

بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستتزی مونوترپن‌ها و تری‌ترین‌ها تحت تأثیر تیمار اسیدسالیسیلیک در گیاه دارویی سیاه‌دانه

ریزان الیاسی^۱، محمد مجدی^{۲*}، بهمن بهرام‌نژاد^۳ و قادر میرزاقادری^۳

۱ - دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۲ - نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

پست الکترونیک: m.majdi@uok.ac.ir

۳ - استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۱۳

چکیده

سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) متعلق به خانواده آلاله، یکی از گیاهان دارویی مهم می‌باشد که انواع متعددی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی از جمله تری‌ترین‌ها را تولید می‌کند. مونوترپن‌ها و تری‌ترین‌ها از مهم‌ترین گروه‌های تشکیل‌دهنده تری‌ترین‌ها می‌باشند. در مسیر بیوستتزی مونوترپن‌ها تحت عنوان مسیر MEP واقع در پلاستید، ژن‌های مختلفی دخیل می‌باشند که مونوترپن سنتازها تحت عنوان ژن‌های محدودکننده سرعت واکنش در این مسیر شناخته شده‌اند. در طی مسیر بیوستتزی مونوترپن‌ها، آنزیم ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز مسئول کاتالیز ژرانیل‌دی‌فسفات به‌عنوان پیش‌ماده عمومی مونوترپن‌ها می‌باشد. اکسیدواسکوآلن سیکلازها از مهم‌ترین آنزیم‌های کاتالیزکننده مسئول تری‌ترین‌های تری‌ترین‌ها می‌باشند که بتا‌آمرین سنتاز و اسکوآلن‌پوکسیداز از جمله این آنزیم‌ها هستند. در این پژوهش بیان ژن‌های مختلف شامل یک ژن مونوترپن سنتازی، ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز، بتا‌آمرین سنتاز و اسکوآلن‌پوکسیداز تحت تیمار اسیدسالیسیلیک بررسی شد. بیان نیمه‌کمی ژن‌های مونوترپن سنتاز، ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز، بتا‌آمرین سنتاز و اسکوآلن‌پوکسیداز در سطح رونوشت در برگ‌های تیمار شده با اسیدسالیسیلیک نشان‌دهنده تغییر بیان متفاوت این ژن‌ها در پاسخ به اسیدسالیسیلیک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تری‌ترین‌ها، سیاه‌دانه، گیاه دارویی، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

(*Nigella Sativa*. L) می‌باشد که متعلق به راسته گل‌ساعتی‌ها (Passiflorales) و خانواده آلاله (Ranunculaceae) است. سیاه‌دانه گیاهی یکساله و دیپلوئید ($n=2x=122$) است. دانه گیاه سیاه‌دانه منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه به‌خصوص مونوترپن‌ها می‌باشد که کاربردهای صنعتی، تجاری و پزشکی فراوانی برای آن‌ها

استفاده بشر از گیاهان برای بقاء و همچنین زندگی بهتر و سالم‌تر از آغاز پیدایش بشر تاکنون ادامه دارد. گیاهان تأمین‌کننده اصلی غذای بشر می‌باشند، به‌طوری‌که بدون وجود گیاه، بقاء بشر بسیار دشوار خواهد بود (Rates et al., 2001). یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی، گیاه سیاه‌دانه

2006). در مسیر وابسته به موالونات ابتدا دو ملکول استیل‌کوآنزیم آ با هم ترکیب شده و استواستیل‌کوآ را به وجود می‌آورند. در ادامه با اضافه شدن یک ملکول دیگر از استیل‌کوآنزیم آ به استواستیل‌کوآ و تحت تأثیر آنزیم مربوطه، بتاهیدروکسی‌بتامتیل‌گلو تاریل‌کوآ به وجود می‌آید و در ادامه با انجام یکسری مراحل دیگر موالونات به وجود می‌آید. موالونات تحت تأثیر مراحل و آنزیم‌های دیگر به ایزوپنتیل‌دی‌فسفات تبدیل می‌شود.

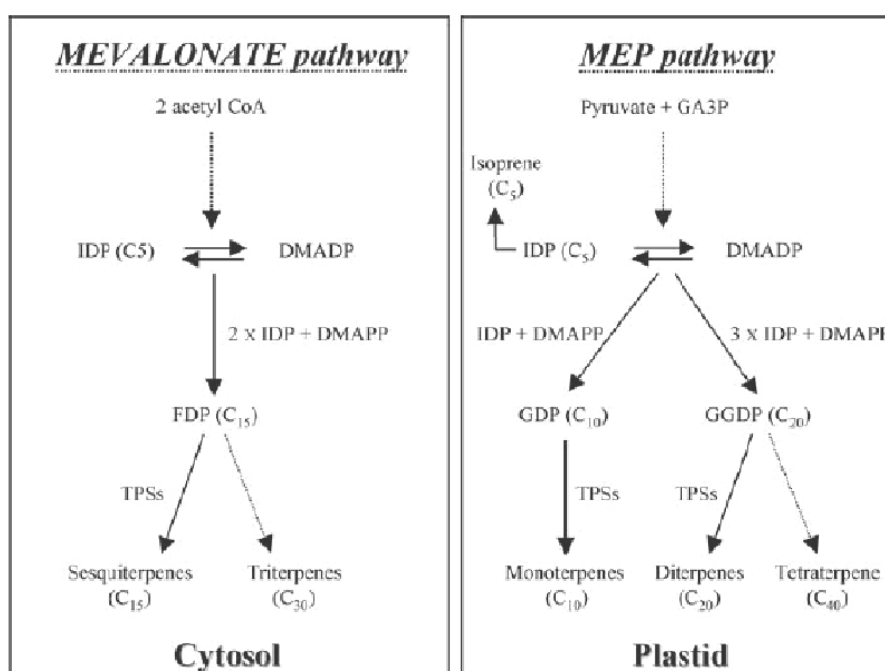
در مسیر دوم یا مسیر متیل‌اریترول‌دی‌فسفات که در پلاستید رخ می‌دهد، ابتدا پیروات با دی‌گلیسرآلدئید ۳-فسفات ترکیب می‌شود و پس از انجام یک سری واکنش دی‌اوکسی‌زایلوز ۵-فسفات به وجود می‌آید. این ماده نیز در ادامه تبدیل به متیل‌اریتریتول ۴-فسفات می‌شود و پس از انجام یک سری مراحل دیگر این ماده نیز به ایزوپنتیل‌دی‌فسفات تبدیل می‌شود و ادامه مراحل مانند مسیر وابسته به موالونات رخ می‌دهد (Davis & Croteau 2000). مونوترین‌ها ایزوپرنوئیدهای ۱۰ کربنه و از اجزای اصلی اسانس می‌باشند که دارای خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌توموری بوده و بر روی دستگاه قلبی‌عروقی و سیستم اعصاب مرکزی تأثیر می‌گذارند (Junior et al., 2010).

تری‌ترینوئیدها ایزوپرنوئیدهای ۳۰ کربنه می‌باشند که علاوه بر اهمیت زیاد در داروسازی در تولید نوشیدنی‌های گازدار، ساخت شامپو، صابون مایع، آتش‌خاموش‌کن و تعیین میزان اکسیژن خون به کار می‌روند (Irmeler et al., 2000). علاوه بر این به عنوان ترکیبات دفاعی در برابر میکروب‌های بیماری‌زا و علف‌های هرز به شمار می‌آیند. هم‌چنین به شکل ضدقارچ و ضد ویروس نیز عمل می‌کنند و چون خواص ضدسرطانی دارند در رژیم غذایی انسان و دام اهمیت دارند (Aggarwal et al., 2007). تری‌ترینوئیدها از مسیر اسیدمولونیک سنتز می‌شوند که با اتصال سربه‌سر دو مولکول فARNسیل‌دی‌فسفات ترکیب ۳۰ کربنه‌ی اسکوالن تولید می‌شود. در واقع اسکوالن یک پیش‌ماده برای

ذکر شده است (Iqbal et al., 2010). یکی از مهم‌ترین ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی مونوترین‌ها ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز است که تولیدکننده پیش‌ساز عمومی مونوترین‌ها یعنی ژرانیل‌دی‌فسفات می‌باشد. متابولیت‌های اولیه گیاهی شامل ترکیب‌هایی مانند اسیدهای آمینه، قندهای ساده، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها می‌باشند که برای فرایندهای سلولی لازم و ضروری می‌باشند. ترکیب‌های ثانویه گیاهی شامل ترکیب‌های تولیدشده در شرایط خاص مانند وجود تنش می‌باشند. به‌طور کلی متابولیت‌های ثانویه گیاهی به سه گروه طبقه‌بندی می‌شوند که شامل ترین‌ها (حدود ۲۵۰۰۰ نوع)، آلکالوئیدها (حدود ۱۲۰۰۰ نوع) و ترکیبات فنلی (بیش از ۸۰۰۰ نوع) می‌باشند. ترینوئیدها ترکیبات ثانویه‌ایی هستند که در حفاظت گیاهان در برابر آفات گیاه‌خوار و بیماری‌ها، جلب گرده‌افشان‌ها و حشرات پراکننده بذر نقش دارند (Ferreria et al., 2010). هم‌چنین نقش مهمی را در ساختار غشا (استرول و هاپانوئید)، واکنش‌های اکسایشی (زنجیره جانبی یوبی‌کوئین، مناکوئین، پلاستوکوئینین و فلاکوئینون)، بازدارنده نوری و حفاظت نوری (کاراتینوئید و زنجیره جانبی کلروفیل‌ها) و تنظیم رشد و نمو (هورمون‌ها و مواد تغییردهنده پروتئین‌ها) بر عهده دارند (Phillipson et al., 2007). ترینوئیدها با وجود داشتن ساختار و عملکرد پیچیده، پلیمر ساده‌ای از واحدهای ایزوپرون پنج‌کربنه و ایزوپنتیل‌دی‌فسفات (IPP) می‌باشند. گیاهان دارای دو مسیر اسیدمولونیک (MVA) و مسیر (MEP) بیوسنتزی برای ترینوئیدها هستند که در چگونگی تولید واحدهای پنج‌کربنه با هم اختلاف دارند. این دو مسیر نه تنها در محل انجام و مواد اولیه، بلکه در محصولات نهایی نیز با هم اختلاف دارند. مسیر MVA با منابع IPP سیتوسولی آغاز می‌شود و به‌وسیله آنزیم ایزوپنتیل‌دی‌فسفات ایزومراز (IDI) به دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (DMAPP) برای ساخت ترکیبات سزکویی و تری‌ترین‌ها تبدیل می‌شود، درحالی‌که مسیر پلاستییدی MEP، ترکیبات IPI و DMAPP را برای مونو، دی و تترترین‌ها فراهم می‌کند (شکل ۱) (Aharoni et al.,

اکسیدواسکوالن سیکلازها هستند که آنزیم بتا آمیرین سنتاز از جمله‌ی آن‌هاست (Irmiler *et al.*, 2000). در ادامه‌ی واکنش حلقوی شدن، با ایجاد تغییراتی بر روی محصولات مانند اکسیداسیون، هیدروکسیلاسیون، گلیکولیزه شدن و دیگر جانشینی‌ها مشتقات دیگر نیز تولید می‌شوند. شکل ۲ مسیر بیوسنتزی بتا آمیرین را از ۲ و ۳ اکسیدواسکوالن نشان می‌دهد.

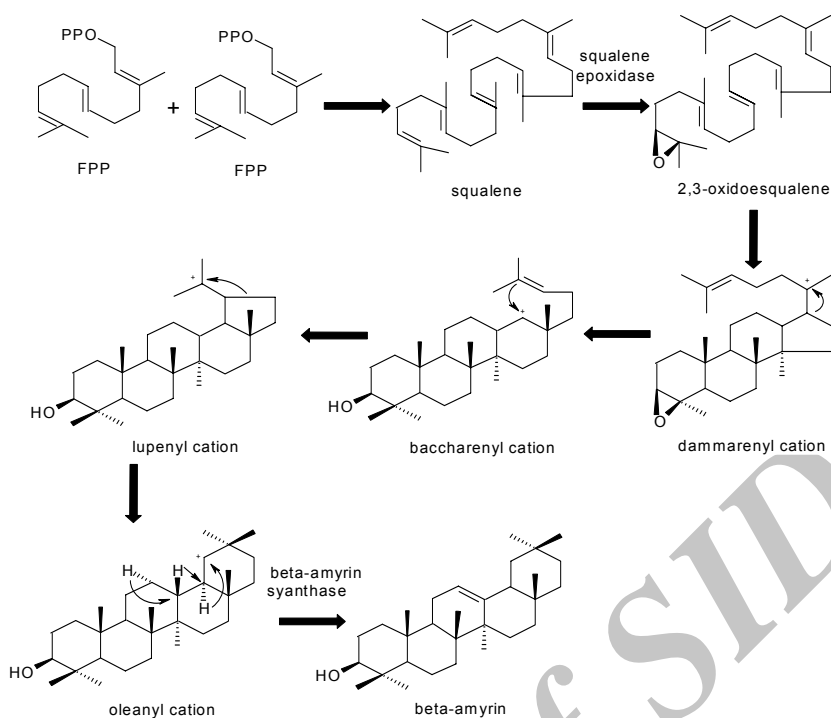
تشکیل سایر ترپنوئیدها است (Bramley, 1997). اسکوالن توسط اکسیدواسکوالن اکسید می‌شود که این نقطه‌ی شروع برای واکنش حلقه‌ای شدن در بیوسنتز تری ترپن ساپونین است. اولین مرحله در بیوسنتز تری ترپن ساپونین‌ها، حلقوی شدن ۲ و ۳- اکسیدواسکوالن است. بیشتر از ۱۰۰ نوع اسکلت تری ترپنی متفاوت در طبیعت یافت شده است (Xu *et al.*, 2004). در واقع آنزیم‌های کاتالیزکننده‌ی فرایند حلقوی شدن،



شکل ۱. مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها در سلول‌های گیاهی. مسیر کلی بیوسنتز ترپن‌ها شامل مسیر وابسته به موالونات (MVA) و مسیر مستقل از موالونات (MEP) به ترتیب در سیتوزول و پلاستید. اختصارات عبارتند از: گلیسرآلدهید ۳-فسفات (GA3P)، ترپن سنتازها (TPSs)، ایزوپنتیل دی فسفات (IDP)، دی متیل آلیل دی فسفات (DMADP)، فارنسیل دی فسفات (FDP)، متیل اریتریول ۴-فسفات (MEP)، ژرانیل دی فسفات (GDP). (Aharoni *et al.*, 2006).

کار قابل توجهی انجام نشده است. با توجه به اهمیت ژن ژرانیل دی فسفات به عنوان پیش ساز مونوترپن‌ها، در این تحقیق بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز و بیان یک ژن مونوترپن سنتازی نیز در گیاه دارویی سیاه دانه بررسی شد.

با توجه به اینکه سیاه دانه یکی از گیاهان دارویی با اثرات سودمند زیادی می‌باشد، مورد توجه محققین و دانشمندان قرار گرفته است و تحقیقات علمی زیادی بر روی این گیاه صورت گرفته است. با این حال از نظر مولکولی بر روی گیاه سیاه دانه



شکل ۲- مسیر بیوسنتزی بتاآمیرین (Anna et al., 2010)

تنفس از نقش‌های مهم این اسید می‌باشد. اسیدسالیسیلیک باعث ابقاء مقاومت اکتسابی می‌شود که شامل تغییر نمایه بیان و واکنش به طیف وسیعی از بیمارگرها می‌شود. یکی از بهترین راه‌های مطالعه‌شده انتقال سیگنال، مسیرهای درگیر در پاسخ‌های مقاومت هستند که اسیدسالیسیلیک جزء کلیدی پیام‌رسانی است. با اعمال این تیمار بر روی برگ احتمال تغییر بیان ژن‌های مختلف وجود دارد. بنابراین در این مطالعه از تیمار اسیدسالیسیلیک جهت بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز مونوترپن‌ها و تری‌ترین‌ها استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت بررسی بیان نیمه‌کمی ژن‌ها

به منظور بررسی بیان ژن‌های بتاآمیرین سنتاز و اسکوالن اپوکسیداز آغازگرها براساس توالی‌های اختصاصی مربوط به ژن‌های بتاآمیرین سنتاز و اسکوالن اپوکسیداز در

هم‌چنین با توجه به اهمیت نقش ساپونین در صنعت و پزشکی و تولید آن در گیاهان از جمله سیاه‌دانه لازم است توجه بیشتری از نظر ژنتیکی و مولکولی به آن معطوف شود. اولین مرحله در مسیر بیوسنتزی ساپونین در گیاهان، حلقه‌ای شدن ۲ و ۳-اکسیدواسکوآلن و تولید انواع ساپونین‌ها است و تری‌ترین ساپونین‌ها توسط آنزیم‌های اکسیدواسکوآلن‌اکسیدازها از جمله بتاآمیرین سنتاز و اسکوالن اپوکسیداز تولید می‌شوند بنابراین با توجه به اهمیت نقش این ژن‌ها در بیوسنتز ساپونین‌ها در گیاهان و اهمیت سیاه‌دانه به‌عنوان یک گیاه دارویی که دارای ترکیبات ساپونینی است بیان این ژن‌ها تحت تأثیر تیمار اسیدسالیسیلیک با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه‌کمی مورد بررسی قرار گرفت. اسیدسالیسیلیک یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید نقش مهمی در ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی بر عهده دارد. این اسید یک تنظیم‌کننده رشد درونی از گروه ترکیبات طبیعی فنلی می‌باشد. القای گل‌دهی، رشد و نمو، سنتز اتیلن، تأثیر در باز و بسته شدن روزنه‌ها و

غلظت ۱ میلی‌مولار روی برگ‌های سیاه‌دانه که در شرایط رشدی گلخانه‌ای قرار داشتند محلول‌پاشی شد. قبل از اعمال تیمار و در زمان‌های صفر، ۴، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار از برگ‌های شاهد و تیمار نمونه‌گیری شد.

استخراج RNA از بافت‌های مختلف سیاه‌دانه برای بررسی بیان نیمه‌کمی ژن

استخراج RNA با روش Piotr و همکاران (۲۰۰۶) از بافت برگ شاهد و تیمار صورت گرفت. بعد از تایید صحت حضور RNAها با کمک ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، غلظت RNA با نانودراپ مشخص شد و به‌منظور سنتز cDNA، RNAهای استخراج‌شده هم‌غلظت شدند.

سنتز cDNA برای بررسی بیان نیمه‌کمی

از RNAهای استخراج‌شده از بافت‌های مختلف، با استفاده از کیت RT-PCR شرکت ویوانتیس مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده cDNA سنتز شد.

RT-PCR نیمه‌کمی

بیان نیمه‌کمی ژن‌های ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز، مونوترین سنتاز، بتا‌آمرین سنتاز و اسکوالن‌اپوکسیداز با کمک RT-PCR نیمه‌کمی انجام شد.

تحلیل آماری

با استفاده از نرم‌افزار GelQuantNET عکس‌های مربوط به ژل (داده‌های حاصل از RT-PCR نیمه‌کمی) به داده‌های کمی تبدیل شد. تمامی آزمایش‌های انجام‌شده براساس طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

گیاه سیاه‌دانه طراحی شدند. توالی این ژن‌ها با شماره شناسایی FJ013228.1 و FJ232947.1 از پایگاه داده NCBI به‌دست آمد. برای بررسی بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز براساس توالی این ژن که توسط Shamsi و همکاران (۲۰۱۲) توالی‌یابی شده آغازگرها طراحی شدند. همچنین برای بررسی بیان ژن مونوترین سنتاز براساس توالی این ژن که توسط Elyasi و همکاران (۲۰۱۴) توالی‌یابی شده آغازگرها طراحی شدند. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 طراحی شد و دمای اتصال و سایر خصوصیات نیز با برنامه‌ی آنلاین OligoCalc محاسبه گردید. مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

طراحی آغازگر از ژن کنترل

برای مطالعه بیان هر کدام از ژن‌های موردنظر در اندام‌های مختلف سیاه‌دانه نیاز به یک جفت آغازگر اختصاصی می‌باشد. یک جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر ژنی مورد نیاز است که در همه اندام‌ها به یک میزان بیان شود (ژن کنترل) وقتی این ژن در همه اندام‌ها به یک میزان بیان شود میزان بیان ژن موردنظر نسبت به آن سنجیده می‌شود و ژن کنترل در این مطالعه ژن دی‌گلیسرآلدئید ۳ فسفات‌دهیدروژناز (*GAPDH*) در نظر گرفته شد (Scholz *et al.*, 2009). این دو آغازگر F-GAPDH و R-GAPDH نامیده شد و توالی آنها در جدول ۱ ارائه شده است. دمای اتصال و سایر خصوصیات مربوط به آغازگر مستقیم و آغازگر معکوس توسط برنامه‌ی آنلاین oligocalc سنجیده شد و طول قطعه‌ای که با این جفت آغازگر تکثیر می‌شود تقریباً ۶۰۰ جفت باز است. جفت آغازگرهایی که برای بیان ژن‌های موردنظر در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است در جدول ۱ ارائه شده است.

تیمار نمونه‌های گیاهی با اسیدسالیسیلیک

ژنوتیپ مورد استفاده در گلخانه‌ی تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان کشت شد. اسیدسالیسیلیک با

نتایج

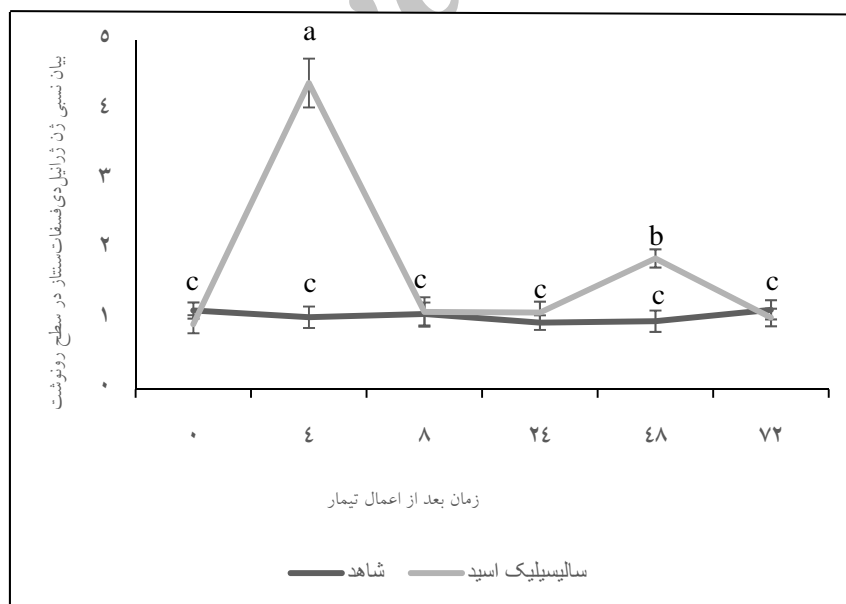
استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب از بافت برگ گیاه دارویی سیاه‌دانه با استفاده از روش تک‌مرحله‌ای مبتنی بر گوانیدینوم انجام شد. سپس سنتز cDNA صورت گرفت و برای مقایسه الگوی بیان ژن‌های موردنظر مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز تحت تأثیر تیمار با اسیدسالیسیلیک ۱ میلی‌مولار نشان داد که بیان ژن مذکور در اثر تیمار با اسیدسالیسیلیک پس از ۴ ساعت از اعمال تیمار افزایش یافته و به حداکثر میزان خود رسید ($P < 0/05$). میزان بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز بعد از ۴ ساعت کاهش یافته و به میزان بیان در گیاه شاهد (محلول‌پاشی شده با آب مقطر) رسید. در گیاه شاهد یک روند تقریباً یکنواخت در میزان بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان بیان ژن مشاهده نشد (شکل ۳).

جدول ۱- مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد

استفاده		دمای اتصال
نام آغازگر	توالی آغازگر	
GAPDH-F	TCGGGATCAACGGGTTTGAAG	63.6°C
GAPDH-R	CTCTCCAGTCCTTGCTTGATGGTC	60 °C
MTS2-F	CACACAAAAGAAGTCGTGG	52.6 °C
MTS2-R	CAGCAAGTCGAAGAATCAAGG	53.9 °C
GDP-F	ACCCAAATCGGTCCGTGATG	61 °C
GDP-R	GCAAGCAAGCTAACGACCTC	63 °C
SQU-F	TATTGTTGGTGCTGGTGTCTG	54 °C
SQU-R	AAAATAGCACCAGGAGTGGG	52.9 °C
AMYRIN-F	GTCCTCCCTTCATTTCTCCC	53.7 °C
AMYRIN-R	AGAAGGCAGACCATTAGGCC	54.5 °C

GAPDH: گلیسرآلدهید ۳-فسفات، MTS: مونوترپن سنتاز، GDP: ژرانیل‌دی‌فسفات

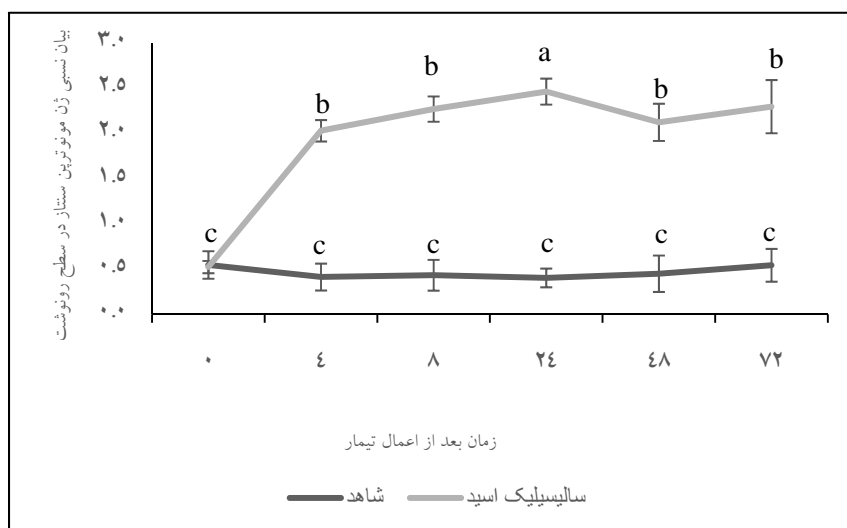
سنتاز، SQU: اسکوالن اپوکسیداز، AMYRIN: بتا‌میرین سنتاز



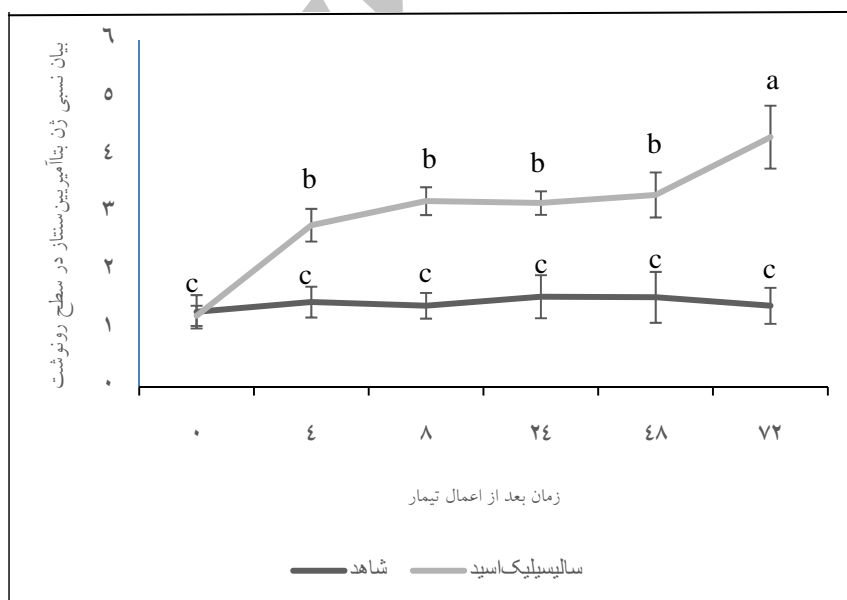
شکل ۳- بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است.

شاهد افزایش بیان مشاهده شد ($P < 0.05$). بیان ژن مونوترین سنتاز در زمان‌های ۴ و ۸ ساعت هم برابر با ۴۸ و ۷۲ ساعت بوده و بیشترین بیان در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار مشاهده شد (شکل ۴).

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن مونوترین سنتاز تحت تأثیر تیمار با اسیدسالیسیلیک ۱ میلی‌مولار نشان داد که میزان بیان ژن مونوترین سنتاز در گیاهان شاهد در زمان‌های مختلف تغییری را نشان ندادند ($P > 0.05$). در حالیکه بیان این ژن در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان



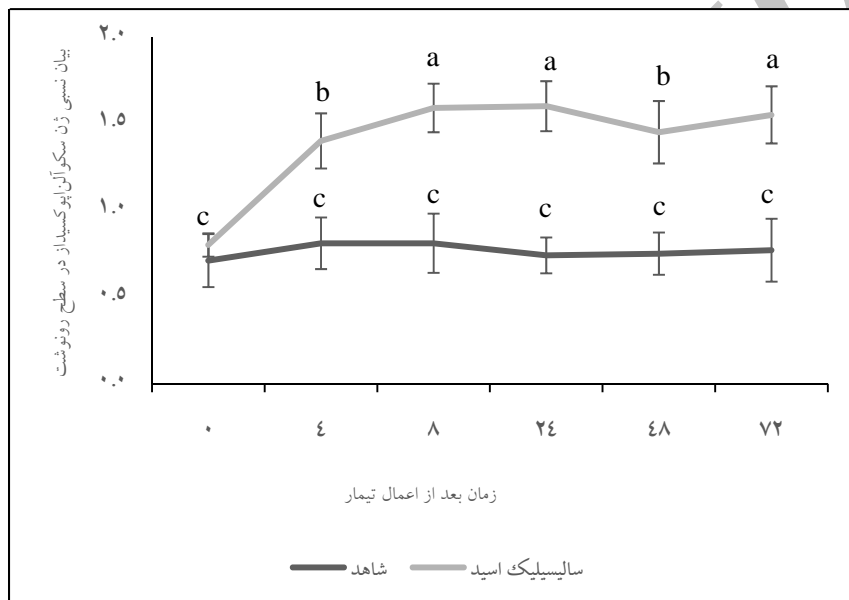
شکل ۴- بیان ژن مونوترین سنتاز در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است.



شکل ۵. بیان ژن بتا آمیرین سنتاز در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن اسکوالن اپوکسیداز تحت تأثیر تیمار اسیدسالیسیلیک ۱ میلی مولار نشان داد که بیان ژن مذکور ۴ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش می یابد و روند افزایشی دارد و در زمان ۷۲ ساعت تقریباً به بیشترین مقدار خود می رسد ($P < 0/05$). در گیاه شاهد یک روند تقریباً یکنواخت در میزان بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتتاز مشاهده شد و تفاوت معنی داری از لحاظ میزان بیان ژن مشاهده نشد ($P > 0/05$) (شکل ۶).

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن بتا آمیرین سنتتاز تحت تأثیر تیمار اسیدسالیسیلیک ۱ میلی مولار نشان داد که بیان این ژن ۴ ساعت بعد از اعمال این تیمار شروع به افزایش می کند و در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت روند ثابتی را نشان می دهد در زمان ۷۲ ساعت بیان ژن به بیشترین مقدار خود می رسد ($P < 0/05$). در گیاه شاهد یک روند تقریباً یکنواخت در میزان بیان ژن بتا آمیرین سنتتاز مشاهده شد و تفاوت معنی داری از لحاظ میزان بیان ژن مشاهده نشد ($P > 0/05$) (شکل ۵).



شکل ۶- بیان ژن اسکوالن اپوکسیداز در زمان های متفاوت در برگ گیاه سیاه دانه پس از اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است.

در برابر تنش های زنده معرفی کند. اعمال تیمارهایی از قبیل اسیدسالیسیلیک که به صورت مصنوعی باعث القاء مسیرهای دفاعی در گیاه می شود می تواند دلیلی برای نقش دفاعی ترین ها باشد. در طول تکامل گیاهان همواره مکانیسم هایی را به منظور مقابله و سازگاری با انواع تنش های زنده و غیر زنده اعمال کرده اند. ماهیت سلول یا سلول ها در بافت ها به قدری پیچیده است که با هر محرکی از سمت محیط، فرایندهای پیچیده از مسیرهای سیگنالی که دارای اثرات متقابل یا هماهنگ هستند فعال

بحث

امروزه همه علوم کشاورزی در پی راهی برای افزایش بازده و کاهش هزینه های تولید هستند. یکی از جنبه هایی که در این راستا همواره مورد توجه واقع شده افزایش توانایی گیاه برای مقابله در برابر انواع تنش های زنده از قبیل آفات و بیماری ها است. ویژگی های منحصر به فرد ترین ها از قبیل خواص زیستی متنوعی مانند فعالیت حشره کشی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد باکتریایی می تواند آنها را به عنوان عاملی برای افزایش مقاومت گیاه

بررسی الگوی بیان برای ژن‌های مورد مطالعه در اثر تیمار با اسیدسالیسیلیک نشان داد که بیان همه ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق در اثر تیمار اسیدسالیسیلیک القا شد. نتایج نشان داد که الگوی بیان در زمان‌های مختلف برای همه ژن‌ها به غیر از ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز دارای الگوی مشابهی بود. بیان این ژن ۴ ساعت پس از اعمال تیمار با اسیدسالیسیلیک به حداکثر رسیده و در ساعات بعد به میزان بیان در سطح شاهد کاهش یافت. در سایر ژن‌های مورد مطالعه بیان ژن در اثر تیمار القا شده و دارای روند صعودی بود و در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار نیز میزان بیان نسبت به گیاه شاهد بیشتر بود. الگوی بیان برای دو ژن مونوترین سنتاز و اسکوالن آپوکسیداز کاملاً مشابه بود به طوری که بیان برای هر دو ژن پس از اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک القا شده، افزایش یافت و در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار به حداکثر میزان خود رسید و به تدریج در ساعات بعد اندکی کاهش یافت به طوری که در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار هنوز دارای سطح بالایی از بیان نسبت به گیاه شاهد بود. الگوی بیان برای ژن بتا آمیرین سنتاز شبیه به ژن‌های مونوترین سنتاز و اسکوالن آپوکسیداز با قدری تفاوت بود. بدین صورت که پس از القا، بیان ژن دارای سیر صعودی بود و در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار به بیشترین میزان بیان خود رسید. نتایج حاصل از اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک نشان داد که تمام ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق در اثر تیمار القا شدند که می‌تواند به دلیل نقش ترین‌ها در مسیرهای دفاعی و انتقال پیام باشد. با توجه به اینکه معمولاً میزان بیان این ژن‌ها در سطح رونوشت با میزان متابولیت مربوطه ارتباط مستقیم دارد بنابراین در مواردی که هدف به دست آوردن و جداسازی یک ترکیب خاص باشد می‌توان با استفاده از تیمارهایی مانند اسیدسالیسیلیک و در زمان مناسب بیشترین مقدار از ترکیب را به دست آورد.

می‌شود. این اثرات متقابل احتمالاً به نحوی تکامل یافته‌اند که موجود زنده را با کمترین و مناسب‌ترین مسیر زیستی قادر به واکنش کنند. دریافت و فهم تنش‌های زنده و غیر زنده منجر به ایجاد پیام‌هایی می‌شود که باعث فعال کردن کانال‌های یونی، فعالیت کینازها، تولید انواع اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species, ROS) تجمع هورمون‌هایی از قبیل اسیدسالیسیلیک، اتیلن، اسیدجاسمونیک و اسیدآسیزیک می‌گردد. این پیام‌ها در نهایت منجر به بیان گروه‌های خاصی از ژن‌های دفاعی می‌شوند که باعث به وجود آمدن یک واکنش دفاعی کلی می‌گردد. گیاهان رونویسی از ژن‌های واکنش دفاعی را در پاسخ به انواع مختلفی از تنش‌های محیطی یا در اثر مقابله با بیمارگر فعال می‌کنند (Borad & Sriran, 2008).

در پژوهشی که در مورد چگونگی عمل برخی از ترکیبات از جمله اسیدسالیسیلیک در القای مقاومت و توقف رشد عوامل بیماری‌زا در گیاهان صورت گرفته است نشان داده شده است که هم‌زمان با افزایش SAR و تولید پروتیین‌های PR، که در اثر تیمار اسیدسالیسیلیک ایجاد می‌شود، افزایش تولید ساپونین به عنوان یکی از ترکیبات ضد میکروبی، تنها در محل آلودگی القا می‌شود. هم‌زمان با القای سریع و موثر ساپونین در محل آلودگی آسیب کم‌تری به گیاه وارد شده و از گسترش آلودگی در گیاه جلوگیری می‌گردد و در نتیجه طول عمر گیاه افزایش می‌یابد (Hammerschmidt, 1999). برای مثال استفاده از تیمار اسیدسالیسیلیک بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای دفاعی را افزایش می‌دهد با توجه به افزایش بیان این ژن‌ها احتمالاً ترکیبات ضد میکروبی آن‌ها از جمله ساپونین‌ها افزایش یابد که نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز نشان‌دهنده افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز این متابولیت‌ها می‌باشد (Raskin, 1992; Papadopoulou et al., 1981; Maleck & Lawton, 1998; Malumy & Klessig, 1992).

- identification of cytochrome P-450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant Journal*, 24: 797-804.
- Jain, D.E. and Tripathy, A.K., 1991. Insect feeding-deterrent activity of some saponin glycoside. *Phytotherapy Res.*, 5: 139-141.
- James, J.T. and Dubery, I.A., 2009. Pentacyclic triterpenoids from the medicine herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*, 14: 3922-3941
- Mahmoud, S.S. and Croteau, R.B., 2003. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *Proceeding of the National Academy Science*, 100(24): 14481-14486.
- Malamy, J. and Klessig, D.F., 1992. Salicylic acid and plant disease resistance, *Plant J.*, 2: 643-654.
- Maleck, K. and Lawton, K. 1998. Plant strategies for resistance to pathogens, *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 208-213.
- Papadopoulou, K., Melton, R., Leggett, M., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E., 1999. Compromised disease resistance I saponin-deficient plants. *Proc. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 96: 12923-12928.
- Phillipson, J. D., 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*, 68: 2960-2972.
- Raskin, I., 1992. Role of salicylic acid in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 439-463.
- Sautour, M. and Mitaine-Offer, A.C., 2007. The dioscorea genus: a review of bioactive steroid saponins. *Journal of Natural Medicine*, 61: 91-101.
- Shamsi Fard, M.H., 2012. Transcript analysis of Geranyl diphosphate synthase gene in different tissues of black cumin (*Nigella sativa* L.). M.Sc. Thesis, Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan.
- Xu, R., Fazio, G.C. and Matsuda, S.P.T., 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65: 261-291.
- Yelani, T., Hussein, A.A. and Meyer, J.J., 2010. Isolation and identification of poisonous triterpenoids from *Elaeodendron croceum*. *Natural Product Research*, 24: 1418-1425.
- Scholz, M., Lipinski, M., Leupold, M., Luftmann, H., Harving, L., Ofir, R., Fischer, R., Pruffer, D. and Muller, K., 2009. Methyl jasmonate induced accumulation of kalapanaxsaponin I in *Nigella sativa*. *Phytochemistry*, 70: 517-522.
- ### منابع مورد استفاده
- Aggarwal, B., Sundaram, C., Malani, N. and Ichikawa, H., 2007. Curcumin: the india solid gold. *Advance in Experimental Medicine and Biology*, 59: 31-38.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.Y., Ri, M.B., Giri, A.P., Verstappen, F. W. A., Schwab, W. and Bouwmeester, H.J., 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, 5: 49-58
- Augustin, J.M., Kuzina, V., Anderson, S.B. and Bak, S., 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72: 435457.
- Bramley, P.M., 1997. Isoprenoid metabolism. *Plant Biochemistry*, 417-437
- Bowyer, P., Clarke, B.R., Lunness, P., Danies, M.J. and Osbourn, A.E., 1995. Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science*, 267: 371-374.
- Davis, E.M. and Croteau, R., 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Current Chemistry*, 209: p. 54-95.
- Einbond, L.S., Wen-Cai, Y. and He, K., 2008. Growth inhibitory activity of extracts and compounds from *Cimicifuga* species on human breast cancer cells. *Phytomedicine*, 15: 504-511.
- Elyasi, R., 2014. Isolation of a monoterpene synthase gene and gene expression patterns of some genes involved in the biosynthetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*). M.Sc. Thesis, Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan.
- Ferreira, F.S., Davanad, L., Luthria, D.L., Sasaki, T. and Heyerick, A., 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*, 15: 3135-3170.
- Hammerschmidt, R., 1999. Induced disease resistance how to induced plants stop pathogens, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55: 77-84.
- Irmeler, S., Schorder, G., St-Pierre, B., Crouch, N.P., Hotze, M., Schmidt, J., Strack, D., Matern, U. and Schroder, J., 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and

Expression pattern analysis of genes involved in the biosynthetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with salicylic acid

R. Elyasi¹, M. Majdi^{*2}, B. Bahrarnnejad³ and Gh. Mirzaghaderi³

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

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

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

Received: 25.06.2015

Accepted: 04.08.2015

Abstract

Black cumin (*Nigella sativa*) is an important medicinal plant belonging to the Ranunculaceae which produces large diversity of secondary metabolites especially terpenes. Mono (C_{10}) and tri-terpenes (C_{30}) are two major structural classes of terpene compounds. Several genes are involved in biosynthetic pathway of the monoterpenes known as MEP pathway, located in plastids. In the MEP pathway, monoterpene synthases are rate-limiting enzymes for monoterpene biosynthesis. In the biosynthetic pathway of monoterpenes geranyl diphosphate synthase catalyzing geranyl diphosphate (GDP) biosynthesis as universal precursor of monoterpenes. Oxidosqualenecyclases is of the most important. In this study gene expression patterns of a monoterpene synthase, GDP synthase, beta amirin synthase and squalene oxidase were evaluated under salicylic acid treatment. Gene expression analysis of the genes at transcript level using semi-quantitative PCR in response to salicylic acid treatment revealed their differential expression.

Keywords: Gene expression, terpenes, black cumin, medicinal plant, secondary metabolite.