ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۲۳۳ - ۲۲۵

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

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

حسین گرگینی‌شبانکاره[۱]، سارا خراسانی‌نژاد*[۲]، حسن سلطانلو[۳]، وحید شریعتی[۴]

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

۲- استادیار، اصلاح گیاهان دارویی، گروه مهندسی علوم باغبانی 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[1], Khorasaninejad S*[2], Soltanloo H[3], Shariati V[4]**

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: ۱۴۰۱/۰۲/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹)

## چکیده

**توالی‌یابی RNA در حال حاضر یک انتخاب مناسب جهت مطالعه ترانسکریپتوم گیاهان غیرمدل می‌باشد که با شناسایی سریع‌تر شبکه‌های ژنی و الگوهای ژن‌های تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه، می‌تواند جهت افزایش این ترکیبات مؤثر واقع شود. در این مطالعه، به‌منظور شناسایی برخی ژن‌های دخیل در مسیر ساخت اسکلت ترپنوئیدی در سرشاخه‌های هوایی (برگ و گل) گیاه دارویی اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* cv. Hidcote) بااستفاده از توالی‌یابی RNA، با تکنیک پربازده Iluumina HiSeq2500 انجام گرفت. پس از کنترل کیفیت خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای FastQC و Trimmomatic، تعداد ۳۰۶۹۹۵۵۵۷ خوانش با کیفیت مناسب تولید شد که بعد از یکپارچه‌سازی *de novo* با برنامه Evidentialgene، منجر به تولید ۲۶۲۴۱۲ یونی‌ژن با میانگین طول ۱۱۸۱/۰۷ و N50 معادل ۱۶۳۳ نوکلئوتید شد. جهت شناسایی یونی‌ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپنوئیدی، توالی یونی‌ژن‌ها در پایگاه KASS بارگذاری شد. در مجموع ۱۷۷۷۷ یونی‌ژن در ۱۲۲ مسیر زیستی شناسایی شدند، مسیر "اسکلت ترپنوئید" با تعداد ۸۸ یونی‌ژن از پر تعدادترین مسیرهای شناسایی‌شده از میان ۱۶۶۴ یونی ژن مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه بود. به‌طورکلی نتایج حاصل از تفسیر کارکردی ژن‌ها منتهی به شناسایی ۲۷ ژن در مسیر بیوسنتز اسکلت ترپنوئیدها شد که شامل تمامی‌ژن‌های دو مسیر اصلی بیوسنتزی اسکلت ترپنوئیدی (مسیر سیتوزولی موالونیک‌اسید (MVA) و پلاستیدی متیل- اریترول- فسفات (MEP) از ابتدای 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

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08 ]

## مقدمه

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 به‌طور 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 ازجمله سازگاری با محیط‌های مختلف و دفاع در برابر تنش‌های زیستی به‌شمار می‌روند (Moore et al. 2014; Harvey et al. 2015). طبق گزارشات، حدود ۲۵۰۰۰۰ متابولیت ثانویه در سلول‌های گیاهی وجود دارد، که بر اساس مبانی بیوسنتز از لحاظ ساختاری و بیوشیمیایی می‌توانند به سه دسته اصلی شامل فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها تقسیم شوند. به این‌ترتیب، بیش از ۳۶۰۰۰ ترپنوئید، ۱۲۰۰۰ آلکالوئید 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 اسانس‌ها شامل هیدروکربن‌ها، استرها، آلدئیدها، الکل‌ها، فنولیدها، کتون‌ها و ترپن‌ها می‌باشند و به دو شکل کمی و کیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند. به‌طور کلی اسانس‌ها در گروه ترپنوئیدها قرار گرفته‌اند. ترپنوئیدها از یک یا چند واحد C5 به نام ایزوپنتینیل (Isopentenyl) یا ایزوپرن (Isoperen) تشکیل شده‌اند. اصطلاح "ترپن" از ماده اصلی تربانتین درخت بنه یا پسته‌کوهی (*Pistacia terbinthus*) یا ماده اصلی سقز (Turaentine) درخت کاج گرفته شده است. این اصطلاح در ابتدا برای توصیف ترکیبی از هیدروکربن‌های گیاهی ایزومتریک دارای فرمول مولکولی C10H16 در اسانس استفاده می‌شد (Croteau et al. 2000).

ترپنوئیدها با توجه به تعداد واحدهای ایزوپرن درگیر در مسیر بیوسنتز آن‌ها به مونوترپن (C10)، سزکویی‌ترپن‌ها (C15)، دی‌ترپن‌ها (C20)، سسترپن‌ها (C25)، تریترپن‌ها (C30) و پلی‌ترپن‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. این متابولیت‌های اختصاصی بزرگ‌ترین گروه از محصولات طبیعی بوده و کاربردهای متنوعی در صنعت دارند (Bhat et al. 2017). مونوترپن‌ها و سزکویی‌ترپن‌ها جزء اصلی اسانس بوده که در عطر، طعم، رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نقش دارند، در حالی که سایر ترپن‌ها جزء عصاره و رزین‌ها هستند که به‌عنوان مواد سمی به‌منظور سازوکارهای ارتباطی 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 دی‌متیل‌آلیل‌پیروفسفات (DMAPP: dimethylallyl pyrophosphate) تشکیل شده که از طریق مسیر سیتوزولی موالونیک‌اسید (MVA: Mevalonic acid) یا پلاستیدی متیل‌اریترول فسفات (MEP: Methylerythritol phosphate) سنتز می‌شوند (Rodrıguez-Concepcion and Boronat 2002). مسیر MVA عمدتاً مسئول سنتز سزکویی‌ترپنوئید و تری‌ترپنوئید می‌باشد (شکل ۱)، در حالی‌که مسیر MEP برای بیوسنتز مونوترپنوئید، دی‌ترپنوئید و تتراترپنوئید فعال می‌شود (شکل ۲) (Rasulov et al. 2015). فارنزیل دی‌فسفات‌سنتاز (FPS: Farnesyl diphosphate synthase) یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز ایزوپرنوئیدها است که با اتصال دو واحد ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP) به دی‌متیل‌آلیل دی‌فسفات (DMAPP: dimethylallyl diphosphate)، فارنزیل‌دی‌فسفات (FPP: farnesyl diphosphate) تولید می‌کند (شکل ۲). FPP به‌عنوان ماده متشکله جدید در اولین نقطه چندشاخه‌ای در مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئید برای چندین ترپنوئید مانند سزکویی‌ترپنوئید، استرول‌ها و پلی‌ایزوپرنوئید عمل می‌کند (Dhar et al. 2013).

امروزه از فناوری‌های امیکس (Omics) برای مطالعه در سطح ترانسکریپتوم، پرتئوم و متابولوم استفاده می‌شود. این فن‌آوری‌ها 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). برای بیوسنتز هرکدام از از این ترکیبات تعداد زیادی آنزیم اختصاصی مورد نیاز است. درک



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08 ]

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

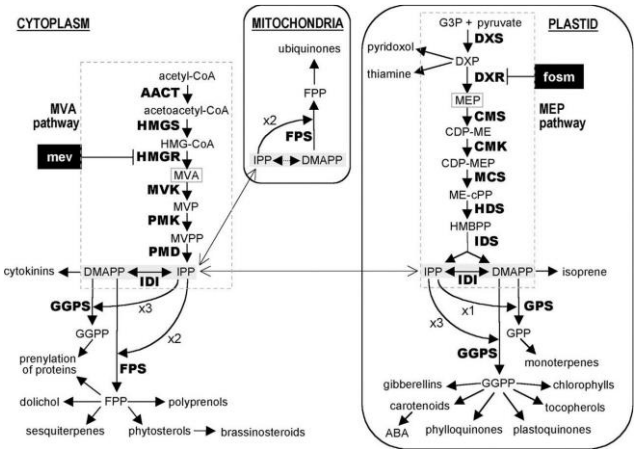
توالی‌یابی RNA در گیاهان غیرمدل که فاقد اطلاعات ژنوم کافی هستند بسیار کاربردی است، زیرا تمرکز توالی‌یابی بر نواحی رمزکننده است. این روش امکان بررسی مجموعه کامل ترنسکریپتوم را با بازدهی بسیار بالا و به‌صورت کمی فراهم می‌کند. داده‌های حاصل ازRNA-Seq کاربردهای متنوعی دارند و می‌توان از آن برای توصیف ژن‌ها، به‌دست 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 ۵۰=2x=2n و با اندازه ژونومی (870Mbp) می‌باشد که عمدتاً به‌دلیل گل‌آذین آن که حاوی اسانس می‌باشد، کشت می‌شود و از زمان‌های بسیار قدیم محبوبیت زیادی داشته و به‌طور گسترده اسانس آن به‌صورت خشک در عطر درمانی، ماده ضدمیکروبی و سموم دفع آفات استفاده می‌شود (Nattamai Malli Pooranachandhiran 2021; Cavanagh and Wilkinson, 2002; Urwin 2009). اهمیت بالای اقتصادی اسطوخودوس به‌دلیل کیفیت بالای اسانس آن است، به‌طوری‌که سالانه ۲۰۰ تن از آن در سراسر جهان تولید می‌شود (Lesage-Meessen et al. 2015). همچنین یکی از مفیدترین اسانس‌ها در علم پزشکی محسوب می‌شود که دارای فعالیت ضدباکتری و ضدقارچی بوده و برای درمان عفونت (Soltani et al. 2013) و اختلالات عصبی (Prusinowska and Smigielski 2014) مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسانس گل عمدتا از لینالول، لینالیل‌استات، ۱ و ۸ سینئول و کامفور تشکیل شده‌است (Cavanagh and Wilkinson 2002; Khorasaninejad et al. 2016; Gorgini Shabankareh et al. 2021)، در حالی‌که اسانس برگ‌ها حاوی ۱ و ۸ سینئول، بورنئول و کامفور است (Chrysargyris et al. 2016). تجاری‌ترین اسطوخودوس‌ها در جهان اسطوخودوس انگلیسی (Syn. *Lavandula angustifolia L.officinalis*; *L.vera*) و اسطوخودوس دورگ (Lavendin) *L.angustifolia* × (*L.latifolia*) می‌باشند که در کل دنیا کشت می‌شوند (Lesage-Meessen *et al.*, 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' (Whitman1et al. 1996) از حیث دارویی می‌باشند.

در حالی که بسیاری از متابولیت‌های ثانویه در اسطوخودوس انگلیسی شناسایی شده است، اما مسیر بیوسنتز آن‌ها به‌علت 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 اسانس 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 به‌منظور شناسایی توالی‌های رونوشت‌های ژنی مرتبط با مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپنوئیدی در سرشاخه‌های هوایی گیاه دارویی اسطوخودوس (*Lavadula 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 به‌عنوان جعبه سیاه، افزایش بیوسنتز ترپنوئیدها و تنظیم تولید آن برای داروهای گیاهی به روش‌های به‌زراعی و به‌نژادی می‌باشد.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08 ]




شکل ۱- دو مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپنوئیدها (Rodrıguez-Concepcion and Boronat, 2002)

## مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال‌های زراعی ۹۷-۱۳۹۶ 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 از شرکت®Renees Garden تهیه شد. بذور سرمادهی‌شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت سه هفته (Khorasaninejad et al. 2015) در اردیبهشت ۹۶ در سینی نشاء کشت و در دی‌ماه ۹۶ به گلدان انتقال یافت. نمونه‌گیری از اندام‌های هوایی (مخلوط برگ و گل) در خرداد ۹۷ (گلدهی کامل) انجام شد. نمونه‌ها (شامل سه تکرار که با هم مخلوط شدند و سه نمونه) بلافاصله پس از برداشت در ازت مایع منجمد و در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. استخراج RNA کل، از نمونه گیاهی (*Lavandula angustifulia* cv. Hidcote) توسط NucleoSpin® RNA Plant kit (MACHEREY-NAGEL GmbH and Co. KG, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی به‌ترتیب با ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودرآپ سنجیده شد.

نمونه (RNA استخراج شده) به‌منظور انجام آزمایش‌های توالی‌یابی، به مؤسسه ژنومیکس پکن (BGI) کشور چین ارسال و با بن‌سازه Illumina HiSeq 2500 به‌صورت خوانش‌های دو طرفه ۱۰۰ نوکلئوتیدی (2×100) توالی‌یابی شد. کیفیت اولیه خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC تعیین شده و در ادامه توالی های دارای طول کوچک‌تر از ۵۰ نوکلئوتید، نوکلئوتیدهای دارای کیفیت کوچکتر از ۲۰ و همچنین آداپتورهای ایلومینا با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه ۰/۳۶) حذف شدند. برای بررسی خصوصیات کتابخانه و همچنین تأیید کارایی، پیرایش داده‌ها استفاده شد و داده‌های با کیفیت بالا برای آنالیزهای بعدی مورداستفاده قرار گرفت. باتوجه به این‌که ژنوم گیاه اسطوخودوس توالی‌یابی‌نشده بود، از روش سرهمبندی نوپدید (*de novo* assembly) استفاده شد. به این منظور جهت یکپارچه‌سازی خوانش‌های دارای کیفیت بالا از نرم‌افزار Evidentialgene، استفاده شد. پس از بهینه‌سازی K-mer استاندارد اجرا شد و برای سایر پارامترهای نرم‌افزار از تنظیمات پیش‌فرض استفاده شد.

یونی‌ژن‌ها در پایگاه تفسیر خودکار KEGG (http://www.genome.jp/kegg/kaas)(KAAS) واقع در پایگاه داده مسیرهای بیوسنتزی (http://www.genome.jp/kaas)(KAAS) قرار 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 به‌صورت مستقیم به یک رکورد در مسیرهای پایگاه KEGG لینک



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08 ]

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

## نتایج

متابولیت‌های 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 بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه انجام شد. پس از استخراج RNA از سرشاخه‌های هوایی گیاه دارویی اسطوخودوس و ارزیابی کمیت و کیفیت نمونه، توالی‌یابی با Illumina HiSeq2500 انجام گرفت که تعداد ۳۰۷۱۲۴۷۱۷ خوانش حاصل شد،از این تعداد ۳۰۶۹۹۵۵۵۷ خوانش با کیفیت مناسب جهت آنالیزهای بعدی مورداستفاده قرار گرفت. در گام اول آنالیزهای بیوانفورماتیکی مرحله یکپارچه‌سازی نوپدید ترانسکریپتوم با استفاده از نرم‌افزار Evidential-gene، تعداد ۲۶۲۴۱۲ یونی‌ژن با میانگین طول ۱۱۸۱/۰۷ و N50 معادل ۱۶۳۳ نوکلئوتید مشخص شد. در گام بعدی توالی یونی‌ژن‌ها در پایگاه KASS بارگذاری شد. 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 به‌طور 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/) به‌منظور نقشه‌یابی مسیرهای KEGG برای ژن‌های ارتولوگ اختصاصی گیاه استفاده شد. در مجموع ۱۷۷۷۷ یونی‌ژن تفسیر شد که این تعداد در ۱۲۲ مسیر زیستی قرار گرفتند، مسیر "اسکلت ترپنوئید" با تعداد ۸۸ یونی‌ژن از پرتعدادترین مسیرهای شناسایی شده از میان ۱۶۶۴ یونی‌ژن مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه بود. به‌طورکلی نتایج حاصل از تفسیر کارکردی ژن‌ها منتهی به شناسایی ۲۷ ژن در مسیر بیوسنتز اسکلت ترپنوئیدها شد که شامل تمامی‌ژن‌های دو مسیر اصلی بیوسنتزی اسکلت ترپنوئیدی (مسیر سیتوزولی موالونیک‌اسید (MVA) و پلاستیدی متیل- اریترول- فسفات (MEP) از ابتدای مسیر تا تولید ایزوپنتنیل دی‌فسفات (IPP) بود (جدول ۱ و شکل ۲).

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

| شناسه KO | شناسه یونی‌ژن | 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 | ۱۴۶۹۲۱۸، ۱۴۶۹۲۰۸ | isopentenyl phosphate kinase | [EC:2.7.4.26] |
| K01662 | ۱۵۰۴۲۰۶، ۳۲۴۶۲، ۱۱۶۸۱۸۲ | 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase | [EC:2.2.1.7] |
| K00099 | ۲۸۶۳۴۱ ، ۱۴۵۴۸۰۲ | deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase-۱ | [EC:1.1.1.267] |
| K00991 | ۸۰۳۸۱۸ ، ۸۱۱۲۵۲ ، ۱۱۱۲۶۹۶ | C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase-۲ | [EC:2.7.7.60] |
| K00919 | ۶۴۳۵۰۰ | diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase-٤ | [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 | ۲۶۹۴۶۳، ۱۶۸۰۷۹ ، ۸۰۹۹۵۹ | 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] |



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08 ]

| | | | |
|---|---|---|---|
| K15891 | ۱۲۲۲۵۳۳، ۱۴۳۱۱۴۰ | NAD+-dependent farnesol dehydrogenase | [EC:1.1.1.354] |
| K05906 | ۶۳۹۷۷۸ | prenylcysteine oxidase / farnesylcysteine lyase | [EC:1.8.3.5 1.8.3.6] |
| K15889 | ۱۲۷۲۶۶۵، ۱۴۳۳۶۹۱، ۸۱۷۲۰۴ | PCME; prenylcysteine alpha-carboxyl methylesterase | [EC:3.1.1.-] |
| K00587 | ۷۸۵۳۲ | protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase | [EC:2.1.1.100] |
| K06013 | ۱۱۰۷۴۹۸ | STE24 endopeptidase | [EC:3.4.24.84] |
| K08658 | ۱۲۸۶۵۲۹ | prenyl protein peptidase | [EC:3.4.22.-] |
| K05955 | ۱۴۶۲۴۰۴ | protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha | [EC:2.5.1.58 2.5.1.59] |
| K11778 | ۶۵۱۹۴۱ | ditrans,polycis-polyprenyl diphosphate synthase | [EC:2.5.1.87] |
| K10960 | ۱۹۰۵، ۱۲۸۸۵۵۶ | geranylgeranyl diphosphate/geranylgeranyl-bacteriochlorophyllide a reductase | [EC:1.3.1.83 1.3.1.111] |
| K05356 | ۸۰۵۰۹۹، ۸۰۶۱۱۰ | all-trans-nonaprenyl-diphosphate synthase | [EC:2.5.1.84 2.5.1.85] |

## بحث

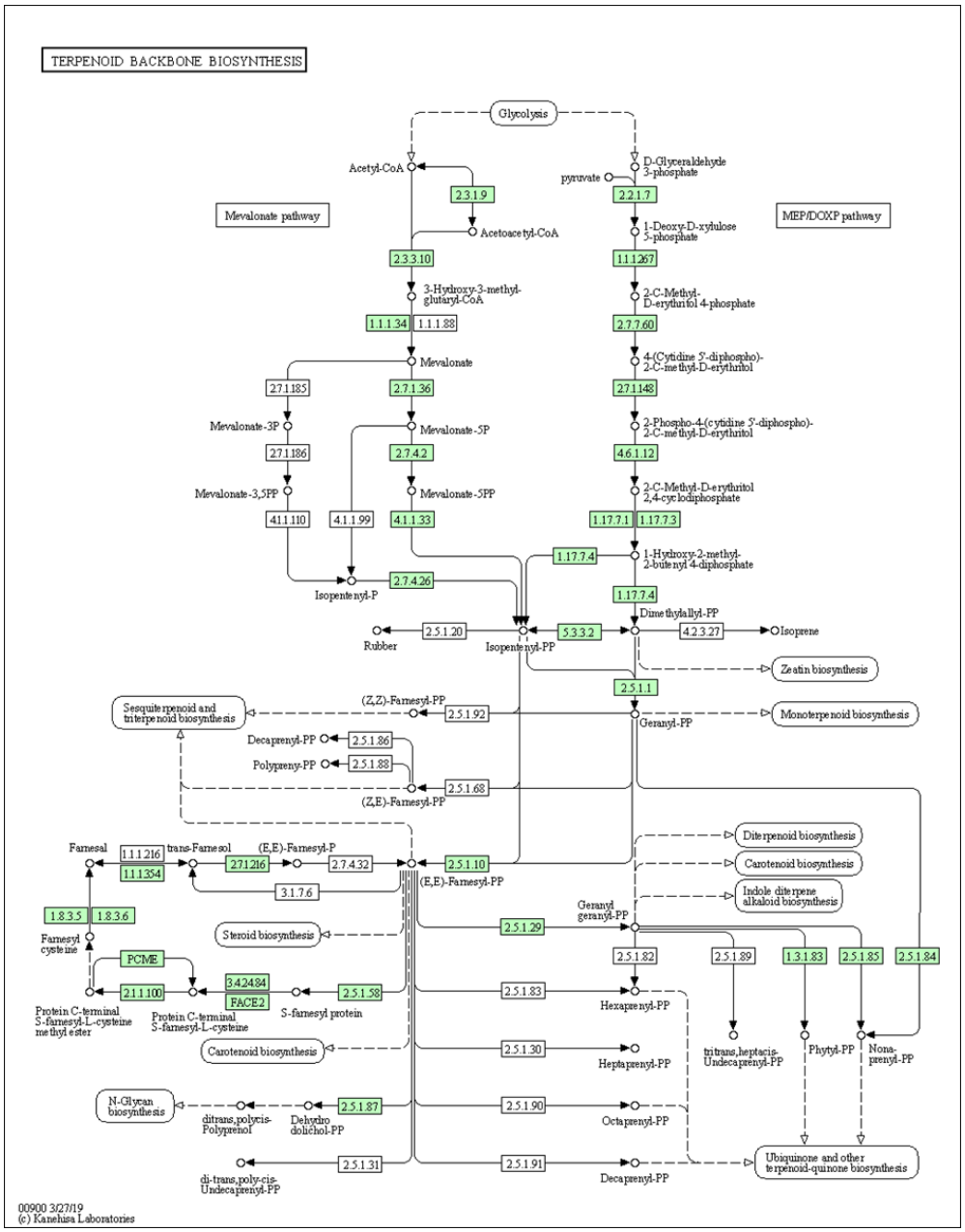
استفاده از مطالعه تحلیلی ترانسکریپتوم منجربه شناسایی تعداد زیادی از ژن‌های وابسته به مسیر ساخت ترپنوئیدها در گیاهان دارویی گردیده است. از آنجا که گیاه اسطوخودوس از نظر اقتصادی گیاه مهمی است که به‌دلیل داشتن اسانس در سراسر جهان رشد می‌کنند و به صنایع آرایشی، بهداشتی و دارویی کمک می‌کنند، به‌همین دلیل درک بهتر مکانیسم‌های ژنتیکی درگیر در اسانس، شناسایی ژن‌های درگیر در فرآیندهای مهم بیولوژیکی، یافتن نشانگرهای ژنتیکی و شناخت سازوکار مولکولی بیوسنتز ترپنوئیدها 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 پلی‌پلوئیداسیون ژنوم گذشته است. بیشتر ژن‌های شناسایی‌شده 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 مونوترپن‌های تیمول، گاما-ترپینن و پاراسیمن هستند، منتهی به شناسایی ۱۲۷ مسیر متابولیکی شامل مسیر MVA و MEP و ۳۰ ژن کلیدی مرتبط با مسیر بیوسنتزی 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).

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 ترپنوئیدها و فنیل‌پروپانوئیدها شناسایی شد (Mohd-Hairul et al. 2020). همچنین در گیاه خربزه‌تلخ یا کارلا (*Momordica charantia*) تجزیه و تحلیل نتایج RNA-Seq منجربه شناسایی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی تری‌ترپنوئید 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 بیوسنتز کارانتین (Charantin) در کارلا دارند. همچنین شرایط نور مطلوب برای افزایش بیوسنتز کارانتین در کارلا مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه نور قرمز مؤثرترین طول موج بود. کارانتین یک نوع تری‌ترپنوئید 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 ائوفول و بتا- سیستوسترول در لاتکس آن می‌باشد. در مطالعه‌ای آنالیز ترانسکریپتوم این گیاه برای شناسایی ژن‌های بیوسنتز اسکلت استرول انجام شد که منجربه شناسایی ژن‌های ۶ آنزیم در مسیر MVA و ۷ آنزیم در مسیر MEP شد (Qiao et al. 2018). بیشتر ژن‌های مرتبط با دو مسیر بیوسنتزی MVA و MEP متابولیت‌های ثانویه در گیاه مریم‌گلی (*Salvia guaranitica*) با استفاده از توالی‌یابی RNA شناسایی شده است.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08 ]




شکل ۲- آنالیز مسیر KEGG نمایشگر ژن‌های درگیر در بیوسنتز اسکلت ترپنوئید مستطیل‌های سبز نشان‌دهنده وجود آنزیم‌های موجود در ترانسکریپتوم گیاه دارویی اسطوخودوس Hidcote

در این مطالعه ۱۹۸ ژن در مسیر MVA و MEP، ژن‌های بیوسنتز اسکلت ترپنوئید و ۶۹ ژن سنتز ترپنوئید شناسایی شده که احتمالاً درگیر در متابولیسم ترپنوئید هستند (Ali et al. 2018). پژوهش در مسیر متابولیکی MEP و MVA مرتبط با بیوسنتز ترپنوئیدها، منجربه شناسایی شمار زیادی ژن جدید در گیاهان مختلف مانند جنسینگ (*Panax notoginseng*) (Luo et al., 2011)، شب‌بو (*Litsea cubeba*) (Han et al. 2013)، عشقه یا پیچک (*Hedera helix*) (Sun *et al.*, 2017)، سیب‌زمینی شیرین (*Dioscorea zingiberensis*) (Li *et al.*, 2018)، بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) (Zhang et al. 2018) و سایر گیاهان دارویی شد. در این پژوهش استفاده از RNA-Seq منجربه شناسایی ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپنوئید (مسیر اصلی ساخت



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08 ]

اسانس) در گیاه دارویی اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* cv Hidcote) شد. این مطالعه اولین تجزیه و تحلیل نوپدید ترانسکریپتوم در اندام هوایی (سرشاخه گل‌دار) اسطوخودوس رقم Hidcote می‌باشد که علاوه‌بر اولین گزارش، اطلاعاتی را در خصوص شناسایی و بیان رونوشت‌های مرتبط با ترپنوئیدها و سزکوئی‌ترپنوئیدها که از مهمترین ترکیات فارماکولوژیک فعال توزیع شده در سرشاخه‌های رقم Hidcote ارائه می‌دهد. به‌طورکلی شناسایی ژن‌های مرتبط با بیوسنتز اسکلت ترپنوئیدی گیاه اسطوخودوس می‌تواند در به‌نژادی این مسیرها در جهت افزایش ساخت ترکیبات ترپنوئیدی اختصاصی از قبیل مونوترپن‌ها (لینالول) و سزکوئی‌ترپن‌ها (کاریوفیلن‌اکساید) در اسانس این گیاه مؤثر واقع شود. همچنین تحقیقات روی ژن‌های دخیل در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه با تاکید بر اجزای اسانس در این گیاه می‌تواند پایه‌ای برای پژوهش‌های بعدی با پیشبرد اهداف مهندسی مسیر در جهت شناخت هرچه بیشتر شبکه ترپنوئیدی 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 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, Jeanmougin 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)




[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08 ]

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, Smigielski, KB (2014) Composition, biological properties and therapeutic e_ects 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.

Rodrıguez-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, Hajibarat 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 Howyzeh 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*. Hortiscience. 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 nextgeneration 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 Physiologiae Plantarum. 40:129.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08 ]