ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲
صفحه ۳۳۲- ۳۲۹

بررسی نحوه پاسخ ژن‌های تریکومی *Artemisia annua* و *Arabidopsis thaliana* به الیسیتورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید

Study on *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana* trichome genes in response to methyl jasmonate and salicylic acid elicitors

محبوبه زارع مهرجردی*[۱]، محمدرضا بی همتا[۲]، منصور امیدی[۳]، محمدرضا نقوی[۴] و حسن سلطانلو[۵]

۱،۲،۳و۴- دانشجوی دوره دکتری و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۵- استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Zare Mehrjerdi M*[1], Bihamta MR[2], Omidi M[3], Naghavi MR[4], Soltanloo H[5]

1,2,3,4. PhD Student, Professors, University College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran
5. Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mzarem@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۰- تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹)

چکیده

آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون است که در تریکوم‌های چند سلولی غده ای ترشحی گیاه *Artemisia annua* (درمنه) تولید می‌شود و در درمان بیماری‌های مختلف از جمله مالاریا و سرطان کاربرد دارد. به دلیل پایین بودن میزان تولید این ترکیب دارویی ارزشمند در گیاه درمنه، تلاش برای افزایش تولید آن ضروری است. در این مطالعه، به منظور روشن شدن اثر احتمالی کاربرد برون زاد متیل جاسمونات (MeJA) و سالیسیلیک اسید (SA) بر روی تولید آرتمیزینین از طریق تاثیر بر روی تریکوم‌ها، تغییرات بیانی ژن‌های شناخته شده موثر در تشکیل و نمو تریکوم در گیاه درمنه در پاسخ به این دو محرک، به کمک روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای بدست آوردن اطلاعات بیشتردر ارتباط با نحوه پاسخ ژن‌های موثر در تشکیل و نمو تریکوم به این دو عامل محرک و با توجه به کمبود اطلاعات در زمینه ژن‌های تریکومی در گیاه درمنه، داده‌های میکروآری موجود در بانک اطلاعاتی EBI مربوط به ژن‌های تریکومی گیاه مدل آرابیدوپسیس در پاسخ به آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که MeJA با تاثیر مثبت بر روی بیان ژن‌های دخیل در شکل گیری، اندازه و جهت گیری رشد تریکوم، بر روی تریکوم‌ها تاثیر گذاشته و SA دارای تاثیر منفی بر روی آنها است. همچنین ژن *TTG1* درمنه هم به عنوان کاندیدای مناسب برای انجام مطالعات بیشتر جهت استفاده از آن در مهندسی تریکوم به منظور افزایش تولید آرتمیزینین معرفی شد.

واژه‌های کلیدی
آرتمیزینین
تریکوم
سالیسیلیک اسید
متیل جاسمونات
Artemisia annua

Archive of SID
www.SID.ir

آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون است که در تریکوم‌های چند سلولی غده ای ترشحی گیاه *Artemisia annua* (درمنه) که برروی برگ‌ها، ساقه‌ها و گل آذین‌ها قرار دارند، تولید می‌شود (Olsson et al. 2009). این ترکیب و مشتقاتش در درمان بیماری های مالاریا و سرطان دارای کاربرد می‌باشد (Liu et al. 2006). با توجه به اهمیت آرتمیزینین در درمان بیماری‌ها و نیز به دلیل عملکرد پائین و تولید ۰/۸-۰/۰۱ درصدی آن در گیاه درمنه (Abdin et al. 2003)، تلاش به منظور افزایش تولید آن ضروری است. در مطالعه قبلی ما مشخص شد که در پی کاربرد برون زاد دو عامل محرک[1] متیل جاسمونات (MeJA) و سالیسیلیک اسید (SA) بر روی گیاه درمنه، MeJA باعث افزایش مداومی در تولید آرتمیزینین شده و SA تاثیر منفی بر روی تولید آن داشت (Zare et al. 1391). یک دلیل احتمالی برای مشاهده چنین رویدادی می‌تواند ناشی از تاثیر متفاوت این دو عامل محرک بر روی تعداد و اندازه تریکوم‌های گیاه درمنه (محل تولید آرتمیزینین) باشد. چنانکه در مطالعه‌ای که بر روی گیاه آرابیدوپسیس انجام شده است، اثر مثبت کاربرد MeJA بر روی شکل گیری، تعداد و اندازه تریکوم‌ها در این گیاه گزارش شده است و بیان شده که SA دارای تاثیر منفی بر روی آنها است (Traw and Bergelson 2003). همچنین در مطالعات دیگر تاثیر مثبت کاربرد MeJA یا جاسمونیک اسید (JA) بر روی افزایش تراکم تریکوم در گوجه فرنگی و درمنه نیز گزارش شده است (Boughton et al. 2005; Liu et al. 2009; Maes et al. 2011). برای بررسی تاثیر احتمالی MeJA و SA بر روی تریکوم‌های گیاه درمنه، اثر آنها در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمار بر روی بیان تنها ژن‌های شناخته شده تریکومی این گیاه (*TTG1* و *TFAR1*) (Liu et al. 2009; Maes et al. 2011) مورد توجه قرار گرفت. همچنین برای بدست آوردن اطلاعات بیشتر، تغییرات بیان ژن‌های دخیل در شکل گیری و نمو تریکوم آرابیدوپسیس به این دو عامل نیز با استفاده از داده‌های میکروواری موجود در بانک اطلاعاتی EBI مورد بررسی قرار گرفت.

بذرهای گیاه درمنه مطابق مطالعه Zare et al. (1391) کشت شدند و پس از سه ماه گیاهانی که موقعیت رشدی یکسانی داشتند، برای انجام آزمایش انتخاب شدند. سپس محلول‌های µM ۳۰۰ MeJA (حل شده در اتانول ۰/۸ درصد) و mM یک SA (حل شده در آب (تنظیم PH 7 با استفاده از NaOH)) تهیه شدند. محلول‌های تهیه شده در ساعت هشت صبح، به طور مجزا بر روی واحدهای آزمایشی مربوطه، به کمک مه پاش و به میزان یک لیتر برای هر واحد آزمایشی اسپری شدند و گیاهان شاهد مربوط به هر تیمار هم با حلال‌های ذکر شده در بالا مورد اسپری قرار گرفتند. نمونه برداری از پنج برگ بالایی که زیر سومین برگ قابل مشاهده از نوک گیاه قرار داشتند در ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تیمار انجام گرفت و نمونه‌ها در دمای ۸۰°C- قرار گرفتند (Pu et al. 2009). توالی مربوط به EST ژن *TTG1* از پروفسور Liu (مکاتبات شخصی، larking_liu@yahoo.com) و توالی مربوط به ژن *TFAR1* از پروفسور Goossens (مکاتبات شخصی، alain.goossens@psb.vib-ugent.be) دریافت شد. توالی آغازگرهای طراحی شده با استفاده از نرم افزار Perl primer برای *TTG*1 به صورت (´3-AATCCCATTCGAGCCCACT -´5 F و ´3- GACTTTGCCTGTTGCGGAG -´5 R) و برای *TFAR1* به صورت (´3- CTGCGGCTAGTGGACCTTTA -´5 F و ´3 -GGTGCCTTAGACCAGGAATGT -´5) بود. آغازگرهای مربوط به ژن مرجع 18SrRNA نیز بر اساس (Zeng et al. 2008) انتخاب شدند.

RNA توسط کیت کیاژن[2] (RNeasy Plant Mini Kit) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سپس از هر نمونه RNA به میزان یک µg برداشته شده و cDNA با استفاده از کیت فرمنتاز[3] (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. واکنش Real time PCR با مقادیر SYBR Green ۱۰ میکرولیتر، cDNA ۵ میکرولیتر، آغازگرهای پیشرو و برگشتی هرکدام یک میکرولیتر و

[1] Elicitor

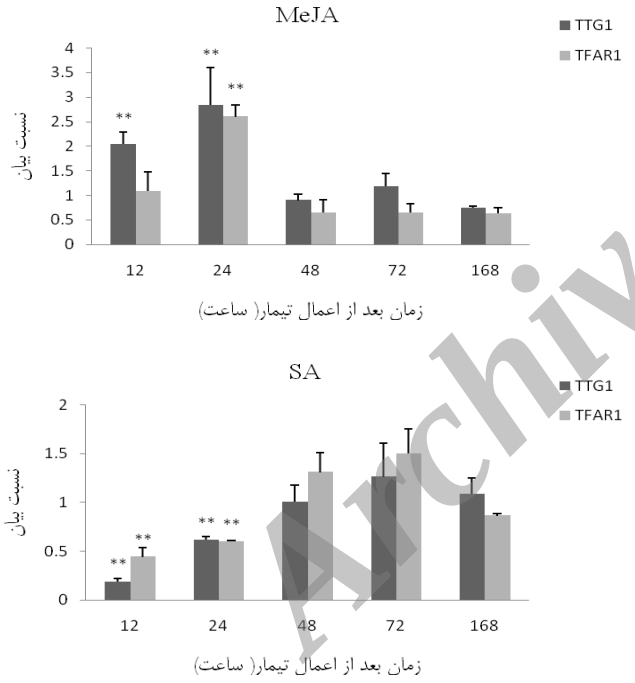
[2] Qiagen
[3] Fermentas

Archive of SID
www.SID.ir

آب دو بار تقطیر ۵ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه iQ5 (BIO-RAD) انجام شد. برنامه مورد استفاده ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه در ابتدا و سپس ۳۵ چرخه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه و۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه بود. آزمایش در دو تکرار زیستی و سه تکرار آزمایشی انجام شد. آنالیز داده‌های Real time PCR با استفاده از روش مقایسه‌ای $^{-\Delta\Delta CT}$۲ انجام شد (Livak and Schmittgen 2001) و داده‌های بدست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شدند. آنالیز آماری آنها با روش T-test و با نرم افزار Excel انجام گرفت. به منظور بررسی نحوه پاسخ ژن‌هایی که در شکل‌گیری و نمو تریکوم در آرابیدوپسیس نقش دارند، به محرک‌های MeJA و SA، داده‌های نرمال شده مربوط به آزمایش میکروواری این تیمارها ((E-CAGE-51)، (E-CAGE-21)، (E-GEOD-14961)) از سایت EBI دریافت شد. داده‌های نرمال شده مربوط به ژن‌های تریکومی شناخته شده در آرابیدوپسیس (*GL1*، *MYB23*، *TTG1*، *GL3*، *EGL3*، *TRY*، *CPC*، *ETC1*، *ETC2*، *GL2*، *SIM*، *KAK*، *SPY*، *CPR5*، *RHL2*، *HYP6*، *AN*، *STI*، *ZWI*، *GRL*، *KLK*، *BRICK1*، *ROP2*، *DIS1*، *DIS2*، *WRM*، *CRK* و *CER4*) از هر آزمایش استخراج شده و آنالیز آماری آنها با روش T-test و با نرم افزار Excel انجام شد. سطح معنی داری، ۵ درصد در نظر گرفته شد و تغییرات معنی دار در بیان ژن‌ها در پاسخ به تیمارهای MeJA و SA مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که در گیاهان درمنه تیمار شده با MeJA، در ۱۲ ساعت پس از کاربرد محرک، سطح بیان ژن *TTG*1 در مقایسه با شاهد دو برابر افزایش بیان نشان داده و این افزایش در ۲۴ ساعت نیز با میزان ۲/۸ برابر افزایش، ادامه پیدا کرد. همچنین این محرک باعث افزایش ۲/۶ برابری در بیان ژن *TFAR*1 در ۲۴ ساعت پس از کاربرد آن در مقایسه با شاهد شد (شکل ۱). در گیاهان تیمار شده با SA نیز، مشاهده شد که بیان دو ژن مطالعه شده در ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از کاربرد، از ۱/۶ تا ۵/۳ برابر در مقایسه با شاهد کاهش نشان دادند (شکل ۱).

ژن *TTG1*، ژنی است که در تشکیل تریکوم نقش دارد و در بالادست سایر ژن‌های القا تشکیل تریکوم (*GL1*، *GL3* و *EGL3*) قرار گرفته است (Zhao et al. 2008). بنابراین با توجه به نتایج، MeJA احتمالا با تاثیر بر روی این ژن و سپس افزایش تعداد تریکوم منجر به افزایش تولید آرتمیزینین می‌شود و تاثیر منفی SA بر روی تولید آرتمیزینین نیز ناشی از تاثیر منفی آن بر روی بیان این ژن می‌باشد. ژن *TFAR1* نیز با ژن *CER4* آرابیدوپسیس که در بیوسنتز موم کوتیکولی نقش داشته و در تریکوم برگ‌های آرابیدوپسیس به طور قوی بیان می‌شود، خویشاوندی نزدیکی دارد (Maes et al. 2011). بنابراین بررسی تغییرات بیانی ژن *TFAR1* نیز تاییدی بر تاثیر مثبت MeJA و تاثیر منفی SA بر روی تریکوم‌ها بود.



شکل۱- اثر کاربرد هورمون‌های MeJA و SA بر بیان ژن‌های *TTG1* و *TFAR1* در درمنه. داده‌ها نشان دهنده $^{-\Delta\Delta CT}$۲ ± انحراف معیار هستند. مقادیر معنی دار از لحاظ آماری ($0.01 \leq P < 0.05$) به صورت * و مقادیر بسیار معنی‌دار ($P < 0.01$) با ** نشان داده شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین بررسی تغییرات ژن‌های تریکومی آرابیدوپسیس در پاسخ به محرک‌های MeJA و SA، نشان دهنده این امر بود که MeJA دارای تاثیر مثبتی بر روی شکل گیری، اندازه و مرفولوژی تریکوم است و بیان ژن‌هایی که در القاء تشکیل تریکوم، رشد و افزایش اندازه آن نقش دارند، با کاربرد MeJA افزایش می‌یابد، در مقابل آن SA تاثیر منفی بر روی تریکوم دارد. این نتایج منطبق با مشاهدات Traw and Bergelson (2003) بود.

با توجه به نتایج بدست آمده ژن *TTG1*، با توجه به اینکه در بالادست سایر ژن‌های القا تشکیل تریکوم قرار دارد، بهترین کاندید برای شروع انجام مطالعات بیشتر است. همچنین به دلیل کمبود اطلاعات در ارتباط با ژن‌های تریکومی درمنه، یافتن همولوگ ژن‌هایی که در تشکیل، اندازه، جهت گیری و هدایت رشدی تریکوم‌ها در آرابیدوپسیس نقش دارند، در گیاه درمنه و مطالعه بر روی آنها می‌تواند به استفاده از آنها در جهت افزایش اندازه تریکوم و احتمالا افزایش میزان آرتمیزینین کمک کند.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران با شماره ۷۱۰۱۰۱۰/۱/۰۳ صورت گرفته است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Abdin MZ, Israr M, Rehman RU, Jain SK (2003) Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approach for enhanced production. Planta Medica 69:289-299.

Boughton AJ, Hoover K, Felton GW (2005) Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. Journal of Chemical Ecology 31: 2211-2216.

Liu C, Zhao Y, Wang Y (2006) Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalaria drug. Applied Microbiology and Biotechnology 72: 11-20.

Liu SQ, Tian N, Li J, Huang JN, Liu ZH (2009) Isolation and identification of novel genes involved in Artemisinin production from flowers of *Artemisia annua* using suppression subtractive hybridization and metabolite analysis. Planta Medica 75: 1542-1547.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408.

Maes L, Van Nieuwerburgh FCW, Zhang YS, Reed DW, Pollier J, Casteele S, Inze D, Covello PS, Deforce DLD, Goossens A (2011) Dissection of the phytohormonal regulation of trichome formation and biosynthesis of the antimalarial compound artemisinin in *Artemisia annua* plants. New Phytologist 189: 176-189.

Olsson ME, Olofsson LM, Lindahl AL, Lundgren A, Brodelius M, Brodelius PE (2009) Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. Phytochemistry 70: 1123-1128.

Pu GB, Ma DB, Chen JJ, Ma LQ, Wang H, Li GF, Ye HC, Liu BY (2009) Salicilic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Reports 28:1127-1135.

Traw MB, Bergelson J (2003) Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in Arabidopsis. Plant Physiology 133: 1367-1375.

Zare Mehrjerdi M, Bihamta M, Omidi M, Naghavi M (1391) Effects of some elicitors on artemisinin production in *Artemisia annua* plant. Iranian Journal of Horticaltural sciences 43: 323-330. (In Farsi).

Zeng QP, Zhao C, Yin LL, Yang RY, Zeng XM, Huang Y, Feng LL, Yang XQ (2008) Cloning of artemisinin biosynthetic cDNAs and novel ESTs and quantification of low temperature-induced gene overexpression. Science in China Series C-Life Sciences 51: 232-244.

Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, Grotewold E, Lloyd A (2008) The TTG1-bHlH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. Development 135: 1991-1999.

Archive of SID

www.SID.ir