

بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها تحت تأثیر متیل جاسمونات 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 مونوترپن‌ها 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 (*AS*) و اسکوالن‌ایوکسیداز (*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 نشان داد 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 اسکوالن‌ایوکسیداز مشابه و دارای روند صعودی بود. نتایج حاصل از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات نشان داد که تمام ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق در اثر متیل‌جاسمونات القاء می‌شوند که می‌تواند به دلیل 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 ترپنوئیدها پیشنهاد کرد.

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

مقدمه

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

امروزه گیاهان دارویی به‌صورت گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی، به‌معنی

می‌شوند که با اتصال سربه‌سر دو مولکول فارتسیل دی‌فسفات ترکیب ۳۰ کربنه‌ی اسکوالن (Squalene) تولید می‌شود. در واقع اسکوالن یک پیش‌ماده برای تشکیل سایر تری‌ترینوئیدها است (شکل ۱) (Barmley, 1997). اسکوالن توسط اکسیدواسکوالن اکسید می‌شود که این نقطه‌ی شروع برای واکنش حلقه‌ای شدن در بیوسنتز تری‌ترین‌سایونین است. اولین مرحله در بیوسنتز تری‌ترین‌سایونین‌ها، حلقوی شدن ۳،۲-اکسیدواسکوالن است (Xu et al., 2004). آنزیم‌های کاتالیزکننده‌ی فرایند حلقوی شدن، اکسیدواسکوالن سیکلازها هستند که آنزیم بتا‌آمرین سنتاز نیز متعلق به این خانواده آنزیمی است (Irmler et al., 2000). تری‌ترینوئیدسایونین‌ها جزو ترکیبات دارویی اصلی سیاهدانه می‌باشند و در مسیر بیوسنتزی آن‌ها مشخص شده است که اسکوالن اپوکسیداز (Squalene epoxidase) و بتا‌آمرین سنتاز (Amyrin synthase) دو ژن کلیدی در مسیر بیوسنتزی تری‌ترینوئیدسایونین‌ها می‌باشند (Zhao et al., 2010). اسکوالن اپوکسیداز اولین مرحله اکسیژنه شدن را در بیوسنتز استرول‌ها ایفا می‌کند و به‌عنوان آنزیم محدودکننده سرعت واکنش در بیوسنتز سایونین‌ها عمل می‌کند. بتا‌آمرین نیز پیش‌ماده عمومی در بیوسنتز تری‌ترین‌ها است که از طریق ۲،۳-اکسیدواسکوالن بیوسنتز می‌شود و -آمرین سنتاز تبدیل اکسیدواسکوالن به بتا‌آمرین را کاتالیز می‌کند (Kushiro et al., 1998) (شکل ۱).

مونوترین‌ها نیز ترکیباتی متنوعی می‌باشند که از طریق پیش‌ماده ژرانیل دی‌فسفات (GDP) و در مسیر MEP بیوسنتز می‌شوند (Tholl et al., 2006). ژرانیل دی‌فسفات سنتاز (GDS) آنزیم کلیدی است که از طریق دی‌متیل آلایل فسفات (DMADP) و ایزوپنتنیل دی‌فسفات (IDP) باعث تولید ژرانیل دی‌فسفات (GDP) می‌شود (Lichtenthaler, 1999). مونوترین سنتازها نیز آنزیم‌های کلیدی هستند که مسئول تولید ترکیبات مختلف مونوترینی از طریق ژرانیل دی‌فسفات (GDP) می‌شود (Tholl, 2006). ویژگی‌های منحصر به فرد ترین‌ها از قبیل خواص زیستی متنوعی مانند فعالیت حشره‌کشی، ضد ویروسی، ضدقارچی

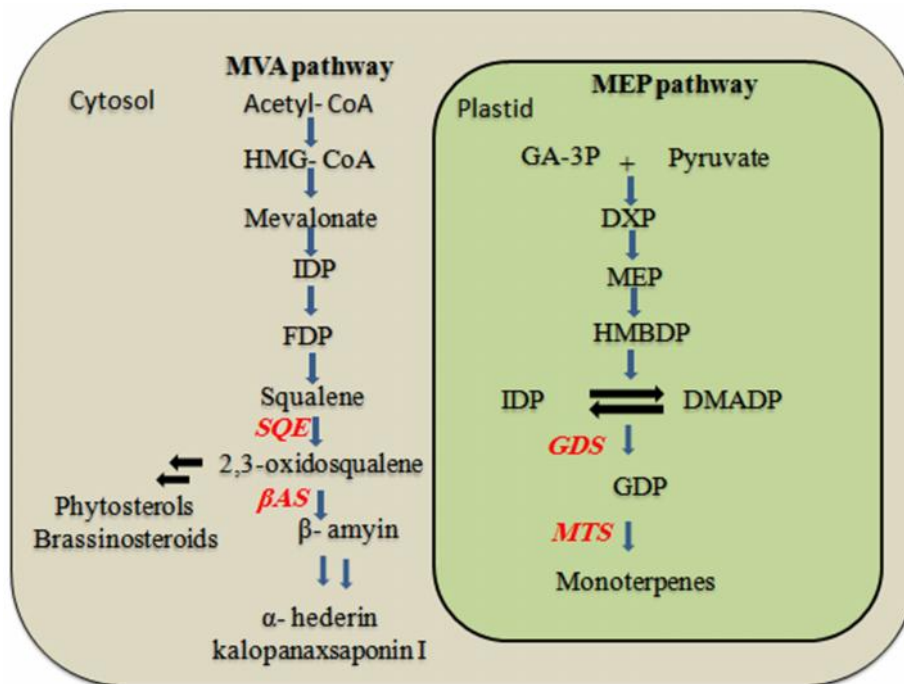
می‌شود. طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی (WHO) بیش از ۸۰ درصد مردم جهان (نزدیک به ۵ میلیارد نفر)، برای درمان بیماری‌ها از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند (Vines, 2004). سه دسته عمده ترکیبات ثانویه گیاهی شامل آلکالوئیدها، فنولیک‌ها و تری‌ترینوئیدها می‌باشند. تری‌ترینوئیدها بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه هستند که شامل بیش از ۲۰ هزار ترکیب شناخته شده می‌باشند (Davis & Croteau, 2000). تری‌ترینوئیدها از دو طریق در گیاهان سنتز می‌شوند، یکی از طریق مسیر موالونات با مداخله استات و دیگری از طریق متیل‌اریتریتول فسفات که پیرووات و گلیسرآلدئید-۳ فسفات را به‌عنوان پیش‌ماده به‌کار می‌برد (Davis & Croteau, 2000). تری‌ترینوئیدها 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 دیپلوئید ($2n=2x=12$) است. دانه‌ی گیاه سیاهدانه منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه مونوترین‌ها و سایونین‌ها می‌باشد که کاربردهای صنعتی، تجاری و پزشکی فراوانی برای آن‌ها ذکر شده است (Iqbal et al., 2011).

تری‌ترینوئیدها با وجود داشتن ساختار و عملکرد پیچیده، پلیمر ساده‌ای از واحدهای ایزوپروپنیل‌کربن و ایزوپنتنیل دی‌فسفات (IDP) می‌باشند. گیاهان دارای دو مسیر وابسته به موالونات (MVA) (Mevalonate) و مسیر متیل‌اریتریتول فسفات (Methylerythritol phosphate) (MEP) بیوسنتزی برای تری‌ترینوئیدها هستند که در چگونگی تولید واحدهای پنج‌کربنه با هم اختلاف دارند و برای ساخت ترکیبات سزکویی و تری‌ترین‌ها به‌کار گرفته می‌شوند (شکل ۱) (Aharoni et al., 2006).

تری‌ترینوئیدها با بیش از ۱۰۰ نوع اسکلت تری‌ترینی متفاوت به‌عنوان ترکیبات دفاعی دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضد میکروبی می‌باشند (Aggarwal et al., 2007). تری‌ترینوئیدها از مسیر موالونیک اسید (MVA) سنتز

(Wasternack & Parthier, 1997; Kozlowski *et al.*, 1999). در این پژوهش متیل جاسمونات به شکل خارجی روی گیاه سیاه‌دانه محلول‌پاشی شد تا با القای سیستم پاسخ مشابه با تنش‌های زیستی میزان بیان ژن‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز مونوترپن‌ها و تری‌ترین‌ها شامل ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز (*GDS*)، مونوترپن سنتاز (*MTS*)، بتا‌آمیرین سنتاز (*AS*) و اسکوالن اپوکسیداز (*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 تری‌ترین‌ها دخیل می‌باشند به دست آورد. نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌تواند برای مطالعات آینده به منظور بررسی ارتباط بیوسنتز ترکیبات تری‌نی و میزان رونوشت ژن‌های مربوطه استفاده شود.

و ضدباکتریایی می‌تواند آن‌ها را به عنوان عاملی برای افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زنده معرفی کند. اعمال تیمارهایی از قبیل متیل جاسمونات که به صورت مصنوعی باعث القاء مسیرهای دفاعی در گیاه می‌شود می‌تواند دلیلی برای نقش دفاعی تری‌ترین‌ها باشد و یکی از ترکیباتی که می‌تواند پاسخی همانند تنش‌های زیستی را در گیاه القاء کند متیل جاسمونات می‌باشد (Wasternack & Parthier, 1997). متیل جاسمونات 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، آلکالوئیدها و تری‌نوئیدها را کاتالیز می‌کند. نتیجه‌ی این فرآیند، القاشدن پاسخ‌های دفاعی و محافظت گیاه در برابر تنش‌های مختلف است



شکل ۱. مسیر بیوسنتزی تری‌ترین‌ها در سلول‌های گیاهی. مسیر کلی بیوسنتز تری‌ترین‌ها شامل مسیر وابسته به موالونات (*MVA*) و مسیر مستقل از موالونات (*MEP*) به ترتیب در سیتوزول و پلاستید. اختصارات عبارت‌اند از: گلیسرآلدئید ۳-فسفات (*GA3P*)، ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز (*GDS*)، مونوترپن سنتاز (*MTS*)، ایزوپنتیل‌دی‌فسفات (*IDP*)، اسکوالن اپوکسیداز (*SQE*)، بتا‌آمیرین سنتاز (*AS*)، دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (*DMADP*)، فARNسیل‌دی‌فسفات (*FDP*)، متیل‌اریتری‌تول ۴-فسفات (*MEP*)، ژرانیل‌دی‌فسفات (*GDP*).

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت بررسی بیان نیمه کمی ژن‌ها

به منظور بررسی بیان ژن‌های بتا آمیرین سنتاز و اسکوالن اپوکسیداز آغازگرها براساس توالی‌های اختصاصی مربوط به ژن‌های بتا آمیرین سنتاز و اسکوالن اپوکسیداز در گیاه سیاه‌دانه طراحی شدند. توالی این ژن‌ها با شماره شناسایی FJ013228.1 و FJ232947.1 از پایگاه داده NCBI به دست آمد. برای بررسی بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز براساس توالی این ژن که توسط Shamsi Fard (۲۰۱۲) توالی‌یابی شده آغازگرها طراحی شدند. همچنین برای بررسی بیان ژن مونوترین سنتازی 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 مورد نظر در اندام‌های 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 مورد نظر نسبت به آن سنجیده می‌شود و ژن کنترل در این مطالعه ژن دی‌گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز (*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 مورد نظر در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است در جدول ۱ آورده شده است.

تیمار نمونه‌های گیاهی با متیل جاسمونات

ژنوتیپ مورد استفاده در گلخانه‌ی تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان کشت شد. متیل جاسمونات با غلظت ۰/۱ میلی مولار 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 نیمه کمی ژن

استخراج RNA با روش Sacchi و Piotr (۲۰۰۶) از بافت برگ شاهد و تیمار صورت گرفت. بعد از تایید صحت حضور RNAها با کمک ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم پروماید، غلظت RNA با نانودراپ مشخص شد و به منظور تهیه cDNA هم غلظت شدند.

سنتز cDNA و RT-PCR نیمه کمی

از RNAهای استخراج شده از بافت برگ، با استفاده از کیت RT-PCR شرکت ویوانتیس مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده cDNA سنتز شد (Vivantis, Malaysia). بیان نیمه کمی ژن‌های مونوترین سنتاز، ژرانیل دی فسفات سنتاز، بتا آمیرین سنتاز و اسکوالن اپوکسیداز با کمک RT-PCR نیمه کمی انجام شد و با استفاده از ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع نرمال سازی انجام شد (Lohrasbi et al., 2007).

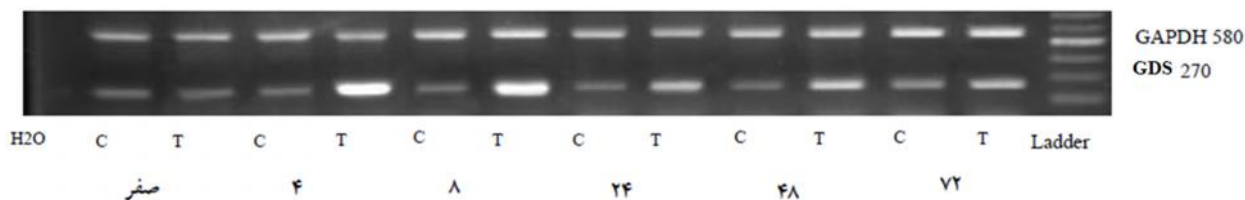
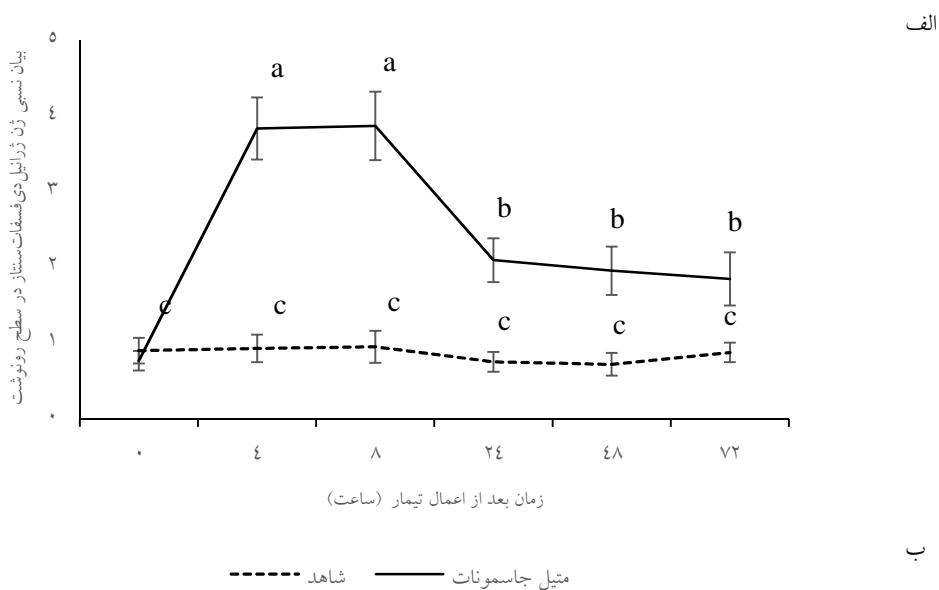
تحلیل آماری

با استفاده از نرم‌افزار GelQuantNET داده‌های حاصل از RT-PCR نیمه کمی به داده‌های کمی تبدیل شدند. تمامی آزمایش‌های انجام شده 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.

جدول ۱- مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	شماره دسترسی	طول قطعه Bp
GAPDH-F	TCGGGATCAACGGGTTTGAAG	°C۶۳/۶	(Scholzet <i>al.</i> , 2009)	bp۵۸۰
GAPDH-R	CTCTCCAGTCCTTGCTTGATGGTC	°C۶۰		
MTS2-F	CACACCAAAAGAAGTCGTGG	°C۵۲/۶	KT353035	bp۲۵۰
MTS2-R	CAGCAAGTCGAAGAATCAAGG	°C۵۳/۹		
GDS-F	ACCCAAATCGGTCCGTGATG	°C۶۱	KF614970.1	bp۲۷۰
GDS-R	GCAAGCAAGCTAACGACCTC	°C۶۳		
SQE-F	TATTGTTGGTGCTGGTGTCG	°C۵۴	FJ232947.1	bp۸۴۰
SQE-R	AAAATAGCACCAGGAGTGGG	°C۵۲/۹		
AMYRIN-F	GTCTCCCTTCATTTCTCCC	°C۵۳/۷	FJ013228.1	bp۷۶۰
AMYRIN-R	AGAAGGCAGACCATTAGGCC	°C۵۴/۵		

GAPDH: گلیسرآلدهید ۳-فسفات، *MTS*: مونوترین سنتاز، *GDS*: ژرانیل دی فسفات سنتاز، *SQE*: اسکوالن اپوکسیداز، *AMYRIN*: بتا آمیرین سنتاز

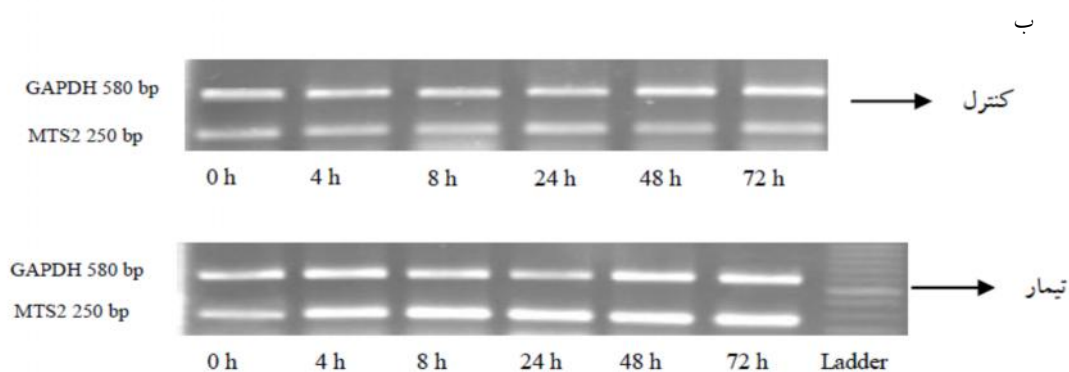
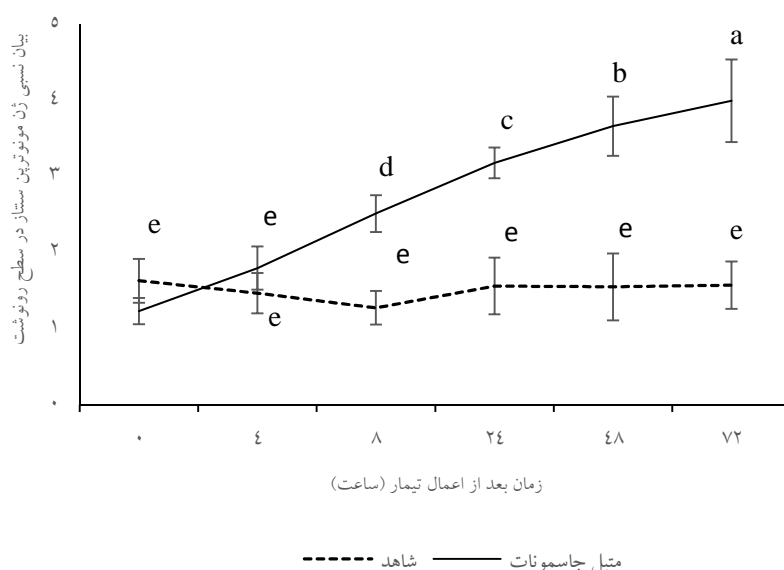


شکل ۲. الف) نمودار میزان بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز (*GDS*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات. ب) نتیجه PCR نیمه کمی مربوط به بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز (*GDS*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات. حروف یکسان بیانگر عدم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

نتایج

گیاهان شاهد افزایش یافته است (شکل ۲). بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز ۴ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش یافت بیان در ۸ ساعت تفاوت معنی داری را با ۴ ساعت نشان نداد و از ۸ ساعت به بعد با کاهش معنی دار نسبت به ۴ ساعت و ۸ ساعت یک روند تقریباً ثابتی را طی کرد ($P < 5\%$). در گیاه شاهد یک روند تقریباً یکنواخت در میزان بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز مشاهده شد و تفاوت معنی داری از لحاظ میزان بیان ژن مشاهده نشد ($P > 5\%$).

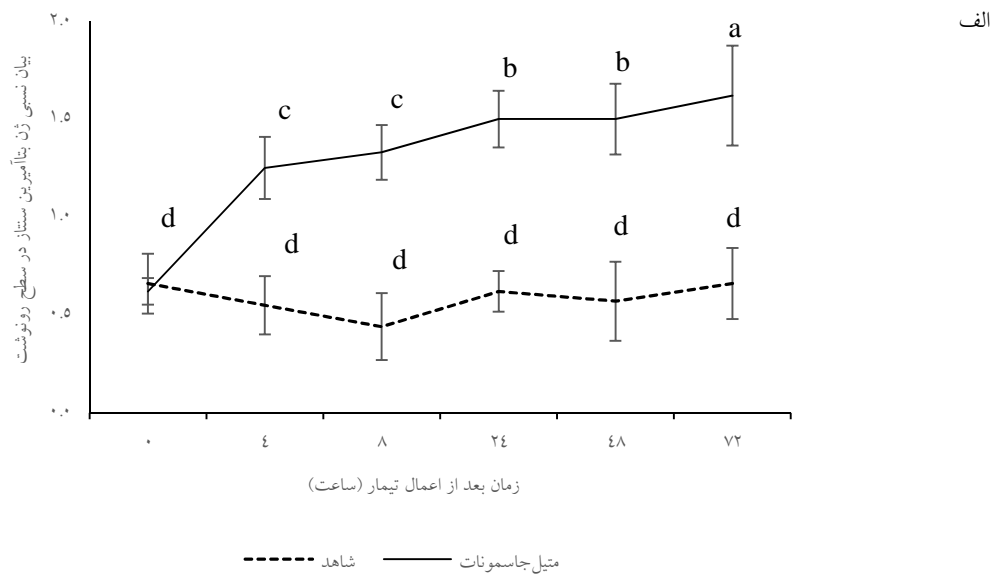
استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب از بافت برگ گیاه دارویی سیاه دانه با استفاده از روش تک مرحله ای مبتنی بر گوانیدینوم انجام شد. سپس سنتز cDNA صورت گرفت و برای مقایسه الگوی بیان ژن های مورد نظر استفاده شد. مطالعه بیان نیمه کمی ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز (*GDS*) در گیاه سیاه دانه تحت تأثیر متیل جاسمونات ۰/۱ میلی مولار نشان داد که بیان این ژن در گیاهان تیمار شده نسبت به



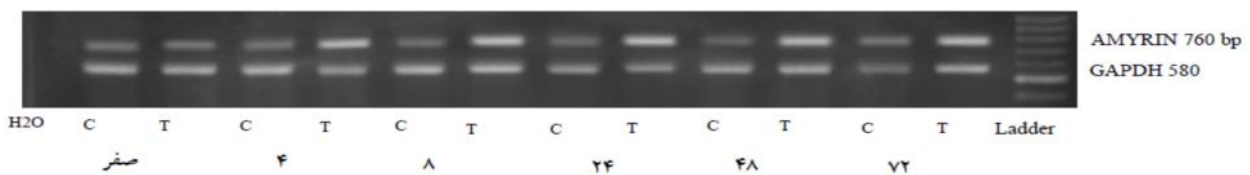
شکل ۳. الف) نمودار میزان بیان ژن مونوترپن سنتاز (*MTS*) در زمان های متفاوت در برگ گیاه سیاه دانه پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات. ب) نتیجه PCR نیمه کمی مربوط به بیان ژن مونوترپن سنتاز (*MTS*) در زمان های متفاوت در برگ گیاه سیاه دانه پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است. C: شاهد. T: تیمار متیل جاسمونات).

تحت تأثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار نشان داد که نمونه‌های شاهد میزبان بیانشان در زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری نداشتند ($P > 5\%$) در حالی که 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 تقریباً ثابتی و یکنواختی در افزایش بیان ژن دیده شد ($P < 5\%$) (شکل ۴).

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن مونوترپین سنتاز (*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 در حالی 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 بتا‌آمیرین سنتاز (*AS*)



ب

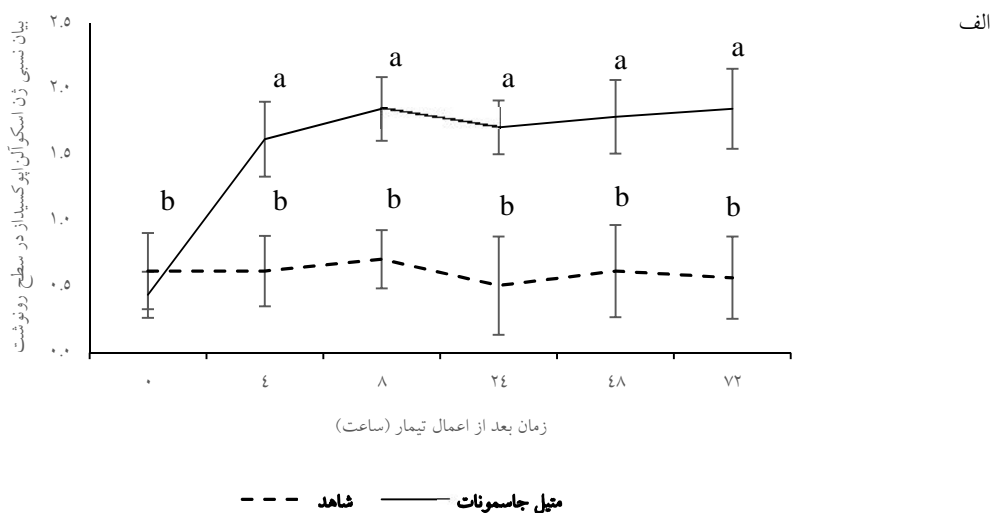


شکل ۴. الف) نمودار میزان بیان ژن بتا‌آمیرین سنتاز (*AMYRIN*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. ب) نتیجه PCR نیمه کمی مربوط به بیان ژن بتا‌آمیرین سنتاز (*AMYRIN*) در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف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

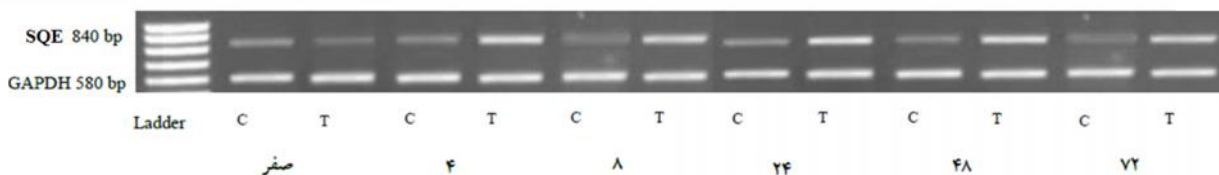
بیان این ژن دیده می‌شود و از ۸ ساعت به بعد با شیب ملایم و به صورت تدریجی افزایش می‌یابد ($P < 5\%$). در گیاه شاهد یک روند تقریباً یکنواخت در میزان بیان ژن اسکوالن اپوکسیداز

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن اسکوالن اپوکسیداز (*SQE*) تحت تأثیر تیمار با متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار نشان داد که در بازه‌ی زمانی صفر تا ۸ ساعت روند افزایشی سریعی در

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



ب



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

بحث

به طوری که بیان پس از اعمال 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 ژرانیل دی فسفات سنتاز در سطح رونوشت در پاسخ به تیمار متیل جاسمونات در گیاه یونجه ۵ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش یافت (Yan *et al.*, 2012). نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن بتا آمیرین سنتاز در گیاه سیاه‌دانه در اثر تیمار با متیل جاسمونات نشان داد که بیان نسبی این ژن در اثر القاء تیمار افزایش می‌یابد و باعث افزایش تولید بتا آمیرین می‌شود (Scholz *et al.*, 2009). نتایج مذکور با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد.

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در اثر تیمار با متیل جاسمونات نشان داد که بیان نسبی ژن‌های مونوترپن سنتاز، ژرانیل دی فسفات سنتاز، بتا آمیرین سنتاز و اسکوآلن اپوکسیداز در اثر تیمار افزایش یافت. الگوی بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز متفاوت از سه ژن دیگر بود. بیان برای ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز 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.

ترکیبات آنزیم اسکوالن اپوکسیداز 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 الیستوروشیمیایی بر میزان بیان ژن اسکوالن اپوکسیداز 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 اسکوالن اپوکسیداز در سیاه‌دانه در اثر اعمال تیمار متیل‌جاسمونات ۴ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش یافت و در ۸ ساعت و ۷۲ ساعت به بیشترین میزان خود رسید (Scholz et al., 2009). در گیاهان *Centella asiatica* و *Galphima glance* ماده 2,3-oxidosqualene به‌عنوان پیش‌ماده برای متابولیسم تری‌ترین‌ها عمل می‌کند. در تحقیقی برای بررسی اثر متیل‌جاسمونات بر میزان متابولیت‌های تری‌ترینی این ۲ گیاه، متیل‌جاسمونات اعمال شد. نتایج نشان داد که میزان ترکیبات تری‌ترینی که از پیش‌ماده‌ی 2,3-oxidosqualene ساخته می‌شوند به شدت افزایش یافت (Mangas et al., 2006). با توجه به این نتایج می‌توان تیمار متیل‌جاسمونات را برای افزایش بیان ژن اسکوالن اپوکسیداز و آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی تری‌ترین‌ها و القای تغییر در مسیر بیوسنتزی ترکیبات ترپنوئیدی پیشنهاد کرد.

در این رابطه اثر سایر الیستورهای 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 نشان‌دهنده الگوی بیان تقریباً یکسانی برای هر ۴ ژن مورد مطالعه به‌ویژه برای ژن‌های ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز و بتا‌آمیرین سنتاز بود. بیان نسبی ژن مونوترپن سنتاز 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

مطالعات نشان داده است که با تیمار متیل‌جاسمونات در کشت سلولی شیرین بیان میزان رونوشت -آمیرین سنتاز و در ادامه تولید ساپونین افزایش یافت (Hayashi et al., 2004). بررسی اثر تیمار متیل‌جاسمونات بر میزان بیان ژن بتا‌آمیرین سنتاز 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 kanoi* میزان رونوشت‌های ژن β -آمیرین سنتاز بعد از تیمار ۰/۵mM متیل‌جاسمونات دو برابر شدند (Shabani et al., 2010). بالا بودن میزان متیل‌جاسمونات در بذرها در حال جوانه‌زدن سویا نیز مسأله قابل توجهی 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 -آمیرین سنتاز یکی از اکسیدوسکوآلن‌اکسیدازهاست که در نقطه انشعاب بیوسنتز استرول (متابولیت اولیه) و ساپونین تری‌ترین (متابولیت ثانویه) است. بنابراین داشتن اطلاعات در راستای تنظیم β -آمیرین سنتاز برای فهم چگونگی تنظیم، مکانیسم و فیزیولوژی متابولیسم ثانویه ضروری است. تاکنون گزارش‌هایی از دست‌کاری چرخه ساپونین تری‌ترین بر اساس بیان ژن رمزکننده -آمیرین سنتاز، ارائه شده است و مشخص شده است که محصول ژن -آمیرین سنتاز یکی از پیش‌ماده‌های کلیدی در چرخه ساپونین تری‌ترین است. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق و سایر تحقیقات انجام شده، با بالا بردن بیان آنزیم -آمیرین سنتاز، ممکن است تولید ساپونین‌ها افزایش یابد. با اعمال تیمارهای مختلف می‌توان میزان بیان این ژن را افزایش داد و به دنبال آن ممکن است میزان تولید ترکیبات ساپونین افزایش یابد. گیاه سیاه‌دانه حاوی ترکیبات ساپونین تری‌ترینی از جمله Hedrin و Kalopanaxsaponin می‌باشد که این ترکیبات خاصیت ضدتوموری دارند. در مسیر بیوسنتزی این

- 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. 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.
- 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.
- Irmiler, 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.
- Kozłowski, 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 *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants. Phytochemistry, 67: 2041-2049.
- اسیدسالیسیلیک افزایش ۲/۵ برابری داشت که می‌تواند به دلیل نقش بیشتر این ژن در مسیر القایی توسط متیل‌جاسمونات نسبت به اسیدسالیسیلیک باشد. در بین ژن‌های مورد مطالعه تنها ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز دارای الگوی بیان متفاوتی بود که می‌تواند به دلیل 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 متیل‌جاسمونات القاء می‌شوند که می‌تواند به دلیل نقش ترین‌ها 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 تری‌ترین‌ها و القای تغییر در مسیر بیوسنتزی ترکیبات ترینوئیدی پیشنهاد کرد زیرا بر اساس مطالعات مختلف میزان تولید ترکیبات ترینی با میزان رونوشت ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتزی آنها ارتباط مستقیم دارد (Nagegowda et al., 2010). به عنوان مثال افزایش ترکیب سزکویی‌ترینی پارتنولید در گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*) در اثر تیمار متیل‌جاسمونات 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 terpenoid 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.

- 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 reprogramming 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., Pruffer, 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 cummin (*Nigella sativa* L.). M.Sc. Thesis, Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan.

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

R. Elyasi¹, M. Majdi^{2*}, B. Bahramnejad³ and Gh. Mirzaghaderi⁴

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- 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*), - amyrin synthase (*AS*) 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, -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 revealed induced-gene expression 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.