مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و سوم - تابستان ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی ژنوم بیان‌شده در سلول‌های غدد برگی گیاه دارویی *Salvia Fruticosa* برای تعیین عناصر مهم ژنومی

زیبا فولادوند*، بهمن فاضلی‌نسب

پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی و پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

چکیده:

سابقه و هدف : روش های ژنومیکس نظیر تجزیه و تحلیل توالی های EST، امکان شناسایی مارکرهای مرتبط با ژن های بیان شده و miRNA های شبکه های تنظیمی و متابولیکی را فراهم می آورند. در این مقاله شناسایی عناصر مرتبط با ژنوم بیان شده در غدد برگی *Salvia fruticosa*مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها : ۱۴۶۵ توالی EST مربوط به کتابخانه ژنوم بیان شده در سلول غدد برگی گیاهان جنس *Salvia* از خانوادهٔ نعناعیان از پایگاه داده NCBI دریافت شد. پس از جمع آوری و حذف توالی های مربوط به وکتور، کلروپلاست، توالی های تکراری، سر هم بندی آن ها، توالی های کانتیگ و سینگلتون ایجاد شد. با استفاده از جستجوی BlastX، hit های موجود و هم چنین فراوانی و توزیع نشان گرهای EST-SSR با استفاده از SSRTools مشخص شد. miRNA های مرتبط با توالی های مورد نظر با استفاده از مدل سازی و جستجو در گیاه آرابیدوپسیس مشخص شدند.

یافته ها : تعداد ۱۵۳ کانتیگ و ۷۷۷ سینگلتون مشخص شد. BLASTX، ۴۷۷unigene دارای hit را مشخص نمود. Gene enrichment analysis توالی ها را در گروه های کارکردی مختلف قرار داد. در بین نشان گرهای مولکولی EST-SSRs مشخص شده دی- نوکلئوتیدهای AT/GA ، تری- نوکلئوتیدهای GCC ، تترانوکلئوتیدهای TAAT دارای حداقل چهار تکرار بیش ترین فراوانی را دارد، برای تکرار های پنتا و هگزا نوکلئوتیدی AAGAG و AGTATT ، CGTGGT به صورت سه تکرار پشت سر هم یک بار گزارش شد. برای ژنوم بیان شده تعداد ۴۰عددmiRNA مرتبط با ژن های مختلف مشخص شد.

نتیجه گیری : EST-SSRs مشخص شده در این گیاه می تواند برای تعیین تنوع بین گونه های مختلف این جنس در خانوادهٔ گیاهان lamiaceae استفاده شود. دو miRNA مهم مرتبط برای تنظیم بیان ژن آنزیم مونوترپن سنتاز در مسیر تولید ترپنوئیدهای مهم موجود در این گیاه مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ژنوم کارکردی، غدد برگی، گیاه دارویی

مقدمه

خانواده نعناعیان(Lamiaceae)، در طب سنتی ایران همواره مورد استفاده بوده اند. گیاهان این خانواده شامل ۲۰۰ جنس و حدود ۳۲۰۰-۳۰۰۰ گونه در منطقه مدیترانه هستند. (۲۷، ۶، ۳) این خانوادهٔ گیاهی شامل بزرگ ترین و مهم ترین گروه های با ارزش اقتصادی است که مواد گیاهی آن ها استخراج می شود و یکی از بزرگ ترین جنس های این خانواده، جنس Salvia با ۵۰۰ گونه است. (۳۰، ۲۹، ۲۱) ۸۱ گونه از این خانواده در ایران استفاده دارویی دارند که بیش تر به عنوان تقویت کننده و برای درمان نفخ و سوء هاضمه و عفونت های میکروبی و قارچی بوده است. جنس *Salvia L.* با نام فارسی مریم گلی بزرگ ترین و مهم ترین جنس در گیاهان خانوادهٔ نعناعیان است. جنس مریم‌گلی ۵۸ گونه در ایران دارد. (۴) گیاهان متعلق به این جنس تنوع زیادی در تولید متابولیت های ثانویه را داراست و اثر های آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و مهار کننده کولین استرازی برای آن ها گزارش شده است. ترکیبات موجود در گیاهان این جنس به طور عمده شامل فلاونوئیدها و ترکیبات پلی فنلی هست. روغن های فرار که اکثر آن ها از ترکیبات ترپنوئیدی و فلاونوئیدی تولید می شوند، در گیاهان خانواده نعناعیان، به فراوانی یافت می شود. (۲۸) گیاه *Salvia fruticosa* ، مریم گلی یونانی، متعلق به خانواده نعناعیان که به دلیل خواص درمانی از زمان های قدیم

نویسنده مسئول :
پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی و پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
پست الکترونیکی: Zibafooladvand83@gmail.com
تاریخ دریافت: ۹۴/۰۷/۰۴
تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۰۷

Archive of SID
www.SID.ir

شناخته شده است هستند. مریم گلی یونانی بومی منطقه مدیترانه است و به عنوان چای گیاهی استفاده می شود. (۲۸) ترکیبات اسانس آن در درمان طیف گسترده ای از بیماری ها استفاده شده است، و اثر های درمانی، غدد برگی در تعداد زیادی از این گیاهان وجود دارد و دارای شکل‌ها و ترکیبات ترشحی متفاوتی هستند. (۲۴، ۱۵، ۱۴، ۵، ۱) امروزه پژوهش ها در سطوح ژنومیکس، ترانسکریپتوم، پروتئوم، متابولوم و دیگر سطوح کارکردی کاربردهای فراوانی دارند. این روش ها با روشن نمودن نحوه فعالیت ژنوم، تنظیم این فرآیندها و پاسخ آن ها به عوامل بیرونی و درونی گیاه، پروفایل مناسبی را در مورد فعالیت ژنوم و راه حل های لازم را برای دست ورزی ژنتیکی و مهندسی گیاهان فراهم می نماید. (۲۶، ۲۵) یکی از جنبه های ژنومیکس استفاده از تجزیه و تحلیل توالی های EST است. داده های خام کتابخانه ها و جزئیات مربوط به هر کدام را می توان از پایگاه های اطلاعاتی از جمله NCBI به دست آورد. (۲۲) مواد با ارزش اقتصادی در غدد برگی در ساختارهایی که از لحاظ متابولیکی فعال هستند، ذخیره می شوند که این ساختار استخراج و خالص سازی این نوع مواد با ارزش را آسان تر می نماید. (۱۳) مطالعه این متابولیت ها و پروتئین ها و ژن های مرتبط با آن ها به عنوان یکی از اهداف مهندسی ژنتیک مطرح شده است تا بر اساس آن ها دست ورزی های ژنتیکی در راستای بهبود تراکم غدد برگی، فیزیولوژی آن ها انجام شود. (۳۱، ۲۰، ۱۹، ۱۰، ۹) ریز ماهواره ها، توالی های تکراری ۶-۲ نوکلئوتیدی هستند که به تعداد فراوان و به صورت یکنواخت در سطح ژنوم هسته داران و در نواحی رمز کننده و غیر رمز کننده DNA پراکنده اند، از طرفی EST-SSR (Expression sequence tag -simple sequence repeat) به دست آمده در مقابل SSR های به دست آمده از ژنوم غیر کد کننده دارای حفاظت شدگی بالاتری هستند. (۱۸، ۱۲، ۱۱، ۸، ۲) این جایگاه های ژنومی از تنوع بسیار بالای اللی برخوردار هستند و بر اساس قوانین مندل و به صورت هم بارز به زاده ها منتقل می شوند و سطوح بسیار بالای چند شکلی را در تعداد توالی های تکرار شونده از خود نشان می دهند. (۱۱، ۲) فناوری ریز ماهواره ها مبتنی بر تکثیر قطعه تکرار شونده با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از نواحی مجاور توالی های تکراری با محتوای GC، ۵۰ درصد و از طریق پی سی آر بوده و نتایج مربوط به آن در آزمایشگاه های مختلف جهان به آسانی قابل تکرار است.(۱۱، ۲) وجود این دسته از مارکرهای مولکولی به متخصصین برای انتخاب گونه های مناسب گیاهی کمک خواهد کرد، علاوه بر این اطلاعات مفیدی در مورد تکامل و توسعهٔ سلولی برای گونه های گیاهی فراهم خواهد شد. دومین هدف مورد نظر در این مقاله معرفی miRNA های موجود داده های EST موجود در کتابخانه غدد برگی گیاه *Sfruticusa* است، چند صد miRNA در گیاهان با استفاده از روش های آزمایشگاهی و کامپیوتری تعیین شده اند اما تا کنون برای *Sfruticusa* چنین داده هایی اعلام نشده است. miRNA های معرفی شده در گونه های مختلف گیاهی در فرآیندهای تنظیم ژن از جمله ژن های مرتبط با انرژی سلول، بیوسنتز اسید آمینه ها، انتقال گروه های متیل، فرآیند یوبی کوئیتیناسین، فرآیندهای اتوفاگوزومی، فاکتورهای رونویسی که در فرآیندهای فتومورفوژنز، پاسخ به هورمون های گیاهی از جمله جیبرلیک اسید، جاسمونیک اسید، سالسیلیک اسید، آبسیزیک اسید، اکسین و اتیلن، سرنوشت سلولی، سیگنالینگ سلولی و دفاع در برابر تنش های اکسیداتیو و ... دخالت دارند. (۲۳، ۵) در این مقاله سعی شده است تا تصویر مناسبی از فرآیند تنظیم بیان ژن با استفاده از miRNA ها به دست بیاید. و بدین ترتیب راه کارهای لازم را برای افزایش تولید این مواد با ارزش دارویی از جمله با استفاده از مارکرهای مولکولی فراهم شد.

مواد و روش ها:

۲-۱: جمع آوری داده های توالی از پایگاه NCBI:

۱۴۶۵ توالی EST مربوط به کتابخانه غدد برگی گیاه مریم گلی از پایگاه داده NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت شد.

۲-۲: حذف توالی های وکتوری، تکراری و ارگانلی (میتوکندری و کلروپلاستی) و سر هم بندی نمودن توالی های به دست آمده با استفاده از سرویس آنلاین Egassembeller:

توالی ها به منظور شناسایی آلودگی های وکتوری و بررسی طول و کیفیت شان با استفاده از سرویس بیوانفورماتیکEgassembler (www.egassembler.hgc.jp) بررسی شدند (۱۶). توالی های مربوط به وکتور، توالی های تکرار شونده، توالی های کلروپلاستی و میتوکندریایی حذف شدند. در ادامه با استفاده از توالی های باقی مانده و با استفاده از همان سرویس ذکر شده در بالا و با در نظر گرفتن ۸۰٪ همانندی دسته بندی و سر هم بندی شدند.

۲-۳: تعیین کردن توالی های عناصر ژنومی:

با استفاده از سرویس بیوانفورماتیک (www. Egassembler egassembler.hgc.jp) بررسی انجام شد.

۲-۴: جستجوی BlastX برای توالی های مورد نظر برای مشخص نمودن hit های موجود:

جستجوی BlastX برای تمام unigene ها (کانتیگ ها و سینگلتون ها) و با در نظر گرفتن حداکثر E-Value در مقابل بانک توالی های NCBI انجام گردید. از طرفی نتایج بلاست X

Archive of SID

www.SID.ir

برای تعیین گروه های کارکردی و شبکه پروتئینی با استفاده از GENE MANIA(http://www.genemania.org) به کار گرفته شدند (۱۷).

۲-۵: فراوانی و توزیع نشان گرهای EST-SSR یافت شده در توالی های EST موجود در سلول های غدد برگی موجود در S.fruticosa:

نشان گرهای SSR، با استفاده از برنامهٔ آنلاین SSRIT تشخیص داده شد. نرم افزار مورد استفاده با آدرس اینترنتی مقابل در دسترس می باشد.

http://archive.gramene.org/db/markers/ssrtool.

۲-۶: معرفی miRNA های مرتبط با بعضی از ژن های مهم با استفاده از مدل سازی در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا:

برای تعیین miRNA های مرتبط، از توالی های کانتیگ و سینگلتون به دست آمده در مراحل قبل استفاده شد. پیش بینی miRNA ها با استفاده از نرم افزارهای موجود در سایت به آدرس http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/ انجام شد (۳۲).

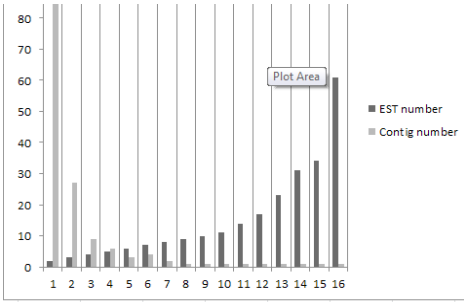
نتایج:

بر اساس آنالیز صورت گرفته بر روی توالی های EST جداسازی شده از غدد برگی جنس Salvia در خانوادهٔ نعناعیان، نتایج موجود در جدول (۱) حاصل شد که بر اساس آن از تعداد کل EST(۱۴۶۵)، تعداد ۱۵۳ کانتیگ و ۷۷۷ سینگلتون و در مجموع ۹۳۰ unigene معرفی شد.

تعداد کل توالی های EST	تعداد کانتیگ	تعداد سینگلتون	تعداد کل unigenes	طول کل پوشش داده ژنوم(bp)
۱۴۶۵	۱۵۳	۷۷۷	۹۳۰	۸۵۸۲۶۵

جدول ۱- نتایج پالایش، صف بندی، هم گذاری توالی های EST موجود در غدد برگی Salvia fruticosa

بررسی های بیش تر بر روی کانتیگ های مشخص شده نشان داد که تعداد زیادی از کانتیگ های مشخص شده، دارای تعداد کم تری از توالی های EST هستند؛ که نتایج آن در نمودار (۱) آمده است.



نمودار ۱ – توزیع کانتیگ ها بر اساس تعداد توالی های EST تشکیل دهندهٔ هر کانتیگ.

از طرف دیگر بر اساس تجزیه و تحلیل عناصر ژنومی که با استفاده از سرویس آنلاین Egassembler انجام شد نتایج موجود در جدول (۲) به دست آمده است.

total length:	858265 bp (858265 bp excl N-runs)		
GC level:	43.43%		
bases masked:	9750 bp (1.14%)		
	number of elements	length occupied	Percentage of sequence
Retroelements	4	391 bp	0.05%
SINEs:	0	0 bp	0.00%
LINEs:	0	0 bp	0.00%
Penelope	0	0 bp	0.00%
CRE/SLACS	0	0 bp	0.00%
L2/CR1/Rex	0	0 bp	0.00%
R1/LOA/Jockey	0	0 bp	0.00%
R2/R4/NeSL	0	0 bp	0.00%
RTE/Bov-B	0	0 bp	0.00%
L1/CIN4	0	0 bp	0.00%
LTR elements:	4	391 bp	0.05%
BEL/Pao	0	0 bp	0.00%
Ty1/Copia	2	132 bp	0.02%
Gypsy/DIRS1	2	259 bp	0.03%
Retroviral	0	0 bp	0.00%
DNA transposons	6	524 bp	0.06%
hobo-Activator	0	0 bp	0.00%
Tc1-IS630-Pogo	2	120 bp	0.01%
En-Spm	0	0 bp	0.00%
MuDR-IS905	3	243 bp	0.03%
PiggyBac	0	0 bp	0.00%
Tourist/Harbinger	0	0 bp	0.00%
Other (Mirage, P-element, Transib)	0	0 bp	0.00%
Rolling-circles	0	0 bp	0.00%
Unclassified:	0	0 bp	0.00%
Total interspersed		915 bp	0.11%
Small RNA:	0	0 bp	0.00%
Satellites:	0	0 bp	0.00%
Simple repeats:	66	2165 bp	0.25%
Low complexity:	116	6670 bp	0.75%

جدول ۲ – نتایج جستجوی عناصر ژنتیکی قابل رونویسی و غیر قابل رونویسی در ژنوم بیان شده در غدد برگی Salvia.

از طرف دیگر جستجوی بلاست ایکس نشان داد که ۴۷۷unigene دارای hit مشخص در بین پروتئین های موجود در پایگاه داده های NCBI بودند و برای سایر توالی ها hit مشخصی شناسایی نشد، نتایج در جدول (۳) آمده است.

unigene	بلاست در مقابل پروتئین های nr(Blastn versus nr)	
	بدون hit	دارای hit
سینگلتون	۴۱۰	۳۶۷
کانتیگ	۴۳	۱۱۰
کل	۴۵۳	۴۷۷

جدول ۳- نتایج بلاست x توالی های کانتیگ و سینگلتون در مقابل بانک داده های nr.

بر اساس آنالیز برای تعیین کارکرد، ژن ها و پروتئین های

Archive of SID

www.SID.ir

مهم معرفی شده در جدول (۴) معرفی شدند (بخشی از داده ها نشان داده شده است). توالی های unigene به دست آمده در چندین گروه پروتئین های کارکردی قابل تقسیم بندی بودند:

گروه اول، مرتبط با بیوسنتز ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و برخی ویتامین ها مثل ویتامین E هستند که دارای بیان بالایی در غدد برگی هستند، این ژن های مرتبط با سنتز متابولیت های ثانویه در غدد سلولی با توجه به نقششان بعضی از آن ها در غشای لوکوپلاستی و برخی دیگر نیز در غشای صاف قرار دارند. بعضی از آن ها در میتوکندری و بعضی دیگر در سیتوزول قرار دارند که نشان دهندهٔ تولید و تسهیم مواد در سطح تک سلولی و در قسمت های مختلف آن است؛ بنابراین قسمت های مختلف و متمایز یک سلول نقش های خاصی را برای تولیدات متابولیت های ثانویه در غدد برگی بر عهده دار باشند.

گروه دوم، گروه پروتئین های انتقال دهنده بودند که تعداد از آن ها توالی های EST ناقل های مواد لیپیدی هستند، نقل و انتقال مواد به خصوص مواد لیپوفیلیک را که از اجزای اصلی روغن های تولید شده هستند، بر عهده دارند.

گروه سوم، ژن های مرتبط با رشد سلولی و تشکیل دیوارهٔ سلولی بودند که با توجه به نقش غدد برگی در ذخیره سازی مواد تولید شده دور از انتظار به نظر نمی رسد.

گروه چهارم، از طرفی ژن های مرتبط با متابولیت های اولیه سلولی در مسیرهای گلیکولیز، پنتوز فسفات و فسفریلاسیون اکسیداتیو نیز با فراوانی بالایی در این سلول ها وجود دارند.

گروه پنجم به عنوان گروه آخر ژن هایی بودند که در عملکردهای سلولی از جمله پیام رسانی داخل سلولی و هم چنین دفاع در برابر عوامل پاتوژنی نقش داشتند که لازمه داشتن یک دفاع سلولی مناسب در برابر تنش ها وجود مسیر سیگنالینگی است که پیام ها را به موقع و در زمان مناسب به هسته سلول برساند و از طرفی چون به طور معمول گیاهان دارویی در شرایط محیطی تنش، میزان متابولیت های ثانویه بیش تری را تولید می کنند شاید بیان این ژن ها به عنوان پیام رسانان سلولی به عنوان یکی از مراحل اولیه برای تولید این مواد مؤثر در گیاه باشد.

نام پروتئین	نام ژن	فرآیندهای بیولوژیک که محصول ژن مورد نظر در آن تأثیر دارد
NADH dehydrogenese	NAD	متابولیسم عمومی سلول
Acetoacetyl-coenzyme A thiolase	ACAT	
Adenosine kinase	ADK2	
Acyl carrier protein	ACL1.1	
Desumoylating isopeptidase 1	DESI1	
Ascorbate peroxidase	APX	
Cytochrome c oxidase subunit 1	MT-CO1	
Acyl carrier protein	acpP	
Thioredoxin	TXN	
GDSL esterase/lipase	GDSL	
Alcohol dehydrogenases	ADH	
Non-specific lipid-transfer	LTP	نقل و انتقال سلولی
YSL transporter	YSL	
Thionin	Thionin	
Ferredoxin	Ferredoxin	
Tissue-type plasminogen activator	PLAT	
Luminal-binding protein	HSC70	
S-adenosylmethionine synthase	MAT2A	متابولیسم اختصاصی اسیدآمینه‌ها
Spermine synthase	SMS	
Probable phytol kinase 1		بیوسنتز ویتامین E
Chalcone--flavonone isomerase 1	CHI1	بیوسنتز فلاونوئیدها
Copalyl diphosphate synthase		بیوسنتز دی ترپنوئیدها
pulegone reductase		بیوسنتز مونوترپنوئیدها
membrane steroid-binding	MSBP1	رشد سلولی
UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase 1	AXS1	توسعه دیوارهٔ سلولی
calreticulin	CRP55	سیگنالینگ سلولی
nucleoside diphosphate kinase	NME1	دفاع سلولی
heat shock	HSC-2	پاسخ به تنش‌های غیر زیستی
pathogenesis-related protein	PR	پاسخ به تنش‌های زیستی

جدول ۴ - نتیجه تعیین عملکرد بعضی از ژن‌های مهم بیان‌شده در غدد برگی که در فهرست کانتیگ ها موجود می‌باشند.

و در نهایت برای تعدادی از ژن های مهم معرفی شده در بلاست x انجام شده در مقابل پایگاه داده های nr شبکه ژنی موجود در شکل (۱) شد. در گروه کارکردی متابولیسم ثانویه که در گیاهان خانواده به عنوان ترکیب هایی با ارزش دارویی در آن ها محسوب می شوند، چندین ژن مهم و با بیان بالا در گروه کانتیگ های معرفی شده وجود دارد. Chalcone flavonone isomerase ۱, pulegone reductase Copalyl diphosphate synthaseکه از آنزیم های مهم در مسیر بیوسنتز متابولیت های ثانویه مثل

Archive of SID

www.SID.ir

فلاونوئیدها و دی ترپنوئیدها می باشند. از آنجایی‌که این ترکیب ها به عنوان ترکیبات مهمی در این گیاهان مطرح هستند، می توانند کاندیداهای مهمی برای بررسی های بیش تر در جهت شناسایی نقش آن ها در بیوسنتز مواد با ارزش دارویی در این گیاهان باشند.

مارکرهایEST-SSRs تشخیص داده شده در ژنوم بیان شده در گیاه دارویی *Sfruticosa*:

بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل توالی های مرتبط با کانتیگ های به دست آمده در مراحل قبلی، SSR های تشخیص داده شده در توالی های موجود در سلول های غدد برگی گیاه *Sfruticosa* به این صورت بیان می شود که در میان EST-SSR های تعیین شده و در بین توالی های دو نوکلئوتیدی که دارای حداقل چهار تکرار پشت سر هم هستند، دی- نوکلئوتیدهای AT/GA دارای بیش ترین فراوانی به ترتیب ۳۰/۷٪ و ۲۳٪ بودند، از طرفی در بین توالی های تری نوکلئوتیدی که دارای حداقل چهار تکرار پشت سر هم هستند، تری- نوکلئوتیدهای GCC دارای بیش ترین فراوانی، ۴۴/۵٪ بودند، در میان توالی های تترانوکلئوتیدی با حداقل سه تکرار پشت سر هم، تترانوکلئوتیدهای TAAT دارای بیش ترین فراوانی، ۴۰٪ بودند و برای موتیف های پنتا و هگزا نوکلئوتیدی به ترتیب AAGAG و AGTATT، CGTGGT فقط یک بار و به صورت سه تکرار پشت سر هم گزارش می‌شوند.

فرآیندهای سلولی که ژن های مرتبط با EST-SSRs در آن دخالت دارند:

با توجه به بررسی های انجام شده، مارکرهای مشخص شده در ارتباط با پروتئین هایی هستند که در چندین گروه قرار می گیرند: پروتئین های دخیل در فرآیندهایی نقل و انتقال از جمله انتقال لیپیدها، مواد مختلف از عرض غشاهای سلولی، پروتئین‌های دخیل در فرآیندهای اکسیداسیون- احیاء، فاکتورهای رونویسی دخیل در تنظیم فرآیندهای رونویسی به خصوص گروه فاکتورهای رونویسی WRKY-type، عوامل دخیل کننده در ترمیم DNA ی آسیب دیده، گروه پروتئین های چاپرونی دخیل در تجزیه پروتئین ها، آنزیم های دخیل در بیوسنتز جاسمونیک اسید به عنوان مولکول مؤثر در سیگنالینگ سلولی و مهم ترین گروه در بین پروتئین های شناخته شده دارای مارکرهای مولکولی، گروه مرتبط با ژن‌های دخیل در سنتز مونوترپن ها به عنوان مواد اولیه و مهم برای تولید متابولیت های ثانویه مهم در این گیاهان هستند که در گروه های متفاوت موتیف های تکراری دو- چهار نوکلئوتیدی قرار گرفته اند و این مارکرها می توانند به عنوان مارکرهای پیشنهادی برای غربال گری گونه های تولیدکنندهٔ متابولیت های مهم گیاهی به کار گرفته شوند(جدول ۵).

فرآیندهای سلولی که ژن های مرتبط با miRNA ی ارائه شده در آن دخالت دارند:

در آنالیز انجام شده بر روی توالی های EST که به صورت کانتیگ و سینگلتون هستند، ژن های مهمیmiRNA مرتبط با آن ها شناسایی شد که مرتبط با فرآیندهای متابولیسم اولیه و ثانویه سلولی هستند. شامل فرآیندهایی از قبیل ترجمهٔ سلولی، بیوسنتز اسید آمینه ها و نوکلئوتیدها، متابولیسم عمومی سلول، دخیل در نقل و انتقال مواد با خصوصیات دارویی، فعالیت هایی مثل رشد فیلامنت های سلولی، ساماندهی دیواره های سلولی، شکل گیری روزنه های سلولی، دفاع سلولی، سیگنالینگ سلولی وابسته غیر وابسته به براسینواستروئیدها، فعال‌کنندهٔ رونویسی و متابولیسم اختصاص اسیدهای آمینه از جمله تولید اسپرمین و بیوسنتز ترپنوئیدها به عنوان دسته مهمی از مواد مهم در تولید مواد دارویی گیاهان خانوادهٔ نعناعیان هستند.

EST	موتیف	تعداد	عملکرد مرتبط با توالی بیان شدهٔ مرتبط با EST-SSRs
Contig4-3	at	۴	lipid transfer protein precursor
Contig153-1			B-cell receptor-associated 31-like
Contig152-7			pulegone reductase
Contig142-9			WRKY-type DNA binding protein 1
Contig116-3			Rab1 protein
Contig32-3			calmodulin-3-like
Contig119-2			ferredoxin (Fdx-1)
Contig88-3			transport protein particle
Contig110-4			UDP-rhamnose
Contig37-1	at	۵	12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3)
Contig46-2			genome assembly
Contig107-1			phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
Contig123-2	at	۸	acid phosphatase 1-like
Contig72-1	ga	۴	thioredoxin H
Contig72-2			thioredoxin H
Contig47-1			tRNA-dihydrouridine(20a/20b) synthase [NAD(P)+]-like
Contig91-2			NAD(P)-binding Rossmann-fold-containing protein
Contig29-1			translation initiation factor 5A4
Contig7-1	ga	۵	nucleoside diphosphate kinase 2, chloroplastic

Archive of SID

www.SID.ir

Contig100-2			ATP synthase subunit epsilon
Contig148-4	ga	۷	photoassimilate-responsive protein family
Contig11-7	gcc	۴	nucleoside diphosphate kinase 2
Contig44-4			apoptosis, WT1, regulator (PAWR)
Contig67-4			plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein-like
Contig4-6	taat	۳	lipid transfer protein precursor
Contig22-5			activating signal cointegrator 1 complex subunit 3
Contig116-6			assembly S_papillosus_ LIN
Contig86-4	aagag	۳	clp protease-related protein
Contig67-8	cgtggt	۳	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein-like

جدول۵- کانتیگ ها و موتیف ها و فراوانی تکرار و ژن های مرتبط با EST-SSRs شناسایی شده.

	ژن های هدف برای miRNA	مسیر بیولوژیکی	توالیmiRNA
۱	WD repeat-containing protein	جزئی از کمپلکس دخیل در تنظیم رونویسی	CAUUCUACUUUAGAAAUUAA
۲	lambda receptor 1 (IFNLR1)	دخیل در دفاع ضد ویروسی	CUCGUCGUUGUA-UCGUCUU
۳	40S ribosomal protein S3a-like	فرآیند ترجمهٔ سلولی	GUCCCCACUGGACUCUUGUGU
۴	L-ascorbate peroxidase 3	فرآیند انتقال الکترون	UAAAGUAGAGUGAAGAGAGU
۵	elongation factor 1-delta	فرآیند ترجمهٔ سلولی	ACUGCUACUACUACUUCUACU
۶	39S ribosomal protein L41	فرآیند ترجمهٔ سلولی	UUCUUAAGUUGUCUCCUUUU
۷	translation initiation factor 5A4	فرآیند ترجمهٔ سلولی	UAUCAUUGGUUGUAUAAGUUA
۸	spermine synthase	نقش در دفاع سلولی و سنتز پلی آمین ها	AAUACAGAACAACGAGAGUU
۹	YTH domain-containing family protein	تنظیم پایداری mRNA	CCUUGUGUUCAUCGUCAUUUU
۱۰	50S ribosomal protein L21	فرآیند ترجمهٔ سلولی	GACGAGAGAGAGAAGACAGU
۱۱	plastid partial rps16 gene for ribosomal protein	فرآیند ترجمهٔ سلولی	UCUGUUUUCGACCUUAGUUU
۱۲	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	دخیل در واکنش های اکسیدوردوکتاز	GAGGAGGAGGGAUAGGAGUAG
۱۳	monoterpene synthase 3 (MTS3)	دخیل در فعالیت آنزیم ترپن سنتاز	CACGAGAGAAAGAAGACAGU
۱۴	transmembrane protein 205	اگزوزوم های خارج سلولی	CGUGCACGGGACGAAGAGGU
۱۵	transmembrane protein 260	پروتئین ناقل از نوع چند بار گذره از غشا	UAUGAUGUUAAAGAAGGUAU
۱۶	MIF family protein geneisomerase activity	فعالیت ایزومراز	CUUUGCUUGUUCUUUGACUA
۱۷	keratinocyte proline-rich protein	اگزوزوم های خارج سلولی	GACGAGAGAGAGAAGACAGU
۱۸	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)	اکسیدردوکتاز	AGAAGUGUUUAGAAUUGAAU
۱۹	aldose 1-epimerase	متابولیسم قندها	UUGGGUUAGAGAUGAAGUCA
۲۰	LRR receptor-like serine/ threonine-protein kinase ERL1	سرین/ ترئونین کیناز	CUGCUACUACUACUUCUACU
۲۱	g-thionin	پروتئین کوچک تولید کننده مواد سمی برای جانوران	AAGAAGUGUUUAG-AAUUGAAU
۲۲	eukaryotic translation initiation factor 5A-2	فرآیند ترجمهٔ سلولی	UUUAAUACAGAAAGGACGGU
۲۳	signal cointegrator 1 complex subunit 3	آسیب DNA، ترمیم DNA، رونویسی و تنظیم آن	AUGCUUUAGAUGUUAAAGUU
۲۴	expansin	دخیل در شکل گیری دیوارهٔ سلولی	AUGGUGGCGAUGACGAUGGU
۲۵	thioredoxin-dependent peroxidase	فعالیت پراکسیدازی	UUAAGUUCGUGAAGUUAAGUU
۲۶	glycogen synthase kinase (GSK1) gene	ریتم های بیولوژیکی، متابولیسم قندها، تمایز	CACGUUCUUCAUCUUCUUUU
۲۷	translationally controlled tumor protein (TCTP)	دخیل در اتصال کلسیم و پایداری میکروتوبول ها	GUUGUUUUGUAGAGCAGGGGUU
۲۸	monoterpene synthase 3 (MTS3)	دخیل در فعالیت آنزیم ترپن سنتاز	AUGCUUUAGAUGUUAAAGUU
۲۹	cobalamine-independent methionine synthase	بیوسنتز متیونین	UUAUGAUGUUAAAGAAGGUAU
۳۰	40S ribosomal protein S16	فرآیند ترجمهٔ سلولی	AUUAAGAUAGUAGAAGAAGGU
۳۱	strigolactone esterase D14	دخیل در ایجاد ارتباط همزیستی با قارچ	AGAAUAUACUAGUGGUGGGU
۳۲	MIF family protein geneisomerase activity	فعالیت ایزومرازی	CUUUGCUUGUUCUUUGACUA

جدول ۶- توالی کلmiRNA های مرتبط با کانتیگ ها و سینگلتون ها در *Sfruticosa*.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث:

تعیین توالی های بیان شده(EST) ، منجر به ایجاد کتابخانه های تولید شده از mRNA غدد برگی شده است که در ترکیب با تجزیه و تحلیل مشخصات متابولیت و پروتئومیکس موجود در آن ها، یک بینش کلی دقیق برای بیوسنتز متابولیت های خاص غدد برگی نسبت به روش های شیمیایی فراهم می شود. بر اساس تجزیه و تحلیل پایگاه داده های EST، مشاهده شد که سلول های غدد برگی بیش تر به عنوان یک سیستم مستقل و خود حمایت کننده دارای مسیرهای بیوشیمیایی فعال برای هر دو نوع متابولیت های اولیه و ثانویه است. بر اساس اطلاعات موجود در غدد برگی گوجه فرنگی و تنباکو مشخص شده است که ژن های کد کننده آنزیم ها و پروتئین های مرتبط با فتوسنتز و تثبیت کننده کربن به صورت مشخصی دارای بیان بالایی هستند که نشان می دهد که حتی کم ترین میزان کربن لازم برای تولید متابولیت های ثانویه توسط خود سلول های برگی تثبیت می شود. از طرفی کل میزان متابولیت های ثانویه تولید شده توسط سلول های غدد برگی مرتبط با میزان ظرفیت آن ها برای تثبیت کربن است، در خانوادهٔ نعناعیان، کم تر از ۲٪ به وزن خشک برگ اختصاص می یابد. هم چنین میزان ورود اسید آمینه ها به داخل غدد برگی در حد مینیمم است و نیتروژن مورد نیاز به وسیلهٔ آمینوترانسفرازها در غدد برگی بازیابی می شود. با توجه به اینکه به نظر می رسد انواع خاص غدد کرکی یک برنامه نموی به شدت وابسته به تعداد سلول و انواع سلول را دارند، بنابراین درک این‌که چگونه غدد کرکی برگ ها توسعه و توزیع خود را بر روی سطح برگ گیاهان کنترل می کنند و عواملی که آن ها را تحت تأثیر قرار می دهند مهم به نظر می رسد، تعیین ژنوتیپ هایی از گونه های مختلف این گیاه که صفات مرتبط با تولید مواد دارویی در آن ها به وسیلهٔ مارکرهای مولکولی ریز ماهواره پیش بینی سطح بیان شونده توسط آن ها قابل ردیابی خواهد بود و از طرف دیگر معرفی miRNA های پیش بینی شده برای اساس قرار دادن آن ها برای مهندسی تولید متابولیت ها به صورتی که بتوان با دخالت در روندهای متابولیسمی در سطح بیان ژن راه های مناسبی را برای افزایش تولید مواد دارویی مهم در این گونه گیاهی فراهم آورد.

نتیجه گیری:

EST-SSRs مشخص شده در این گیاه می تواند برای تعیین تنوع بین گونه های مختلف این جنس در خانوادهٔ گیاهان *lamiaceae* استفاده شود. دو miRNA مهم مرتبط برای تنظیم بیان ژن آنزیم مونوترپن سنتاز در مسیر تولید ترپنوئیدها ی مهم موجود در این گیاه مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر بررسی گیاه *S.fruticosa* لازم است تا گیاهان دیگر این جنس نیز مورد بررسی قرار گیرد تا آلل های مورد نظر برای SSRs مشخص شود و بتوان از آنها برای طراحی پرایمرها استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل به خاطر ارائه خدمات لازمه تقدیر و تشکر به عمل می آید.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع:

1- Ament K, Kant MR, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. Plant Physiology. 2004. 135**:** 2025–2037.

2- Ablett G, Hilland H and Henry R. Sequence polymorphism discovery in wheat microsatellite flanking regions using pyrophosphate sequencing 2006. Molecular Breeding, 17: 281-289

3- Ascensao L, Marques N, Pais MS. Glandular trichomes of vegetative and Reproductive Organs of Leonotis leonurus(Lamiaceae). Annals Botany. 1995. 75: 619-626.

4- Balali, P. Sodi, M. Saeidnia, S. Study of the protective effect of the peptide beta-amyloid-induced toxicity of medicinal plants of Lamiaceae the cells P. Medical journal of Tehran University. 2012; 70(7): 402-409

5- Baohong Zhang Xiaoping Pan, George P. Cobb, Todd A. Anderson Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact, Developmental Biology. 2006. 289: 3–16.

6- Bayark A, Akgul A. Composition of essential oil from Turkish Salvia species. Phytochemistry. 1987. 26: 846-847.

7- Boughton AJ, Hoover K, Felton GW. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato,Lycopersicon esculentum. Chemistry. Ecology. 2005. 31: 2211–2216.

8- Bryan GJ, Collins AJ, Stephanson P, Orry A, smith JB and Gale MD Isolation and characterisation of microsatellite from hexaploid bread wheat. 1997. Theor. Appl. Genet. 94: 557-563

9- Choi YE, Lim S, Kim HJ, Han JY, Lee MH, Yang Y, Kim JA, Kim YS. Tobacco NtLTP1, a glandular-specific lipid transfer protein, is required for lipid secretion from glandular trichomes. Plant Journal (Epub ahead of print), Plant J. 2012 70(3):480-91.

10- Fobes JF, Mudd JB, Marsden MPF. Epicuticular lipid accumulation on the leaves of Lycopersicon pennellii (Corr.) D'Arcy and Lycopersicon esculentum Mill. Plant Physiology. 1985. 77: 567–570.

11- Gupta PK, Balyan HS, Edwards J, Isaac P, Korzun V, Roder MS, Gautier MF, Schlatter A R, Dubcovsky J, Delapena RC, Khairallah M, Penner G, Hayden MJ, Sharp P, Keller B, Wang RCC, Hardouin P, Jack P and Leroy P Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. Theor. Appl. Genet. 2002. 105: 413-422.

12- Halton TA Plant genotyping by analysis of microsatellite In R. J. Henry(Ed). Plant genotyping, The DNA fingerprinting of plant. 2001. 15-29, CABI publication, New York, USA

13- Kowalski SP, Eannetta NT, Hirzel AT, Steffens JC. Purification and characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of Solanum berthaultii. Plant Physiology. 1992. 100: 677–684.

14- Li L, Zhao YF, McCaig BC, Wingerd BA, Wang JH, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA. The tomato homolog of CORONATINEINSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation,jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. Plant Cell, 2004. 16: 126–143.

15- Maluf WM, Inoue IF, Ferreira, RDPD, Gomes LAA, de-Castro EM, Cardoso MDG. Higher glandular trichome density in tomato leaflets and repellence to spider mites. Pesquisa Agropecuária Brasileira: 2007. 42: 1227–1235.

16- Masoudi-Nejad A, Tonomura K, Kawashima S, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo

Archive of SID

www.SID.ir

T, Goto S. EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. Nucleic Acids Research. 2006. 34: 459-462.
17- Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, Donaldson SL, Morris Q,Bader GD. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. Bioinformatics. 2010. 26(22):2927-8.
18- Osborne, Thomas B. (Thomas Burr), The protein of wheat kernal cargenieins. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington, 1907. 1859-1929.
19- Rios-Estepa R, Turner GW, Lee JM, Croteau RB, Lange BM. A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpenoid essential oil composition in peppermint. Proceedings of the National Academy of Sciences 2008. 105: 2818–2823.
20- Rios-Estepa R, Lange I, Lee JM, Lange BM. Mathematical modeling-guided evaluation of biochemical, developmental, environmental, and genotypic determinants of essential oil composition and yield in peppermint leaves. Plant Physiology. 2010. 152: 2105–2119.
21- Senatore F, De Fusco R, De FeoV. Essential oil from *Salvia* spp.(*Lamiaceae*), I. Chemical composition of the essential oils from Salvia glutinosaL. Growing wild in the Southern Italy. Essential oil Research. 1997. 9: 151-157.
22- Schilmiller AL, Last RL, Pichersky E, Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. Plant Journal, 2008. 54: 702–711.
23- Slocombe SP, Schauvinhold I, McQuinn RP, Besser K, Welsby NA, Harper A, Aziz N, Li Y, Larson TR, Giovannoni J. Transcriptomic and reverse genetic analyses of branched-chain fatty acid and acyl sugar production in Solanum pennellii and Nicotiana benthamiana. Plant Physiology. 2008. 148: 1830–1846.
24- Thaler JS, Farag MA, Pare PW, Dicke M. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defences against herbivores. Ecology.Letters. 2002. 5: 764–774.
25- Tissier, A. Glandular trichomes: What comes after expressed sequence tags? Plant Journal. 2012. 70; 51–68.
26- Tissier, A. Trichome specific expression: promoters and their applications. In Transgenic Plants - Advances and Limitations .InTechnology, 2012: 353–378.
27- Valant-Vetschera KM, Roitman JN, Wollenweber E. Chemodiversity of Exudates flavonoids in some members of the Lamiaceae. Biochemistry. Systematics Ecology. 2003. 31: 1279-1289.
28- Wagner GJ. Secreting glandular trichomes: More than just hairs. Plant Physiology. 1991. 96: 675–679.
29- Werker E. Function of essential oil-secreting glandular hiars in Aromatic Plants of the lamiaceae-Review. Flavour Fragrance Journal. 1993. 8: 249-255.
30- Werker E, Ravid U, Putievsky E. Glandular glandular hiars and their secretions in the vegetative and reproductive organs of Salvia Sclarea and S.Daminica. Annals Boanyt. 1985. 55: 559-565.
31- Xie Z, Kapteyn J, Gang DR. A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes.Plant Journal. 2008. 54: 349–361.
32- Xinbin Dai and Patrick X. Zhao.psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server, Nucleic Acids Research. 2011.20: 14-24.

Archive of SID
www.SID.ir