

# شناصایی برخی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپنوئیدی اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* cv. Hidcote) با تکنیک RNA

## توالی‌یابی RNA

### Identification of some genes involved in terpenoid biosynthesis pathway in *Lavandula angustifolia* using RNA sequencing technique

حسین گرجی‌نی‌شبانکاره<sup>۱</sup>، سارا خراسانی‌نژاد<sup>۲\*</sup>، حسن سلطانلو<sup>۳</sup>، و حیدر شریعتی<sup>۴</sup>

۱- دانش آموخته دوره دکتری، رشته گیاهان دارویی، گروه مهندسی علوم باگبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- استادیار، اصلاح گیاهان دارویی، گروه مهندسی علوم باگبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- دانشیار، اصلاح نباتات، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- استادیار، مهندسی ژنتیک و بیوانفورماتیک، مرکز ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

**Gorgini Shabankareh H<sup>۱</sup>, Khorasaninejad S<sup>۲\*</sup>, Soltanloo H<sup>۳</sup>, Shariati V<sup>۴</sup>**

1- PhD Graduated of medicinal plant, Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Associate Professor of Medicinal plants breeding, Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Associate Professor of Plant Breeding, Plant production faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural, Gorgan, Iran

4- Assistant Professor of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: khorasaninejad@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۳۰)

چکیده

توالی‌یابی RNA در حال حاضر یک انتخاب مناسب جهت مطالعه ترانسکریپتوم گیاهان غیرمدل می‌باشد که با شناسایی سریع تر شبکه‌های ژنی و الگوهای ژن‌های تولید کننده متابولیت‌های ثانویه، می‌تواند جهت افزایش این ترکیبات مؤثر واقع شود. در این مطالعه، به منظور شناسایی برخی ژن‌های دخیل در مسیر ساخت اسکلت ترپنوئیدی در سرشاخه‌های هوایی (برگ و گل) گیاه دارویی اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* cv. Hidcote) با استفاده از توالی‌یابی RNA، با تکنیک پریازده HiSeq2500 Ilumina انجام گرفت. پس از کترول کیفیت خواش‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای FastQC و Trimmomatic، تعداد ۳۰۶۹۹۵۵۷ خواش با کیفیت مناسب تولید شد که بعد از یکپارچه‌سازی de novo با برنامه Evidentialgene، منجر به تولید ۲۶۲۴۱۲ یونی ژن با میانگین طول ۱۱۸۱/۰۷ و N50 معادل ۱۶۳۳ نوکلوتید شد. جهت شناسایی یونی ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپنوئیدی، توالی یونی ژن‌ها در پایگاه KASS بازگذاری شد. در مجموع ۱۷۷۷۷ یونی ژن در ۱۲۲ مسیر زیستی شناسایی شدند، مسیر "اسکلت ترپنوئید" با تعداد ۸۸ یونی ژن از پر تعداد ترین مسیرهای شناسایی شده از میان ۱۶۶۴ یونی ژن مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه بود. به طور کلی نتایج حاصل از تفسیر کارکردی ژن‌ها منتهی به شناسایی ۲۷ ژن در مسیر بیوسنتز اسکلت ترپنوئیدها شد که شامل تمامی ژن‌های دو مسیر اصلی بیوسنتزی اسکلت ترپنوئیدی (مسیر سیتوزولی موالونیک اسید (MVA) و پلاستیدی متیل- اریترول- فسفات (MEP) از ابتدا مسیر تا تولید ایزوپنتنیل دی‌فسفات (IPP) بود. شناسایی توالی ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی اسکلت ترپنوئیدی و عملکردهای مرتبط با آن می‌تواند پایه‌ای برای پژوهش‌های بعدی با پیشبرد اهداف مهندسی متابولیت این ژن‌ها شود.

## واژه‌های کلیدی

پروفایل ترانسکریپتوم

ترپنوئید

توالی‌یابی نسل آینده

گیاهان دارویی

MEP

MVA

## مقدمه

پلی‌ترین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. این متابولیت‌های اختصاصی بزرگ‌ترین گروه از محصولات طبیعی بوده و کاربردهای متنوعی در صنعت دارند (Bhat et al. 2017). مونوترین‌ها و سزکوئی‌ترین‌ها جزء اصلی انسانس بوده که در عطر، طعم، رنگدانه‌های فتوستزی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نقش دارند، در حالی که سایر ترین‌ها جزء عصاره و رزین‌ها هستند که به عنوان مواد سمی به منظور سازوکارهای ارتیاطی و دفاعی در برابر آفات و بیماری‌های گیاهی فعالیت می‌کنند (Pavela et al. 2020). ساختار ترپن‌وئیدها از دو پیش‌ساز اصلی ایزوپنتنیل‌پیروفسفات (IPP: isopentenyl pyrophosphate) و ایزومر آن DMAPP: dimethylallyl (دی‌متیل‌آلیل‌پیروفسفات) تشکیل شده که از طریق مسیر سیتوزولی موالونیک‌اسید (MVA: Mevalonic acid) یا پلاستیدی متیل‌اریترول فسفات (MEP: Methylerythritol phosphate) سنتز می‌شوند (Rodríguez-Concepcion and Boronat 2002). مسیر MVA عمده‌ای مسئول سنتز سزکوئی‌ترین‌وئید و تری‌ترپن‌وئید می‌باشد (شکل ۱)، در حالی که مسیر MEP برای بیوستز مونوترین‌وئید، دی‌ترپن‌وئید و ترتراترپن‌وئید فعال می‌شود (شکل ۲) (Rasulov et al. 2015).

FPS: فارنزیل دی‌فسفات‌ستاز (Farnesyl diphosphate synthase) یک آنزیم کلیدی در بیوستز ایزوپرن‌وئیدها است که با اتصال دو واحد ایزوپنتنیل‌پیروفسفات (IPP) به دی‌متیل‌آلیل دی‌فسفات (DMAPP: dimethylallyl) تشکیل شده (شکل ۲). FPS به عنوان ماده متشکله (diphosphate) تولید می‌کند (شکل ۲). این FPS در اولین نقطه چندشاخه‌ای در مسیر بیوستز ایزوپرن‌وئید جدید در برای چندین ترپن‌وئید مانند سزکوئی‌ترپن‌وئید (Dhar et al. 2013) و پلی‌ایزوپرن‌وئید عمل می‌کند.

امروزه از فناوری‌های امیکس (Omics) برای مطالعه در سطح ترانسکریپتوم، پرتووم و متابولوم استفاده می‌شود. این فناوری‌ها نحوه کارکرد ژنوم در شرایط محیطی خاص، روابط بین ژن‌ها، نقش بخش‌های رمزکننده و غیررمزکننده ژنوم و نقاط کلیدی شبکه پاسخ به شرایط درونی و بیرونی گیاه را روشن می‌سازند (Saidi and Hajibarat 2020).

ترکیبات تعداد زیادی آنزیم اختصاصی مورد نیاز است. درک

گیاهان توانایی سنتز و ذخیره انواع مختلفی از ترکیبات با وزن مولکولی پایین را دارا هستند که اصطلاحاً متابولیت‌های اختصاصی یا ثانویه نامیده می‌شوند. این متابولیت‌ها ترکیبات آلی هستند که غیر ضروری بوده، اما به طور غیر مستقیم بر بقاء و رشد و نمو گیاه تأثیر می‌گذارند. این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده‌تری نسبت به متابولیت‌های اولیه (مثل اسیدهای آمینه) ضروری برای بقاء زندگی سلول‌ها می‌باشند. متابولیت‌های ثانویه گیاه، ترکیب‌هایی با وزن مولکولی کم و ساختار متنوع هستند که منابع طبیعی مهمی برای توسعه داروها و محصولات طبیعی، فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی و اکولوژیکی از جمله سازگاری با محیط‌های مختلف و دفاع در برابر تنفس‌های زیستی به شمار می‌روند (Moore et al. 2014; Harvey et al. 2015). طبق گزارشات، حدود ۲۵۰۰۰۰ متابولیت ثانویه در سلول‌های گیاهی وجود دارد، که بر اساس مبانی بیوستز از لحاظ ساختاری و بیوشیمیایی می‌توانند به سه دسته اصلی شامل فلاونوئیدها، ترپن‌وئیدها و آلالوئیدها تقسیم شوند. به این ترتیب، بیش از ۳۶۰۰۰ ترپن‌وئید، ۱۲۰۰۰ آلالوئید و ۱۰۰۰۰ فلاونوئید کشف شده است، اگرچه این نشان‌دهنده تنها بخشی از آنچه که در طبیعت وجود دارد، می‌باشد (Chen et al. 2016).

ساختمان شیمیایی انسان‌ها شامل هیدروکربن‌ها، استرهای، آلدئیدها، الکل‌ها، فنولیدها، کتون‌ها و ترپن‌ها می‌باشند و به دو شکل کمی و کیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند. به طور کلی انسان‌ها در گروه ترپن‌وئیدها قرار گرفته‌اند. ترپن‌وئیدها از یک یا چند واحد C5 به نام ایزوپنتنیل (Isopentenyl) یا ایزوپرن (Isoperen) تشکیل شده‌اند. اصطلاح "ترین" از ماده اصلی تریانتین درخت بنه یا پسته‌کوهی (*Pistacia lentiscus*) یا ماده اصلی سقر (Turaentine) درخت کاج گرفته شده است. این اصطلاح در ابتدا برای توصیف ترکیبی از هیدروکربن‌های گیاهی ایزومنتریک دارای فرمول مولکولی C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> در انسان استفاده می‌شد (Croteau et al. 2000).

ترپن‌وئیدها با توجه به تعداد واحدهای ایزوپرن درگیر در مسیر بیوستز آن‌ها به مونوترین (C10)، سزکوئی‌ترین‌ها (C15)، دی‌ترین‌ها (C20)، سترین‌ها (C25)، تریترین‌ها (C30) و

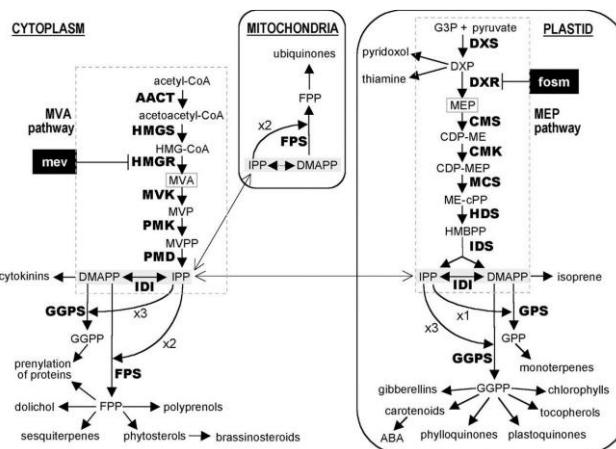
محسوب می‌شود که دارای فعالیت ضدبacterی و ضدقارچی بوده و برای درمان عفونت (Soltani et al. 2013) و اختلالات عصبی (Prusinowska and Smigielski 2014) مورد استفاده قرار می‌گیرد. انسانس گل عمده‌تا از لینالول، لینالیل استات، ۱ و ۸ سینتول Cavanagh and Wilkinson 2002; (Syn. Khorasaninejad et al. 2016; Gorgini Shabankareh et al. 2021)، در حالی که انسانس برگ‌ها حاوی ۱ و ۸ سینتول، بورنثول و کامفور تشکیل شده‌است (Chrysargyris et al. 2016). تجاری‌ترین اسطوخودوس‌ها در جهان اسطوخودوس انگلیسی (Lavandula angustifolia L.officinalis; L.vera L.langustifolia × Lavendin) می‌باشد که در کل دنیا کشت می‌شوند (Lesage-Latifolia 2015). براین اساس، بسیاری از تحقیقات اصلاحی روی این گونه‌ها، بهویژه اسطوخودوس انگلیسی، انجام شده است و انواع مختلفی از آن معرفی شده که شناخته‌شده‌ترین ارقام آن (Lavandula angustifolia 'Hidcote' Monaghan et al. 2004) و (Lavandula angustifolia 'Munstead' Whitman et al. 1996) از حیث دارویی می‌باشند.

در حالی که بسیاری از متابولیت‌های ثانویه در اسطوخودوس انگلیسی شناسایی شده است، اما مسیر بیوستز آن‌ها به علت اطلاعات ژنتیکی محدودی که برای گیاهان موجود است، هنوز مشخص نشده‌است. اخیراً در برخی مطالعات از فن‌آوری RNA-Seq جهت شناسایی ژن‌های حاضر در مسیرهای دخیل در تولید انسانس و متابولیسم ترپن‌وئیدها در گیاه اسطوخودوس انگلیسی استفاده شده است (Li et al. 2019). با توجه به اینکه مهم‌ترین خواص دارویی گیاه اسطوخودوس مربوط به ترپن‌وئیدها می‌باشد، از این‌رو این مطالعه به منظور شناسایی توالی‌های رونوشت‌های ژنی مرتبط با مسیر بیوستزی اسکلت ترپن‌وئیدی در سرشاخه‌های Lavandula angustifolia cv. (Hidcote) انجام شد. رونوشت‌های شناسایی شده در این مطالعه، پایه‌ای برای تحقیقات و مطالعات آینده در زمینه مهندسی متابولیک برای شناسایی شبکه تولید ترکیبات ترپن‌وئیدی به عنوان جعبه سیاه، افزایش بیوستز ترپن‌وئیدها و تنظیم تولید آن برای داروهای گیاهی به روش‌های به‌زراعی و به‌نژادی می‌باشد.

مسیرهای بیوستزی برای تولید تجاری متابولیت‌های خاص ضروری است. متابولیت‌های اختصاصی گیاه اغلب مسیرهای بیوستزی طولانی و پیچیده‌ای داشته و شناسایی تمامی آنزیم‌های درگیر در آن عموماً چالش‌برانگیز است. ساختار بسیاری از مسیرها به صورت شبکه‌های آنزیمی پیچیده‌ای است که چندین محصول را تولید می‌کنند و در نتیجه کشف ژن‌های بیوستزی درگیر در متابولیسم اختصاصی گیاه یک چالش منحصر به فرد است. علاوه‌بر آن اغلب متابولیت‌های اختصاصی با ارزش از گیاهان غیرمدل به دست می‌آیند که اطلاعات ژنومی اندکی از آن‌ها موجود است (Xiao et al. 2013). با توجه به دشواری‌های توالی‌بایی کل ژنوم، در سال‌های اخیر کاوش داده‌های ترنسکریپتومی به عنوان روشی کارآمد برای کشف ژن‌ها یا خانواده‌های ژنی رمزکننده آنزیم‌های درگیر در مسیرهای متابولیکی مطرح شده است (Drew et al. 2013).

توالی‌بایی RNA در گیاهان غیرمدل که قادر اطلاعات ژنوم کافی هستند بسیار کاربردی است، زیرا تمرکز توالی‌بایی بر نواحی رمزکننده است. این روش امکان بررسی مجموعه کامل ترنسکریپتوم را با بازدهی بسیار بالا و به صورت کمی فراهم می‌کند. داده‌های حاصل از RNA-Seq کاربردهای متنوعی دارند و می‌توان از آن برای توصیف ژن‌ها، بدست آوردن اطلاعات از رونوشت‌های جدید، بیان ژن، چندشکلی‌های تک-نوکلئوتیدی (SNP)، پیرایش متناوب و تنوع ساختاری RNA پیامبر (mRNA) استفاده کرد (Dillies et al. 2013; Fang et al. 2015).

جنس اسطوخودوس (Lavandula spp.) گیاه بوته‌ای چندساله با سطح پلوئیدی  $2n=2x=50$  و با اندازه ژنومی (870Mbp) می‌باشد که عمده‌تاً بدلیل گل‌آذین آن که حاوی انسانس می‌باشد، کشت می‌شود و از زمان‌های بسیار قدیم محبوبیت زیادی داشته و به طور گسترده انسانس آن به صورت خشک در عطر درمانی، ماده ضدمیکروبی و سوم دفع آفات استفاده می‌شود (Nattamai Malli Pooranachandhiran 2021; Cavanagh and Wilkinson, 2009; Urwin 2002). اهمیت بالای اقتصادی اسطوخودوس به دلیل کیفیت بالای انسانس آن است، به طوری که سالانه ۲۰۰ تن از آن در سراسر جهان تولید می‌شود (Lesage-Meessen et al. 2015). همچنین یکی از مفیدترین انسانس‌ها در علم پژوهشی



(Rodriguez-Concepcion and Boronat, 2002)

## مواد و روش‌ها

با بن سازه Illumina HiSeq 2500 به صورت خوانش‌های دو طرفه ۱۰۰ نوکلئوتیدی ( $100 \times 2$ ) توالی یابی شد. کیفیت اولیه خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC تعیین شده و در ادامه توالی‌های دارای طول کوچکتر از ۵۰ نوکلئوتید، نوکلئوتیدهای دارای کیفیت کوچکتر از ۲۰ و همچنین آداتپورهای ایلومینا با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه ۰۳۶) حذف شدند. برای بررسی خصوصیات کتابخانه و همچنین تأیید کارایی، پیرایش داده‌ها استفاده شد و داده‌های با کیفیت بالا برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به این که ژنوم گیاه اسطوخودوس *de novo* توالی یابی نشده بود، از روش سرهمندی نوبدید (assembly) استفاده شد. به این منظور جهت یکپارچه‌سازی Evidentialgene خوانش‌های دارای کیفیت بالا از نرم‌افزار K-mer استاندارد اجرا شد و برای استفاده شد. پس از بهینه‌سازی K-mer مسیرهای K-mer استاندارد اجرا شد و برای سایر پارامترهای نرم‌افزار از تنظیمات پیش‌فرض استفاده شد.

یونی‌ژن‌ها در پایگاه تفسیر خودکار KEGG داده مسیرهای بیوستزی داده شدند تا به آن‌ها عدد KO (kegg orthology) تخصیص یابد. روش اجرای شناسه‌های اختصاصی KO روش Single-directional Best Hit (SBH) می‌باشد. شناسه KO مجموعه‌ای از ارتولوگ‌های ژنی است که به صورت مستقیم به یک رکورد در مسیرهای پایگاه KEGG لینک

این آزمایش در سال‌های زراعی ۱۳۹۶-۹۷ در دانشکده‌ی تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۳۰ دقیقه شمالی، طول ۵۳ درجه و ۵۷ دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۵۵ متری از سطح دریای آزاد اجرا شد. در این تحقیق بذر گیاهان *Lavandula angustifolia* cv. Hidcote® Garden Renes شرکت Khorasaninejad et al. (۲۰۱۵) در اردیبهشت ۹۶ در سینی نشاء کشت و در دی ماه ۹۶ به گلدان انتقال یافت. نمونه‌گیری از اندام‌های هوایی (مخلوط برگ و گل) در خرداد ۹۷ (گلدی کامل) انجام شد. نمونه‌ها (شامل سه تکرار که با هم مخلوط شدند و سه نمونه) بالاصله پس از برداشت در ازت مایع متجمد و در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. استخراج RNA کل، از نمونه گیاهی (*Lavandula angustifolia* cv. Hidcote® NucleoSpin® RNA Plant kit (MACHEREY-NAGEL GmbH and Co. KG, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیت و کیفیت RNA استخراجی به ترتیب با ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانورآپ سنجیده شد.

نمونه RNA (استخراج شده) به منظور انجام آزمایش‌های توالی‌یابی، به مؤسسه ژنومیکس پکن (BGI) کشور چین ارسال و

شده. KEGG یکی از پرکاربردترین پایگاه‌های اطلاعاتی زیستی در جهان است که مجموعه ژن‌های یک ژنوم را به کارکردهای سلول و موجود مرتبط می‌کند و این کار به طور خاص از طریق نقشه‌های مسیر KEGG صورت می‌پذیرد (Kanehisa et al. 2015). در این مطالعه از پایگاه اتوماتیک KASS (http://www.genome.jp/kegg/kaas/) به منظور نقشه‌یابی مسیرهای KEGG برای ژن‌های ارتوЛОگ اختصاصی گیاه استفاده شد. در مجموع ۱۷۷۷۷ یونی ژن تفسیر شد که این تعداد در ۱۲۲ مسیر زیستی قرار گرفتند، مسیر "اسکلت ترپنئید" با تعداد ۸۸ یونی ژن از پرتعدادترین مسیرهای شناسایی شده از میان ۱۶۶۴ یونی ژن مسیر بیوستز متابولیت‌های ثانویه بود. به طور کلی نتایج حاصل از تفسیر کارکردی ژن‌ها منتهی به شناسایی ۲۷ ژن در مسیر بیوستز اسکلت ترپنئیدها شد که شامل تمامی ژن‌های دو مسیر اصلی بیوستز اسکلت ترپنئیدی (مسیر سیتوزولی موالونیک اسید (MVA) و پلاستیدی متیل- اریترول- فسفات (MEP) از ابتدای مسیر تا تولید ایزوپستیل دی‌فسفات (IPP) بود (جدول ۱ و شکل ۲).

Moriya et al. (2007) شده که مرجع پیوند ژنوم با مسیرهای زیستی هستند.

## نتایج

متabolیت‌های ثانویه در گیاه اسطوخودوس عمدتاً در سرشاخه‌های گلدار این گیاه تجمع می‌یابد. بنابراین توالی‌یابی ترانسکریپتوم سرشاخه هوایی این گیاه دارویی با هدف شناسایی ژن‌های درگیر در مسیر بیوستز متابولیت‌های ثانویه انجام شد. پس از استخراج RNA از سرشاخه‌های هوایی گیاه دارویی اسطوخودوس و Illumina ارزیابی کمیت و کیفیت نمونه، توالی‌یابی با HiSeq2500 انجام گرفت که تعداد ۳۰۷۱۲۴۷۱۷ خوانش حاصل شد، از این تعداد ۳۰۶۹۹۵۵۷ خوانش با کیفیت مناسب جهت آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در گام اول آنالیزهای بیوانفورماتیکی مرحله یکپارچه‌سازی نویدید ترانسکریپتوم با استفاده از نرم‌افزار Evidential-gene، تعداد ۲۶۲۴۱۲ یونی ژن با میانگین طول ۱۱۸۱/۰۷ و N50 معادل ۱۶۳۳ نوکلئوتید مشخص شد. در گام بعدی توالی یونی ژن‌ها در پایگاه KASS بارگذاری

جدول ۱- آنزیم‌های درگیر در بیوستز اسکلت ترپنئید در ترانسکریپتوم گیاه دارویی اسطوخودوس  
KASS بر اساس نتایج پایگاه (*L. angustifolia* cv. Hidcote)

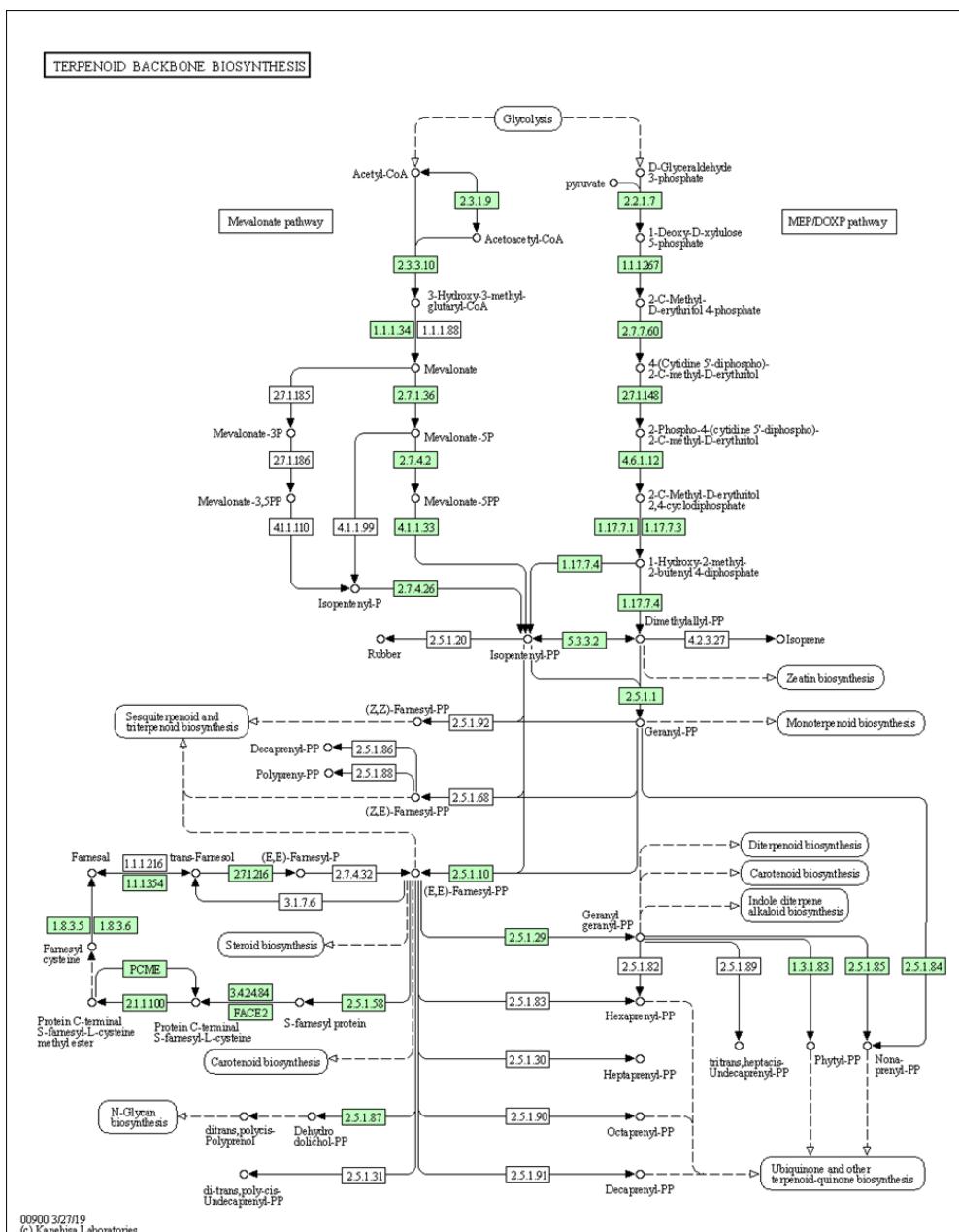
شناخته شده	شناخته شده	توصیف آنزیم	عدد EC*
K00626	۱۰۹۰۰۲۰	acetyl-CoA C-acetyltransferase	[EC:2.3.1.9]
K01641	۱۱۳۵۷۲۷	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	[EC:2.3.3.10]
K00021	۱۲۰۱۳۲۰	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)	[EC:1.1.1.34]
K00869	۲۴۴۱۰۴	mevalonate kinase	[EC:2.7.1.36]
K00938	۱۱۵۷۹۵	phosphomevalonate kinase	[EC:2.7.4.2]
K01597	۱۲۸۶۶۷۷	diphosphomevalonate decarboxylase	[EC:4.1.1.33]
K06981	۱۴۶۹۲۰۸، ۱۴۶۹۲۱۸	isopentenyl phosphate kinase	[EC:2.7.4.26]
K01662	۱۱۶۸۱۸۲، ۳۲۴۶۲، ۱۵۰۴۲۰۶	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	[EC:2.2.1.7]
K0099	۱۴۵۴۸۰۲، ۲۸۶۳۴۱	deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase-۱	[EC:1.1.1.267]
K00991	۱۱۱۲۶۹۶، ۸۱۱۲۵۲، ۸۰۳۸۱۸	C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase-۲	[EC:2.7.7.60]
K00919	۶۴۳۵۰۰	diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase-۴	[EC:2.7.1.148]
K01770	۷۵۷۶۶	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	[EC:4.6.1.12]
K03526	۷۸۶۵۷۵	(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase	[EC:1.17.7.1 1.17.7.3]
K03527	۸۰۹۹۵۹، ۱۶۸۰۷۹، ۲۶۹۴۶۳	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase	[EC:1.17.7.4]
K01823	۱۵۲۴۷۰۵	isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	[EC:5.3.3.2]
K13789	۱۵۲۴۴۷۵	geranylgeranyl diphosphate synthase, type II	[EC:2.5.1.1 2.5.1.10 2.5.1.29]
K15892	۸۶۵۶۴۴	farnesol kinase	[EC:2.7.1.216]

[EC:1.1.1.354]	NAD+-dependent farnesol dehydrogenase	۱۴۳۱۱۴۰، ۱۲۲۲۵۳۳	K15891
[EC:1.8.3.5 1.8.3.6]	prenylcysteine oxidase / farnesylcysteine lyase	۶۳۹۷۷۸	K05906
[EC:3.1.1.-]	PCME; prenylcysteine alpha-carboxyl methyltransferase	۸۱۷۲۰۴، ۱۴۲۳۶۹۱، ۱۲۷۲۶۶۵	K15889
[EC:2.1.1.100]	protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase	۷۸۰۵۳۲	K00587
[EC:3.4.24.84]	STE24 endopeptidase	۱۱۰۷۴۹۸	K06013
[EC:3.4.22.-]	prenyl protein peptidase	۱۲۸۶۵۲۹	K08658
[EC:2.5.1.58 2.5.1.59]	protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	۱۴۶۲۴۰۴	K05955
[EC:2.5.1.87]	ditrans, polycis-polyprenyl diphosphate synthase	۶۵۱۹۴۱	K11778
[EC:1.3.1.83 1.3.1.111]	geranylgeranyl diphosphate/geranylgeranyl-bacteriochlorophyllide a reductase	۱۲۸۸۵۵۶، ۱۹۰۵	K10960
[EC:2.5.1.84 2.5.1.85]	all-trans-nonaprenyl-diphosphate synthase	۸۰۶۱۱۰ ۸۰۵۰۹۹	K05356

## بحث

آنالیز ترانسکریپتوم گونه ارکیده هیبرید (Tan Chay Yan) در مجموع ۳۴۰۲۷ رونوشت (۸۸/۴۱ درصد) تولید کرد که از این تعداد ۲۰ رونوشت مربوط به مسیر ترپنوفئیدها و فنیلپروپانوفئیدها شناسایی شد (Mohd-Hairul et al. 2020). همچنین در گیاه خربزه‌تلخ یا کارلا (*Momordica charantia*) تجزیه و تحلیل نتایج RNA-Seq منجر به شناسایی ژن‌های درگیر در مسیر بیوستزی تری‌ترپنوفئید شد. بیشتر ژن‌ها در مراحل بلوغ در گل‌ها بهویژه گل نر و یا میوه‌ها بهشدت بیان شده بود که نشان می‌دهد این ژن‌ها نقش مهمی در بیوستز کارانتین (Charantin) در کارلا دارند. همچنین شرایط نور مطلوب برای افزایش بیوستز کارانتین در کارلا مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه نور قرمز مؤثرترین طول موج بود. کارانتین یک نوع تری‌ترپنوفئید کوکوربیتان است که عملکرد مفید دارویی مانند فعالیت ضدسرطان، ضددیابت و ضدباکتریایی دارد (Cuong et al. 2017). درخت نفت یا فرفیون هند (*Euphorbia tirucalli*), حاوی دو استروئید دارویی فعال اثوفول و بتا-سیستوسترون در لاتکس آن می‌باشد. در مطالعه‌ای آنالیز ترانسکریپتوم این گیاه برای شناسایی ژن‌های بیوستز اسکلت استرون انجام شد که منجر به شناسایی ژن‌های ۶ آنزیم در مسیر MVA و ۷ آنزیم در مسیر MEP شد (Qiao et al. 2018). بیشتر ژن‌های مرتبط با دو مسیر بیوستزی MVA و MEP متابولیت‌های ثانویه در گیاه مریم‌گلی (*Salvia guaranitica*) با استفاده از توالی‌یابی RNA شناسایی شده است.

استفاده از مطالعه تحلیلی ترانسکریپتوم منجر به شناسایی تعداد زیادی از ژن‌های وابسته به مسیر ساخت ترپنوفئیدها در گیاهان دارویی گردیده است. از آنجا که گیاه اسطوخودوس از نظر اقتصادی گیاه مهمی است که بهدلیل داشتن اسانس در سراسر جهان رشد می‌کنند و به صنایع آرایشی، بهداشتی و دارویی کمک می‌کنند، بههمین دلیل درک بهتر مکانیسم‌های ژنتیکی درگیر در اسانس، شناسایی ژن‌های درگیر در فرآیندهای مهم بیولوژیکی، یافتن نشانگرهای ژنتیکی و شناخت سازوکار مولکولی بیوستز ترپنوفئیدها برای بهبود عملکرد و کیفیت آن ضروری می‌باشد. توالی‌یابی انجام گرفته روی گیاه اسطوخودوس (*L. angustifolia* cv. Maillette) نشان داد که رونوشت‌های تولیدشده شامل ۶۲۱۴۱ ژن کدکننده پروتئین و ۲۰۰۳ ژن کدکننده RNA بودند که بخش بزرگی از این ژنوم تولیدی توالی تکراری را نشان می‌دادند که احتمالاً نشان‌دهنده پلی‌بلوئیداسیون ژنوم گذشته است. بیشتر ژن‌های شناسایی شده در این تحقیق شامل *DXS* و *HDR* بود (Malli et al. 2019). آنالیز ترانسکریپتوم گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) از خانواده چتریان که بذرهای آن دارای اصلی‌ترین ترکیب‌های مونوتربن‌های تیمول، گاما-ترپین و پاراسیمن هستند، متنهی به شناسایی ۱۲۷ مسیر متابولیکی شامل مسیر MVA و MEP و ۳۰ ژن کلیدی مرتبط با مسیر بیوستزی اسکلت ترپن شد (Amiripour et al. 2018). ارزیابی ترانسکریپتوم در گیاه دارویی زنیان توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Soltani Howyzeh et al. 2018).



شکل ۲- آنالیز مسیر KEGG نماینگر ژن‌های درگیر در بیوستز اسکلت ترپنoid مستطیل‌های سبز نشان‌دهنده وجود آنزیم‌های موجود در ترانسکریپتوم گیاه دارویی  
اسطوخودوس Hidcote

*Hedera* (Han et al. 2013) (*Litsea cubeba*)  
*Dioscorea* (Sun et al., 2017) (*helix*)  
*Matricaria* (Li et al., 2018) (*zingiberensis*)  
*Zhang et al. 2018* (*chamomilla*) و سایر گیاهان دارویی شد.  
 در این پژوهش استفاده از RNA-Seq منجر به شناسایی ژن‌های مرتبط با مسیر بیوستز اسکلت ترپنoid (مسیر اصلی ساخت

در این مطالعه ۱۹۸ ژن در مسیر MVA و MEP ژن‌های بیوستز اسکلت ترپنoid و ۶۹ ژن سترز ترپنoid شناسایی شده که احتمالاً درگیر در متابولیسم ترپنoid هستند (Ali et al. 2018). پژوهش در مسیر متابولیکی MEP و MVA مرتبط با بیوستز ترپنoidها، منجر به شناسایی شمار زیادی ژن جدید در گیاهان مختلف مانند جنسینگ (*Panax notoginseng*) (Luo et al., 2011)

مسیرها در جهت افزایش ساخت ترکیبات ترپنئیدی اختصاصی از قبیل مونوتربین‌ها (لينالول) و سزکوئی‌ترپین‌ها (كاریوفيلن اکساید) در انسان این گیاه مؤثر واقع شود. همچنین تحقیقات روی ژن‌های دخیل در مسیرهای بیوستزی متابولیت‌های ثانویه با تأکید بر اجزای انسان در این گیاه می‌تواند پایه‌ای برای پژوهش‌های بعدی با پیشبرد اهداف مهندسی مسیر در جهت شناخت هرچه بیشتر شبکه ترپنئیدی و مهندسی متابولیت در اسطوخودوس گردد.

### منابع

- Ali M, Hussain RM, Rehman NU, She G, Li P, Wan X, Guo L, Zhao J (2018) *De novo* transcriptome sequencing and metabolite profiling analyses reveal the complex metabolic genes involved in the terpenoid biosynthesis in Blue Anise Sage (*Salvia guaranitica* L.). *DNA Research*, 25: 597-617.
- Amirpour M, Nouri A, Shariati V, Soltani Hoveyzeh M (2018) Identification of terpene skeletal biosynthetic pathway genes in *Trachyspermum ammi* L. using RNA sequencing. *Iranian Genetics Society*. 13: 133-141. (In Farsi)
- Bhat SV, Nagasampagi BA, Sivakumar, M (2017) Chemistry of Natural products. New York: Springer Berlin Heidelberg. 830p.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM (2002) Biological activities of Lavender essential oil. *Phytotherapy Research*. 16:301–308.
- Chen Q, Ma C, Qian J, Lan X, Chao N, Sun J, Wu Y (2016) Transcriptome sequencing of *Gynostemma pentaphyllum* to identify genes and enzymes involved in triterpenoid biosynthesis. *International Journal of Genomics*. 16: 1-10.
- Chrysargyris A, Laoutari S, Litskas, VD, Stavrinides MC, Tzortzakis, N (2016) Effects of water stress on lavender and sage biomass production, essential oil composition and biocidal properties against *Tetranychus urticae* (Koch). *Scientia Horticulturae*. 213: 96-103.
- Croteau R, Kutchan T.M. Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*. 14:111-129.
- Cuong DM, Jeon J, Morgan AM, Kim C, Kim JK, Lee SY, Park SU (2017) Accumulation of charantin and expression of triterpenoid biosynthesis genes in bitter melon (*Momordica charantia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65: 7240-7249.
- Dhar MK, Koul A, Kaul S (2013) Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic

اسانس) در گیاه دارویی اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* cv Hidcote) شد. این مطالعه اولین تجزیه و تحلیل نوپدید ترانسکریپتم در اندام هوایی (سرشاخه گل دار) اسطوخودوس رقم Hidcote می‌باشد که علاوه‌بر اولین گزارش، اطلاعاتی را در خصوص شناسایی و بیان رونوشت‌های مرتبط با ترپنئیدها و سزکوئی‌ترپنئیدها که از مهمترین ترکیبات Hidcote فارماکولوژیک فعال توزیع شده در سرشاخه‌های رقم ارائه می‌دهد. به طور کلی شناسایی ژن‌های مرتبط با بیوستز اسکلت ترپنئیدی گیاه اسطوخودوس می‌تواند در بهنژادی این

pathway and potential molecular target for drug development. *New Biotechnology*. 30: 114-123.

Drew DP, Dueholm B, Weitzel C, Zhang Y, Sensen CW, Simonsen HT (2013) Transcriptome Analysis of *Thapsia laciniata* Rouy Provides Insights into Terpenoid Biosynthesis and Diversity in Apiaceae. *International Journal of Molecular Sciences*. 14:9080-9098.

Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeamougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, Guernec G (2013) A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Briefings in Bioinformatics*. 14: 671-683.

Fang Y, Huang J, Huang X, Chen SH, Zou PC, Li WS, Yu K, Liu YW (2015) Generation of expressed sequence tags from a cDNA library of *Coleus forskohlii* for identification of genes involved in terpene biosynthesis. *Biologia Plantarum*. 59: 463-468.

Han XJ, Wang YD, Chen YC, Lin LY, Wu QK (2013) Transcriptome sequencing and expression analysis of terpenoid biosynthesis genes in *Litsea cubeba*. *PloS one*. 8: e76890.

Harvey A L, Edrada-Ebel R, Quinn RJ (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews in Drug Discovery*. 14: 111-129.

Gorgini Shabankareh H, Khorasaninejad S, Soltanloo H, Shariati V (2021) Physiological response and secondary metabolites of three lavender genotypes under water deficit. *Scientific Reports*. 11:19164.

Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M (2015) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*. 44: 457-462.

Khorasaninejad, S, Soltanloo H, Ramezanpour SS, Hadian J, Atashi S (2015) The Effect of Drought Stress on the Growth, Essential Oil Yield and Chemical Composition of Lavender. *Journal of Crops Improvement (Journal of Agriculture)*. 17: 979-988. (In Farsi)

- Khorasaninejad S, Soltanloo H, Hadian J, Atashi S (2016) The Effect of Salinity Stress on the Growth, Essential Oil Yield and Chemical Composition of Lavender (*Lavandula angustifolia*). Journal of Horticulture Science. 30: 206-216. (In Farsi)
- Luo H, Sun, C, Sun Y, Wu Q, Li Y, Song J, Chen S (2011) Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers. BMC genomics. 12: 1-15.
- Lesage-Meessen L, Bou M, Sigoillot JC, Faulds CB, Lomascolo A (2015) Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: A review of current use and potential application in white biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology. 99: 3375-3385
- Li H, Li J, Dong Y, Hao H, Ling Z, Bai H, Shi L (2019) Time-series transcriptome provides insights into the gene regulation network involved in the volatile terpenoid metabolism during the flower development of lavender. BMC Plant Biology. 19: 1-17.
- Li J, Liang Q, Li C, Liu M, Zhang Y (2018) Comparative transcriptome analysis identifies putative genes involved in dioscin biosynthesis in *Dioscorea zingiberensis*. Molecules. 23: E454.
- Malli RPN, Adal AM, Sarker LS, Liang P, Mahmoud SS (2019) *De novo* sequencing of the *Lavandula angustifolia* genome reveals highly duplicated and optimized features for essential oil production. Planta. 249: 251-256.
- Mohd-Hairul AR, Abdullah J, Lian Song A, Ling Foo H, Parameswari Namasivayam P, Abdul Rahim R (2020) Volatile constituents and floral transcriptome analyses provide new insights into fragrance biosynthesis of Vanda 'Tan Chay Yan'. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 12: 143-151.
- Monaghan JM, Wurr DCE, Fellows JR (2004) The effects of temperature and lighting on flowering of lavender (*Lavandula angustifolia* 'Hidcote'). Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 79: 811-817.
- Moore BD, Andrew RL, Külheim C, Foley WJ (2014) Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. New Phycologist. 201: 733-750.
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M (2007) KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. Nucleic Acids Research 35: 182-W185.
- Nattamai Malli Pooranachandhiran, R., (2021). *De novo* sequencing, annotation, and characterization of the genome of *Lavandula angustifolia* (Lavender)
- Pavela R, Maggi F, Giordani C, Cappellacci L, Petrelli R, Cana, A (2020) Insecticidal activity of two essential oils used in perfumery (*ylang and frankincense*). Natural Product Research. 108: 137-147.
- Prusinowska, R, Smigelski, KB (2014) Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.): A review. Herba Polonica Journal. 60: 56-66.
- Qiao W, Li C, Mosongo I, Liang Q, Liu M, Wang X (2018) Comparative transcriptome analysis identifies putative genes involved in steroid biosynthesis in *Euphorbia tirucalli*. Genes. 9: 38-45.
- Rasulov B, Talts E, Kannaste A, Niinemets U (2015). Bisphosphonate inhibitors reveal a large elasticity of plastidic isoprenoid synthesis pathway in isoprene-emitting hybrid aspen. Plant Physiology. 168: 532-548.
- Rodríguez-Concepcion M, Boronat A (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. Plant Physiology. 130: 1079-1089.
- Saidi A, Hajibaratz Z (2020) Application of Next Generation Sequencing, GWAS, RNA seq, WGRS, for genetic improvement of potato (*Solanum tuberosum* L.) under drought stress. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 29: 101-111.
- Soltani Howyzed M, Noori S, Vahid Shariati V, Amiripour M (2018) Comparative transcriptome analysis to identify putative genes involved in thymol biosynthesis pathway in medicinal plant *Trachyspermum ammi* L. Scientific Reports. 8: 134-145.
- Soltani R, Soheilipour S, Hajhashemi V, Asghari G, Bagheri M, Molavi M (2013) Evaluation of aromatherapy with lavender essential oil on post-tonsillectomy pain in pediatric patients: A randomized controlled trial. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. 77: 1579-1581.
- Sun H, Li F, Xu Z, Sun M, Cong H, Qiao F, Zhong X (2017). *De novo* leaf and root transcriptome analysis to identify putative genes involved in triterpenoid saponins biosynthesis in *Hedera helix* L. PloS One. 12: e0182243.
- Urwin N (2009) Improvement of lavender varieties by manipulation of chromosome number. Rural Industries Research and Development Corporation.
- Whitman CM, Heins RD, Cameron AC, Carlson WH (1996) Cold Treatments, Photoperiod, and Forcing Temperature Influence Flowering of *Lavandula angustifolia*. Hortscience. 31:1150-1153.
- Xiao M, Zhang Y, Chen X, Lee E-J, Barber CJ, Chakrabarty R, Desgagné-Penix I, Haslam TM, Kim Y-B, Liu E (2013) Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. Journal of Biotechnology. 166:122-134.
- Zhang W, Tao T, Liu X, Xu F, Chang J, Liao Y (2018) *De novo* assembly and comparative transcriptome analysis: novel insights into sesquiterpenoid biosynthesis in *Matricaria chamomilla* L. Acta Physiologae Plantarum. 40:129.