

بررسی بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز (Geranyl diphosphate synthase) در سطح رونوشت در بافت‌های مختلف گیاه دارویی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)

محمدحسن شمس‌فرد^۱، قادر میرزا قادری^{۲*} و محمد مجدی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، دکترای تخصصی اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
پست الکترونیک: gh.mirzaghaderi@uok.ac.ir

۳- استادیار، دکترای تخصصی اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۱۱

چکیده

مونوترپن‌ها یکی از مهمترین گروه‌های تشکیل‌دهنده ترین‌ها می‌باشند که به صورت موادی مانند لیمونن، کارواکرول و تیموکینون در بذر گیاه سیاه‌دانه وجود دارند. از ژن‌های مهم اثرگذار در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز (*GPPS*) است که تولیدکننده پیش‌ساز مونوترپن‌ها می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی بیان رونویسی این ژن در ژنوتیپ‌های گیاه دارویی سیاه‌دانه بود، بنابراین استخراج RNA، سنتز cDNA، جداسازی و تعیین توالی این ژن از گیاه دارویی سیاه‌دانه انجام شد. در ادامه بیان *GPPS* از طریق RT-PCR نیمه‌کمی، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *GPPS* و *GAPDH* انجام شد. نتایج حاصل از RT-PCR نیمه‌کمی نشان داد که بیان رونویسی ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در بافت‌های ساقه و برگ به طور معنی‌داری بیشتر از بافت‌های ریشه، کپسول و بذر می‌باشد. قطعه توالی‌یابی شده مربوط به ژن *GPPS* در پایگاه داده‌های ژنومی (NCBI) به شماره دسترسی KF614970.1 وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، ژرانیل دی فسفات سنتاز، سیاه‌دانه.

مقدمه

استفاده بشر از گیاهان به‌عنوان دارو از ابتدای تمدن بشری شروع شده و تاکنون ادامه دارد (Eftekharinasab et al., 2012; Masoumi et al., 2012). در ایران از دانه این گیاه به‌عنوان چاشنی در نان، ماست، ترشی و پنیر استفاده می‌شود (Hajhashemi et al., 2004; Rchid et al., 2004). عصاره دانه سیاه‌دانه حاوی انواع مهمی از مونوترپن‌ها از جمله تیموکینون، تیموهِیدروکینون، تیمول، کارواکرول و لیمونن می‌باشد (Bourgou et al., 2010; Morikawa et al., 2010).

استفاده بشر از گیاهان به‌عنوان دارو از ابتدای تمدن بشری شروع شده و تاکنون ادامه دارد (Eftekharinasab et al., 2012; Masoumi et al., 2012). داروهای گیاهی دارای خواص متعدد و عوارض کمتر بوده و در برخی موارد به‌عنوان تنها درمان مؤثر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Huseini et al., 2006; Salem & Hossain, 2000). از جمله این گیاهان، گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.; $2n$)

تأثیر برخی از مونوترین سنتازها ابتدا به ترین، در ادامه به موادی حد واسط و در نهایت به تایموکینون تبدیل می شود. با توجه به اینکه این ژن یک ژن کلیدی در تولید انواع متنوعی از مونوترین ها در گیاه سیاه دانه است بیان رونوشت های آن در این تحقیق در بافت های مختلف گیاه دارویی سیاه دانه بررسی شد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: بذر ۸ ژنوتیپ از گیاه دارویی سیاه دانه که گیاهی دیپلوئید و خودبارور است از مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور دریافت شد (جدول ۱). ژنوتیپ ها در بهار سال ۱۳۹۰ در شرایط مزرعه و در پاییز سال ۱۳۹۰ در شرایط گلخانه در دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان کشت شدند. دو ژنوتیپ ۱۴۹۸۹ و ۱۵۰۷ در این آزمایش ها از نظر طول دوره رشد در نقطه مقابل هم قرار داشتند (شکل ۱) و اختلاف معنی داری با یکدیگر نشان دادند. از این رو این دو ژنوتیپ برای بررسی های بیان ژن در نظر گرفته شدند.

تایموکینون موجود در روغن سیاه دانه از ترکیبات اصلی بذر بوده و اثرات درمانی زیادی از جمله بازدارنده سلول های سرطانی (Gurung et al., 1998; Worthen et al., 2010; al., 2010)، التیام درد، ضد تشنج، ضد التهاب و ضد چربی خون به آن نسبت داده شده است (Al-Majed et al., 2006). محل اصلی تجمع تایموکینون در دانه و پوسته دانه می باشد. تایموکینون در دانه های نارس به میزان ناچیزی وجود دارد ولی همراه با رسیدگی دانه میزان آن به حداکثر می رسد. پس از بلوغ کامل دانه، میزان آن دوباره کمی کاهش می یابد (Botnick et al., 2012).

یکی از مهمترین ژن های مسیر بیوسنتزی مونوترین ها، ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز (GPPS) است. محصول این ژن یعنی آنزیم ژرانیل دی فسفات سنتاز، با اتصال دو مولکول ۵ کربنه دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) و ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) به یکدیگر، ژرانیل دی فسفات ۱۰ کربنه را می سازد که پیش ساز مونوترین هاست (Trapp & Croteau, 2001; Mahmoud & Croteau, 2002). ژرانیل دی فسفات تحت

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ های دریافت شده از مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور

ردیف	شماره دسترسی	محل جمع آوری بذر	تعداد روز تا گل دهی
۱	۸۳۹۵	اردبیل	۵۵
۲	۱۴۹۸۹	اراک	۴۵
۳	۲۳۳۵۲	اردبیل	۵۶
۴	۲۳۷۶۸	قزوین	۵۶
۵	۱۲۶۰۱	همدان	۵۶
۶	۱۶۰۸	همدان	۵۴
۷	۱۵۰۷	خرم آباد	۶۹
۸	۱۴۶۹۶	گلستان	۵۵

Indaice دریافت شد و هم ردیفی آنها با استفاده از نرم افزار آنالیز ClustalW (Thompson et al., 1994) و Boxshade (Thompson et al., 1994) انجام شد. آغازگرهای دژنره با استفاده از نرم افزار Primer3 (Steve & Skaletsky, 1999) در سایت NCBI از روی نواحی حفاظت شده طراحی و توسط شرکت بیونیر سنتز شد. توالی

طراحی آغازگرهای دژنره: ابتدا توالی های نوکلئوتیدی EST ژن GPPS در ۷ گیاه آراییدوپسیس (At)، گوجه فرنگی (SI)، تاج الملوک (Ac)، تنباکو (Nt)، فلفل (Ca)، کلزا (Bn) و سویچ گراس (Pv) به ترتیب با شماره های دسترسی TC137528، TC32312، TC222775، TC368677، TC20943، TC197262 و TC62187 از سایت Plant Gene

روش هضم آنزیمی توسط دو آنزیم *EcoR I* و *Hind III* تأیید گردید و قطعه همسانه شده در پلاسمید توسط شرکت بیونیر توالی‌یابی شد (شکل‌های ۲ و ۳).

بررسی بیان ژن هدف: آغازگرهای اختصاصی از روی نتیجه توالی‌یابی به همراه آغازگرهای ژن خانه‌دار *GAPDH* ساخته شدند. توالی آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس ژن ژرانیل دی‌فسفات سنتاز به ترتیب *5'ACCCAAATCGGTCCGTGATGGT3'* و *5'GCAAGCAAGCTAACGACCTCTGT3'* و آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن *GAPDH* به ترتیب *5'ACCCAAATCGGTCCGTGATGGT3'* و *5'GCAAGCAAGCTAACGACCTCTGT3'* بودند (Scholz *et al.*, 2009).

برای بررسی بیان این ژن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، از پنج بافت ریشه، ساقه، برگ، کپسول و بذر از هر دو ژنوتیپ زودرس و دیررس، RNA استخراج شده و هم‌غلظت گردیدند. پس از استخراج RNA و یکسان‌سازی غلظت‌ها، سنتز cDNA برای هر کدام از بافتها انجام شد.

انجام PCR نیمه کمی (RT-PCR): RT-PCR با استفاده ۵ پیکومول از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس ژن *GPPS* و آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن *GAPDH* و همچنین کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مولار؛ ۰/۲۵ میلی مولار از هر کدام از dNTP؛ ۰/۵ واحد آنزیم تک DNA پلیمراز و ۲ میکرولیتر cDNA با تعداد ۲۹ چرخه به صورت همزمان انجام شد. RT-PCR در ۴ تکرار انجام شد. محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱٪ قرار گرفته و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد (شکل ۴).

تحلیل آماری: داده‌های حاصل از RT-PCR با استفاده از نرم‌افزار ImageJ 1.45 (Abramoff *et al.*, 2004) به صورت کمی در آمده و داده‌های حاصل با نرم‌افزار SAS 9.1 به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. نمودارها در نرم‌افزار Excel رسم گردید.

هم‌ردیفی و رسم دندروگرام: هم‌ردیفی ناحیه تعیین توالی شده از ژن *GPPS* گیاه سیاه‌دانه (*Ns*) با همین ناحیه

آغازگرهای دژنره مسـتقیم *5'ATGGTRGYBGCBGAGGTCC3'* و معکوس *5'TGTSCCYGTGAAATCAAGAACA3'* بود که در آن حروف S, Y, R و B به ترتیب بیانگر بازهای G یا C, C یا T, A یا G و G یا T یا C می‌باشند. نتایج هم‌ردیفی، تکثیر محصولی به طول تقریبی ۶۴۵ جفت باز در واکنش RT-PCR را توسط آغازگرهای دژنره پیش‌بینی می‌کرد. واکنش RT-PCR با استفاده از cDNA سیاه‌دانه از mRNA و H₂O (به‌عنوان کنترل منفی) و از پلاسمید باکتری (به عنوان کنترل مثبت) انجام شد.

استخراج RNA: استخراج RNA به منظور تعیین توالی ژن، در مرحله سه تا چهار برگی رشد گیاه، از برگ ژنوتیپ‌های ۱۴۹۸۹ و ۱۵۰۷ با استفاده از گوانیدینیوم (Chomczynski & Sacchi, 2006) انجام شد و کیفیت آن با استفاده از اسپکتروفوتومتری و ژل آگارز بررسی شد.

سنتز cDNA: سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت ویوانتیس و مطابق دستورالعمل مربوطه به کمک آغازگر Oliog-dT انجام شد.

PCR با آغازگر دژنره: واکنش PCR با اجزای بافر 10X؛ کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مولار؛ ۰/۲۵ میلی مولار dNTP؛ ۵ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۰/۵ واحد آنزیم تک DNA پلیمراز؛ ۲ میکرولیتر cDNA انجام شد. دمای اولیه و اسرشت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه هر کدام شامل ۹۴ (۵۰ ثانیه)، ۶۱ (۵۰ ثانیه) و ۷۲ (۵۰ ثانیه) درجه سانتیگراد و به دنبال آن ۷ دقیقه بسط نهایی در ۷۲ درجه انجام شد. پس از انجام PCR و مشاهده باند مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱٪، این باند با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت ویوانتیس جدا شد.

تعیین توالی باند مورد نظر: قطعه استخراج شده از ژل با استفاده از کیت همسانه‌سازی شرکت ویوانتیس و ناقل pTG19-T در باکتری *E. coli* سویه DH5α (دریافتی از شرکت سینا ژن) به کمک محیط LB حاوی آمپی‌سیلین، مطابق دستورالعمل موجود (Sambrook *et al.*, 1989) همسانه‌سازی شد. سپس پلاسمید، استخراج شده و وجود قطعه مورد نظر با

هم در شرایط گلخانه در سطح ۱ درصد با یکدیگر اختلاف معنی داری داشتند، به طوری که ژنوتیپ ۱۴۹۸۹، ۴۵ روز پس از کشت همزمان وارد مرحله گلدهی شد، در حالی که این مدت برای ژنوتیپ ۱۵۰۷ در حدود ۶۹ روز بود. همچنین ریزش گلبرگ‌ها و خشک شدن کپسول‌ها در ژنوتیپ ۱۴۹۸۹ در حدود ۱۸ روز زودتر از ژنوتیپ ۱۵۰۷ شروع شد. این دو ژنوتیپ همچنین از نظر اندازه ظاهری کاملاً باهم متفاوت بودند (شکل ۱).

آغازگرهای دژنه طراحی شده حاصل از هم‌ردیفی ژن *GPPS* در گونه‌های آرابیدوپسیس (*At*)، کلزا (*Bn*)، گوجه فرنگی (*Sl*)، فلفل (*Ca*)، تنباکو (*Nt*)، تاج‌الملوک (*Ac*) و سوئیچ‌گراس (*Pv*) (شکل ۲) طبق انتظار قطع‌امی در حدود ۶۴۵ جفت باز را در واکنش RT-PCR تکثیر کرد (شکل ۳-ب).

در گیاهان آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی، تاج‌الملوک، تنباکو، فلفل، کلزا و سوئیچ‌گراس دریافتی از پایگاه اطلاعاتی Plant Gene Indices، با استفاده از نرم‌افزار آنالیز ClustalW انجام شد و مناطق حفظ‌شده بین این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار آنالیز Boxshade مشخص شد. دندروگرام بر اساس ناحیه تعیین توالی شده از ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز گیاه سیاه‌دانه و همین ناحیه در گیاهان آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی، تاج‌الملوک، تنباکو، فلفل، کلزا و سوئیچ‌گراس با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 (Kumar et al., 2008) با روش نزدیکترین همسایگی و با بوت استرپ ۱۰۰ رسم شد.

نتایج

طول دوره رشد ژنوتیپ‌های ۱۴۹۸۹ و ۱۵۰۷ سیاه‌دانه که در این تحقیق از آنها استفاده شد هم در شرایط مزرعه و



شکل ۱- (a) کشت گلخانه‌ای ژنوتیپ زودرس (۱۴۹۸۹) و دیررس (۱۵۰۷)، (b) کشت گلدانی همان ژنوتیپ‌ها در شرایط مزرعه (۴۵ روز پس از کشت همزمان)

At-GPPS 426 TCACTTCTTAGTAATAAGTTGAGAGAGATGGTACTTGCCGAGGTTCCAAAGCTTGGCTCT
 Bn-GPPS 367 TCACTTCTTAGTAATAAGTTGAGAGCCATGGTAGTTGCCGAGGTGCCGAAGCTTGGCTCT
 Sl-GPPS 275 TCCCTTCTGACAAAACAGGCTGAGATCAATGGTAGTCCGGGAGGTCCCCAAAGCTGGCTTCA
 Ca-GPPS 422 TCCCTTCTGACTAACAGGCTGAGATCAATGGTAGTTGCTGAGGTCCCCAAAGCTGGCTTCA
 Nt-GPPS 438 TCCCTTCTGACAAAACAGGCTGAGATCAATGGTAGTTGCCGAGGTCCCCAAAGCTGGCTTCA
 Ac-GPPS 292 TCAATTGTTGCAAATAGATTGCGAGCAATGGTGGTGGCTGAGGTCCCTAAGCTTGGCTCA
 Pv-GPPS 377 TCACTCGTTGAGATAGATTACGATGCATGGTGGCTGGTGGAGGTCCCCAAACTGGCATCA

At-GPPS 486 GCTGCTGAGTACTTCTTCAAAGGGGTGTGCAAGGAAAACAGTTTCGTTCAACTATTTTG
 Bn-GPPS 427 GCGGCTGAATACTTCTTCAAAGGGGTGTGCAAGGAAAACAGTTTCGTTCAACTATTTTG
 Sl-GPPS 335 GCTGCTGAAATATTTCTTCAAAGTGGGAGTAGAAGGAAAGAGGTTTCGACCAACAGTTTG
 Ca-GPPS 482 GCTGCTGAGTATTTTCAAAGTGGGAGTAGAAGGAAAGAGGTTTCGACCCACAGTTCTG
 Nt-GPPS 498 GCTGCTGAGTATTTCTTCAAAGTGGGAGTAGAAGGAAAGAGGTTTCGACCCACAGTTCTG
 Ac-GPPS 352 GCTGCTGAGTATTTCTTCAAAGTGGGAGTTGAGGAAAGAGATTTCGTTCCACGGTTCTG
 Pv-GPPS 437 GCAAGCTGAGTACTTTTCAAAGTGGGAGCTGAGGAAAGAAATTCGACCTACCGTTTG

At-GPPS 546 CTGCTGATGGCCACAGCTCTGAATGTACGAGTTCAGAAAGCA--TTGATTGGGGAATCAA
 Bn-GPPS 487 CTGTTGATGGCCACCGCTCTGAATGTACGCGTACCAGAAGCA--TTGGCTGCTGAATCAG
 Sl-GPPS 395 CTATTGATGGCAACTGCATTGAACGTACAGATTCCCTAGATCTGCTCCGAGGTGGAT--G
 Ca-GPPS 542 CTGTTGATGGCAACTGCATTGAACGTACAGATTCCCTAGATCTGCTCCGAGGTGGAT--G
 Nt-GPPS 558 CTGTTGATGGCAACGGCACTGAACCGCACCGGTACTTAGA-----CCCCAGGTGGAT--G
 Ac-GPPS 412 TTGTTGATGGCTTCGGCTTTTAAATTTGACTTCCCAAATTTGGCTCCACAATGCTTT--A
 Pv-GPPS 497 TTAAGTATGCTTACTGATGGCTTCAGCTCTCAAATTTCCCTCTCAGAATCAA--CAGAGGGCGGAGTTC

At-GPPS 604 CAGATATAGTTCACATCA--GAATTACCGCTAAGGCAACCGGGTATTGCTGAAATCACTGA
 Bn-GPPS 545 CAGATATAGTTCACATCA--GAATTACCGCTAAGGCAACCGGGTATTGCTGAAATCACTGA
 Sl-GPPS 453 TTGATTCCTTTTCCGGGGATTTGCGTACAAGGCAGCAGTGTATAGCTGAGATCACTGA
 Ca-GPPS 600 ATGATTCCTTTTCCGGGGATTTGCGTACAAGGCAGCAGTGTATAGCTGAGATCACTGA
 Nt-GPPS 610 TTGATTCCTTTTCCAGGGATTTGCGTACAGGCAGCAGTGTATAGCTGAAATCACTGA
 Ac-GPPS 470 CGGACTCCTTACCCAGCGAATTGCGTACAAGGCAGCAGTGTATTGCTGAGATCACTGA
 Pv-GPPS 555 TCAGTATCTTAGT--GGATAAATCTCTGCGCACCCCATCTGAACATTGCAAGATACCGGA

At-GPPS 662 AATGATACACGTCGCAAGTCTACTGCACGATGATGTCTTGGATGATGCCGATACAAGGCG
 Bn-GPPS 605 AATGATACATGTTGCAAGCCTACTGCATGATGATGTCTTGGATGATGCCGATACAAGGCG
 Sl-GPPS 511 GATGATCCATGTTGCTAGCCTACTTCATGATGATGTACTGGATGATGCTGACACAAGACG
 Ca-GPPS 658 GATGATCCATGTTGCCAGCCTACTTCATGATGATGTACTGGATGATGCTGACACAAGACG
 Nt-GPPS 668 GATGATCCATGTTGCCAGCCTACTTCATGATGATGTACTAGATGATGCTGACACAAGACG
 Ac-GPPS 528 AATGATTATGTTGCAAGCCTTCTTACCGATGATGTTTTAGATGATGCAAGAAACAAGACG
 Pv-GPPS 613 GATGATTCATGTCGCAAGCCTTCTGCATGATGATGTCTAGATGATGCTGATACTAGGCG

At-GPPS 722 TGGTGTGGTTCCTTAAATGTTGTAATGGGTAACAAGATGTCGGTATTAGCAGGAGACTT
 Bn-GPPS 665 TGGTGTGGTTCCTTAAACTTTGTAATGGGTAACAAGATGTCGGTATTAGCAGGAGACTT
 Sl-GPPS 571 TGGGATAGGTTCTTTAAACTTTGTGATGGGAAATAAGCTAGCTGTACTAGCCGGAGACTT
 Ca-GPPS 718 TGGGATAGGTTCTTTAAACTTTGTGATGGGAAATAAGCTAGCTGTACTAGCCGGAGATTT
 Nt-GPPS 728 TGGGATAGGTTCTTTAAACTTTGTGATGGGAAATAAGTATAGCTGTACTAGCTGGAGACTT
 Ac-GPPS 588 CGGTATTGGTTCATTAATAATGTCATGCGGAAATAAGCTAGCTGTCTAGCAGGAGATTT
 Pv-GPPS 673 TGGTGTGAGTTCGTTGAATCTTGTATGCGGAAACAAGCTCTCTGATTTGCAAGGTGACTT

At-GPPS 782 CTGCTCTCCCGGGCTTGTGGGGCTCTCGCTGCTTTAAAGAACACAGAGGTTGTAGCATI
 Bn-GPPS 725 TTTGCTCTCTCGGGCTTGTGTGGCTCTTGTGCTCTTAAAACACAGAGGTTGTATCGTIT
 Sl-GPPS 631 TTTGCTTCCCGAGCATGTGTGGCACTTGCCTCCTTGAAGAACACAGAGGTTGTATGCTCT
 Ca-GPPS 778 TCTGCTTCCCGAGCATGTGTGGCACTTGCCTCCTTGAAGCACACAGAGGTTGTATCTCT
 Nt-GPPS 788 TCTGCTTCCCGAGCGTGTGTGGCACTTGCCTCCTTGAAGAAACACAGAGGTTGTATCCCT
 Ac-GPPS 648 CCTGCTCTCTAGAGCTTGTGTAGCATGCTTGCCTTCAATTGAAAACACAGAGGTTGTATCCTT
 Pv-GPPS 733 CTTCTGTCTAGAGCATGTGTGGCACTTGCAGCACTTGGGAACACAGAGGTTGTATCCTT

At-GPPS 842 ACTTGCAACTGCTGTAGAATCTTGTACTGGTGAACCATGGAGATAACTAGTTCAAC
 Bn-GPPS 785 ACTTGCAACTGTTGTAGAATCTTGTACTGGTGAACCATGCAATGACTAGCACAAAC
 Sl-GPPS 691 TCTGGCAACTGTTGTGGAACATCTTGTACTGGAGAGACAATGCAATGACCACTTCTTC
 Ca-GPPS 838 TCTGGCAACTGTTGTGGAACATCTTGTACTGGGAGAGACAATGCAATGACCACTTCTTC
 Nt-GPPS 848 TCTGGCAACTGTTGTGGAACATCTTGTACTGGAGAGACAATGCAATGACCACTTCTTC

Ac-GPPS 708 ACTTGCATAAGTTGTGGAGCATCTAGTAACTGGCGAAACCATGCAAAATGACAACACTACATC
 Pv-GPPS 793 AATGGCAACTGCTGTAGAACATCTAGTTACTGGTGAAACTATGCAGATCTCAACAAGCAG

At-GPPS 902 CGAGCAGCGTTATAGTATGGACTACTACATGCAGAAGACATATTATAAGACAGCATCGCT
 Bn-GPPS 845 CGATCAGCGTTCATAGTATGGACTACTACATGCAGAAGACATATTATAAGACCGCATCACT
 Sl-GPPS 751 TGATGAACGTTGTAGCATGGAGTATTAATGCAGAAAACATATTACAAGACTGCATCAAT
 Ca-GPPS 898 TGATGAACGTTGTAGCATGGATTATTACATGCAGAAAACATATTACAAGACTGCATCAAT
 Nt-GPPS 908 AGATGAACGTTGTAGCATGGATTATTACATGCAGAAAACATATTACAAGACTGCATCAAT
 Ac-GPPS 768 TGATGAACGGTGTAGTATGGAGTATTAATGCAGAAAAGACGTTCTACAAAACAGCTTCGCT
 Pv-GPPS 853 AGAGCAACGACGAAGCATGGAACACTACTGTCAGAAGACATACTACAAAACAGCATCACT

At-GPPS 962 AATCTCTAACAGCTGCAAAGCTCTTGCCGTTCTCACTGGACAAACAGCAGAAGTTGCCCT
 Bn-GPPS 905 AATCTCAAACAGCTGCAAAGCAGTTGCATTACTCGCTGGACAATCAGCAGAAGTTGCCAT
 Sl-GPPS 811 GATTTCAAATAGTTGCAAAGCAATTGCACTACTTGTGGGCAATAGTGCTGAAGTCTCCGT
 Ca-GPPS 958 GATTTCAAATAGTTGCAAAGCATTGCACTACTTGTGGGCACTACTGCTGAAGTCTCCGT
 Nt-GPPS 968 AATTTCAAACAGTTGCAAAGCAATAGCCCTACTTGTGGGCACTACTGCTGAAGTCTCCAT
 Ac-GPPS 828 TATTTCAAACAGCTGCAAAGGCGATTGCTATTCTCACAGGACAAACAGCAGAAGTATCAAC
 Pv-GPPS 913 GATATCAAATAGTTGCAAAGGCTGTGCTATTCTTGCAAGGGCACACTGCTGAGGTTCTCAAT

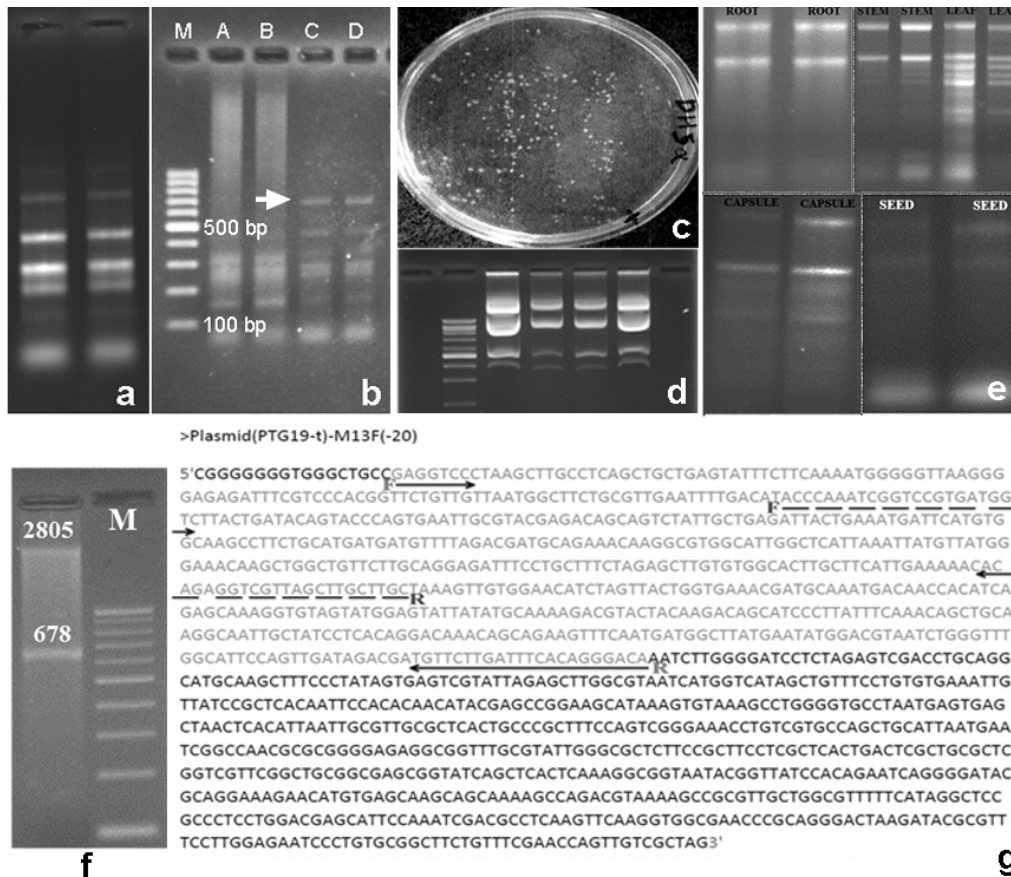
At-GPPS 1022 GTTAGCTTTTGAATATGGGAGGAATCTGGGTTTAGCATTCCAATTATAGACGACATTCT
 Bn-GPPS 965 GTTAGCTTTTGAATACGGGAAGAATCTGGGCTTGGCATTCCAATTGATAGACGACGTTCT
 Sl-GPPS 871 GCTGGCTTTTGAATACGGAAAAAATCTGGGATTGGCATTCAATTATAGATGATGTTCT
 Ca-GPPS 1018 GTTGGCTTTTGAATACGGAAAAAATCTGGGATTGGCATTCAATTGATAGATGATGTTCT
 Nt-GPPS 1028 GTTGGCTTTTGAATATGGGAAAAAATTTGGGCTTGGCATTCAATTATAGACGATGTTCT
 Ac-GPPS 888 GCTGGCTTATGAATATGGACGTTAATCTGGGTTTGGCATTCCAGTTGATAGATGATGTTCT
 Pv-GPPS 973 GCTTGCCTACGAATATGGTTCGAAACTTGGGTTTGGCGTTCCAGTTGATTGACGATGTTCT

At-GPPS 1082 TGATTTACGGGCACATCTGCCTCTCTCGGAAAGGGATCGTTGTCAAGATATTCCGCATGG
 Bn-GPPS 1025 TGACTTCACCGGCACATCTGCCTCTCTAGGAAAGGGATCCTTATCAGACATCCGACATGG
 Sl-GPPS 931 TGATTTACGGGCACATCTGCAACTCTTGGCAAGGGTTCATTGTCTGATATTCCGTCATGG
 Ca-GPPS 1078 TGATTTACGGGTACATCTGCAACCCTTGGCAAGGGTTCATTGTCTGATATTCCGTCATGG
 Nt-GPPS 1088 TGATTTCAACGGCACATCTGCCACCCTCGGCAAGGGTTCATTGTCTGATATTCCGTCATGG
 Ac-GPPS 948 TGATTTACGGGCACA TCAGCTTCCCTCGGAAAGGGCTCCTTGTCAAGATATTCCGTCATGG
 Pv-GPPS 1033 AGATTTACGGGCACATCCGCATCCCTTGGGAAGGGTTCATTATCTGATATTCCGCATGG

شکل ۲- بخشی از هم‌ردیفی ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز (GPPS) در گیاهان آراییدوپسیس (At)، گوجه فرنگی (Sl)،

تاج‌الملوک (Ac)، تنباکو (Nt)، فلفل (Ca)، کلزا (Bn) و سوئیچ‌گراس (Pv)

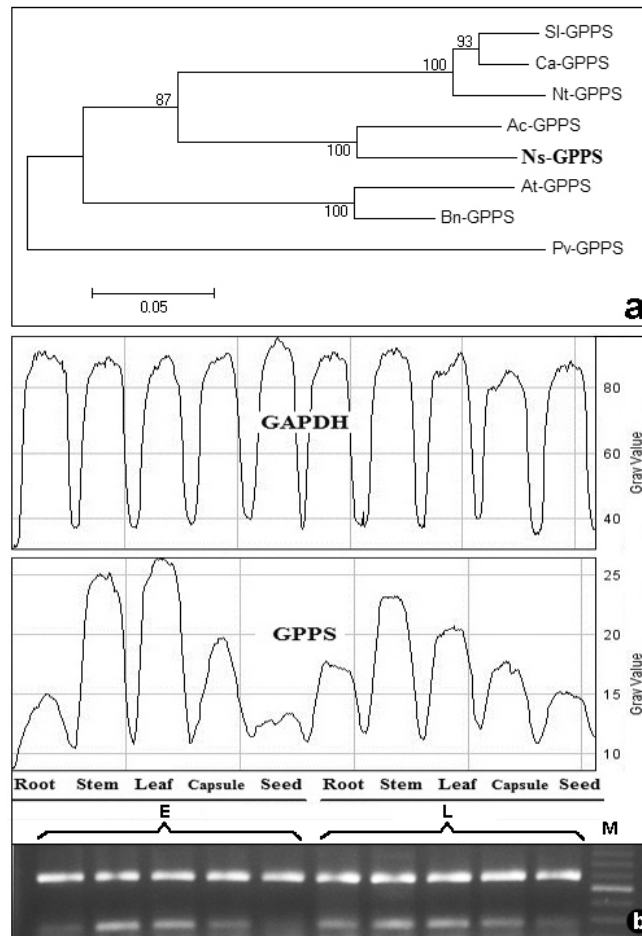
موقعیت آغازگرهای دژنره با پیکان نشان داده شده است.



شکل ۳- (a) نمونه RNA استخراج شده از برگ گیاه سیاه‌دانه ژنوتیپ زودرس و دیررس در ژل آگارز ۲٪ (b) قطعه تکثیر شده توسط آغازگرهای دژنره در واکنش RT-PCR با وزن مورد انتظار حدود ۶۴۵ bp در ژل آگارز ۲٪. واکنش‌ها برای ستون‌های A، B، C و D به ترتیب در ۵۷، ۵۹/۵/۶۰ و ۶۱ درجه سانتی‌گراد انجام شد. (c) همسانه‌های تراریخت شده از باکتری *E. coli* ایزوله DH5a بر روی محیط کشت LB دارای آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین. (d) پلاسمید استخراج شده از همسانه‌های رشد کرده بر روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین. (e) استخراج RNA از بافت‌های مختلف دو ژنوتیپ زودرس و دیررس گیاه سیاه‌دانه در ژل آگارز ۲٪ RNA در هر بافت از چپ به راست به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های زودرس و دیررس می‌باشند. (f) هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب توسط دو آنزیم *Hind III* و *EcoR I* حاصل از ژنوتیپ دیررس. (g) توالی قطعه همسانه‌سازی شده. توالی روشن‌تر قطعه همسانه شده است که موقعیت آغازگرهای دژنره (پیکان ممتد) و آغازگرهای اختصاصی (پیکان منقطع) بر روی آن نشان داده شده است. F: آغازگر مستقیم و R: آغازگر معکوس است. M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

استفاده از آنزیم‌های *Hind III* و *EcoR I* وجود قطعه مورد نظر در پلاسمید اثبات شد، به طوری که دو قطعه با اندازه‌های حدود ۶۷۸ و ۲۸۰۵ (اندازه‌های مورد انتظار) جفت باز مشاهده شدند (شکل ۳-f). توالی قطعه همسانه‌سازی شده از ژن *GPPS* پس از توالی‌یابی در سایت NCBI ثبت شده و با شماره دسترسی KF614970 موجود است.

روش تک مرحله‌ای مبتنی بر گوانیدینوم (Chomczynski & Sacchi, 2006) برای استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب از بافت‌های برگ، ریشه، ساقه، کپسول و بذر گیاه دارویی سیاه‌دانه مناسب بود (شکل ۳-a). برای اثبات وجود قطعه مورد نظر در همسانه‌های رشد کرده بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک، پس از استخراج پلاسمید و برش با



شکل ۴- (a) دندروگرام ناحیه توالی یابی شده از ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز سیاه دانه (*Ns*) با همین ناحیه در گیاهان آرابیدوپسیس (*At*), گوجه فرنگی (*SI*), تاج الملوک (*Ac*), تنباکو (*Nt*), فلفل (*Ca*), کلزا (*Bn*) و سویچ گراس (*Pv*) به روش نزدیکترین همسایگی در نرم افزار *MEGA 4*. خط مقیاس تشابه را نشان می دهد. (b) نتیجه *RT-PCR* نیمه کمی مربوط به بیان رونویسی ژن های *GPPS* (باند پایین ژل) و *GAPDH* (باند بالای ژل) در دو ژنوتیپ زودرس (*E*) و دیررس (*L*) و مقادیر کمی شده متناظر با آنها با استفاده از نرم افزار *ImageJ* (M) نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

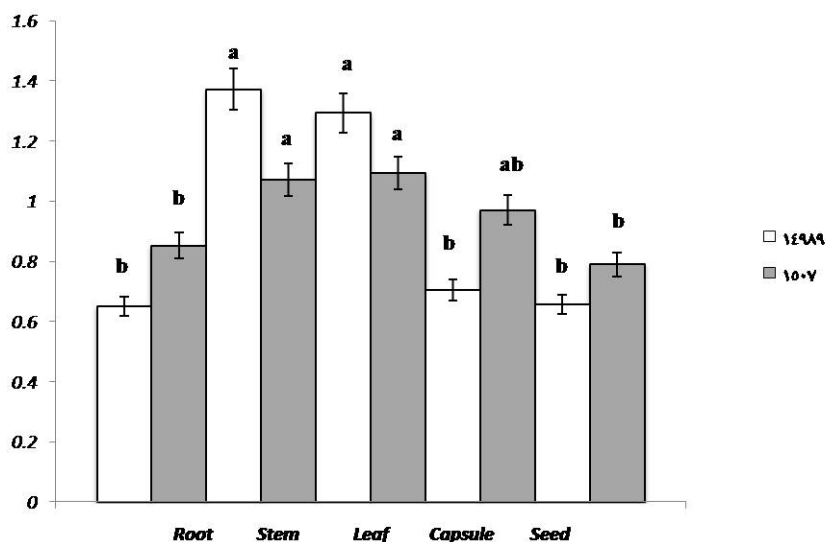
موضوع نشان دهنده تشابه بیشتر این ژن در گیاهان هم خانواده می باشد (شکل ۴- a).
 شدت باندها در ژل های به دست آمده توسط نرم افزار *ImageJ* به صورت کمی در آمده و داده های حاصل مورد بررسی آماری قرار گرفتند. بررسی نتایج *RT-PCR* نیمه کمی با استفاده از نرم افزار *ImageJ* نیز نشان داد که بیان رونویسی ژن خانه دار *GAPDH* در بافت های ریشه، ساقه، برگ، کپسول و بذر دو ژنوتیپ دیررس و زودرس گیاه

دندروگرام بر اساس ناحیه توالی یابی شده ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز گیاه سیاه دانه و همین ناحیه در هفت گونه گیاهی دیگر با روش نزدیکترین همسایگی نشان داد که سیاه دانه با تاج الملوک (*Aquilegia caerulea*) و همچنین آرابیدوپسیس با کلزا نیز با بوت استریی برابر با ۱۰۰ نیز کنار هم قرار گرفته اند و سه گیاه فلفل، تنباکو و گوجه فرنگی نیز در یک خوشه واقع شده اند. تمام گیاهانی که با هم در یک خوشه قرار گرفته اند هم خانواده می باشند که این

دی فسفات سنتتاز با سه بافت دیگر یعنی ریشه، کپسول و بذر وجود داشت (شکل ۵).

در مورد رونویسی ژن ژرانیل دی فسفات سنتتاز در سه بافت ریشه، کپسول و بذر دو ژنوتیپ مورد مطالعه، در ژنوتیپ زودرس بافت های کپسول، ریشه و بذر به ترتیب بیشترین تا کمترین میزان رونویسی ژن ژرانیل دی فسفات سنتتاز را به خود اختصاص دادند که این موضوع در مورد سه بافت ریشه، کپسول و بذر ژنوتیپ دیررس هم صادق می باشد (شکل ۵).

سیاه دانه تقریباً به میزان یکسانی بوده است. نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی (شکل ۴-ب) و تجزیه واریانس داده های میزان رونویسی ژن ژرانیل دی فسفات سنتتاز بین دو نوع ژنوتیپ زودرس و دیررس اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵ ندارد. در حالی که اختلاف معنی داری بین بافت های مختلف مشاهده شد. به طوری که در بین پنج بافت مورد مطالعه در هر دو نوع ژنوتیپ زودرس و دیررس اختلاف معنی داری در میزان بیان رونویسی ژن ژرانیل



شکل ۵- نمودار میزان بیان رونویسی ژن ژرانیل دی فسفات سنتتاز در بافت های مختلف دو ژنوتیپ زودرس (۱۴۹۸۹) و دیررس (۱۵۰۷) سیاه دانه. خطای معیار هر میانگین در بالای ستون مربوطه نشان داده شده است. حروف مشابه نشان دهنده گروه بندی حاصل از مقایسه میانگین ها به روش $LSD_{0.05}$ می باشد.

می شود (Mahmoud & Croteau, 2002). ژرانیل دی فسفات برای بیوسنتز دی ترین ها، پلاستوکوینون و کلروفیل ها مورد نیاز است (Wang & Dixon, 2008). کلروفیل و پلاستوکوینون هر دو برای انجام فتوسنتز در بافت های فتوسنتز کننده گیاه از جمله برگ لازم و ضروری می باشند، از این رو می توان دلیل بالا بودن بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتتاز در بافت های فتوسنتز کننده مانند برگ و ساقه را با این موضوع در ارتباط دانست.

بحث

ژرانیل دی فسفات که محصول آنزیم ژرانیل دی فسفات سنتتاز است پس از ایجاد می تواند دو مسیر را ادامه دهد، مسیر اول مسیری است که در پایان منجر به تولید مونوترین ها می شود و مسیر دوم مسیری است که در طی آن ژرانیل دی فسفات تحت تأثیر آنزیم فارنسیل دی فسفات سنتتاز تبدیل به فارنسیل دی فسفات و در ادامه فارنسیل دی فسفات تبدیل به ژرانیل دی فسفات

سنتازها در بافت برگ، در نتیجه میزان بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز که تولیدکننده پیش ساز اصلی مونوترپین ها یعنی ژرانیل دی فسفات می باشد نیز باید در بافت برگ بالا باشد.

بررسی های انجام شده نشان داده است که ژرانیل دی فسفات برای بیوسنتز جیبرلین ها ضروریست، به طوری که پس از به وجود آمدن ژرانیل دی فسفات توسط ژرانیل دی فسفات سنتاز، این ماده تحت تأثیر آنزیم ژرانیل ژرانیل دی فسفات سنتاز، تبدیل به ژرانیل ژرانیل دی فسفات شده و در ادامه به ترتیب تحت تأثیر آنزیم های انت-کوپالیل دی فسفات سنتاز، انت-کورن سینتاز و انت-کورن اکسیداز به انواع متنوعی از هورمون جیبرلین تبدیل می شود (Van Schie *et al.*, 2007). کاهش بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در گوجه فرنگی باعث پاکوتاه شدن شدید گیاه تیمار شده می شود (Van Schie *et al.*, 2007) که این امر به علت دخیل بودن ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در مسیر بیوسنتزی جیبرلین می باشد. بررسی بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در بافت های مختلف گیاه یونجه با استفاده از تکنیک Real time RT-PCR نشان داده است که این ژن در تمام بافت های این گیاه بدون تفاوت بیان می شود، همچنین بیان این ژن در پاسخ به تیمار متیل جاسمونات در گیاه یونجه افزایش می یابد (Sun *et al.*, 2013). افزایش بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در گیاه نعناع با استفاده از روش های مهندسی متابولیک باعث افزایش میزان برخی از مونوترپین های موجود در اسانس این گیاه شده است (Lange *et al.*, 2011).

از آنجا که هورمون جیبرلین یکی از هورمون های اساسی گیاه به شمار می رود و باعث طویل شدن ساقه و توسعه برگ می شود (Alamgir and Peng, 2003). بنابراین با توجه به نقش اثرگذار ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در مسیر تولید هورمون جیبرلین، این امر می تواند دلیل دیگری برای بیان بالای ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در بافت های ساقه و برگ باشد.

البته مطالعات اندکی در مورد بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در بافت های مختلف گیاهی انجام شده است، ولی با این حال نتایج تحقیقات بر روی برخی از گیاهان نیز از بیان بالای ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در بافت های برگ و ساقه خبر می دهد؛ به طوری که بررسی ژن کدکننده زیر واحد کوچک و ژن کدکننده زیر واحد بزرگ آنزیم ژرانیل دی فسفات سنتاز در بافت های مختلف گیاه گل میمونی نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن کدکننده زیر واحد بزرگ در بافت های برگ و کاسبرگ می باشد، ولی میزان رونویسی ژن کدکننده زیر واحد کوچک در بافت گلبرگ بالاترین میزان را داراست (Tholl *et al.*, 2004). همچنین در تحقیقی دیگر میزان بیان ژن کدکننده زیر واحد کوچک و بزرگ این آنزیم در گیاه رازک در بافت های ساقه، برگ، گل و کرک ها بررسی شد که نتایج نشان داد ژن کدکننده زیر واحد بزرگ بالاترین بیان را در بافت های کرک، برگ و ساقه و ژن کدکننده زیر واحد کوچک بالاترین بیان را در بافت های کرک و گل داراست (Wang & Dixon, 2008).

از آنجا که در یک گیاه بافت هایی مانند برگ و ساقه به عنوان اندام های تولیدکننده و بافت هایی مانند بذر به عنوان بافت ذخیره ای برای انواع متابولیت ها می باشند و با توجه به اینکه بیشتر مونوترپین ها در بافت های ذخیره ای مانند بذر و پوسته بذر سیاه دانه انباشته شده اند (Botnick *et al.*, 2012) می توان اینگونه برداشت کرد که مونوترپین ها ابتدا در برگ ساخته شده و بعد برای ذخیره و مصرف به سایر بافت ها مخصوصاً گل و بذر منتقل می شوند. به طوری که در تحقیقی که بر روی برخی مونوترپین سنتاز-های گیاه درمنه انجام شده است مشخص شده که مونوترپین سنتازها در برگ های جوان و پیر و همچنین بافت جوانه گل این گیاه به میزان بیشتری نسبت به سایر بافت ها موجود می باشند (Olofsson *et al.*, 2011). با در نظر گرفتن این موضوع که ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز یکی از ژن های کلیدی در تولید مونوترپین ها می باشد، می توان این گونه برداشت کرد که به دلیل بالا بودن میزان مونوترپین

منابع مورد استفاده

- placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research*, 20: 1036–1039.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. and Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306.
 - Lange, B.M., Mahmoud, S.S., Wildung, M.R., Turner, G.W., Davis, E.M., Lange, I., Baker, R.C., Boydston, R.A. and Croteau, R.B., 2011. Improving peppermint essential oil yield and composition by metabolic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 18: 16943-16948.
 - Mahmoud, S.S. and Croteau, R.B., 2002. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7: 366-373.
 - Masoumi, S.M., Kahriz, D., Rostami Ahmadvandi, H., Sourni, J., Kani, Sara., Mostafaei., A., Yari, K. 2012. Genetic diversity study of some medicinal plant accessions belong to Apiaceae family based on seed storage proteins patterns. *Molecular Biology Reports*, 39: 10361-10365.
 - Morikawa, T., Xu, F., Ninomiya, K., Matsuda, H. and Yoshikawa, M., 2004. Nigellamines A3, A4, A5, and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52: 494-497.
 - 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.
 - Rchid, H., Chevassus, H., Nmila, R., Guiral, C., Petit, P., Chokaïri, M. and Sauvaire, Y., 2004. *Nigella sativa* seed extracts enhance glucose-induced insulin release from rat-isolated Langerhans islets. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 18: 525–529.
 - Salem, M.L. and Hossain, M.S., 2000. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *International Journal of Immunopharmacology*, 22: 729-740.
 - Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 3th Ed. Cold Spring Harbor, NY, 2679289-9293.
 - Scholz, M., Lipinski, M., Leupold, M., Luftmann, H., Harig, L., Ofir, R., Fischer, R., Prüfer, D. and Müller, K.J., 2009. Methyl jasmonate induced accumulation of kalopanaxsaponin I in *Nigella sativa*. *Phytochemistry*, 70: 517–522.
 - Steve, R. and Skaletsky, H.J., 1999. Primer3 on the www for General Users and for Biologist
 - Abramoff, M.D., Magalhães, P.J. and Ram, S.J., 2004. Image processing with Image. *J. Biophotonics International*, 11: 36-42.
 - Al-Majed, A.A., Al-Omar, F.A. and Nagi, M.N., 2006. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. *The European Journal of Pharmacology*, 543: 40-47.
 - Botnick, I., Xue, W., Bar, E., Ibdah, M., Schwartz, A., Joel, D.M., Lev, E., Fait, A. and Lewinsohn, E., 2012. Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. *Molecules*, 17: 10159-10177.
 - Bourgou, S., Pichette, A., Marzouk, B. and Legault, J., 2010. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany*, 76: 210–216.
 - Bouvier, F., Suire, C., D'Harlingue, A., Backhaus R.A. and Camara, B., 2000. Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *The Plant Journal*, 24: 241-252.
 - Chomeczynski, P. and Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1: 581-585.
 - El-Dakhkhany, M., 1963. Studies on the chemical constitution of Egyptian *N. sativa* L. seeds. *Planta Medica*, 11: 465 - 470.
 - Eftekharinasab, N., Zarei, D., Paidar, S., Jafari Moghadam M., Kahrizi, D., Khanahmadi M. and Chenari P., 2012. Identification of wild medicinal plant in Dalahoo mountain and their used indigenous knowledge (Kermanshah, Iran). *Annals of Biological Research*. 3: 3234-3239.
 - Gurung, R.L., Lim, S.N., Khaw, A.K., Soon, J.F., Shenoy, K., Ali, S.M., Jayapal, M., Sethu, S., Baskar, R. and Hande, M.P., 2010. Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. *PLoS One*, 5: e12124.
 - Hajhashemi, V., Ghannadi, A. and Jafarabadi, H., 2004. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytotherapy Research*, 18: 195-199.
 - Huseini, H.F., Larijani, B., Heshmat, R., Fakhrzadeh, H., Radjabipour, B., Toliat, T. and Raza, M., 2006. The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn.(silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind,

- and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Trapp, S.C. and Croteau, R.B., 2001. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 158: 811-832.
 - Van Schie, C.C., Ament, K., Schmidt, A., Lange, T., Haring, M.A. and Schuurink, R.C., 2007. Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins. *The Plant Journal*, 52: 752-762.
 - Wang, G. and Dixon, R.A., 2008. Heterodimeric geranyl (geranyl) diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 14: 1-6.
 - Worthen, D.R., Ghosheh, O.A. and Crooks, P.A., 1998. The *in vitro* anti-tumor activity of some crude and purified components of black seed, *Nigella sativa*. *Anticancer Research*, 18: 1527-1532.
 - Programmers. In: Misener, S. & Krawetz S.A. (Eds.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press: 365-386.
 - Sun, Y., Long, R., Kang, J., Zhang, T., Zhang, Z., Zhou, H. and Yang, Q., 2013. Molecular cloning and characterization of three isoprenyl diphosphate synthase genes from alfalfa. *Molecular Biology Reports*, 40: 2035-2044.
 - Tholl, D., Kish, C.M., Orlova, I., Sherman, D., Gershenzon, J., Pichersky, E. and Dudareva, N., 2004. Formation of Monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* Flowers Involves Heterodimeric Geranyl Diphosphate Synthases. *The Plant Cell Online*, 16: 977-992.
 - Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties

Transcript expression analysis of geranyl diphosphate synthase gene in different tissues of black cumin (*Nigella sativa* L.)

M.H. Shamsi-Fard¹, G. Mirzaghaderi^{2*} and M. Majdi³

1- M.Sc., Students, Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan, I.R.Iran

2* - Corresponding author, Assist. Prof., Plant breeding, Department of Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran,
Email: gh.mirzaghaderi@uok.ac.ir

3- Assit. Prof., Plant breeding, Department of Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran

Received:02.09.2013 Accepted:03.12.2014

Abstract

Monoterpenes are one of the major groups of terpenes which are present in black cumin (*Nigella sativa* L.) as limonene, carvacrol, thymoquinone etc. One of the key genes in monoterpene biosynthesis is geranyl diphosphate synthase (*GPPS*) that produces a monoterpene precursor. The aim of this study was to investigate the expression of the genes in black cumin. RNA was extracted, cDNA was synthesized and a partial sequence of *GPPS* gene was isolated using degenerate primers and sequenced. Moreover, RNA was extracted from different tissues of the species and semi-quantitative RT-PCR using specific primers of *GPPS* gene and *GAPDH* as housekeeping gene in order to study the pattern of *GPPS* gene expression. Results showed that transcript expression of geranyl diphosphate synthase in stem and leaf is significantly higher than that of root, capsule and seed.

Keywords: Black cumin, geranyl diphosphate synthase gene, transcript expression.