالی پروموتور مورد بررسی قرار گیرد (Fu et al., 2024). پس از استخراج، تمامی توالی‌ها در قالب یک فایل FASTA سازماندهی شدند تا امکان پردازش و تحلیل دسته‌جمعی

فراهم شود. فایل آماده‌شده سپس به پایگاه داده و ابزار آنلاین PLANTREGMAP ارسال گردید. این وب‌سایت به‌طور تخصصی برای شناسایی و پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی در گیاهان طراحی شده است و می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه شبکه‌های تنظیمی ژنی ارائه دهد. داده‌های حاصل از تحلیل PLANTREGMAP پس از دریافت، وارد نرم‌افزار TBtools شدند. در این نرم‌افزار، با استفاده از ماژول Simple BioSequence Viewer، توالی‌ها و نتایج به دست آمده مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند (Fu et al., 2024).

Cis شناسایی عناصر تنظیمی

برای شناسایی عناصر تنظیمی سیس در ژن‌های KSL1، CPS1 و CYP در گیاه *S.miltiorrhiza*، ناحیه پروموتور هر ژن مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، بخش ۲۰۰۰ جفت باز بالادست ناحیه شروع رونویسی از ژنوم اینگونه استخراج شد. انتخاب این ناحیه به دلیل اهمیت آن در فرایند تنظیم رونویسی و احتمال حضور جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی صورت گرفت و به‌عنوان توالی پروموتور برای تحلیل‌های بعدی استفاده شد. پس از استخراج، توالی‌های پروموتور به پایگاه داده PlantCARE ارسال شدند تا عناصر سیس احتمالی شناسایی شوند. نتایج حاصل از این تحلیل برای نمایش گرافیکی و بررسی دقیق‌تر وارد نرم‌افزار TBtools گردید. با استفاده از ابزارهای موجود در این نرم‌افزار، نقشه عناصر تنظیمی سیس ترسیم شد و موقعیت و پراکندگی آن‌ها در طول توالی پروموتور مشخص گردید (Mohsenzadeh Golfazani et al., 2022; Taghvimimi et al., 2024).

نتایج و بحث

بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارویی در گیاهان تحت کنترل شبکه‌های تنظیمی پیچیده‌ای در سطوح مختلف بیان ژن قرار دارد. در این مطالعه، با بهره‌گیری از رویکردهای بیوانفورماتیکی، شبکه‌ای چندلایه شامل microRNAها،

بررسی بیوانفورماتیکی مکانیزم‌های تنظیمی چندلایه‌ای دخیل در بیوسنتز تانیشینون در گیاه دارویی مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza*) / یازرلو، نرگس؛ تقوایی، محمد مهدی؛ محسن زاده گل‌فرزانی، محمد؛ سمیع زاده لاهیجی، حبیب‌الله.

فاکتورهای رونویسی و عناصر تنظیمی، سیس مرتبط با ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز تانیشینون در *Salvia miltiorrhiza* شناسایی و تحلیل شد. نتایج نشان داد که تنظیم بیان ژن‌های CPS1، KSL1 و CYP نه‌تنها به‌صورت خطی، بلکه در قالب شبکه تنظیمی هماهنگ و پویا انجام می‌شود.

تجزیه و تحلیل miRNAهای مؤثر بر ژن‌های KSL1، CPS1 و CYP

کل miRNAهای گیاهی با هدف قرار دادن ژن‌های CPS1، KSL1 و CYP مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند که شامل ۲۵۲ miRNA و ۲۸ خانواده هستند. اطلاعات دقیق miRNAهای شناسایی‌شده در شکل ۱ ارائه شده است (اطلاعات تکمیلی در پیوست ۱ قرار دارد). تعداد ۸۴ miRNA برای ژن CPS1 شناسایی شد که بیشتر آن‌ها متعلق به خانواده‌های miR781، miR319 و miR482 بودند. در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا، ath-miR781 یک microRNA است که به‌عنوان هدف قراردهنده mRNA ژن AT4G34890 شناسایی شده است که آنزیم زانتین دی‌هیدروژناز (XDH1) را رمزگذاری می‌کند. نقش محوری در کاتابولیسم پورین، مسیر متابولیکی حیاتی برای بازیافت بازهای نیتروژنی، ایفا می‌کند و همچنین با فرایندهایی مانند پیری برگ و پاسخ به تنش‌های محیطی مانند شوری، سرما و تاریکی مرتبط است (Sakuraba et al., 2024). miR319 یک microRNA محوری در گیاهان است که فرایندهای رشدی، به‌ویژه ریخت‌زایی برگ را با تنظیم پس از رونویسی زیرمجموعه‌ای از فاکتورهای رونویسی در خانواده TCP تنظیم می‌کند. در آرابیدوپسیس و سایر گونه‌های گیاهی، miR319 به mRNAهای چندین ژن TCP (از جمله TCP2، TCP3، TCP4، TCP10 و TCP24) متصل و منجر به برش یا سرکوب ترجمه آن‌ها می‌شود. این تنظیم هدفمند به‌طور مستقیم بر تکثیر و تمایز سلولی در حاشیه برگ تأثیر می‌گذارد (Koyama et al., 2017). مطالعات انجام‌شده در گونه‌هایی مانند *Brassica juncea*، نواحی پروموتوری

همولوگ‌های miR319 را بررسی کرده و واگرایی قابل توجه در الگوهای تنظیمی آن‌ها را آشکار ساخته‌اند. نتایج این مطالعات نشان داد که تحت تنش‌هایی مانند سرما، شوری و گرما، پروموتورهای مختلف miR319 الگوهای بیان مکانی - زمانی متمایزی از خود نشان می‌دهند. این یافته‌ها بیانگر آن است که miR319 نه‌تنها در تنظیم فرایندهای رشدی نقش دارد، بلکه با ادغام سیگنال‌های ناشی از تنش، تنظیم پویای رشد گیاه را نیز هدایت می‌کند (Joshi et al., 2021). miR482 ابرخانواده microRNA حفاظت‌شده در گیاهان است که نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و تا حدودی فرایندهای رشدی ایفا می‌کند. عملکرد اصلی آن حول هدف قرار دادن رونوشت‌های ژن‌های تکرار غنی از لوسین (NBS-LRR) در محل اتصال نوکلئوتید می‌چرخد که نقش کلیدی در شناسایی پاتوژن فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی گیاه دارند. miR482 با اتصال به این mRNAها، معمولاً تخریب آن‌ها را آغاز یا ترجمه آن‌ها را سرکوب می‌کند و در نتیجه، سطح پروتئین‌های مقاومت را تعدیل می‌کند. این عمل تنظیمی به جلوگیری از فعالیت بیش از حد سیستم ایمنی که در غیر این صورت ممکن است رشد و نمو طبیعی گیاه را به خطر بیندازد، کمک می‌کند (Kuang et al., 2022; Zhang et al., 2024). علاوه بر عملکرد ایمنی آن، تحقیقاتی که microRNAهای ژنومی را در گل‌ابی تجزیه و تحلیل می‌کنند، نشان داد که pbr-miR482 رونوشت‌های خاصی را که در دفاع و ویروسی نقش دارند، هدف قرار می‌دهد و در نتیجه، به تعدیل پاسخ‌های ضدویروسی کمک می‌کند (Zhang et al., 2019). همچنین ۹۰ miRNA برای ژن KSL1 شناسایی شد که تحت تأثیر چند خانواده miRNA قرار گرفت که بیشتر آن‌ها متعلق به خانواده‌های miR156 و miR902 بودند. تحقیقات نشان داده‌اند که دینامیک بیان miR156 می‌تواند در بافت‌های مختلف و گونه‌های گیاهی مختلف متفاوت باشد؛ برای مثال، در برنج (*Oryza sativa*)، در حالی که کل شاخه ممکن است از روند معمول کاهش miR156 برای افزایش بلوغ پیروی کند، سطح miR156 در برگ‌های منفرد می‌تواند با افزایش سن برگ افزایش یابد. این تنظیم خاص بافت نشان می‌دهد که miR156 نه‌تنها گذارهای رشدی گسترده را

کنترل می‌کند، بلکه بیان زمانی ژن‌های متعدد را نیز در طول فرایندهایی مانند رشد برگ تنظیم می‌کند (Xie et al., 2012). مقالات اخیر نشان داده‌اند که شبکه تنظیمی miR156-SPL به نشانه‌های محیطی خارجی حساس است؛ برای مثال، مطالعات مدل‌سازی و آزمایش‌ها نشان می‌دهد که سطح بالای CO₂ می‌تواند بر پویایی بیان miR156 تأثیر بگذارد و در نتیجه، زمان گل‌دهی را تنظیم کند. حلقه‌های بازخوردی تعبیه‌شده در این شبکه نه تنها به گذارهای رشدی تحت شرایط متغیر محیطی استحکام می‌بخشند، بلکه نشان می‌دهند که miR156 ممکن است گره‌ای حیاتی برای سازگاری با تغییرات اقلیمی باشد (Zhang et al., 2023). miR156 نه تنها بر زمان‌بندی گذارهای رشدی تأثیر می‌گذارد، بلکه در متابولیسم ثانویه نیز نقش دارد. این عملکرد دوگانه پتانسیل بالایی برای بهبود محصول ارائه می‌دهد؛ زیرا تنظیم دقیق بیان miR156 می‌تواند منجر به بهبود صفاتی مانند بهبود عملکرد، مقاومت در برابر تنش و حتی تجمع بهینه ترکیبات زیست‌فعال در گیاهان دارویی و زینتی شود (Xu et al., 2024).

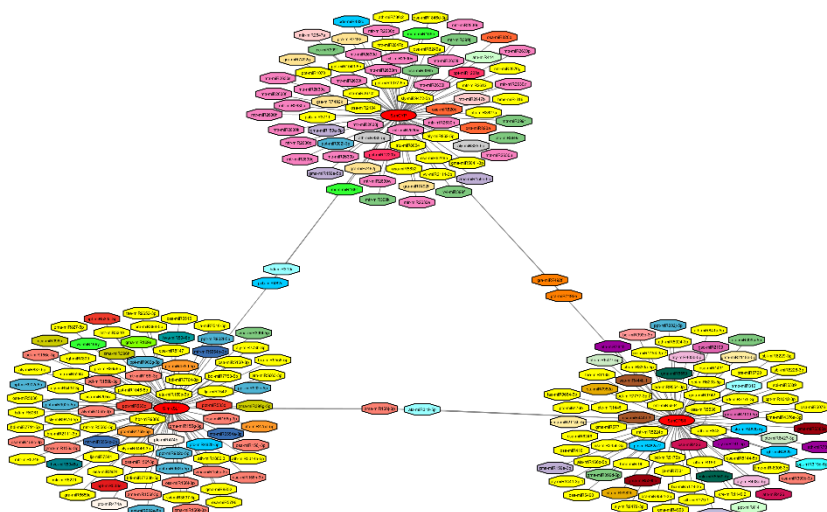
miR902 یک microRNA گیاهی است که اخیراً از طریق مطالعاتی که پاسخ‌های تنش خشکی، به‌ویژه در گونه‌هایی مانند خزه را بررسی می‌کنند، آشکار شده است. در تجزیه و تحلیلی محاسباتی از miRNAهای مرتبط با خشکسالی، نوع miR902a-5p به‌عنوان مرکز شبکه در شبکه تنظیم هم‌زمان ظاهر شد. این موقعیت مرکزی نشان می‌دهد که miR902 ممکن است نقش مهمی در هماهنگی بیان چندین ژن دخیل در پاسخ به تنش خشکی داشته باشد؛ رونوشت‌هایی که به‌طور بالقوه در تنظیم اسمزی، سیگنالینگ تنش یا سایر مکانیسم‌های محافظتی در شرایط کمبود آب نقش دارند (Wan et al., 2011)؛ علاوه بر این، miRNA ۷۹ هدف‌گیرنده ژن CYP شناسایی شد که میان آن‌ها، خانواده‌های miR2630 و miR399 بیشترین فراوانی برخوردار بودند. miR399 یک microRNA القاشده توسط گرسنگی Pi است که در شاخه‌ها تولید می‌شود و سپس به ریشه‌ها منتقل می‌گردد؛ برای مثال، در آرابیدوپسیس، miR399، PHO2 را هدف قرار می‌دهد؛ ژنی که یک کونزوگاز یوئیکوتیتین را رمزگذاری

و به‌طور معمول برای محدود کردن جذب فسفات عمل می‌کند. با سرکوب PHO2 در ریشه‌ها، miR399 انتقال و تخصیص فسفات را افزایش می‌دهد و به‌طور مؤثر تقاضای Pi شاخه را با جذب Pi ریشه هماهنگ می‌کند (Chiang et al., 2023). در ذرت، تحقیقاتی نشان می‌دهد که تنظیم نادرست miR399 عواقب رشدی قابل توجهی دارد. بیان بیش از حد miR399 منجر به پیری زودرس پس از گرده‌افشانی شد؛ فنوتیپی که اثرات مشاهده‌شده هنگام خاموش شدن ژن، هدف آن (PHO2) را منعکس می‌کند (Wang et al., 2023). تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های miR399 انگور، چندین عنصر سیس مرتبط با پاسخ‌های تنش غیرزیستی و هورمونی (خشکسالی، جیبرلین‌ها، اسید سالیسیلیک، ABA و MeJA) را نشان داد. این نشان می‌دهد که اگرچه نقش اصلی miR399 در هموستاز فسفات باقی می‌ماند، ممکن است سیگنال‌های عوامل تنش‌زای محیطی را نیز برای تنظیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و سازگاری کلی گیاه ادغام کند؛ ویژگی‌ای که از اهمیت بالقوه‌ای در گیاهان دارویی و حساس به تنش برخوردار است (Liu et al., 2024). miR2630 یک microRNA است که در *Medicago truncatula* گیاهی مدل حبوبات، یافت می‌شود. این microRNA متعلق به خانواده ژنی miR2630 است و در تنظیم ژن نقش دارد. شواهد تجربی حاصل از تجزیه و تحلیل RNA کوچک در سطح ژنوم بررسی کرد که به دخالت آن در فرایندهایی مانند توسعه ریشه و تشکیل گره اشاره دارد (Lelandais-Brière et al., 2009). با توجه به نتایج به دست آمده (شکل ۱)، miR7492 با دو ژن CPS1 و CYP و miR482 و miR319 با دو ژن KSL1 و microRNA یک miR7492 در ارتباط است. گیاهی است که به‌طور خاص در پنبه (*Gossypium hirsutum*) به‌عنوان ghr-miR7492c شناسایی شده است که در تنظیم پس از رونویسی بیان ژن عمل می‌کند. تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای miRNAome در تخمک‌های پنبه، miR7492 را در چندین microRNA که ممکن است در شروع رشد الیاف، یک ویژگی حیاتی برای کیفیت و عملکرد پنبه، نقش داشته باشند، برجسته کرد. اگرچه

بررسی بیوانفورماتیکی مکانیزم‌های تنظیمی چندلایه‌ای دخیل در بیوسنتز تانشینون در گیاه دارویی مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza*) / یازرلو، نرگس؛ تقوایی، محمد مهدی؛ محسن زاده گلفزانی، محمد؛ سمیع زاده لاهیجی، حبیب‌الله.

به‌طور تنگاتنگ با برنامه‌های رشدی و سیگنال‌های محیطی گیاه در ارتباط است (Kuang et al., 2024; Xie et al., 2012; Zhang et al., 2022). شناسایی miRNA هایی که قادر به هدف‌گیری هم‌زمان بیش از یک ژن مسیر هستند، پدیده همکاری microRNA ها (miRNA cooperativity) را برجسته می‌سازد؛ سازوکاری که پیش‌تر به‌عنوان راهی برای تقویت مهار پسارونویسی و افزایش دقت تنظیم بیان ژن‌ها پیشنهاد شده است (Hayder et al., 2018).

رونوشت‌های هدف دقیق برای miR7492 هنوز در دست بررسی هستند، پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهد که می‌تواند ژن‌های کنترل‌کننده فاکتورهای رونویسی، مسیرهای سیگنالینگ هورمونی یا پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به استرس را تعدیل کند (Wang et al., 2012). تحلیل برهم‌کنش‌های miRNA-mRNA نشان داد که تعداد قابل توجهی از microRNA های گیاهی، متعلق به خانواده‌های حفاظت‌شده‌ای نظیر miR156، miR319، miR482 و miR399، ژن‌های کلیدی مسیر تانشینون را هدف قرار می‌دهند. حضور این خانواده‌های miRNA با نقش‌های شناخته‌شده در تنظیم رشد، پاسخ به تنش و متابولیسم ثانویه، نشان‌دهنده آن است که بیوسنتز تانشینون



شکل ۱- روابط بین microRNA های اثرگذار بر ۳ ژن CPS1، KSL1 و CYP است که به کمک نرم‌افزار Cytoscape به‌صورت بیضی شکل رسم شد. رنگ قرمز نشان‌دهنده ژن‌های مورد نظر و گروه‌های رنگی اطراف آن بیانگر خانواده‌های ژنی microRNA ها است

و MYB، bZIP، AP2، bHLH، MYC-MADS

C2H2 اختصاص داشتند (اطلاعات تکمیلی در پیوست ۲ قرار دارد). تنوع بالای خانواده‌های فاکتور رونویسی در پروموتور این ژن، نشان‌دهنده پیچیدگی شبکه تنظیمی حاکم بر KSL1 و نقش بالقوه آن در فرایندهای رشد، تمایز و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (Rushton et al., 2012). در ژن CPS1 تعداد ۲۴۰ جایگاه اتصال فاکتور رونویسی شناسایی شد. فراوان‌ترین جایگاه‌ها مربوط به فاکتورهای AP2، MYC-MADS، BBR-BPC،

نتایج پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی

ژن‌های KSL1، CPS1 و CYP در *S. miltiorrhiza*

برای شناسایی جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی در ژن‌های KSL1، CPS1 و CYP از نرم‌افزار TBtools استفاده شد (شکل ۲). نتایج حاصل از این تحلیل نشان داد که در ژن KSL1 تعداد ۳۸۷ جایگاه اتصال فاکتور رونویسی شناسایی گردید. بیشترین این جایگاه‌ها به فاکتورهای رونویسی ERF، BBR-BPC، Dof، WRKY، LBD،

Dof, GRAS, C2H2, WRKY و ERF بودند. حضور غالب این فاکتورها نشان می‌دهد که CPS1 علاوه بر مشارکت مستقیم در مسیرهای متابولیکی بیوسنتز دی‌ترین‌ها، تحت کنترل سازوکارهای تنظیمی مرتبط با دفاع گیاه، سیگنالینگ هورمونی و پاسخ به تنش‌های محیطی قرار دارد (Cui et al., 2015). همچنین تجزیه و تحلیل جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی در ژن‌های CYPs نشان داد که تعداد ۱۵۹ جایگاه اتصال شناسایی شد. بیشترین این جایگاه‌ها به فاکتورهای رونویسی bZIP, MYB, WRKY و ERF اختصاص داشتند. با توجه به نقش محوری آنزیم‌های CYP در مراحل انتهایی و اختصاصی مسیرهای بیوسنتزی، حضور این خانواده‌های فاکتور رونویسی می‌تواند نشان‌دهنده تنظیم دقیق بیان این ژن‌ها در پاسخ به سیگنال‌های محیطی و فیزیولوژیک باشد (Bathe, 2019).

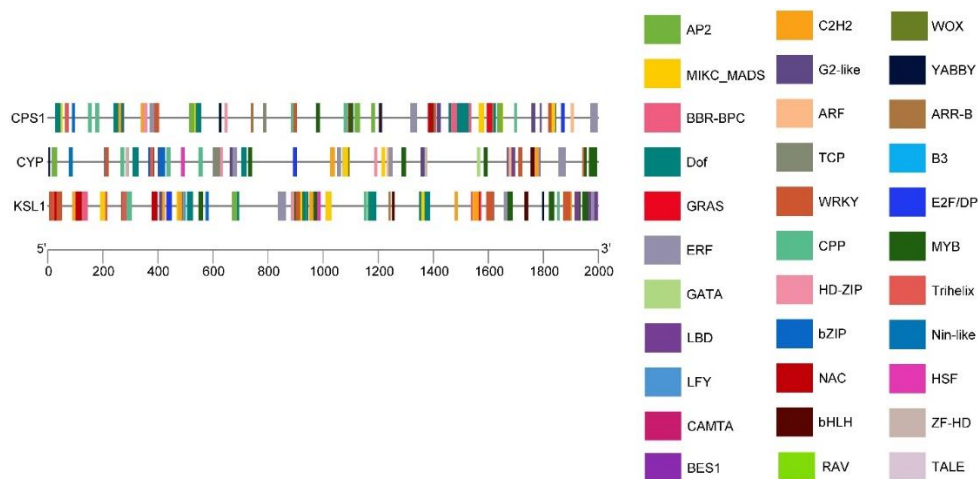
نکته قابل توجه آن است که جایگاه‌های اتصال مربوط به فاکتورهای WRKY و ERF در ژن‌های KSL1, CPS1 و CYPs به صورت مشترک مشاهده شدند. این همپوشانی نشان‌دهنده وجود مسیرهای تنظیمی مشترک میان این ژن‌ها و احتمال تعامل آن‌ها در پاسخ‌های دفاعی و تنظیم متابولیسم ثانویه در *S. miltiorrhiza* است. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان‌دهنده آن است که ژن‌های KSL1, CPS1 و CYPs تحت کنترل مجموعه‌ای پیچیده از فاکتورهای رونویسی قرار دارند که هم در فرایندهای رشد و توسعه و هم در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش آفرینی می‌کنند. فاکتورهای رونویسی ERF بزرگ‌ترین زیرخانواده در ابرخانواده گیاهی AP2/ERF هستند و نقش کلیدی در تنظیم تحمل تنش‌های غیرزیستی، مانند خشکی، شوری و سرما، دارند. در پاسخ به تنش، ERF‌ها معمولاً از طریق فسفوریلاسیون وابسته به MAPK یا کاهش یوبیکوئیتیناسیون فعال شده، با پروتئین‌های نوکلئیک کمپلکس تشکیل می‌دهند و به عناصر سیس در پروموتور ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش متصل می‌شوند (Wu et al., 2023).

2022). خانواده ژنی WRKY گروهی از فاکتورهای رونویسی اختصاصی گیاهان است که نقش محوری در تنظیم پاسخ‌های گیاه به تنش‌های زیستی (مانند مقابله با پاتوژن‌ها) و غیرزیستی (از جمله خشکی، شوری و دما) ایفا می‌کنند؛ افزون بر این، اعضای این خانواده در فرایندهای رشدی، از جمله تمایز بافت، گل‌دهی و تنظیم متابولیسم ثانویه نیز نقش دارند. بسیاری از اعضای خانواده WRKY در شبکه‌های سیگنال‌دهی هورمونی، مانند مسیرهای سالیسیلات، ژبیرلین و اتیلن، مشارکت دارند و از طریق تعامل با سایر فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های سیگنال‌دهنده، بیان ژن‌های هدف را تنظیم می‌کنند (Phukan et al., 2016). فاکتورهای رونویسی گیاهی BBR/BPC، مشابه GAF حیوانی، به تکرارهای GA متصل می‌شوند و با تعدیل کروماتین تنظیم چندمرحله‌ای ژن را ممکن می‌کنند. مشخصه آن‌ها ناحیه C-ترمینال حفاظت‌شده با پنج سیستئین است. این خانواده علاوه بر تنظیم ژن‌های هومئوتیک و رشد، در سیگنالینگ هورمونی، پاسخ به استرس، نوسان شبانه‌روزی و تعیین جنسیت نقش دارند و با حفظ گسترده در گیاهان، به عنوان خانواده‌ای تکاملی کلیدی برای هماهنگی رشد - ایمنی شناخته می‌شوند (Sahu et al., 2023). خانواده گیاهی DOF با ناحیه اتصال DNA تک‌انگشتی شناخته می‌شود و اعضای آن در چرخه زندگی گیاه نقش‌های حیاتی دارند. آن‌ها نه تنها در تنظیم سیگنال‌های هورمونی و پاسخ‌های مختلف به تنش‌های زیستی یا غیرزیستی دخیل هستند، بلکه گزارش شده است که بسیاری از فرایندهای زیستی گیاه، مانند خواب، تمایز بافت، جذب کربن و نیتروژن و متابولیسم کربوهیدرات را نیز تنظیم می‌کنند (Zou and Sun, 2023). بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که فاکتورهای رونویسی bZIP تنظیم‌کننده‌های اصلی در گیاهان هستند و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، مانند خشکی، شوری، گرما، سرما و متابولیسم ثانویه و رشد را هماهنگ می‌کنند. آن‌ها از طریق اتصال به DNA و دیمریزاسیون عمل می‌کنند و توسط پیرایش، فسفوریلاسیون و تعاملات پروتئینی تعدیل می‌شوند (Guo et al., 2024). در مجموع، نتایج این تحلیل نشان می‌دهد که ژن‌های KSL1, CPS1 و CYPs

بررسی بیوانفورماتیکی مکانیزم‌های تنظیمی چندلایه‌ای دخیل در بیوسنتز تانشینون در گیاه دارویی مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza*) / یازرلو، نرگس؛ تقوایی، محمد مهدی؛ محسن زاده گلفزانی، محمد؛ سمیع زاده لاهیجی، حبیب‌الله.

این نتایج از طریق روش‌هایی نظیر ChIP-qPCR، EMSA یا آنالیزهای بیان ژن تحت تیمارهای تنش برای تأیید عملکرد واقعی این عناصر تنظیمی ضروری است

در *Salvia miltiorrhiza* تحت کنترل مجموعه‌ای پیچیده و هم‌پوشان از فاکتورهای رونویسی قرار دارند که هماهنگی میان رشد، پاسخ‌های دفاعی و تنظیم متابولیسم ثانویه را ممکن می‌سازد. با وجود این، از آنجا که شناسایی جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی مبتنی بر پیش‌بینی‌های زیست محاسباتی است، اعتبارسنجی تجربی



شکل ۲- جایگاه‌های اتصال فاکتور رونویسی ژن‌های *CPS1*، *KSL1* و *CYP* که به کمک نرم‌افزار TBtools رسم گردید.

داد که تمامی پروموتورهای مورد بررسی دارای عناصر پاسخ‌دهنده به نور هستند. نور یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی تنظیم‌کننده متابولیسم ثانویه بوده و گزارش شده است که بسیاری از مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات فنولیک و ترپنوئیدی تحت کنترل مستقیم یا غیرمستقیم سیگنال‌های نوری قرار دارند (Jenkins, 2009). حضور گسترده این عناصر در پروموتور ژن‌های *CPS1*، *KSL1* و *CYPs* نشان می‌دهد که بیان این ژن‌ها احتمالاً با تغییرات شدت و کیفیت نور هماهنگ می‌شود. پروموتور ژن *KSL1* علاوه بر عناصر نوری، حاوی عناصر پاسخ‌دهنده به جیبرلین، اسید آبسزیک (ABA) و شرایط بی‌هوازی بود. حضور عناصر ABA نشان‌دهنده نقش احتمالی این ژن در پاسخ به تنش‌های خشکی و اسمزی است، در حالی که عناصر مرتبط با شرایط بی‌هوازی می‌توانند به تنظیم متابولیسم انرژی و سازگاری سلولی در شرایط کمبود اکسیژن اشاره داشته باشند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, ۲۰۰۶).

نتایج تجزیه و تحلیل عناصر سیس ژن‌های *KSL1*،

S.miltiorrhiza در *CYP* و *CPS1*

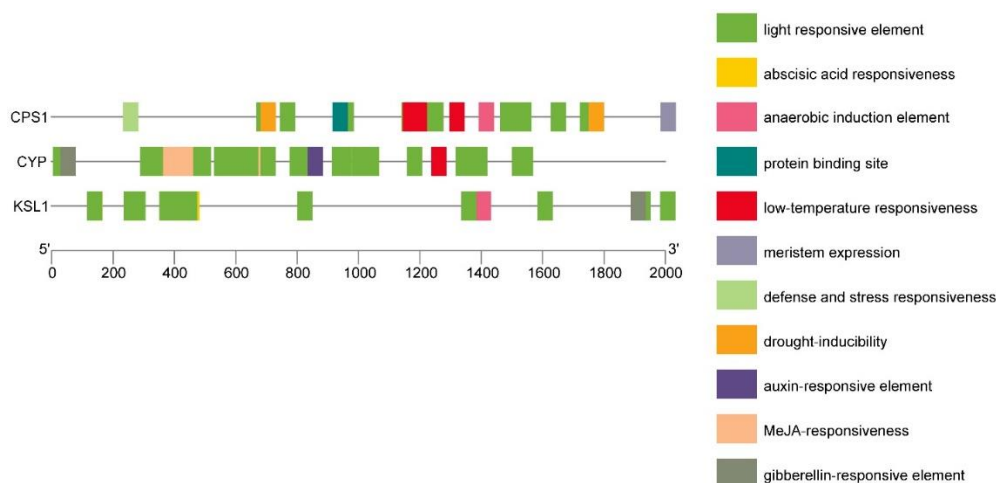
بررسی عناصر تنظیمی سیس در ژن‌های *KSL1*، *CPS1* و *CYP* نشان داد که علاوه بر عناصر رایج TATA-box و CAAT-box، پروموتورهای این ژن‌ها در *S. miltiorrhiza* دارای مجموعه‌ای متنوع از عناصر سیس هستند که به طیف گسترده‌ای از محرک‌ها، از جمله نور، تنش‌های غیرزیستی (خشکی، سرما و شرایط بی‌هوازی)، سیگنال‌های هورمونی (جیبرلین، اکسین، اسید آبسزیک و متیل جاسمونات)، دفاع و بیان اختصاصی بافتی پاسخ می‌دهند (شکل ۳) (اطلاعات تکمیلی در پیوست ۳ قرار دارد). چنین تنوعی بیانگر پیچیدگی تنظیم رونویسی ژن‌های مذکور و نقش چندلایه آن‌ها در سازگاری گیاه با شرایط محیطی متغیر است (Lescot et al., 2002). نتایج نشان

2007). این الگو نشان می‌دهد که KSL1 ممکن است در تنظیم انعطاف‌پذیر مراحل ابتدایی بیوسنتز دی‌ترین‌ها در شرایط تنشی نقش داشته باشد. در مقابل، ژن CPS1 دارای عناصر پاسخ‌دهنده به نور، دمای پایین، خشکی، اسید آسزیک، شرایط بی‌هوازی، بیان مریستم، دفاع و استرس و همچنین عناصر اتصال‌دهنده پروتئین است. این تنوع بالا می‌تواند نشان‌دهنده نقش تنظیمی گسترده CPS1 در هماهنگی بین رشد، توسعه و پاسخ‌های دفاعی باشد. وجود عناصر بیان مریستمی همچنین حاکی از احتمال تنظیم فضایی بیان این ژن در بافت‌های در حال تقسیم است که برای تأمین پیش‌سازهای متابولیکی در مراحل رشد فعال اهمیت دارد. از میان این عناصر، پاسخ‌دهنده‌های نور، اسید آسزیک و شرایط بی‌هوازی بین ژن‌های KSL1 و CPS1 مشترک هستند؛ علاوه بر این، تجزیه و تحلیل عناصر تنظیمی سیس در ژن‌های CYPs نشان داد که این ژن‌ها در برابر نور، دمای پایین، جیبرلین، متیل جاسمونات و اکسین، واکنش نشان می‌دهند. حضور عناصر پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات (MeJA) به‌ویژه حائز اهمیت است؛ زیرا جاسمونات‌ها تنظیم‌کننده‌های اصلی مسیرهای دفاعی و القاکننده بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند. این یافته با نقش CYPها در مراحل انتهایی و اختصاصی‌تر مسیرهای بیوسنتزی همخوانی دارد (Wasternack and Strnad, 2018). بررسی تطبیقی عناصر مشترک نشان داد که عناصر پاسخ‌دهنده به نور و جیبرلین بین ژن‌های KSL1

و CYPs مشترک هستند و عناصر پاسخ‌دهنده به نور و دمای پایین بین ژن‌های CPS1 و CYPs همپوشانی دارند. این الگوی همپوشانی بیانگر وجود نوعی هم‌تنظیمی (CO-regulation) میان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی است که می‌تواند پاسخ هماهنگ متابولیسم ثانویه را به سیگنال‌های محیطی و هورمونی ممکن سازد.

بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان گفت که سیگنال‌های محیطی (نور، دما و تنش‌های غیرزیستی) و سیگنال‌های هورمونی (GA، MeJA، ABA و اکسین) از طریق فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی متناظر خود، به عناصر سیس فعال در نواحی پروموتری ژن‌های KSL1، CPS1 و CYPs متصل می‌شوند و بیان این ژن‌ها را به‌صورت هماهنگ تنظیم می‌کنند. این تنظیم هماهنگ منجر به تعدیل مراحل مختلف بیوسنتز دی‌ترین‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه می‌شود و به گیاه امکان می‌دهد تا پاسخ‌های متابولیکی مؤثری در شرایط تنش و رشد فعال ایجاد کند. با وجود اهمیت این یافته‌ها، باید توجه داشت که شناسایی عناصر سیس فعال مبتنی بر پیش‌بینی‌های زیست محاسباتی است. از این رو، اعتبارسنجی عملکرد واقعی این عناصر از طریق آزمایش‌های تجربی، مانند آنالیز بیان ژن تحت تیمارهای هورمونی و تنشی، آزمون‌های گزارشگر پروموتری (Promoter Reporter Assays) و ChIP-PCR برای تأیید اتصال فاکتورهای رونویسی ضروری است.

بررسی بیوانفورماتیکی مکانیزم‌های تنظیمی چندلایه‌ای دخیل در بیوسنتز تانشینون در گیاه دارویی مریم‌گلی چینی (*Salvia miltiorrhiza*) / یازرلو، نرگس؛ تقوایی، محمد مهدی؛ محسن زاده گل‌فرانی، محمد؛ سمیع زاده لاهیجی، حبیب‌الله.



شکل ۳- شناسایی عناصر تنظیمی Cis فعال ژن‌های *KSL1*، *CPS1* و *CYP* که به کمک نرم‌افزار TBtools رسم گردید

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که تنظیم بیان ژن‌ها در *Salvia miltiorrhiza* تحت کنترل یک شبکه تنظیمی پیچیده و چندلایه قرار دارد که از برهم‌کنش هماهنگ miRNAها، فاکتورهای رونویسی و عناصر سیس فعال پروموتری شکل گرفته است. این سازمان‌دهی چندسطحی امکان کنترل دقیق، پویا و وابسته به شرایط محیطی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، از جمله *KSL1*، *CPS1* و *CYPs* را فراهم می‌سازد. حضور هم‌زمان سطوح مختلف تنظیمی بیان ژن نشان‌دهنده آن است که این ژن‌ها نه تنها در سطح رونویسی، بلکه در مرحله پسارونویسی نیز به‌طور فعال تنظیم می‌شوند و به‌عنوان گره‌های مرکزی در شبکه‌های تنظیم متابولیسم عمل می‌کنند (Chen, 2009). در این چارچوب، miRNAها با هدف‌گیری اختصاصی mRNAها و از طریق ایجاد اثرات جمع‌پذیر یا سینرژیستیک، نقش مؤثری در افزایش کارایی سرکوب بیان ژن ایفا می‌کنند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که هدف‌گیری هم‌زمان چند miRNA برای یک ژن یا مجموعه‌ای از ژن‌های هم‌مسیر می‌تواند منجر

به مهار قوی‌تر و پایدارتر بیان ژن شود؛ پدیده‌ای که به‌ویژه در تنظیم مسیرهای متابولیسم پیچیده اهمیت دارد (Axtell, 2013). این لایه پسارونویسی در کنار شبکه گسترده فاکتورهای رونویسی و عناصر سیس فعال پروموتری، یک سیستم تنظیمی چندبُعدی ایجاد می‌کند که امکان پاسخ هماهنگ گیاه به سیگنال‌های رشدی، هورمونی و تنش‌های زیستی و غیرزیستی را فراهم می‌سازد. یافته‌های این مطالعه با ارائه تصویری یکپارچه از تنظیم چندلایه بیان ژن، درک ما را از مکانیسم‌های مولکولی حاکم بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در *S. miltiorrhiza* تعمیق می‌بخشد. شناسایی ژن‌های *KSL1*، *CPS1* و *CYPs* به‌عنوان عناصر کلیدی در این شبکه، آن‌ها را به اهداف مناسبی برای راهبردهای مهندسی متابولیک تبدیل می‌کند. دست‌کاری هدفمند این شبکه‌های تنظیمی می‌تواند به افزایش تولید ترکیبات دارویی ارزشمند نظیر تانشینون‌ها، بهبود پاسخ‌های دفاعی گیاه و در نهایت، ارتقای ویژگی‌های اقتصادی گیاهان دارویی منجر شود (Shao et al., 2025).

بر اساس این یافته‌ها، مدل تنظیمی یکپارچه‌ای برای بیوسنتز تانشینون پیشنهاد می‌شود که در آن عناصر سیس به‌عنوان دریافت‌کننده سیگنال‌ها عمل می‌کنند، فاکتورهای رونویسی این سیگنال‌ها را به تغییرات رونویسی تبدیل و

چارچوب روشنی برای طراحی مطالعات آینده ایجاد می‌کند و اعتمادپذیری تفسیر نتایج را افزایش می‌دهد

microRNAها با تنظیم پسا رونویسی، شدت و پایداری پاسخ را تعدیل می‌نمایند. تعامل متقابل این سه لایه منجر به ایجاد شبکه‌ای پویا با حلقه‌های فیدبک (Feedback) و فیدفوروارد (Feedforward) می‌شود که امکان تنظیم دقیق جریان متابولیکی به‌سوی تولید تاننشینون‌ها را فراهم می‌آورد. همچنین بهره‌گیری از فناوری‌های نوین ویرایش ژنوم نظیر CRISPR/Cas9 و روش‌های RNA interference (RNAi)، فرصت‌های بی‌سابقه‌ای برای مداخله دقیق در سطوح مختلف تنظیم بیان ژن فراهم می‌آورد. این فناوری‌ها امکان بازبرنامه‌ریزی هدفمند شبکه‌های تنظیمی شامل miRNAها، فاکتورهای رونویسی و عناصر پروموتوری را فراهم می‌سازند و می‌توانند به توسعه رویکردهای نوآورانه در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه، افزایش تحمل تنش‌های محیطی و گسترش کاربردهای زیستی و کشاورزی منجر شوند (Mipeshwaree Devi et al., 2023). با این حال، تحقق کامل این اهداف مستلزم انجام مطالعات تجربی تکمیلی برای اعتبارسنجی عملکردی اجزای شناسایی‌شده این شبکه تنظیمی و بررسی پیامدهای فیزیولوژیک دست‌کاری آن‌ها در سطح گیاه کامل است. با وجود جامعیت تحلیل‌های ارائه‌شده، این پژوهش دارای برخی محدودیت‌ها است که باید در تفسیر نتایج مورد توجه قرار گیرند. نخست آنکه تمامی تعامل‌های شناسایی‌شده میان miRNAها و ژن‌های هدف، بر پایه پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی بوده و هنوز به‌صورت تجربی تأیید نشده‌اند. ابزارهای محاسباتی با وجود دقت بالا، همواره با احتمال بروز مثبت کاذب (false positives) همراه هستند. دوم، در این مطالعه آزمایش‌های تجربی نظیر qRT-PCR برای بررسی همبستگی بین سطوح بیان miRNAها و ژن‌های CPS1، KSL1 و CYP انجام نشده است. همچنین استفاده نکردن از تحلیل‌های Degradome sequencing مانع از تأیید مستقیم برش mRNA توسط miRNAهای پیش‌بینی‌شده می‌شود. در نهایت، بررسی این شبکه تنظیمی در شرایط فیزیولوژیک متفاوت (مانند تیمارهای هورمونی یا تنش‌های محیطی) می‌توانست درک پویاتری از عملکرد این شبکه فراهم کند. با این حال، شفاف‌سازی این محدودیت‌ها

Progress 108, 00368504251332109.
<https://doi.org/10.1177/00368504251332109>.

Fu, C., Liao, Z., Jiang, N., and Yang, Y. (2024). Genome-wide identification and molecular evolution of Dof transcription factors in *Cyperus esculentus*. *BMC Genomics* 25, 667. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10565-y>.

Guo, Z., Dzinyela, R., Yang, L., and Hwarari, D. (2024). bZIP Transcription Factors: Structure, Modification, Abiotic Stress Responses and Application in Plant Improvement. *Plants* 13, 2058. <https://doi.org/10.3390/plants13152058>.

Hao, X., Pu, Z., Cao, G., You, D., Zhou, Y., Deng, C., Shi, M., Nile, S.H., Wang, Y., Zhou, W., and Kai, G. (2020). Tanshinone and salvianolic acid biosynthesis are regulated by SmMYB98 in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Journal of Advanced Research* 23, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.01.012>.

Hayder, H., O'Brien, J., Nadeem, U., and Peng, C. (2018). MicroRNAs: crucial regulators of placental development. *Reproduction* 155, R259–R271. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0603>.

Jenkins, G.I. (2009). Signal Transduction in Responses to UV-B Radiation. *Annual Review of Plant Biology* 60, 407–431. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092953>.

Jiang, Z., Gao, W., and Huang, L. (2019). Tanshinones, Critical Pharmacological Components in *Salvia miltiorrhiza*. *Frontiers in Pharmacology Volume 10 - 2019*.

Joshi, G.A.n., Chauhan, C., and Das, S. (2021). Sequence and functional analysis of MIR319 promoter homologs from *Brassica juncea* reveals regulatory diversification and altered expression under stress. *Molecular Genetics and Genomics* 296, 731–749. <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01778-x>.

Koyama, T., Sato, F., and Ohme-Takagi, M. (2017). Roles of miR319 and TCP Transcription Factors in Leaf Development. *Plant Physiology* 175, 874–885. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00732>.

Akiyama, T., Horie, K., Hinoi, E., Hiraiwa, M., Kato, A., Maekawa, Y., Takahashi, A., and Furukawa, S. (2020). How does spaceflight affect the acquired immune system? *npj Microgravity* 6, 14. <https://doi.org/10.1038/s41526-020-0104-1>.

Axtell, M.J. (2013). Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology* 64, 137–159. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120043>.

Bathe, U. (2019). The role of cytochrome P450 enzymes in the biosynthesis of abietane diterpenes from rosemary and sage. *Kumulative Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany*.

Chen, X. (2009). Small RNAs and Their Roles in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25, 21–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113417>.

Chiang, C.-P., Li, J.-L., and Chiou, T.-J. (2023). Dose-dependent long-distance movement of microRNA399 duplex regulates phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 240, 802–814. <https://doi.org/10.1111/nph.19182>.

Cui, G., Duan, L., Jin, B., Qian, J., Xue, Z., Shen, G., Snyder, J.H., Song, J., Chen, S., Huang, L., et al. (2015). Functional Divergence of Diterpene Syntheses in the Medicinal Plant *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Physiology* 169, 1607–1618. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00695>.

Ding, K., Pei, T., Bai, Z., Jia, Y., Ma, P., and Liang, Z. (2017). SmMYB36, a Novel R2R3-MYB Transcription Factor, Enhances Tanshinone Accumulation and Decreases Phenolic Acid Content in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots. *Scientific Reports* 7, 5104. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04909-w>.

Eom, S.H., and Hyun, T.K. (2025). MicroRNA-mediated regulation of ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* and its biotechnological implications. *Science*

- Das, S. (2023). Metabolic engineering of plant secondary metabolites: prospects and its technological challenges. *Frontiers in Plant Science Volume 14* - 2023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1171154>.
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Taghvaei, M.M., Samizadeh Lahiji, H., Ashery, S., and Raza, A. (2022). Investigation of proteins' interaction network and the expression pattern of genes involved in the ABA biogenesis and antioxidant system under methanol spray in drought-stressed rapeseed. *3 Biotech 12*, 217. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03290-4>.
- Phukan, U.J., Jeena, G.S., and Shukla, R.K. (2016). WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science Volume 7* - 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00760>.
- Rushton, D.L., Tripathi, P., Rabara, R.C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A.K., Langum, T.J., Smidt, L., Boomsma, D.D., Emme, N.J., et al. (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnology Journal 10*, 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00634.x>.
- Sahu, A., Singh, R., and Verma, P.K. (2023). Plant BBR/BPC transcription factors: unlocking multilayered regulation in development, stress and immunity. *Planta 258*, 31. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04188-y>.
- Sakuraba, Y., Yang, M., and Yanagisawa, S. (2024). HASTY-mediated miRNA dynamics modulate nitrogen starvation-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Nature Communications 15*, 7913. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52339-w>.
- Shao, S., Lv, B., Wang, M., Zeng, S., Wang, S., Yang, Z., and Ma, P. (2025). Biosynthesis and regulatory mechanism of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *The Plant Journal 123*, e70358. <https://doi.org/10.1111/tpj.70358>.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Kuang, W., Qin, D., Huang, Y., Liu, Y., Cao, X., and Xu, M. (2024). Analysis of the miR482 Gene Family in Plants. Genes 15, 1043. https://doi.org/10.3390/genes15081043.*
- Lelandais-Brière, C., Naya, L., Sallet, E., Calenge, F., Frugier, F., Hartmann, C., Gouzy, J.r., and Crespi, M. (2009). Genome-Wide *Medicago truncatula* Small RNA Analysis Revealed Novel MicroRNAs and Isoforms Differentially Regulated in Roots and Nodules. *The Plant Cell 21*, 2780–2796. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068130>.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., and Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research 30*, 325–327. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>.
- Liu, J., Ren, Y., Sun, Y., Yin, Y., Han, B., Zhang, L., Song, Y., Zhang, Z., Xu, Y., Fan, D., et al. (2024). Identification and Analysis of the MIR399 Gene Family in Grapevine Reveal Their Potential Functions in Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences 25*, 2979. <https://doi.org/10.3390/ijms25052979>.
- Lu, S. (2021). Biosynthesis and Regulatory Mechanisms of Bioactive Compounds in *Salvia miltiorrhiza*, a Model System for Medicinal Plant Biology. *Critical Reviews in Plant Sciences 40*, 243–283. <https://doi.org/10.1080/07352689.2021.1935719>.
- Ma, P., Liu, J., Osbourn, A., Dong, J., and Liang, Z. (2015a). Regulation and metabolic engineering of tanshinone biosynthesis. *RSC Advances 5*, 18137–18144. <https://doi.org/10.1039/C4RA13459A>.
- Ma, X.-H., Ma, Y., Tang, J.-F., He, Y.-L., Liu, Y.-C., Ma, X.-J., Shen, Y., Cui, G.-H., Lin, H.-X., Rong, Q.-X., et al. (2015b). The Biosynthetic Pathways of Tanshinones and Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Molecules 20*, 16235–16254. <https://doi.org/10.3390/molecules200916235>.
- Mipeshwaree Devi, A., Khedashwori Devi, K., Premi Devi, P., Lakshmipriyari Devi, M., and

- Wu, Y., Li, X., Zhang, J., Zhao, H., Tan, S., Xu, W., Pan, J., Yang, F., and Pi, E. (2022). ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science Volume 13* - 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1042084>.
- Xie, K., Shen, J., Hou, X., Yao, J., Li, X., Xiao, J., and Xiong, L. (2012). Gradual Increase of miR156 Regulates Temporal Expression Changes of Numerous Genes during Leaf Development in Rice. *Plant Physiology* 158, 1382–1394. <https://doi.org/10.1104/pp.111.190488>.
- Xu, Y., Gao, C., Huang, Z., Liu, J., Ren, Z., He, Y., Xia, Y., Feng, S., and Wu, Y. (2024). MicroRNA156: a count up timer with potential to enhance horticultural traits. *Ornamental Plant Research* 4. <https://doi.org/10.48130/opr-0024-0008>.
- Zhang, K., Wang, E., Liu, Q.A., and Wang, J. (2023). High CO₂ adaptation mechanisms revealed in the miR156-regulated flowering time pathway. *PLOS Computational Biology* 19, e1011738. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011738>.
- Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, S., Hao, L., Wang, S., Xu, C., Jiang, F., and Li, T. (2019). Characterization of genome-wide microRNAs and their roles in development and biotic stress in pear. *Planta* 249, 693–707. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3027-2>.
- Zhang, Y., Waseem, M., Zeng, Z., Xu, J., Chen, C., Liu, Y., Zhai, J., and Xia, R. (2022). MicroRNA482/2118, a miRNA superfamily essential for both disease resistance and plant development. *New Phytologist* 233, 2047–2057. <https://doi.org/10.1111/nph.17853>.
- Zhu, B., Wang, M., Pang, Y., Hu, X., Sun, C., Zhou, H., Deng, Y., and Lu, S. (2024). The Smi-miR858a-SmMYB module regulates tanshinone and phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Horticulture Research* 11, uhae047. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae047>.
- Zou, X., and Sun, H. (2023). DOF transcription factors: Specific regulators of plant biological processes. *Frontiers in Plant Science Volume 14* - 2023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1044918>.
- Experimental Botany 58, 221–227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>.
- Taghvaei, M.M., Lahiji, H.S., and Golfazani, M.M. (2022). Evaluation of expression changes, proteins interaction network, and microRNAs targeting catalase and superoxide dismutase genes under cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.). *OCL* 29, 3. <https://doi.org/10.1051/ocl/2021051>.
- Taghvimi, P., Mohsenzadeh Golfazani, M., Taghvaei, M.M., and Samizadeh Lahiji, H. (2024). Investigating the effect of drought stress and methanol spraying on the influential genes in the Calvin cycle and photorespiration of rapeseed (*Brassica napus*). *Functional Plant Biology* 51, —. <https://doi.org/10.1071/FP23280>.
- Wan, P., Wu, J., Zhou, Y., Xiao, J., Feng, J., Zhao, W., Xiang, S., Jiang, G., and Chen, J.Y. (2011). Computational Analysis of Drought Stress-Associated miRNAs and miRNA Co-Regulation Network in *Physcomitrella Patens*. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 9, 37–44. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(11\)60006-5](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(11)60006-5).
- Wang, X., Yuan, D., Liu, Y., Liang, Y., He, J., Yang, X., Hang, R., Jia, H., Mo, B., Tian, F., et al. (2023). INDETERMINATE1 autonomously regulates phosphate homeostasis upstream of the miR399-ZmPHO2 signaling module in maize. *The Plant Cell* 35, 2208–2231. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad089>.
- Wang, Z.-M., Xue, W., Dong, C.-J., Jin, L.-G., Bian, S.-M., Wang, C., Wu, X.-Y., and Liu, J.-Y. (2012). A Comparative miRNAome Analysis Reveals Seven Fiber Initiation-Related and 36 Novel miRNAs in Developing Cotton Ovules. *Molecular Plant* 5, 889–900. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr094>.
- Wasternack, C., and Strnad, M. (2018). Jasmonates: News on Occurrence, Biosynthesis, Metabolism and Action of an Ancient Group of Signaling Compounds. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2539. <https://doi.org/10.3390/ijms19092539>.