

ORIGINAL ARTICLE

Comparative analysis of secondary metabolite clusters synteny in eleven *Oryza* species and three related species

Sahand Sasani¹, Sajad Rashidi Monfared^{1*}(ORCID: [0000000153801387](https://orcid.org/0000000153801387)), Danial Kahrizi¹, Masoumeh Khanahmadi^{2*}

1. Department of Biotechnology,
Faculty of Agriculture, Tarbiat
Modares University, Tehran, Iran.

2. Academic Center for Education,
Culture & Research (ACECR),
Kermanshah, Iran.

Correspondence:

Sajad Rashidi Monfared

Email: rashidims@modares.ac.ir

&

Masoumeh Khanahmadi

Email: chem_khanahmadi@yahoo.com

Received: 30, Jan. 2024

Accepted: 15, Aug. 2024

How to cite:

Sasani, S., Rashidi Monfared, S., Kahrizi, D., & Khanahmadi, M. (2024). Comparative analysis of secondary metabolite clusters Synteny in eleven *Oryza* species and three related species. *Crop Biotechnology*, 14 (1), 123-134.

(DOI: [10.30473/cb.2024.70435.1953](https://doi.org/10.30473/cb.2024.70435.1953))

ABSTRACT

The rice (*Oryza sativa*) is part of the Poacea family and is one of the most important crops in the world. In this project, the presence of synteny in the clusters involved in the biosynthesis of secondary metabolites is known in the rice plant with 11 different species of *Oryza* and 3 related species. Genome sequences of all studied species were received from the NCBI database, and then the genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites, which were located in the specific clusters were retrieved from the planti smash database. All genes were selected to align against 13 other species to identify sequences which similar to rice gene clusters using blastn tools. To map the genes of each species with the genome of the same species, gmap software was used. In the last step, gene blocks with synteny were identified using MCSanX software. According to the results, the existence of synteny in the clusters was proven in *O. rufipogon*, *O. punctata* and *O. sativa* indica species. After identifying the common regulatory factors of gene clusters, it is possible to regulate the expression of all gene clusters simultaneously to produce more content for the final products. On the other hand, due to the Co-inheritance of the genes located in each cluster, it could be possible to transfer desirable gene clusters by producing substitution lines that carry that gene cluster.

KEYWORDS

Gene clusters, Rice, Secondary metabolite pathways, Synteny, Co-regulation, Co-inheritance.



© 2024, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://cropbiotechjournals.pnu.ac.ir/>

«مقاله پژوهشی»

بررسی سینتی خوشه‌های ژنی متابولیت‌های ثانویه در یازده گونه مختلف *Oryza* و سه گونه خویشاوند

سهند ساسانی^۱، سجاد رشیدی منفرد^{۱*} (ارکیده: ۱۵۳۸۰۱۳۸۷-۰۰۰۰۰۰۰۰)، دانیال کهریزی^۱، معصومه خان احمدی^{۲*}

چکیده

گیاه برنج با نام علمی *Oryza sativa* جز خانواده poacea می‌باشد و یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در کل دنیا می‌باشد، در این پروژه وجود سینتی در خوشه‌های ژنی دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه شناخته شده در گیاه برنج با ۱۱ گونه مختلف *Oryza* و ۳ گونه خویشاوند آن بررسی شده است که بدین منظور در این توالی آن‌ها از بانک اطلاعاتی NCBI دریافت شد و در ادامه ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه که به صورت خوشه ژنی قرار داشتند از وبسایت planti smash دریافت شدند، در مرحله بعد ژن‌هایی که از طریق پایگاه داده‌ها برای این پژوهش انتخاب شدند را در تمام ۱۳ گونه دیگر به منظور شناسایی توالی‌های مشابه برنج در سایر گونه دیگر با استفاده از blastn پیدا کرده و توالی این ژن‌ها را از دیتابیس NCBI دریافت شدند. به منظور مپ کردن ژن‌های مربوط به هر گونه با ژنوم همان گونه از نرم افزار gmap استفاده گردید. همچنین بر روی همه ژن‌ها blastn صورت گرفت طوریکه query ژن‌های خوشه‌های ژنی تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه در گیاه برنج و subject ژن‌های معادل در سایر ۱۳ گونه‌ها بودند. در مرحله آخر نیز با استفاده از نرم افزار MCSanX بلوک‌های ژنی دارای سینتی مشخص شدند. با توجه به نتایج بدست آمده وجود سینتی در این خوشه‌های ژنی در گیاهان *O. sativa indica* و *O. punctata*، *O. rufipogon* ثابت شد. می‌توان با شناسایی عوامل تنظیمی مشترک در خوشه‌های ژنی به منظور مهندسی تنظیمی آنها بهره جست یا به دلیل وراثت باهم ژن‌های آن خوشه‌ها، با تولید لاین‌هایی با جایگزین کروموزومی حامل خوشه ژنی به انتقال خوشه‌های ژنی مطلوب مبادرت ورزید.

واژه‌های کلیدی

برنج، بلوک‌های ژنی، سینتی، مسیرهای متابولیکی ثانویه، هم‌تنظیمی، وراثت باهم.

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲. گروه شیمی، موسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی استان کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

نویسنده مسئول:

سجاد رشیدی منفرد

رایانامه: rashidims@modares.ac.ir

و

معصومه خان احمدی

رایانامه: chem_khanahmadi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۵

استناد به این مقاله:

ساسانی، سهند؛ رشیدی منفرد، سجاد؛ کهریزی، دانیال و خان احمدی، معصومه (۱۴۰۳). بررسی سینتی خوشه‌های ژنی متابولیت‌های ثانویه در یازده گونه مختلف *Oryza* و سه گونه خویشاوند. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۱)، ۱۲۳-۱۳۴.
(DOI: 10.30473/cb.2024.70435.1953)

مقدمه

گیاه برنج با نام علمی *Oryza sativa* یکی از اصلی ترین گیاهان زراعی است که تقریباً بیش از ۵۰۰۰ سال توسط انسان‌ها مصرف می‌شود و یکی از غذای های اصلی مردم در کل دنیا و بویژه قاره آسیا محسوب می‌شود که به‌طور گسترده‌ای در رژیم غذایی مردم دنیا از آن برای تامین انرژی و مواد مغذی استفاده می‌شود. به‌طوریکه که بیش از نصف جمعیت جهان در حال حاضر از برنج در وعده‌های غذایی خود استفاده می‌کنند (Zhou et al., 2002). جنس *Oryza* جز خانواده *poacea* می‌باشد که دارای ۲۴ گونه مختلف است. گونه‌ها در این جنس از لحاظ ژنوم به دو دسته دیپلوئید ($2n=24$) مانند *O. sativa* و تتراپلوئید ($4n=48$) مانند *Oryza coarctata* تقسیم می‌شوند (Duncan and Vaughan, 2003). یکی از معروف‌ترین گونه‌های این جنس گونه *O. sativa* است که دارای زیر گونه‌های مختلفی از جمله *indica* و *japonica* می‌باشد. دو زیرگونه *O. sativa japonica* و *O. sativa indica* اگرچه هردو مربوط به یک گونه هستند و منشاء آن‌ها کشور چین ذکر شده و اندازه ژنوم یکسانی (۳۸۵ Mb) دارند اما به‌طور کلی از لحاظ صفات مورفولوژیکی، زراعی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، عملکرد و مقاومت به آفات و استرس‌های محیطی با یکدیگر تفاوت دارند (Yang, 2014). گونه‌های و خویشاوندان مختلفی برای جنس *Oryza* شناسایی شده‌است که ژنوم آن‌ها اندازه‌های مختلفی را در دامنه ۲۶۶Mb تا ۱۳۴۰Mb دارند. در این بین کوچکترین اندازه ژنوم مربوط به گونه خویشاوند *L. perrieri* است که اندازه ژنوم آن ۲۶۶Mb می‌باشد و مبدا این گونه ماداگاسکار ذکر شده است. همچنین گونه *E. crus-galli* دارای بزرگترین ژنوم در بین گونه‌های خویشاوند برنج است که اندازه ژنوم آن ۱۳۴۰Mb است و مبدا آن آسیای گرمسیری می‌باشد (Guo et al., 2017). از جمله گونه‌های دیگر شناسایی شده می‌توان به *O. longistaminata* اشاره داشت که ژن مقاومت xa21 برای اولین بار از این گونه جداسازی شده است. گونه *O. barthii* نوعی برنج وحشی بومی آفریقایی است و *O. puctata* که نام دیگر آن برنج قرمز نیز می‌باشد به عنوان علوفه مورد

استفاده قرار می‌گیرد (Nayar, 2014; Singh et al., 2018).

متابولیت‌های ثانویه گروهی از ترکیبات آلی هستند که توسط گیاهان، حیوانات، قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شوند که پیش‌ساز این مولکول‌ها متابولیت‌های اولیه هستند، این متابولیت‌ها مستقیماً در رشد، نمو یا تولید مثل ارگانیسم نقش ندارند. در عوض این متابولیت‌ها نقش‌های مختلف و فراوانی از جمله در سازگاری‌های اکولوژیکی نظیر دفاع و سیگنالینگ یا نقش‌های ضدباکتریایی و توکسینی را در گیاهان برعهده دارند. متابولیت‌های ثانویه نیز به دلیل داشتن فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع، مورد توجه صنایع دارویی و کشاورزی هستند. برخی از متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها و ترپنوئیدها برای شکارگرها و گیاهخواران سمی هستند، در حالی که برخی دیگر مانند فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کنند و گیاه را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Teoh, 2016). علاوه بر این، متابولیت‌های ثانویه می‌توانند در ارتباطات درون گونه‌ای و بین گونه‌ای نقش داشته باشند، مانند فرومون‌ها که برای جذب جفت یا دفع رقبای مورد استفاده قرار می‌گیرند. متابولیت‌های ثانویه همچنین می‌توانند در جذب و ذخیره مواد مغذی نقش داشته باشند، مانند تولید آنتوسیانین در گیاهان که به محافظت در برابر اشعه UV و جذب گرده افشان‌ها کمک می‌کنند. از جمله گروه‌های مهم دیگر متابولیت‌های ثانویه می‌توان به آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و پلی کتیدها اشاره کرد (Osbourne, 2010). متابولیت‌های ثانویه کاربردهای زیادی در صنایع دارویی، کشاورزی و بیوتکنولوژی دارند. بسیاری از متابولیت‌های ثانویه دارای فعالیت‌های بیولوژیکی قوی مانند خواص ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد التهابی هستند. به عنوان مثال آلکالوئید وین کریستین تولید شده به وسیله گل ماداگاسکار (*Catharanthus roseus*)، برای درمان سرطان خون استفاده می‌شود، در حالی که آنتی بیوتیک پنی سیلین توسط قارچ *Penicillium chrysogenum* تولید می‌شود. متابولیت‌های ثانویه همچنین در تولید آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌های طبیعی مانند پیرترین و روتونون که توسط

گیاهان تولید می‌شوند و برای کنترل حشرات و کنه‌ها استفاده می‌شوند. علاوه بر این، متابولیت‌های ثانویه در صنایع غذایی و آرایشی کاربرد دارند، به‌طوری‌که از آن‌ها به‌عنوان رنگ‌های طبیعی، طعم دهنده‌ها و عطرها استفاده می‌شود (Wink, 2003). مطالعه خوشه‌های ژنی دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه فرصت ارزشمندی برای دستیابی به این منابع دست‌نخورده در تولید بیومولکول‌های ارزشمندی که در گیاهان تولید می‌شوند را فراهم می‌کند، هدف این پروژه بررسی وجود سینتتی هفت خوشه‌های ژنی دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه بین گیاه برنج و ۱۳ گونه‌های خوشاوند آن می‌باشد که در صورت اثبات وجود سینتتی بین گیاه برنج و خوشاوندان آن در این خوشه‌های ژنی، علاوه بر بهبود چشم انداز تکاملی این گیاه، می‌توان در پروژه‌های آتی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه (پلی‌کتیدها و آلکالوئیدها) ارزشمند حاصل از آن خوشه‌های ژنی در گیاه برنج استفاده نمود.

پیشینه پژوهش

متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی توسط گیاهان تولید می‌شوند که در عملکردهای فیزیولوژیکی و اکولوژیکی آن‌ها از جمله واکنش در برابر استرس‌های زنده و غیر زنده نقش مهمی ایفا می‌کنند، ژن‌های مسئول در بیوسنتز این متابولیت‌ها اغلب برای یک بیان هماهنگ در کنار هم قرار می‌گیرند و در واقع به‌صورت خوشه‌های ژنی قرار دارند که این خوشه‌های ژنی به‌طور معمول در باکتری‌ها و قارچ‌های رشته‌ای مشاهده می‌شوند. مشابه خوشه‌های ژنی پروکاریوتی، در گیاهان نیز خوشه‌های ژنی دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که خوشه‌های ژنی از طریق مضاعف شدن ژن‌ها و وقوع موتاسیون‌هایی که باعث تغییر عملکرد در این ژن‌ها می‌شوند تکامل می‌یابند (Chen et al., 2019). در ارتباط با ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه در ابتدا تصور بر این بود که در گیاهان ژن‌های دخیل در تولید متابولیت‌های ثانویه به‌صورت خوشه‌های ژنی قرار ندارند و خوشه‌های ژنی دخیل در تولید

متابولیت‌های ثانویه تنها در باکتری‌ها و قارچ‌های رشته‌ای دیده می‌شود اما در تحقیقات بعدی وجود این خوشه‌های ژنی در گیاهان نیز تایید شد (Frey et al., 2009)، تا به امروز، بیش از ۲۰ خوشه ژنی حامل ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گونه‌ها و خانواده‌های مختلف گیاهی شناسایی شده‌اند که آنزیم‌هایی مختلفی در مسیر سنتز انواع متابولیت‌های ثانویه مانند ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و اسیدهای هیدروکسامیک حلقوی رمز می‌کنند. اندازه این خوشه‌های ژنی از چند کیلو باز تا چند صد کیلو باز متغیر است و از دو تا بیش از ۲۰ ژن در آن‌ها وجود دارد. مانند خوشه ژنی Avenacin در گیاه *Avena strigose* (جو دیپلوئید) که دارای ۱۰ ژن است و در بیوسنتز نوعی تری ترپنی به‌نام ساپونین نقش دارد که باعث ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن‌های قارچی می‌شود (Elshafie et al., 2023). در تحقیقی که توسط Osbourn et al. (2010) انجام شد، پنج خوشه ژنی در ارتباط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف شناسایی شد. این خوشه‌های ژنی عبارت‌اند از خوشه ژنی دخیل در تولید هیدروکسامیک اسید حلقوی (DIBOA) در ذرت، خوشه‌های ژنی دخیل در بیوسنتز تری‌ترین در جو و اراییدوپسیس (avenacin & thalianol) و خوشه‌های ژنی بیوسنتزکننده دای‌ترین‌ها در برنج (momilactone & phytocassane). در ارتباط با خوشه‌های ژنی شناسایی‌شده دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه در این تحقیق مشخص شد که چهار خوشه ژنی موجود در غلات اشاره‌شده در پاسخ به تنش‌ها تولید می‌شوند و نقش دفاعی در گیاهان حامل دارند (Frey et al., 2009; Osbourn, 2010).

روش‌شناسی پژوهش

در این پروژه از ۱۱ گونه مختلف جنس *Oryza* و ۳ خوشاوند آن استفاده شده، در ابتدا توالی ژنوم هر ۱۱ گونه‌ی مختلف *Oryza* و ۳ خوشاوند آن از بانک اطلاعاتی NCBI^۱ که شامل گونه‌های زیر می‌باشند دریافت شد.

^۱ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

با استفاده از نرم افزار (v2.31.0) bedtools^۲ تبدیل شد و در ادامه با استفاده از برنامه MCScanX(v3.3.2) به منظور بررسی سینتینی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا با استفاده از برنامه blastn عملیات هم‌ردیفی همه ژن‌ها در همه گونه‌های مورد مطالعه انجام شد. به‌طوری‌که در ایم هم‌ردیفی query ژن‌های خوشه‌های ژنی تولید کننده متابولیت‌های ثانویه در گیاه برنج و subject ژن‌های معادل در سایر ۱۳ گونه بودند. نرم افزار MCScanX به دو فایل ورودی برای بررسی وجود سینتینی نیاز دارد که عبارت‌اند از یک فایل bed و فایل نتیجه هم‌ردیفی با استفاده از برنامه blastn می‌باشد. در آخر با استفاده از نرم افزار MCScanX بلوک‌های ژنی دارای سینتینی مشخص شدند (Wang et al., 2012). همچنین به‌منظور ترسیم نمودار نتایج به‌دست آمده از نرم افزار Accusyn (v2020.1)^۳ استفاده شد.

جدول ۲. خوشه‌های ژنی ژن‌های دخیل در تولید

متابولیت‌های ثانویه

متابولیت تولیدی	تعداد ژن‌ها	شماره خوشه ژنی
لیگنین- پلی کتید	۵	۳
ساکارید	۵	۶
ساکارید-پلی کتید	۶	۱۰
ساکارید-آلکالوئید	۱۰	۱۷
پلی کتید	۵	۳۵
لیگنین	۵	۴۵
ساکارید	۵	۴۶

یافته‌های پژوهش

شکل شماتیک به‌دست آمده نتایج نرم افزار MCScanX را توسط نرم‌افزار Accusyn در تصویر ۱ مشاهده می‌کنید که در این گراف هر بلوک نمایانگر یک کروموزوم در یک گونه خاص می‌باشد، کد هر بلوک نشان دهنده کروموزوم و گونه می‌باشد (جدول ۳) و هر کدام از خطوطی که این بلوک‌ها را یکدیگر متصل می‌کنند نشان‌دهنده وجود سینتینی میان این بلوک‌ها می‌باشند.

در جدول ۱ اسامی گونه‌ها، اندازه ژنوم و تعداد کروموزوم‌های آن‌ها آمده‌است.

جدول ۱. اسامی گونه‌های مورد استفاده، اندازه ژنوم و تعداد

کروموزوم‌های هر گونه

گونه	اندازه ژنوم	تعداد کروموزوم
<i>Oryza nivara</i>	448Mb	2n=24
<i>Oryza rufipogon</i>	386Mb	2n=24
<i>Oryza brachyanth</i>	362Mb	2n=24
<i>Oryza punctate</i>	423Mb	2n=24
<i>Oryza glumipatula</i>	464Mb	2n=24
<i>Oryza meridionalis</i>	435Mb	2n=24
<i>Oryza barthii</i>	411Mb	2n=24
<i>Oryza longistaminata</i>	340Mb	2n=24
<i>Oryza glaberrima</i>	358Mb	2n=24
<i>Oryza sativa japonica</i>	385Mb	2n=24
<i>Oryza sativa indica</i>	385Mb	2n=24
<i>Zizania latifolia</i>	603Mb	2n=34
<i>Echinochloa crus-galli</i>	1,340Mb	2n=54
<i>Leersia perrieri</i>	266Mb	2n=24

در ادامه ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه که به‌صورت خوشه ژنی قرار داشتند از وب سایت planti smash^۱ دریافت شدند، در میان تعداد خوشه‌های ژنی که در این وب سایت برای *O. sativa* یافت می‌شدند، تنها خوشه‌های ژنی با بیش از ۵ cds انتخاب و در مراحل بعدی از نظر وجود سینتینی بررسی شدند. لیست خوشه‌های ژنی مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ آورده شده‌است. در مرحله بعد ژن‌هایی که از طریق پایگاه برای این پژوهش انتخاب شدند را در تمام ۱۳ گونه دیگر به‌منظور شناسایی توالی‌های مشابه برنج در سایر گونه‌های دیگر با استفاده از (v2.13.0) blastn شناسایی و توالی این ژن‌ها را از پایگاه NCBI دریافت شدند. خروجی این مرحله ۱۳ فایل مختلف می‌باشد (برای هر گونه یک فایل). در ادامه به‌منظور مکان‌یابی ژن‌های مربوط به هر گونه با ژنوم همان گونه (در واقع هم‌ردیف کردن ژن‌ها با ژنوم آن گونه و مشخص شدن مکان آن‌ها بر روی کروموزوم‌ها) از نرم افزار gmap2022.08.25 استفاده گردید که خروجی این نرم افزار به فرمت GFF3 می‌باشد. در ادامه فایل‌های خروجی مرحله قبل با یکدیگر ادغام شدند و پس از ادغام، فرمت GFF3 به فرمت bed

^۲ <https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/>

^۳ <https://accusyn.usask.ca/>

^۱ <http://plantismash.secondarymetabolites.org/>

مشاهده نشد. از آنجایی که موضوع این پژوهش گیاه برنج می باشد در ادامه بطور تنها کروموزوم‌های ۱، ۴ و ۱۲ *O. sativa japonica* به‌طور کامل بررسی شدند.

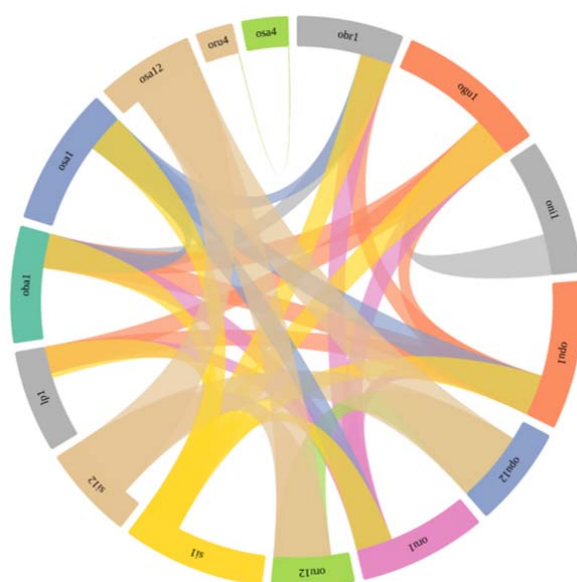
بررسی سینتینی ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کروموزوم شماره ۱ *O. sativa japonica*

با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد که کروموزوم شماره ۱ *O. sativa japonica* سینتینی با پنج گونه دیگر *Oryza* دیده می‌شود که این گونه‌ها عبارت اند از *O. punctata*، *O. sativa indica*، *O. rufipogon* (شکل ۲) و سینتینی برای این خوشه‌های ژنی متابولیتی در هشت گونه دیگر مشاهده نشد. خروجی نرم افزار MCScanX برای این کروموزوم نیز در شکل ۳ آمده‌است.

جدول ۳. کدهای اختصاری مربوط به هر گونه

کد	گونه
si	<i>O. sativa japonica</i>
obr	<i>O. brachyantha</i>
oru	<i>O. rufipogon</i>
oni	<i>O. nivara</i>
opu	<i>O. punctata</i>
osa	<i>O. sativa indica</i>
lp	<i>L. perrieri</i>
oba	<i>O. barthii</i>
ob	<i>O. brachyantha</i>
ogu	<i>O. glumipatula</i>

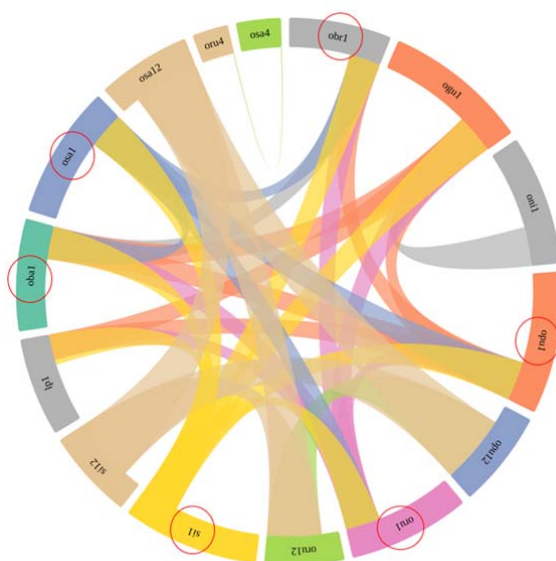
با توجه به نتایج و بررسی‌های اولیه مشخص شد که خوشه‌های ژنی دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه، عمدتاً روی کروموزوم‌های شماره ۱، ۴ و ۱۲ قرار دارند. همچنین در بین گونه‌های *O. meridionalis*، *O. longistaminata*، *E. crus-galli*، *latifolia* و *O. glaberrima* برای خوشه‌های ژنی مورد مطالعه سینتینی



شکل ۱. خروجی بدست آمده از نتایج نرم افزار MCScanX توسط نرم افزار Accusyn

Duplication depth	Reference chromosome	Collinear blocks
5	BAS73030.1	OPUNC01G21920.1 ORUFI01G24500.1 OsaR498G0101479800.01.T01 OB01G31350.1 OBART01G21780.1
5	BAS73034.1	OPUNC01G22040.1 ORUFI01G24550.1 OsaR498G0101482200.01.T01 OB01G31360.1 OBART01G21840.1
5	BAS73034.13	
5	BAS73036.1	
5	BAS73039.1	OPUNC01G22090.1 ORUFI01G24600.1 OsaR498G0101482200.01.T02 OB01G31370.1 OBART01G21890.1
5	BAS74819.1	OPUNC01G33260.1 ORUFI01G37590.1 OsaR498G0101485500.01.T01 OB01G43100.1 OBART01G21840.1
5	BAS74821.1	
5	BAS74823.1	ORUFI01G37640.1
5	BAS74828.1	OPUNC01G33340.1 ORUFI01G37660.1 OsaR498G0102166500.01.T01 OB01G43210.1 OBART01G34320.1
5	BAS74829.1	OPUNC01G33350.1 ORUFI01G37690.1 OsaR498G0102167000.01.T01 OB01G43230.1 OBART01G34330.1

شکل ۲. خروجی نرم افزار MCScanX برای کروموزوم شماره ۱ *O. sativa japonica*



شکل ۳. کلاسترهای قرار گرفته بر روی کروموزم شماره ۱ *O. sativa japonica*

کروموزوم شماره چهار قرار دارد و در تولید ساکارید-آلکالوئید نقش دارد. خروجی نرم افزار MCSanX برای این کروموزوم در شکل ۶ نمایش داده شده است. بلوک های ژنی در این بخش نیز بر اساس کد مربوط مشخص می شوند، در واقع حروف انگلیسی تعیین کننده گونه بوده و عدد نشان دهنده شماره کروموزوم می باشد، در جدول ۵ این حروف مشخص شده اند. همچنین عملکردهای ژن هایی که بر روی این کروموزوم قرار دارند نیز در جدول ۷ آمده است.

بررسی سینتنی ژن‌های دخیل در بیوسنتز
متابولیت‌های ثانویه در کروموزوم شماره ۱۲ *O. sativa*
japonica

در مورد خوشه‌های ژنی که روی کروموزوم شماره ۱۲ در *O. sativa japonica* قرار دارند، مشخص شد که این خوشه‌های ژنی با سه گونه دیگر *Oryza* دارند که شامل *O. punctate*، *O. rufipogon* و *O. sativa indica* می‌باشند. اما با ۱۰ گونه دیگر برای آن‌ها سیتمنی مشاهده نشد. خوشه‌های ژنی شماره ۴۵ و ۴۶ روی این کروموزوم قرار دارند که به‌ترتیب در سنتز پلی کتیدها و ساکاریدها نقش دارند (شکل ۷). خروجی نرم افزار MCScanX برای این کروموزوم در

جدول ۴. کدهای اختصاری هر گونه

گونه	کد
<i>O. sativa japonica</i>	BAS
<i>O. punctate</i>	OPUNC
<i>O. rufipogon</i>	ORUF
<i>O. sativa indica</i>	OsR
<i>O. brachyantha</i>	OB
<i>O. barthii</i>	OBAR

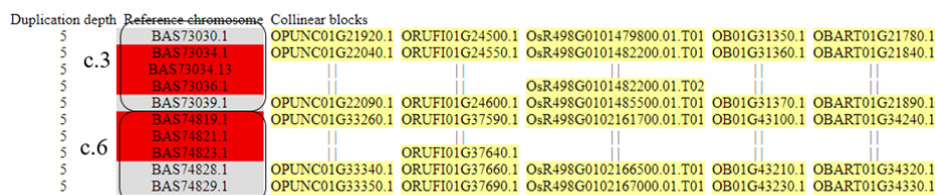
با توجه به بررسی‌های انجام شده مشخص شد که خوشه‌های ژنی شماره ۳ و ۶ روی کروموزوم شماره ۱ قرار دارند (شکل ۴). خوشه ژنی شماره ۳ در تولید لیگنین-پلی‌کتید و خوشه ژنی شماره ۶ در تولید ساکارید نقش دارد. همچنین عملکردهای ژن‌هایی که در این خوشه روی کروموزوم شماره ۱ قرار دارند، نیز در جدول ۵ آورده شده‌است.

بررسی سینتتی ژن‌های دخیل در بیوسنتز
متابولیت‌های ثانویه در کروموزوم شماره ۴ *O. sativa*
japonica

باتوجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که ژن های موجود در این کروموزوم تنها با گونه *O. rufipogon* سینتی دارند و در سایر ۱۲ گونه سینتی مشاهده نشد (شکل ۵). همچنین خوشه ژنی شماره ۱۷ تولید متابولیت های ثانویه روی

شکل ۸ آمده‌است. بلوک‌های ژنی در این بخش نیز بر اساس شناسه موردنظر قابل تفکیک هستند، در واقع حروف انگلیسی بیانگر گونه بوده و عدد آن نشان

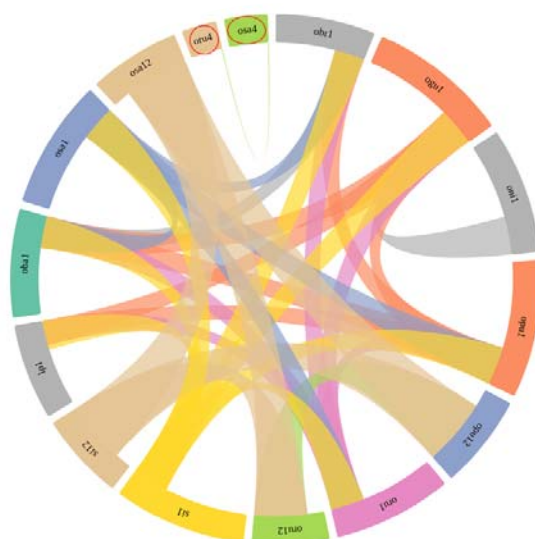
دهنده شماره کروموزوم، در جدول ۸ این حروف آمده‌است. همچنین عملکرد ژن‌هایی که روی این کروموزوم قرار دارند نیز در جدول ۹ آورده شده‌است.



شکل ۱. گونه‌های دارای سیتنتی با کروموزوم شماره ۱ *O. sativa japonica*

جدول ۵. عملکرد ژن‌های قرار گرفته بر روی کروموزوم شماره ۱ *O. sativa japonica*

ژن	عملکرد
BAS73030.1	receptor-like protein EIX2
BAS73034.1	cytochrome P450 72A15
BAS73034.13	cytochrome P450 72A15
BAS73036.1	cytochrome P450 (CYP72C)-like
BAS73039.1	inactive protein kinase SELMODRAFT_444075
BAS74819.1	cytochrome P450 94B3
BAS74821.1	cytochrome P450 94B3
BAS74823.1	cytochrome P450 94B3-like
BAS74828.1	UDP-glycosyltransferase 87A1
BAS74829.1	cyclin-B1-1 isoform X2



شکل ۴. گونه‌های دارای سیتنتی با کروموزوم شماره ۵ *O. sativa japonica*

جدول ۶. کدهای اختصاری گونه‌ها

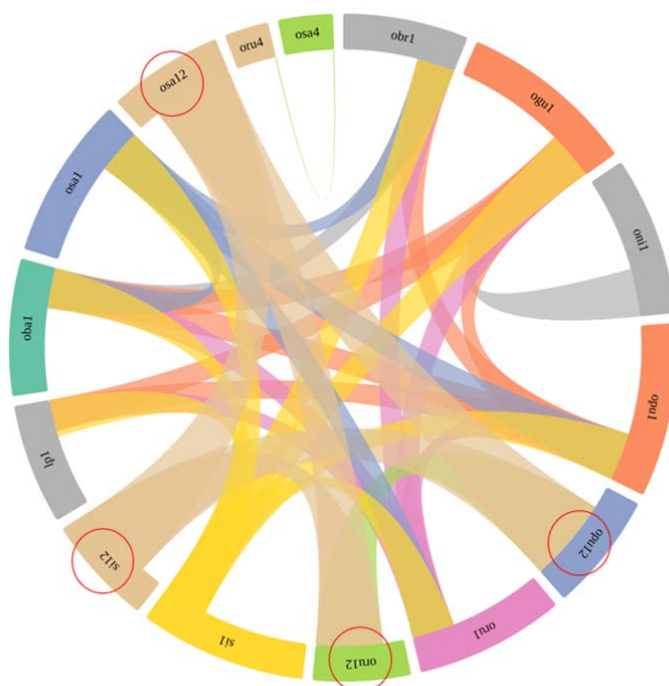
کد	گونه
BAS	<i>O. sativa japonica</i>
ORUF	<i>O. rufipogon</i>

Duplication depth	Reference chromosome	Collinear blocks
0	BAS88313.1	
1	BAS88316.1	ORUF104G06600.1
1	BAS88317.1	
1	BAS88326.1	ORUF104G06670.1
1	BAS88330.1	ORUF104G06730.1
1	BAS88332.1	ORUF104G06750.1
1	BAS88333.1	
1	BAS88338.1	ORUF104G06810.1
1	BAS88341.1	
1	BAS88343.1	ORUF104G06860.1

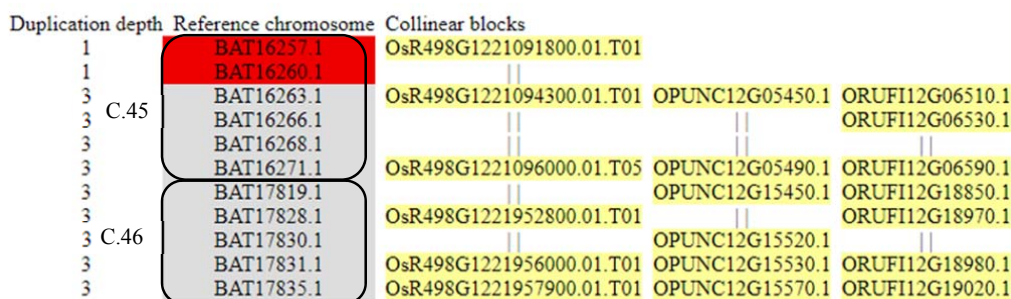
شکل ۵. کلاسترهای قرار گرفته بر روی کروموزم شماره ۴ *O. sativa japonica*

جدول ۷. عملکرد ژن‌های قرار گرفته بر روی کروموزم شماره ۴ *O. sativa japonica*

ژن	عملکرد
BAS88313.1	tropinone reductase homolog At2g29360
BAS88316.1	primary amine oxidase-like
BAS88317.1	primary amine oxidase-like
BAS88326.1	UDP-glycosyltransferase 92A1
BAS88330.1	UDP-glycosyltransferase 92A1 isoform X1
BAS88332.1	Os04g0271800
BAS88333.1	UDP-glycosyltransferase 92A1-like
BAS88338.1	UDP-glycosyltransferase 92A1
BAS88341.1	UDP-glycosyltransferase 92A1-like
BAS88343.1	hypothetical protein



شکل ۷. گونه‌های دارای سینتینی با کروموزوم شماره ۱۲ *O. sativa japonica*



شکل ۸. کلاسترهای قرار گرفته بر روی کروموزم شماره ۱۲ *O. sativa japonica*

جدول ۸. کدهای اختصاری گونه‌ها

کد	گونه
BAT	<i>O. sativa japonica</i>
OPUNC	<i>O. punctate</i>
OsR	<i>O. sativa indica</i>
ORUF	<i>O. rufipogon</i>

جدول ۹. عملکرد ژن‌های قرار گرفته بر روی کروموزم شماره ۱۲ *O. sativa japonica*

ژن	عملکرد
BAT16257.1	mannose/glucose-specific lectin
BAT16260.1	mannose/glucose-specific lectin
BAT16263.1	3-aminomethylindole N-methyltransferase-like
BAT16266.1	cytochrome P450 76M5-like
BAT16268.1	3-aminomethylindole N-methyltransferase
BAT16271.1	putative methyltransferase Atlg22800, mitochondrial
BAT17819.1	serine carboxypeptidase-like 3
BAT17828.1	cytochrome P450 81D1
BAT17830.1	Cytochrome P450 family protein, expressed
BAT17831.1	uncharacterized protein
BAT17835.1	aspartic proteinase nepenthesin-1

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

متابولیت‌های ثانویه موادی هستند که توسط میکروب‌ها و گیاهان تولید می‌شود و از این مواد برای رقابت با سایر ارگانیسم‌ها در محیط زندگیشان استفاده می‌کنند، این دسته از مواد تأثیرات مختلفی بر روی گیاه تولیدکننده و سایر موجودات زنده دارند. میکروب‌ها و گیاهان طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که نقش‌های متفاوت و گسترده‌ای بیولوژیکی مانند تحریک گلدی، تشکیل میوه، ریزش برگ‌ها، سیگنالینگ، جذب حشرات به منظور گرده افشانی، رقابت با سایر گیاهان بر سر منابع و نقش‌های دفاعی را بر عهده دارند (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). لازم به ذکر است که انسان‌ها نیز از متابولیت‌های ثانویه به عنوان

دارو، طعم دهنده‌های غذایی، آفت کش‌ها و مواد مخدر نیز بهره می‌گیرند، به‌عنوان مثال استفاده از متابولیت‌های ثانویه در صنعت دارو از مدت‌ها پیش شروع شده و از این متابولیت‌ها در نقش‌های مختلفی از جمله به‌عنوان آنتی بیوتیک‌ها، داروهای ضدسرطانی و ضدعفونی کننده‌ها استفاده می‌شود (Teoh, 2016). تاکنون بیش از ۵۰ هزار متابولیت ثانویه در قلمرو گیاهان شناخته شده‌است که از این تعداد وسیع دست کم ۲۷۶ متابولیت ثانویه در برنج کشف شده که شامل اسید فنولیک‌ها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، استروئیدها و مشتقات آن‌ها می‌شود (Wang et al., 2018). این متابولیت‌های ثانویه متنوعی که در برنج تولید می‌شوند مختص اندام‌ها و بافت‌ها هستند. به عنوان مثال فیتوالکسین‌های دای ترپنوئیدی عمدتاً در

کروموزوم‌های شماره ۱، ۴ و ۱۲ قرار دارند). با توجه به این که در هر ۳ کروموزوم برنج سینتی با کروموزوم‌های *O. rufipogon* دیده می‌شود (خوشه‌های ژنی شماره ۴۵، ۱۷، ۶ و ۴۶ که روی این کروموزوم قرار دارند)، می‌توان گفت که این دو گونه شباهت ژنتیکی بالایی داشته و همچنین نقطه انشقاق نزدیک‌تری دارند. همچنین بین گونه‌های *O. sativa indica*، *O. punctata* و برنج در خوشه‌های ژنی که روی کروموزوم‌های شماره ۱ و ۱۲ قرار دارند (خوشه‌های ژنی شماره ۳، ۶، ۴۵ و ۴۶) سینتی مشاهده می‌شود. اما در ارتباط با کروموزوم شماره ۴ *O. sativa japonica* با توجه به این که خوشه‌های ژنی موجود در این کروموزوم تنها با گونه *O. rufipogon* سینتی دارند، می‌توان بیان داشت که این خوشه ژنی یک خوشه ژنی اختصاصی می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش پیشنهاد می‌شود ژن‌های موجود در گیاه *O. rufipogon* و *O. punctata* که در آن‌ها سینتی با خوشه‌های ژنی برنج مشاهده شد، در پروژه‌های آتی مورد مطالعه بیشتری قرار گیرند. در واقع می‌توان با شناسایی عوامل تنظیمی مشترک در خوشه‌های ژنی مورد مطالعه به‌منظور مهندسی تنظیمی آن‌ها بهره‌جست یا به‌دلیل وراثت باهم ژن‌های آن خوشه‌ها، با تولید لاین‌هایی با جایگزین کروموزومی حامل خوشه ژنی به انتقال خوشه‌های ژنی مطلوب که امکان تولید بالاتری از متابولیت‌های ارزشمند مدنظر را دارند، مبادرت ورزید.

برگ‌ها وجود دارد، در حالی که اسید فنولیک‌ها، فلاونوئیدها، استرول‌ها و تری ترپنوئیدها عمدتاً در سبوس برنج وجود دارند (Friedman, 2013). متابولیت‌های ثانویه برنج یا به‌عنوان عوامل دفاعی، مانند مقاومت در برابر بیماری‌ها، آفات و سایر تنش‌های زنده و غیر زنده نقش دارند یا در رشد و نمو گیاه تاثیر دارند. آن‌ها همچنین انواع مختلفی از عملکردهای بیولوژیکی مانند خواص ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، سیتوتوکسیک و ضد التهابی را نیز نشان می‌دهند که از این خواص بیولوژیکی در برنامه‌های مختلف ارتقای سلامتی و پیشگیری بیماری مختلف می‌توان استفاده کرد (Wang et al., 2018). در این پژوهش از تعداد محدودی خوشه ژنی شناخته شده دخیل در بیوسنتز متابولیت‌ها استفاده شده و نتایج نشان داد که گونه‌های نزدیک به هم برای ژن‌های آن خوشه‌ها دارای سینتی بوده، تردیدی نیست که این روند تکامل در سایر گونه‌ها برای بسیاری از خوشه‌های ژنی قابل مشاهده است. به‌طوری که با مطالعه آن‌ها می‌توان به روابط ژنتیکی بین گونه‌ها برای آن خوشه‌های ژنی پی برد و با بهره‌گیری از این واقعه تکاملی برای اصلاح گیاهان بر پایه روش‌های مدرن و به نژادی کلاسیک بهره‌برد.

در مورد خوشه‌های ژنی متابولیت‌های ثانویه بررسی شده در این پژوهش می‌توان گفت که این ژن‌ها طی تکامل بین کروموزوم‌های مختلف پخش نشده بلکه نوع کروموزوم‌های حامل آن‌ها نیز حفظ شده‌اند (در واقع روی

REFERENCES

- Chen, X., Liu, F., Liu, L., Qiu, J., Fang, D., Wang, W., Zhang, X., Ye, C., Timko, M. P., Zhu, Q. H., Fan, L., & Xiao, B. (2019). Characterization and evolution of gene clusters for terpenoid phytoalexin biosynthesis in tobacco. *Planta*, 250(5), 1687-1702. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03255-7>
- Duncan A Vaughan, H. M., Kadowaki, (2003). Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(2), 139-146. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00009-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00009-8)
- Elshafie, H. S., Camele, I., & Mohamed, A. A. (2023). A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3266. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/4/3266>
- Frey, M., Schullehner, K., Dick, R., Fiesselmann, A., & Gierl, A. (2009). Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry*, 70(15-16), 1645-1651. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.012>
- Friedman, M. (2013). Rice brans, rice bran oils, and rice hulls: composition, food and industrial uses, and bioactivities in humans, animals, and cells. *J Agric Food Chem*, 61(45), 10626-10641. <https://doi.org/10.1021/jf403635v>

- Guo, L., Qiu, J., Ye, C., Jin, G., Mao, L., Zhang, H., Yang, X., Peng, Q., Wang, Y., Jia, L., Lin, Z., Li, G., Fu, F., Liu, C., Chen, L., Shen, E., Wang, W., Chu, Q., Wu, D., . . . Fan, L. (2017). *Echinochloa crus-galli* genome analysis provides insight into its adaptation and invasiveness as a weed. *Nat Commun*, 8(1), 1031. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01067-5>
- N.M.Nayar. (2014). *Oryza Species and Their Interrelationships*. academic press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417177-0.00004-8>
- Osborn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet*, 26(10), 449-457. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.07.001>
- P.K.SinghK.VenkatesanT.P.Swarnam. (2018). Rice Genetic Resources in Tropical Islands. *academic press*, 355-384. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813064-3.00012-0>
- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav*, 6(11), 1720-1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Teoh, E. S. (2016). Secondary Metabolites of Plants. In E. S. Teoh (Ed.), *Medicinal Orchids of Asia* (pp. 59-73). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5
- Wang, W., Li, Y., Dang, P., Zhao, S., Lai, D., & Zhou, L. (2018). Rice Secondary Metabolites: Structures, Roles, Biosynthesis, and Metabolic Regulation. *Molecules*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123098>
- Wang, Y., Tang, H., Debarry, J. D., Tan, X., Li, J., Wang, X., Lee, T. H., Jin, H., Marler, B., Guo, H., Kissinger, J. C., & Paterson, A. H. (2012). MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Res*, 40(7), e49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1293>
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00300-5)
- Yang Y, Z. K., Xia H, Chen L, Chen K. (2014). Comparative proteomic analysis of indica and japonica rice varieties. *Genet Mol Biol*, 37(4), 652-661. <https://doi.org/doi:10.1590/S1415-47572014005000015>
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., & Blanchard, C. (2002). Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(8), 849-868. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00625.x>