DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2015.12197

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۲، صفحه ۱۵۵-۱۴۳ (۱۳۹۳)

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

**محمدحسن شمسی‌فرد[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 دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۲

## چکیده

مونوترپن‌ها یکی از مهمترین گروه‌های تشکیل‌دهنده ترپن‌ها می‌باشند که به صورت موادی مانند لیمونن، کارواکرول و تایموکینون در بذر گیاه سیاه‌دانه وجود دارند. از ژن‌های مهم اثرگذار در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز (*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 دی‌فسفات‌سنتاز 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 دی‌فسفات‌سنتاز، 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). 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). ازجمله این گیاهان، گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.; $2n = 2x = 12$) می‌باشد که به‌عنوان چاشنی و در طب سنتی در طول تاریخ و در فرهنگ‌های مختلف استفاده شده است (Botnick *et al.*, 2012). در ایران از دانهٔ 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 ازجمله تایموکینون، تایموهیدروکینون، تیمول، کارواکرول و لیمونن می‌باشد (Bourgou *et al.*, 2010; Morikawa *et*

*al.*, 2004; Botnick *et al.*, 2012). تایموکینون موجود در روغن سیاه‌دانه از ترکیبات اصلی بذر بوده و اثرات درمانی زیادی ازجمله بازدارنده سلول‌های سرطانی (Gurung *et al.*, 2010; Worthen *et al.*, 1998)، 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 می‌باشد. تایموکینون در دانه‌های نارس به میزان ناچیزی وجود دارد ولی همراه با رسیدگی دانه میزان آن به حداکثر می‌رسد. پس از بلوغ کامل دانه، میزان آن دوباره کمی کاهش می‌یابد (Botnick *et al.*, 2012).

یکی از مهمترین ژن‌های مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها، ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز (*GPPS*) است. محصول این ژن یعنی آنزیم ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز، با اتصال دو مولکول ۵ کربنه دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (DMAPP) و ایزوپنتیل‌دی‌فسفات (IPP) به یکدیگر، ژرانیل‌دی‌فسفات ۱۰ کربنه را می‌سازد که پیش‌ساز مونوترپن‌هاست (Trapp & Croteau, 2001; Mahmoud & Croteau, 2002). ژرانیل‌دی‌فسفات تحت تأثیر برخی از مونوترپن سنتازها بتدا به ترپینن، در ادامه به موادی حد واسط و در نهایت به تایموکینون تبدیل می‌شود. با توجه به اینکه این ژن یک ژن کلیدی در تولید انواع متنوعی از مونوترپن‌ها در گیاه سیاه‌دانه است بیان رونوشت‌های آن در این تحقیق در بافت‌های مختلف گیاه دارویی سیاه‌دانه بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** بذر ۸ ژنوتیپ از گیاه دارویی سیاه‌دانه که گیاهی دیپلوئید و خودبارور است از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور دریافت شد (جدول ۱). ژنوتیپ‌ها 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 آزمایش‌ها از نظر طول دوره رشد در نقطهٔ مقابل هم قرار داشتند (شکل ۱) و اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان دادند. از این رو این دو ژنوتیپ برای بررسی‌های بیان ژن در نظر گرفته شدند.

**جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های دریافت شده از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور**

| ردیف | شماره دسترسی | محل جمع‌آوری بذر | تعداد روز تا گل‌دهی |
|---|---|---|---|
| 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 | خرم‌آباد | ۶۹ |
| ۸ | ۱۴۶۹۶ | گلستان | ۵۵ |

**طراحی آغازگرهای دژنره:** ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی EST ژن *GPPS* در ۷ گیاه آرابیدوپسیس (*At*)، گوجه‌فرنگی (*Sl*)، تاج‌الملوک (*Ac*)، تنباکو (*Nt*)، فلفل (*Ca*)، کلزا (*Bn*) و سوئیچ گراس (*Pv*) به‌ترتیب با شماره‌های دسترسی TC368677، TC222775، TC32312، TC137528، TC20943، TC197262 و TC62187 از سایت Plant Gene Indaice دریافت شد و هم‌ردیفی آنها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) و Boxshade (Thompson *et al.*, 1994) انجام شد. آغازگرهای دژنره با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (Steve & Skaletsky, 1999) در سایت NCBI از روی نواحی حفاظت شده طراحی و توسط شرکت بیونیر سنتز شد. توالی

آغازگرهای دژنره مستقیم 5'ATGGTRGYBGCBGAGGTCC3' و معکوس 5'TGTSCCYGTGAAATCAAGAACA3' بود که در آن حروف S، Y، R و B به‌ترتیب 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 $H_2O$ (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 کمیت و کیفیت آن با استفاده از اسپکتروفتومتری 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 واسرشت 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 روش هضم آنزیمی توسط دو آنزیم *Hin*d III و *Eco*R I 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 دی‌فسفات‌سنتاز به‌ترتیب 5'ACCCAAATCGGTCCGTGATGGT3' و 5'GCAAGCAAGCTAACGACCTCTGT3' و توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن GAPDH به‌ترتیب 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 نیمه‌کمی (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 رنگ‌آمیزی 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

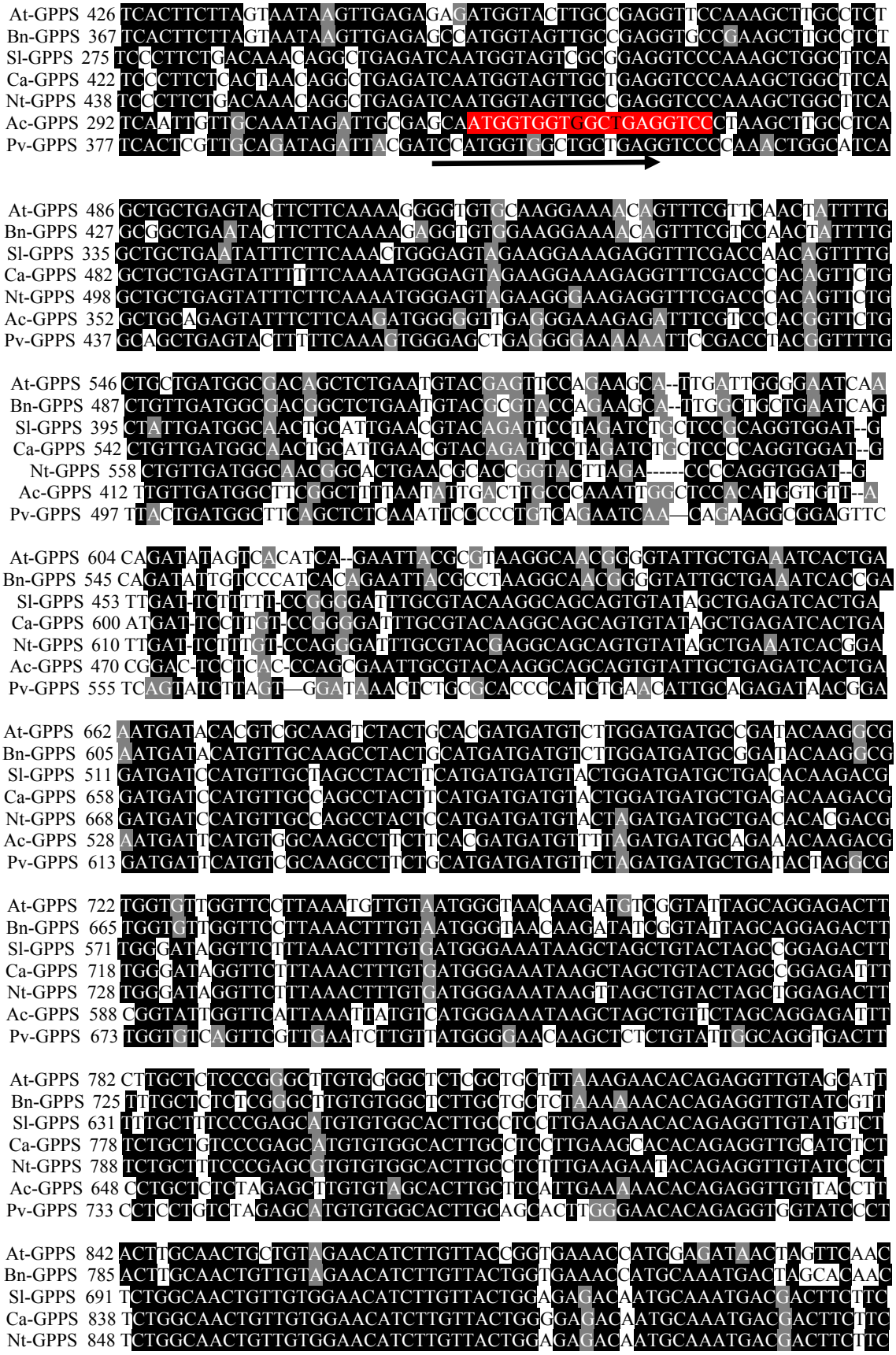
در گیاهان آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی، تاج‌الملوک، تنباکو، فلفل، کلزا و سوئیچ‌گراس دریافتی از پایگاه اطلاعاتی Plant Gene Indices، با استفاده از نرم‌افزار آنلاین ClustalW انجام شد و مناطق حفظ‌شده بین این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Boxshade مشخص شد. دندروگرام بر اساس ناحیه تعیین توالی شده از ژن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

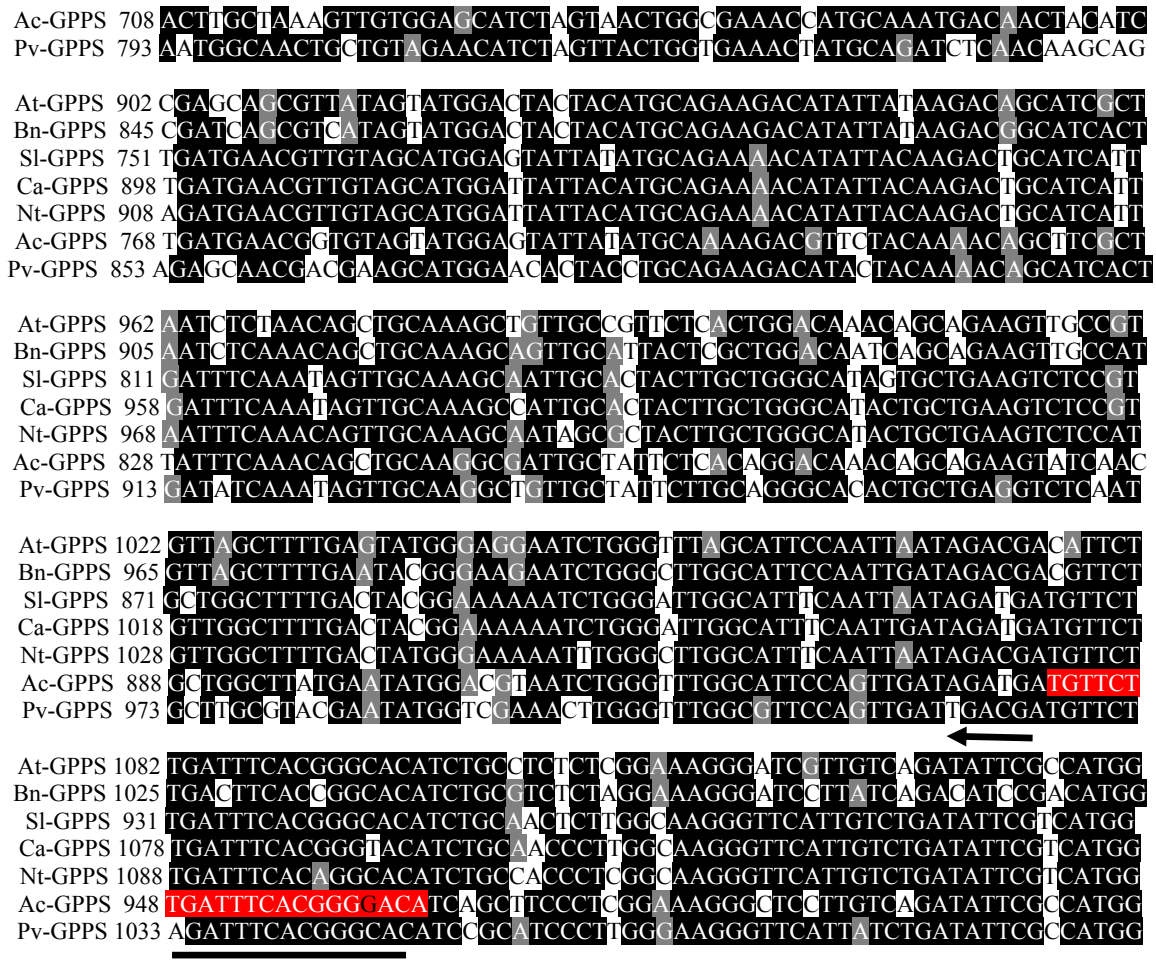
## نتایج

طول دوره رشد ژنوتیپ‌های ۱۴۹۸۹ و ۱۵۰۷ سیاه‌دانه که در این تحقیق از آنها استفاده شد هم در شرایط مزرعه و هم در شرایط گلخانه در سطح ۱ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند، به‌طوری‌که ژنوتیپ ۱۴۹۸۹، ۴۵ روز پس از کشت همزمان وارد مرحله گلدهی شد، درحالی‌که 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 اندازهٔ ظاهری کاملاً باهم متفاوت بودند (شکل ۱).

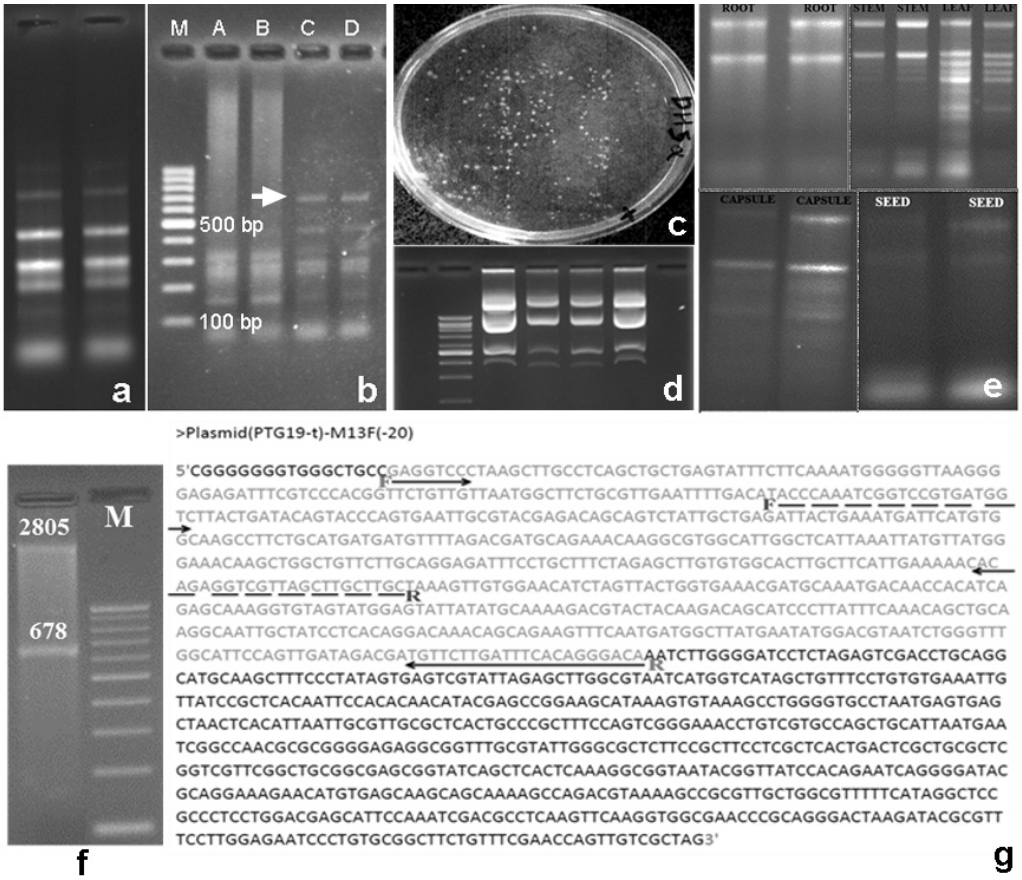
آغازگرهای دژنره طراحی‌شده حاصل از هم‌ردیفی ژن *GPPS* در گونه‌های آرابیدوپسیس (At)، کلزا (Bn)، گوجه فرنگی (Sl)، فلفل (Ca)، تنباکو (Nt)، تاج‌الملوک (Ac) و سوئیچ‌گراس (Pv) (شکل ۲) طبق انتظار قطعه‌ای در حدود ۶۴۵ جفت باز را در واکنش RT-PCR تکثیر کرد (شکل ۳–b).

**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 TCACTTCTTAGTAATAAGTTGAGAGATGGTACTTGCCGAGGTTCCAAAGCTTGCCTCT
Bn-GPPS 367 TCACTTCTTAGTAATAAGTTGAGAGCCATGGTAGTTGCCGAGGTGCCGAAGCTTGCCTCT
Sl-GPPS 275 TCCCTTCTGACAAACAGGCTGAGATCAATGGTAGTCGCGGAGGTCCCAAAGCTGGCTTCA
Ca-GPPS 422 TCCCTTCTCACTAACAGGCTGAGATCAATGGTAGTTGCTGAGGTCCCAAAGCTGGCTTCA
Nt-GPPS 438 TCCCTTCTGACAAACAGGCTGAGATCAATGGTAGTTGCCGAGGTCCCAAAGCTGGCTTCA
Ac-GPPS 292 TCAATTGTTGCAAATAGATTGCGAGCAATGGTGGTGGCTGAGGTCCCTAAGCTTGCCTCA
Pv-GPPS 377 TCACTCGTTGCAGATAGATTACGATCCATGGTGGCTGCTGAGGTCCCCAAACTGGCATCA
At-GPPS 486 GCTGCTGAGTACTTCTTCAAAAGGGGTGTGCAAGGAAAACAGTTTCGTTCAACTATTTTG
Bn-GPPS 427 GCGGCTGAATACTTCTTCAAAAGAGGTGTGGAAGGAAAACAGTTTCGTCCAACTATTTTG
Sl-GPPS 335 GCTGCTGAATATTTCTTCAAACTGGGAGTAGAAGGAAAGAGGTTTCGACCAACAGTTTTG
Ca-GPPS 482 GCTGCTGAGTATTTTTTCAAAATGGGAGTAGAAGGAAAGAGGTTTCGACCCACAGTTCTG
Nt-GPPS 498 GCTGCTGAGTATTTCTTCAAAATGGGAGTAGAAGGGAAGAGGTTTCGACCCACAGTTCTG
Ac-GPPS 352 GCTGCAGAGTATTTCTTCAAGATGGGGGTTGAGGGAAAGAGATTTCGTCCCACGGTTCTG
Pv-GPPS 437 GCAGCTGAGTACTTTTTCAAAGTGGGAGCTGAGGGGAAAAAATTCCGACCTACGGTTTTG
At-GPPS 546 CTGCTGATGGCGACAGCTCTGAATGTACGAGTTCCAGAAGCA--TTGATTGGGGAATCAA
Bn-GPPS 487 CTGTTGATGGCGACGGCTCTGAATGTACGCGTACCAGAAGCA--TTGGCTGCTGAATCAG
Sl-GPPS 395 CTATTGATGGCAACTGCATTGAACGTACAGATTCCTAGATCTGCTCCGCAGGTGGAT--G
Ca-GPPS 542 CTGTTGATGGCAACTGCATTGAACGTACAGATTCCTAGATCTGCTCCCCAGGTGGAT--G
Nt-GPPS 558 CTGTTGATGGCAACGGCACTGAACGGCACCGGTACTTAGA------CCCCAGGTGGAT--G
Ac-GPPS 412 TTGTTGATGGCTTCGGCTTTTAATATTGACTTGCCCAAATTGGCTCCACATGGTGTT--A
Pv-GPPS 497 TTACTGATGGCTTCAGCTCTCAAATTCCCCCTGTCAGAATCAA—CAGAAGGCGGAGTTC
At-GPPS 604 CAGATATAGTCACATCA--GAATTACGCGTAAGGCAACGGGGTATTGCTGAAATCACTGA
Bn-GPPS 545 CAGATATTGTCCCATCACAGAATTACGCCTAAGGCAACGGGGTATTGCTGAAATCACCGA
Sl-GPPS 453 TTGAT-TCTTTTT-CCGGGGATTTGCGTACAAGGCAGCAGTGTATAGCTGAGATCACTGA
Ca-GPPS 600 ATGAT-TCCTTGT-CCGGGGATTTGCGTACAAGGCAGCAGTGTATAGCTGAGATCACTGA
Nt-GPPS 610 TTGAT-TCTTTGT-CCAGGGATTTGCGTACGAGGCAGCAGTGTATAGCTGAAATCACGGA
Ac-GPPS 470 CGGAC-TCCTCAC-CCAGCGAATTGCGTACAAGGCAGCAGTGTATTGCTGAGATCACTGA
Pv-GPPS 555 TCAGTATCTTAGT—GGATAAACTCTGCGCACCCCATCTGAACATTGCAGAGATAACGGA
At-GPPS 662 AATGATACACGTCGCAAGTCTACTGCACGATGATGTCTTGGATGATGCCGATACAAGGCG
Bn-GPPS 605 AATGATACATGTTGCAAGCCTACTGCATGATGATGTCTTGGATGATGCGGATACAAGGCG
Sl-GPPS 511 GATGATCCATGTTGCTAGCCTACTTCATGATGATGTACTGGATGATGCTGACACAAGACG
Ca-GPPS 658 GATGATCCATGTTGCCAGCCTACTTCATGATGATGTACTGGATGATGCTGAGACAAGACG
Nt-GPPS 668 GATGATCCATGTTGCCAGCCTACTCCATGATGATGTACTAGATGATGCTGACACACGACG
Ac-GPPS 528 AATGATTCATGTGGCAAGCCTTCTTCACGATGATGTTTTAGATGATGCAGAAACAAGACG
Pv-GPPS 613 GATGATTCATGTCGCAAGCCTTCTGCATGATGATGTTCTAGATGATGCTGATACTAGGCG
At-GPPS 722 TGGTGTTGGTTCCTTAAATGTTGTAATGGGTAACAAGATGTCGGTATTAGCAGGAGACTT
Bn-GPPS 665 TGGTGTTGGTTCCTTAAACTTTGTAATGGGTAACAAGATATCGGTATTAGCAGGAGACTT
Sl-GPPS 571 TGGGATAGGTTCTTTAAACTTTGTGATGGGAAATAAGCTAGCTGTACTAGCCGGAGACTT
Ca-GPPS 718 TGGGATAGGTTCTTTAAACTTTGTGATGGGAAATAAGCTAGCTGTACTAGCCGGAGATTT
Nt-GPPS 728 TGGGATAGGTTCTTTAAACTTTGTGATGGGAAATAAGTTAGCTGTACTAGCTGGAGACTT
Ac-GPPS 588 CGGTATTGGTTCATTAAATTATGTCATGGGAAATAAGCTAGCTGTTCTAGCAGGAGATTT
Pv-GPPS 673 TGGTGTCAGTTCGTTGAATCTTGTTATGGGGAACAAGCTCTCTGTATTGGCAGGTGACTT
At-GPPS 782 CTTGCTCTCCCGGGCTTGTGGGGCTCTCGCTGCTTTAAAGAACACAGAGGTTGTAGCATT
Bn-GPPS 725 TTTGCTCTCTCGGGCTTGTGTGGCTCTTGCTGCTCTAAAAAACACAGAGGTTGTATCGTT
Sl-GPPS 631 TTTGCTTTCCCGAGCATGTGTGGCACTTGCCTCCTTGAAGAACACAGAGGTTGTATGTCT
Ca-GPPS 778 TCTGCTGTCCCGAGCATGTGTGGCACTTGCCTCCTTGAAGCACACAGAGGTTGCATCTCT
Nt-GPPS 788 TCTGCTTTCCCGAGCGTGTGTGGCACTTGCCTCTTTGAAGAATACAGAGGTTGTATCCCT
Ac-GPPS 648 CCTGCTCTCTAGAGCTTGTGTAGCACTTGCTTCATTGAAAAACACAGAGGTTGTTACCTT
Pv-GPPS 733 CCTCCTGTCTAGAGCATGTGTGGCACTTGCAGCACTTGGGAACACAGAGGTGGTATCCCT
At-GPPS 842 ACTTGCAACTGCTGTAGAACATCTTGTTACCGGTGAAACCATGGAGATAACTAGTTCAAC
Bn-GPPS 785 ACTTGCAACTGTTGTAGAACATCTTGTTACTGGTGAAACCATGCAAATGACTAGCACAAC
Sl-GPPS 691 TCTGGCAACTGTTGTGGAACATCTTGTTACTGGAGAGACAATGCAAATGACGACTTCTTC
Ca-GPPS 838 TCTGGCAACTGTTGTGGAACATCTTGTTACTGGGGAGACAATGCAAATGACGACTTCTTC
Nt-GPPS 848 TCTGGCAACTGTTGTGGAACATCTTGTTACTGGAGAGACAATGCAAATGACGACTTCTTC

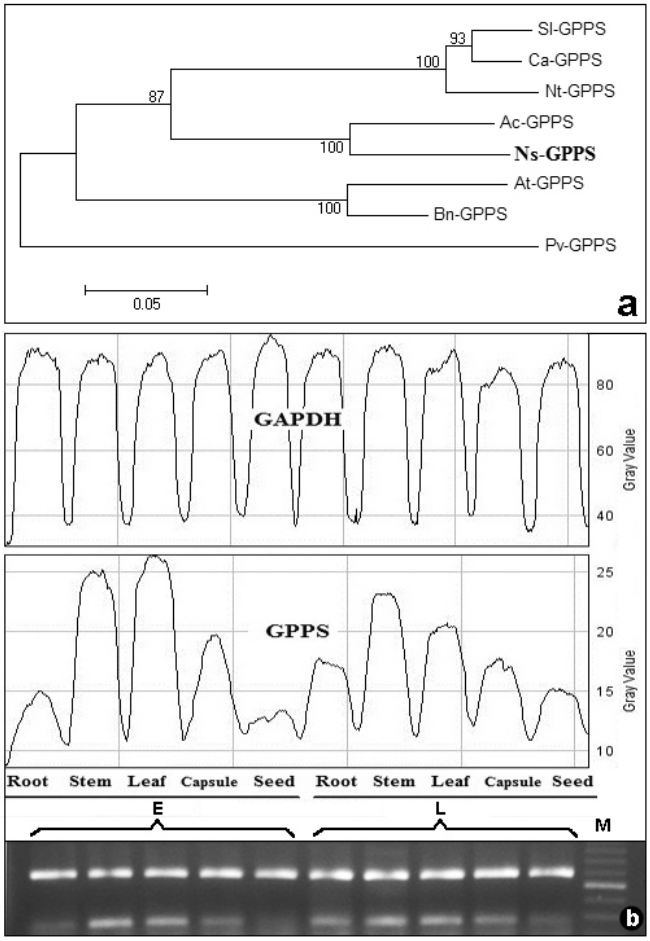



شکل ۲- بخشی از هم‌ردیفی ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز (***GPPS***) در گیاهان آرابیدوپسیس (**At**)، گوجه فرنگی (**Sl**)، تاج‌الملوک (**Ac**)، تنباکو (**Nt**)، فلفل (**Ca**)، کلزا (**Bn**) و سوئیچ‌گراس (**Pv**)
موقعیت آغازگرهای دژنره با پیکان نشان داده شده است.




**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 bp ۶۴۵ در ژل آگارز ۲٪. واکنش‌ها برای ستون‌های A، B، C و D به‌ترتیب در 57 ، 59، ۶۰/۵ و 61 درجه سانتی‌گراد انجام شد. (c) همسانه‌های تراریخت شده از باکتری *E. coli* ایزوله DH5α 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 به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های زودرس و دیررس می‌باشند. (f) هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب توسط دو آنزیم *Hin*d III و *Eco*R 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**

روش تک مرحله‌ای مبتنی بر گوانیدیوم ( 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 استفاده از آنزیم‌های *Hin*d *III* و *Eco*R I وجود قطعه مورد نظر در پلاسمید اثبات شد، به‌طوری 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.



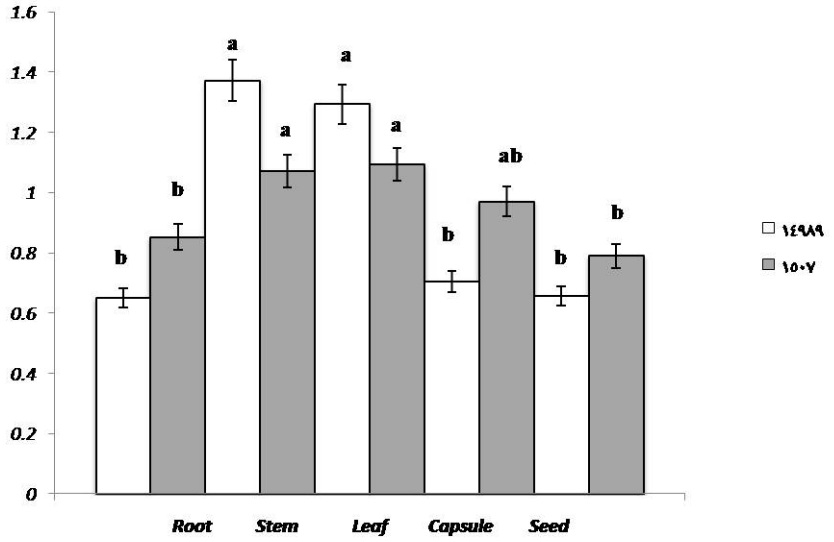

**شکل ۴– (a) دندروگرام ناحیه توالی‌یابی شده از ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز سیاه‌دانه (*Ns*) با همین ناحیه در گیاهان آرابیدوپسیس (*At*)، گوجه فرنگی (*Sl*)، تاج‌الملوک (*Ac*)، تنباکو (*Nt*)، فلفل (*Ca*)، کلزا (*Bn*) و سوئیچ‌گراس (*Pv*) به روش نزدیکترین همسایگی در نرم‌افزار MEGA 4. خط مقیاس تشابه را نشان می‌دهد. (b) نتیجه RT-PCR نیمه‌کمی مربوط به بیان رونویسی ژن‌های *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 نرم‌افزار ImageJ (M) نشانگر مولکولی ۱۰۰جفت بازی**

دندروگرام بر اساس ناحیه توالی‌یابی شده ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز گیاه سیاه‌دانه و همین ناحیه در هفت گونه گیاهی دیگر با روش نزدیکترین همسایگی نشان داد که سیاه‌دانه با تاج‌الملوک (*Aquilegia caerulea*) و همچنین آرابیدوپسیس با کلزا نیز با بوت استرپی برابر با ۱۰۰ نیز کنار هم قرار گرفته‌اند و سه گیاه فلفل، تنباکو و گوجه‌فرنگی نیز در یک خوشه واقع شده‌اند. تمام گیاهانی که با هم در یک خوشه قرار گرفته‌اند هم‌خانواده می‌باشند که این موضوع نشان‌دهنده تشابه بیشتر این ژن در گیاهان هم‌خانواده می‌باشد (شکل ۴–a).

شدت باندها در ژل‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزار ImageJ به صورت کمی درآمده و داده‌های حاصل مورد بررسی آماری قرار گرفتند. بررسی نتایج RT-PCR نیمه‌کمی با استفاده از نرم‌افزار ImageJ نیز نشان داد که بیان رونویسی ژن خانه‌دار *GAPDH* در بافت‌های ریشه، ساقه، برگ، کپسول و بذر دو ژنوتیپ دیررس و زودرس گیاه

سیاه‌دانه تقریباً به میزان یکسانی بوده است. نتایج حاصل از RT-PCR نیمه‌کمی (شکل ۴-b) و تجزیه واریانس داده‌های میزان رونویسی ژن *GPPS* (شکل ۵) نشان داد که میزان رونویسی ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز بین دو نوع ژنوتیپ زودرس و دیررس اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ ندارد. در حالی که اختلاف معنی‌داری بین بافت‌های مختلف مشاهده شد. به‌طوری‌که در بین پنج بافت مورد مطالعه در هر دو نوع ژنوتیپ زودرس و دیررس اختلاف معنی‌داری در میزان بیان رونویسی ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز با سه بافت دیگر یعنی ریشه، کپسول و بذر وجود داشت (شکل ۵).

در مورد رونویسی ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در سه بافت ریشه، کپسول و بذر دو ژنوتیپ مورد مطالعه، در ژنوتیپ زودرس بافت‌های کپسول، ریشه و بذر به‌ترتیب بیشترین تا کمترین میزان رونویسی ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز را به خود اختصاص دادند که این موضوع در مورد سه بافت ریشه، کپسول و بذر ژنوتیپ دیررس هم صادق می‌باشد (شکل ۵).




**شکل ۵- نمودار میزان بیان رونویسی ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در بافت‌های مختلف دو ژنوتپ زودرس (۱۴۹۸۹) و دیررس (۱۵۰۷) سیاه‌دانه. خطای معیار هر میانگین در بالای ستون مربوطه نشان داده شده است.**
حروف مشابه نشان‌دهنده گروه‌بندی حاصل از مقایسه میانگین‌ها به روش $LSD_{0.05}$ می‌باشد.

## بحث

ژرانیل دی‌فسفات که محصول آنزیم ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز است پس از ایجاد می‌تواند دو مسیر را ادامه دهد، مسیر اول مسیری است که در پایان منجر به تولید مونوترپن‌ها می‌شود و مسیر دوم مسیری است که در طی آن ژرانیل دی‌فسفات تحت تأثیر آنزیم فارنسیل دی‌فسفات‌سنتاز تبدیل به فارنسیل دی‌فسفات و در ادامه فارنسیل‌دی‌فسفات تبدیل به ژرانیل‌دی‌فسفات می‌شود (Mahmoud & Croteau, 2002). ژرانیل دی‌فسفات برای بیوسنتز دی‌ترپن‌ها، پلاستوکوینون و کلروفیل‌ها مورد نیاز است (Wang & Dixon, 2008). کلروفیل و پلاستوکوینون هر دو برای انجام فتوسنتز در بافت‌های فتوسنتزکننده گیاه ازجمله برگ لازم و ضروری می‌باشند، از این رو می‌توان دلیل بالا بودن بیان ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در بافت‌های فتوسنتزکننده مانند برگ و ساقه را با این موضوع در ارتباط دانست.

البته مطالعات اندکی در مورد بیان ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در بافت‌های مختلف گیاهی انجام شده است، ولی با این حال نتایج تحقیقات بر روی برخی از گیاهان نیز از بیان بالای ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در بافت‌های برگ و ساقه خبر می‌دهد؛ به‌طوری‌که بررسی ژن کدکننده زیر واحد کوچک و ژن کدکننده زیر واحد بزرگ آنزیم ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در بافت‌های مختلف گیاه گل میمونی نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن کدکننده زیر واحد بزرگ در بافت‌های برگ و کاسبرگ می‌باشد، 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 بافت‌های ساقه، برگ، گل و کرک‌ها بررسی شد که نتایج نشان داد ژن کدکننده زیر واحد بزرگ بالاترین بیان را در بافت‌های کرک، برگ و ساقه و ژن کدکننده زیر واحد کوچک بالاترین بیان را در بافت‌های کرک و گل داراست (Wang & Dixon, 2008).

از آنجا که در یک گیاه بافت‌هایی مانند برگ و ساقه به‌عنوان اندام‌های تولیدکننده و بافت‌هایی مانند بذر به‌عنوان بافت ذخیره‌ای برای انواع متابولیت‌ها می‌باشند و با توجه به اینکه بیشتر مونوترپن‌ها در بافت‌های ذخیره‌ای مانند بذر و پوسته بذر سیاه‌دانه انباشته شده‌اند (Botnick *et al.*, 2012) می‌توان اینگونه برداشت کرد که مونوترپن‌ها ابتدا در برگ ساخته شده و بعد برای ذخیره و مصرف به سایر بافت‌ها مخصوصاً گل و بذر منتقل می‌شوند. به‌طوری‌که در تحقیقی که بر روی برخی مونوترپن‌سنتاز-های گیاه درمنه انجام شده است مشخص شده که مونوترپن‌سنتازها در برگ‌های جوان و پیر و همچنین بافت جوانه گل این گیاه به میزان بیشتری نسبت به سایر بافت‌ها موجود می‌باشند (Olofsson *et al.*, 2011). با در نظر گرفتن این موضوع که ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز یکی از ژن‌های کلیدی در تولید مونوترپن‌ها می‌باشد، می‌توان این گونه برداشت کرد که به دلیل بالا بودن میزان مونوترپن سنتازها در بافت برگ، در نتیجه میزان بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز که تولیدکننده پیش‌ساز اصلی مونوترپن‌ها یعنی ژرانیل‌دی‌فسفات می‌باشد نیز باید در بافت برگ بالا باشد.

بررسی‌های انجام شده نشان داده است که ژرانیل‌دی‌فسفات برای بیوسنتز جیبرلین‌ها ضروریست، به‌طوری‌که پس از به‌وجود آمدن ژرانیل‌دی‌فسفات توسط ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز، این ماده تحت تأثیر آنزیم ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز تبدیل به ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات شده و در ادامه به‌ترتیب تحت تأثیر آنزیم‌های انت-کوپالیل دی‌فسفات‌سنتاز، انت-کورن سینتاز و انت-کورن اکسیداز به انوع متنوعی از هورمون جیبرلین تبدیل می‌شود (Van Schie *et al.*, 2007). کاهش بیان ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در گوجه فرنگی باعث پاکوتاه شدن شدید گیاه تیمار شده می‌شود (Van Schie *et al.*, 2007) که این امر به علت دخیل بودن ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در مسیر بیوسنتزی جیبرلین می‌باشد. بررسی بیان ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در بافت‌های مختلف گیاه یونجه با استفاده از تکنیک Real time RT-PCR نشان داده است که این ژن در تمام بافت‌های این گیاه بدون تفاوت بیان می‌شود، همچنین بیان این ژن در پاسخ به تیمار متیل جاسمونات در گیاه یونجه افزایش می‌یابد (Sun *et al.*, 2013). افزایش بیان ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در گیاه نعناع با استفاده از روش‌های مهندسی متابولیک باعث افزایش میزان برخی از مونوترپن‌های موجود در اسانس این گیاه شده است (Lange *et al.*, 2011).

از آنجا که هورمون جیبرلین یکی از هورمون‌های اساسی گیاه به‌شمار می‌رود و باعث طویل‌شدن ساقه و توسعه برگ می‌شود (Alamgir and Peng, 2003). بنابراین با توجه به نقش اثرگذار ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در مسیر تولید هورمون جیبرلین، این امر می‌تواند دلیل دیگری برای بیان بالای ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در بافت‌های ساقه و برگ باشد.

## منابع مورد استفاده


- 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.
- Chomczynski, 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-Dakhakhany, 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, 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., Mostafaie., 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 e ect 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

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 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 Reserch, 18: 1527-1532.

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

**M.H. Shamsi-Fard[1], G. Mirzaghaderi[2]* and M. Majdi[3]**

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.