دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۲، صفحه ۱۷۴-۱۶۴ (۱۳۹۴)

بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها 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 ترپن‌ها را تولید می‌کند. مونوترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها از مهم‌ترین گروه‌های تشکیل‌دهنده ترپن‌ها می‌باشند. در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها تحت عنوان مسیرMEP واقع در پلاستید، ژن‌های مختلفی دخیل می‌باشند که مونوترپن سنتازها تحت عنوان ژن‌های محدودکننده سرعت واکنش در این مسیر شناخته شده‌اند. در طی مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها، آنزیم ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز مسئول کاتالیز ژرانیل‌دی‌فسفات به‌عنوان پیش‌ماده عمومی مونوترپن‌ها می‌باشد. اکسیدواسکوآلن‌سیکلازها از مهم‌ترین آنزیم‌های کاتالیزکننده مسئول بیوسنتز تری‌ترپنوییدها می‌باشند که بتاآمیرین سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز از جمله‌ی این آنزیم‌ها هستند. در این پژوهش بیان ژن‌های مختلف شامل یک ژن مونوترپن سنتازی، ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز، بتاآمیرین سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز تحت تیمار اسیدسالیسیلیک بررسی شد. بیان نیمه‌کمی ژن‌های مونوترپن سنتاز، ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز، بتاآمیرین سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز در سطح رونوشت در برگ‌های تیمارشده با اسیدسالیسیلیک نشان دهنده تغییر بیان متفاوت این ژن‌ها در پاسخ به اسیدسالیسیلیک می‌باشد.

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

مقدمه

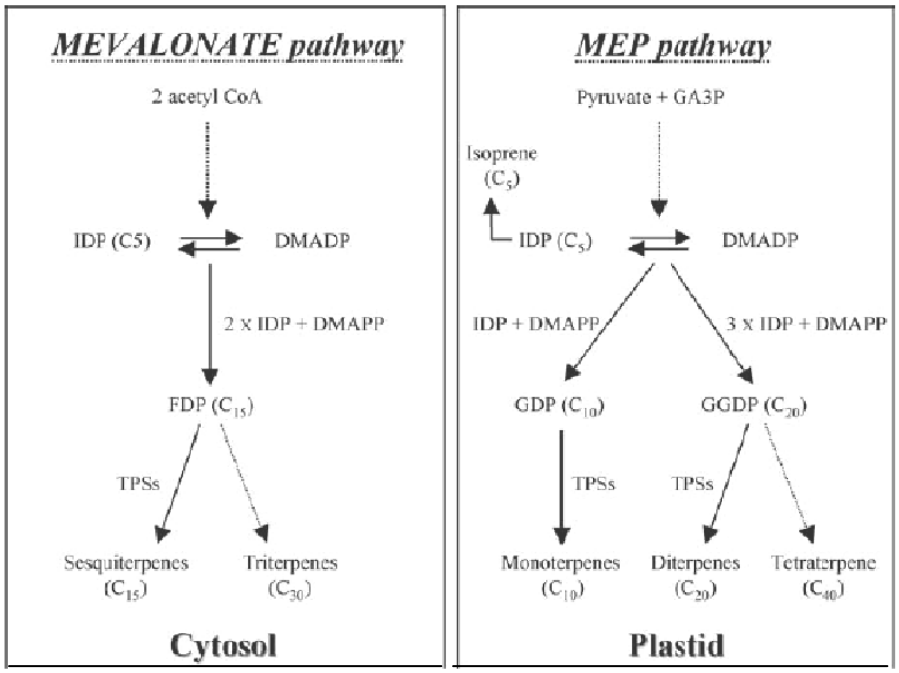
استفاده بشر از گیاهان برای بقاء و همچنین زندگی بهتر و سالم‌تر از آغاز پیدایش بشر تاکنون ادامه دارد. گیاهان تأمین‌کننده اصلی غذای بشر می‌باشند، به‌طوری‌که بدون وجود گیاه، بقاء بشر بسیار دشوار خواهد بود (Rates *et al.*, 2001). یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی، گیاه سیاه‌دانه (*Nigella Sativa.* L) می‌باشد که متعلق به راسته گل‌ساعتی‌ها (Passiflorales) و خانواده آلاله (Ranunculaceae) است. سیاه‌دانه گیاهی یکساله و دیپلوئید (n=2x=12۲) است. دانه گیاه سیاه‌دانه منبع غنی از متابولیت‌های‌ثانویه به‌خصوص مونوترپن‌ها می‌باشد که کاربردهای صنعتی، تجاری و پزشکی فراوانی برای آن‌ها

ذکر شده است (Iqbal *et al*., 2010). یکی از مهم‌ترین ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها ژن ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز است که تولیدکننده پیش‌ساز عمومی مونوترپن‌ها یعنی ژرانیل‌دی‌فسفات می‌باشد. متابولیت¬های‌اولیه گیاهی شامل ترکیب‌هایی مانند اسیدهای‌آمینه، قندهای‌ساده، اسیدهای‌نوکلئیک و لیپیدها می‌باشند که برای فرایندهای سلولی لازم و ضروری می‌باشند. ترکیب‌های ثانویه گیاهی شامل ترکیب‌های تولیدشده در شرایط خاص مانند وجود تنش می‌باشند. به‌طورکلی متابولیت‌های‌ثانویه گیاهی به سه گروه طبقه‌بندی می‌شوند که شامل ترپن‌ها (حدود ۲۵۰۰۰ نوع)، آلکالوئیدها (حدود ۱۲۰۰۰ نوع) و ترکیبات فنلی (بیش از ۸۰۰۰ نوع) می‌باشند. ترپنوئیدها 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 یوبی‌کوئینین، 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). ترپنوئیدها با وجود داشتن ساختار و عملکرد پیچیده، پلیمر ساده‌ای از واحدهای ایزوپرون پنج‌کربنه و ایزوپنتیل‌دی‌فسفات (IPP) می‌باشند. گیاهان دارای دو مسیر اسیدموالونیک (MVA) و مسیر (MEP) بیوسنتزی برای ترپنوییدها 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 ایزوپنتیل‌دی‌فسفات‌ایزومراز (IDI) به دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (DMAPP) برای ساخت ترکیبات سزکویی و تری‌ترپن‌ها تبدیل می‌شود، درحالیکه مسیر پلاستیدی MEP، ترکیبات IPI و DMAPP را برای مونو، دی و تتراترپن‌ها فراهم می‌کند (شکل ۱) (Aharoni *et al*., 2006). در مسیر وابسته به موالونات ابتدا دو ملکول استیل‌کوآنزیم‌آ با هم ترکیب شده و استواستیل‌کوآ را به‌وجود می‌آورند. در ادامه با اضافه شدن یک ملکول دیگر از استیل‌کوآنزیم‌آ به استواستیل‌کوآ و تحت تأثیرآنزیم مربوطه، بتاهیدروکسی‌بتامتیل‌گلوتاریل‌کوآ به‌وجود می‌آید و در ادامه با انجام یکسری مراحل دیگر موالونات به‌وجود می‌آید. موالونات تحت تأثیرمراحل و آنزیم‌های دیگر به ایزوپنتنیل‌دی‌فسفات تبدیل می‌شود.

در مسیر دوم یا مسیر متیل‌اریترول‌دی‌فسفات که در پلاستید رخ می‌دهد، ابتدا پیروات با دی‌گلیسرآلدهید ۳-فسفات ترکیب می‌شود و پس از انجام یک سری واکنش دی‌اوکسی‌زایلوز ۵-فسفات به‌وجود می‌آید. این ماده نیز در ادامه تبدیل به متیل اریتریتول ۴-فسفات می‌شود و پس از انجام یک سری مراحل دیگر این ماده نیز به ایزوپنتنیل‌دی‌فسفات تبدیل می‌شود و ادامه مراحل مانند مسیر وابسته به موالونات رخ می‌دهد (Davis & Croteau 2000). مونوترپن‌ها ایزوپرنوئیدهای ۱۰کربنه و از اجزای اصلی اسانس می‌باشند که دارای خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌توموری بوده و بر روی دستگاه قلبی‌عروقی و سیستم اعصاب مرکزی تأثیرمی‌گذارند (Junior *et al*., 2010).

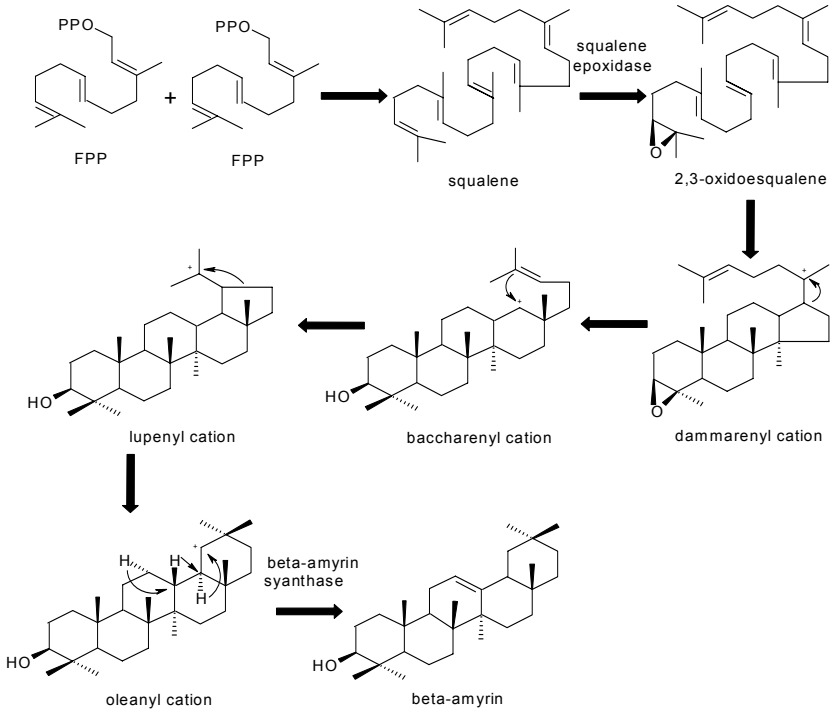
تری‌ترپنوئیدها ایزوپرونوئیدهای ۳۰ کربنه می‌باشند که علاوه بر اهمیت زیاد در داروسازی در تولید نوشیدنی‌های گازدار، ساخت شامپو، صابون مایع، آتش‌خاموش‌کن و تعیین میزان اکسیژن خون به‌کار می‌روند (Irmler *et al*., 2000). علاوه بر این به‌عنوان ترکیبات دفاعی در برابر میکروب‌های بیماری‌زا و علف‌های هرز به‌شمار می‌آیند. هم‌چنین به‌شکل ضدقارچ و ضدویروس نیز عمل می‌کنند و چون خواص ضدسرطانی دارند در رژیم غذایی انسان و دام اهمیت دارند (Aggarwal *et al*., 2007). تری‌ترپنوئیدها از مسیر اسیدموالونیک سنتز می‌شوند که با اتصال سربه‌سر دو مولکول فارنسیل‌دی‌فسفات ترکیب ۳۰ کربنه‌ی اسکوالن تولید می‌شود. در واقع اسکوالن یک پیش‌ماده برای

تشکیل سایر تری‌ترپنوئیدها است (Bramley, 1997). اسکوالن توسط اکسیدواسکوالن اکسید می‌شود که این نقطه‌ی شروع برای واکنش حلقه‌ای‌شدن در بیوسنتز تری‌ترپن‌ساپونین است. اولین مرحله در بیوسنتز تری‌ترپن‌ساپونین‌ها، حلقوی‌شدن ۲و۳- اکسیدواسکوالن است. بیشتر از ۱۰۰ نوع اسکلت تری‌ترپنی متفاوت در طبیعت یافت شده است (Xu *et al.*, 2004). در واقع آنزیم‌های کاتالیزکننده‌ی فرایند حلقوی‌شدن، اکسیدواسکوالن‌سیکلازها هستند که آنزیم بتاآمیرین‌سنتاز از جمله‌ی آن‌هاست (Irmler *et al.*, 2000). در ادامه‌ی واکنش حلقوی‌شدن، با ایجاد تغییراتی بر روی محصولات مانند اکسیداسیون، هیدروکسیلاسیون، گلیکولیزه‌شدن و دیگر جانشینی‌ها مشتقات دیگر نیز تولید می‌شوند. شکل ۲ مسیر بیوسنتزی بتاآمیرین را از ۲ و ۳ اکسیدواسکوآلن نشان می‌دهد.



شکل۱. 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 عبارتند از: گلیسرآلدهید ۳-فسفات (GA3P)، ترپن‌سنتازها (TPSs)، ایزوپنتیل‌دی‌فسفات (IDP)، دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (DMADP)، فارنسیل‌دی‌فسفات (FDP)، متیل‌اریتریتول ۴-فسفات (MEP)، ژرانیل‌دی‌فسفات (GDP). (Aharoni *et al.*, 2006).

با توجه به اینکه سیاه‌دانه 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 سیاه‌دانه کار قابل‌توجهی انجام نشده است. با توجه به اهمیت ژن ژرانیل‌دی‌فسفات به‌عنوان پیش‌ساز مونوترپن‌ها، در این تحقیق بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز و بیان یک ژن مونوترپن سنتازی نیز در گیاه دارویی سیاه‌دانه بررسی شد.



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

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 تری‌ترپن‌ساپونین‌ها توسط آنزیم‌های اکسیدواسکوآلن‌اکسیدازها از جمله بتاآمیرین سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز 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 تأثیرتیمار اسیدسالیسیلیک با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه‌کمی مورد بررسی قرار گرفت. اسیدسالیسیلیک یا اورتوهیدروکسی‌بنزوییک‌اسید 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، تأثیردر باز و بسته شدن روزنه‌ها و تنفس از نقش‌های مهم این اسید می‌باشد. اسیدسالیسیلیک باعث القاء 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 تری‌ترپن‌ها استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت بررسی بیان نیمه‌کمی ژن‌ها

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های بتاآمیرین سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز آغازگرها براساس توالی‌های اختصاصی مربوط به ژن‌های بتاآمیرین سنتاز 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 ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز براساس توالی این ژن که توسط Shamsi و همکاران (۲۰۱۲) توالی‌یابی شده آغازگرها طراحی شدند. هم‌چنین برای بررسی بیان ژن مونوترپن سنتازی 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 دی‌گلیسرآلدهید 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 تقریبا 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 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 اتیدیوم‌بروماید، 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، مونوترپن سنتاز، بتاآمیرین سنتاز و اسکوآلن‌اپوکسیداز 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 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.

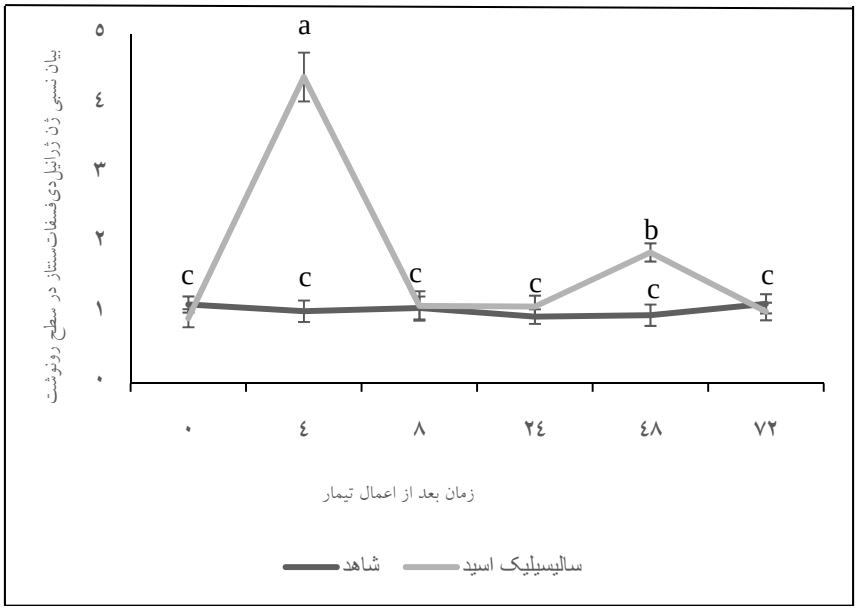
جدول ۱- مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
GAPDH-F	TCGGGATCAACGGGTTTGGAAG	63.6ºC
GAPDH-R	CTCTCCAGTCCTTGCTTGATGGTC	60 ºC
MTS2-F	CACACCAAAAGAAGTCGTGG	52.6 ºC
MTS2-R	CAGCAAGTCGAAGAATCAAGG	53.9 ºC
GDP-F	ACCCAAATCGGTCCGTGATG	61 ºC
GDP-R	GCAAGCAAGCTAACGACCTC	63 ºC
SQU-F	TATTGTTGGTGCTGGTGTCG	54 ºC
SQU-R	AAAATAGCACCAGGAGTGGG	52.9 ºC
AMYRIN-F	GTCCTCCCTTCATTTCTCCC	53.7 ºC
AMYRIN-R	AGAAGGCAGACCATTAGGCC	54.5 ºC

GAPDH: گلیسرآلدهید ۳-فسفات، MTS: مونوترپن سنتاز، GDP: ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز، SQU: اسکوآلن‌اپوکسیداز، AMYRIN: بتاآمیرین سنتاز

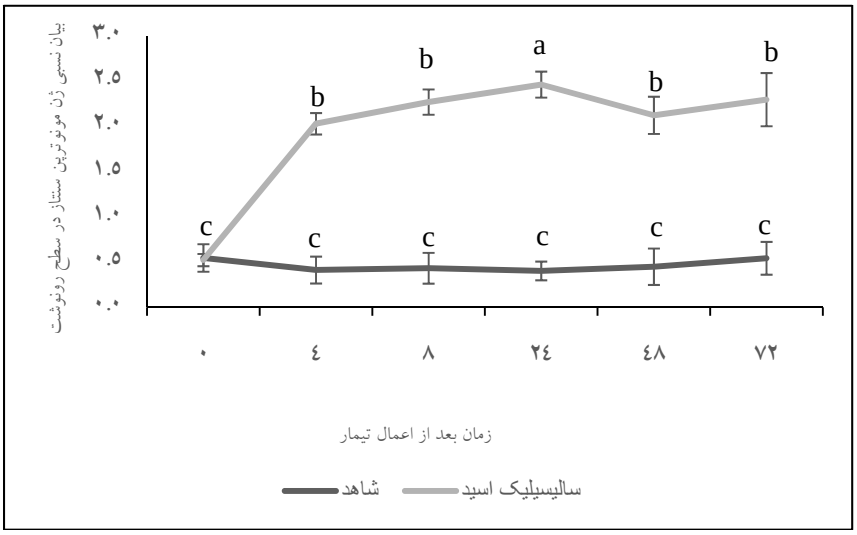
نتایج

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 موردنظر مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز تحت تأثیرتیمار با اسیدسالیسیلیک ۱ میلی‌مولار نشان داد که بیان ژن مذکور در اثر تیمار با اسیدسالیسیلیک پس از ۴ ساعت از اعمال تیمار افزایش‌یافته و به حداکثر میزان خود رسید ($P<0/05$). میزان بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز بعد از ۴ ساعت کاهش‌یافته و به میزان بیان در گیاه شاهد (محلول‌پاشی شده با آب مقطر) رسید. در گیاه شاهد یک روند تقریبا یکنواخت در میزان بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان بیان ژن مشاهده نشد (شکل ۳).

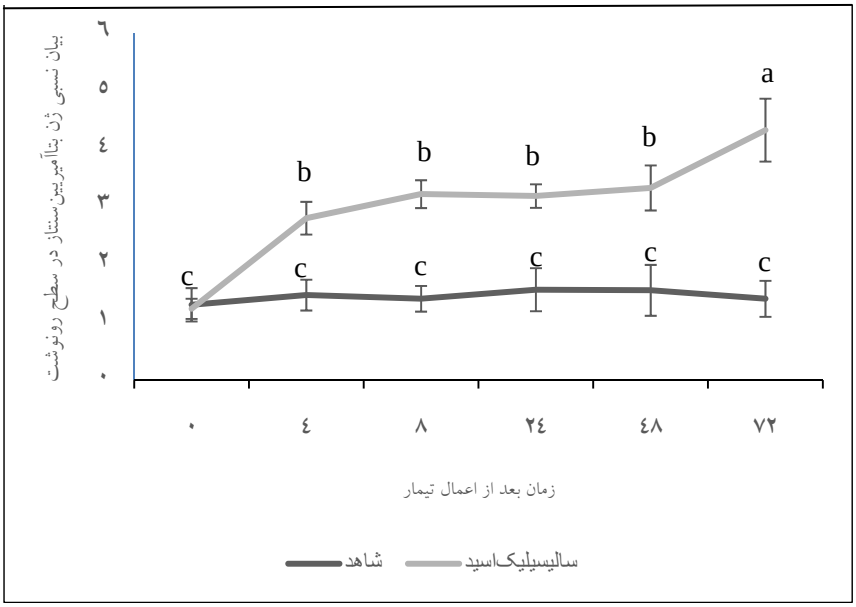


شکل ۳- بیان ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن مونوترپن سنتاز تحت تأثیرتیمار با اسیدسالیسیلیک ۱ میلی‌مولار نشان داد که میزان بیان ژن مونوترپن سنتاز در گیاهان شاهد در زمان‌های مختلف تغییری را نشان ندادند ($P>0.05$). درحالیکه بیان این ژن در گیاهان تیمارشده نسبت به گیاهان شاهد افزایش بیان مشاهده شد ($P<0.05$). بیان ژن مونوترپن‌سنتاز 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).



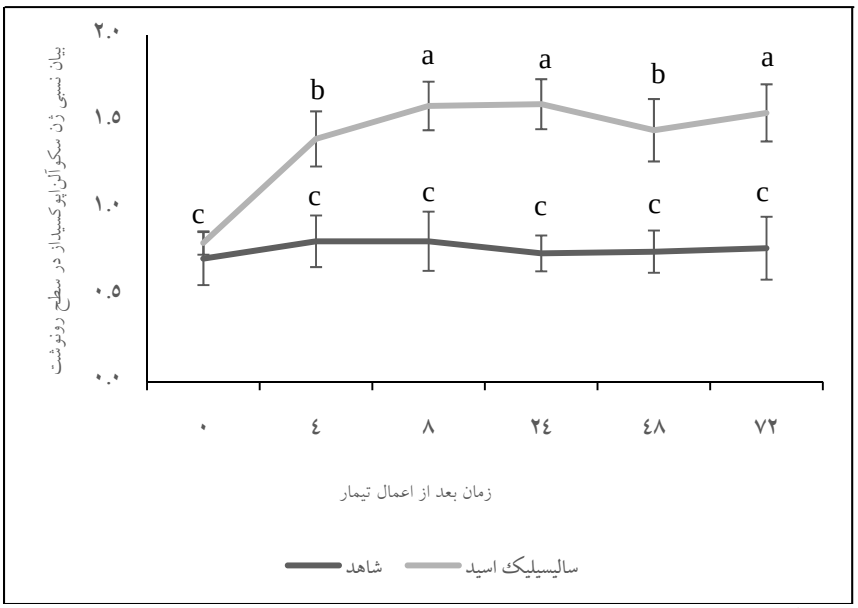
شکل ۴- بیان ژن مونوترپن سنتاز در زمان‌های متفاوت در برگ گیاه سیاه‌دانه پس از اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون LSD است.



شکل ۵. بیان ژن بتاآمیرین 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 بتاآمیرین سنتاز تحت تأثیرتیمار اسیدسالیسیلیک ۱ میلی‌مولار نشان داد که بیان این ژن ۴ ساعت بعد از اعمال این تیمار شروع به افزایش می‌کند و در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت روند ثابتی را نشان می‌دهد در زمان ۷۲ ساعت بیان ژن به بیشترین مقدار خود می‌رسد (P<0/05). در گیاه شاهد یک روند تقریبا یکنواخت در میزان بیان ژن بتاآمیرین سنتاز مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان بیان ژن مشاهده نشد (P>0/05) (شکل ۵).

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن اسکوآلن‌اپوکسیداز تحت تأثیرتیمار با اسیدسالیسیلیک ۱ میلی‌مولار نشان داد که بیان ژن مذکور ۴ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش می‌یابد و روند افزایشی دارد و در زمان ۷۲ ساعت تقریبا به بیشترین مقدار خود می‌رسد (P<0/05). 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>0/05) (شکل ۶).



شکل ۶- بیان ژن اسکوآلن‌اپوکسیداز 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.

بحث

امروزه همه علوم کشاورزی در پی راهی برای افزایش بازده و کاهش هزینه‌های تولید هستند. یکی ازجنبه‌هایی که در این راستا همواره مورد توجه واقع شده افزایش توانایی گیاه برای مقابله در برابر انواع تنش‌های زنده از قبیل آفات و بیماری‌ها است. ویژگی‌های منحصر به فرد ترپن‌ها از قبیل خواص زیستی متنوعی مانند فعالیت حشره‌کشی، ضد ویروسی، ضدقارچی و ضدباکتریایی می‌تواند آنها را به عنوان عاملی برای افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زنده معرفی کند. اعمال تیمارهایی از قبیل اسیدسالیسیلیک که به صورت مصنوعی باعث القاء مسیرهای دفاعی در گیاه می‌شود می‌تواند دلیلی برای نقش دفاعی ترپن‌ها باشد. در طول تکامل گیاهان همواره مکانیسم‌هایی را به منظور مقابله و سازگاری با انواع تنش‌های زنده و غیر زنده اعمال کرده‌اند. ماهیت سلول یا سلول‌ها در بافت‌ها به قدری پیچیده است که با هر محرکی از سمت محیط، فرایندهای پیچیده از مسیرهای سیگنالی که دارای اثرات متقابل یا هماهنگ هستند فعال

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 اسیدآبسیزیک 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 ضدمیکروبی، 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 احتمالا ترکیبات ضدمیکروبی آن‌ها از جمله ساپونین‌ها افزایش یابد که نتایج به دست‌آمده 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).

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 به‌غیر از ژن ژرانیل‌دی‌فسفات سنتاز دارای الگوی مشابهی بود. بیان این ژن ۴ ساعت پس از اعمال تیمار با اسیدسالیسیلک 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 مونوترپن سنتاز و اسکوالن‌آپوکسیداز کاملا مشابه بود به‌طوری‌که 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 به‌تدریج در ساعات بعد اندکی کاهش یافت به‌طوری‌که در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار هنوز دارای سطح بالایی از بیان نسبت به گیاه شاهد بود. الگوی بیان برای ژن بتاآمیرین سنتاز شبیه به ژن‌های مونوترپن سنتاز و اسکوالن‌اپوکسیداز با قدری تفاوت بود. بدین‌صورت‌که 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 ترپن‌ها در مسیرهای دفاعی و انتقال پیام باشد. با توجه به اینکه معمولا میزان بیان این ژن‌ها در سطح رونوشت با میزان متابولیت مربوطه ارتباط مستقیم دارد بنابراین در مواردی که هدف به‌دست‌آوردن 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.

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
- 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. Flavonids 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.
- 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 *Catharanthusroseus*: new enzyme activities and 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, Centellaasiatica (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. Procceding of the Natinal 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 Elaeodendroncroceum. Natural Product Research, 24: 1418-1425.
- 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.

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

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 trasnscript 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**.**