

تأثیر متیل جاسمونات در بیان نسبی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز

گلیسیریزین در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان (*Glycyrrhiza**glabra*)The effect of methyl jasmonate on the relative expression of genes involved in the pathway of glycyrrhizin biosynthesis in cell suspension culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra*)مریم اله دو*^۱، منصور امید^۲، محمدرضا بی‌همتا^۲، علیرضا عباسی^۳، براتعلی فاخری^۴

۱- دانش‌آموخته دکتری، دانشگاه تهران و عضو هیات علمی دانشگاه زابل

۲- استادن، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران

۴- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل

Allahdou M^{*1}, Omid M², Bihanta M², Abbasi AR³, Fakheri BA⁴

1. PhD Graduated of Plant Breeding, University of Tehran and Faculty member of University of Zabol
2. Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran
3. Associated Professor, Department of Biotechnology, University of Tehran
4. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: maryam.allahdo@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱)

چکیده

ریشه‌ها و استولن‌های شیرین‌بیان یکی از مهم‌ترین داروهای گیاهی در دنیا را تشکیل داده و حاوی مقادیر زیادی ماده مؤثره گلیسیریزین که یک نوع تریترپن ساپونین است، می‌باشد. در این تحقیق بیان نسبی ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتز این متابولیت ثانویه شامل ژن‌های *SQS*، *bAS* و *CYP88D6* و *CYP72A154* در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان در حضور متیل‌جاسمونات مورد بررسی قرار گرفت. متیل‌جاسمونات در غلظت صد میکرومولار در فاز رشدی ثابت به‌همراه تیمار کنترل (بدون متیل‌جاسمونات) به سوسپانسیون سلولی اضافه و سلول‌ها در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برداشت و میزان بیان نسبی هر ژن محاسبه و نمودارها ترسیم شد. نتایج نشان داد که دو ژن *bAS* و *CYP88D6* در ۴۸ ساعت بعد از تیمار و ژن‌های *SQS* و *CYP72A154* در ۷۲ ساعت بعد از تیمار بیش‌ترین میزان بیان را نشان دادند. ژن‌های *bAS* و *SQS* افزایش بیان بیشتری نسبت به ژن‌های *CYP88D6* و *CYP72A154* نشان دادند زیرا ژن‌های *bAS* و *SQS* در مسیر اولیه بیوسنتز دخالت داشته و نیز در بیوسنتز سایر ساپونین‌ها مانند سوباساپونین نیز دخالت دارند در حالی که ژن‌های *CYP88D6* و *CYP72A154* در مسیر نهایی بیوسنتز گلیسیریزین دخالت دارند. با توجه به اینکه قبلاً حضور گلیسیریزین در ریشه تأیید شده بود، این تحقیق نیز به‌دلیل افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز و نیز پایداری نسبی بیان آن‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان، حضور گلیسیریزین را در کشت سلولی این گیاه تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
سوسپانسیون سلولی
شیرین‌بیان
متیل‌جاسمونات

مقدمه

گیاهان مقادیر زیادی از متابولیت‌های مخصوص که به‌عنوان منابع طبیعی شناخته شده و یک منبع غنی از داروهای مدرن می‌باشند، تولید و ذخیره می‌کنند. در چین برای هزاران سال است که گیاهان برای مصارف دارویی استفاده می‌شوند (Yang et al. 2016). برآورد شده است که تقریباً ۲۰۰ هزار متابولیت ثانویه در گیاهان وجود دارد (Harvey et al. 2015) که بر اساس منابع بیوسنتزی، می‌تواند داخل گروه‌های عمده: فنیل پروپانویید، ترپنوئید و الکالوئیدها، به‌اضافه گروه‌های دیگری با فراوانی کمتر طبقه‌بندی شوند (Qiu 2007). تعدادی از گونه‌های گیاهی نظیر شیرین بیان، جنسینگ و همچنین گیاهان زراعی مانند لگوم‌ها و یولاف، تریتروپنوئید ساپونین را به‌عنوان بخشی از برنامه‌های نرمالشان در رشد و توسعه سنتز می‌کنند. این‌ها اغلب گیاهانی هستند که به‌عنوان منابع دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Haralampidis et al. 2002).

ریشه‌ها و استولن‌های گونه‌های شیرین بیان (*Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza inflata*, *Glycyrrhiza glabra*) یکی از مهم‌ترین داروهای گیاهی در دنیا را تشکیل می‌دهند و محتوی مقادیر زیادی از ماده مؤثر گلیسیریزین (۲ تا ۸ درصد از ماده خشک) که یک نوع تریتروپنوئید ساپونین است، می‌باشند (Seki et al. 2011). گلیسیریزین عمدتاً در بخش‌های چوبی ریشه‌های ضخیم و استولن‌ها وجود داشته، در حالی که سویاساپونین‌ها، اولئونان-نوعی تریتروپن ساپونین، عمدتاً در بذرها و ریشه‌های شیرین بیان وجود دارد (Hayashi et al. 1993). از طرف دیگر میزان بتولینیک اسید- یک نوع تریتروپن لوپان، در لایه‌های کرکی ریشه‌های ضخیم شیرین بیان زیاد است (Hayashi et al. 1998). سطح استفاده شیرین بیان به‌دلیل خصوصیات دارویی آن بالا است در حالی که منابع این گیاه مناطق محدودی از دنیا را در بر گرفته‌است. قبلاً کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه شامل کشت کالوس، کشت سویاسپانسیون سلولی و کشت ریشه‌های مویی انجام گرفته است (Yoo and Kim 1976; Hayashi et al. 1988; Toivonen and Rosenqvist, 1999; Li et al. 2000). فقط دو گزارش از شناسایی گلیسیریزین در مطالعات آزمایشگاهی وجود دارد (Yoo and Kin 1976; Wongwicha et al. 2007). در کشت

سویاسپانسیون سلولی شیرین بیان گونه *glabra* هیچ گلیسیریزین قابل مشاهده‌ای تولید نشد (Hayashi et al. 1998) در حالی که دو تریتروپنوئید سویاساپونین (Hayashi et al. 1990) و بوتیلیک اسید (Hayashi et al. 1988) در کشت سویاسپانسیون سلولی این گیاه تولید شده بود. کشت سویاسپانسیون سلولی شیرین بیان گونه *Inflata* با بیوراکتور ۷/۵ لیتری محتوی ۵۰ گرم در لیتر وزن ترسلول، ماکزیمم بیومس ۱۹۴/۴ گرم وزن تر را بعد از ۱۸ روز از کشت نشان داده و آنالیز کروماتوگرافی مایع (LC-MS/MS) حضور گلیسیریزین در عصاره سلولی را در مقایسه با استاندارد نشان داد (Ya-li et al. 2012).

در سال‌های اخیر گزارش شده‌است که کاربرد لیسیتورها می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه را در کشت سلولی گیاه بهبود بخشد. استعمال خارجی متیل جاسمونات، تجمع چندین گروه از الکالوئیدها را در چندین گونه گیاهی تحریک کرده است (Saenz-Carbonell 1997). علاوه بر آن گزارش شده بود که جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات در یک بخش از مسیر عبوری سیگنال‌هایی که آنزیم‌های مخصوصی را القا می‌کنند تا واکنش بیوشیمی را به‌منظور تشکیل ترکیبات دفاعی با وزن مولکولی پایین در گیاهان، نظیر پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها، کیونین‌ها، ترپنوئیدها و پلی‌پتیدها کاتالیزکنند، درگیر هستند (Mizukami et al. 1993). هم‌چنین متیل جاسمونات در کشت سلولی گیاه جنسینگ تولید ساپونین را تحریک کرده است (Lu et al. 2001) و کاربرد آن در کشت سلولی شیرین بیان گونه *glabra* بیوسنتز سویاساپونین را تحریک کرده بود (Hayashi et al. 2003). بیوسنتز گلیسیریزین شامل سیکل‌های اولیه ۲، ۳-اکسیدوسکوالن، معمول در هر دوی تریتروپن و فیتوسترول، می‌باشد در حالی که در تریتروپن آمیرین یکسری واکنش‌های اکسیداتیو در جایگاه C-11 (اکسیداسیون دو مرحله‌ای) و C-30 (اکسیداسیون سه مرحله‌ای) و گلوکونوریلاسیون گروه C-3 هیدروکسیل به دنبال آن اتفاق می‌افتد، اگرچه ترتیب دقیق محصول میانی ناشناخته است. دو ژن که آنزیم‌های دخیل در مراحل اولیه تشکیل اسکلتون تریتروپن را رمزبایی می‌کنند، عبارتند از *SQS* (squalene synthase) و *bAS* (β amyryn synthase) که به‌طور موفقیت‌آمیزی از شیرین بیان گونه *glabra* ایزوله شده‌اند. با این وجود هیچ پیشرفتی در جهت

(Mousavi 2009). برای تولید کالوس از هیپوکوتیل استفاده شد. هیپوکوتیل گیاهچه‌های دو هفته‌ای کشت شده در محیط کشت نیم MS، به قطعات نیم سانتی‌متری تقسیم و به پتری دیش‌های اتوکلاو شده محتوی محیط کشت MS محتوی ۳ درصد ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد شامل: ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA و نیم میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA قرار گرفت (Parsaiemehr and Mousavi 2009). در هر پتری دیش حدود ۲۰ تا ۲۵ قطعه از هیپوکوتیل قرار گرفت. به‌منظور کاهش در قهوه‌ای شدن کالوس از اسیداسکوربیک به میزان هشتاد یا صد میلی‌گرم در لیتر استفاده شد (Allahdou et al. 2019). برای استریل کردن اسیداسکوربیک از فیلترهای ۰/۲۲ میکرون استفاده شد و زمانی که دمای محیط کشت به حدود پنجاه تا شصت درجه رسید، اسیداسکوربیک به محیط کشت اضافه شد. بعد از انتقال گیاهچه‌ها به محیط کشت محتوی تنظیم‌کننده‌های رشد و آنتی‌اکسیدان‌ها، پتری دیش‌ها در تاریکی و دمای بیست و پنج درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. چهار هفته بعد از کشت، کالوس‌ها جمع‌آوری و در محیط کشت‌های جدید محتوی صد میلی‌گرم در لیتر اسیداسکوربیک قرار گرفت و سپس هر بیست و یک روز واگشت انجام می‌شد.

حدود نیم گرم کالوس به ارلن‌های محتوی ۴۰ سی سی محیط کشت MS مایع محتوی تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل و در دمای بیست و پنج درجه سانتی‌گراد، اتاق تاریک و شیکر با صد و پنجاه دور در دقیقه قرار گرفت.

به‌منظور القای متابولیت‌های ثانویه از الیستور متیل جاسمونات (شرکت سیگما آلدریچ) استفاده و بعد از ضد عفونی با عبور از فیلترهای ۰/۲۲ میکرون، در هجدهمین روز از کشت سوسپانسیون سلولی (Li et al. 2012) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در سه تکرار به ارلن‌هایی که اطراف آن‌ها با فویل آلومنیوم پوشیده شده بود، اضافه شد. به تیمار کنترل نیز ۴۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و ارلن‌ها به انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ دور در دقیقه و اتاق تاریک منتقل شد. سپس در فاصله ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برداشت سلولی انجام گرفت، بدین صورت که سلول‌ها در زیر هود استریل از صافی عبور و با محلول PBS با غلظت ۱X شستشو داده شد. در هنگام برداشت سلولی شاخص رشد سلول با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و تکرارهای دارای رشد

شناسایی ژن‌های دخیل در اکسیداسیون متعدد و گلیکوزیلی شدن از آمین به گلیسیریزین صورت نگرفته است (Seki et al. 2008). سیتوکروم‌های P450 یک نقش بحرانی در واکنش اکسیداتیو در طی بیوستز محصولات متنوع طبیعی گیاهی، شامل تریتین‌ها بازی می‌کنند. با آنالیز ESTها یک ژن به نام *CYP88D6* از خانواده سیتوکروم P450، شناسایی شد که این ژن بتا آمیرین ۱۱-اکسیداز، یک آنزیم در مسیر بیوستز گلیسیریزین، را رمزبایی می‌کند (Seki et al. 2008) و نیز ژن *CYP72A154* نیز که در مسیر نهایی بیوستز گلیسیریزین دخالت دارد از گونه *Uralensis* جداسازی شده است (Seki et al. 2011).

در این مطالعه الگوی بیان ژن‌های *bas* و *SQS* که در مراحل اولیه بیوستز گلیسیریزین و نیز ژن‌های *CYP88D6* و *CYP72A154* که در مراحل نهایی بیوستز دخالت دارند، در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان گونه *glabra* و در حضور متیل جاسمونات بررسی شد و این اولین گزارش از الگوی بیان این ژن‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی در حضور الیستور متیل جاسمونات بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی استفاده شده در این تحقیق با بررسی‌های انجام شده از منطقه سمیرم اصفهان جمع‌آوری شد. بذور ابتدا در آب مقطر استریل محتوی یک قطره مایع ظرفشویی شستشو داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ قرار گرفته و سه مرتبه به مدت یک دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شد. بذور پس از خراش دهی در زیر هود استریل با هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه شستشو و سپس در محیط کشت $\frac{1}{2}MS$ به منظور تولید ساقه کشت گردید.

با توجه به اینکه ریشه و برگ در شیرین بیان مقدار کالوس کمی تولید می‌کردند، از هیپوکوتیل برای تولید کالوس استفاده شد. در شیرین بیان با افزایش غلظت هورمون BA تولید کالوس افزایش می‌یابد. در اکثر منابع غلظت دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA یا 2/4-D بیشترین تولید کالوس را در بر داشته‌اند و زمانی که از هورمون NAA استفاده شده بود رشد کالوس و تراکم و رنگ آن بهتر از 2/4-D بود. (Parsaiemehr and

در این تحقیق از آغازگرهای مربوط به ژن‌های درگیر در مسیر بیوستز گلیسیریزین استفاده شد. ژن‌های این مسیر بیوستزی عبارتند از *SQS*، *bAS*، *CYP88D6* (Seki et al. 2013) و *CYP72A154* (Seki et al. 2015). برای طراحی آغازگرهای مورد نظر از نرم‌افزار 3 Primer (نسخه ۰/۰۴) استفاده و ویژگی‌های جفت آغازگرها از لحاظ تشکیل ساختارهای ثانویه، همودایمر، هتروداایمر و غیره با نرم‌افزار Oligoanalyzer (نسخه ۳/۱) بررسی و تایید شدند. ژن خانه دار Actin به‌عنوان مرجع برای نرمال کردن داده‌های بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Zhang et al. 2018).

مخلوط واکنش qPCR شامل ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین (شرکت تاکارا)، یک میکرولیتر cDNA، دو میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۰/۴ میکروگرم در لیتر بوده که با آب مقطر استریل عاری از RNase به حجم ۱۵ میکرولیتر رسید. برنامه PCR شامل ۴۰ سیکل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۷ تا ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه انجام گرفت. برای تمام نمونه‌ها هر واکنش RT-PCR در چهار تکرار (دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی) اجرا شد. میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از فرمول $Fold\ Chang = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffi 2001) در نرم‌افزار Excell نسخه ۲۰۱۶ محاسبه و نمودارها برای هر ژن نیز ترسیم شد.

مطلوب برای آنالیز بیان ژن و دیگر مطالعات در دمای منفی ۷۰ نگاه‌داری شد.

$$G_i = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_1} \right) \times 100 \quad (\text{Zahedzadeh et al. 2014})$$

در این فرمول: G_i شاخص رشد کالوس (تفاوت وزن ثانویه و اولیه کالوس تقسیم بر وزن ثانویه ضرب در ۱۰۰)، W_1 وزن اولیه کالوس، W_2 وزن ثانویه کالوس می‌باشد.

استخراج RNA از نمونه‌های فریز شده به روش CTAB-Litum chloride (Chang et al. 1993; Zareie et al. 2012) انجام گرفت و برای بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراجی، از الکتروفورز ژل آگارز یک و نیم درصد و دستگاه نانودراپ استفاده شد. برای حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی با RNA استخراجی با آنزیم DNase I (شرکت Thermo Scientific) تیمار و مقدار ۵۰۰ نانوگرم از آن برای ساخت cDNA توسط کیت سنتز cDNA شرکت تاکارا ژاپن (شماره کاتالوگ RR037A) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. cDNA سنتز شده توسط دستگاه نانودراپ تعیین غلظت و غلظت‌ها یکسان سازی شدند. به‌منظور بررسی میزان بیان نسبی ژن‌ها واکنش Real Time PCR با استفاده از سایبرگرین SYBER PREMIx EX TAq شرکت تاکارا ژاپن (شماره کاتالوگ RR820Q) و دستگاه Rotor-Gene Q QIAGEN در چهار تکرار برای هر تیمار انجام گرفت.

جدول ۱- مشخصات آغازگرها برای بررسی بیان نسبی ژن‌های درگیر در مسیر بیوستز گلیسیریزین در شیرین بیان

اندازه امپلیکون	TM	توالی 5'→3'	Accession number	پرایمر
۱۸۱	۵۸	TGCGAATTCTGGAGAAG	GU072921.1	bASF
۱۸۱	۵۸	AGGATCCAAAACCTCAGG	GU072921.1	bASR
۱۶۱	۵۸	GTTGAGCAGGCTGGAAGCTA	GQ266153.1	SQSF
۱۶۱	۵۸	GGCGTTGGCAGAGAGATAA	GQ266153.1	SQSR
۱۳۸	۵۸	CCACGTCTTCATGGGCTCTT	KB851192(<i>glabra</i>)*	Cyp88D6F
۱۳۸	۵۸	TTACGTGCCTCGAGTGCTTT	AB433179(<i>uralensis</i>)*	Cyp88D6R
۱۱۳	۵۸	TTCCACACCAGGGGCTATCT	AB558153	Cyp72A154F
۱۱۳	۵۸	GCCTTTCCAACCTCTTTGGC	AB558153	Cyp72A154R
۲۰۰	۵۷	CCTCAACCCAAAGGTCAACAG	EU 190972.1	GuactinF
۲۰۰	۵۷	GACCAGCGAGATCCAAACGAA	EU 190972.1	GuactinR

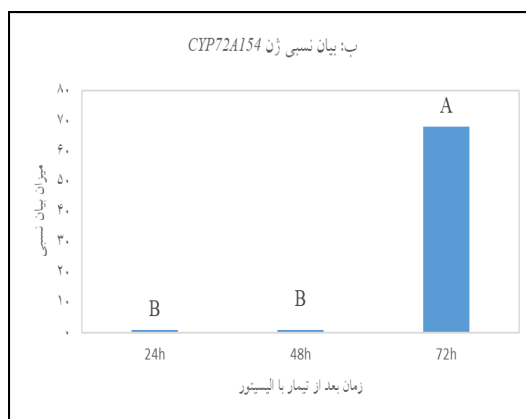
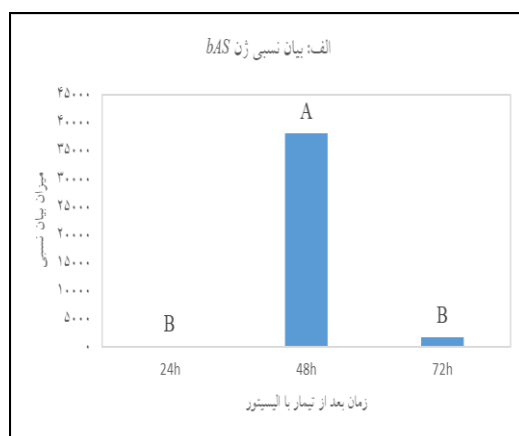
*از هم‌ردیفی توالی مربوط به accession دو گونه و نواحی consensus طراحی شد.

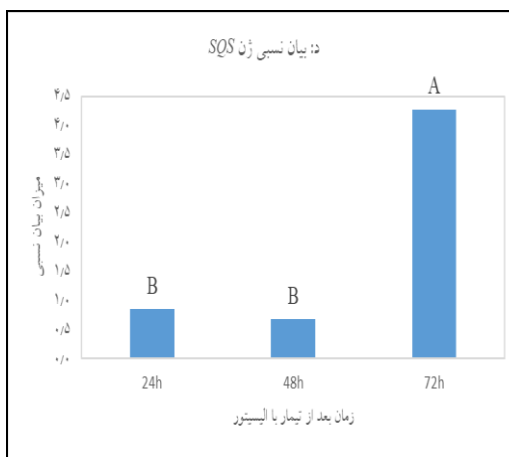
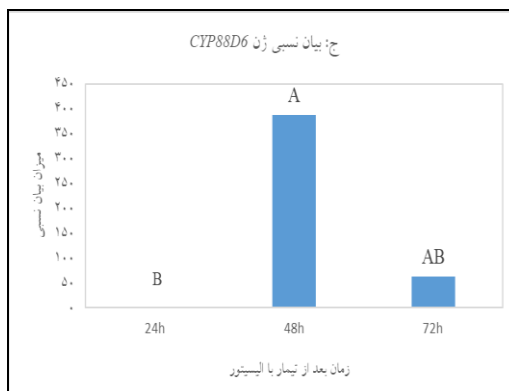
نتایج

ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات، بیشترین بیان نسبی را نشان داد، درحالی‌که در ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد (شکل ۱).

بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنز گلیسیریزین نیز نشان داد که ژن *bAS* در ۲۴ ساعت بعد از تیمار افزایش ۲/۴۵ برابر، در ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۷۶۲۲۹ برابر و در ۷۲ ساعت بعد از تیمار ۳۲۹۶/۰۴ برابر بیان نسب به کنترل نشان دادند. ژن *CYP72A154* در ۲۴ ساعت بعد از تیمار ۰/۵۶۴ برابر، در ۴۸ ساعت ۰/۵۹۸ برابر که نشان‌دهنده کاهش بیان نسبت به کنترل و در ۷۲ ساعت بعد از تیمار، ۱۳۴/۶۵ برابر نسبت به کنترل که نشان‌دهنده افزایش بیان در زمان ۷۲ ساعت بعد از تیمار با الیسیتور بود. ژن *CYP88D6* نیز مشابه ژن *bAS* و ژن *SQS* مشابه ژن *CYP72A154* از نظر افزایش بیان نسبت به کنترل عمل نمودند (جدول ۲).

نتایج تکثیر سلول‌های سوسپانسیون سلولی در حضور متیل جاسمونات با ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنز گلیسیریزین نشان داد که این ژن‌ها در کالوس بیان می‌شوند. ژن *bAS* که اولین ژن در مسیر بیوستنز گلیسیریزین است، در ۴۸ ساعت بعد از تیمار با الیسیتور متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر بیشترین بیان و در ۲۴ ساعت بعد از تیمار تفاوت چندانی با تیمار کنترل نشان نداد (شکل ۱). بررسی بیان نسبی ژن *CYP88D6* نیز نتایج مشابه با ژن *bAS* نشان داده و در ۴۸ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات بیشترین بیان و در زمان ۷۲ ساعت بعد از برداشت، نسبت به کنترل افزایش ولی نسبت به زمان ۴۸ ساعت بعد از تیمار روند کاهشی داشت (شکل ۱). ژن *CYP72A154* در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار نسبت به کنترل کاهش ولی میزان بیان آن در ۷۲ ساعت بعد از تیمار افزایش یافته بود (شکل ۱). ژن *SQS* که اولین ژن دخیل در این مسیر بیوستنزی است نیز، در ۷۲





شکل ۱- بیان نسبی ژن‌های درگیر در مسیر بیوستنز گلیسیریزین، الف: *bAS*، ب: *CYP72A154*، ج: *CYP88D6* و د: *SQS*

جدول ۲- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های درگیر در مسیر بیوستنز گلیسیریزین در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان

میانگین Fold Chang				
<i>SQS</i>	<i>CYP88D6</i>	<i>CYP72A154</i>	<i>bAS</i>	ژن/ زمان بعد از تیمار
۰/۷۰۳	۲/۸۸	۰/۵۶۴	۲/۴۵	۲۴ ساعت
۰/۳۵۷	۷۷۱/۸۵	۰/۵۹۸	۷۶۲۲۹	۴۸ ساعت
۷/۵۵	۱۲۴/۴	۱۳۴/۶۵	۳۲۹۶/۰۴	۷۲ ساعت

(Schoendorf et al. 2001; Jennewein et al. 2001) و درمنه (Teoh et al. 2006) شده بود. دو ژن دخیل در مسیر بیوستنز گلیسیریزین در مراحل نهایی مسیر به نام‌های *CYP88D6* در گونه *uralensis* (Seki et al. 2008) و در گونه *glabra* (Aalami et al. 2016) و ژن *CYP72A154* در گونه *uralensis* از شیرین بیان (Seki et al. 2011) شناسایی شده بود. در این مطالعه تاثیر الیستور متیل جاسمونات در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان بر بیان این دو ژن در مسیر نهایی بیوستنز و دو ژن *bAS* و *SQS* در مراحل اولیه بیوستنز گلیسیریزین بررسی شد. ژن‌های *bAS* (در

بحث

دو ژن که آنزیم‌های دخیل در مراحل اولیه تشکیل اسکولون تریتیرین به نام اسکولون سنتاز (*SQS*) و بتاآمیرین سنتاز (*bAS*)، را رمزبایی می‌کنند، از شیرین بیان گونه *glabra* جدا شده‌اند، ولی هیچ پیشرفتی برای شناسایی ژن‌های دخیل در مسیر چندگانه اکسیداسیون و گلیکوزیلاسیون از بتاآمیرین به گلیسیریزین انجام نشده بود (Seki et al. 2008). تلاش برای کشف ژن‌ها با استفاده از ژنومیکس کاربردی منجر به شناسایی چندین ژن سیتوکروم P450 دخیل در مسیر بیوستنز تریتیرین‌ها در گونه‌های تاکسول

ژن‌ها و تحریک تولید گلیسیریزین در این بافتها شده‌است. همچنین حضور هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد مانند BA و NAA به‌عنوان القا کننده تولید کالوس نیز می‌تواند بر تحریک سنتز گلیسیریزین تأثیر گذار باشد، زیرا در مطالعات قبلی نیز تولید گلیسیریزین در حضور ترکیب هورمون‌های BA و NAA و هورمون TDZ سنتز ولی در حضور ترکیب هورمون‌های 2/4-D و Kin این متابولیت تولید نشده بود (Wongwich et al. 2008). کاربرد قارچ مایکوریز در شرایط تنش خشکی در شیرین بیان گونه *uralensis* میزان گلیسیریزین را افزایش داده و با بیان ژن‌های *bAS*، *SQS1* و *CYP88D6* همبستگی مثبت نشان داد (Xie et al. 2018). ژن‌های القا شده به‌وسیله متیل جاسمونات در اکثر گیاهان مدل نظیر آراییدوپسیس شناسایی شده بود ولی بیان اکثر این ژن‌های القا شده بوسیله متیل جاسمونات ناپایدار بود (Sasaki et al. 2001). سطوح بالای mRNA ژن‌های *bAS* و *SQS* در کشت سلولی شیرین بیان گونه *glabra* در حضور ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات برای بیشتر از سه روز بعد از تیمار دوام آورد در حالی که تجمع mRNA ژن *PKR* درگیر در بیوسنتز ۵ داکسی فلاونوئید ناپایدار بود (Hayashi et al. 2003). در این مطالعه نیز ژن *bAS* و *CYP88D6* در ۲۴ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نسبت به کنترل افزایش بیان نشان داده و تا ۷۲ ساعت بعد از تیمار نیز نسبتاً پایدار و نسبت به کنترل افزایش بیان نشان دادند که این پایداری نسبی بیان در ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز می‌تواند دال بر وجود گلیسیریزین در کشت سلولی این گونه از شیرین بیان باشد. افزایش سطح mRNA ژن‌های *bAS* و *SQS*، تجمع بالای سویاساپونین در سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات را تأیید کرد (Hayashi et al. 2003) همچنین در این مطالعه چون ژن *CYP88D6* در مسیر نهایی بیوسنتز گلیسیریزین دخالت دارد، افزایش بیان آن در ۴۸ ساعت و پایداری نسبی آن در ۷۲ ساعت بعد از تیمار، حضور گلیسیریزین را در سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات تأیید کرد.

تأثیر متیل جاسمونات و جاسمونیک‌اسید در کشت سلولی گیاه *Catharanthus roseus* بررسی و مشاهده شده بود که سلول‌های کشت شده در حضور اکسین هیچ آکالوئیدی تولید نکرده، در

مسیر اولیه بیوسنتز) و ژن *CYP88D6* (در مرحله نهایی بیوسنتز)، ۴۸ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات در فاز ثابت، بیشترین بیان را دارا بودند. ژن *CYP88D6* در ریشه‌ها و استولن‌های شیرین بیان، بیان شده و از نظر الگوی بیان مشابه ژن *bAS* بوده که عمدتاً در بخش‌های زیرزمینی شیرین بیان، بیان می‌شود و به‌طور قوی نقش کلیدی این ژن (*CYP88D6*) به‌عنوان بت‌آمیرین‌اکسیداز در بیوسنتز گلیسیریزین پیشنهاد شده بود (Seki et al. 2008). در این مطالعه نیز این دو ژن (*bAS* و *CYP88D6*) تحت تیمار متیل جاسمونات در فاز ثابت کشت سوسپانسیون سلولی، بیشترین میزان بیان را در ۴۸ ساعت بعد از تیمار دارا بوده که می‌تواند دال بر تشابه عملکرد این دو ژن در گونه‌های شیرین بیان باشد. میزان بیان این دو ژن در ۷۲ ساعت بعد از تیمار نسبت به ۴۸ ساعت بعد از تیمار، کاهش یافته بود که نشان‌دهنده تغییر بیان این ژن‌ها در کشت سلولی شیرین بیان می‌باشد. سطح mRNA سیکلوآزنول سنتز در کشت سلولی شیرین بیان نسبتاً پایدار بود در حالی که سطح mRNA بت‌آمیرین‌سنتز در کشت سلولی شیرین بیان به شدت تغییر کرده بود (Hayashi et al. 2001). در این مطالعه میزان بیان ژن *bAS* بعد از تیمار با متیل جاسمونات بیشتر از ژن *CYP88D6* بود زیرا ژن *bAS* در مسیر بیوسنتز سویاساپونین و گلیسیریزین (در مراحل اولیه بیوسنتز) ولی ژن *CYP88D6* فقط در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین دخالت دارد. (Seki et al. 2000) Hayashi نیز سطح mRNA بت‌آمیرین‌سنتز بالایی را مشاهده کردند، به‌طوری‌که همزمان در کشت سلولی شیرین بیان نیز سویاساپونین به طور فعال تولید شده بود. سطح mRNA بت‌آمیرین‌سنتز در کشت سلولی شیرین بیان با کاربرد صد میکرومولار متیل جاسمونات افزایش و با کاربرد ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار اسیدجبرلیک کاهش یافته بود (Hayashi et al. 2004) که با نتایج این مطالعه با کاربرد متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار مطابقت دارد. با توجه به افزایش سطح mRNA این ژن‌ها در حضور متیل جاسمونات در کشت سلولی می‌توان گفت فرایند سنتز گلیسیریزین علاوه بر ریشه‌ها و استولن‌های شیرین بیان (Seki et al. 2008)، در کالوس نیز مشاهده می‌شود. به‌نظر می‌رسد آنچه که باعث تولید گلیسیریزین در کشت سلولی شده باشد، متیل جاسمونات بوده که باعث فعال‌سازی رونویسی

۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در فاز ثابت رشدی در مقایسه با کنترل مشاهده شد. کاربرد ۲۲ میکرومولار متیل جاسمونات در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه درمنه در ۳۰ دقیقه بعد از تیمار بیشترین افزایش بیان را در ژن *CYP71A1* و کاربرد ۲۰۰ میکرومولار مایکونازول نیز در ۳۰ دقیقه و ۴ ساعت بعد از تیمار به ترتیب بیشترین افزایش بیان را در ژن‌های *CPR* و *DBR2* را در برداشتند در حالی که در ۲۴ ساعت و ۵ روز بعد از تیمار نیز کاهش بیان در این ژن‌ها مشاهده شد (Caretto et al. 2011). در این مطالعه نیز ژن‌های *bAS*، *CYP88D6* در ۴۸ ساعت و ژن‌های *SQS* و *CYP72A154* ۷۲ ساعت بعد از تیمار بیشترین میزان بیان را داشته و بعد از آن روند کاهشی مشاهده شد که این افزایش بیان در زمان نسبتاً کوتاه می‌تواند نشان دهنده پاسخ نسبتاً سریع متیل جاسمونات در میزان بیان و تاثیر آن در افزایش بیان این ژن‌ها باشد. کاربرد ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در کشت سوسپانسیون سلولی سویا در روز سوم بعد از تیمار باعث افزایش بیان ژن‌های *GmCHS7* و *GmIFS2* (دخیل در مسیر بیوستنز ایروفلاونوئیدها در سویا) شد (Jeong et al. 2018) که با نتایج این تحقیق در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان مطابقت دارد.

منابع

Allahdou M, Omidi M, Bihamta M, Abbasi A, Fakheri B (2019) Study of the effect of different antioxidants in reducing the browning of callus and its biomass production in two species of licorice. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 27: 120-131.

Ayabe S, Takano H, Fujita T, Furuya T, Hirota H, Takahashi T (1990) Triterpenoid biosynthesis in tissue cultures of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera*. Plant Cell Reports 9: 181-184.

Bonfill M, Mangas S, Moyano E, Cusido R.M, Palazo J (2011) Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*. Plant Cell Tissue Organ Culture 104:61-67.

Caretto S, Quarta A, Durante M, Nisi R, De Paolis A, Blando F, Mita G (2011) Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua*. Plant Biology 13: 51-58.

Chang S, Puryear S, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter 11: 113-116.

حالی که در حضور متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید، توانایی تولید آلکالوئیدها در این گیاه القا شده بود (Gantet et al. 1998). در این مطالعه نیز افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنز گلیسیریزین، نشان دهنده توانایی تولید این متابولیت در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان در حضور متیل جاسمونات می‌باشد در حالی که مطالعات قبلی عدم توانایی تولید گلیسیریزین را در کشت سلولی این گیاه نشان داده بود (Ayabe et al. 1990) و نیز بر اساس مطالعات انجام شده در گونه *inflat* حضور گلیسیریزین در کشت سلولی به اثبات رسیده بود (Le et al. 2014). تولید سنتلوزوئیدها و فیتوسترول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی *Centella asiatica* در حضور متیل جاسمونات بررسی شده و بیشترین میزان بیان ژن بتا آمیرین سنتاز (*CabAS*) که تشکیل سنتلوزاید را باعث می‌شود، در فاز ثابت رشدی سلول‌های تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات، نسبت به کنترل مشاهده شد در حالی که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات تولید سنتلوزوئید نسبت به کنترل افزایش نیافته و افزایش بیان ژن بتا آمیرین سنتاز نیز مشاهده نشد (Bonfil et al. 2011). در این تحقیق نیز افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنز گلیسیریزین در سلول‌های تیمار شده با

Hayashi H, Huang P, Kirkosyan A, Inoue K, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Kushiro T, Shibuya M Ebizuka, Y (2001). Cloning and Characterization of a cDNA Encoding b-Amyrin Synthase Involved in Glycyrrhizin and Soyasaponin Biosyntheses in Licorice. Biological and Pharmaceutical Bulletin 24: 912-916.

Hayashi H, Fukui H, Tabata M (1988) Examination of triterpenoids produced by callus and cell suspension cultures of *Glycyrrhiza glabra*. Plant Cell Reports 7: 508-511.

Hayashi H, Sakai T, Fukui H, Tabata M (1990) Formation of soyasaponins in licorice cell suspension cultures. Phytochemistry 29: 3127-3129.

Hayashi H, Huang P, Inoue P (2003) Up-regulation of Soyasaponin Biosynthesis by Methyl Jasmonate in Cultured Cells of *Glycyrrhiza glabra*. Plant Cell Physiology 44: 404-411.

Henry M, Marty B (1984) Isolation of licorice protoplasts (*Glycyrrhiza glabra* L. var. *typica* Reg. et Hed.) from cell suspension cultures not producing glycyrrhetic acid. C. R. Academic Science Paris 3: 899-903.

Jennewein S, Rithner C-D, Williams R-M, Croteau R-B (2001) Taxol biosynthesis: taxane 13-hydroxylase is a

cytochrome P450-dependent monooxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98:13595-13600.

Jeong Y, Han C, Park S-C, Pyun JW, Lee J-Y, Kim SW, Kim H-S, Kim YR, Jeong J.C, Kim CY (2018) Methyl jasmonate increases isoflavone production in soybean cell cultures by activating structural genes involved in isoflavonoid biosynthesis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 9:1-38.

Li W, Asada Y, Yoshikawa T (2000) Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Photochemistry 55: 447-456.

Li Y, Yang Y, Fu C, Yu L (2012) Production of Glycyrrhizin in cell suspension of *Glycyrrhiza inflata* batalin cultured in Bioractor. Biotechnology & Biotechnological Equipment 26: 3231-3235.

Lu M.B, Wong H.L, Teng W.L (2001) Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. Plant Cell Reports 20: 674-677.

Mizukami H, Tavira Y, Ellis BE (1993) Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Reports 12:706-709.

Parsaeimehr A, Mousavi B (2009) Producing Friable Callus for suspension Culture in *Glycyrrhiza glabra*. Advances in Environmental Biology 3: 125-128.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29:45.

Saenz-Carbonell L, Loyola-Vargas, VM (1997) Datura stramonium hairy roots tropane alkaloid content as a response to changes in Gamborg's B5 medium. Applied Biochemistry and Biotechnology 61:321-337.

Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kanako T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda T, Shimada H, Takamiya, K, Ohta H, Tabata S (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA microarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. DNA Research 8: 153-161.

Schoendorf A, Rithner C-D, Williams R-M, Croteau, R-B (2001) Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98:1501-1506.

Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T (2008) Licorice -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) 105: 14204-14209.

Seki H, Sawai S, Ohyama K, Mizutani M, Ohnishi T (2011) Triterpene Functional Genomics in Licorice for identification of *CYP72A154* involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. The Plant Cell 23: 4112-4123.

Shirazi Z, Aalami A, Tohidfar M, Sohani M.M (2016) Isolation, cloning and bioinformatics analysis of β -amyrin 11-oxidase coding sequence from licorice. Plant Omics Journal 9:165-171.

Teoh K-H, Polichuk D-R, Reed D-W, Nowak G, Covello P-S (2006) *Artemisia annua* L. (*Asteraceae*) trichome-specific cDNAs reveal *CYP71AV1*, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. FEBS Letters 580:1411-1416.

Toivonen L, Rosenqvist H (1995) Establishment and growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Plant Cell Tissue Organization 41:249-258.

Wongwicha W, Tanaka H, Shoyama W, Tuvshintogtokh I, Putaluna W (2008) Production of Glycyrrhizin in Callus Cultures of Licorice. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen, 63c:413-417.

Xie W, Hao Z, Zhou X, Jiang X, Xu L, Wu S, Zhao A, Zhang X, Chen B (2018) Arbuscular mycorrhiza facilitates the accumulation of glycyrrhizin and liquiritin in *Glycyrrhiza uralensis* under drought stress. Mycorrhiza 28:285-300.

Yoo S, Kim S (1976) Studies in tissue culture of medicinal plants (II). Tissue culture of *Glycyrrhiza glabra* L. var. glandulifera Reg. et Herder. Korean. Journal of Pharmacology 7:55-57.

Zarei A, Zamani Z, Mousavi A, Fatahi R, Karimi Alavijeh M, Dehsara B, Salami S.A (2012) An effective protocol isolation of high-quality RNA from Pomegranate seeds. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology 6: 32-37.

Zhang X, Ding X, Ji Y, Wang S, Chen Y, Luo J, Shen Y, Li P (2018) Measurement of metabolite variations and analysis of related gene expression in Chinese liquorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants under UV-B irradiation. Scientific Reports 8: 1-17.