

بررسی ژنوم بیان شده در سلول های غدد برگ گیاه دارویی *Salvia Fruticosa* برای تعیین عناصر مهم ژنومی

زیبا فولادوند*، بهمن فاضلی نسب

پژوهشکده زیست فناوری 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 برگ گیاه *Salvia fruticosa* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: ۱۴۶۵ توالی EST مربوط به کتابخانه ژنوم بیان شده در سلول غدد برگ گیاهان جنس *Salvia* از خانواده نعنائیان 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 کانتینگ و سینگلتن ایجاد شد. با استفاده از جستجوی BlastX، hit های موجود و هم چنین فراوانی و توزیع نشان گرهای EST-SSR با استفاده از SSRTtools مشخص شد. miRNA های مرتبط با توالی های مورد نظر با استفاده از مدل سازی و جستجو در گیاه آراییدوپسیس مشخص شدند.

یافته ها: تعداد ۱۵۳ کانتینگ و ۷۷۷ سینگلتن 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 ۴۰ عدد miRNA 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 خانواده 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 برگ، گیاه دارویی

مقدمه

خانواده نعنائیان (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 خانواده 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

نویسنده مسئول:

پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی و پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

پست الکترونیکی: Zibafooladvand83@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۷/۰۴

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۰۷

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 خانواده نعنائیان است. جنس مریم گلی 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 نعنائیان، به فراوانی یافت می شود. (۲۸) گیاه *Salvia fruticosa*، مریم گلی یونانی، متعلق به خانواده نعنائیان که به دلیل خواص درمانی از زمان های قدیم

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 شکل ها و ترکیبات ترشحات 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 توسعه 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 *S.fruticosa* است، چند صد miRNA در گیاهان با استفاده از روش های آزمایشگاهی و کامپیوتری تعیین شده اند اما تا کنون برای *S.fruticosa* 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 فتومورفوزن، پاسخ به هورمون های گیاهی از جمله جیبرلیک اسید، جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید، آبسزیک 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:

۱-۲: 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 ارگانی (میتوکندری و کلروپلاستی) و سر هم بندی نمودن توالی های به دست آمده با استفاده از سرویس آنالین Egassembler:

توالی ها به منظور شناسایی آلودگی های وکتوری و بررسی طول و کیفیت شان با استفاده از سرویس بیوانفورماتیک Egassembler (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 Egassembler (www.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 (کانتینگ ها و سینگلتن ها) و با در نظر گرفتن حداکثر E-Value در مقابل بانک توالی های NCBI انجام گردید. از طرفی نتایج بلاست X

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 برگ *Salvia*.

از طرف دیگر جستجوی بلاست یکس 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)	
		hit بدون	hit دارای
سینگلتون		۴۱۰	۳۶۷
کانتینگ		۴۳	۱۱۰
کل		۴۵۳	۴۷۷

جدول ۳ - نتایج بلاست X توالی های کانتینگ و سینگلتون در مقابل بانک

داده های nr.

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

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

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

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

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

۶-۲: 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 کانتینگ 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:

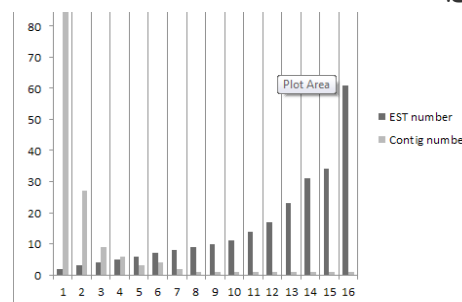
بر اساس آنالیز صورت گرفته بر روی توالی های EST جداسازی شده از غدد برگ جنس *Salvia* در خانواده نعنائیان، نتایج موجود در جدول (۱) حاصل شد که بر اساس آن از تعداد کل EST (۱۴۶۵)، تعداد ۱۵۳ کانتینگ و ۷۷۷ سینگلتون و در مجموع ۹۳۰ unigene معرفی شد.

تعداد کل توالی های EST	تعداد کانتینگ	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 برگ *Salvia fruticosa*

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



نمودار ۱ - توزیع کانتینگ ها بر اساس تعداد توالی های EST تشکیل

دهنده هر کانتینگ.

از طرف دیگر بر اساس تجزیه و تحلیل عناصر ژنومی که با استفاده از سرویس آنالیز Egassembler انجام شد نتایج موجود

نام پروتين	نام ژن	فرايندهاى بيولوژيك كه محصول ژن مورد نظر در آن تأثير دارد
NADH dehydrogenase	NAD	متابوليسم عمومى 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	نقل و انتقال سلولى
Non-specific lipid-transfer	LTP	
YSL transporter	YSL	
Thionin	Thionin	
Ferredoxin	Ferredoxin	
Tissue-type plasminogen activator	PLAT	
Luminal-binding protein	HSC70	
S-adenosylmethionine synthase	MAT2A	متابوليسم اختصاصى اسيدامينها
Spermine synthase	SMS	
Probable phyto kinase 1		بيوسنتز ويتامين E
Chalcone--flavonone isomerase 1	CHI1	بيوسنتز فلاونويدها
Copalyl diphosphate synthase		بيوسنتز دي ترپنوئيدها
pulegone reductase		بيوسنتز مونوترپنوئيدها
membrane steroid-binding	MSBP1	رشد سلولى
UDP-D-apirose/UDP-D-xylose synthase 1	AXS1	توسعه ديواره سلولى
calreticulin	CRP55	سيگنالينگ سلولى
nucleoside diphosphate kinase	NME1	دفاع سلولى
heat shock	HSC-2	پاسخ به تنش هاى غير زيستى
pathogenesis-related protein	PR	پاسخ به تنش هاى زيستى

جدول ۴ - نتيجه تعيين عملکرد بعضى از ژن هاى مهم بيان شده در غدد

برگى كه در فهرست كانتيگ ها موجود مى باشند.

و در نهايت براى تعدادى از ژن هاى مهم معرفى شده در بلاست x انجام شده در مقابل پاىگاه داده هاى nr شبكه ژنى موجود در شكل (۱) شد. در گروه كاركردى متابوليسم ثانويه كه در گياهان خانواده به عنوان تركيب هاى با ارزش دارويى در آن ها محسوب مى شوند، چندين ژن مهم و با بيان بالا در گروه كانتيگ هاى معرفى شده وجود دارد. Chalcone flavonone isomerase ۱, Copalyl diphosphate synthase pulegone reductase كه از آنزيم هاى مهم در مسير بيوسنتز متابوليت هاى ثانويه مثل

مهم معرفى شده در جدول (۴) معرفى شدند (بخشى از داده ها نشان داده شده است). توالى هاى unigene به دست آمده در چندين گروه پروتين هاى كاركردى قابل تقسيم بندى بودند: گروه اول، مرتبط با بيوسنتز ترپنوئيدها، فلاونويدها و برخى ويتامين ها مثل ويتامين E هستند كه داراى بيان بالايى در غدد برگى هستند، اين ژن هاى مرتبط با سنتز متابوليت هاى ثانويه در غدد سلولى با توجه به نقششان بعضى از آن ها در غشاي لوكوپلاستى و برخى ديگر نيز در غشاي صاف قرار دارند. بعضى از آن ها در ميتوكندرى و بعضى ديگر در سيتوزول قرار دارند كه نشان دهنده توليد و تسهيم مواد در سطح تك سلولى و در قسمت هاى مختلف آن است؛ بنابراين قسمت هاى مختلف و متمايز يك سلول نقش هاى خاصى را براى توليدات متابوليت هاى ثانويه در غدد برگى بر عهده دار باشند.

گروه دوم، گروه پروتين هاى انتقال دهنده بودند كه تعداد از آن ها توالى هاى EST ناقل هاى مواد ليپيدى هستند، نقل و انتقال مواد به خصوص مواد ليپوفيليك را كه از اجزاى اصلى روغن هاى توليد شده هستند، بر عهده دارند.

گروه سوم، ژن هاى مرتبط با رشد سلولى و تشكيل ديواره سلولى بودند كه با توجه به نقش غدد برگى در ذخيره سازى مواد توليد شده دور از انتظار به نظر نمى رسد.

گروه چهارم، از طرفى ژن هاى مرتبط با متابوليت هاى اوليه سلولى در مسيرهاى گليكوليز، پنتوز فسفات و فسفويلاسيون اكسيداتيوى نيز با فراوانى بالايى در اين سلول ها وجود دارند.

گروه پنجم به عنوان گروه آخر ژن هاىي بودند كه در عملكردهاى سلولى از جمله پيام رسانى داخل سلولى و هم چنين دفاع در برابر عوامل پاتوژنى نقش داشتند كه لازمه داشتن يك دفاع سلولى مناسب در برابر تنش ها وجود مسير سيگنالينگى است كه پيام ها را به موقع و در زمان مناسب به هسته سلول برساند و از طرفى چون به طور معمول گياهان دارويى در شرايط محيطى تنش، ميزان متابوليت هاى ثانويه بيش ترى را توليد مى كنند شايد بيان اين ژن ها به عنوان پيام رسانان سلولى به عنوان يكى از مراحل اوليه براى توليد اين مواد مؤثر در گياه باشد.

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 سینگلتن هستند، ژن های مهمی miRNA مرتبط با آن ها شناسایی شد که مرتبط با فرآیندهای متابولیسم اولیه و ثانویه سلولی هستند. شامل فرآیندهایی از قبیل ترجمه 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، فعال کننده 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 خانواده نعنائیان هستند.

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

فلاونوئیدها و دی ترپنوئیدها می باشند. از آنجایی که 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.

مارکرهای EST-SSRs تشخیص داده شده در ژنوم بیان شده در گیاه دارویی *S. fruticosa*:

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 *S. fruticosa* 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 می شوند.

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، پروتئین های 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 ژن های 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 تولیدکننده متابولیت های مهم گیاهی به کار گرفته شوند(جدول ۵).

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 2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)	اگزوزوم های خارج سلولی	GACGAGAGAGAGAAGACAGU
۱۸	aldose 1-epimerase	اکسیدردوکتاز	AGAAGUGUUUAGAAUUGAAU
۱۹	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERL1	متابولیسم قندها	UUGGGUUAGAGAUGAAGUCA
۲۰	g-thionin	سرین / ترئونین کیناز	CUGCUACUACUUCUACU
۲۱	eukaryotic translation initiation factor 5A-2	پروتئین کوچک تولید کننده مواد سمی برای جانوران	AAGAAGUGUUUAG-AAUUGAAU
۲۲	signal cointegrator 1 complex subunit 3	فرآیند ترجمه سلولی	UUUAAUACAGAAAGGACGGU
۲۳	expansin	آسیب DNA، ترمیم DNA، رونویسی و تنظیم آن	AUGCUUUAGAUGUUAAAGUU
۲۴	thioredoxin-dependent peroxidase	دخیل در شکل گیری دیواره سلولی	AUGGUGGCGAUGACGAUGGU
۲۵	glycogen synthase kinase (GSK1) gene	فعالیت پراکسیدازی	UUAAAGUUCGUGAAGUUAAGUU
۲۶	translationally controlled tumor protein (TCTP)	ریتیم های بیولوژیکی، متابولیسم قندها، تمایز	CACGUUCUUCUUCUUCUUU
۲۷	monoterpene synthase 3 (MTS3)	دخیل در اتصال کلسیم و پایداری میکروتوبول ها	GUUGUUUUUGAAGCAGGGGUU
۲۸	cobalamine-independent methionine synthase	دخیل در فعالیت آنزیم ترین سنتاز	AUGCUUUAGAUGUUAAAGUU
۲۹	40S ribosomal protein S16	بیوسنتز متیونین	UUUUGAUGUUAAAGAAGGUAU
۳۰	strigolactone esterase D14	فرآیند ترجمه سلولی	AUUUAGAUAGUAGAAGAAGGU
۳۱	MIF family protein geneisomerase activity	دخیل در ایجاد ارتباط همزیستی با قارچ	AGAAUUAUACUAGUGGGGU
۳۲		فعالیت ایزومرازی	CUUUGCUUGUUCUUUGACUA

جدول ۶- توالی کل miRNA های مرتبط با کانتینگ ها و سینگلتون ها در

S.fruticosa

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

جدول ۵- کانتینگ ها و موتیف ها و فراوانی تکرار و ژن های مرتبط با

EST-SSRs شناسایی شده.

توالی miRNA	مسیر بیولوژیکی	ژن های هدف برای miRNA
CAUUCUACUUUAGAAAUUAA	جزئی از کمپلکس دخیل در تنظیم رونویسی	WD repeat-containing protein
CUCGUGUUGUA-UCGUCUU	دخیل در دفاع ضد ویروسی	lambda receptor 1 (IFNLR1)
GUGCCACUGGACUCUUGUGU	فرآیند ترجمه سلولی	40S ribosomal protein S3a-like
UAAAGUAGAGUGAAGAGAGU	فرآیند انتقال الکترون	L-ascorbate peroxidase 3
ACUGCUACUACUUCUACU	فرآیند ترجمه سلولی	elongation factor 1-delta
UUCUUUAGUUGUCUCCUUUU	فرآیند ترجمه سلولی	39S ribosomal protein L41
UAUCAUUGGUUGUAUAGUUA	فرآیند ترجمه سلولی	translation initiation factor 5A4
AAUACAGAACAACGAGAGUU	نقش در دفاع سلولی و سنتز پلی آمین ها	spermine synthase
CCUUGUGUUAUCUGCAUUUUU	تنظیم پایداری mRNA	YTH domain-containing family protein
GACGAGAGAGAGAAGACAGU	فرآیند ترجمه سلولی	50S ribosomal protein L21
UCUGUUUUCGACCUUAGUUU	فرآیند ترجمه سلولی	plastid partial rps16 gene for ribosomal protein
GAGGAGGAGGGAUAGGAGUAG	دخیل در واکنش های اکسیدردوکتاز	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
CACGAGAGAAAGAAGACAGU	دخیل در فعالیت آنزیم ترین سنتاز	monoterpene synthase 3 (MTS3)
CGUGCACGGGACGAAGAGGU	اگزوزوم های خارج سلولی	transmembrane protein 205

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 خانواده نعنایان، 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 وسیله 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 این که 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 وسیله 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 خانواده 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.

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

- 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 cagenieins. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington, 1907. 1859-1929.
- 19- Rios-Estépa 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-Estépa 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 Feo V. Essential oil from *Salvia* spp. (*Lamiaceae*), I. Chemical composition of the essential oils from *Salvia glutinosa* L. Growing wild in the Southern Italy. *Essential oil Research*. 1997. 9: 151-157.
- 22- Schillmiller 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*. In Technology, 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 hairs in Aromatic Plants of the *lamiaceae*-Review. *Flavour Fragrance Journal*. 1993. 8: 249-255.
- 30- Werker E, Ravid U, Putievsky E. Glandular hairs and their secretions in the vegetative and reproductive organs of *Salvia sclarea* and *S. damianica*. *Annals Botany*. 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. psRNA Target: A Plant Small RNA Target Analysis Server, *Nucleic Acids Research*. 2011. 20: 14-24.

