Archive of SID

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۱، صفحه ۶۵-۵۴ (۱۳۹۵)

بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها تحت تأثیر متیل‌جاسمونات در سیاه‌دانه (*Nigella sativa*)

ریزان الیاسی[۱]، محمد مجدی[۲*]، بهمن بهرام‌نژاد[۳] و قادر میرزاقادری[۴]

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

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، عضو هیئت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

پست الکترونیک: m.majdi@uok.ac.ir

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

۴- استادیار، عضو هیئت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۹

چکیده

سیاه‌دانه یکی از گیاهان دارویی مهم متعلق به خانواده Ranunculaceae می‌باشد که انواع متعددی از متابولیت‌های ثانویه شامل مونو ترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها را تولید می‌کند که در صنعت و پزشکی کاربرد دارند. در این پژوهش بیان نسبی برخی ژن‌های کلیدی مسیر ترپن‌ها شامل یک ژن مونوترپن‌سنتازی (*MTS*)، ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز (*GDS*)، بتاآمیرین‌سنتاز (*βAS*) و اسکوآلن‌اپوکسیداز (*SQE*) تحت تیمار متیل‌جاسمونات در سیاه‌دانه بررسی شد. متیل‌جاسمونات با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار روی برگ‌های سیاه‌دانه که در شرایط رشدی گلخانه‌ای قرار داشتند محلول‌پاشی شد و در زمانهای ۰، ۴، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه‌برداری انجام شد. بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA واکنش RT-PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مختلف انجام شد. نتایج حاصل از RT-PCR نیمه‌کمی نشان‌داد که الگوی بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز متفاوت از سه ژن دیگر بود. بیان نسبی برای ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز ۴ ساعت پس از اعمال تیمار به حداکثر رسید و در ۸ ساعت نیز در همان سطح باقی ماند و سپس میزان بیان این ژن در ساعات بعد کاهش یافت. الگوی بیان برای سه ژن مونوترپن‌سنتاز، بتاآمیرین‌سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز مشابه و دارای روند صعودی بود. نتایج حاصل از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات نشان داد که تمام ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق در اثر متیل جاسمونات القاء می‌شوند که می‌تواند به‌دلیل نقش ترپن‌ها در مسیرهای دفاعی و انتقال پیام باشد. در نتیجه می‌توان تیمار متیل‌جاسمونات را برای القای مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها و بررسی آنزیم‌ها و متابولیت‌های مرتبط با متابولیسم ترپنوییدها پیشنهاد کرد.

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

مقدمه

امروزه گیاهان دارویی به‌صورت گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی، به‌معنی روند رو به‌کاهش آن در دنیای مدرن امروزی نیست. امروزه نیز در جوامع صنعتی و در بسیاری از کشورهای پیشرفته و در حال توسعه از گیاهان دارویی برای حفظ سلامتی استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود. طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی (WHO) بیش از ۸۰ درصد مردم جهان (نزدیک به ۵ میلیارد نفر)، برای درمان بیماری‌ها از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند (Vines, 2004). سه دسته عمده ترکیبات ثانویه گیاهی شامل آلکالوییدها، فنولیک‌ها و ترپنوییدها می‌باشند. ترپنوییدها بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه هستند که شامل بیش از ۲۰ هزار ترکیب شناخته شده می‌باشند (Davis & Croteau, 2000). ترپنوییدها از دو طریق در گیاهان سنتز می‌شوند، یکی از طریق مسیر موالونات با مداخله استات و دیگری از طریق متیل‌اریتریتول‌فسفات که پیروات و گلیسرآلدهید-۳ فسفات را به‌عنوان پیش‌ماده به‌کار می‌برد (Davis & Croteau 2000). ترپنوییدها به‌علت دامنه وسیع فعالیت زیستی و ظرفیت آن‌ها برای مصارف پزشکی و کشاورزی مورد توجه می‌باشند. یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی، گیاه سیاه‌دانه (*Nigella Sativa L*) می‌باشد که متعلق به راسته‌ی گل‌ساعتی‌ها (Passiflorales) و خانواده‌ی آلاله (Ranunculaceae) است. سیاه‌دانه گیاهی یکساله و دیپلوییید ($2n=2x=12$)است. دانه‌ی گیاه سیاه‌دانه منبع غنی از متابولیت‌های‌ثانویه به‌ویژه مونوترپن‌ها و ساپونین‌ها می‌باشد که کاربردهای صنعتی، تجاری و پزشکی فراوانی برای آن‌ها ذکر شده است (Iqbal *et al*., 2011).

ترپنوییدها با وجود داشتن ساختار و عملکرد پیچیده، پلیمر ساده‌ای از واحدهای ایزوپرون پنج‌کربنه و ایزوپنتیل‌دی‌فسفات (IDP) می‌باشند. گیاهان دارای دو مسیروابسته به موالونات (Mevalonate) (MVA) و مسیر متیل اریتریتول فسفات (Methylerythritol phosphate) (MEP) بیوسنتزی برای ترپنوییدها هستند که در چگونگی تولید واحدهای پنج‌کربنه با هم اختلاف دارند و برای ساخت ترکیبات سزکویی و تری‌ترپن‌ها به‌کار گرفته می‌شوند (شکل ۱)(Aharoni *et al*., 2006).

تری‌ترپنوییدها با بیش از ۱۰۰ نوع اسکلت تری‌ترپنی متفاوت به‌عنوان ترکیبات دفاعی دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدمیکروبی می‌باشند (Aggarwal *et al*., 2007). تری‌ترپنوییدها از مسیر موالونیک‌اسید (MVA) سنتز می‌شوند که با اتصال سربه‌سر دو مولکول فارنسیل‌دی‌فسفات ترکیب ۳۰ کربنه‌ی اسکوالن (Squalene) تولید می‌شود. در واقع اسکوالن یک پیش‌ماده برای تشکیل سایر تری‌ترپنوییدها است (شکل ۱) (Barmley, 1997). اسکوالن توسط اکسیدواسکوالن اکسید می‌شود که این نقطه‌ی شروع برای واکنش حلقه‌ای‌شدن در بیوسنتز تری‌ترپن‌ساپونین است. اولین مرحله در بیوسنتز تری‌ترپن‌ساپونین‌ها، حلقوی‌شدن ۳،۲-اکسیدواسکوالن است (Xu *et al*., 2004). آنزیم‌های کاتالیزکننده‌ی فرایند حلقوی‌شدن، اکسیدواسکوالن‌سیکلازها هستند که آنزیم بتاآمیرین‌سنتاز نیز متعلق به این خانواده آنزیمی است (Irmler*et al*., 2000). تری‌ترپنوییدساپونین‌ها جزو ترکیبات دارویی اصلی سیاهدانه می‌باشند و در مسیر بیوسنتزی آن‌ها مشخص شده است که اسکوالن اپوکسیداز (Squaleneepoxidase) و بتاآمیرین‌سنتاز (β- Amyrin synthase) دو ژن کلیدی در مسیر بیوسنتزی تری‌ترپنوییید ساپونین‌ها می‌باشند (Zhao *et al*., 2010). اسکوالن‌اپوکسیداز اولین مرحله اکسیژنه‌شدن را در بیوسنتز استرول‌ها ایفا می‌کند و به‌عنوان آنزیم محدود کننده سرعت واکنش در بیوسنتز ساپونین‌ها عمل می‌کند. بتاآمیرین نیز پیش‌ماده عمومی در بیوسنتز تری‌ترپن‌ها است که از طریق ۳،۲- اکسیدواسکوالن بیوسنتز می‌شود و β-آمیرین‌سنتاز تبدیل اکسیدواسکوالن به بتاآمیرین را کاتالیز می‌کند (Kushiro *et al*., 1998) (شکل ۱).

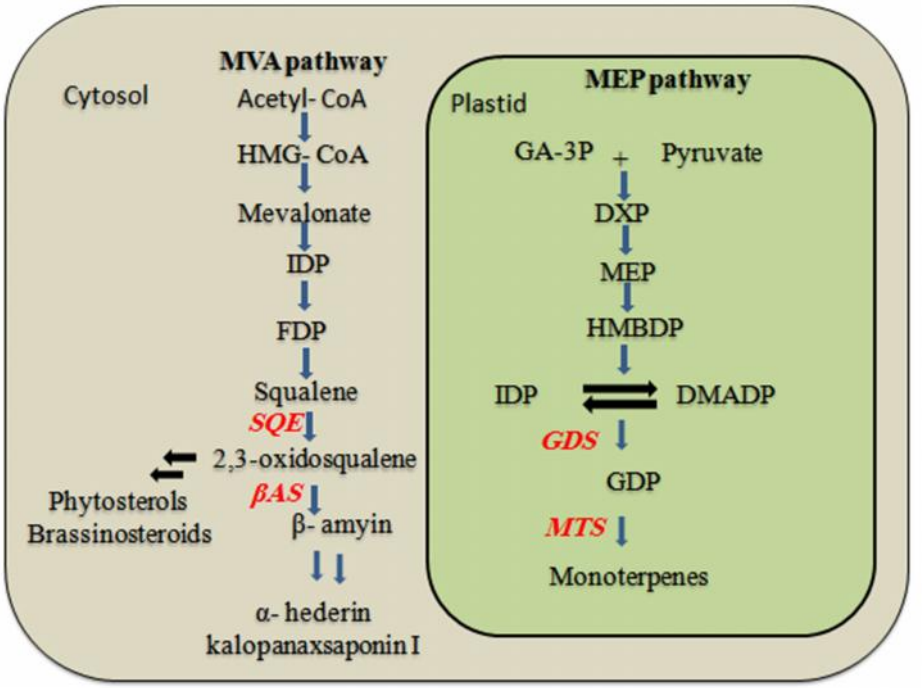
مونوترپن‌ها نیز ترکیباتی متنوعی می‌باشند که از طریق پیش‌ماده ژرانیل‌دی‌فسفات (GDP) و در مسیر MEP بیوسنتز می‌شوند (Tholl *et al*., 2006). ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز (GDS) آنزیم کلیدی است که از طریق دی‌متیل‌آلیل‌فسفات (DMADP) و ایزوپنتنیل‌دی‌فسفات (IDP) باعث تولید ژرانیل‌دی‌فسفات (GDP) می‌شود (Lichtenthaler, 1999). مونوترپن‌سنتازها نیز آنزیم‌های کلیدی هستند که مسئول تولید ترکیبات مختلف مونوترپنی از طریق ژرانیل‌دی‌فسفات (GDP) می‌شود (Tholl, 2006).

ویژگی‌های منحصر به‌فرد ترپن‌ها از قبیل خواص زیستی متنوعی مانند فعالیت حشره‌کشی، ضد ویروسی، ضدقارچی

www.SID.ir

Archive of SID

و ضدباکتریایی می‌تواند آن‌ها را به‌عنوان عاملی برای افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زنده معرفی کند. اعمال تیمارهایی از قبیل متیل‌جاسمونات که به‌صورت مصنوعی باعث القاء مسیرهای دفاعی در گیاه می‌شود می‌تواند دلیلی برای نقش دفاعی ترپن‌ها باشد و یکی از ترکیباتی که می‌تواند پاسخی همانند تنش‌های زیستی را در گیاه القاء کند متیل‌جاسمونات می‌باشد (Wasternack & Parthier, 1997). متیل‌جاسمونات یک تنظیم‌کننده رشد درونی در گیاه می‌باشد که منجر به القاء فعالیت آنزیم‌های ویژه‌ای می‌شود که واکنش‌های بیوسنتزی مربوط به تولید ترکیب‌های دفاعی مانند پلی‌فنل‌ها، آلکالوییدها و ترپنوییدها را کاتالیز می‌کند. نتیجه‌ی این فرآیند، القاشدن پاسخ‌های دفاعی و محافظت گیاه در برابر تنش‌های مختلف است (Wasternack & Parthier, 1997; Kozlowski *et al.*, 1999). در این پژوهش متیل‌جاسمونات به‌شکل خارجی روی گیاه سیاه‌دانه محلول‌پاشی شد تا با القای سیستم پاسخ مشابه با تنش‌های زیستی میزان بیان ژن‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز مونوترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها شامل ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز (*GDS*)، مونوترپن‌سنتاز (*MTS*)، بتاآمیرین‌سنتاز (*βAS*) و اسکوالن‌اپوکسیداز (*SQE*) را در سیاه‌دانه در زمان‌های مختلف بعد از تیمار متیل جاسمونات بررسی کرد تا درک مناسبی را از روند بیان ژن‌هایی که در بیوسنتز مونوترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها دخیل می‌باشند به‌دست آورد. نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق می‌تواند برای مطالعات آینده به‌منظور بررسی ارتباط بیوسنتز ترکیبات ترپنی و میزان رونوشت ژن‌های مربوطه استفاده شود.



شکل ۱. مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها در سلول‌های گیاهی. مسیر کلی بیوسنتز ترپن‌ها شامل مسیر وابسته به موالونات (**MVA**) و مسیر مستقل از موالونات (**MEP**) به‌ترتیب در سیتوزول و پلاستید. اختصارات عبارت‌اند از: گلیسرآلدهید ۳-فسفات (**GA3P**)، ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز (***GDS***)، مونوترپن‌سنتاز (***MTS***)، ایزوپنتیل‌دی‌فسفات (**IDP**)، اسکوالن‌اپوکسیداز (***SQE***)، بتاآمیرین‌سنتاز (***βAS***)، دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (**DMADP**)، فارنسیل‌دی‌فسفات (**FDP**)، متیل‌اریتریتول ۴-فسفات (**MEP**)، ژرانیل‌دی‌فسفات (**GDP**).

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت بررسی بیان نیمه‌کمی ژن‌ها

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های بتاآمیرین‌سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز آغازگرها براساس توالی‌های اختصاصی مربوط به ژن‌های بتاآمیرین‌سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز در 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 ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز براساس توالی این ژن که توسط Shamsi Fard (۲۰۱۲) توالی‌یابی شده آغازگرها طراحی شدند. هم‌چنین برای بررسی بیان ژن مونوترپن‌سنتازی براساس توالی این ژن که توسط Elyasi و همکاران (۲۰۱۵) 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 آورده شده است. برای مطالعه‌ی بیان هر کدام از ژن‌های موردنظر در اندام‌های سیاه‌دانه نیاز به‌یک جفت آغازگر اختصاصی می‌باشد. یک جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر ژنی موردنیاز است که در همه اندام‌ها به‌یک میزان بیان شود (ژن کنترل) وقتی این ژن در همه اندام‌ها به‌یک میزان بیان شود میزان بیان ژن مورد نظر نسبت به آن سنجیده می‌شود و ژن کنترل در این مطالعه ژن دی‌گلیسرآلدهید ۳ فسفات‌دهیدروژناز (*GAPDH*) در نظر گرفته شد (جدول ۱) (Scholz *et al*., 2009). 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 جدول۱ آورده شده است.

تیمار نمونه‌های گیاهی با متیل‌جاسمونات

ژنوتیپ مورد استفاده در گلخانه‌ی تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان کشت شد. متیل‌جاسمونات با غلظت ۰/۱ 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 RNAبا روش Piotr و Sacchi (۲۰۰۶) از بافت برگ شاهد و تیمار صورت گرفت. بعد از تایید صحت حضور RNAها با کمک ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید، غلظت RNAبا نانودراپ مشخص شد و به‌منظور تهیه cDNA هم غلظت شدند.

سنتز cDNA و RT-PCR نیمه‌کمی

از RNAهای استخراج‌شده از بافت برگ، با استفاده از کیت RT-PCR شرکت ویوانتیس مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده cDNA سنتز شد (Vivantis, Malaysia). بیان نیمه‌کمی ژن‌های مونوترپن‌سنتاز، ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز، بتاآمیرین‌سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز با کمک RT-PCR نیمه‌کمی انجام شد و با استفاده از ژن *GAPDH*به عنوان ژن مرجع نرمال‌سازی انجام شد (Lohrasbi *et al*., 2007).

تحلیل آماری

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

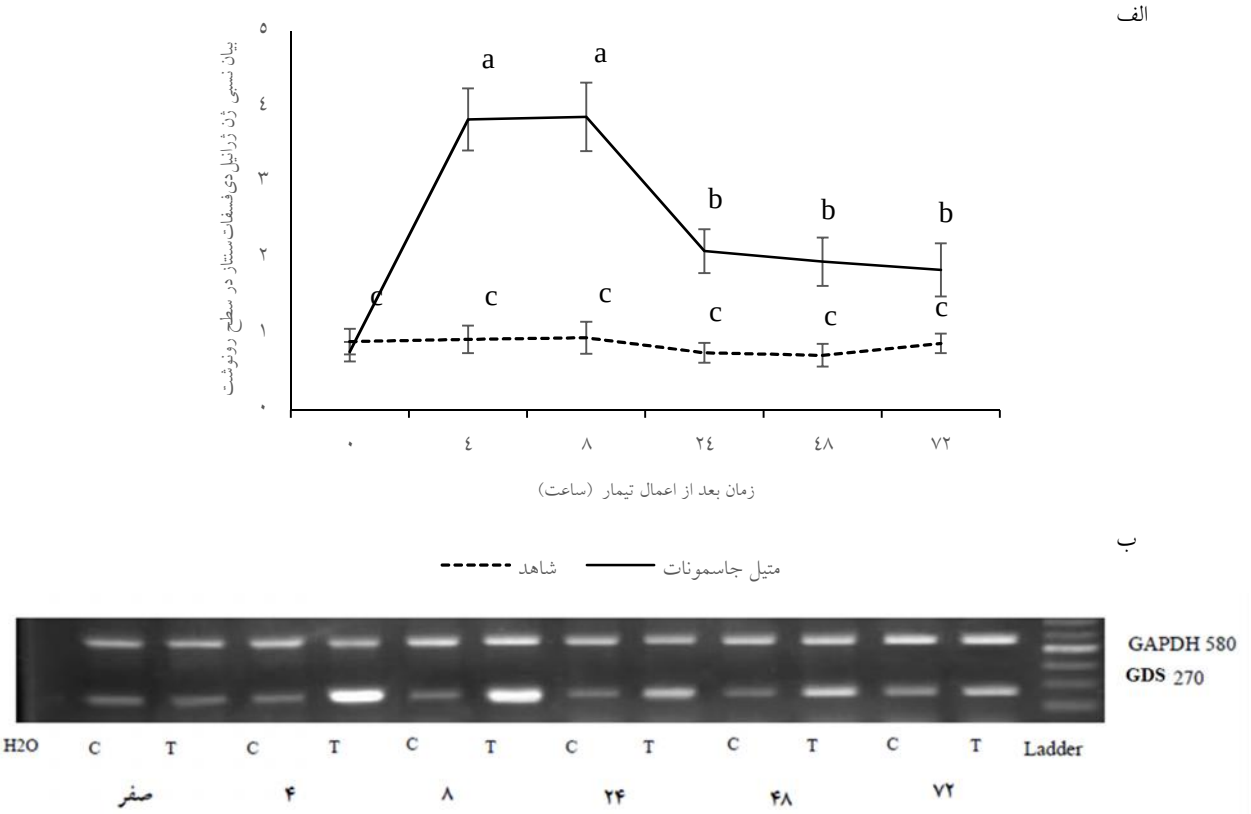
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	شماره دسترسی	طول قطعه Bp
GAPDH-F	TCGGGATCAACGGGTTTGGAAG	ºC۶۳/۶	(Scholz*et al*., 2009)	**bp۵۸۰**
GAPDH-R	CTCTCCAGTCCTTGCTTGATGGTC	ºC۶۰		
MTS2-F	CACACCAAAAGAAGTCGTGG	ºC۵۲/۶	KT353035	**bp۲۵۰**
MTS2-R	CAGCAAGTCGAAGAATCAAGG	ºC۵۳/۹		
GDS-F	ACCCAAATCGGTCCGTGATG	ºC۶۱	KF614970.1	**bp۲۷۰**
GDS-R	GCAAGCAAGCTAACGACCTC	ºC۶۳		
SQE-F	TATTGTTGGTGCTGGTGTCG	ºC۵۴	FJ232947.1	**bp۸۴۰**
SQE-R	AAAATAGCACCAGGAGTGGG	ºC۵۲/۹		
AMYRIN-F	GTCCTCCCTTCATTTCTCCC	ºC۵۳/۷	FJ013228.1	**bp۷۶۰**
AMYRIN-R	AGAAGGCAGACCATTAGGCC	ºC۵۴/۵		

GAPDH: گلیسرآلدهید ۳-فسفات، *MTS*:مونوترپن‌سنتاز، *GDS*:ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز، *SQE*:اسکوآلن‌اپوکسیداز، *AMYRIN*: بتاآمیرین‌سنتاز



شکل ۲. الف) نمودار میزان بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز (*GDS*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. ب) نتیجه PCR نیمه‌کمی مربوط به بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز (*GDS*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است. (C: شاهد. T: تیمار متیل‌جاسمونات).

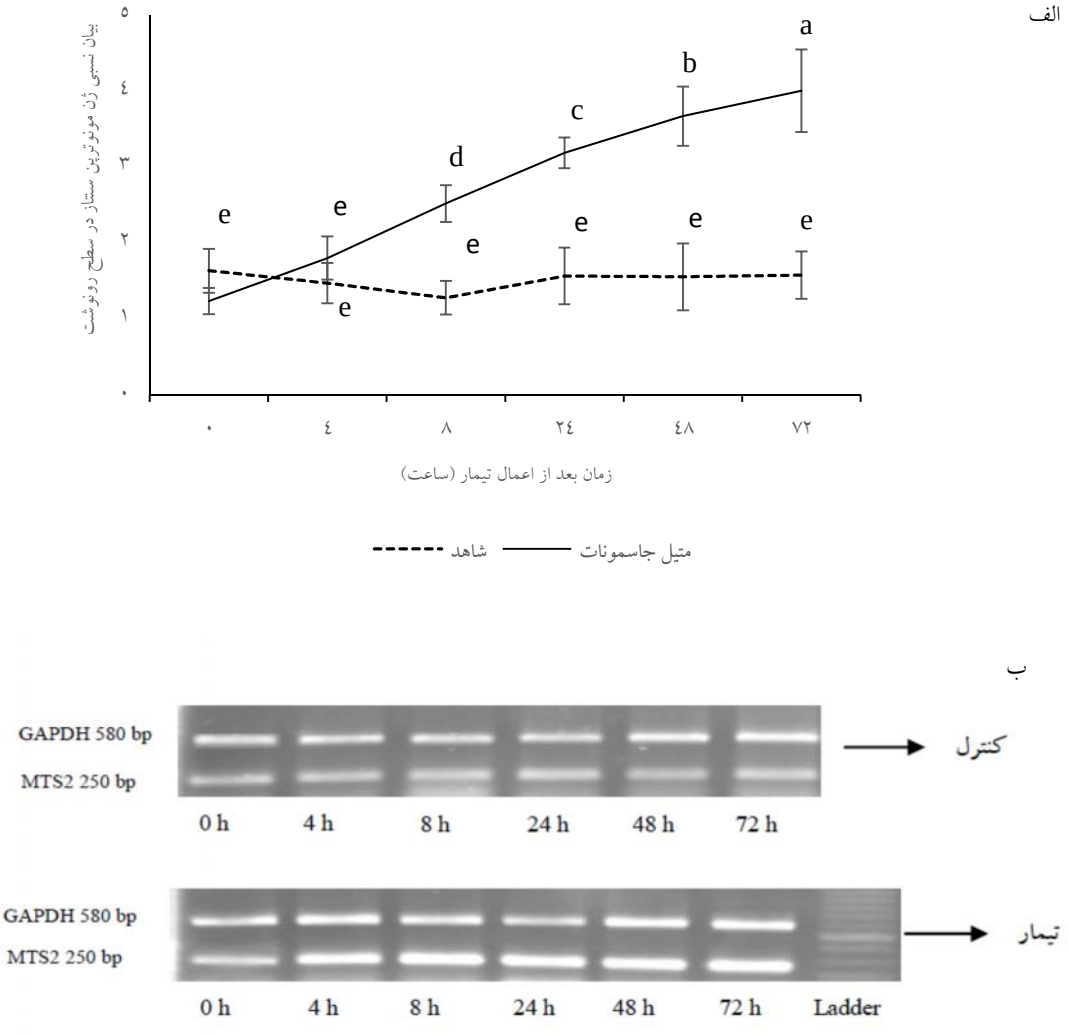
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب از بافت برگ گیاه دارویی سیاه‌دانه با استفاده از روش تک‌مرحله‌ای مبتنی بر گوانیدیوم انجام شد. سپس سنتز cDNA صورت گرفت و برای مقایسه الگوی بیان ژن‌های مورد نظر استفاده شد.

مطالعه بیان نیمه‌کمی ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز (*GDS*) در گیاه سیاه‌دانه تحت تأثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار نشان داد که بیان این ژن در گیاهان تیمارشده نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است (شکل ۲). بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز ۴ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش یافت بیان در ۸ ساعت تفاوت معنی‌داری را با ۴ ساعت نشان نداد و از ۸ ساعت به بعد با کاهش معنی‌دار نسبت به ۴ ساعت و ۸ ساعت یک روند تقریبا ثابتی را طی کرد (P<%5). در گیاه شاهد یک روند تقریبا یکنواخت در میزان بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان بیان ژن مشاهده نشد (P>%5).



شکل ۳. الف) نمودار میزان بیان ژن مونوترپن‌سنتاز (*MTS*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. ب) نتیجه PCR نیمه‌کمی مربوط به بیان ژن مونوترپن‌سنتاز (*MTS*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است. (C: شاهد. T: تیمار متیل جاسمونات).

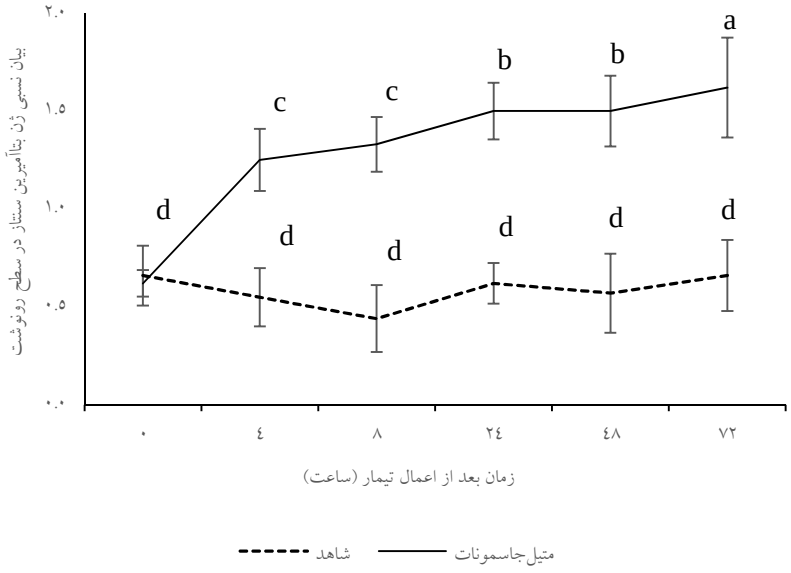
www.SID.ir

Archive of SID

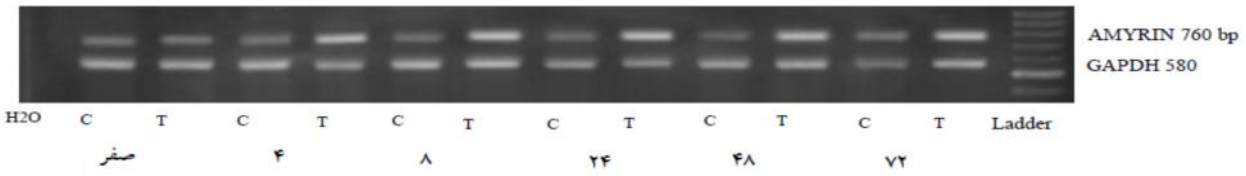
نتایج حاصل از بررسی بیان ژن مونوترپن‌سنتاز(*MTS*) در تیمار با متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار نشان داد که بیان این ژن در اثر تیمار با متیل‌جاسمونات افزایش می‌یابد و در ۷۲ ساعت به حداکثر بیان خود می‌رسد (P<%5)، این درحالی است که بیان این ژن در گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و روند یکنواختی داشت (P>%5) (شکل ۳).

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن بتاآمیرین‌سنتاز (*βAS*) تحت تأثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار نشان داد که نمونه‌های شاهد میزان بیانشان در زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری نداشتند (P>%5) درحالی‌که پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات به نسبت نمونه‌های شاهد بیان ژن مذکور بعد از ۴ ساعت اعمال تیمار افزایش یافته و از ۴ ساعت به بعد روند تقریبا ثابتی و یکنواختی در افزایش بیان ژن دیده شد (P<%5) (شکل ۴).

الف



ب



شکل ۴. الف) نمودار میزان بیان ژن بتاآمیرین‌سنتاز (*AMYRIN*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. ب) نتیجه PCR نیمه‌کمی مربوط به بیان ژن بتاآمیرین‌سنتاز (*AMYRIN*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است. (C: شاهد. T: تیمار متیل جاسمونات).

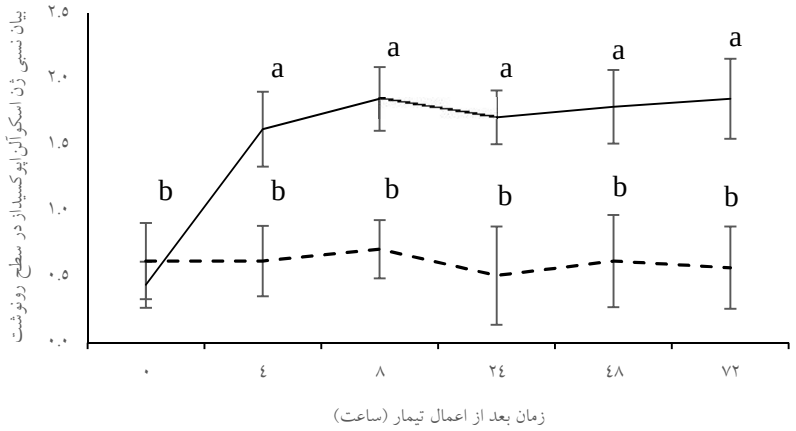
نتایج حاصل از بررسی بیان ژن اسکوآلن‌اپوکسیداز(*SQE*) تحت تأثیر تیمار با متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار نشان داد که در بازه‌ی زمانی صفر تا ۸ ساعت روند افزایشی سریعی در بیان این ژن دیده می‌شود و از ۸ ساعت به بعد با شیب ملایم و به‌صورت تدریجی افزایش می‌یابد (P<%5). در گیاه شاهد یک روند تقریبا یکنواخت در میزان بیان ژن اسکوآلن‌اپوکسیداز

www.SID.ir

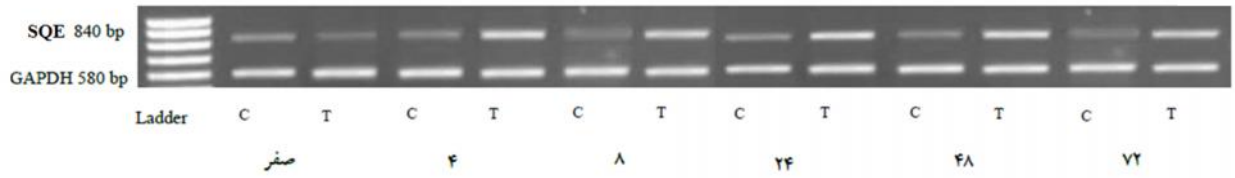
Archive of SID

مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان بیان ژن مشاهده نشد (P>%5) (شکل ۵).

الف



ب



شکل ۵. الف) نمودار میزان بیان ژن ژن اسکوآلن‌اپوکسیداز (*SQE*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. ب) نتیجه PCR نیمه‌کمی مربوط به بیان ژن ژن اسکوآلن‌اپوکسیداز (*SQE*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است.(C: شاهد. T: تیمار متیل‌جاسمونات).

بحث

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در اثر تیمار با متیل‌جاسمونات نشان داد که بیان نسبی ژن‌های مونوترپن‌سنتاز، ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز، بتاآمیرین‌سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز در اثر تیمار افزایش یافت. الگوی بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز متفاوت از سه ژن دیگر بود. بیان برای ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز ۴ ساعت پس از اعمال تیمار به حداکثر رسید و در ۸ ساعت نیز در همان سطح باقی ماند. میزان بیان در ساعات بعد کاهش یافت اما همچنان در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار همچنان بیشتر از میزان بیان در گیاه شاهد بود. الگوی بیان نسبی برای سه ژن دیگر مشابه و صعودی بود. به‌طوری‌که بیان پس ازاعمال تیمار همچنان افزایش یافت تا این که در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار به حداکثر میزان خود رسید. تحقیقات نشان داده است که بیان نسبی ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز در سطح رونوشت در پاسخ به‌تیمار متیل‌جاسمونات در گیاه یونجه ۵ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش یافت (Yan *et al.*, 2012). نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن بتاآمیرین‌سنتاز در گیاه سیاه‌دانه در اثر تیمار با متیل‌جاسمونات نشان داد که بیان نسبی این ژن در اثر القاء تیمار افزایش می‌یابد و باعث افزایش تولید بتاآمیرین می‌شود (Scholz *et al.*, 2009). نتایج مذکور با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مطابقت دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات نشان داده است که با تیمار متیل‌جاسمونات در کشت سلولی شیرین‌بیان میزان رونوشت β-آمیرین‌سنتاز و در ادامه تولید ساپونین افزایش یافت (Hayashi *et al*., 2004). بررسی اثر تیمار متیل‌جاسمونات بر میزان بیان ژن بتاآمیرین‌سنتاز در گونه یونجه زرد (*Medicago truncatula*) نشان داد که این تیمار سبب افزایش بیان ۵۰ برابری ژن مورد نظر شده و حداکثر بیان در ۲۴ ساعت بعد از تیمار مشاهده شد که این نتایج نشان دهنده‌ی تاثیر متیل‌جاسمونات بر روی بیان نسبی این ژن می‌باشد (Suzuki *et al*., 2005). در ریشه گیاه *Bupleurum kaoi* میزان رونوشت‌های ژن β-آمیرین‌سنتاز بعد از تیمار ۰/۵mM متیل‌جاسمونات دو برابر شدند (Shabani *et al*., 2010). بالا بودن میزان متیل‌جاسمونات در بذرهای در حال جوانه‌زدن سویا نیز مسأله قابل‌توجهی است و پیشنهاد شده است که متیل‌جاسمونات یک مولکول سیگنال بوده و موجب افزایش ژن‌های درگیر در بیوسنتز ساپونین می‌شود (Hayashi *et al*., 2004). در ضمن β-آمیرین‌سنتاز یکی از اکسیدوسکوآلن‌اکسیدازهاست که در نقطه انشعاب بیوسنتز استرول (متابولیت اولیه) و ساپونین تری‌ترپن (متابولیت ثانویه) است. بنابراین داشتن اطلاعات در راستای تنظیم β-آمیرین‌سنتاز برای فهم چگونگی تنظیم، مکانیسم و فیزیولوژی متابولیسم ثانویه ضروری است. تاکنون گزارش‌هایی از دست‌کاری چرخه ساپونین تری‌ترپن بر اساس بیان ژن رمزکننده β-آمیرین‌سنتاز، ارائه شده است و مشخص شده است که محصول ژن β-آمیرین‌سنتاز یکی از پیش‌ماده‌های کلیدی در چرخه ساپونین تری‌ترپن است. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق و سایر تحقیقات انجام شده، با بالا بردن بیان آنزیمβ-آمیرین‌سنتاز، ممکن است تولید ساپونین‌ها افزایش یابد. با اعمال تیمارهای مختلف می‌توان میزان بیان این ژن را افزایش داد و به‌دنبال آن ممکن است میزان تولیدترکیبات ساپونین افزایش یابد. گیاه سیاه‌دانه حاوی ترکیبات ساپونین تری‌ترپنوییدی از جمله Hedrin و Kalopanaxsaponin می‌باشد که این ترکیبات خاصیت ضدتوموری دارند. در مسیر بیوسنتزی این ترکیبات آنزیم اسکوآلن‌اپوکسیداز به‌عنوان یک آنزیم مهم و کلیدی است که محدودکننده سرعت واکنش در مسیر بیوسنتزی ترکیب یا ترکیبات هدف عمل می‌کند. در یک تحقیق اثر متیل‌جاسمونات به‌عنوان یک الیسیتورشیمیایی بر میزان بیان ژن اسکوآلن‌اپوکسیداز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که با اعمال این تیمار افزایش ۲/۵ برابری در بیان این ژن در اندام‌های هوایی صورت گرفت که در نهایت سطح Hedrin و Kalopanaxsaponin نزدیک به ۱۰ درصد افزایش پیدا کرد و در این تحقیق بیان نسبی ژن اسکوآلن‌اپوکسیداز در سیاه‌دانه در اثر اعمال تیمار متیل‌جاسمونات ۴ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش یافت و در ۸ ساعت و ۷۲ ساعت به‌بیشترین میزان خود رسید (Scholz *et al*., 2009). در گیاهان *Centella asiatica* و *Galphima glance*، ماده 2,3-oxidosqualene به‌عنوان پیش‌ماده برای متابولیسم تری‌ترپن‌ها عمل می‌کند. در تحقیقی برای بررسی اثر متیل‌جاسمونات بر میزان متابولیت‌های تری‌ترپنی این ۲ گیاه، متیل‌جاسمونات اعمال شد. نتایج نشان داد که میزان ترکیبات تری‌ترپنی که از پیش‌ماده‌ی 2,3-oxidosqualene ساخته می‌شوند به‌شدت افزایش یافت (Mangas *et al*., 2006). با توجه به این نتایج می‌توان تیمار متیل‌جاسمونات را برای افزایش بیان ژن اسکوآلن‌اپوکسیداز و آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی تری‌ترپن‌ها و القای تغییر در مسیر بیوسنتزی ترکیبات ترپنوییدی پیشنهاد کرد.

در این رابطه اثر سایر الیسیتورهای زیستی مانند اسیدسالیسیلیک نیز بر بیان این ژن‌ها در سیاه‌دانه مشاهده شده است (Elyasi *et al*., 2015). مقایسه الگوی بیان ژن تحت تاثیر تیمار با اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات نشان‌دهنده‌ی الگوی بیان تقریبا یکسانی برای هر ۴ ژن مورد مطالعه به‌ویژه برای ژن‌های ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز و بتاآمیرین‌سنتاز بود. بیان نسبی ژن مونوترپن‌سنتاز در اثر تیمار با متیل‌جاسمونات بیشتر از تیمار با اسیدسالیسیلیک القاء شد. به‌طوری‌که در حداکثر میزان بیان نسبت به شاهد ۴/۵ برابر افزایش بیان یافت و این برای تیمار با

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدسالیسیلیک افزایش ۲/۵ برابری داشت که می‌تواند به‌دلیل نقش بیشتر این ژن در مسیر القایی توسط متیل‌جاسمونات نسبت به اسیدسالیسیلیک باشد. در بین ژن‌های مورد مطالعه تنها ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز دارای الگوی بیان متفاوتی بود که می‌تواند به‌دلیل دخالت آن در مسیر بیوسنتزی کلروفیل و پلاستوکینون باشد (Elyasi *et al*., 2015; Guodong & Dixon 2008). نتایج حاصل از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات نشان می‌دهد که تمام ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق در اثر تیمار متیل جاسمونات القاء می‌شوند که می‌تواند به‌دلیل نقش ترپن‌ها در مسیرهای دفاعی و انتقال پیام باشد. با توجه به این نتایج می‌توان تیمار متیل‌جاسمونات را برای افزایش بیان ژن‌ها و آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی تری‌ترپن‌ها و القای تغییر در مسیر بیوسنتزی ترکیبات ترپنوئیدی پیشنهاد کرد زیرا بر اساس مطالعات مختلف میزان تولید ترکیبات ترپنی با میزان رونوشت ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتزی آنها ارتباط مستقیم دارد (Nagegowda *et al*., 2010). به‌عنوان مثال افزایش ترکیب سزکویی‌ترپنی پارتنولید در گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*) در اثر تیمار متیل جاسمونات بیشتر مرتبط با افزایش رونوشت ژن ژرماکرن A سنتاز می‌باشد.

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 terpeniod biosynthesis in plants. Phytochemistry, 5: 49-58
- Barmley, P.M., 1997. Isoprenoid metabolism. In: Dey, P.M., and Hrborne, J.B., " Plant Biochemistry", Academic Press, San Diego, PP. 417-437.
- Davis, E.M. and Croteau, R., 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. Current Chemistry, 209: p. 54-95.
- Elyasi, R., Majdi, M., Bahramnejad, B. and Mirzaghaderi, GH., 2015. Expression pattern analysis of genes involved in the biosynthetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with salicylic acid. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23: 164-174
- Guodong, W. and Dixon, R.A., 2008. Heterodimericgeranyl (geranyl) diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 14: 1-6.
- Hayashi, H., Huang, P., Takada, S., Obinata, M., Inoue, K. and Shibuya, M., 2004. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27: 1086–1092.
- Iqbal, M.S., Nadeem, S.H., Mehbood, S.H., Chafoor, A., Rajoka, M.I., Qureshi, A.S. and Niaz, B., 2011. Exploration of genotype specific fingerprinting of *Nigella sativa L.* using RAPD markers. Turkish Journal Agriculture and Forestry, 35: 1-10.
- Irmler, 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 *Catharan thusroseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P-450 CYP72A1 as secologanin synthase. Plant Journal, 24: 797-804.
- Kozlowski, G., Buchala, A. and M´etraux, J.P., 1999. Methyl jasmonate protects Norway spruce (*Picea* abies (L.) Karst.) seedlings against Pythium against *Pythium ultimum*Trow. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55: 53-58.
- Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y., 1998. Beta-amyrin synthase-cloning of oxidosqualenecyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. European Journal of Biochemistry, 15: 238-244.
- Lichtenthaler, H.K., 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50:47–65.
- Lohrasebi, T., Malboobi, M.A., Samaeian, A. and Sanei, V., 2007. Differential expression of *Arabidopsis thaliana* acid phosphatases in response to abiotic stresses. Iranian Journal of Biotechnology, 5: 130-139.
- Mangas, S., Bonfill, M., Osuna, L., Moyano, E., Tortoriello, J., Cusido, R.M., Piñol, M.T. and Palazón, J., 2006. The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centellaasiatica*, *Ruscusaculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants. Phytochemistry, 67: 2041-2049.

www.SID.ir

Archive of SID

- Suzuki, H., Naoumkina, M.S., Aziz, N., Huhman, G., Sumner, L., Mendes, J.W. and Dixon, R., 2005. Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. Planta, 220: 696-707.
- Tholl, D., 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. Current Opinion in Plant Biology, 9: 1–8.
- Wasternack, C. and Parthier, B., 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. Trends in Plant Sciences, 2: 302–307.
- Xu, R., Fazio, G.C. and Matsuda, S.P.T., 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. Phytochemistry, 65: 261-291.
- Zhao, C.L., Cui, X.M., Chen, Y.P. and Liang, Q., 2010. Key enzymes of triterpenoids aponin biosynthesis and the induction of their activities and gene expressions in plants. Natural Products Communication, 5:1147–1158.
- Piotr, C. and Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nature Protocols, 1: 581-585.
- Scholz, M., Lipinski, M., Leupold, M., Luftmann, H., Harving, L., Ofir, R., Fischer, R., Prufer, D. and Muller, K., 2009. Methyl jasmonate induced accumulation of kalapanaxsaponin I in *Nigella Sativa.* Phytochemistry, 70: 517-522.
- Shabani, L., Ehsanpour, A.A. and Esmaeili, A., 2010. Assessment of squalene synthase and beta-amyrin synthase gene expression in licorice roots treated with methyl jasmonate and salicylic acid using real-time qPCR. Russian Journal of Plant Physiology, 57: 480-484.
- Shamsi Fard, M.H., 2012.Transcript analysis of Geranyldiphosphate synthase gene in different tissues of black cumin (*Nigella sativa* L.). M.Sc. Thesis, Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan.

www.SID.ir

Archive of SID

Expression analysis of genes involved in terpenes biosynthesis in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with methyl jasmonate

R. Elyasi[1], M. Majdi[2*], B. Bahramnejad[3] and Gh. Mirzaghaderi[4]

1- M.Sc., Students, Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran
2- Corresponding auther, Assist. Prof., Department of Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran, Email: m.majdi@uok.ac.ir
3- Assoc. Prof., Department of Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran
4- Assist. Prof., Department of Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran

Received: 02.09.2015 Accepted: 20.12.2015

Abstract

Black cumin (*Nigella sativa*) is an important medicinal plant belongs to the Ranunculaceae which produce large diversity of secondary metabolites including industrial and medicinal monoterpenes/ triterpenes. In the present work, relative gene expression of genes involved in biosynthetic pathway of terpenes including a monoterpene synthase (*MTS*), geranyldiphosphate synthase (*GDS*), β- amyrin synthase (*βAS*) and squaleneepoxidase(*SQE*) were investigated in black cumin plants treated with methyl jasmonate. The plants were grown in a greenhouse sprayed with 0.1 mM methyl jasmonate. Samples were collected at 0, 4, 8, 24, 48 and 72 hours after applying the treatments. RT-PCR was performed by gene-specific primers after RNA extraction and cDNA synthesis. Results of semi quantitative RT-PCR showed that the expression pattern of *GDS* gene differed with the results of other genes. The highest gene expression of *GDS* was observed at 4 h and its expression remained at the same level till 8 h then dropped at next time periods. The expression patterns of monoterpene synthase, β-amyrin synthase and squaleneepoxidase showed rising trend. Gene expression analysis of the genes at transcript level using semi-quantitative PCR in black cumin leaves treated by methyl jasmonate revealedinduced-geneexpression which might show the roles of terpenes in defense mechanisms and signal transduction. Consequently, methyl jasmonate treatment can be considered to induce the terpene biosynthetic pathway and to study the enzymes/ metabolites associated with terpenoid metabolism.

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

www.SID.ir