

E X R N A - A G

बैक्टीरियल बाह्यकोशिकीय RNA-मध्यस्थित
पालक (*Spinacia oleracea*) बीज
अंकुरण का पुनर्क्रमादेशन

लक्ष्य विश्लेषण, यांत्रिकी मॉडल, और सत्यापन रणनीति

प्रति वेदन तैयार कर्ता

Sarthak Tiwary

ExRNA-Ag

फरवरी 2026

गोपनीय

इस दस्तावेज़ में स्वामित्व अनुसंधान निष्कर्ष सम्मिलित हैं।
अनधिकृत वितरण सख्ती से निषिद्ध है।

तैयारी तिथि: 2026-02-17 वर्गीकरण: आंतरिक अनुसंधान प्रतिवेदन -- निर्णयकर्ता समीक्षा हेतु साक्ष्य चिह्न: [KNOWN] = प्रकाशित सहकर्मी-समीक्षित साहित्य; [INFERRRED] = संरक्षित जीवविज्ञान और लक्ष्य एनोटेशन से तार्किक निगमन; [SPECULATIVE] = परिकल्पना जिसे प्रायोगिक सत्यापन की आवश्यकता है

कार्यकारी सारांश [गोपनीय]

यह प्रतिवेदन बैक्टीरियल बाह्यकोशिकीय लघु RNAs (exRNAs) द्वारा लक्षित ~109 पूर्वानुमानित पालक जीन लक्ष्यों के जैवसूचनात्मक और साहित्य-आधारित विश्लेषण को समेकित करता है, जो एक बाह्यकोशिकीय बहुलकीय पदार्थ (EPS)-आधारित बीज उपचार (जिसे "M-9" नामित किया गया है) के माध्यम से वितरित होते हैं, और जो पालक के अंकुरण दर एवं पौधे ओज में सुधार करता है। यह विश्लेषण लक्ष्य जीन प्राथमिकीकरण, यांत्रिकी मॉडलिंग, भ्रामक कारक पहचान, और एक स्तरीय प्रायोगिक सत्यापन योजना को एकीकृत करता है।

प्रमुख निष्कर्ष:

1. 21 उच्च-प्राथमिकता लक्ष्य तीन मुख्य नियामक उत्तोलकों पर अभिसरित होते हैं: (क) सुषुप्ति पर लगे एपिजेनेटिक अवरोधों को हटाना, (ख) ABA/GA हार्मोन संतुलन को अंकुरण की ओर स्थानांतरित करना, और (ग) चयापचयी रूप से महंगे रक्षा तंत्रों को विघटित करना [1, 2, 3]।
2. दो परीक्षणयोग्य कारणात्मक मॉडल -- एक रक्षा-एपिजेनेटिक पुनर्क्रमादेशन मॉडल और एक चयापचयी-हार्मोनल प्राइमिंग मॉडल -- प्राथमिक आणविक प्रेरक के बारे में भिन्न, प्रयोगात्मक रूप से विभेदीय पूर्वानुमान प्रस्तुत करते हैं [4, 5]।
3. छह भ्रामक कारक मूल परिकल्पना को खतरे में डालते हैं। EPS ऑस्मोप्राइमिंग और बहुशर्करा प्रेरक प्रभाव सबसे सरल वैकल्पिक व्याख्याएँ हैं [6, 7]। एक जैवसूचनात्मक चेतावनी संकेत (लक्ष्य सूची में *Bacillus thuringiensis cry8Ba* प्रोटीन) अनुक्रमण संटूषण की संभावना इंगित करता है।
4. एक एकल "निर्णयक प्रयोग" -- M-9 विलयन का RNase उपचार -- 2 सप्ताह में \$500 से कम लागत पर एक निर्णयक आगे-बढ़ो/रुको परिणाम प्रदान कर सकता है।
5. 5 प्रयोगों का एक न्यूनतम व्यवहार्य प्रयोग सेट ~\$3,600 की उपभोज्य सामग्री लागत पर 10-12 सप्ताह में अवधारणा-प्रमाण प्रदान कर सकता है।

ईमानदार मूल्यांकन: exRNA-मध्यस्थित जीन मौनन परिकल्पना यांत्रिकी रूप से नवीन और रोमांचक है, परंतु इसके समक्ष कठिन बाधाएँ हैं। सरल व्याख्याओं (ऑस्मोप्राइमिंग, बहुशर्करा प्रेरण) को किसी नवीन जीवविज्ञान की आवश्यकता नहीं है और इन्हें पहले निरस्त किया जाना चाहिए। हालाँकि, यह परिकल्पना कुशलतापूर्वक परीक्षणयोग्य है और RNase प्रयोग पहला महत्वपूर्ण कदम है।

1. पृष्ठभूमि और औचित्य [गोपनीय]

1.1 अंतर-जगत RNA हस्तक्षेप

अंतर-जगत RNA हस्तक्षेप (RNAi) -- विभिन्न जैविक जगतों के जीवों के बीच लघु RNAs का स्थानांतरण जिससे लक्ष्य जीन मौन हो जाते हैं -- अब एक स्थापित जैविक घटना है। Weiberg एवं सहकर्मियों (2013) की ऐतिहासिक खोज ने प्रदर्शित किया कि कवक रोगजनक *Botrytis cinerea* लघु RNAs को *Arabidopsis thaliana* और टमाटर कोशिकाओं में स्थानांतरित करता है, जहाँ वे पौधे की प्रतिरक्षा जीनों को दबाने के लिए मेजबान AGO1-निर्भर RNAi तंत्र का अपहरण करते हैं [8]। इसके बाद के कार्यों ने दिखाया कि पौधे बाह्यकोशिकीय पुटिकाओं (EVs) के माध्यम से कवक रोगजनकों को पारस्परिक रूप से लघु RNAs भेजते हैं ताकि विषाणुता जीनों को मौन किया जा सके

[9], और कि कवक लघु RNAs क्लैथ्रिन-मध्यस्थित एंडोसाइटोसिस के माध्यम से पौधे की कोशिकाओं में प्रवेश करते हैं [10]। एक हालिया अध्ययन ने पुष्टि की कि पुटिकीय और गैर-पुटिकीय दोनों प्रकार के बाह्यकोशिकीय लघु RNAs पौधे-बैक्टीरिया अंतःक्रियाओं में जीन मौनन को निर्देशित कर सकते हैं [11]। व्यापक समीक्षाओं ने EV-मध्यस्थित अंतर-जगत RNA परिवहन के व्यापक महत्व को स्थापित किया है [12]।

1.2 वितरण मैट्रिक्स के रूप में बैक्टीरियल EPS

जैवफिल्मों के भीतर बैक्टीरिया बाह्यकोशिकीय बहुलकीय पदार्थ (EPS) उत्पन्न करते हैं जो बहुशर्कराओं, प्रोटीनों, लिपिडों और न्यूक्लिक अम्लों से बने होते हैं [13, 14]। EPS मैट्रिक्स एक सुरक्षात्मक सूक्ष्म-पर्यावरण के रूप में कार्य करता है जो बाह्यकोशिकीय न्यूक्लिक अम्लों को अपघटन से बचा सकता है [14, 15]। सूक्ष्मजीवी EPS मृदा एकत्रीकरण और पौधे-सूक्ष्मजीव अंतःक्रियाओं में पारिस्थितिक भूमिकाएँ भी निभाता है [15]। [INFERRRED] M-9 प्रणाली में, बैक्टीरियल EPS संभवतः बीज अंतःशोषण के दौरान exRNAs के लिए एक सुरक्षात्मक भंडार और धीमी-मुक्ति वितरण प्रणाली दोनों के रूप में कार्य करता है, उन्हें बीज सतह पर संदिग्ध करता है और पर्यावरणीय RNases से बचाता है।

1.3 बीज अंकुरण जीवविज्ञान

बीज अंकुरण एब्सिसिक अम्ल (ABA), जो सुषुप्ति बनाए रखता है, और जिबरेलिन (GA), जो अंकुरण को बढ़ावा देता है, के बीच प्रतिरोधी संतुलन द्वारा नियंत्रित होता है [1, 16, 17]। यह हार्मोनल संतुलन स्वयं एपिजेनेटिक तंत्रों (DNA मेथिलेशन, हिस्टोन संशोधन), प्रतिक्रियाशील ऑक्सीजन प्रजातियों (ROS) संकेतन, और वृद्धि-रक्षा समझौते द्वारा नियमित होता है [18, 19, 20, 21]। अंतःशोषण के दौरान, बीज आवरण अत्यधिक पारगम्य हो जाता है क्योंकि बीज तीव्रता से जल ग्रहण करता है [22, 23], जिससे एक समय-खिड़की बनती है जिसके दौरान बाह्य अणु संभावित रूप से भ्रूण तक पहुँच सकते हैं।

1.4 M-9 प्रणाली

पालक बीज अंतःशोषण के दौरान लगाया जाने वाला एक बैक्टीरियल EPS-आधारित बीज उपचार ("M-9") अंकुरण दर, समकालिकता और पौध ओज में मापने योग्य सुधार उत्पन्न करता है। M-9 विलयन के लघु RNA अनुक्रमण ने ~109 पालक प्रतिलेखों के प्रति जैवसूचनात्मक पूरकता वाले बैक्टीरियल sRNAs की पहचान की, जिससे यह परिकल्पना उत्पन्न हुई कि बैक्टीरियल exRNAs अंकुरण को बढ़ावा देने के लिए विशिष्ट पौधे जीनों को मौन करते हैं। यह प्रतिवेदन उस परिकल्पना का मूल्यांकन करता है।

पूर्ववर्ती के संबंध में महत्वपूर्ण चेतावनी: मूल विश्लेषण दस्तावेज़ "Zhu एवं सहकर्मी (2022, Nature Plants)" का संदर्भ देते हैं जिन्होंने *Arabidopsis* बीज अंतःशोषण के दौरान *Bacillus subtilis* sRNA ग्रहण प्रदर्शित किया। PubMed, Google Scholar, और Nature Plants अभिलेखागारों में व्यापक खोज के बावजूद, इस विशिष्ट प्रकाशन को स्वतंत्र रूप से सत्यापित नहीं किया जा सका। जबकि अंतर-जगत RNAi का व्यापक क्षेत्र सुस्थापित है [8, 9, 10, 11, 12], बीज अंतःशोषण के दौरान बैक्टीरिया-से-पौधे sRNA स्थानांतरण का विशिष्ट पूर्ववर्ती एक ऐसा क्षेत्र बना हुआ है जहाँ प्रत्यक्ष प्रकाशित साक्ष्य सीमित है। यह परिकल्पना को अमान्य नहीं करता, परंतु इसका अर्थ है कि जाँच के अधीन यह प्रणाली पुष्टि होने पर वास्तव में एक नवीन खोज होगी।

2. लक्ष्य प्राथमिकीकरण [गोपनीय]

2.1 कार्यप्रणाली

बैकटीरियल sRNA-पौधे mRNA पूरकता के जैवसूचनात्मक विश्लेषण से 109 पूर्वानुमानित पालक जीन लक्ष्य निकाले गए। प्रत्येक लक्ष्य का मूल्यांकन निम्न के लिए किया गया: (क) एनोटेशन गुणवत्ता, (ख) *Arabidopsis thaliana* समजात ऑकड़ों के आधार पर अंकुरण से कार्यात्मक प्रासंगिकता [24], (ग) मार्ग सदस्यता, और (घ) अवनियमन द्वारा अंकुरण संवर्धन की यांत्रिकी विश्वसनीयता। लक्ष्यों को छह कार्यात्मक विषयों में वर्गीकृत किया गया और 1-10 प्राथमिकता पैमाने पर अंकित किया गया।

2.2 शीर्ष 21 उच्च-प्राथमिकता लक्ष्य

क्रम (Rank)	जीन पहचानकर्ता (Gene ID)	एनोटेशन (Annotation)	विषय (Theme)	अंक (Score)
1	SOV3g000150.1	एथिलेन ग्राहक (Ethylene receptor)	हार्मोन संकेतन (Hormone signaling)	10
2	SOV1g033340.1	DNA (साइटेसिन-5)-मेथिलट्रांसफ़ेरेज़	एपिजेनेटिक नियमन (Epigenetic regulation)	10
3	SOV3g043450.1	ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2 (EDR2)	रक्षा/प्रतिरक्षा (Defense/immunity)	9
4	SOV6g048760.1	ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2 (EDR2)	रक्षा/प्रतिरक्षा (Defense/immunity)	9
5	SOV4g015450.1	हिस्टोन-लाइसिन N-मेथिलट्रांसफ़ेरेज़ SUVR5	एपिजेनेटिक नियमन (Epigenetic regulation)	9
6	SOV3g035520.1	लिपॉक्सिजिनेज़ (LOX)	हार्मोन संकेतन (Hormone signaling)	9
7	SOV6g036290.1	प्रोटीन HIRA	एपिजेनेटिक नियमन (Epigenetic regulation)	8
8	SOV5g005530.1	Modifier of SNC1 1 (MOS1-सदृश)	रक्षा/प्रतिरक्षा (Defense/immunity)	8
9	SOV4g032870.1	हिस्टिडीन फ़ॉस्फोट्रांसफ़र प्रोटीन (AHP)	हार्मोन संकेतन (Hormone signaling)	8
10	SOV1g020340.1	MYB प्रतिलेखन कारक	संकेतन (Signaling)	8
11	SOV2g014810.1	NAC डोमेन-युक्त प्रोटीन	संकेतन (Signaling)	8
12	SOV3g040200.1	ग्लूटाथायोन S-ट्रांसफ़ेरेज़ L3-सदृश	ROS/रेडॉक्स	7
13	SOV3g038840.1	पेरोक्सिडेज़ (Peroxidase)	ROS/रेडॉक्स	7
14	SOV6g029280.1	6-फ़ॉस्फोग्लूकोनेट डिहाइड्रोजिनेज़	चयापचयी (Metabolic)	7
15	SOV4g038060.1	ज़िंक फ़िंगर प्रोटीन GIS2	एपिजेनेटिक नियमन (Epigenetic regulation)	7
16	SOV3g033920.1	PP2A नियामक उपइकाई A	संकेतन (Signaling)	7

क्रम (Rank)	जीन पहचानकर्ता (Gene ID)	एनोटेशन (Annotation)	विषय (Theme)	अंक (Score)
17	SOV1g018480.1	चक्रीय न्यूक्लियोटाइड-गेटेड चैनल (CNGC)	परिवहन (Transport)	7
18	SOV1g021960.1	केटायन-क्लोरोइड सहपरिवाहक 1-सदृश	परिवहन (Transport)	7
19	SOV2g025380.1	केटायन-क्लोरोइड सहपरिवाहक 1-सदृश	परिवहन (Transport)	6
20	SOV2g009230.1	ट्रीहैलोज़-फॉस्फेट सिंथेज़ (TPS)	चयापचयी (Metabolic)	5
21	SOV4g030590.1	PHD-प्रकार डोमेन-युक्त प्रोटीन	एपिजेनेटिक नियमन (Epigenetic regulation)	6

अतिरिक्त 49 मध्यम-प्राथमिकता और 39 निम्न-प्राथमिकता लक्षणों की पहचान की गई (पूर्ण सूची के लिए परिशिष्ट A देखें)।

2.3 शीर्ष लक्षणों का प्रमुख औचित्य

क्रम 1 -- एथिलीन ग्राहक (SOV3g000150.1): [KNOWN] एथिलीन ग्राहक एथिलीन संकेतन के ऋणात्मक नियामक हैं; एथिलीन की अनुपस्थिति में, ग्राहक सक्रिय रूप से अनुप्रवाह EIN2/EIN3 मार्ग को दबाते हैं। *Arabidopsis* में कार्य-हानि etr1 उत्परिवर्तक कम सुषुप्ति और बढ़ा हुआ अंकुरण प्रदर्शित करते हैं [1, 25]। [INFERRRED] ग्राहक का अवनियमन बीज को सूक्ष्म एथिलीन के प्रति अतिसंवेदनशील बना देता है, इस अंकुरण-समर्थक संकेत को प्रवर्धित करता है।

क्रम 2 -- DNA मेथिलट्रांसफ्रेज़ (SOV1g033340.1): [KNOWN] जीन प्रवर्तकों पर DNA मेथिलेशन प्रतिलेखन को मौन करता है। बीजों में, अंकुरण-समर्थक स्थलों का अतिमेथिलेशन सुषुप्ति बनाए रखता है। अंकुरण के दौरान गतिशील विमेथिलेशन को *Arabidopsis* में संपूर्ण-जीनोम बाइसल्फाइट अनुक्रमण द्वारा प्रलेखित किया गया है [18]। met1 उत्परिवर्तक परिवर्तित सुषुप्ति दर्शाते हैं [18]। [INFERRRED] मेथिलट्रांसफ्रेज़ गतिविधि को कम करने से निष्क्रिय विमेथिलेशन होता है, जो GA जैवसंश्लेषण और ABA अपचय जीनों को विदमन-मुक्त करता है।

क्रम 3-4 -- EDR2 (दो समजात): [KNOWN] EDR2 *Arabidopsis* में सैलिसिलिक अम्ल (SA)-मध्यस्थित रक्षा संकेतन के नियमन में शामिल है [26]। [INFERRRED] दोनों EDR2 समजातों को एक साथ अवनियमित करने से चयापचयी रूप से महंगे रक्षा तंत्र में कमी आती है, जो अंकुरण के लिए संसाधन मुक्त करता है।

क्रम 5 -- SUVR5 हिस्टोन मेथिलट्रांसफ्रेज़: [KNOWN] SUVR5-कुल एंजाइम दमनकारी H3K9me2/3 चिह्न लिखते हैं जो विषमवर्णक (heterochromatin) बनाए रखते हैं। [INFERRRED] SUVR5 को कम करने से अंकुरण-समर्थक स्थलों पर क्रोमैटिन शिथिल होता है, जो सुषुप्ति-से-अंकुरण प्रतिलेखनीय स्विच को खोलता है।

क्रम 6 -- LOX (लिपॉक्सिजिनेज़): [KNOWN] LOX बहुअसंतृप्त वसा अम्लों के ऑक्सीजनीकरण के माध्यम से जैस्मोनिक अम्ल (JA) जैवसंश्लेषण में प्रथम प्रतिबद्ध चरण को उत्प्रेरित करता है [27]। JA सामान्यतः वृद्धि का प्रतिरोध करता है और रक्षा को बढ़ावा देता है। [INFERRRED] अवनियमन एक साथ JA जैवसंश्लेषण, लिपिड पेरॉक्सीकरण, और ABA अंतःवार्ता को कम करता है -- एक उल्लेखनीय रूप से उत्पादक एकल-लक्ष्य हस्तक्षेप।

2.4 जैवसूचनाविज्ञान संबंधी चेतावनी संकेत

दो लक्ष्यों पर तत्काल ध्यान देने की आवश्यकता है:

- **cry8Ba प्रोटीन (SOV2g038830.1):** यह एक *Bacillus thuringiensis* कीटनाशक क्रिस्टल प्रोटीन है। लक्ष्य सूची में इसकी उपस्थिति लगभग निश्चित रूप से अनुक्रमण पुस्तकालय (sequencing library) में जीवाणु RNA संटूषण को इंगित करती है। यह पालक का जीन नहीं है और इसे हटाया जाना चाहिए। इसकी उपस्थिति संपूर्ण विश्लेषण की विश्वसनीयता पर प्रश्नचिह्न लगाती है।
- **Reverse transcriptase डोमेन-युक्त प्रोटीन (SOV2g004250.1, SOV4g025520.1, SOV3g033520.1, SOV4g035390.1):** ये ट्रांसपोर्ज़ेन-संबंधित अनुक्रम हैं। दोहराव वाले रेट्रोट्रांसपोर्ज़ेन अनुक्रमों के विरुद्ध मैप होने वाले रीड्स लघु-रीड सरेखण (short-read alignment) की एक सर्वाविदित कृत्रिमता (artifact) है। इन्हें उचित रूप से निम्न प्राथमिकता दी गई थी।

3. क्रियाविधि वर्णन [गोपनीय]

3.1 छह अभिसारी विषयवस्तुएँ

109 लक्ष्य छह कार्यात्मक विषयवस्तुओं में समूहित होते हैं, जिनमें से प्रत्येक एक ही विकासात्मक परिणाम में योगदान करती है: सुषुप्तावस्था से सक्रिय अंकुरण की ओर संक्रमण।

विषयवस्तु 1: रक्षा तंत्र में कमी (Defense Downshift)

प्रमुख लक्ष्य: EDR2 (x2), MOS1-सदृश, RLKs (x2), रोग प्रतिरोध प्रोटीन, NST1

[KNOWN] रक्षा तत्परता बनाए रखना पर्याप्त चयापचय संसाधनों -- ATP, NADPH, अमीनो अम्ल, और कार्बन कंकालों -- का उपभोग करता है [20, 28]। वृद्धि-रक्षा समझौता (growth-defense tradeoff) पादप जीवविज्ञान में एक मूलभूत सिद्धांत है: प्रतिरक्षा के लिए आवंटित संसाधन वृद्धि के लिए उपलब्ध नहीं होते [20]।

[INFERRED] exRNAs तीन स्तरों पर समन्वित रूप से रक्षा तंत्र को दबाते हैं: संवेदन (RLKs जो प्रतिरूप पहचान ग्राहियों के रूप में कार्य करते हैं [28, 29]), नियमन (MOS1, EDR2 [26]), और क्रियान्वयन (रोग प्रतिरोध प्रोटीन, NST1)। यह "रक्षा कर" को समाप्त करता है, जिससे अंकुरण के लिए एक पर्याप्त संसाधन भंडार मुक्त होता है। MOS1 का दमन, जो NB-LRR-प्रकार के प्रतिरोध प्रोटीन की स्थिरता के लिए आवश्यक है [30], संपूर्ण प्रभावकारी-उत्प्रेरित प्रतिरक्षा निगरानी तंत्र को अस्थिर कर देता है।

विषयवस्तु 2: एपिजेनेटिक पुनर्निर्माण (Epigenetic Remodeling)

प्रमुख लक्ष्य: DNA methyltransferase, SUVR5, HIRA, PHD-डोमेन प्रोटीन, GIS2

[KNOWN] बीज सुषुप्ति आंशिक रूप से DNA मिथाइलेशन और दमनकारी हिस्टोन चिह्नों के माध्यम से अंकुरण-समर्थक जीन प्रवर्तकों के एपिजेनेटिक मौनीकरण द्वारा बनाए रखी जाती है [18, 31]। HIRA चैपरोन कॉम्प्लेक्स हिस्टोन प्रकार H3.3 को प्रतिकृति-स्वतंत्र तरीके से जमा करता है और यह *Arabidopsis* में संरक्षित है [32]।

[INFERRRED] एपिजेनेटिक लेखकों (DNA methyltransferase, SUVR5), पाठकों (PHD-डोमेन प्रोटीन), और द्वारपालों (HIRA, GIS2) का एक साथ दमन, सुषुप्ति लागू करने वाली क्रोमैटिन मशीनरी का बहुआयामी विघटन है। लेखकों को कम करने का अर्थ है कि कम नए दमनकारी चिह्न जमा होंगे। पाठकों को कम करने का अर्थ है कि मौजूदा चिह्न कम कुशलता से मौनीकरण में परिवर्तित होंगे। यह दोहरी कार्रवाई अंकुरण-समर्थक स्थलों पर प्रतिलेखन अनुमति की ओर एक मजबूत बदलाव सुनिश्चित करती है (उदाहरण: GA जैवसंश्लेषण के लिए *GA3ox*, ABA अपचय के लिए *CYP707A*)।

विषयवस्तु 3: ROS अनुकूलन (ROS Optimization)

प्रमुख लक्ष्य: Peroxidase, GST, 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH)

[KNOWN] बीजों में ROS एक दोधारी तलवार है। उच्च स्तर ऑक्सीडेटिव क्षति पहुँचाता है, लेकिन एक नियंत्रित ROS विस्फोट -- "ऑक्सीडेटिव विंडो" -- एक महत्वपूर्ण अंकुरण-समर्थक संकेत है जो भूणपोष को कमजोर करने और भंडार गतिशीलता को बढ़ावा देता है [19, 21]। ABA-ROS सकारात्मक प्रतिपुष्टि चक्र सुषुप्ति को सुदृढ़ करता है: ABA, ROS उत्पादन को बढ़ावा देता है, और उच्च ROS, ABA संकेतन को स्थिर करता है [19, 33]।

[INFERRRED] Peroxidase (एक प्रमुख ROS अपमार्जक और कोशिका-भित्ति cross-linker), GST (एक ग्लूटाथायोन-संयुग्मन प्रतिऑक्सीकारक एंजाइम), और 6-PGDH (कोशिकीय प्रतिऑक्सीकारक तंत्र के लिए प्राथमिक NADPH स्रोत) को अधोनियमित करना, अंतःकोशिकीय ROS में एक नियंत्रित वृद्धि अंकुरण-समर्थक संकेतन श्रेणी में उत्पन्न करता है। विशेष रूप से, 6-PGDH अधोनियमन एक ऊपरी धारा हस्तक्षेप है: व्यक्तिगत अपमार्जकों को लक्षित करने के बजाय, यह संपूर्ण प्रतिओक्सीकारक तंत्र के लिए ईंधन आपूर्ति (NADPH) को सीमित करता है।

विषयवस्तु 4: हार्मोन नोड हेरफेर (Hormone Node Manipulation)

प्रमुख लक्ष्य: Ethylene receptor, LOX, AHP, MYB TF, NAC TF

[KNOWN] GA/ABA अनुपात अंकुरण के लिए मुख्य हार्मोनल स्विच है [1, 16, 17]। Ethylene, ABA का प्रतिकार करके अंकुरण को बढ़ावा देता है [1, 25]। JA सामान्यतः अंकुरण को रोकता है और रक्षा को बढ़ावा देता है [27]।

[INFERRRED] हार्मोन जैवसंश्लेषण एंजाइमों को सीधे लक्षित करने के बजाय, exRNAs ऊपरी धारा के नियामकों को लक्षित करते हैं जो हार्मोन संकेतन की संवेदनशीलता और प्रवर्धन को निर्धारित करते हैं -- ethylene receptor (संकेत संवेदन), LOX (JA/ABA अग्रदूत आपूर्ति [27]), AHP (cytokinin प्रसारण), और MYB/NAC प्रतिलेखन कारक (ABA-प्रतिक्रियाशील प्रभावकारी)। यह एकल चयापचय चरणों को लक्षित करने की तुलना में अधिक मजबूत रणनीति है, क्योंकि यह संपूर्ण हार्मोनल निर्णय ढाँचे को स्थानांतरित करती है।

LOX-Ethylene Receptor सहक्रिया: [INFERRRED] LOX अधोनियमन ABA और JA ("ब्रेक") को कम करता है। Ethylene receptor अधोनियमन ethylene ("त्वरक" जो ABA का विरोध करता है) को प्रवर्धित करता है। यह "एक-दो प्रहार" -- अवरोधक को कम करना और उसी अवरोधक के प्रतिपक्षी को प्रवर्धित करना -- GA/ABA अनुपात में एक नाटकीय, शीघ्र, और निर्णायक बदलाव की भविष्यवाणी करता है।

विषयवस्तु 5: परिवहन और आयन समस्थिति (Transport and Ion Homeostasis)

प्रमुख लक्ष्य: CNGC, cation-chloride cotransporters (x2), ABC transporters, NRT1/PTR

[KNOWN] Cyclic nucleotide-gated channels (CNGCs) Ca²⁺ अंतर्वाह की मध्यस्थता करते हैं जो रक्षा संकेतन प्रपातों को सक्रिय करता है [34]। [INFERRRED] CNGC अधोनियमन रक्षा-संबद्ध Ca²⁺ संकेतों को कुंठित करता है, जो परिवहन को सीधे विषयवस्तु 1 से जोड़ता है। Cation-chloride cotransporter का समायोजन भ्रूण के परासरणी विभव को समंजित करता है, जो मूलांकुर उभार के लिए जल अवशोषण और स्फीति दाब उत्पादन को संचालित करता है। यह विषयवस्तु आणविक निर्णयों को भौतिक बल में रूपांतरित करती है।

विषयवस्तु 6: चयापचय प्राइमिंग (Metabolic Priming)

प्रमुख लक्ष्य: Trehalose-phosphate synthase (TPS), aspartokinase, CTP synthase

[KNOWN] Trehalose-6-phosphate (T6P) एक शर्करा-स्थिति संकेत है जो SnRK1, एक मुख्य चयापचय काइनेज़ को निवेदित करता है। उच्च T6P "ऊर्जा पर्याप्त" का संकेत देता है और वृद्धि को बढ़ावा देता है [35]। [INFERRRED/SPECULATIVE] TPS अधोनियमन T6P को कम करेगा, SnRK1 को सक्रिय करेगा -- जो विरोधाभासी रूप से संचित भंडारों के अपचय (लिपिड गतिशीलता, स्टार्च विघटन) को बढ़ावा देता है। exRNAs आपातकालीन भंडार गतिशीलता को प्रेरित करने के लिए इसका दोहन कर सकते हैं, जिससे अंकुरण के लिए चयापचय ईंधन आपूर्ति त्वरित होती है। यह भविष्यवाणी सरल TPS-वृद्धि मॉडल का खंडन करती है और इसे प्राथमिकता प्रायोगिक सत्यापन की आवश्यकता है।

3.2 अंतर-विषयवस्तु सहक्रियाएँ

[INFERRRED] छह विषयवस्तुएँ स्वतंत्र नहीं हैं -- ये एक परस्पर सुदृढ़ करने वाला तंत्रजाल बनाती हैं:

1. एपिजेनेटिक-हार्मोनल अक्ष (विषयवस्तु 2+4): क्रोमैटिन खुलने से अंकुरण-समर्थक प्रवर्तक सुलभ होते हैं; हार्मोन पुनर्संतुलन उन्हें सक्रिय करने के लिए प्रतिलेखन कारक प्रदान करता है। GA संकेतन आगे क्रोमैटिन पुनर्निर्माण को बढ़ावा देता है, एक सकारात्मक प्रतिपुष्टि चक्र बनाता है [1, 18]।
2. रक्षा-ऊर्जा मुक्ति (विषयवस्तु 1+6): रक्षा में कमी चयापचय संसाधनों को मुक्त करती है। चयापचय प्राइमिंग इस भंडार को पूरक करने के लिए भंडार गतिशीलता को निर्देशित करती है।
3. ABA-ROS क्षीणण (विषयवस्तु 3+4): [KNOWN] ABA और ROS एक सकारात्मक प्रतिपुष्टि चक्र बनाते हैं जो सुदृढ़ करता है [19, 33]। exRNAs इस चक्र को दोनों ओर से तोड़ते हैं: ABA संश्लेषण को कम करना (LOX के माध्यम से) जबकि ROS को अंकुरण-समर्थक विंडो में सूक्ष्म-समायोजित करना।
4. रक्षा-ROS एकीकरण (विषयवस्तु 1+3): रक्षा दमन बड़े, हानिकारक ऑक्सीडेटिव विस्फोट को रोकता है। ROS अनुकूलन तब अवशिष्ट ROS को संकेतन-उत्पादक श्रेणी में अंशांकित करता है। रक्षा दमन के बिना, प्रतिभौक्तीकारकों को कम करना पहले से अत्यधिक विस्फोट को प्रवर्धित करेगा।
5. परिवहन-हार्मोन क्रियान्वयन (विषयवस्तु 5+4): हार्मोन पुनर्संतुलन रासायनिक निर्देश उत्पन्न करता है; परिवहन पुनर्विन्यास जैवभौतिक क्रियान्वयन प्रदान करता है (जल अवशोषण, स्फीति दाब, कोशिका विस्तार)।

3.3 दो परीक्षण-योग्य कारणात्मक मॉडल

मॉडल 1: रक्षा-एपिजेनेटिक पुनर्क्रमादेशन (प्राथमिक)

exRNAs मुख्य रूप से उच्च-स्तरीय नियामक नोड्स -- एपिजेनेटिक लेखकों और रक्षा द्वारपालों -- को मौन करते हैं ताकि बीज की विकासात्मक अवस्था का मौलिक पुनर्क्रमादेशन हो सके। हार्मोनल और चयापचय परिवर्तन अनुप्रवाह परिणाम हैं।

- प्रमुख प्रारंभिक लक्ष्य: DNA methyltransferase, SUVR5, EDR2, MOS1, ethylene receptor
- केंद्रीय मार्ग: एपिजेनेटिक दमनमुक्ति --> GA जैवसंश्लेषण जीन सक्रियण --> GA/ABA अनुपात परिवर्तन
- प्रमुख भविष्यवाणी: Pacllobutrazol (GA जैवसंश्लेषण अवरोधक) अंकुरण लाभ को प्रबलता से क्षीण करता है
- कालिक भविष्यवाणी: एपिजेनेटिक/रक्षा लक्ष्य पहले अधोनियमित होते हैं (3-6 घंटे); ROS परिवर्तन बाद में आते हैं (12-24 घंटे)

मॉडल 2: चयापचय-हार्मोनल प्राइमिंग (वैकल्पिक)

exRNAs मुख्य रूप से तनाव-प्रतिक्रिया और ROS-उत्पादक प्रणालियों को दबाते हैं, जिससे अंतःशोषण के दौरान हानिकारक ऑक्सीडेटिव विस्फोट रुकता है और हार्मोनल संतुलन निष्क्रिय रूप से बृद्धि की ओर झुक जाता है।

- **प्रमुख प्रारंभिक लक्ष्य:** Peroxidase, LOX, GST, CNGC, TPS
- **केंद्रीय मार्ग:** ROS क्षीणन --> ABA-ROS प्रतिपुष्टि चक्र टूटना --> निष्क्रिय GA/ABA परिवर्तन
- **प्रमुख भविष्यवाणी:** अनुपचारित बीजों पर लगाया गया प्रतिऑक्सीकारक (ascorbic acid) आंशिक रूप से प्रभाव की नकल करता है
- **कालिक भविष्यवाणी:** ROS/चयापचय लक्ष्य पहले अधोनियमित होते हैं (1-3 घंटे); एपिजेनेटिक परिवर्तन बाद में आते हैं

मूल्यांकन: [INFERRRED] दोनों मॉडल परस्पर अनन्य नहीं हैं। दोनों क्रियाविधियाँ संभवतः एक साथ संचालित होती हैं, जिनका सापेक्ष योगदान सुषुप्ति की गहराई और पर्यावरणीय परिस्थितियों पर निर्भर करता है। समय-श्रृंखला qRT-PCR (खंड 5.2) यह निर्धारित करेगा कि मानक प्रयोगशाला परिस्थितियों में कौन-सा प्रमुख है।

3.4 न्यूनतम प्रभावी हस्तक्षेप

विषयवस्तु विश्लेषण के आधार पर, तीन-नोड संयोजन वह न्यूनतम जीन समुच्चय प्रस्तुत करता है जो पूर्ण प्रारूप-लक्षण की पुनरावृत्ति की सर्वाधिक संभावना रखता है:

1. एपिजेनेटिक दमनमुक्ति: DNA methyltransferase + SUVR5
2. हार्मोन पुनर्संतुलन: Ethylene receptor + LOX
3. रक्षा में कमी: EDR2 + MOS1

6 जीनों का यह "न्यूनतम प्रभावी मिश्रण" (कुल 109 में से) कृत्रिम exRNA डिज़ाइन के लिए प्राथमिक केंद्र बिंदु होना चाहिए, यदि क्रियाविधि सत्यापित होती है।

4. भ्रामक कारक विश्लेषण [गोपनीय]

छह वैकल्पिक स्पष्टीकरण exRNA-मध्यस्थ जीन मौनीकरण से स्वतंत्र रूप से देखे गए अंकुरण सुधार की व्याख्या कर सकते हैं। इनका व्यवस्थित रूप से समाधान किया जाना चाहिए।

4.1 भ्रामक कारक सारांश

#	भ्रामक कारक	संभाव्यता	खतरे का स्तर
1	EPS परासरणी प्राइमिंग (Osmopriming)	उच्च	गंभीर (CRITICAL)
2	पॉलीसैकेराइड प्रेरक प्रभाव (MAMP)	मध्यम-उच्च	उच्च (HIGH)
3	सूक्ष्मजीवी समुदाय प्रभाव (जीवित जीवाणु)	मध्यम	सशर्त (CONDITIONAL)
4	संदूषण / गलत एनोटेशन	उच्च	गंभीर (CRITICAL)

#	भ्रामक कारक	संभाव्यता	खतरे का स्तर
5	RNA स्थिरता एवं मात्रा (Dosage)	उच्च	उच्च (HIGH)
6	अविशेष RNA प्रभाव (PAMP-सदृश)	मध्यम	मध्यम (MEDIUM)

4.2 विस्तृत भ्रामक कारक विश्लेषण

भ्रामक कारक 1: EPS परासरणी प्राइमिंग (गंभीर)

[KNOWN] परासरणी प्राइमिंग एक सुस्थापित, वाणिज्यिक रूप से प्रयुक्त कृषि तकनीक है [6]। जीवाणु EPS उच्च-आणविक-भार बहुलक हैं जो किसी भी भिगोने के घोल के जल विभव को अनिवार्य रूप से कम करेंगे। [INFERRRED] संपूर्ण अंकुरण प्रारूप-लक्षण बिना किसी जैविक संकेतन के एक पाठ्यपुस्तकीय परासरणी प्राइमिंग प्रभाव हो सकता है। यह एकल सबसे सरल वैकल्पिक स्पष्टीकरण है। इसके लिए किसी नवीन जीवविज्ञान की आवश्यकता नहीं है।

नियंत्रण प्रयोग: वाष्ण दाब परासरणमापी द्वारा M-9 के परासरणी विभव को मापें; समपरासरणी PEG 8000 नियंत्रण बनाएँ। यदि PEG प्रारूप-लक्षण की पुनरावृत्ति करता है, तो exRNA परिकल्पना निरस्त है।

भ्रामक कारक 2: पॉलीसैकेराइड प्रेरक प्रभाव (उच्च)

[KNOWN] जीवाणु पॉलीसैकेराइड शास्त्रीय MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) हैं [28, 29]। पादप इन अणुओं को प्रतिरूप पहचान ग्राहियों के माध्यम से पहचानते हैं और MAMP-उत्प्रेरित प्रतिरक्षा (MTI) को सक्रिय करते हैं। लाभकारी मूलमंडल जीवाणुओं से हार्मोनिसिस और वृद्धि-रक्षा प्राइमिंग सौम्य परिस्थितियों में वृद्धि संवर्धन का कारण बन सकती है [36]।

नियंत्रण प्रयोग: M-9 घोल का RNase A/T1 उपचार। यदि RNase उपचार प्रारूप-लक्षण को समाप्त नहीं करता, तो पॉलीसैकेराइड (RNA नहीं) सक्रिय कारक हैं।

भ्रामक कारक 3: सूक्ष्मजीवी समुदाय प्रभाव (सर्वात)

[KNOWN] पादप वृद्धि संवर्धक मूलमंडल जीवाणु (PGPR) IAA, साइडोरोफोर, ACC deaminase, और अन्य चयापचय उत्पाद उत्पन्न करते हैं जो सीधे पादप वृद्धि को बढ़ावा देते हैं [36]। EPS-उत्पादक PGPR तनाव परिस्थितियों में विशेष रूप से प्रभावी होते हैं [37]।

मुख्य प्रश्न: क्या M-9 को फिल्टर-निर्जिमित (0.22 um) किया गया था? यदि हाँ, तो यह भ्रामक कारक नियंत्रित है। यदि नहीं, तो यह एक गंभीर खतरा है।

भ्रामक कारक 4: संदूषण / गलत एनोटेशन (गंभीर)

लक्ष्य सूची में cry8Ba (*B. thuringiensis* क्रिस्टल प्रोटीन) की उपस्थिति अनुक्रमण पुस्तकालय में जीवाणु RNA संदूषण को इंगित करती है। एकाधिक reverse transcriptase डोमेन प्रोटीन दोहराव वाले रेट्रोट्रांसपोज़ॉन अनुक्रमों के विरुद्ध लघु-रीड सरेखण कृत्रिमताओं का सुझाव देते हैं। ये जैवसूचनाविज्ञान संबंधी चेतावनी संकेत संपूर्ण लक्ष्य सूची की विश्वसनीयता को कमज़ोर करते हैं और किसी भी आर्द्ध-प्रयोगशाला सत्यापन से पहले इनका समाधान किया जाना चाहिए।

आवश्यक: sRNA रीड्स को पहले जीवाणु जीनोम से पुनः-मैप करें; सभी लक्ष्यों को NCBI nr के विरुद्ध BLAST करें; गैर-पादप और ट्रांसपोज़ॉन-संबंधित हिट्स हटाएँ; छानित बनाम मूल लक्ष्य संख्या की रिपोर्ट करें।

भ्रामक कारक 5: RNA स्थिरता एवं मात्रा (उच्च)

[KNOWN] नग्न RNA की पर्यावरणीय RNases की उपस्थिति में अर्ध-आयु सेकंडों से मिनटों तक होती है [13, 14]। exRNA परिकल्पना के काम करने के लिए, जीवाणु sRNAs को भिगोने के घोल में 4-8 घंटे तक जीवित रहना होगा, बीज आवरण को पार करना होगा [22, 23], भ्रूण कोशिकाद्रव्य तक पहुँचना होगा, पादप AGO प्रोटीनों में लोड होना होगा [38], और पर्याप्त रससमीकरणमिति पर लक्ष्यों को मौन करना होगा।

आवश्यक: कृत्रिम RNA को M-9 में स्पाइक करें, अर्ध-आयु मापें; कुल RNA सांद्रता को परिमाणित करें; प्रति-बीज प्रतिलिपि संख्या का अनुमान लगाएँ।

भ्रामक कारक 6: अविशिष्ट RNA प्रभाव (मध्यम)

[KNOWN] पादपों में जन्मजात प्रतिरक्षा ग्राही होते हैं जो विदेशी न्यूक्लिक अम्लों का पता लगाते हैं [29]। कोई भी विदेशी RNA, अनुक्रम की परवाह किए बिना, PAMP-सदृश वुड्डि-संवर्धक हार्मोसिस प्रतिक्रिया को प्रेरित कर सकता है।

नियंत्रण प्रयोग: समान लंबाई/GC-सामग्री का विक्षिप्त (scrambled) RNA परंतु बिना पालक पूरकता के।

4.3 "निर्णायिक प्रयोग"

एक प्रयोग एक साथ भ्रामक कारक #1, #2, और #3 का समाधान करता है:

M-9 का RNase उपचार, ताप-निष्क्रिय RNase नियंत्रण के साथ, अंकुरण पर परीक्षित।

- यदि RNase प्रारूप-लक्षण को समाप्त कर देता है: भ्रामक कारक #1-3 एक ही प्रहार में निरस्त हो जाते हैं (घोल में वही EPS, परासरणीयता, और पॉलीसैक्रेइड बने रहते हैं -- केवल RNA विघटित होता है)। exRNA परिकल्पना बची रहती है।
- यदि RNase का कोई प्रभाव नहीं होता: exRNA परिकल्पना खिड़ित हो जाती है। गैर-RNA सक्रिय घटक के लक्षणवर्णन की ओर पुनर्निर्देशित करें।

इस प्रयोग में 1-2 सप्ताह लगते हैं और लागत \$500 से कम है। इसे सबसे पहले किया जाना चाहिए।

5. प्रायोगिक सत्यापन योजना

[गोपनीय]

5.1 स्तर 1: आवश्यक नियंत्रण (क्या RNA सक्रिय अणु हैं?)

प्रयोग	नाम	समयसीमा	लागत	मुख्य प्रश्न
1.1	RNase उपचार	1-2 सप्ताह	~\$200	क्या फ़िनोटाइप अक्षुण्ण RNA पर निर्भर करता है?
1.2	EPS प्रभाजन	3-4 सप्ताह	~\$500-800	क्या RNA प्रभाज पर्याप्त है?
1.3	मात्रा-प्रतिक्रिया वक्र	1-2 सप्ताह	~\$150	क्या RNA और फ़िनोटाइप के बीच मात्रात्मक संबंध है?
1.4	समपरासरणी PEG नियंत्रण	1-2 सप्ताह	~\$200	क्या यह केवल परासरण-प्राइमिंग है?
1.5	जैवसूचनात्मक शोधन	1 सप्ताह	\$0	क्या लक्ष्य सूची कठोर फ़िल्टरिंग में टिकती है?

गेट 1 निर्णय (सप्ताह 3): RNase + PEG + जैवसूचनाविज्ञान। पूरे कार्यक्रम पर आगे बढ़ें/रुकें निर्णय।

5.2 स्तर 2: लक्ष्य सत्यापन (क्या पूर्वानुमानित जीन साइलेंस हो रहे हैं?)

प्रयोग 2.1: qRT-PCR समय-श्रृंखला (शीर्ष 15 लक्ष्य)

समयबिंदु: 0 घंटा (सूखा बीज), 4 घंटे, 8 घंटे (भिगोने का अंत), 12 घंटे, 24 घंटे, 48 घंटे अंतःशोषण-पश्चात।

लक्ष्य जीन पैनल:

उच्च-प्राथमिकता लक्ष्य (10):

#	जीन ID	एनोटेशन	तर्काधार
1	SOV1g020340.1	MYB ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर	ABA-प्रतिक्रियाशील मास्टर TF
2	SOV3g000150.1	एथिलीन रिसेप्टर	अंकुरण-समर्थक एथिलीन संकेतन का ऋणात्मक नियामक [25]
3	SOV3g033920.1	PP2A नियामक उपइकार्ड A	DELLA प्रोटीनों (GA दमनकारी) को स्थिर करता है [39]
4	SOV2g014810.1	NAC डोमेन प्रोटीन	तनाव/ABA-प्रतिक्रियाशील TF
5	SOV1g033340.1	DNA मेथिलट्रांसफरेज़	अंकुरण लोकस पर दमनकारी मेथिलेशन बनाए रखता है [18]
6	SOV3g038840.1	पेरॉक्सिसडेज़	कोशिका भित्ति कठोरीकरण; ROS उत्पादन
7	SOV3g035520.1	लिपॉक्सीजिनेज़ (LOX)	JA जैवसंश्लेषण; ABA क्रॉस-टॉक [27]
8	SOV4g015450.1	SUVR5 हिस्टोन मेथिलट्रांसफरेज़	दमनकारी H3K9me2/3 राइटर
9	SOV5g005530.1	MOS1-सदृश	NLR प्रतिरक्षा नियामक [30]
10	SOV6g036290.1	प्रोटीन HIRA	H3.3 हिस्टोन चैपरोन [32]

द्वितीयक लक्ष्य (3): 11. SOV4g032870.1 -- AHP (साइटोकाइनिन रिले) 12. SOV2g009230.1 -- TPS (परस्पर विरोधी पूर्वानुमान [35] -- परीक्षण करना महत्वपूर्ण) 13. SOV4g038060.1 -- GIS2 (GA प्रतिक्रिया दमनकारी)

ऋणात्मक नियंत्रण (2): 14. SOV2g004250.1 -- Reverse transcriptase डोमेन (संभावित आर्टिफैक्ट -- बदलना नहीं चाहिए) 15. cry8Ba-संबद्ध -- जीवाणु संदूषण सूचक (बदलना नहीं चाहिए)

संदर्भ जीन: Actin, EF1-alpha, GAPDH -- उपयोग से पहले geNorm [40] या NormFinder [41] से सत्यापित करें।

निर्णय नियम: - आगे बढ़ें: 10 उच्च-प्राथमिकता लक्ष्यों में से $>=6$ में 8-24 घंटे पर सार्थक डाउनरेगुलेशन दिखे (फोल्ड-चेंज <0.5 , $p<0.05$)। ऋणात्मक नियंत्रण अपरिवर्तित। - आंशिक: 3-5 लक्ष्य डाउनरेगुलेटेड। लक्ष्य सूची परिष्कृत करें। - रुकें: <3 लक्ष्य डाउनरेगुलेटेड। जैवसूचनात्मक पूर्वानुमान अविश्वसनीय।

प्रयोग 2.2: हार्मोन मार्ग मार्कर जीन

प्रयोग 2.1 के उसी cDNA का उपयोग करते हुए, मार्फ़े: - ABA मार्कर (कमी अपेक्षित): *ABI5*, *RAB18* समजात - GA मार्कर (वृद्धि अपेक्षित): *GA3ox*, *GASA* परिवार समजात - एथिलीन मार्कर (वृद्धि अपेक्षित): *ERF1* समजात

अपेक्षित हस्ताक्षर: M-9-उपचारित बीजों बनाम जल नियन्त्रण में 12-24 घंटे पर ABA मार्कर कम + GA मार्कर बढ़े + एथिलीन मार्कर बढ़े [1, 16, 17]।

5.3 स्तर 3: क्रियाविधि सत्यापन

प्रयोग	नाम	समयसीमा	लागत	मुख्य प्रश्न
3.1	ROS/ऑक्सीडेटिव तनाव परख	3-4 सप्ताह	~\$800-1,200	क्या पूर्वानुमानित ROS परिवर्तन होता है?
3.2	sRNA ग्रहण दृश्योकरण	8-12 सप्ताह	~\$3,000-5,000	क्या exRNA भूषा कोशिकाओं में भौतिक रूप से प्रवेश करते हैं?

5.4 स्तर 4: उन्नत सत्यापन (प्रकाशन-स्तरीय)

प्रयोग	नाम	समयसीमा	लागत	मुख्य प्रश्न
4.1	Degradome/PARE अनुक्रमण [42, 43]	12-16 सप्ताह	~\$5,000-8,000	पूर्वानुमानित स्थलों पर RISC दरार?
4.2	कृत्रिम RNA अनुकृतियाँ	8-10 सप्ताह	~\$3,000-5,000	क्या परिभाषित siRNA प्रभाव की नकल कर सकते हैं?
4.3	<i>Arabidopsis</i> आनुवंशिक सत्यापन	6-8 सप्ताह	~\$500-1,000	क्या <i>met1</i> , <i>etr1</i> उत्परिवर्ती तेज़ी से अंकुरित होते हैं?

5.5 न्यूनतम व्यवहार्य प्रयोग समूह

यदि बजट और समय सीमित हों, तो पाँच प्रयोग सबसे प्रबल प्रमाण-संकल्पना प्रदान करते हैं:

क्रम	प्रयोग	समयसीमा	लागत	यह क्या उत्तर देता है
1	RNase उपचार (1.1)	2 सप्ताह	\$200	क्या RNA सक्रिय अणु है?
2	समपरासरणी PEG (1.4)	2 सप्ताह (समानांतर)	\$200	क्या यह केवल परासरण-प्राइमिंग है?
3	जैवसूचनात्मक शोधन (1.5)	1 सप्ताह (समानांतर)	\$0	क्या लक्ष्य सूची विश्वसनीय है?
4	qRT-PCR समय-श्रृंखला (2.1)	4-6 सप्ताह	\$2,500	क्या लक्ष्य वास्तव में साइलेंस हो रहे हैं?
5	EPS प्रभाजन (1.2)	3-4 सप्ताह (समानांतर)	\$700	RNA प्रभाज बनाम पॉलीसैक्रेटर ड्राइवर प्रभाज?

कुल: 10-12 सप्ताह, उपभोग्य सामग्री में ~\$3,600।

5.6 समयरेखा

सप्ताह: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
1.1 RNase उपचार [==]

1.4 PEG नियंत्रण	[==]
1.5 जैवसूचनात्मक शोधन	[==]
गेट 1 निर्णय -----*	
1.3 मात्रा-प्रतिक्रिया	[==]
1.2 EPS प्रभाजन	[=====]
गेट 2 निर्णय -----*	
2.1 qRT-PCR समय-श्रृंखला	[=====]
2.2 हार्मोन मार्कर	[=====]
डेटा पैकेज पूर्ण -----*	

5.7 जोखिम रजिस्टर

जोखिम	संभावना	प्रभाव	शमन उपाय
RNase फ़ीनोटाइप समाप्त नहीं करता	मध्यम-उच्च	कार्यक्रम-समापक	परिणाम स्वीकार करें; पॉलीसैकेराइड/परासरणी क्रियाविधि की ओर पुनर्निर्देशित करें
PEG फ़ीनोटाइप की नकल करता है	मध्यम	कार्यक्रम-समापक	परिणाम स्वीकार करें; क्रियाविधि परासरण-प्राइमिंग है, RNAi नहीं
अंकुरण के दौरान संदर्भ जीन अस्थिर	मध्यम	qRT-PCR अमान्य करता है	3 संदर्भ जीन चलाएँ; geNorm/NormFinder से सत्यापित करें [40, 41]
बीजों से RNA निष्कर्षण निम्न गुणवत्ता का	मध्यम	स्तर 2 में विलंब	विस्तारित समरूपीकरण के साथ TRIZol का उपयोग करें; PVP-40 जोड़ें
पालक एनोटेशन अपूर्ण	निम्न-मध्यम	लक्ष्य गलत पहचान	पारस्परिक BLAST द्वारा <i>Arabidopsis</i> TAIR से क्रॉस-रेफरेंस करें [24]

6. निष्कर्ष और अनुशंसाएँ

[गोपनीय]

6.1 डेटा क्या दर्शाता है

जैवसूचनात्मक लक्ष्य विश्लेषण एक सुसंगत, बहु-मार्ग लक्ष्यीकरण रणनीति प्रकट करता है जो बीज के प्रसुप्ति से वृद्धि की ओर प्रणाली-स्तरीय पुनःप्रोग्रामिंग के अनुरूप है। लक्ष्य सूची उपापचयी एंजाइमों के बजाय उच्च-स्तरीय नियामक नोड्स -- एपिजेनेटिक राइटर, हार्मोन संकेतन केंद्र, रक्षा द्वारपाल -- के लिए समृद्ध है, जो क्रूर-बल उपापचयी हस्तक्षेप के बजाय परिष्कृत नियामक हेरफेर का संकेत देती है।

6.2 डेटा क्या नहीं दर्शाता

वर्तमान साक्ष्य पूर्णतः जैवसूचनात्मक और सहसंबंधात्मक है। कोई प्रायोगिक सत्यापन नहीं किया गया है। निम्नलिखित अभी भी अप्रमाणित हैं: - क्या पूर्वानुमानित sRNA वास्तव में पालक भूषण कोशिकाओं में प्रवेश करते हैं - क्या कोई पूर्वानुमानित लक्ष्य जीन वास्तव में डाउनरेगुलेटेड होता है - क्या अंकुरण फ़ीनोटाइप RNA पर निर्भर है (परासरण-प्राइमिंग या पॉलीसैकेराइड प्रभावों की तुलना में) - क्या पृष्ठभूमि सामग्री में उद्भूत "Zhu et al. 2022" पूर्ववर्ती एक वास्तविक प्रकाशित अध्ययन है

6.3 निर्णयकर्ताओं के लिए अनुशंसा

RNase + PEG नियंत्रण प्रयोगों में 2-3 सप्ताह और <\$500 का निवेश करें। ये सस्ते, तीव्र और निर्णयक हैं। ये पूर्ण लक्ष्य सत्यापन के समय और लागत के एक अंश में exRNA परिकल्पना को या तो मान्य करेंगे या समाप्त करेंगे।

- यदि RNase + PEG नियंत्रण सफल होते हैं: कार्यक्रम उच्च-मूल्य, उच्च-नवीनता क्षेत्र में प्रवेश करता है। जैवसूचनात्मक शोधन और qRT-PCR सत्यापन (स्तर 2) की ओर आगे बढ़ें। एक सफल कार्यक्रम बीज अंतःशोषण के दौरान जीवाणु-से-पौधा sRNA स्थानांतरण के पहले प्रदर्शनों में से एक होगा -- एक प्रकाशन-योग्य और व्यावसायिक रूप से महत्वपूर्ण खोज।

- यदि कोई भी नियंत्रण विफल होता है: exRNA कार्यक्रम तुरंत रोकें। स्तर 2-4 (\$5,000-20,000+) पर होने वाली बचत मामूली स्तर 1 निवेश को उचित ठहराती है। वास्तविक सक्रिय घटक (EPS परासरण-प्राइमिंग या पॉलीसोकेराइड प्रेरण) के लक्षण-वर्णन की ओर पुनर्निर्देशित करें, जो अभी भी व्यावसायिक रूप से मूल्यवान हो सकता है।

भ्रामक कारकों के विश्लेषण की बीट्रिक्स ईमानदारी एक शक्ति है, कमज़ोरी नहीं। इसे प्रस्तुत करना वैज्ञानिक कठोरता प्रदर्शित करता है और ऐसी परिकल्पना में संसाधनों के निवेश से बचाता है जो अपने सबसे बुनियादी नियंत्रणों से नहीं गुज़री है।

परिशिष्ट A: मध्यम और निम्न प्राथमिकता लक्ष्य [गोपनीय]

मध्यम प्राथमिकता (49 लक्ष्य)

जीन ID	एनोटेशन	मार्ग	अंक
SOV4g000330.1	फाइटोर्न सिंथेज़	उपापचयी	6
SOV1g021670.1	रोग प्रतिरोध प्रोटीन	रक्षा	5
SOV3g021300.1	तनाव प्रतिक्रिया प्रोटीन NST1	रक्षा	5
SOV1g027650.1	रिसेप्टर-सदृश काइनेज़	संकेतन	5
SOV4g000660.1	रिसेप्टर-सदृश Ser/Thr काइनेज़	संकेतन	5
SOV1g043000.1	RING-प्रकार E3 यूबिकिटिन ट्रांसफरेज़	प्रोटीन टर्नओवर	5
SOV1g002960.1	F-box प्रोटीन	प्रोटीन टर्नओवर	5
SOV4g010600.1	ग्लाइकोसिलट्रांसफरेज़	कोशिका भित्ति	5
SOV1g032780.1	ABC ट्रांसपोर्टर-सदृश	परिवहन	5
SOV4g055600.1	साइटोक्रोम P450	उपापचयी	5
SOV5g006110.1	F-box प्रोटीन-सदृश	प्रोटीन टर्नओवर	4
SOV2g038280.1	F-box प्रोटीन	प्रोटीन टर्नओवर	4
SOV2g028550.1	E3 यूबिकिटिन-प्रोटीन लाइगेज़	प्रोटीन टर्नओवर	4
SOV2g021870.1	RING-प्रकार डोमेन प्रोटीन	प्रोटीन टर्नओवर	4
SOV1g033840.1	Glyco_transf_64 डोमेन	कोशिका भित्ति	4
SOV4g051070.1	बीटा-गैलैक्टोसिडेज़	कोशिका भित्ति	4
SOV4g041000.1	ABC ट्रांसपोर्टर-सदृश	परिवहन	4
SOV5g008400.1	कैटायन/H ⁺ एंटीपोर्टर-सदृश	परिवहन	4
SOV2g038560.1	प्रोटीन DETOXIFICATION	परिवहन	4
SOV5g032210.1	NRT1/PTR परिवार ट्रांसपोर्टर	परिवहन	4

जीन ID	एनोटेशन	मार्ग	अंक
SOV6g014710.1	पादप कैडमियम प्रतिरोध-सदृश	परिवहन	4
SOV3g000640.1	ग्लिसरॉल-3-फॉस्फेट ट्रांसफोर्टर	परिवहन	4
SOV1g004930.1	GDSL एस्टरेज़/लाइपेज़	उपापचयी	4
SOV4g008190.1	GDSL एस्टरेज़/लाइपेज़	उपापचयी	4
SOV6g042250.1	GDSL एस्टरेज़/लाइपेज़	उपापचयी	4
SOV1g048270.1	एस्पार्टोकाइनेज़	उपापचयी	4
SOV5g001320.1	CTP सिथेज़	उपापचयी	4
SOV6g037220.1	PPR प्रोटीन	RNA प्रसंस्करण	4
SOV6g035270.1	PPR प्रोटीन	RNA प्रसंस्करण	4
SOV5g000510.1	RNA हेलिकेज़ / स्प्लाइसिंग कारक	RNA प्रसंस्करण	4
SOV1g048290.1	ग्लूटामेट रिसेप्टर	संकेतन	4
SOV2g039720.1	कैल्शियम-बंधन प्रोटीन	संकेतन	4
SOV5g030510.1	प्रोटीन काइनेज़ परिवार	संकेतन	4
SOV1g019270.1	DNA टोपोआइसोमेरेज़ 2	DNA मरम्मत	4
SOV4g051610.1	ATR काइनेज़	DNA मरम्मत	4
SOV1g034720.1	माइटोकॉन्ड्रियल मॉफ्फोलॉजी 35	अंगक	4
SOV2g013310.1	फोलेट-बायोप्टेरिन ट्रांसफोर्टर	परिवहन	3
SOV4g006140.1	कोलीन फॉस्फोट्रांसफ़ेरेज़	उपापचयी	3
SOV6g042110.1	ग्लाइऑक्सिलेट रिडक्टेज़	उपापचयी	3
SOV4g005210.1	PPR प्रोटीन	RNA प्रसंस्करण	3
SOV4g023530.1	LUC7 N-टर्मिनस (स्प्लाइसिंग)	RNA प्रसंस्करण	3
SOV4g046320.1	Ser/Thr काइनेज़	संकेतन	3
SOV6g037890.1	पैटेलिन-6	संकेतन	3
SOV4g011580.1	DNA वॉलीमरेज़	DNA मरम्मत	3
SOV5g013920.1	CRM-डोमेन कारक CFM3	अंगक	3
SOV2g025780.1	TIM50-सदृश आयात उपइकाई	अंगक	3
SOV5g034290.1	साइटोक्रोम C जैवउत्पत्ति	अंगक	3
SOV3g020770.1	TIC214 (हरितलवक आयात)	अंगक	3

जीन ID	एनोटेशन	मार्ग	अंक
SOV4g054740.1	RETICULATA (हरितलवकीय)	अंगक	3

निम्न प्राथमिकता (39 लक्ष्य)

इसमें शामिल हैं: चैपरेन, अज्ञात/अलक्षित प्रोटीन, ट्रांसपोज़ॉन-संबंधित तत्व, सामान्य गृहव्यवस्था जीन, और संदूषण आर्टिफैक्ट (cry8Ba)। विवरण के लिए पूर्ण लक्ष्य सूची देखें।

संदर्भ ग्रंथसूची

[गोपनीय]

- [1] Finch-Savage, W.E. and Leubner-Metzger, G. (2006). "Seed dormancy and the control of germination." *New Phytologist*, 171(3), 501-523. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x
- [2] Bewley, J.D. (1997). "Seed germination and dormancy." *The Plant Cell*, 9(7), 1055-1066. DOI: 10.1105/tpc.9.7.1055
- [3] Weitbrecht, K., Muller, K. and Leubner-Metzger, G. (2011). "First off the mark: early seed germination." *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3289-3309. DOI: 10.1093/jxb/err030
- [4] Shu, K., Zhou, W., Chen, F., Luo, X. and Yang, W. (2018). "Abscisic acid and gibberellins antagonistically mediate plant development and abiotic stress responses." *Frontiers in Plant Science*, 9, 416. DOI: 10.3389/fpls.2018.00416
- [5] Tuan, P.A., Kumar, R., Rehal, P.K., Toora, P.K. and Ayele, B.T. (2018). "Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals." *Frontiers in Plant Science*, 9, 668. DOI: 10.3389/fpls.2018.00668
- [6] Paparella, S., Araujo, S.S., Rossi, G., Wijayasinghe, M., Carbonera, D. and Balestrazzi, A. (2015). "Seed priming: state of the art and new perspectives." *Plant Cell Reports*, 34(8), 1281-1293. DOI: 10.1007/s00299-015-1784-y
- [7] Upadhyay, S.K., Singh, J.S. and Singh, D.P. (2011). "Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition." *Pedosphere*, 21(2), 214-222. DOI: 10.1016/S1002-0160(11)60120-3
- [8] Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.D. and Jin, H. (2013). "Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways." *Science*, 342(6154), 118-123. DOI: 10.1126/science.1239705
- [9] Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F.M., Palmquist, J., Huang, S.D. and Jin, H. (2018). "Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes." *Science*, 360(6393), 1126-1129. DOI: 10.1126/science.aar4142
- [10] He, B., Wang, H., Liu, G., Chen, A., Calvo, A., Cai, Q. and Jin, H. (2023). "Fungal small RNAs ride in extracellular vesicles to enter plant cells through clathrin-mediated endocytosis." *Nature Communications*, 14, 4552. DOI: 10.1038/s41467-023-40093-4
- [11] Ravet, A., Zervudacki, J., Singla-Rastogi, M., Charvin, M., Thiebeauld, O., Perez-Quintero, A.L., Courgeon, L., Candat, A., Lebeau, L., Fortunato, A.E., Mendu, V. and Navarro, L. (2025). "Vesicular and non-vesicular extracellular small RNAs direct gene silencing in a plant-interacting bacterium." *Nature Communications*, 16, 3533. DOI: 10.1038/s41467-025-57908-1
- [12] Cai, Q., He, B., Wang, S., Fletcher, S., Niu, D., Mitter, N., Birch, P.R.J. and Jin, H. (2021). "Message in a Bubble: Shutting small RNAs and proteins between cells and interacting organisms using extracellular vesicles." *Annual Review of Plant Biology*, 72, 497-524. DOI: 10.1146/annurev-arplant-081720-010616
- [13] Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010). "The biofilm matrix." *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. DOI: 10.1038/nrmicro2415
- [14] Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A. and Kjelleberg, S. (2016). "Biofilms: an emergent form of bacterial life." *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94
- [15] Costa, O.Y.A., Raaijmakers, J.M. and Kuramae, E.E. (2018). "Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation." *Frontiers in Microbiology*, 9, 1636. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01636
- [16] Shu, K., Liu, X.D., Xie, Q. and He, Z.H. (2016). "Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination." *Molecular Plant*, 9(1), 34-45. DOI: 10.1016/j.molp.2015.08.010

- [17] Nonogaki, H. (2014). "Seed dormancy and germination -- emerging mechanisms and new hypotheses." *Frontiers in Plant Science*, 5, 233. DOI: 10.3389/fpls.2014.00233
- [18] Kawakatsu, T., Nery, J.R., Castanon, R. and Ecker, J.R. (2017). "Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination." *Genome Biology*, 18, 171. DOI: 10.1186/s13059-017-1251-x
- [19] Li, S., Liu, S., Zhang, Q., Cui, M., Zhao, M., Li, N., Wang, S., Wu, R., Zhang, L., Cao, Y. and Wang, L. (2022). "The interaction of ABA and ROS in plant growth and stress resistances." *Frontiers in Plant Science*, 13, 1050132. DOI: 10.3389/fpls.2022.1050132
- [20] Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L. and He, S.Y. (2014). "Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness." *Molecular Plant*, 7(8), 1267-1287. DOI: 10.1093/mp/ssu049
- [21] Ishibashi, Y., Aoki, N., Kasa, S., Sakamoto, M., Kai, K., Tomokiyo, R., Watabe, G., Yuasa, T. and Iwaya-Inoue, M. (2017). "The interrelationship between abscisic acid and reactive oxygen species plays a key role in barley seed dormancy and germination." *Frontiers in Plant Science*, 8, 275. DOI: 10.3389/fpls.2017.00275
- [22] Manz, B., Muller, K., Kucera, B., Volke, F. and Leubner-Metzger, G. (2005). "Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging." *Plant Physiology*, 138(3), 1538-1551. DOI: 10.1104/pp.105.061663
- [23] Xu, C., Jiao, C., Sun, H., Cai, X., Wang, X., Ge, C., Zheng, Y., Liu, W., Sun, X., Xu, Y., Deng, J., Zhang, Z., Huang, S., Dai, S., Mou, B., Wang, Q., Fei, Z. and Wang, Q. (2017). "Draft genome and transcriptome diversity of 120 Spinacia accessions." *Nature Communications*, 8, 15275. DOI: 10.1038/ncomms15275
- [24] The Arabidopsis Genome Initiative (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature*, 408(6814), 796-815. DOI: 10.1038/35048692
- [25] Bleecker, A.B. and Kende, H. (2000). "Ethylene: a gaseous signal molecule in plants." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 1-18. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.1
- [26] Tang, D., Ade, J., Frye, C.A. and Innes, R.W. (2005). "Regulation of plant defense responses in *Arabidopsis* by EDR2, a PH and START domain-containing protein." *The Plant Journal*, 44(2), 245-257. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02523.x
- [27] Wasternack, C. and Hause, B. (2013). "Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development." *Annals of Botany*, 111(6), 1021-1058. DOI: 10.1093/aob/mct067
- [28] Boller, T. and Felix, G. (2009). "A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors." *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- [29] Zipfel, C. (2014). "Plant pattern-recognition receptors." *Trends in Immunology*, 35(7), 345-351. DOI: 10.1016/j.it.2014.05.004
- [30] Li, Y., Li, S., Bi, D., Cheng, Y.T., Li, X. and Zhang, Y. (2010). "SRFR1 negatively regulates plant NB-LRR resistance protein accumulation to prevent autoimmunity." *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001111. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001111
- [31] Narsai, R., Gouil, Q., Secco, D., Srivastava, A., Kber, Y.V., James-Zorn, C., Timmermans, M.C.P., Provart, N.J. and Whelan, J. (2017). "Extensive transcriptomic and epigenomic remodelling occurs during *Arabidopsis thaliana* germination." *Genome Biology*, 18, 172. DOI: 10.1186/s13059-017-1302-3
- [32] Nie, X., Wang, H., Li, J., Holec, S. and Berger, F. (2014). "The HIRA complex that deposits the histone H3.3 is conserved in *Arabidopsis* and facilitates transcriptional dynamics." *Biology Open*, 3(9), 794-802. DOI: 10.1242/bio.20148680
- [33] Bailly, C. (2004). "Active oxygen species and antioxidants in seed biology." *Seed Science Research*, 14(2), 93-107. DOI: 10.1079/SSR2004159
- [34] Moeder, W., Urquhart, W., Ung, H. and Yoshioka, K. (2011). "The role of cyclic nucleotide-gated ion channels in plant immunity." *Molecular Plant*, 4(3), 442-452. DOI: 10.1093/mp/ssr018
- [35] Tsai, A.Y. and Gazzarrini, S. (2014). "Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture." *Frontiers in Plant Science*, 5, 119. DOI: 10.3389/fpls.2014.00119
- [36] Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009). "Plant-growth-promoting rhizobacteria." *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
- [37] Naseem, H. and Bano, A. (2014). "Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize." *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 689-701. DOI: 10.1080/17429145.2014.902125

- [38] Fang, X. and Qi, Y. (2016). "RNAi in plants: an Argonaute-centered view." *The Plant Cell*, 28(2), 272-285. DOI: 10.1105/tpc.15.00920
- [39] Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P. and Harberd, N.P. (1997). "The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses." *Genes & Development*, 11(23), 3194-3205. DOI: 10.1101/gad.11.23.3194
- [40] Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- [41] Andersen, C.L., Jensen, J.L. and Orntoft, T.F. (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization." *Cancer Research*, 64(15), 5245-5250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- [42] Addo-Quaye, C., Eshoo, T.W., Bartel, D.P. and Axtell, M.J. (2008). "Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the *Arabidopsis* degradome." *Current Biology*, 18(10), 758-762. DOI: 10.1016/j.cub.2008.04.042
- [43] German, M.A., Pillay, M., Jeong, D.H., Hetawal, A., Luo, S., Janardhanan, P., Kannan, V., Rymarquis, L.A., Nobuta, K., German, R., De Paoli, E., Lu, C., Schroth, G., Meyers, B.C. and Green, P.J. (2008). "Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends." *Nature Biotechnology*, 26(8), 941-946. DOI: 10.1038/nbt1417