



Evaluation of differential expression of homospermidine synthase (*HSSI*) gene in different tissues of medicinal plant *Senecio vulgaris* L.

Hashem Marawene

Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. hashem.marawne421@gmail.com

Asadollah Ahmadikhah

*Assistant Prof., Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

Masoud Tohidfar

Associate Prof., Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. gtohidfar@yahoo.com

Abstract

Objective

Homospermidine synthase (HSS) is the first enzyme in the specific pathway of pyrrolizidine alkaloid (PA). HSS catalyzes the NAD⁺-dependent transfer of an aminobutyl group of spermidine to putrescine. Putrescine, spermidine and spermine are three polyamines which are naturally positively charged compounds found in virtually all living cells. These compounds bind to DNA and have been implicated in a number of crucial processes such as cell division, differentiation and membrane function. Very few studies on expression of *homospermidine synthase* gene in *Senecio vulgaris*, particularly in natural conditions have been reported. The objective of current research was to study *homospermidine synthase* gene expression in different tissues of *S. vulgaris* by real-time PCR.

Material and methods

The total RNA was extracted from roots, shoots (stems and leaves) and flowers, and was converted to cDNA. Specific primers were designed for *HSSI* gene and also

for the *Pol II* which was applied as a reference housekeeping gene in the experiment and expression level of *HSS1* was assessed using real-time PCR.

Results

Melting curves of two genes showed the specificity of PCR amplification. Evaluation of normalized expression level of *HSS1* gene showed that the gene was differentially expressed in different tissues of *S. vulgaris*. Maximum relative expression (>59-fold change relative to *Pol II* reference gene) was observed in roots where the homospermidine synthase is activated and homospermidine is produced. Interestingly, the gene is also expressed in flowers but with a lower extent (4-fold change relative to housekeeping *Pol II* gene). As expected the gene showed non-significant relative expression in shoots where the homospermidine is transported.

Conclusions

Expression of *HSS1* gene in *S. vulgaris* is tissue-specific and is higher in the roots relative to other tissues.

Keywords: Homospermidine synthase, Gene expression, Natural condition, Real-time PCR, *Senecio vulgaris*

Citation: Marawne H, Ahmadikhah A, Tohidfar M (2019) Evaluation of differential expression of homospermidine synthase (*HSS1*) gene in different tissues of medicinal plant *Senecio vulgaris* L. Agricultural Biotechnology Journal 10(4), 133-146.

DOI: 10.22103/jab.2019.2253

Received: December 27, 2018; Accepted: February 3, 2019

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

ارزیابی بیان افتراقی ژن هموسپرمیدین سینتاز ۱ (*HSS1*) در بافت‌های مختلف گیاه دارویی زلف پیر (*Senecio vulgaris* L.)

هاشم مروانه

دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. hashem.marawne421@gmail.com

اسدالله احمدی‌خواه

* استادیار، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. a_ahmadikhah@sbu.ac.ir

مسعود توحیدفر

دانشیار، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. gtohidfar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۳

چکیده

هدف: اولین آنزیم مسیر اختصاصی بیوستنز آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی (PA)، هموسپرمیدین سینتاز (*HSS*) است. *HSS* انتقال *NAD1* وابسته به یک گروه آمینوبوتیل اسپرمیدین را به پوترسین کاتالیز می‌کند. پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین سه پلی‌آمین هستند که بطور طبیعی دارای بار مثبت بوده و تقریباً در تمام سلول‌های زنده یافت می‌شوند. این ترکیبات به *DNA* متصل شده و در تعدادی از فرآیندهای حیاتی مانند تقسیم سلولی، تمایز و عملکرد غشاء دخالت دارند. گزارش‌های بسیار اندکی در مورد بیان ژن هموسپرمیدین سینتاز ۱ (*HSS1*) در گیاه دارویی زلف پیر (*Senecio vulgaris*) به خصوص در شرایط طبیعی گزارش شده است. هدف از پژوهش حاضر بررسی بیان ژن هموسپرمیدین سینتاز ۱ در بافت‌های مختلف گیاه دارویی زلف پیر (*S. vulgaris*) با استفاده از *PCR* در زمان واقعی بود.

مواد و روش‌ها: *RNA* کل از ریشه‌ها، شاخساره‌ها (ساقه‌ها و برگ‌ها) و گل‌ها استخراج شد و به *cDNA* تبدیل شد. آغازگرهای اختصاصی برای ژن *HSS1* و نیز برای *Pol II* (به عنوان ژن خانه‌دار مرجع در آزمایش)، طراحی شد و بیان نسبی ژن با استفاده از روش پی سی آر در زمان واقعی بررسی شد.

نتایج: منحنی ذوب دو ژن نشان دهنده تکثیر اختصاصی در PCR بود. ارزیابی سطح بیان نرمال شده ژن *HSSI* نشان داد که این ژن به صورت متفاوتی در اندام‌های مختلف *S. vulgaris* بیان شده است. حداکثر بیان نسبی (تغییرات بیش از ۵۹ برابر نسبت به ژن مرجع *Pol II*) در ریشه‌هایی که هموسپرمیدین سینتاز فعال است و هموسپرمیدین تولید می‌شود مشاهده شد. علاوه بر آن این ژن در گل‌ها نیز به میزان کمتری (افزایش ۴ برابر نسبت به ژن خانه‌دار *Pol II*) بیان شد. طبق انتظار، این ژن بیان نسبی قابل توجهی در شاخسارها یعنی جایی که هموسپرمیدین حمل می‌شود، نشان نداد.

نتیجه‌گیری: بیان ژن *HSSI* در گیاه زلف پیر به صورت ویژه بافتی است و در ریشه‌ها بیشتر از دیگر بافت‌ها می‌باشد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، پی سی آر در زمان واقعی، زلف پیر، شرایط طبیعی، هموسپرمیدین سینتاز

مقدمه

گیاه دارویی زلف پیر (*Senecio vulgaris* L.) یکی از اعضای خانواده آستراسه است که گیاهی یک‌ساله، تتراپلوئید و خودگرده افشان است (Baker 1974; Robinson et al. 2003). منشأ این گیاه دارویی، اروپای مدیترانه‌ای است، اگر چه فعالیت‌های انسانی به طور گسترده‌ای باعث گسترش آن به سایر مناطق شده است (Mitich 1995; Robinson et al. 2003). این گیاه دامنه وسیعی از سازگاری اکولوژیک را نشان می‌دهد و توانایی سازش در بسیاری از زیستگاه‌ها مانند باغ‌ها، محل‌های دفن زباله، جاده‌ها و مزارع را دارد (Mitich 1995; Robinson et al. 2003).

زلف پیر دارای برخی از کاربردهای درمانی مانند Diuretic، dysmenorrea، diaphoretic و رفع زانو درد است (Shun et al. 1960). از سوی دیگر این گیاهان به علت سنتز آلکالوئیدهای پیرولیزیدین دارای اثرات هیپاتوکسیک بر روی انسان و دام می‌باشند. تولید آلکالوئیدهای هیپاتوکسیک سبب ایجاد سمیت درونی می‌شود بنابراین کنترل این گونه گیاهی در مزارع کشاورزی و مراتع بسیار ضروری است (Robinson et al. 2003). گاوها با خوردن گیاهانی که دارای آلکالوئیدهای پیرولیزیدین هستند، مسموم می‌شوند و به علت ضایعات کبدی و ریوی تلف می‌شوند. علاوه بر این انسان با مصرف گوشت حیوانات و عسل زنبورهای تغذیه کننده از گیاه زلف پیر مسموم می‌شود (Smith & Culvenor 1981; Roeder 1995; Stegelmeier et al. 1999). میزان آلکالوئیدهای پیرولیزیدین در گیاهان بستگی به نوع گونه‌ی گیاهی و بافت گیاه و تحت تأثیر فاکتورهای فیزیکی دیگر می‌باشد (Schulz et al. 2015). آلکالوئید پیرولیزیدین (PA) در برخی از گیاهان خانواده‌های Apocyanaceae، Boraginaceae، Asteraceae، Senecionae و Eupatoriae، Fabaceae (Crotalaria)، و خانواده Scrophulariaceae (Dolan et al. 2010) یافت می‌شود. بیش از ۹۵ درصد PAها در گیاهانی که متعلق به این چهار خانواده هستند یافت می‌شود (Ober & Hartmann 1999). PAها از طریق فلوئوم از

ریشه به سمت ساقه حرکت می‌کنند و به بافت‌های ذخیره‌ای مانند اندام‌های مولد و بافت‌های محیطی منتقل می‌شوند (Hartmann et al. 1989; Hartmann 1999).

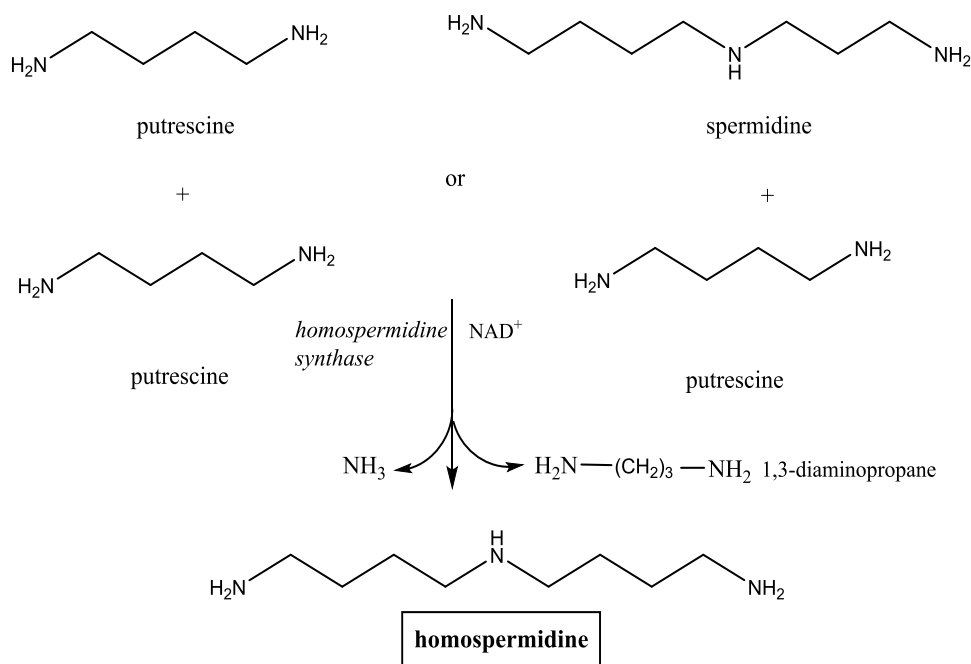
ساختار پیرولیزیدین شامل دو حلقه پنج وجهی است که با به اشتراک گذاشتن یک اتم نیتروژن به هم متصل می‌شوند. حلقه‌ها حاوی یک گروه هیدروکسی اتیلن در موقعیت C-1 و یک گروه هیدروکسیل در موقعیت C-7 هستند، که یک باز نسین^۱ را تشکیل می‌دهند (Dolan et al. 2010). به دلیل اینکه نسین PA خاصیت هیپاتوکسیک، تومورزایی، ژنوتوکسیک، تراتوژنیک و گاهی پنوموتوکسیک دارد باعث سمیت آنزیمی می‌شود. آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی تومورها را از طریق یک مکانیزم ژنوتوکسیک ایجاد می‌کنند.

مطالعات بیوشیمیایی نشان داده که بیوستنز باز نسین (بخش بازی PA) با متابولیسم اولیه توسط پوترسین و بخش آمینوبوتیل اسپرمیدین مرتبط است که هر دو از آرژینین مشتق شده‌اند (Hartmann et al. 1988). هموسپرمیدین، اولین واسطه مسیر اختصاصی در بیوستنز PA (Böttcher et al. 1993)، توسط آنزیم هموسپرمیدین سینتاز (EC 2.5.1.44) (HSS) (شکل ۱) تشکیل می‌شود. این آنزیم اولین آنزیم مسیر اختصاصی برای بیوستنز آلکالوئیدهای پیرولیزیدین است. HSS انتقال NAD1 وابسته به یک گروه آمینوبوتیل اسپرمیدین به پوترسین را کاتالیز می‌کنند. پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین سه پلی‌آمین هستند که بطور طبیعی دارای بار مثبت هستند که تقریباً در تمام سلول‌های زنده یافت می‌شوند. این ترکیبات به DNA متصل شده و در تعدادی از فرآیندهای حیاتی مانند تقسیم سلولی، تمایز و عملکرد غشاء ایجاد اختلال می‌کنند. تا امروز، هموسپرمیدین سینتاز در باکتری‌ها (Tholl et al. 1996)، ویروس‌ها (Kaiser 1999) و گیاهان (Kaiser 1999; Ober & Hartmann 1999) شناسایی شده است. ژن *homospermidine synthase* گیاهی (HSS)، در متابولیسم ثانویه گیاه دخالت دارد.

رویکردهای مدرن بیوتکنولوژی مانند تجزیه بیان ژن برای شناخت مکانیزم‌های مولکولی گیاهان مهم است (Chuaqui et al. 2013; Rasmussen et al. 2002). RT-qPCR و RT-PCR نیمه کمی را می‌توان برای تشخیص بیان ژن‌های هدف استفاده کرد (Al-Bader and Al-Sarraf 2005; del Mar Romero et al. 2007; Strati et al. 2011; Inal et al. 2014). RT-PCR حساس‌ترین روش شناسایی و تعیین کمیت mRNA تولید شده در سلول است (Maroufi et al. 2010). در مطالعات بررسی بیان نسبی ژن مورد نظر، انتخاب ژن مرجع ناپایدار می‌تواند باعث اشتباهات غیر قابل پیش‌بینی در تجزیه بیان ژن شود. ژن مرجع ایده آل باید در نمونه‌های مختلف بیولوژیکی، از جمله مراحل مختلف رشد، انواع سلول‌های تمایز یافته و نمونه‌های در معرض شرایط مختلف آزمایش بیان نسبتاً پایداری داشته باشد. بر این اساس، ژن‌های خانه‌دار برای RT-qPCR عبارتند از RNA پلیمراز II، گلیسرالدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) (Kumar & Joyner 2003; Dündar et al. 2013) و

¹ Necine

Aerts et al. 2004; Strati et al. 2011; Eren et al. 2015; Gurkok et al. 2015; Akdogan) 18S rRNA
(Tufekci et al. 2016; Tombuloglu et al. 2016



شکل ۱. مسیر بیوسنتزی که منجر به تشکیل هموسپرمیدین در ریشه‌های گیاه زلف پیر (*Senecio vulgaris*) می‌شود

Figure 1. Biosynthetic pathway resulting in homospermidine production in roots of *Senecio vulgaris*

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی بیان ژن *homospermidine synthase* در گیاه زلف پیر در شرایط طبیعی انجام نشده است. بنابراین هدف تحقیق حاضر بررسی بیان این ژن در بافت‌های مختلف گیاه زلف پیر با استفاده از PCR در زمان واقعی در شرایط طبیعی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاه کامل زلف پیر (شامل ساقه، برگ، گل‌آذین و ریشه) از محوطه دانشگاه شهید بهشتی تهران (35°48'17.94N, 51°23'28.06E)، در اردیبهشت ۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. شناسایی گیاهان بر اساس کلید گیاه‌شناسی انجام شد. بافت‌های مختلف جداسازی شده و بعد از شستشو با آب مقطر با ازت مایع پودر شدند.

استخراج RNA کل و سنتز cDNA

RNA کل از برگ‌ها، گل‌ها و ریشه‌ها با استفاده از RNAX plus Kit (شرکت سیناکلون، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سپس RNA بر روی ژل ۱٪ آگارز با الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفته و کیفیت نمونه‌های RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر NanoDrop 2000 (NanoDrop, Thermo Scientific) تعیین شد. در نهایت نمونه‌های RNA با نسبت A260/A280 بین ۱/۹-۲/۱ و نسبت A260/A230 بیشتر از ۲ برای تحلیل‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. پس از آن، اولین رشته cDNA با استفاده از کیت RT (شرکت پارس توس) سنتز شد. کیفیت cDNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop 2000 و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت و cDNA در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

طراحی آغازگرها

هم‌ردیف‌سازی توالی کدکننده *HSS1* در *S. vulgaris* و گونه‌های خویشاوند بر اساس مطالعات قبلی با استفاده از ClustalW انجام شد. بر اساس مطالعات قبلی و توالی‌های cDNA و EST از گونه *Senecio vernalis*، آغازگرهای مورد نظر برای تکثیر اختصاصی ژن طراحی شدند (جدول ۱). این آغازگرها معیارهای زیر را داشتند: دمای اتصال از ۵۸-۶۲ درجه سانتی‌گراد، اندازه بین ۱۸ تا ۲۵ باز و محتوای GC بین ۴۵ تا ۵۵ درصد متغیر بود. آغازگرها توسط شرکت سیناکلون (تهران) سنتز شدند.

ژن کنترل درونی

بیان ژن‌های هدف باید با بیان یک ژن درونی دیگر که به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته می‌شود، نرمالیزه شود. کنترل درونی باید در سطح ثابت در تمام نمونه‌ها بیان شود. در این آزمایش، ژن RNA پلیمراز II برای این منظور انتخاب شد.

کمیت‌سنجی با استفاده از Real-Time-PCR

سایبرگرین به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و پس از تحریک نور را ساطع می‌کند. بنابراین، در حالی که محصول PCR تجمع پیدا می‌کند، فلورسنس افزایش می‌یابد. واکنش‌های PCR با حجم ۱۰ میکرولیتر به صورت زیر تهیه شدند: ۵ میکرولیتر سایبرگرین Master mix (شرکت پارس توس)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومول بر میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر نمونه cDNA و ۲ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز. تجزیه و تحلیل RT-PCR در یک سیستم Real-time PCR از نوع ABI StepOne انجام شد. واکنش‌ها در ۴ تکرار با استفاده از چرخه‌های حرارتی زیر انجام شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (مرحله واسرشتگی)، سپس ۴۲ چرخه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه. مرحله تجزیه منحنی ذوب به صورت زیر انجام شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه.

تکثیر اختصاصی ژن مرجع و ژن مورد مطالعه با حضور یک تک‌قله (Peak) در RT-PCR و یک تک‌باند در PCR معمولی تایید شد. در PCR معمولی، از پرایمرهای اختصاصی و rTaq DNA پلیمراز (SinaClon, Iran) استفاده شد.

تحلیل‌های آماری

محاسبات آماری با نرم افزار REST 2009 انجام شد. روش تجزیه و تحلیل $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای محاسبه تفاوت‌های معنی‌دار در بیان ژن نسبت به ژن مرجع *Pol II* استفاده شد. اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه در سطح $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در Real-time PCR برای ژن هدف و ژن خانه‌دار

Table 1. The primers used in Real-time PCR for target gene and housekeeping gene

آغازگر	توالی آغازگر	دمای ذوب	طول قطعه (جفت باز)
Primer	Primer sequence	Tm (°C)	Band size (bp)
PolIII-F	TCCCTTCACAGATGTCACAG	۶۰	۱۵۸
PolIII-R	TCTTTGGTAGTAAGTGGGCC	۶۰	
HSS.exp-F	CCGTAAAGAAAGAGAAGGCAT	۶۰	۱۴۹
HSS.exp-R	ACATTGAAGGAAGAGTGCAT	۶۱	

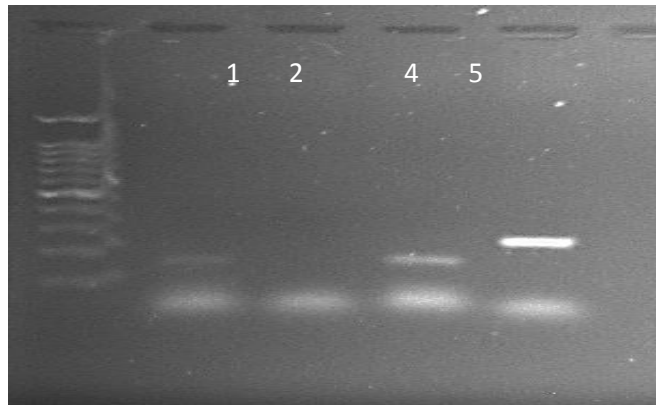
نتایج و بحث

حساسیت و کارایی تکثیر آغازگرهای RT-PCR

الکتروفورس ژل آغازز محصولات PCR برای هر دو ژن *HSSI* و ژن *Pol II* به عنوان ژن مرجع نشان داد که باندهای اختصاصی با اندازه‌های مورد انتظار تکثیر شد (شکل ۲).

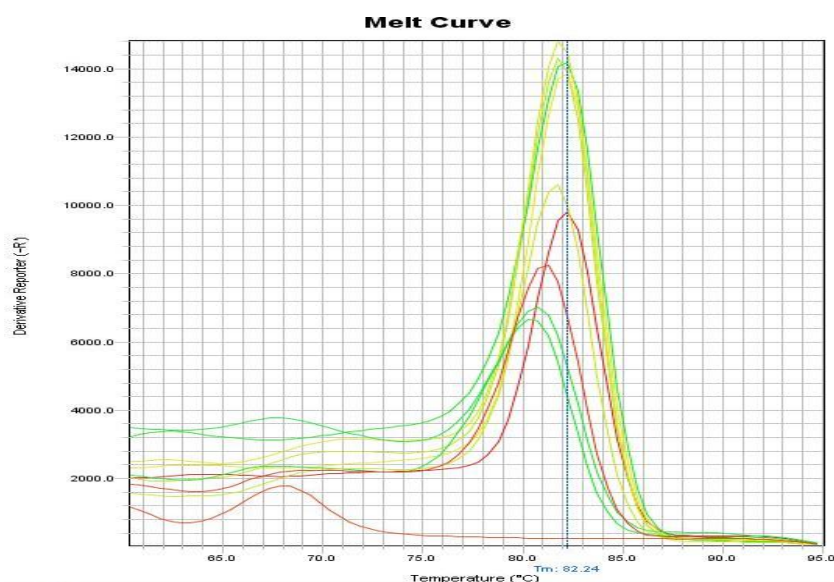
تجزیه و تحلیل سطح بیان ژن *HSSI*

اختصاصی بودن آغازگرها را می‌توان با استفاده از منحنی ذوب تعیین کرد. منحنی ذوب ژن مرجع در نمونه‌های *S. vulgaris* نشان دهنده یک تکثیر واضح بوده و منحنی‌های تکثیر با چهار تکرار، تکرارپذیری خوبی داشتند (شکل ۳). بر اساس آنالیز منحنی ذوب، پرایمر-دایمری تشکیل نشد. ژن خانه‌دار RNA پلیمراز II، الگوی بیان مشابهی را در تمام نمونه‌ها نشان داد. در تمام نمونه‌های کنترل منفی، هیچگونه سیگنال واضحی مشاهده نشد. بازده تکثیر PCR بین ۰/۹۱-۱/۰۱ بود و بنابراین شرایط لازم برای آزمایش RT-PCR را فراهم نمود.



شکل ۲. بررسی اختصاصی بودن تکثیر ژن های *HSS1* و *Pol II*. چاهک اول: نشانگر وزن مولکولی 100 bp، چاهک دوم: باند ۱۴۹ جفت بازی مربوط به cDNA گل آذین با پرایمرهای اختصاصی ژن *HSS1*، چاهک سوم: کنترل منفی (بدون الگوی cDNA)، چاهک چهارم: باند ۱۴۹ جفت بازی مربوط به cDNA ریشه با پرایمرهای ژن *HSS1*، چاهک پنجم: باند ۲۵۸ جفت بازی مربوط به cDNA ریشه با پرایمرهای ژن مرجع *Pol II*

Figure 2. Investigation of specific amplification of *HSS1* and *Pol II* genes. 1: 100 bp ladder, 2: 149 bp band in flower cDNA using *HSS1* primers, 3: negative control (without cDNA template), 4: 149 bp band in root cDNA using *HSS1* primers, 5: 258 bp band in root cDNA using reference gene *Pol II*



شکل ۳. منحنی ذوب ژن مرجع *Pol II*

Figure 3. Melting curve of reference gene *Pol II*

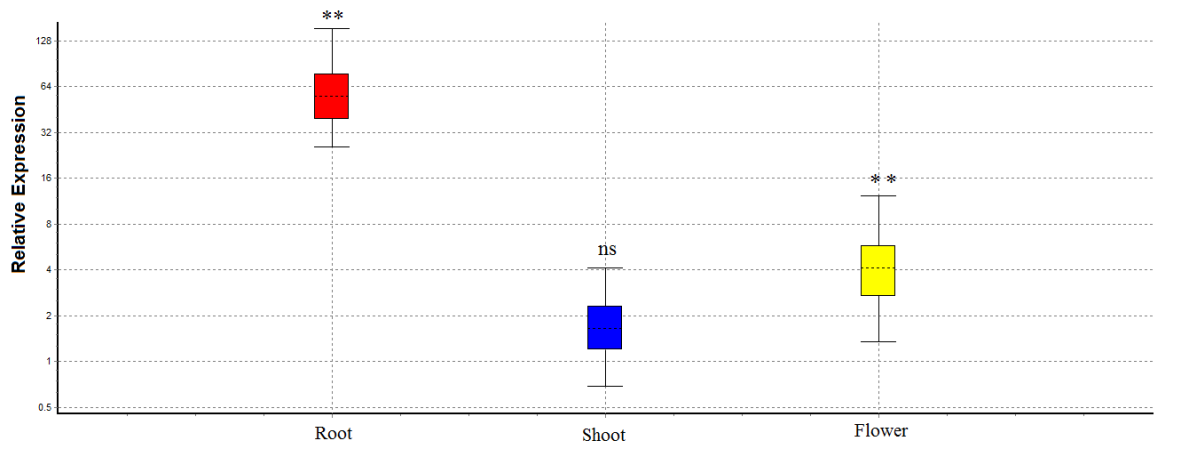
تجزیه و تحلیل سطح بیان ژن *HSSI*

ارزیابی سطح بیان ژن *HSSI* نشان داد که این ژن به صورت متفاوتی در اندام‌های مختلف *S. vulgaris* بیان شده است. حداکثر بیان نسبی در ریشه‌ها که آنزیم *homospermidine synthase* فعال است و در بیوستنز هموسپرمیدین نقش دارد، مشاهده شد. بیان ژن *HSSI* در ریشه‌ها بیش از ۵۹ برابر افزایش نسبت به ژن مرجع نشان داد (جدول ۲، شکل ۴). جالب اینکه این ژن در گل‌ها نیز بیان می‌شود، اما مقدار بیان آن نسبتاً کم است (تغییر ۴ برابری نسبت به ژن *Pol II* خانه‌دار). همانطور که انتظار می‌رفت، ژن *HSSI* دارای بیان نسبی قابل توجهی در شاخساره‌ها (یعنی جایی که هموسپرمیدین به آنجا منتقل می‌شود) نبوده است.

جدول ۲. تغییرات بیان ویژه بافتی ژن *HSSI* در گیاه زلف پیر

Table 2. Alterations of tissue-specific expression of *HSSI* in *S. vulgaris*

Result	نتیجه	Significance	معنی‌داری	Relative expression	بیان نسبی	Tissue	بافت
UP-regulated	افزایش بیان	0.001		58.85		Root	ریشه
Not changed	بدون تغییر	0.109		1.67		Shoots	شاخساره
UP-regulated	بیش بیان	0.004		4.01		Flower	گل‌آذین



شکل ۴. مقایسه بیان ژن *HSSI* در سه بافت مختلف گیاه زلف پیر. ns و ** به ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشد

Figure 4. Comparison of *HSSI* expression in three different tissues of *S. vulgaris*. ns and ** indicate non-significant and significant at 1% level of probability

با توسعه مستمر زیست شناسی مولکولی و تکمیل پروژه‌های توالی یابی ژنوم، تجزیه و تحلیل بیان ژن به طور گسترده‌ای در تحقیقات مربوط به مکانیزم تنظیم متابولیسم مورد استفاده قرار گرفته است. تجزیه و تحلیل دقیق بیان ژن در شرایط طبیعی می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد درک شبکه‌های تنظیمی پیچیده ارائه دهد. RT-PCR به عنوان یک روش مناسب برای تجزیه و تحلیل سطوح بیان ژن‌های هدف در نمونه‌های بیولوژیک به دلیل اختصاصیت بالای آن، حساسیت بالا، سادگی و محدوده وسیع اندازه‌گیری مورد پذیرش قرار گرفته است (Ginzinger, 2002). البته برای نیل به این هدف، ژن‌های مرجع مناسب برای تجزیه و تحلیل RT-PCR مورد نیاز است. انتخاب ژن مرجع مناسب برای جلوگیری از تاثیر عوامل تصادفی و بهبود دقت تجزیه و تحلیل نتایج RT-PCR تبدیل به یک مشکل اساسی شده است که باید به طور خاص در بیان ژن مورد توجه قرار گیرد (Nolan, Hands et al. 2006, VanGuilder, Vrana et al. 2008).

تولید هموسپرمیدین در گونه‌های مختلف و نقش کلیدی آنزیم هموسپرمیدین سینتاز در بیوسنتز آلکالوئیدهای پیرولیزیدین، می‌تواند انگیزه‌ای برای بررسی تنوع فیلوژنتیک بین ژن‌های *HSS* از منابع مختلف باشد. در این تحقیق برای بررسی نقش ژن *HSS* گیاهی در متابولیسم ثانویه، بیان ژن *HSSI* در شرایط طبیعی در گیاه زلف پیر بررسی شده است. علت بیان بالای این ژن در ریشه (بیش از ۵۹ برابر نسبت به ژن مرجع) نیز به خاطر مسیر فعال بیوسنتز این ژن در ریشه می‌باشد که پس از تولید محصول نهایی (آلکالوئیدهای پیرولیزیدین) از طریق فلوئم به گل‌آذین رفته و در آنجا به هوا به‌عنوان مولکول‌های فرار آزاد می‌شوند. پس بیان یا حضور چندانی در برگ و ساقه (شاخساره‌ها) ندارد. می‌توان گفت که ریشه تنها محل اصلی بیان ژن *HSSI* نمی‌باشد، بلکه محل اصلی تولید آلکالوئیدهای پیرولیزیدین است (Hartmann & Toppel, 1987; Toppel et al. 1987). اگرچه آلکالوئیدهای پیرولیزیدین (به عنوان متابولیت ثانویه) در گیاهان تولید می‌شوند ولی این آلکالوئیدها توسط خود گیاهان استفاده نمی‌شوند، بلکه این متابولیت‌ها در حفاظت و پیشگیری از آفات نقش دارند. گیاهان دارویی سنتی که دارای PA هستند، برای سلامتی مفیدند، اما به عنوان گیاهان سمی نیز گزارش شده‌اند (Roeder & Wiedenfeld, 2013). استفاده بیش از حد از این گیاهان دارویی می‌تواند باعث سمیت کبدی و عصبی شود و بنابراین برای سلامت انسان خطرناک است.

در تایید نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مطالعات دیگر نیز نشان داده که بیان *HSS* منحصر به اندودرم‌های تخصصی و سلول‌های پارانشیمی مجاور فلوئوم ریشه می‌باشد. سلول‌های اندودرم با یک نوار لیپیدی (به نام سوپرین) در دیواره‌های شعاعی و عرضی پوشیده شده‌اند که مانع از انتقال پروتئین‌ها از قشر به استوانه مرکزی می‌شود. این اندودرم‌های تخصصی و سلول‌های لایه مجاور نه تنها محل‌های اختصاصی بیان *HSS* هستند، بلکه محل‌های درونی بیوسنتز *senecionine N-oxide*، (به عنوان ترکیبات اصلی گونه‌های *Senecio*) نیز می‌باشند. بنابراین، در گونه *Senecio*، ریشه نه تنها محل اختصاصی بیان ژن *HSS* بلکه محل منحصر به فرد تولید PAها در شرایط *de novo* است (Hartmann & Toppel, 1987; Toppel et al. 1987). ترتیب سلول‌های بیان کننده *HSSI* در مقابل فلوئوم، با انتقال اختصاصی *Senecionine N-oxide* از فلوئوم ریشه به ساقه مطابقت دارد (Hartmann et al. 1989).

References

- Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL (2004) Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques* 36, 84-97.
- Akdogan G, Tufekci ED, Uranbey S, Unver, T (2016) miRNA-based drought regulation in wheat. *Functional and Integrative Genomics* 16, 221-233.
- Al-Bader MD, Al-Sarraf HA (2005) Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Devel Brain Res* 156, 38-45.
- Baker, HG (1974). The evolution of weeds. *Ann Rev Ecol Systematics* 5(1), 1-24.
- Böttcher F, Adolph RD, Hartmann T (1993) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochem* 32, 679-689.
- Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ et al. (2002) Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet* 32, 509-514.
- del Mar Romero M, del Mar Grasa M, Esteve M et al. (2007) Semiquantitative RT-PCR measurement of gene expression in rat tissues including a correction for varying cell size and number. *Nutr Metabol* 4, 26.
- Dolan LC, Matulka RA, Burdock GA (2010) Naturally occurring food toxins. *Toxins* 2, 2289-2332.
- Dündar E, Suakar Ö, Unver T, Dagdelen A (2013) Isolation and expression analysis of cDNAs that are associated with alternate bearing in *Olea europaea* L. cv. Ayvalık. *BMC Genomics* 14, 219.
- Eren H, Pekmezci MY, Okay S et al. (2015) Hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) root miRNome analysis in response to salt stress. *Ann Appl Biol* 167, 208-216.
- Fu PP, Chou MW, Xia Q et al. (2001) Genotoxic pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid N-oxides—mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. *J Environ Sci Health, Part C* 19, 353-385.
- Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30, 503-512.
- Gurkok T, Turktas M, Parmaksiz I, Unver T (2015) Transcriptome profiling of alkaloid biosynthesis in elicitor induced opium poppy. *Plant Mol Biol Rep* 33, 673-688.
- Hartmann T (1999) Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* 207, 483-495.
- Hartmann T, Ehmke A, Eilert U et al. (1989) Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta* 177, 98-107.

- Hartmann T, Sander H, Adolph R, Toppel G (1988) Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Planta* 175, 82-90.
- Hartmann T, Toppel G (1987) Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochem* 26, 1639-1643.
- Inal B, Türktaş M, Eren H et al. (2014) Genome-wide fungal stress responsive miRNA expression in wheat. *Planta* 240, 1287-1298.
- Kaiser A (1999) Cloning and expression of a cDNA encoding homospermidine synthase from *Senecio vulgaris* (Asteraceae) in *Escherichia coli*. *Plant J* 19, 195-201.
- Kempen HM, Graf J (1981) Weed seed production. *Proc West Soc Weed Sci* 34, 78-81.
- Kumar R, Joyner RW (2003) Expression of protein phosphatases during postnatal development of rabbit heart. *Mol Cell Biochem* 245, 91-98.
- Lutman PJW, Berry KJ, Freeman SE (2008) Seed production and subsequent seed germination of *Senecio vulgaris* (groundsel) grown alone or in autumn-sown crops. *Weed Res* 48, 237-247.
- Maroufi A, Van Bockstaele E, De Loose M (2010) Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol* 11, 15.
- Mattocks AR (1986) Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids, Academic Press, London, UK, pp. 134-152.
- Mitich LW (1995) Common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Weed Technol* 9, 209-211.
- Moritz DML, Kadereit JW (2001) The genetics of evolutionary change in *Senecio vulgaris* L.: a QTL mapping approach. *Plant Biol* 3, 544-552.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1, 1559-1582.
- Ober D, Hartmann T (1999) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc Natl Acad Sci* 96, 14777-14782.
- Ollerton, J, & Lack, AJ (1992). Flowering phenology: an example of relaxation of natural selection? *Trend Ecol Evol* 7, 274-276.
- Rasmussen S, Barah P, Suarez-Rodriguez MC et al. (2013) Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 161, 1783-1794.
- Roberts HA (1982) Seasonal patterns of weed emergence. *Proc. of Aspects of Applied Biology: broad-leaved weeds and their control in cereals*. March 24-25, 1982. University of Warwick, England. pp. 321-322.

- Robinson DE, O'Donovan JT, Sharma MP et al. (2003) The biology of Canadian weeds. 123. *Senecio vulgaris* L. Can J Plant Sci 83, 629-644.
- Roeder E (1995) Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. Pharmazie 50: 83-98.
- Roeder E, Wiedenfeld H (2013) Plants containing pyrrolizidine alkaloids used in the Traditional Indian Medicine—including Ayurveda. Die Pharmazie- Inter J Pharm Sci 68, 83-92.
- Schulz M, Meins J, Diemert S et al. (2015) Detection of pyrrolizidine alkaloids in German licensed herbal medicinal teas. Phytomedicine 22, 648-656.
- Shun T, Koluch J, Šantavý F (1960) Isolierung der alkaloiden aus dem gemeinen kreuzkraut (*Senecio vulgaris* L.). Coll Czechoslovak Chem Com 25, 934-939.
- Smith LW, Culvenor CCJ (1981) Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. J Nat Prod 44, 129-152.
- Stegelmeier BL, Edgar JA, Colegate SM et al. (1999) Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. J Nat Toxins 8, 95-116.
- Strati A, Markou A, Parisi C et al. (2011) Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. BMC Cancer 11, 422.
- Tholl D, Ober D, Martin W et al. (1996) Purification, molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of homospermidine synthase from *Rhodospseudomonas viridis*. FEBS J 240, 373-379.
- Tombuloglu H, Ozcan I, Tombuloglu G et al. (2016) Aquaporins in boron-tolerant barley: identification, characterization, and expression analysis. Plant Mol Biol Rep 34, 374-386.
- Toppel G, Witte L, Riebesehl B et al. (1987) Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing *Senecio* species. Plant Cell Rep 6, 466-469.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques 44, 619.
- Weiner J, Rosenmeier L, Massoni ES et al. (2009) Is reproductive allocation in *Senecio vulgaris* plastic? Botany 87, 475-481.