RNA-Seq ابزاری برای شناسایی ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتزی تیمول و کارواکرول در گونه‌های آویشن

ابوذر سورنی*[1]، سمیرا دهقانی[1]
[1] گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
*نویسنده مسئول: soorni@cc.iut.ac.ir

چکیده

آویشن (*Thymus*) با نام عمومی Thyme گیاهی دولپه متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae)، حاوی ترکیبات متعدد دارویی در اسانس می‌باشد. خواص ارزشمند اسانس باعث شده آویشن از گیاهان مهم در حوزه صنعت و داروسازی شناخته شود. مونوترپن‌ها از جمله تیمول وکارواکرول، اجزای اصلی اسانس این گیاه را تشکیل می‌دهند که دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد تومور و التهاب، آنتی اکسیدان و نگهدارنده طبیعی غذا هستند. این ترکیبات از طریق دو مسیر موالونات (MVA) در سیتوزول و شبکه آندوپلاسمی و مسیر کلروپلاستی متیل اریتریول فسفات (MEP) در گیاهان بیوسنتز می‌شوند. تاکنون مطالعات متعددی در خصوص بررسی و تجزیه‌ی اسانس‌های گونه‌های آویشن در ایران و جهان صورت گرفته است، با این حال اطلاعات ژنتیکی اندکی برای این گیاه به خصوص در زمینه‌ی بیوسنتز ترپنوئیدها در دسترس است. از این رو در این مطالعه، اطلاعات ترنسکریپتومی آویشن با استفاده از تکنیک Illiminia Hiseq 2000 جمع‌آوری و به کمک آنالیزهای بیوانفورماتیکی از طریق Blastx در برابر پایگاه پروتئینی Uniprot، کانتیگ‌های مربوط به ژن‌های بیوسنتز ترپن‌ها (مسیر MEP) شناسایی شدند. بیش از ۶۵ درصد کانتیگ‌ها حداقل با یک توالی در بانک اطلاعات همولوژی نشان دادند که در این میان طول کامل برخی از ژن‌های مسیر MEP، همچون ژن کلیدی DXR جداکننده‌ی مسیر کلروپلاستی از مسیر موالانات به دست آمد. اطلاعات ترنسکریپتومی بدست آمده در این مطالعه برای گونه‌های جنس آویشن، منبع مهمی برای مهندسی ژنتیک، بررسی بیان ژن و تحقیقات ژنومیک عملکردی و مقایسه‌ای را فراهم می‌آورد.

کلمات کلیدی: آویشن، ترپنوئیدها، ترنسکریپتوم، جستجوی همولوژی

مقدمه

آویشن با نام عمومی Thyme گیاهی دولپه متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) و زیر خانواده Nepetoideae است که از نظر فیلوژنی با جنس‌های *Origanum*، *Zataria* و *Micromeria* قرابت و خویشاوندی دارد (جمزاد،۱۳۸۸). آویشن گیاهی مقاوم به خشکی و معطر (Hardman *et al.*, 2002)، چند ساله، بوته‌ای، با ارتفاع20 تا 50 سانتیمتر و گل‌هایی با رنگ سفید تا ارغوانی، برگ‌های معطر و بومی کشورهای مدیترانه‌ای است (جمزاد،۱۳۸۸).

به دلیل دگرگرده‌افشان بودن و هیبریداسیون‌های فراوان بین گونه‌ای، تنوع ژنتیکی و در نتیجه آن تنوع مورفولوژیکی، تنوع در ترکیبات شیمیایی و بازده اسانس در این جنس به وفور دیده می‌شود. چندشکلی شیمیایی از خصوصیات گونه‌های آویشن می‌باشد که این امر موجب ایجاد کموتایپ‌های تیمول[1]، کارواکرول[2]، آلفا ترپینئول[3]، آلفا توجون[4]، ژرانیول، لینالول[5] در این جنس شده است (Thompson *et al.*, 2018). مواد شیمیایی تشکیل دهنده آویشن عمدتاً به دوگروه فلاونوییدها[6] و اسانس[7] تقسیم‌بندی می‌شوند. متداول‌ترین اسانس در این گیاه مونوترپن‌ها می‌باشد که از مهم-

1 - Thymol
2 - Carvacrol
3 - α-Terpineol
4- α- Thujone
5 - Geraniol
6 - Flavonoids
7 - Essential oil

IrHC2019

ترین آن‌ها می‌توان به تیمول، کارواکرول، گاماترپینن[8]، پی-سیمین[9](کریمی و همکاران، ۱۳۸۹) و از فلاونوییدها تیموسین[10]، ایزوتیمونین[11]، فلاونول هاو لوتئولین[12] اشاره نمود (Behnia *et al.*, 2008).

ترپنوییدها از دو طریق در گیاهان سنتز می‌شوند، یکی از مسیر موالونات[13] با مداخله استات و دیگری از مسیر C-2-متیل-D-اریتریتول 4-فسفات (MEP) [14] که پیروات[15] و گلیسرآلدهید 3-فسفات[16] را به عنوان پیش‌ماده به کار می‌برد (Davis and Croteau. 2002).از جمله خواص اسانس آن می‌توان به فعالیت ضد قارچی، باکتریایی و آنتی بیوتیکی، آنتی اکسیدانی، ضد تومور، ویروس، ضد التهاب واسپاسم اشاره کرد. اسانس ارزشمند این گیاه در صنایع مختلف دارویی، غذایی و آرایشی، بهداشتی کاربرد فراوانی دارد (Mahmoudi *et al.*, 2008)(Boubaker *et al.*, 2016) . خواص دارویی اسانس گونه‌های جنس آویشن باعث شده است تا این گیاه از معروف‌ترین و متداول‌ترین گیاهان در دنیا باشد. این گیاه طبق نظرات کنگره کمیسیون دارویی آلمان دارای وضعیت مثبت درمانی است و در کمیسیون متخصصین گیاهان دارویی اروپا و کمیسیون سازمان بهداشت جهانی دارای رتبه نخست درمانی می‌باشد و به همین دلیل توجه خاص و روزافزونی به آنالیز ترکیبات فرار در اسانس آن‌ها شده است. با این حال اطلاعات ژنتیکی و مولکولی اندکی برای این گیاه به خصوص در زمینه‌ی بیوسنتز ترپنوئیدها در دسترس می‌باشد.

در سال‌های اخیر فناوری زیستی با استفاده از روش‌هایی نظیر تجزیه وتحلیل ترنسکریپتوم به کمک تکنیک RNA-Seq قادر است کارایی گیاهان دارویی را در جهت تولید دارو افزایش دهد. شناسایی و دستورزی ژنتیکی آنزیم-های دخیل در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه جهت افزایش میزان آن‌ها و تولید متابولیت‌های جدید می‌تواند زمینه را برای کاربرد چنین تکنیک‌هایی در گیاهان دارویی نیز فراهم نماید. همچنین شناسایی مسیرهای موثر در تولید ترکیبات دارویی گیاهان و افزایش بیان ژن‌های هدف آن‌ها می‌تواند بخش بزرگی از نیاز جامعه بشری در تولید داروهای گیاهی را رفع نماید و سبب تامین سلامت جوامع و افزایش پتانسیل اقتصادی در تولید گیاهان به عنوان یک منبع درآمد مطمئن را فراهم سازد.

مواد و روش‌ها

بذور گونه‌های *Thymus. daenensis* و *Thymus vulgaris* از موسسه جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه و در گلخانه کشت داده شد، سپس برگ‌های جوان در مرحله رشد رویشی جهت استخراج RNA به آزمایشگاه منتقل شدند. RNA کل با استفاده از کیت RNeasy mini kit از شرکتQiagen بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده جداسازی شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با نانودراپ و ژل الکتروفروز سنجیده و در نهایت بعد از تایید کیفیت برای ساخت کتابخانه cDNA و توالی‌یابی ارسال گردید. توالی‌یابی توسط Illumina HiSeq 2000 PAIRED-END 150 bp صورت گرفت. کنترل کیفیت توالی‌ها توسط نرم‌افزارهای FastQC و Trimmomatic انجام شد و طی آن آداپتورها، آغازگرها و توالی-های با کیفیت پایین حذف گردیدسرهم‌بندی توالی‌هابا استفاده از نرم‌افزارهای Trinity و BinPacker برای هر گونه انجام شد، و در نهایت مستندسازی رونوشت‌ها با استفاده از Blastx در برابر داده‌های پایگاه پروتئینی Uniprot صورت گرفت. این مجموعه شامل جستجوی همولوژی به منظور شناسایی ژن‌های کدکننده پروتئین، شناسایی دومین‌ها و

8 - γ-Terpinene
9 - P-cymene
10 - Thymosin
11 - Isotimonin
12 - Luteolin
13 - Mevalonate
14 - 2-C-Methylerythritol 4-phosphate
15 - Pyruvate
16 - Glyceraldehyde 3-phosphate

IrHC2019

مقایسه با دیگر بانک‌های اطلاعاتی به منظور تفسیر عملکردی ژن‌ها است. براساس نتایج حاصل از مستندسازی رونوشت‌ها، ژن‌های دخیل در مسیر سنتز تیمول و کارواکرول شناسایی شده و مسیر کلی سنتز این ترکیبات بر اساس ژن‌های کدکننده ترسیم شد.

نتایج و بحث

تکنولوژی RNA_seq برای هر دو نوع موجودات مدل و غیر مدل استفاده می‌شود، برای موجودات غیر مدل از قبیل آویشن، توالی‌یابی عمیق (Deep sequencing) و به دنبال آن سرهم‌بندی از ابتدا (De novo) و خوشه‌بندی، برای دستیابی به توالی رونوشت مرجع ضروری است. از این رو در این مطالعه داده‌های حاصل از Illumina Hiseq2000 پس از حذف آداپتورها، آغازگرها و توالی‌های بی‌کیفیت با نرم افزارهای Trinity و Binpacker سرهم‌بندی شد که مقایسه جامع نشان داد Binpacker کانتیگ‌های بهتری در طول و N50 ایجاد می‌کند. با استفاده از Binpacker برای گونه‌ی *T. daenensis* و *T. vulgaris* به ترتیب تعداد ٦٦٥٩١ و ٨٨٩٥٣ کانتیگ با متوسط طول ١٠٦٢,٦٨ و ١٠٢٨,٠٣ *bp* به دست آمد. علاوه بر اندازه‌ی کانتیگ‌ها، شاخص N50 به عنوان معیار کیفیت همگذاری برای هر گونه محاسبه گردید.که این شاخص برای هر گونه بر اساس جدول (١) می‌باشد.

اطلاعات مربوط به اسمبلی حاصل از برنامه‌ی Binpacker با K-merبه طول ٢٥bp طبق جدول زیر می‌باشد:

«جدول «١» گزارشی از ترنسکریپتوم آویشن»

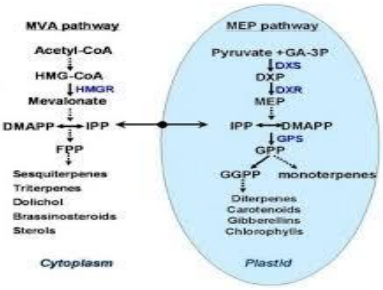
	T. vulgaris	*T. daenensis*
Total size (Mp)	94.52	68.45
Number of contigs	88953	66591
Maximum lenght (bp)	17174	14373
Minimum lenght (bp)	200	200
Average lenght (bp)	1062.68	1028.03
N50 (bp)	1603	1553

جهت تفسیر کانتینگ‌ها، جستجو شباهت با استفاده از Blastx در مقابل پایگاه پروتئینیUniprot صورت گرفت، ٦٥ درصد از کل کانتیگ‌های شناسایی شده دارای شباهت معنی‌داری با پروتئین‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی بودند. به علت فقدان اطلاعات در مورد ژنوم *Thymus* نزدیک به 35 درصد از کانتیگ‌ها هیچ جورشدگی با پایگاه اطلاعاتی نشان ندادند.

با مطالعه منابع و اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی، آنزیم‌های مختلف دخیل در سنتز ترپنوئیدها شناسایی شدند(شکل١) و یونی ژن‌های به دست آمده برای شناسایی این آنزیم‌ها بررسی شدند بررسی انتولوژی ژن نشان داد که ژن‌های مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها در فرآیندهای مولکولی، بیولوژیکی (فرآیندهای متابولیکی، رشد سلولی و...) و ترکیبات سلولی (برهم کنش سلولی) و ... درگیر هستند. در نهایت ١٠ ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز کلروپلاستی ترئنوئیدها شناسایی گردید.(جدول٢) استفاده از پتانسیل این ژن‌ها در بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه پیشنهاد می‌گردد.

«شکل «١»: مسیر بیوسنتزی ترپنوئید»

IrHC2019



جدول «۱» ناحیه کد کننده ژن‌های مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها

	Length ORF		Lengh Contig	
name	*T. daenensis*	*T. vulgaris*	*T. daenensis*	*T. vulgaris*
DXR	۱۴۰۷	۱۴۰۷	۲۹۵۶	۶۲۲۵
DXS	۲۰۳۵	۲۰۳۵	۲۵۰۷	۳۳۸۰
ISPD	۹۱۰	۹۱۰	۱۲۶۳	۱۶۵۹
ISPE	۱۱۸۷	۱۱۸۷	۱۳۶۲	۱۴۸۹
ISPF	۹۰۴	۹۰۴	۹۷۲	۹۶۵
ISPG	2229	۲۲۲۹	۲۵۸۲	۲۷۳۵
ISPH	1389	۱۳۸۹	۲۱۱۶	۱۸۹۱
IDI	۷۲۲	۷۲۲	۱۰۹۲	۱۳۶۱
GGTP	۱۰۴۹	۱۰۴۹	۱۱۷۷	۱۴۸۸
GTP	1052	1052	1872	1465

در مسیر کلروپلاستی بیوسنتز ترپنوئیدها ژن DXR به عنوان یک نقطه کنترلی مهم عمل می‌کند، زیرا فعالیت این آنزیم اولین مرحله اصلی و متمایزکننده مسیر MEP از مسیر موالونات می‌باشد. در پایان این مسیر بیوسنتزی، ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) و دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) به وجود می‌آیند، این دو ماده قابلیت تبدیل به یکدیگر را دارند. در ادامه با ترکیب شدن این دو ماده و تحت تأثیر ژرانیل تری فسفات سنتاز (GTPS)، ژرانیل تری فسفات (GTP) پیش‌ماده ساخت مونوترپن‌ها تولید می‌شود. این ماده تحت تاثیر آنزیم‌های مونوترپن سنتازها به مونوترپن‌های مختلف تبدیل می‌شود(Banerjee *et al.*, 2014) .

در بین ژن‌های این مسیر بعضی از ژن‌ها همانند DXS، IDI و ژن کلیدی GTP چندین ایزوفرم از آن شناسایی شد. پیشنهاد می‌گردد بر روی این ژن‌ها مطالعات دقیق‌تری برای درک بیوسنتز مونوترپن‌ها صورت گیرد.

منابع

جمزاد، ز .۱۳۸۸ . آویشن ها و مرزه های ایران .موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور،کرج.

کریمی، آ.، قاسمی پیربلوطی، ع .ا.، ملکپور، ف.، یوسفی، م .و گلپرور ۱۳۸۹.بررسی تنوع اکوتیپی وشیمیوتیپی آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) در استان های اصفهان و چهارمحال و بختیاری.فصلنامه داروهای گیاهی : 3 – 10

Behnia, M., Haghighi, A., Komeylizadeh, H., Tabaei, S. J. S. and Abadi, A. 2008. Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on *in vitro* growth of *Entamoeba histolytica*. Korean J. Parasitol. 46: 153–156. doi: 10.3347/kjp.2008.46.3.153.

Boubaker, H., Karim, H., El Hamdaoui, A., Msanda, F., Leach, D., Bombarda, I., Vanloot, P., Abbad, A., Boudyach, E. H. and Ait Ben Aoumar, A. 2016. Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. Ind. Crops Prod. 86: 95–101. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.03.036.

Davis, E. M. and Croteau, R. 2000. *Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes*. In: *Topics in Current Chemistry*. Springer. berlin. Heidelborg.

IrHC2019

Hardman, R., Stahl-biskup, E. and Sáez, F. 2002. *Thyme the genus Thymus.* 1st Editio. CRC press book. londo

Mahmoudi, M., Morteza-Semnani, K. and Mojra, E. 2008. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Thymus pubescens* extract. Fitoterapia 79: 361–365. doi: 10.1016/j.fitote.2008.04.004.

Thompson, J. D., Manicacci, D. and Tarayre, M. 2018. Thirty-five years of *Thymes*: a tale of two polymorphisms why so many females? why so many chemotypes?. Bioscience 48: 805–815.

(Banerjee A., Sharkey T.D. Methylerythritol 4- phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Natural Product Reports* 2014; 31.8: 1043-55.

RNA-Seq A Tool for Identifying Genes Related to Thymol and Carvacrol Biosynthesis Pathway in *Thymus* Species

Samira Dehghani[1] and Aboozar Soorni[1*]

Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 8415683111, Iran

[*]*Corresponding Author:* soorni@cc.iut.ac.ir

Abstract

Thymus, commonly known as Thyme is a dicotyledon plant belonging to the Lamiaceae family. Invaluable properties of *Thymus* essential oil have made it an important plant in the industrial and pharmaceutical domain. Monoterpenes, including thymol and carvacrol are the main components of essential oil in *Thymus*, which have various exclusive biological activities, such as,antibacterial, antifungal, antitumor, inflammatory and antioxidative. Also, they can act as natural food preservatives. These monoterpenes are synthesized by two independent pathways in plants, including the mevalonate (MVA) pathway in the cytoplasm and endoplasmic reticulum and the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway in the chloroplast. So far, several studies have been conducted on the analysis of essential oils of *Thymus* species in Iran and the world. Despite the importance of the thyme-derived drugs, little information is available on the genome and especially the biosynthesis of terpenoids inthis plant. In the present study, transcriptomic data of *Thymus* was generated by Illumina Hiseq 2000 technique. Contigs related to terpenoid biosynthesis pathways (MEP pathway) were identified by bioinformatics analysis through Blastx against the UniProt protein database. More than 65% of all contigs had at least one homology in database. In this case, the total lengths of the some of the path MEP genes such, DXR (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase) gene, which is responsible for separating MEP pathway from MVA pathway.Thus, we generated a large uniGene dataset which provides an important source for genetic engineering, gene expression analysis, and functional genomic research.

Keywords: *Thymus*, Terpenoids, Transcriptome , Homology Search

IrHC2019