

بررسی بیان ژن ۱-دئوکسی-دی-زایلوز ۵-فسفات سنتاز و ژن چند عملکردی *TcGLIP* در گیاه پیرتروم (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) در پاسخ به متیل جاسمونات

سید محمد دبیری^۱، محمد مجدی^{۲*} و بهمن بهرام‌نژاد^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

پست الکترونیک: m.majdi@uok.ac.ir

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۵

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۴

چکیده

ژن ۱-دئوکسی-دی-زایلوز ۵-فسفات سنتاز و ژن چند عملکردی *GLIP* (*TcGLIP*) دو ژن کلیدی در مسیر بیوسنتزی "پیرترین‌ها" می‌باشند که دارای خاصیت حشره‌کشی می‌باشند. ژن *DXS* در مسیر MEP با استفاده از پیروات و گلیسر آلدهید ۳-فسفات باعث تولید ۱-دئوکسی-دی-زایلوز ۵-فسفات می‌گردد و ژن *TcGLIP* نیز در انتهای مسیر بیوسنتزی دخالت می‌کند و مولکول‌های کریزانتیمیل کوآ (*Chrysanthemyl CoA*) و پیرتروم (*Pyrethrolone*) توسط دو مسیر MEP و لیپوکسی ژناز را به یکدیگر متصل می‌کند و باعث تولید پیرترین نوع ۱ می‌شود. با توجه به اهمیت بالای پیرترین‌ها، بررسی و شناخت بیشتر این متابولیت‌ها حائز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه، جداسازی ژن *DXS* در گیاه پیرتروم (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) از خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها و بررسی بیان دو ژن *DXS* و *TcGLIP* تحت تیمار متیل جاسمونات بود. در این تحقیق ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی ژن ۱-دئوکسی-دی-زایلوز ۵-فسفات سنتاز گونه‌های گیاهی مختلف از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت شد و بعد توالی‌های دریافت شده توسط نرم‌افزار تحت وب ClustalW هم‌ردیف شدند. از هم‌ردیف‌سازی توالی‌های بدست آمده برای این توالی در گیاه پیرتروم آغازگرهای ویژه طراحی و سنتز شد. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و نتایج توالی‌یابی محصول آن و مشاهده باند با طول ۷۱۵bp نشان داد که آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای جداسازی ژن *DXS* کارایی لازم را دارند. همچنین بررسی بیان این دو ژن تحت تیمار متیل جاسمونات، القای بیان این ژن‌ها را تحت تأثیر متیل جاسمونات در مرحله گیاهچه‌ای نشان داد که نشان می‌دهد که متیل جاسمونات می‌تواند به‌عنوان یک الیسیتور مناسب برای افزایش میزان تولید پیرترین‌ها بکار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: ۱-دئوکسی-دی-زایلوز ۵-فسفات سنتاز، پیرتروم، ژن چند عملکردی *TcGLIP*، جداسازی ژن، متیل جاسمونات.

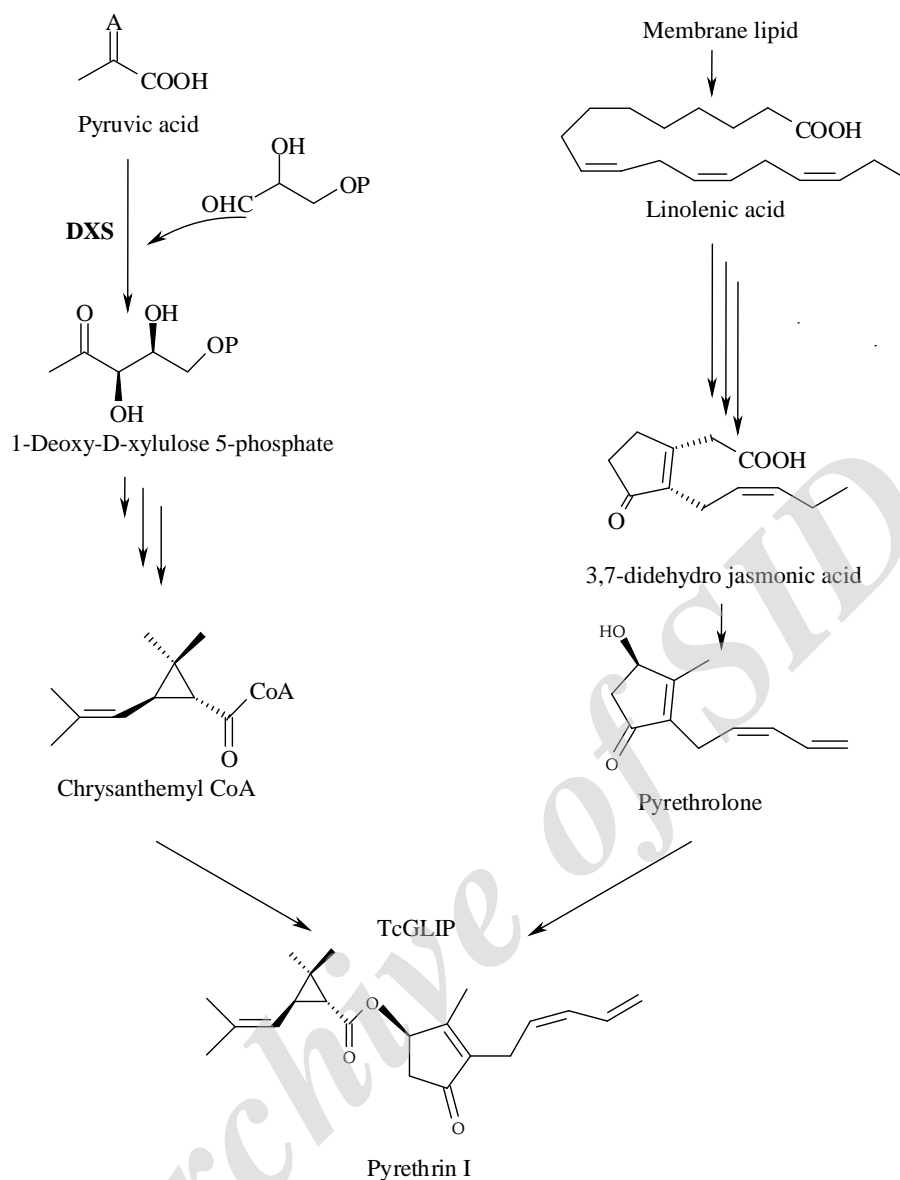
مقدمه

(*Chrysanthemum*) متعلق به خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها می‌باشد. این جنس دارای بیش از هزار گونه زینتی می‌باشد که تنها تعداد کمی از آنها همانند

پیرتروم با نام علمی *Chrysanthemum cinerariaefolium* گیاهی یک‌ساله از جنس کریزانتوموم

پیرترین‌ها و همچنین مسیر ساخت ترپین‌ها می‌باشد. در انتهای مسیر MEP ژن چند عملکردی *TcGLIP* با اتصال دو مولکول اسید کریزانتیمیک که در مسیر MEP ساخته شده و پیرتولون که در مسیر لیپوکسی‌ژناز ساخته می‌شود پیرترین نوع ۱ را می‌سازد. پیرترین‌ها که سر اسیدی آنها در مسیر MEP و سر الکلی آنها در مسیر لیپوکسی‌ژناز ساخته می‌شود دارای خاصیت ضد حشره‌ای هستند و به عنوان سموم حشره کش شناخته می‌شوند. روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان وجود دارد. الیسیتورها ترکیب‌هایی با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao et al., 2005; Ramakrishna & Ravishankar, 2007; Namdeo, 2007; Balusamy et al., 2015; 2011). متیل جاسمونات و متیل‌های استری آن که به جاسمونات‌ها معروف هستند هورمون‌های تنش‌زایی بوده که به عنوان تنظیم‌کننده پاسخ دفاعی عمل می‌کنند (Memelink et al., 2001). گزارش‌های متعددی مبنی بر اهمیت نقش جاسمونات‌ها بر افزایش بیان ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه و همچنین ترپین‌ها وجود دارد (شکل ۱). گزارش شده‌است که استفاده از متیل جاسمونات در گیاه *Artemisia tridentate* (Tamogami et al., 2008) و استفاده از دیگر انواع ترکیب‌های آلی فرار دیگر در گیاه پیرتروم باعث افزایش بیان این ژن و در نهایت افزایش تولید پیرترین‌ها شده است (Kikuta et al., 2011). از آنجایی که آنزیم DXS تنظیم‌کننده ابتدایی مسیر MEP در ساخت ترپین‌ها، مخصوصاً سر اسیدی پیرترین‌ها می‌باشد و ژن *TcGLIP* نیز یکی از ژن‌های انتهایی مسیر بوده و نقش کلیدی را در بیوسنتز این مولکول دارد. بنابراین هدف از این مطالعه جداسازی ژن *DXS* در گیاه پیرتروم برای اولین بار بوده و بررسی بیان این ژن و ژن *TcGLIP* تحت تیمار متیل جاسمونات به عنوان الیسیتور می‌باشد.

Chrysanthemum cinerariaefolium (گل‌امشی) و *Chrysanthemum coccineum* (پیرتروم وحشی) که دارای خاصیت سمی برای حشرات هستند شناسایی شده‌است (Gandinger, 1993). همچنین استفاده از پیرتروم به عنوان حشره‌کش به منطقه آسیا و قفقاز برگشته و در اوایل قرن نوزدهم وارد اروپا شده‌است. گیاه پیرتروم دارای شش ماده استری ضد حشره‌ای به نام‌های سینرین-۱، جاسمولین-۱، پیرترین-۱، سینرین-۲، جاسولین-۲ و پیرترین-۲ است که پیرترین-۱ از بقیه مؤثرتر می‌باشد (Crombie, 1995). اثر این ماده بستگی به اثر این ترکیب‌ها روی سیستم عصبی حشرات دارد که این ماده روی کانال‌های سدیمی سیستم عصبی حشره می‌گذارد (Soderlund & Knipple, 2003). مزایای استفاده از این ماده کاربرد آن در غلظت پایین برای مقابله با حشرات، صدمه زدن به موجودات مفید، سمیت کم برای انسان، تجزیه مستقیم به مواد سازنده آن، سرکوبی سریع طیف وسیعی از حشرات و سازگاری با طبیعت است و از این لحاظ مسیر بیوسنتزی این ماده بسیار بااهمیت می‌باشد (Mrak, 1973). این ماده از لحاظ بیوسنتزی دارای یک قسمت اسیدی و یک قسمت الکلی است که قسمت اسیدی از استریفیکاسیون دو نوع اسید و سر الکلی با ۳ ماده ایجاد می‌شود (Rivera et al., 2001). قسمت اسیدی این ماده یک مونوترپن بوده که حاوی یک حلقه سیکلو پروپان بوده و در مسیر MEP (non mevalonate pathway) تولید می‌شود که در پلاستید انجام شده و طی آن ابتدا یک پیرویک اسید و یک گلیسر آلدهید ۳-فسفات توسط آنزیم ۱-دئوکسی دی-زایلوز ۵-فسفات سنتاز (DXS; 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase) انجام شده و یک ۱-دئوکسی دی-زایلوز ۵-فسفات (1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate) تولید می‌شود (Matsuda et al., 2005). این آنزیم مرحله ابتدایی مسیر MEP را کاتالیز می‌کند. دئوکسی دی-زایلوز ۵-فسفات پیش‌ماده مورد نیاز برای تولید



شکل ۱- مسیر ساخت پیرترین نوع ۱ (Matsuda et al., 2005)

دمای روزانه ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شبانه ۱۸ تا ۲۲ درجه تا مرحله گیاهچه‌ای رشد داده شدند.

تیمار گیاه پیرتروم با متیل جاسمونات

متیل جاسمونات با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار روی برگ‌های پیرتروم در مرحله گیاهچه‌ای که در شرایط رشدی گلخانه‌ای قرار داشتند محلول‌پاشی شد و همزمان با محلول‌پاشی تیمار بر روی نمونه‌های شاهد نیز آب

مواد و روش‌ها

شرایط کشت و آماده‌سازی

برای انجام این پژوهش بذره‌های پیرتروم (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) از مرکز تحقیقات گیاهی واگنینگن هلند (دکتر مارتین یانگسما) تهیه شد و در گلدان با خاک سبک از مخلوط مساوی ماسه الک شده، رس، گیاه خاک و کود حیوانی در گلخانه کشت شدند و در

Nicotinia tabacum (استویا)، *Sativa rebaudiana* (توتون) و *Solanum lycopersicum* (گوجه‌فرنگی) برای هم‌ردیف‌سازی و شناسایی نواحی حفظ شده استفاده شد. برای ژن *TcGLIP* نیز به‌منظور طراحی آغازگر توالی نوکلئوتیدی این ژن از پایگاه NCBI دریافت شد. برای ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع نیز از چهار توالی *Traxacum officinale* (گل قاصدک)، *Artemisia annua* (گینگو)، *Enchinacea tennesensis* (سرخارگل) و *Saussurea involucrate* (برف لوتوس) برای هم‌ردیف‌سازی و شناسایی نواحی حفظ شده در ژن گلیسرینل آدهید-۳ فسفات دهیدروژناز مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

مقطر محلول پاشی شد. قبل از اعمال تیمار و در زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار از برگها نمونه‌گیری انجام شد.

طراحی آغازگر

برای این پژوهش آغازگرها برای ژن‌های *DXS* و *TcGLIP* به عنوان ژن‌های هدف و *GAPDH* به عنوان ژن مرجع با استفاده از نرم‌افزار تحت وب primer3 plus طراحی شدند. برای طراحی آغازگر برای ژن *DXS* توالی‌های cDNA این ژن در پایگاه داده NCBI جستجو شد و از چهار توالی *Chrysanthemum × morifolium* (داوودی)،

جدول ۱- مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد مطالعه

| نام آغازگر | توالی آغازگر | دمای اتصال (سانتی‌گراد) |
|------------|-----------------------|-------------------------|
| F-GAPDH | TGG GTG TCAACGAGA AGG | ۵۶/۸ |
| R-GAPDH | TGAGACATCAACAGTTGG | ۵۳/۸ |
| F-DXS | GATCATATGGGATGTTGG | ۵۱/۴ |
| R-DXS | CTCAAACAAAGTCGATCC | ۵۱/۴ |
| F-TcGLIP | CGAGGAAAGATGGTCAGAGG | ۵۹/۸ |
| R-TcGLIP | GCAAGTTCCAGTGCTTTTCG | ۵۹/۵ |

سنتر cDNA

سنتر cDNA طی یک واکنش دو مرحله‌ای انجام شد که ابتدا ۶ میکرولیتر RNA با غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به تیموب ۰/۲ میکرولیتری اضافه شده و بعد ۱ میکرولیتر Oligodt با غلظت ۵۰ میکرومولار و ۱ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱ میلی‌مولار به میکروتیوب اضافه گردید و حجم میکروتیوب با استفاده از آب عاری از نوکلئاز به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار دادند و بعد از این مرحله نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس به نمونه‌ها ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس ساخت شرکت Vivantis و ۷/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به آنها

استخراج RNA

برای استخراج RNA تام از برگ پیرتروم و با استفاده از کیت سیناژن محلول RNAX™_PLUS همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵٪ و آب DEPC (Diethyl pyrocarbonate) طبق پروتکل شرکت سیناژن استفاده شد. پس از استخراج RNA کل، کیفیت آن به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ بررسی شد و کمیت آن نیز توسط دستگاه نانو دراپ انجام شد، به طوری که میانگین غلظت RNA در حدود ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ برای نمونه‌های مختلف حدود ۱/۹ بود. در نهایت تمامی نمونه‌ها هم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر غلظت گردید، به طوری که برای سنتر cDNA از هر یک از نمونه‌ها با غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد.

شد، چون در دوره‌های بالاتر از ۳۰ مرحله تکثیر قرار دارد و در حالت اشباع دوره‌ها در بررسی بیان نمونه‌ها با یکدیگر قابل مقایسه نمی‌باشند. آنالیز محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱٪ با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید انجام شد. در تمام واکنش‌های PCR انجام شده در این مطالعه از آغازگرهایی با غلظت ۵ پیکومولار در میکرولیتر استفاده شده است. پس از اتمام واکنش PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شد. در نهایت از ژل مورد نظر نور UV با استفاده از دستگاه UVIDoc عکس برداری شد (شکل‌های ۳ و ۴). سپس با استفاده از نرم‌افزار GelQuantNET میزان بیان ژن کمی ژن هدف نسبت به ژن مرجع خود در سه تکرار زیستی مورد محاسبه قرار گرفت.

اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در نهایت نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

واکنش PCR

واکنش RT-PCR نیمه کمی در دستگاه ترمال سیکلر مدل BIO-RAD انجام شد. به منظور جداسازی و تکثیر ژن مورد نظر، RT-PCR با استفاده از آغازگرهای DXS-F و DXS-R انجام گردید. شرایط و چرخه‌های حرارتی بکار برده شده برای واکنش PCR در جدول ۲ و ۳ نشان داده شده است، به منظور بهینه‌سازی این واکنش در بررسی بیان تعداد ۳۰ دوره در نظر گرفته شد. در این دوره حداقل میزان تکثیر مشاهده

جدول ۲- اجزای مواد بکار برده شده برای واکنش زنجیره پلی‌مراز

| مواد | غلظت در محلول پایه | حجم استفاده شده |
|----------------------|--------------------|-----------------|
| آب | - | ۵/۵ |
| آغازگر | 5 pmol/μl | ۱+۱ |
| آنزیم تگ DNA پلیمراز | 10 μl | ۰/۱ |
| کلرید منیزیم | 50 mM | ۰/۲ |
| یافتار RT-PCR | 10 X | ۱ |
| dNTP | 10 mM | ۰/۲ |
| cDNA | - | ۱ |
| جمع کل | - | ۱۰ |

جدول ۳- چرخه حرارتی بکار برده شده برای تکثیر قطعات مورد نظر

| تعداد چرخه | مرحله | زمان | دما (سانتی‌گراد) |
|------------|--------------|------------|------------------|
| ۱ | واسرشت اولیه | ۵ (دقیقه) | ۹۴ |
| ۳۰ | واسرشت | ۳۵ (ثانیه) | ۹۴ |
| ۳۰ | اتصال | ۳۵ (ثانیه) | ۵۶ |
| ۳۰ | بسط | ۳۵ (ثانیه) | ۷۲ |
| ۱ | بسط نهایی | ۷ (دقیقه) | ۷۲ |

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها با ۳ تکرار زیستی انجام شد. به منظور بررسی اختلاف‌های معنی‌دار تیمارها و شاهد از نرم‌افزار SAS version 9.0 و آزمون t-test استفاده شد. برای رسم نمودارهای مربوطه نیز از برنامه Microsoft office Excel 2013 استفاده شد.

توالی‌یابی محصول PCR

محصول PCR هر دو ژن توسط شرکت Bioneer کره جنوبی با استفاده از هر دو آغازگر مستقیم و معکوس توالی‌یابی گردید. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Bioedit 7.2.2 مورد بررسی قرار گرفت و فیلوژنی آن نیز با استفاده از نرم‌افزار MEGA 4 رسم شد.

```
gi|194396282|gb|EU650419.1| AGTGTATATGATTGCTTTGGCACCCGGCCACAGTTCAACCACCATCTCAGC
gi|350539506|ref|NM_001247743. AGTGAATATGATTGCTTTGGCACCCGGCCACAGTTCCACCACCATCTCAGC
gi|87299428|dbj|AB205044.1| AGTGTTCATGATGCTTTTGGCGCAGGGCATAGTTCTACCAGTATCTCTGC
gi|209360746|gb|FJ214107.1| AGTGCTCATGATGCTTTTGGTGTGGACATAGTTCTACAAGCATCTCTGT
**** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *

gi|194396282|gb|EU650419.1| AGGCTTAGGGATCGCTTGTGGAAGAGATCTGAAAGGAAGAAACAACAATG
gi|350539506|ref|NM_001247743. AGGCTTAGGGATGGCTTGTGGTAGAGATCTAAAAGGAAGAAACAACAATG
gi|87299428|dbj|AB205044.1| TGGCTTAGGATGGCTGTCCGGAAGAGATCTATTAGGGAATAAACAATG
gi|209360746|gb|FJ214107.1| TGGCTTAGGATGGCTGTCCGGAAGAGATTTATTAGGGAATAAACAACAACG
**** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *

gi|194396282|gb|EU650419.1| CAGAAGCAGAAGCAGATAAGGATATGTTGCAATCCATGCCGCTATGCGT
gi|350539506|ref|NM_001247743. CAGAAGCAGAAGCAGATAAAGACATTTGTTGCAATCCATGCCATGGGG
gi|87299428|dbj|AB205044.1| AAGAAGCAGAAGTAGATAACAAGGTTGTGGCAATACATGCAGCTATGGGA
gi|209360746|gb|FJ214107.1| AAGAAGCTGAAGCTGATAACAAGATTGTCCGATACACGCCCCATGGGA
*****

gi|194396282|gb|EU650419.1| GGTGGACTGGTATGAACCTATTCCACCCTCGCTTCCCAACCGGTTGTTT
gi|350539506|ref|NM_001247743. GGTGGACCGGATGAACCTTTCCATCGTGGCTTCCCAACAAGGTTT
gi|87299428|dbj|AB205044.1| GGTGGACAGGACTCAACTATTTTCAGAAAAAGTCCCGGATCGTTGCTT
gi|209360746|gb|FJ214107.1| GCGCTACCGGACTCAATTTACTTCCAGAAGAAGTGTCCGGAACGTTGTTT
**** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *
```

(الف)

(ب)

شکل ۲- هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها برای مشخص شدن نواحی حفظ شده برای سنتز آغازگرهای اختصاصی برای جداسازی ژن *DXS*.

(الف) آغازگر مستقیم، (ب) آغازگر معکوس

Nicotiana tabacum [gi|194396282|gb|EU650419.1], *Solanum lycopersicum* [gi|350539506|ref|NM_001247743.], *Chrysanthemum × morifolium* [gi|87299428|dbj|AB205044.1], *Stevia rebaudiana* [gi|209360746|gb|FJ214107.1].

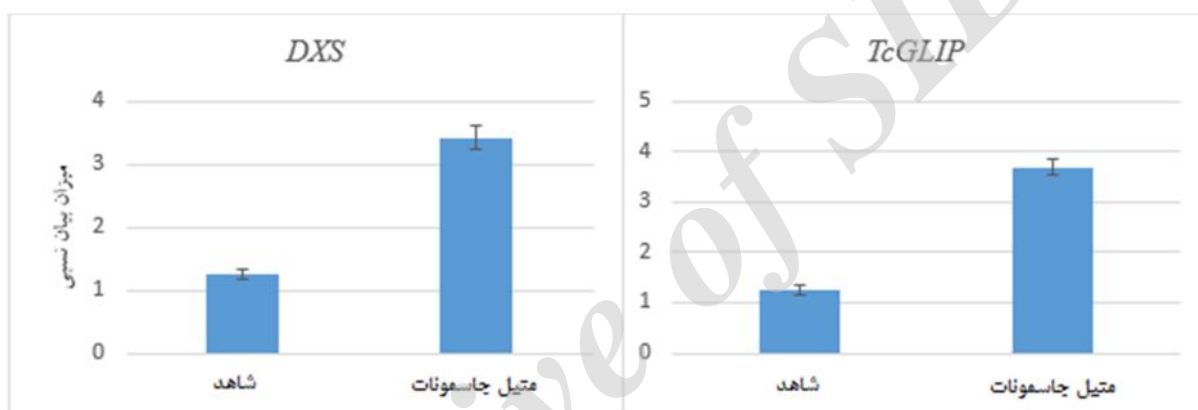
نتایج

را نشان می‌داد و آغازگرهای طراحی شده براساس نواحی حفظ شده عملکرد بالایی را در تکثیر ژن *DXR* از گیاه پیرتروم داشت. شکل ۲ نواحی انتخاب شده را برای طراحی آغازگرهای اختصاصی نشان می‌دهد و توالی‌یابی قطعه تکثیر شده صحت عملکرد آغازگرها را تأیید کرد (شکل ۵). همچنین مقایسه توالی آمینواسیدی ژن *DXS* توالی‌یابی شده بیشترین شباهت را با توالی مربوط به گیاه داوودی (*Chrysanthemum × morifolium*) از خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها، استویا (*Stevia rebaudiana*) از خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها، توت هندی (*Morinda citrifolia*) از

یکی از روش‌های مهم جداسازی ژن‌ها از گونه‌های گیاهی مختلف، استفاده از PCR براساس همولوژی ژن‌ها می‌باشد. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که هم‌ردیف‌سازی توالی‌های ژن *DXS* چهار گونه گیاهی (*Chrysanthemum × morifolium*) (داوودی) (*Sativa rebaudiana*) (استویا) (*Nicotina tabacum*) (توتون) (*Solanum lycopersicum*) و (گوجه‌فرنگی) (NM001247743.1) حفظ‌شدگی بالایی

این تحقیق بررسی بیان ژن *TcGLIP* در گیاه پیرتروم تحت تیمار متیل جاسمونات نیز افزایش معنی داری را نسبت به شاهد نشان داد که افزایش بیان این ژن تحت این تیمار بعد از ۲۴ ساعت ۲/۸۹ برابر در مقایسه با شاهد بود ($P < 0.05$) (شکل ۳). در شکل ۶ دندروگرام بدست آمده از ترجمه توالی نوکلئوتیدی ژن *DXS* با سایر گونه های گیاهی با استفاده از نرم افزار MEGA4 نشان داده شده است.

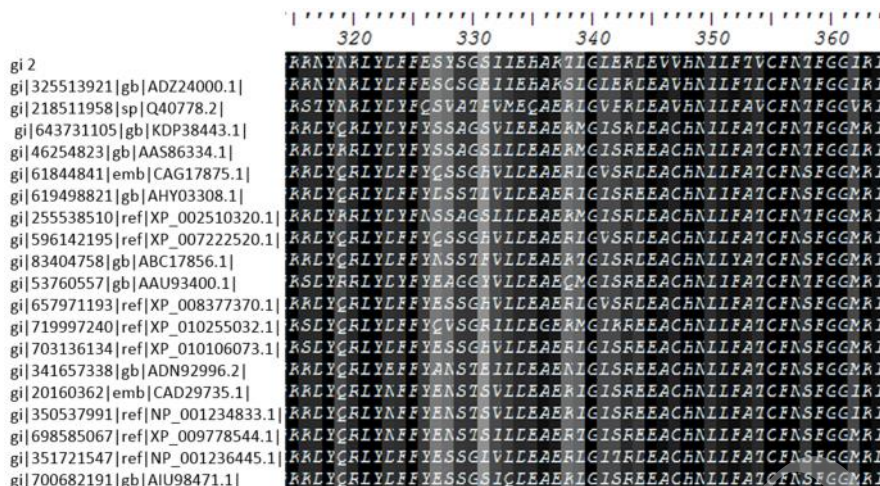
خانواده روناسیان (Runabiaceae) و کائوچو (*Hevea brasiliensis*) از خانواده افوریاسه (Euphorbiaceae) داشت. در این تحقیق بررسی بیان نیمه کمی ژن *DXS* تحت تیمار متیل جاسمونات در گیاه پیرتروم با استفاده از مقایسه میانگین ها به وسیله آزمون t نشان داد که این ژن تحت این تیمار افزایش بیان معنی داری را نسبت به شاهد نشان می دهد ($P < 0.05$) که میزان افزایش بیان این ژن در زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار متیل جاسمونات ۲/۷۳ برابر بیشتر در مقایسه با شاهد بود (شکل ۳).



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن های مورد مطالعه (۱: شاهد، ۲: تیمار متیل جاسمونات)



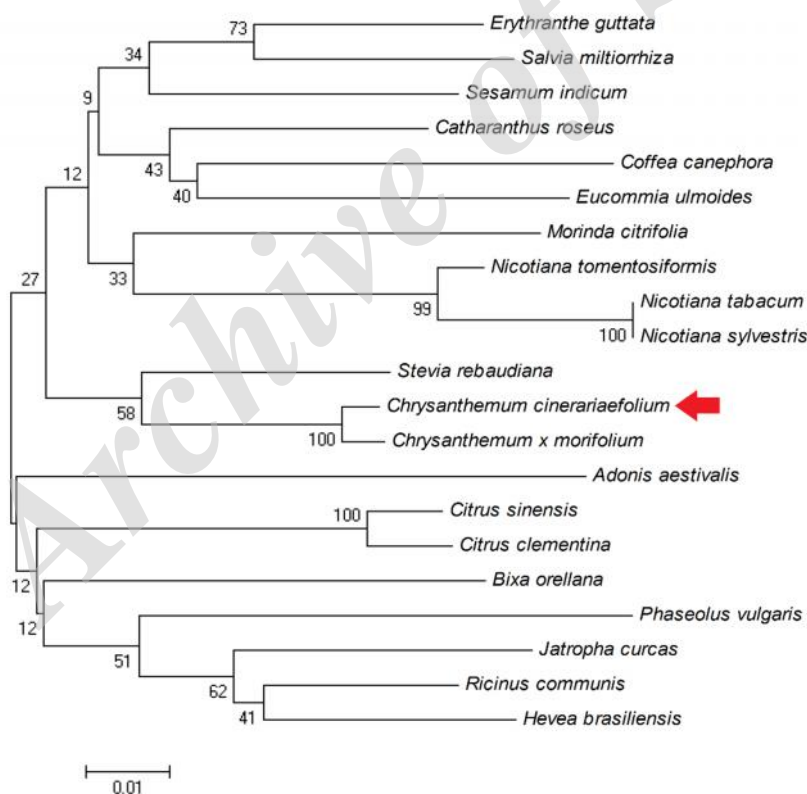
شکل ۴- الگوی باندهای بدست آمده از بررسی بیان ژن های (الف: *TcGLIP*; ب: *DXS* کنترل منفی H_2O)



شکل ۵- قسمتی از هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی ژن *DXS* با دیگر توالی‌های نزدیک در گونه‌های گیاهی مختلف با استفاده از نرم‌افزار

Bio Edit version 7.2

Chrysanthemum × morifolium [BAE79547.1], *Stevia rebaudiana* [ACI43010.1], *Morinda citrifolia* [AAL32062.1], *Hevea brasiliensis* [ABF13288.1], *Sesamum indicum* [XP_011099963.1], *Catharanthus roseus* [CAA09804.2], *Erythranthe guttata* [EYU30922.1], *Salvia miltiorrhiza* [AEZ55686.1], *Citrus sinensis* [KDO60531.1], *Bixa Orellana* [AAO33582.1], *Coffea canephora* [CDP01586.1], *Jatropha curcas* [KDP29794.1], *Ricinus communis* [XP_002532384.1], *Nicotiana tomentosiformis* [XP_009590491.1], *Citrus clementine* [XP_006426248.1], *Eucommia ulmoides* [AFU93069.1], *Adonis aestivalis* [ABK35283.1], *Phaseolus vulgaris* [XP_007156461.1], *Nicotiana tabacum* [AFM78321.1], *Nicotiana sylvestris* [XP_009768276.1], *Chrysanthemum cinerariaefolium* [gi2].



شکل ۶- دندروگرام بدست‌آمده از ترجمه توالی نوکلئوتیدی ژن *DXS* با سایر گونه‌های گیاهی با استفاده از نرم‌افزار **MEGA4**

Chrysanthemum × morifolium [BAE79547.1], *Stevia rebaudiana* [ACI43010.1], *Morinda citrifolia* [AAL32062.1], *Hevea brasiliensis* [ABF13288.1], *Sesamum indicum* [XP_011099963.1], *Catharanthus roseus* [CAA09804.2], *Erythranthe guttata* [EYU30922.1], *Salvia miltiorrhiza* [AEZ55686.1], *Citrus sinensis* [KDO60531.1], *Bixa Orellana* [AAO33582.1], *Coffea canephora* [CDP01586.1], *Jatropha curcas* [KDP29794.1], *Ricinus communis* [XP_002532384.1], *Nicotiana tomentosiformis* [XP_009590491.1], *Citrus clementine* [XP_006426248.1], *Eucommia ulmoides* [AFU93069.1], *Adonis aestivalis* [ABK35283.1], *Phaseolus vulgaris* [XP_007156461.1], *Nicotiana tabacum* [AFM78321.1], *Nicotiana sylvestris* [XP_009768276.1], *Chrysanthemum cinerariaefolium* [gi2].

بحث

در پژوهش انجام شده توسط Yang و همکاران (۲۰۱۲) بر روی ژن *DXS* با استفاده از طراحی آغازگرهای اختصاصی در گیاه *Salvia miltiorrhiza* (سالویا) که یک گیاه با خواص دارویی از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) بوده، به منظور مطالعه بیان در بیوسنتز تانشینون (*Fanshinone*) جداسازی شده است. همچنین در مطالعات بیان ژن‌های دخیل در سنتز ترپین‌ها توسط Olofsson و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از طراحی آغازگرهای اختصاصی این ژن در گیاه *Artemisia annua* L. (درمنه خزری) جداسازی و میزان بیان ژن بررسی شده است. افزایش بیان ژن *DXS* احتمالاً به این دلیل است که ترکیب‌های تولیدی در این مسیر با استفاده از تیمار متیل جاسمونات افزایش می‌یابد. مطالعات انجام شده توسط Kikuta و همکاران (۲۰۱۱) روی گیاه پیرتروم با استفاده از ترکیب‌های آلی فرار (*Volatile organic compounds*) افزایش بیان این ژن را در فاصله زمانی صفر تا ۲۴ ساعت نشان داد. البته فرایندهای سیگنالی متیل جاسمونات در بسیاری از فرایندهای زیستی دخیل می‌باشد (Gao et al., 2004)، به طوری که افزایش متابولیت‌های ثانویه مختلف توسط این ماده نیز گزارش داده شده است که می‌تواند به عنوان الیسیتور مناسبی برای افزایش تولید ترکیب‌های ارزشمند بکار گرفته شود (Creelman & Mullet, 1995). همچنین استفاده از متیل جاسمونات به عنوان الیسیتور (*Elicitor*) در افزایش متابولیت‌های ثانویه از جمله آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها شناخته شده می‌باشد (Memelink et al., 2001). Yang و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه کاربرد تیمار متیل جاسمونات بر روی سنتز زیستی متابولیت تانشینون که یک دی‌ترین می‌باشد و از طریق مسیر MEP بیوسنتز می‌شود افزایش بیان ژن *DXS* را به طور معنی‌داری در بازه زمانی ۲۴ ساعت گزارش کرده‌اند. در رابطه با افزایش بیان ژن *TcGLIP* نیز در مطالعات Park و همکاران (۲۰۰۲) نشان داده شده است که بیان این ژن در گیاه *Arabidopsis thaliana*

(آراییدوپسیس) تحت تیمار متیل جاسمونات القاء می‌گردد. Kwon و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه بیان این ژن در مقاومت سیستمیک نشان داده‌اند که این ژن در تیمار با متیل جاسمونات افزایش بیان را نشان می‌دهد و مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهد که مولکول‌های سیگنالی همانند متیل جاسمونات در القاء مسیرهای دفاعی در گیاهان دخیل می‌باشند (Broekaert et al., 2006; Xu et al., 1994). Mur et al., 2006). ترکیب‌های آلی فرار از جمله Z-۳-هگزنال، E-۲-هگزنال، Z-۳-هگز-۱-اول و Z-۳-هگز-۱-ایل-استات ترکیب‌هایی می‌باشند که ساختارهایی بسیار مشابه با پیش ساختارهای جاسمونیک اسید را دارند که از مسیر لیپوکسی ژناز منشعب می‌شوند. بنابراین افزایش حضور این مواد می‌تواند باعث افزایش حضور سوبستراها برای ساخت اسید جاسمونیک و فعالیت بیشتر آنزیم‌های دخیل و در نهایت تولید پیرتروم‌ها برای ساخت سرالکلی مولکول پیرترین‌ها شود. همچنین Ruiz-May و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهش خود روی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) نشان دادند که استفاده از تیمار متیل جاسمونات باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه با تأثیر بر ژن ابتدای مسیر *DXS* از طریق فرایندهای سیگنالی می‌شود و از آنجایی که سر اسیدی پیرترین‌ها یک مونوترپن در ادامه مسیر MEP است، بنابراین افزایش بیان ژن‌های دخیل در ساخت پیرترین‌ها با استفاده از تیمار متیل جاسمونات القاء می‌گردد (Zhou et al., 2010). در بررسی‌های انجام شده توسط Wasternack و Parthier (۱۹۹۷) نشان می‌دهد که متیل جاسمونات و استرهای آن فیتوآلکسین‌هایی از جمله ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها را که جزء ترکیب‌های دفاعی در گیاهان به‌شمار می‌روند برای مقابله با تنش‌های خارجی دخالت می‌کنند و جاسمونات‌ها از جمله متیل جاسمونات بر بیان ژن‌های دخیل در سنتز ترکیب‌های فیتوآلکسین‌ها تأثیر گذاشته و باعث افزایش بیان آنها می‌گردد. البته نتایجی که از القاء جاسمونات‌ها روی بیان ژن‌های مختلف مربوط به مسیرهای بیوشیمیایی مختلف بدست آمده است بسیار پیچیده می‌باشد و

- damaged conspecific plants. *Plant and Cell Physiology*, 52(3): 588-596.
- Kwon, S.J., Jin, H.C., Lee, S., Nam, M.H., Chung, J.H., Kwon, S.I., Ryu, C.M. and Park, O.K., 2009. GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 58(2): 235-245.
 - Matsuda, K., Kikuta, Y., Haba, A., Nakayama, K., Katsuda, Y., Hatanaka, A. and Komai, K., 2005. Biosynthesis of pyrethrin I in seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Phytochemistry*, 66(13): 1529-1535.
 - Memelink, J., Verpoorte, R. and Kijne, J.W., 2001. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science*, 6(5): 212-219.
 - Mrak, E.M., 1973. Advantages and disadvantages of pyrethrum: 307-311. In Casida, J.E., (Ed.). *Pyrethrum: The Natural Insecticide*. New York, Academic Press, 347p.
 - Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. and Wasternack, C., 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, 140: 249-262.
 - Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 69-79.
 - Olofsson, L., Engström, A., Lundgren, A. and Brodelius, P.E., 2011. Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L. *BMC Plant Biology*, 11: 45.
 - Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A. and Feyerisen, R., 2002. A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal*, 31: 1-12.
 - Ramakrishna, A. and Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11): 1720-1731.
 - Rivera, S.B., Swedlund, B.D., King, G.J., Bell, R.N., Hussey, C.E., Shattuck-Eidens, D.M., Wrobel, W.M., Peiser, G.D. and Poulter, C.D., 2001. Chrysanthemyl diphosphate synthase: Isolation of the gene and characterization of the recombinant non-head-to-tail monoterpene synthase from *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8): 4373-4378.
- نشان داده شده است که جاسموناتها در هماهنگی با دیگر هورمونهای گیاهی عمل کرده و باعث القای بیان ژنهای دخیل در مسیرهای دفاعی می شوند (Donnell *et al.*, 1996). در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق می توان نتیجه گیری کرد که می توان از جاسموناتها و دیگر استرهای آن برای افزایش بیان ژنهای دخیل در مسیرهای دفاعی به عنوان القاءکننده های غیرزیستی استفاده کرد تا بتوان باعث افزایش و بهبود تولید متابولیت های ثانویه دفاعی در گیاهان شد.
- منابع مورد استفاده**
- Balusamy, S.R.D., Rahimi, S., Sukweenadhi, J., Kim, Y.J. and Yang, D.C., 2015. Exogenous methyl jasmonate prevents necrosis caused by mechanical wounding and increases terpenoid biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(2): 341-348.
 - Broekaert, W.F., Delauré, S.L., De Bolle, M.F. and Cammue, B.P., 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 393-416.
 - Creelman, R.A. and Mullet, J.E., 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10): 4114-4119.
 - Crombie, L., 1995. Chemistry of pyrethrins: 123-193. In: Casida, J.E. and Quistad, G.B., (Eds.). *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses*. Oxford University Press, New York, 384p.
 - Donnell, P.J.O., Calvert, C., Atzorn, R. and Wasternack, C.H.M.O., 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, 274(5294): 1914-1917.
 - Gandinger, C.B., 1933. Description and history of pyrethrum. *Pyrethrum Flowers*. Minneapolis. Minesota, McLaughlin Gormley King Company. 4p.
 - Gao, X.P., Wang, X.F., Lu, Y.F., Zhang, L.Y., Shen, Y.Y., Liang, Z. and Zhang, D.P., 2004. Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves. *Plant, Cell & Environment*, 27(4): 497-507.
 - Kikuta, Y., Ueda, H., Nakayama, K., Katsuda, Y., Ozawa, R., Takabayashi, J., Hatanaka, A. and Matsuda, K., 2011. Specific regulation of pyrethrin biosynthesis in *Chrysanthemum cinerariaefolium* by a blend of volatiles emitted from artificially

- Xu, Y.I., Chang, P.F.L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghobama, K.G., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A., 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 6: 1077-1085.
- Yang, D., Ma, P., Liang, X., Wei, Z., Liang, Z., Liu, Y. and Liu, F., 2012. PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Physiologia Plantarum*, 146: 173-183.
- Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23: 283-333.
- Zhou, M.L., Zhu, X.M., Shao, J.R., Wu, Y.M. and Tang, Y.X., 2010. Transcriptional response of the catharanthine biosynthesis pathway to methyl jasmonate/nitric oxide elicitation in *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88: 737-750.
- Ruiz-May, E., De-la-Peña, C., Galaz-Ávalos, R.M., Lei, Z., Watson, B.S., Sumner, L.W. and Loyola-Vargas, V.M., 2011. Methyl jasmonate induces ATP biosynthesis deficiency and accumulation of proteins related to secondary metabolism in *Catharanthus roseus* (L.) G. hairy roots. *Plant and Cell Physiology*, 52(8): 1401-1421.
- Soderlund, D.M. and Knipple, D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(6): 563-577.
- Tamogami, S., Rakwal, R. and Agrawal, G.K., 2008. Interplant communication: airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(4): 723-727.
- Wasternack, C. and Parthier, B., 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in plant Science*, 2: 302-307.

Archive of SID

Gene expression analysis of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and *TcGLIP* multifunctional genes in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) under methyl jasmonate treatment

S.M. Dabiri¹, M. Majdi^{2*} and B. Bahramnejad³

1- M.Sc. graduate Student, Department of Agriculture and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

2*- Corresponding Author, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

E-mail: m.majdi@uok.ac.ir

3- Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: November 2015

Revised: April 2016

Accepted: June 2016

Abstract

The gene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (*DXS*) and *TcGLIP* multifunctional genes are two key genes involved in pyrethrins biosynthetic pathway, which retain insecticidal properties. *DXS* gene in the MEP pathway produces 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate using pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *TcGLIP* gene is involved at the last steps of pyrethrins biosynthesis pathway and integrates chrysanthemyl-CoA and pyrethrolone, which are produced in the MEP pathway and lipoxigenase pathways, respectively to yield pyrethrin I. Based on the significances of pyrethrins, further identification and studies are needed on these metabolites. The aim of this study was to isolate *DXS* gene in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) from the Asteraceae, as well as expression analysis of these two genes under methyl-jasmonate treatment. In the present work, the nucleotide sequences of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene of different plant species were obtained from NCBI database and subsequently aligned with ClustalW online software. Specific primers were designed from the conserved regions of aligned sequences. The polymerase chain reaction product with 715bp length showed that the specific primers had high efficiency to isolate *DXS*. In addition, gene expression analysis under methyl-jasmonate treatment showed that both *DXS* and *TcGLIP* were up-regulated in response to methyl jasmonate elicitor. Our data showed that methyl jasmonate treatment in seedling stage could be used as a suitable elicitor to increase pyrethrin production.

Keywords: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, pyrethrum, *TcGLIP* multifunctional gene, gene isolation, methyl-jasmonate.