ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷
صفحه ۱۴۱ - ۱۳۳

شناسایی ژن‌های مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپن در گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) با استفاده از توالی‌یابی RNA

Identification of terpenoid backbone biosynthetic pathway genes in Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) by RNA-Seq

محبوبه امیری پور[۱]، سیداحمد سادات نوری*[۲]،وحید شریعتی[۳]، مهدی سلطانی هویزه[۱]

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان
۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران،پردیس ابوریحان
۳- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک

Amiripour M[1], Sadat Nouri SA[*2], Shariati V[3], Soltani Howyzeh M[1]
1- PhD Student, Abouraihan Campus, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran
2- Professor, Abouraihan Campus, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran
3- Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: noori@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

توالی‌یابی RNA می‌تواند شناسایی ژن‌های کلیدی مرتبط با ساخت متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تسهیل و تسریع نماید. بذور گیاه دارویی زنیان دارای ۲ تا ۹ درصد اسانس هستند که اصلی‌ترین ترکیبات آن را مونوترپن‌های تیمول، گاماترپینن و پاراسیمن تشکیل می‌دهد. در این پژوهش مطالعه ترنسکریپتوم گیاه دارویی زنیان با استفاده از توالی‌یابی RNA با تکنیک پربازده Illumina انجام گرفت. تعداد ۴۲۲۶۰۸۳۰ خوانش دارای کیفیت مناسب بعد از یکپارچه‌سازی *de novo* با برنامه Trinity، منتهی به تولید ۶۸۰۵۱ عدد تک‌ژن با میانگین طول ۸۵۹/۴ و N50 معادل ۱۲۵۷ جفت‌باز شد. جهت شناسایی تک‌ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپن، توالی تک‌ژن‌ها در پایگاه KAAS بارگذاری شد. بر اساس نتایج حاصل تعداد ۳۰ ژن موجود در مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپن شناسایی شد که مشتمل بر تمامی ژن‌های دو مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپن (MEP و MVA) از ابتدای مسیر تا تولید ایزوپنیل دی‌فسفات بود. آنزیم‌های درگیر در مسیر MEP که در این پژوهش شناسایی شدند شامل ۱- دئوکسی-دی-زایلولوز ۵-فسفات سنتاز (DXS)، ۱-دئوکسی-دی-زایلولوز ۵ فسفات رداکتوایزومراز (DXR)، ۲-سی-متیل-دی-اریتریتول ٤-فسفات سیتیدیلیل ترنسفراز (ispD)، ٤-دی‌فسفوسیتیدیل-۲-سی-متیل-دی-اریتریتول کیناز (ispE)، ۲-سی-اتیل-دی-اریتریتول ۲و٤-سیکلودی‌فسفات سنتاز (ispF)، ٤-هیدروکسی-۳-متیل‌بوت-۲-انیل دی-فسفات سنتاز (gcpE)، ٤-هیدروکسی-۳-متیل‌بوت-۲-انیل دی‌فسفات ردوکتاز (ispH)، ایزوپنتیل-دی‌فسفات دلتا ایزومراز، ایزوپرن سنتاز (ispS)، و ژرانیل-دی‌فسفات سنتاز (GPS) و به همین ترتیب آنزیم‌های مسیر MEV شامل استیل-کوآنزیم‌آ استیل‌ترنسفراز، HMG-کوآنزیم‌آ سنتاز، HMG-کوآنزیم‌آ ردوکتاز (HMGCR)، موالونات کیناز، فسفوموالونات کیناز و موالونات دی‌فسفات دکربوکسیلاز بودند شناسایی توالی ژن‌های مسیربیوسنتزی اسکلت‌ترپن می‌تواند زمینه‌ساز پژوهش‌های آینده در جهت مطالعه بیش‌تر، بیش‌بیان و مهندسی متابولیت این ژن‌ها شود.

واژه‌های کلیدی

مجموعه رونوشت ژنوم
ترپنوئید
چتریان
MEP
MVA

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.12.9]

مقدمه

یکی از ویژگی‌های گیاهان، توانایی آن‌ها در سنتز و ذخیره انواع مختلفی از ترکیبات با وزن مولکولی پایین است که اصطلاحا متابولیت‌های اختصاصی یا ثانویه یا فرآورده‌های طبیعی نامیده می‌شوند. برخلاف متابولیت‌های اولیه که برای حیات تمامی گیاهان ضروری هستند، هر یک از انواع متابولیت‌های ثانویه معمولا در تعداد محدودی از گیاهان وجود داشته و درنتیجه گفته می‌شود این مواد برای متابولیسم اولیه ضروری نیستند (Wink 2011). سه دسته بزرگ متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌عنوان محصولات طبیعی وجود دارد؛ ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و ترکیبات فنولی. ترپن‌ها فراوان‌ترین و متنوع‌ترین (از نظر ساختاری) محصولات طبیعی گیاهی هستند (Zwenger and Basu 2008).

بیان اهمیت متابولیت‌های ثانویه در طبیعت و برای انسان دشوار است و با توجه به نقش آن‌ها به‌عنوان ترکیبات سیگنالی و دفاعی، اهمیت این متابولیت‌ها برای حفظ شایستگی گیاه نیز آشکار می‌شود. از طرفی بسیاری از این ترکیبات ویژگی‌های بیولوژیکی یا دارویی جالب توجهی دارند که آن‌ها را جهت استفاده به‌عنوان دارو یا آفت‌کش‌های زیستی مفید می‌سازد. تخمین زده می شود که گیاهان بیش از ۲۵۰۰۰۰ متابولیت ثانویه مختلف را تولید می‌کنند (Pichersky and Lewinsohn 2011) که برای بیوسنتز هرکدام تعداد زیادی آنزیم اختصاصی مورد نیاز است. درک 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 عموما چالش برانگیز است. ساختار بسیاری از مسیرها به‌صورت شبکه‌های آنزیمی پیچیده‌ای است که چندین محصول را تولید می‌کنند و درنتیجه کشف ژن‌های بیوسنتزی درگیر در متابولیسم اختصاصی گیاه یک چالش منحصر بفرد است. علاوه بر آن اغلب متابولیت‌های اختصاصی باارزش از گیاهان غیرمدل به‌دست می‌آیند که اطلاعات ژنومی اندکی از آن‌ها موجود است (Xiao et al. 2013). باتوجه به دشواری‌هایی که بر سر راه توالی‌یابی کل ژنوم وجود دارد، در سال‌های اخیر کاوش داده‌های ترنسکریپتومی به‌عنوان روشی کارآمد برای کشف ژن‌ها یا خانواده‌های ژنی کدکننده آنزیم‌های درگیر در مسیرهای متابولیکی مطرح شده‌است (Drew et al. 2013).

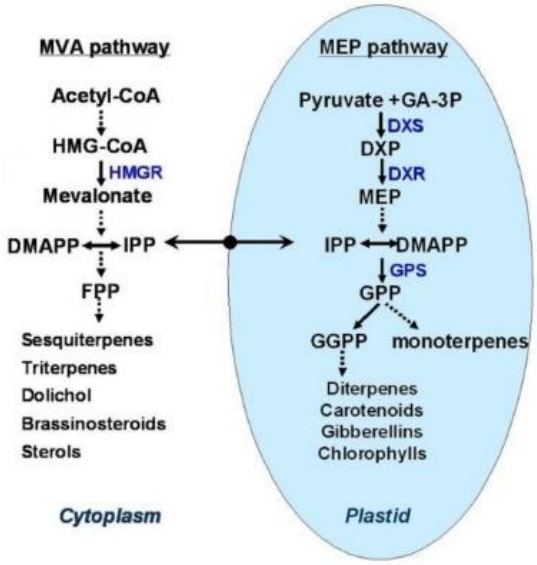
امروزه با استفاده از بن‌سازه‌های[1] توالی‌یابی نسل جدید[2] (NGS)، می‌توان ترنسکریپتوم را عمیق‌تر و وسیع‌تر مطالعه کرد. هزینه پایین توالی‌یابی‌های نسل جدید به‌همراه امکان یکپارچه‌سازی داده‌های ترنسکریپتوم بدون نیاز به اطلاعات قبلی از ژنوم (*de novo* assmbly) و تعیین کمیت فراوانی‌های رونوشت، راهی به‌سوی مطالعه گونه‌های مختلف گیاهی مشتمل بر گیاهان دارویی گشوده است (Hamilton and Robin Buell 2012). توالی‌یابی نسل جدید قادر است میلیاردها توالی کوتاه را هم‌زمان و بسته به نوع تکنولوژی عموما به طول ۸۰۰-۵۰ جفت‌باز تولید کند و تولید داده‌های توالی که زمانی سال‌ها به‌طول می‌انجامید اکنون در چند روز یا حتی چند ساعت به‌دست می‌آید (Strickler et al. 2012). یکی از رایج‌ترین کاربردهای توالی‌یابی نسل جدید در مطالعه ترنسکریپتوم، توالی‌یابیRNA [3] نامیده می‌شود. توالی‌یابی RNA که اقتصادی‌تر و ممکن‌تر از توالی‌یابی کل ژنوم است، به‌عنوان انقلابی در مطالعه ترنسکریپتوم مطرح شده‌است (Wang et al. 2009). این روش امکان بررسی مجموعه کامل ترنسکریپتوم را با بازدهی بسیار بالا و به‌صورت کمی فراهم می‌کند. داده‌های حاصل از RNA-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. توالی‌یابی RNA در گیاهان غیرمدل که فاقد اطلاعات ژنومی کافی هستند بسیار کاربردی است زیرا تمرکز توالی یابی بر نواحی کدکننده است. این نواحی معمولا عناصر تکرارشونده کم‌تر و محتوای GC بالاتری دارند (Strickler et al. 2012). مراحل مطالعه تحلیلی ترنسکریپتوم به‌طور خلاصه شامل استخراج RNA و ساخت کتابخانه cDNA، توالی‌یابی توسط تکنولوژی‌های توالی‌یابی نسل جدید، ویرایش اولیه داده‌های خام، یکپارچه‌سازی (assembly) توالی‌های کوتاه، به‌دست آوردن تک ژن‌ها و در

[1] Platform
[2] Next Generation Sequencing
[3] RNA-seq

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.12.9]

نهایت تفسیر کارکردی تک ژن‌ها با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی می‌باشد. در حال حاضر، توالی‌یابی‌های پر بازده Roche 454 pyrosequencing و Illumina بن‌سازه‌های رایج توالی‌یابی در مطالعات ترنسکریپتوم گیاهان دارویی هستند. پیشرفت در مراحل توالی‌یابی این فن‌آوری‌ها، از آماده‌سازی نمونه‌ها تا آنالیز داده‌ها، امکان مطالعه عمیق‌تر ترنسکریپتوم را فراهم کرده است. در نهایت بر اساس تک ژن‌های به‌دست آمده از آنالیز داده‌های حاصل از توالی‌یابی، توالی‌های کدکننده پروتئین که مبتنی بر داده‌های ترنسکریپتومی است، پیش‌بینی می‌شوند. بنابراین توالی‌یابی نسل جدید پربازده امکان توصیف سریع ترنسکریپتوم و در نتیجه ابزاری جامع برای کشف ژن و درک مسیرهای متابولیکی فراهم کرده است و مطالعات کارکردی این ژن‌ها اصلاح مولکولی، انتقال ژن و مهندسی متابولیت را تسهیل می‌کند تا تولید ماده دارویی هدف در این گیاهان افزایش یابد.

مطالعه ترنسکریپتوم مسیرهای متابولیکی می‌تواند زیربنای دستورزی مسیرهای بیوسنتزی در گیاهان و بازسازی این مسیرها در میزبان های میکروبی باشد (Ajikumar et al. 2010). همان‌طور که قبلا ذکر شد ترپن‌ها فراوان ترین گروه متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تشکیل می‌دهند. اسکلت اصلی ترپن‌ها از مولکول‌های پنج کربنه ایزوپنتیل پیروفسفات[1] (IPP) و ایزومر آن دای متیل آلیل پیروفسفات[2] (DMAPP) تشکیل شده‌است که هردوی آن‌ها از مسیر سیتوزولی موالونیک اسید[3] (MVA) و مسیر پلاستیدی متیل-اریتریتول-فسفات[4] (MEP) سنتز می‌شوند. مسیر MVA با سه واحد استیل کوآنزیم A آغاز و منتهی به تولید فارنسیل پیروفسفات[5] (FPP) می‌شود. FPP از الحاق دو واحد IPP و یک واحد DMAPP حاصل شده و پیش ماده تمامی سزکوئی‌ترپن‌ها[6] و تری‌ترپن‌هاست. مسیر MEP در پلاستیدها واقع شده و با گلیسرآلدهاید-۳-فسفات و پیروات آغاز می‌شود. با الحاق یک مولکول DMAPP و یک مولکول IPP، ژرانیل دی فسفات[7] (GPP) حاصل می‌شود که پیش‌ماده تمامی مونوترپن‌ها، دی‌ترپن‌ها و تتراترپن‌ها (کاروتنوئیدها) است (Sapir-Mir et al. 2008, Sallaud et al. 2009) (شکل ۱). در مراحل بعدی اسکلت کربنی خطی GPP و FPP به‌وسیله آنزیم‌های ترپن سنتاز به اسکلت اصلی ترپنی تبدیل می‌شوند (Degenhardt et al. 2009).



شکل ۱- دو مسیر بیوسنتزی ساخت ترپن‌ها، برگرفته از (Yang et al. 2012)

گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* گیاهی علفی و یکساله از تیره چتریان (Apiaceae) است. میوه (بذر) این گیاه دارای ۲ تا ۹ درصد اسانس بوده که ٤٠ تا ٦٠ درصد اسانس را مونوترپن تیمول و مابقی آن را مونوترپن‌های گاماترپینن، پاراسیمن، و کارواکرول تشکیل می‌دهد (Akbarinia et al. 2005, Davazdahemami et al. 2011, Zarshenas et al. 2014). منشأ این گیاه آسیاست و در کشورهای هند، ایران، افغانستان و مصر به‌طور طبیعی می‌روید یا کشت می‌شود (Akbarinia et al. 2005). با بررسی‌های دارویی ثابت شده‌است که میوه گیاه زنیان دارای خواص مختلف دارویی از قبیل آنتی اکسیدانی، ضد قارچی، ضد درد، ضد فشارخون، ضد اسپاسم، ضد سرفه، ضدانگل، ضد کرم و ضد فیلاریا می‌باشد (Bairwa 2012) که این خواص به اسانس آن بر می‌گردد. باتوجه به اینکه این گیاه بومی ایران بوده و با عملکردی معادل ۲ تا ۳ تن دانه در هکتار، بیش از ۷۰ کیلوگرم

[1] Isopentenyl Pyrophosphate
[2] Dimethylallyl Pyrophosphate
[3] the Mevalonic Acid Pathway
[4] 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate Pathway
[5] Farnesyl Pyrophosphate
[6] Sesquiterpenes
[7] Geranyl diphosphate

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.12.9]

اسانس را در هکتار از این گیاه قابل استحصال است (Akbarinia et al. 2005)، بررسی و مطالعه ژن‌های مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه آن و بویژه مونوترپن‌ها که اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس آن هستند اهمیت خاصی پیدا می‌کند. درحال حاضر بجز تعداد محدودی توالی نوکلئوتیدی در پایگاه NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Trachyspermum%20ammi)، توالی ژنومی دیگری از گیاه زنیان به ثبت نرسیده است. این پژوهش به‌منظور شناسایی توالی رونوشت‌های مرتبط با بیوسنتز اسکلت اصلی‌ترپن در گیاه زنیان انجام شد.

مواد و روش‌ها

یک اکوتیپ گیاه زنیان با نام "اراک" که بذر آن از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور (با کد دسترسی ۱٤٤۹۲) تهیه شده بود در مزرعه آزمایشی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران کشت شد. انتخاب مرحله نموی گل‌آذین بر اساس مطالعات قبلی صورت گرفت (Soltani-Howyzeh 2017). پنج نمونه گل آذین در مرحله رشدی پنج روز پس از گرده افشانی تهیه، بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. RNA کل از پنج نمونه با استفاده از ماده ترایزول (Invitrogen) مطابق با دستورالعمل کارخانه استخراج، با هم مخلوط و سپس با آنزیم DNase I تیمارشد. کیفیت و کمیت نمونه‌ی RNA به‌ترتیب با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ تعیین شد. نمونه به موسسه BGI (چین) ارسال و با بن‌سازه Illumina HiSeq 2000 به‌صورت خوانش‌های جفت انتهایی 2x100 توالی‌یابی شد. اطلاعات خام در بخش SRA سایت NCBI به شماره پذیرش SRR5137050 بارگذاری شدند. حذف توالی‌های آداپتور و داده‌های بی‌کیفیت توسط نرم‌افزار Trimmomatic v0.30 (http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic) (Bolger et al. 2014) انجام گرفت. توالی‌های با طول زیر ۵۰ نوکلئوتید و نوکلوتیدهای با کیفیت کمتر از ۲۰ حذف شد. سپس از نرم‌افزار FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) برای بررسی خصوصیات کتابخانه و هم‌چنین تأیید کارایی پیرایش داده‌ها استفاده شد. داده‌های با کیفیت بالا برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه ژنوم گیاه زنیان توالی‌یابی نشده‌است، برای یکپارچه‌سازی[1] خوانش‌ها از روش *de novo* asembly استفاده شد. به این منظور داده‌های باکیفیت بالا با استفاده از نرم‌افزار Trinity de novo RNA-Seq assembler (v2.1.) یکپارچه‌سازی شدند تا تک‌ژن‌ها[2] حاصل شوند (Grabherr et al. 2011). پس از بهینه‌سازی، Kmer معادل ۳۳ انتخاب و برای سایر پارامترهای نرم‌افزار Trinity از تنظیمات استاندارد استفاده شد. خروجی نرم‌افزار Trinity تک‌رونوشت[3] نامیده می‌شود که از گروه‌بندی آن‌ها تک‌ژن‌ها حاصل شدند. تک‌ژن‌ها در پایگاه تفسیر خودکار KEGG[4] (KAAS)(http://www.genome.jp/kegg/kaas) واقع در پایگاه داده مسیرهای بیوسنتزی[5] (KAAS)(http://www.genome.jp/kegg/) قرار داده شدند تا به آن‌ها عدد KO[6] تخصیص یابد. تخصیص عدد KO بر اساس روش Single-directional Best Hit (SBH) انجام گرفت. پایگاه KAAS تفسیر توالی‌های ارسال شده را با استفاده از شناسه‌های KO به‌صورت خودکار انجام می‌دهد. هر KO معادل یک گروه ارتولوگ از ژن‌هایی است که به‌صورت مستقیم به یک رکورد در مسیرهای پایگاه KEGG لینک شده (Moriya et al. 2007) و درنتیجه مرجع اطلاعات برای ارتباط دادن ژنوم‌ها به سیستم زیستی است.

نتایج

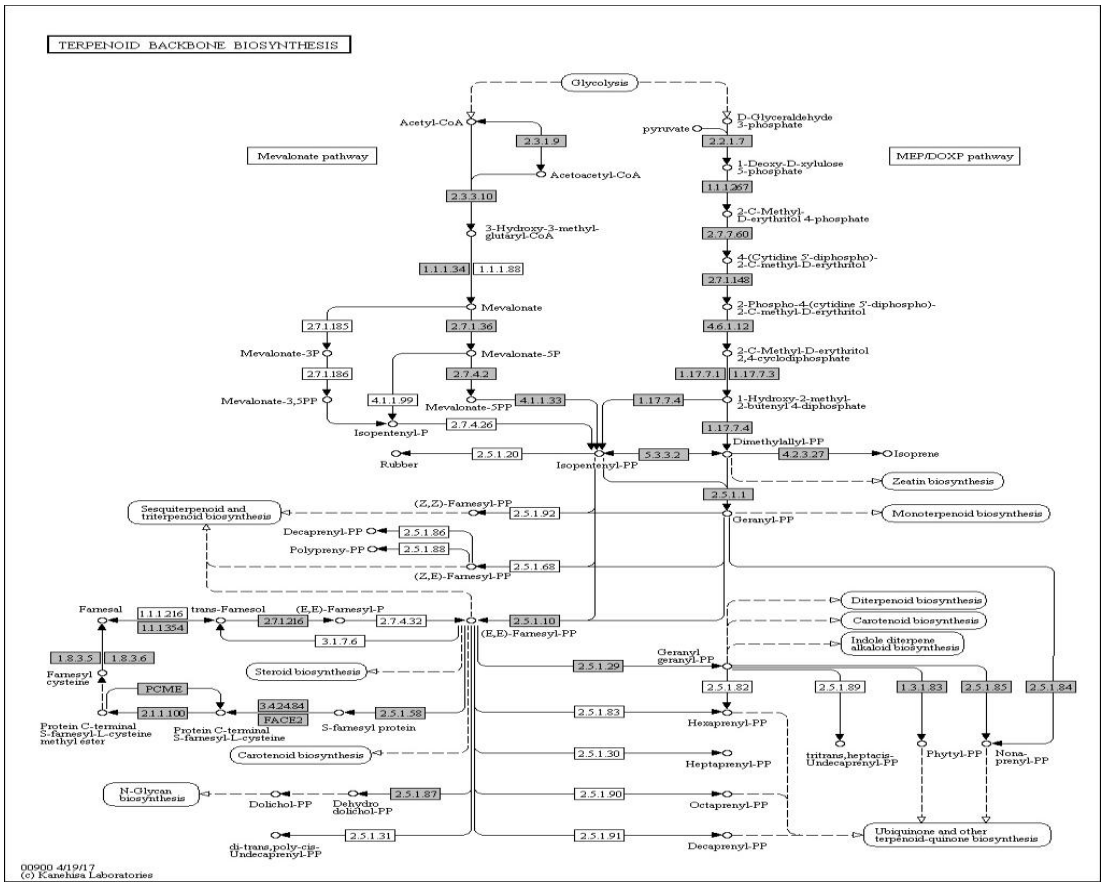
متابولیت‌های ثانویه عمدتا در میوه (بذر) زنیان تجمع می‌یابند. برای دستیابی به ترنسکریپتوم زنیان که دارای حداکثر تعداد ژن‌های مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه باشد، RNA از گل آذین اکوتیپ "اراک" استخراج شد. بر اساس مطالعات پیشین، این اکوتیپ دارای مقادیر بالای اسانس (٦/۱۱ درصد وزنی بذر) و عملکرد مونوترپن تیمول (۲/٦٤ درصد) در میان بیش از ۲۰

[1] Assembly
[2] Unigenes
[3] Unitranscript
[4] KEGG Automatic Annotation Server
[5] The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
[6] KEGG Orthology

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.12.9]

اکوتیپ بوده (Mirzahosseini et al. 2017) و هم‌چنین در زمان ۵ روز پس از گرده‌افشانی مقادیر مونوترپن‌ها در اسانس به مقدار قابل توجهی می‌رسد (Soltani-Howyzeh 2017). توالی‌یابی با بن‌سازه Illumina HiSeq2000 انجام گرفت و در نتیجه ٤٦٠٨٥٩٦٤ خوانش حاصل شد که از این تعداد ٤٢٢٦٠٨٣٠ خوانش دارای کیفیت مناسب جهت آنالیزهای بعدی بودند. یکپارچه‌سازی de novo با برنامه Trinity، منتهی به تولید ٦٨٠٥١ عدد تک‌ژن با میانگین طول ١٠٠٩/٧ جفت‌باز شد. توالی این تک‌ژن‌ها در پایگاه KAAS 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 را به‌طور خاص از طریق نقشه‌های مسیر KEGG انجام می‌دهد (Kanehisa et al. 2015). در این پژوهش از پایگاه KAAS به‌منظور نقشه‌یابی مسیرهای KEGG برای ژن‌های ارتولوگ مربوطه استفاده شد. در مجموع ١٤٩٨٦ تک‌ژن در این پایگاه تفسیر شدند که این تعداد در ١٢٧ مسیر زیستی قرار گرفتند. پر تعدادترین مسیرها به‌ترتیب "مسیرهای متابولیکی" (٣٢٤١ تک ژن، ko01100)، "بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه" (١٩٦٥ تک‌ژن، ko01110)، "ریبوزوم" (٧١٤ تک‌ژن، ko03010)، "اسپلایسوزوم" (٤٢٢ تک‌ژن، ko03040)، "فراوری پروتئین در شبکه اندوپلاسمی" (٤٢٦ تک‌ژن، ko04141)، و "انتقال سیگنال هورمونی گیاه" (٤١٨ تک‌ژن، ko04075) بودند. در میان تمامی مسیرهای متابولیت ثانویه، مسیر "بیوسنتز فنیل پروپانوئید" (١٦٩ تک‌ژن) و پس از آن "بیوسنتز اسکلت ترپنوئید" (٩٣ تک‌ژن) دارای بیش‌ترین تک‌ژن‌ها بودند. مونوترپن‌ها که اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس زنیان هستند از پیش ماده IPP حاصل از مسیر MEP سنتز می‌شوند. تعداد نتایج حاصل از تفسیر کارکردی تک‌ژن‌ها در پایگاه KEGG منتهی به شناسایی رونوشت‌های مرتبط با ٣٠ ژن مسیرهای بیوسنتزی MEP و MVA در داده‌های ترنسکریپتوم گل‌آذین زنیان شد (جدول ١ و شکل ٢).



شکل٢- آنالیز مسیر KEGG نمایان‌گر ژن‌های درگیر در بیوسنتز اسکلت ترپن. مستطیل‌های خاکستری آنزیم‌های موجود در ترنسکریپتوم گل‌آذین زنیان را نشان می‌دهند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.12.9]

بحث

استفاده از مطالعه تحلیلی ترنسکریپتوم تاکنون منجر به شناسایی تعداد زیادی از ژن‌های مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه با ارزش گیاهان دارویی و از جمله انواع ترپن‌ها شده‌است. *Chlorophytum borivilianum* (گل گندمی) یک گیاه دارویی در خطر انقراض است که بیشتر به‌دلیل خاصیت تقویت قوای جنسی ناشی از حضور ساپونین‌ها در آن شناخته شده‌است. با استفاده از مطالعه تحلیلی ترنسکریپتوم تقریبا تمامی ژن‌های مرتبط با مسیرهای بیوسنتزی MVA و MEP درگیر در سنتز ساپونین‌ها و همین‌طور ژن‌های مرتبط با بیوسنتز فلاونوئید و آلکالوئیدها در این گیاه شناسایی شد (Kalra et al. 2013). آنالیز ترنسکریپتوم گونه *Bupleurum Chinese* از خانواده چتریان که یک گیاه دارویی مهم در طب سنتی چین است منتهی به یافتن تعدادی از ژن‌های کاندید مرتبط با بیوسنتز اسکلت سایکوساپونین‌ها شد (Sui et al. 2011). گیاه آب بشقابی (*Centella asiatica*) گونه دارویی مهم دیگری از چتریان است که اکثر ژن‌های مرتبط با دو مسیر بیوسنتزی MVA و MEP متابولیت‌های ثانویه آن در مطالعه‌ای با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید ترنسسکریپتوم شناسایی شده‌است (Sangwan et al. 2013). مهم‌ترین داروی ضد مالاریا یعنی آرتمیسین که یک لاکتون سزکوئی‌ترپن است، در تریکوم‌های غده‌ای درمنه (*Artemisia annua*) تولید می‌شود. در مطالعه‌ای ترنسکریپتوم تریکوم‌های غده‌ای *A. annua* به‌وسیله بن‌سازه 454 pyrosequencing (Wang et al. 2009) توصیف و کارکردهای بالقوه بیش از ۲۸۵۷۳ تک ژن شناسایی شد که مشتمل بر آنزیم‌های احتمالا درگیر در بیوسنتز سزکوئی‌ترپن بود. در این تحقیق هم‌چنین تک ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسیر MEP و MVA و تمام آنزیم‌های مسیر سزکوئی‌ترپن آرتمیسین در مجموعه داده حاصل از توالی‌یابی RNA به‌دست آمد. تک ژن‌های مربوط به آنزیم‌های مسیر MEP دو برابر رونوشت‌های MVA بودند و این نشان می‌دهد مسیر MEP مسیر اصلی برای تولید DMAPP/IPP در تریکوم‌های *A. annua* است.

جدول ۱- آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز اسکلت ترپن در ترنسکریپتوم گل‌آذین زنیان بر اساس نتایج پایگاه KEGG. عدد داخل پرانتز نشان دهنده تعداد تک رونوشت[1] موجود برای هر تک ژن است.

عدد EC*	توصیف آنزیم	شناسه تک ژن زنیان	شناسه ko
[EC:1.1.1.34]	HMGCR; hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)	21724, 43134, 46370, 87803, 17049 (2)	K 0 0 0 2 1
[EC:1.1.1.267]	dxr; 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	44875	K00099
[EC:2.1.1.100]	ICMT; protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase	55995(9)	K00587
[EC:2.3.1.9]	acetyl-CoA C-acetyltransferase	16455, 25492(2), 38901 (2), 41178, 42255, 45391, 57396	K00626
[EC:2.5.1.1 2.5.1.10]	FDPS; farnesyl diphosphate synthase	45915	K00787
[EC:2.7.1.36]	mevalonate kinase	23196, 28766, 54851 (4)	K00869
[EC:2.7.1.148]	ispE; 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	36615	K00919
[EC:2.7.4.2]	phosphomevalonate kinase	56695 (3), 89833	K00938
[EC:2.7.7.60]	ispD; 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase	42987 (3)	K00991
[EC:4.1.1.33]	MVD; diphosphomevalonate decarboxylase	43442, 104780	K01597
[EC:2.3.3.10]	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	43372	K01641
[EC:2.2.1.7]	dxs; 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	30805, 44346, 46265, 50586, 82996, 836	K01662
[EC:4.6.1.12]	ispF; 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	37821	K01770
[EC:5.3.3.2]	idi; isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	41437	K01823
[EC:1.17.7.1 1.17.7.3]	gcpE; (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase	47244 (6), 21529	K03526
[EC:1.17.7.4]	ispH; 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase	39578, 51891 (5), 52395, 56344 (3), 29238, 37220 (2)	K03527
[EC:2.5.1.84 2.5.1.85]	SPS; all-trans-nonaprenyl-diphosphate synthase	29285, 53359 (3), 93590	K05356
[EC:1.8.3.5 1.8.3.6]	PCYOX1; prenylcysteine oxidase / farnesylcysteine	45249	K05906

[1] Unitranscript

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.12.9]

	lyase		
[EC:2.5.1.58]	FNTB; protein farnesyltransferase subunit beta	46353 (2)	K05954
[EC:2.5.1.58 2.5.1.59]	FNTA;protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	52762	K05955
[EC:3.4.24.84]	STE24; STE24 endopeptidase	29865, 31133, 42894	K06013
[EC:3.4.22.-]	RCE1; prenyl protein peptidase	42839 (3)	K08658
[EC:1.3.1.83]	chlP; geranylgeranyl reductase	34364, 54127	K10960
[EC:2.5.1.87]	DHDDS; ditrans,polycis-polyprenyl diphosphate synthase	29713, 36819, 48242, 51498, 54915 (2), 72424	K11778
[EC:4.2.3.27]	ispS; isoprene synthase	50287, 77104	K12742
[EC:2.5.1.1 2.5.1.10 2.5.1.29]	GGPS; geranylgeranyl diphosphate synthase, type II	28035, 30279, 42603, 44310, 74796, 91376	K13789
[EC:2.5.1.1]	GPS; geranyl diphosphate synthase	35063 (2)	K14066
[EC:3.1.1.-]	PCME; prenylcysteine alpha-carboxyl methylesterase	43496 (4), 53520	K15889
[EC:1.1.1.216]	FLDH; farnesol dehydrogenase	39038 (2), 560	K15891
[EC:2.7.1.-]	FOLK; farnesol kinase	48929 (3)	K15892

در مطالعه‌ای بر روی گیاه *Taxus cuspidate* که تولیدکننده تاکسان (متابولیت ضدسرطان) است، تمام ژن‌های کدکننده هفت آنزیم مسیر پلاستیدی MEP در مجموعه داده حاصل از توالی‌یابی RNA شناسایی شدند (Wu et al. 2011). در گیاه *T. mairei* که منبع مهم دیگری برای تاکسان است، همه ژن‌های کدکننده هفت آنزیم در مسیر پلاستیدی MEP در مجموعه داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA با بن‌سازه Illumina شناسایی شدند (Hao et al. 2011). کمپتوتسین[1] یک ایندول آلکالوئید ترپنوئیدی است که اثرات بالینی آن در درمان سرطان مشهود است. *Camptotheca acuminata* گونه بومی جنوب چین است که با نام "درخت شادی" شناخته می‌شود و برگ‌های آن حاوی کمپتوتسین است. در مطالعه‌ای با استفاده از توالی‌یابی RNA و آنالیز ترنسکریپتوم این گیاه ۲۰ ژن آنزیمی مرتبط با مسیر بیوسنتزی اسکلت کمپتوتسین شناسایی و سه ژن کاندید در بالادست مسیر کلون شد (Sun et al. 2011). *Ophiorrhiza pumila* از خانواده Rubiaceae نیز آلکالوئید ضد سرطان کمپتوتسین را در خود تجمع می‌دهد. در پژوهشی با استفاده از تلفیق تجزیه و تحلیل عمیق ترنسکریپتوم با متابولیت پروفایلینگ، ژن‌های کاندید درگیر در بیوسنتز کمپتوتسین و سایر متابولیت های این گیاه شناسایی شد (Yamazaki et al. 2013). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه زردچوبه (*Curcuma longa*) صورت گرفت، تعداد زیادی مسیرهای متابولیتی ثانویه و مسیرهای بیوسنتز ترپن‌ها شناسایی شد. در این تحقیق برای اولین بار رونوشت‌هایی مربوط به مسیرهای بیوسنتزی چندین ترکیب ضد سرطان مانند تاکسول[2]، کورکومین[3] و وینبلاستین[4] علاوه بر ترکیبات ضدمالاریا مانند آرتمیسین و آلکالوئیدهای آکریدونی شناسایی شد (Annadurai et al. 2013). صدها ژن جدید در مسیر MEP و سایر مسیرهای متابولیکی مرتبط با بیوسنتز ترپنوئیدها، در مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*) (Yang et al. 2013)، گیاه چای (*Camellia sinensis*) (Shi et al. 2011)، *Sa. miltiorrhiza* (Wenping et al. 2011)، *Euphorbia fischeriana* (Barrero et al. 2011)، *Sophora japonica* (Zhu et al. 2014)، *Dendrobium officinale* (Guo et al. 2013)، گل راعی (*Hypericum perforatum L.*) (He et al. 2012)، *Litsea cubeba* (Han et al. 2013)، *Polygonum cuspidatum* (Hao et al. 2012)، جنس *Epimedium* (Zeng et al. 2010) و سایر گیاهان دارویی که قبلا ذکر شدند شناسایی شده‌است.

شناسایی ژن‌های مرتبط با بیوسنتز اسکلت ترپن می‌تواند در دستورزی این مسیرها در جهت افزایش ترپن‌های خاص در اسانس گیاه موثر باشد. بعنوان مثال یک مطالعه سیستم زیستی در تریکوم‌های غده‌ای ریحان (*Ocimum basilicum*) همبستگی مثبتی را بین سطح رونوشت، فراوانی پروتئین و هم‌چنین فعالیت آنزیمی آنزیم‌های ۱-دئوکسی-دی-زایلولوز ۵ فسفات رداکتوایزومراز (DXR) و ۱- دئوکسی-دی-زایلولوز ۵-فسفات سنتاز (DXS) با عملکرد اسانس نشان داد (Xie et al. 2008). هم‌چنین نشان داده شده‌است که بیش بیان ژن *DXR* منجر به

[1] Camptothecin

[2] Taxol
[3] Curcumin
[4] Vinblastine

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.12.9]

افزایش معنادار تولید و تجمع ترپن در گیاه نعنافلفلی (*Mentha piperita*)(Wildung and Croteau 2005)، اربیدوپسیس تراریخت (Carretero-Paulet et al. 2006) و گوجه (Enfissi et al. 2005) شده‌است.

در این پژوهش استفاده از توالی‌یابی RNA منجر به شناسایی ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپن‌ها در گیاه دارویی دارویی زنیان شد که شناسایی این رونوشت‌ها امکان تحقیقات بیش‌تر را در زمینه مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی با ارزش زنیان فراهم می‌کند. مطالعه مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی و مکانیسم ژنتیکی مربوطه می‌تواند تولید تجاری داروها را از طریق اصلاح مولکولی، مهندسی متابولیت و گیاهان تراریخت تسهیل کند.

منابع

Ajikumar PK, Xiao W-H, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B and Stephanopoulos G (2010) Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in Escherichia coli. Science 330:70-74.

Akbarinia A, Sefidkon F, Ghalavand A, Tahmasebi Sarvestani Z and Sharifi Ashorabadi A (2005) A study on chemical composition of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) essential oil produced in Qazvin. The Journal of Qazvin Univerity of Medical Science 9:22-26.

Annadurai RS, Neethiraj R, Jayakumar V, Damodaran AC, Rao SN, Katta MA, Gopinathan S, Sarma SP, Senthilkumar V and Niranjan V (2013) De Novo transcriptome assembly (NGS) of *Curcuma longa* L. rhizome reveals novel transcripts related to anticancer and antimalarial terpenoids. PloS one 8:e56217.

Bairwa R (2012) Medicinal uses of *Trachyspermum ammi*: a review. The Pharma Research 5:247-258.

Barrero RA, Chapman B, Yang Y, Moolhuijzen P, Keeble-Gagnère G, Zhang N, Tang Q, Bellgard MI and Qiu D (2011) De novo assembly of *Euphorbia fischeriana* root transcriptome identifies prostratin pathway related genes. BMC genomics 12:600.

Bolger AM, Lohse M and Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114-2120.

Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavía P, Besumbes O ,Campos N, Boronat A and Rodríguez-Concepción M (2006) Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. Plant Molecular Biology 62:683-695.

Davazdahemami S, Sefidkon F, Jahansooz M and Mazaheri D (2011) Chemical Composition of the Essential Oils from Foliages and Seeds of Ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) in two planting dates (spring and summer). Journal of Essential Oil Bearing Plants 14:639-642.

Degenhardt J, Köllner TG and Gershenzon J (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. Phytochemistry 70:1621-1637.

Drew DP, Dueholm B, Weitzel C, Zhang Y, Sensen CW and 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.

Enfissi E, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W and Bramley PM (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. Plant Biotechnology Journal 3:17-27.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R and Zeng Q (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature Biotechnology 29:644-652.

Guo X, Li Y, Li C, Luo H, Wang L, Qian J, Luo X, Xiang L, Song J and Sun C (2013) Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid Biosynthetic genes and genetic markers. Gene 527:131-138.

Hamilton JP and Robin Buell C (2012) Advances in plant genome sequencing. The Plant Journal 70: 177-190.

Han X-J, Wang Y-D, Chen Y-C, Lin L-Y and Wu Q-K (2013) Transcriptome sequencing and expression analysis of terpenoid biosynthesis genes in *Litsea cubeba*. PloS One 8:e76890.

Hao D, Ma P, Mu J, Chen S, Xiao P, Peng Y, Huo L, Xu L and Sun C (2012) De novo characterization of the root transcriptome of a traditional Chinese medicinal plant *Polygonum cuspidatum*. Science China Life Sciences 55:452-466.

Hao DC, Ge G, Xiao P, Zhang Y and Yang L (2011) The first insight into the tissue specific taxus transcriptome via Illumina second generation sequencing. PloS One 6:e21220.

He M, Wang Y, Hua W, Zhang Y and Wang Z (2012) De novo sequencing of *Hypericum perforatum* transcriptome to identify potential genes involved in the biosynthesis of active metabolites. PloS One 7:e42081.

Kalra S, Puniya BL, Kulshreshtha D, Kumar S, Kaur J, Ramachandran S and Singh K (2013) De Novo Transcriptome Sequencing Reveals Important Molecular Networks and Metabolic Pathways of the Plant, *Chlorophytum borivilianum*. PloS One 8:e83336.

Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M and Tanabe M (2015) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. Nucleic Acids Research 44:D457-D462.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.12.9]

Mirzahosseini SM, Noori SAS, Amanzadeh Y, Javid MG and Howyzeh MS (2017) Phytochemical assessment of some native ajowan (*Therachyspermum ammi* L.) ecotypes in Iran. Industrial Crops and Products 105:142-147.

Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC and Kanehisa M (2007) KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. Nucleic Acids Research 35:W182-W185.

Pichersky E and Lewinsohn E (2011) Convergent evolution in plant specialized metabolism. Annual Review of Plant Biology 62:549-566.

Sallaud C, Rontein D, Onillon S, Jabès F, Duffé P, Giacalone C, Thoraval S, Escoffier C, Herbette G and Leonhardt N (2009) A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato Solanum habrochaites. The Plant Cell Online 21:301-317.

Sangwan RS, Tripathi S, Singh J, Narnoliya LK and Sangwan NS (2013) *De novo* sequencing and assembly of *Centella asiatica* leaf transcriptome for mapping of structural, functional and regulatory genes with special reference to secondary metabolism. Gene 525:58-76.

Sapir-Mir M, Mett A, Belausov E, Tal-Meshulam S, Frydman A, Gidoni D and Eyal Y (2008) Peroxisomal Localization of Arabidopsis Isopentenyl Diphosphate Isomerases Suggests That Part of the Plant Isoprenoid Mevalonic Acid Pathway Is Compartmentalized to Peroxisomes. Plant Physiology 148:1219-1228.

Shi C-Y, Yang H, Wei C-L, Yu O, Zhang Z-Z, Jiang C-J, Sun J, Li Y-Y, Chen Q and Xia T (2011) Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea-specific compounds. BMC Genomics 12:131.

Soltani-Howyzeh M (2017) Transcriptome Analysis of Medicinal Plant *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague and Identification of Terpene synthases Genes Related to Thymol Biosynthesis. Dissertation, University of Tehran, Iran.

Strickler SR, Bombarely A and Mueller LA (2012) Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species. American Journal of Botany 99:257-266.

Sui C, Zhang J, Wei J, Chen S, Li Y, Xu J, Jin Y, Xie C, Gao Z and Chen H (2011) Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins. BMC Genomics 12:539.

Sun Y, Luo H, Li Y, Sun C, Song J, Niu Y, Zhu Y, Dong L, Lv A and Tramontano E (2011) Pyrosequencing of the *Camptotheca acuminata* transcriptome reveals putative genes involved in camptothecin biosynthesis and transport. BMC Genomics 12:533.

Wang W, Wang Y, Zhang Q, Qi Y and Guo D (2009) Global characterization of *Artemisia annua* glandular trichome transcriptome using 454 pyrosequencing. BMC Genomics 10:465.

Wang Z, Gerstein M and Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics 10:57-63.

Wenping H, Yuan Z, Jie S, Lijun Z and Zhezhi W (2011) De novo transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients. Genomics 98:272-279.

Wildung MR and Croteau RB (2005) Genetic engineering of peppermint for improved essential oil composition and yield. Transgenic Research 14:365-372.

Wink M (2011). Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, John Wiley and Sons.

Wu Q, Sun C, Luo H, Li Y, Niu Y, Sun Y, Lu A and Chen S (2011) Transcriptome analysis of *Taxus cuspidata* needles based on 454 pyrosequencing. Planta Medica 77:394-400.

Xiao M, Zhang Y, Chen X, Lee E-J, Barber CJ, Chakrabarty R, Desgagné-Penix I, Haslam TM, Kim Y-B and 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.

Xie Z, Kapteyn J and Gang DR (2008) A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. The Plant Journal 54:349-361.

Yamazaki M, Mochida K, Asano T, Nakabayashi R, Chiba M, Udomson N, Yamazaki Y, Goodenowe DB, Sankawa U and Yoshida T (2013) Coupling deep transcriptome analysis with untargeted metabolic profiling in *Ophiorrhiza pumila* to further the understanding of the biosynthesis of the anti-cancer alkaloid camptothecin and anthraquinones. Plant and Cell Physiology 54: 686-696.

Yang D, Du X, Liang X, Han R, Liang Z, Liu Y, Liu F and Zhao J (2012) Different roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in cell growth and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. PloS One 7:e46797.

Yang L, Ding G, Lin H, Cheng H, Kong Y, Wei Y, Fang X, Liu R, Wang L and Chen X (2013) Transcriptome analysis of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* and identification of genes related to tanshinone biosynthesis. PLoS One 8:e80464.

Zarshenas M, Samani S, Petramfar P and Moein M (2014) Analysis of the essential oil components from different *Carum copticum* L. samples from Iran. Pharmacognosy Research 6:62-66.

Zeng S, Xiao G, Guo J, Fei Z, Xu Y, Roe BA and Wang Y (2010) Development of a EST dataset and characterization of EST-SSRs in a traditional Chinese medicinal plant, *Epimedium sagittatum* (Sieb. Et Zucc.) Maxim. BMC Genomics 11:94.

Zhu L, Zhang Y, Guo W, Xu X-J and Wang Q (2014) De Novo Assembly and Characterization of *Sophora japonica* Transcriptome Using RNA-seq. BioMed Research International 2014:750961.

Zwenger S and Basu C (2008) Plant terpenoids: applications and future potentials. Biotechnology and Molecular Biology Reveiws 3:1-7.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.12.9]