DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز مونو ترپن‌ها در گیاه دارویی اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) تحت تیمار سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات

ساکار حسینی[۱]، اسعد معروفی[۲،۳]* و سید حسن حسنی[۱]

[۱] ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[۲] ایران، سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه ژنتیک و تولیدات گیاهی

[۳] ایران، سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، پژوهشکده کشت و اصلاح گیاهان دارویی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۴

چکیده

مونوترپن‌های مهمی مانند کامفور و فنچول از جمله اجزای مهم تشکیل‌دهنده اسانس گیاه دارویی اسطوخودوس می‌باشند. ژن-های مونوترپن سنتاز اهدف مناسبی برای مهندسی متابولیک در اسطوخودوس هستند. این پژوهش به منظور سنجش بیان و القای دو ژن کلیدی (فنچول سنتاز و برنئول سنتاز) در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها در اسطوخودوس در پاسخ به الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید اجرا شد. ابتدا گیاهان در مراحل قبل و بعد از گل دهی در آزمایشات منفرد تحت تیمارهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید هر یک با غلظت یک میلی‌مولار، قرار گرفتند. سپس در زمان‌های صفر (شاهد)، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار در مراحل قبل و بعد از گل دهی، نمونه‌برداری از برگ گیاهان جهت بررسی بیان ژن انجام شد. نتایج نشان داد که بیان این ژنها تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات قرار می گیرند. به طور کلی بیان هر دو ژن فنچول سنتاز و برنئول سنتاز در مرحله قبل از گلدهی بیشتر از بعد از گلدهی بود. همچنین در تیمار با متیل‌جاسمونات بیان برنئول سنتاز بیشتر تحت تاثیر قرار گرفت و تا ۷۲ ساعت روند بیان آن کاملا افزایشی بود. به واسطه بیان افزایشی این ژنها در تیمارهای سالیسیلیک اسید و به ویژه متیل‌جاسمونات می توان انتظار داشت که مقدار مونوترپن های با ارزشی مانند کامفور و فنچول در گیاه اسطوخودوس افزایش نشان دهند.

واژه های کلیدی: اسطوخودوس، بیان ژن، متابولیتهای ثانویه، مهندسی متابولیک، الیسیتور

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۷۳۳۶۲۰۵۵۲ ، پست الکترونیکی: a.maroufi@uok.ac.ir

مقدمه

اسطوخودوس از گیاهان گلدار متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceaea) و دارای حدود ۳۱ گونه متفاوت است (۲۶). اسطوخودوس یک گیاه بومی مناطق معتدله و مدیترانه‌ای است. در ایران نیز در مناطقی مانند تهران، کرج، اصفهان، فارس و اراک وجود دارد. اسطوخودوس معمولی یا انگلیسی (Lavender) (*Lavandula angustifolia*) یک گیاه دارویی است که دارای ترکیبات ثانویه با ارزشی می‌باشد که سبب شده است مصارف درمانی داشته باشد. به علاوه به دلیل بوی بسیار مطبوعی که دارد اسانس‌گیری نیز از آن به عمل آید. تنوع و تقسیم‌بندی اسطوخودوس از لحاظ اسانس، به میزان روغن و کیفیت آن بستگی دارد، روغن با کیفیت بالا برای تولید اسانس خالص، عطر سازی و مصارف پزشکی و روغن با کیفیت پایین تر برای تولید صابون و شوینده ها به کار می رود (۱۲). از گل‌های گیاه اسطوخودوس در گذشته برای معطر کردن لباس‌ها و دفع حشرات استفاده می‌کردند. در فارماکوپه های معتبر از

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

اسطوخودوس انگلیسی به عنوان یک گیاه دارویی یاد شده و خواص درمانی آن مورد بررسی قرار گرفته است. در طب سنتی، روغن و اسانس اسطوخودوس برای درمان عفونت، اضطراب و تشویش، نازایی و تب تجویز شده است، همچنین به عنوان داروی ضدافسردگی، ضداسپاسم، ضد نفخ، ضد استفراغ و برای از بین بردن استرس و بیخوابی به کار رفته است (۲۹،۱۵). مونوترپنها به علت طعم و بوی خاص و همچنین خواص دارویشان در صنایع داروسازی و بهداشتی مورد استفاده قرار میگیرند (۳۱). فراوانترین مونوترپنهای یافت شده در اسطوخودوس شامل لینالول، لینالول استات، برنئول،کامفور و سینئول هستند (۱۲). بررسی‌ها نشان داده است که لینالول، لینالول استات و سینئول موجود در اسانس این گونه گیاهی، دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، و حشره کشی هستند (۲۴). به علاوه کامفور، به عنوان ماده موثر این گیاه دارویی، در روغنها و مرهمهای مورد استفاده در بی‌حسی موضعی استفاده میشود (۳۰).

مونوترپنها از پیش ماده ی ژرانیل دی فسفات (GPP) توسط فعالیت ترپن سنتازهای مختلف بوجود می آیند (۱۷). اولین گام مهم در بیوسنتز مونوترپنها، کاتالیز آنها توسط مونوترپن سنتازها می باشد (۱۶)، بنابراین مونوترپن سنتازها، ژنهای هدف مناسبی برای مهندسی این ترکیبات میباشند .علاوه بر این، از آنجایی که مونوترپن سنتازها ممکن است به عنوان عامل محدودکننده در بیوسنتز باشند، دستکاری بیان این ژنها میتواند منجر به افزایش بازده و تغییر در الگوی کمی مونوترپنهای گیاهان هدف شود. مونوترپن کامفور از برنئول سنتاز از طریق واکنش دی هیدروژناز الکل زنجیره کوتاه تولید میشود. کلون کردن برنئول سنتاز به بالا بردن کیفیت روغنهای ضروری اسطوخودوس از طریق مهندسی متابولیک کمک شایانی کرده است (۱۹). فنچول نیز که یک ترکیب مونوترپنی با ارزش دیگر است از طریق آنزیم فنچول سنتاز کاتالیز می‌شود و کلون کردن و بررسی بیان آن می تواند اطلاعات بسیار باارزشی در رابطه با افزایش مقدار این ترکیبات و دستکاری از طریق مهندسی ژنتیک را در اختیار محققین قرار دهد. الیسیتورها نیز می توانند از طریق فعال کردن مکانیسم های دفاعی گیاهان باعث القای بیان ژنها و تشکیل متابولیت های ثانویه شوند. بنابراین کاربرد این ترکیبات اطلاعات مناسبی را از نحوه واکنش ژنهای مورد مطالعه در اختیار قرار می دهد. در یک مطالعه اثر سالیسیلیک اسید بر روی توده های کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اسطوخودوس بررسی شد و محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها اندازه گیری شد. بر اساس نتایج حاصل بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در غلظت ۱۲ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد (۸). بررسی منابع نشان میدهد که تا کنون اطلاعات اندکی راجع به بیان ژنهای مسیر بیوسنتز مونوترپنها به ویژه در پاسخ به الیسیتورهایی مانند سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات در گیاه دارویی اسطوخودوس موجود می-باشد. بنابراین مطالعه ژنهای کلیدی جهت افزایش محتوای مونوترپن‌ها در شرایط متفاوت در این گیاه ضروری به نظر می‌رسد، چنانچه امروزه یکی از استراتژیهای سودمند برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، اعمال و به کار بردن تنش‌ها و الیسیتورها به منظور افزایش بیان ژنهای دخیل در بیوسنتز آنها می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی و تیمارها: گیاهان اسطوخودوس از طریق قلمه‌زنی، تکثیر و جهت رشد و رسیدن به مرحله مناسب در گلخانه با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۴ درجه سانتی گراد کشت شدند. الگوی بیان ژن‌های فنچول سنتاز و برنئول سنتاز، از مونوترپن سنتازهای مهم، تحت تیمارهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید (هر یک با غلظت یک میلی مولار)، قبل و بعد از گلدهی، در چهار آزمایش جداگانه، بررسی

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

شدند. هر آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. پس از اعمال تیمارها در زمانهای صفر (شاهد)، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه برداری از برگ گیاهان انجام گرفت. نمونه ها تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA، ساخت cDNA و طراحی آغازگر: استخراج RNA از برگ با استفاده از روش مازارا و جیمز (۲۱) با اندکی تغییرات انجام شد. کیفیت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. سپس cDNA با استفاده از کیت شرکت پیشگام طبق دستورالعمل سنتز شد. برای طراحی آغازگرها، ابتدا توالی‌های ژن‌های کد کننده برنئول سنتاز و فنچول سنتاز به عنوان ژنهای تحت مطالعه و بتا اکتین به عنوان ژن مرجع از پایگاه داده NCBI گرفته شدند و پس از هم ردیفی با استفاده از نرم افزار آنلاین Clustal W براساس نواحی حفاظت شده این توالی‌ها و با استفاده از نرم افزار آنلاین Primer3 آغازگرها طراحی شدند. برای بررسی خصوصیات و کیفیت آن‌ها از نرم افزارهای آنلاین Primer-BLAST و OligoAnalyzer 3.1 استفاده شد. مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان نسبی ژن های درگیر در مسیر بیوسنتز منوترپن ها در اسطوخودوس

نام آغازگر	نام ژن	توالی (5′-3′)	دمای اتصال Tm(°C)	اندازه قطعه (bp)
BAC-F	بتا اکتین	TGTGGATTGCCAAGGCAGAGT	۶۰/۵	۱۵۰
BAC-R	بتا اکتین	AATGAGCAGGCAGCAACAGCA	۶۰/۵	
BRS-F	برنئول سنتاز	GTTTTGAGAAGGCTGGAAGG	۵۹/۵	۴۳۰
BRS-R	برنئول سنتاز	CAACATAATACGGCGAGACG	۵۹/۵	
FES-F	فنچول سنتاز	GATTGATGAGGGTGAACCTG	۵۸/۴	۵۶۰
FES-R	فنچول سنتاز	GATTCAGTCTCCCATCTTCG	۵۸/۴	

جدول ۲- چرخه های حرارتی ، زمان و سیکلهای واکنش RT-PCR برای هر ژن

ژن	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	بسط	بسط نهایی	تعداد چرخه (واسرشت تا بسط) برای تکثیر قطعات	تعداد چرخه (واسرشت تا بسط) برای واکنشهای نیمه کمی
برنئول سنتاز	۹۴ °C ۵ دقیقه	۹۴ °C ۳۰ ثانیه	۵۹/۵ °C ۳۰ ثانیه	۷۲ °C ۶۰ ثانیه	۷۲ °C ۷ دقیقه	۳۵	۳۰
فنچول سنتاز	۹۴ °C ۵ دقیقه	۹۴ °C ۳۰ ثانیه	۵۸/۴ °C ۳۰ ثانیه	72 °C ۴۵ ثانیه	۷۲ °C ۷ دقیقه	۳۵	۳۰
بتا اکتین	۹۴ °C ۵ دقیقه	۹۴ °C ۳۰ ثانیه	۶۰/۵ °C ۳۰ ثانیه	۷۲ °C ۲۰ ثانیه	۷۲ °C ۷ دقیقه	۳۵	۳۰

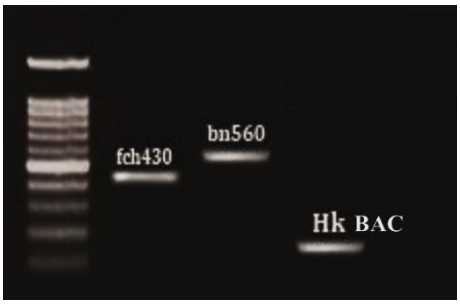
انجام واکنش RT-PCR نیمه کمی و بیان نسبی ژنها: تکثیر قطعات ژنها با انجام واکنش RT-PCR به وسیله آغازگرهای رقیق شده در غلظت ۱۰Mμ، cDNA و ماستر میکس در در دستگاه ترمال سایکلر Biorad انجام شد. ماستر میکس مورد استفاده از شرکت پیشگام شامل تمامی اجزا مورد نیاز برای واکنش PCR بود. شرایط دمایی PCR و تعداد چرخه ها طبق جدول ۲ استفاده شدند. واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژنهای برنئول سنتاز (BRS)،

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4

فنچول سنتاز (FES) و بتا اکتین (BAC) برای همه تیمارها و تکرارها در این آزمایش انجام شد. با استفاده از نرم افزار GelQuantNET تصاویر ذخیره شده ژل ها به داده های کمی برای همه ژنها در هر تیمار تبدیل شدند. بدین ترتیب که ابتدا تصویر ژل مورد نظر در برنامه بارگذاری شده و براساس شدت باند مدنظر، هر باند توسط نرم افزار به یک داده کمی تبدیل شد. جهت محاسبه نسبت بیان ژنهای مورد مطالعه، نسبت داده هر ژن به داده متناظر با ژن مرجع نرمال شد. این داده ها برای تجزیه و تحلیل اختلاف بین تیمارها و رسم نمودارها استفاده شدند. تجزیه واریانس و تحلیل داده‌های بدست آمده با سه تکرار با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت و مقایسه میانگین ها با آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد انجام گرفت. نمودارهای مربوط به بیان نسبی ژنها در سطح رونوشت نیز با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2010 رسم شدند.

نتایج

استخراج RNA، ساخت cDNA و تکثیر ژنها: RNA با کمیت و کیفیت مناسب از برگهای گیاه دارویی اسطوخودوس استخراج شدند. آغازگرهای طراحی شده که جهت جداسازی ژن‌های فنچول سنتاز، برنئول سنتاز و بتا اکتین طراحی شدند، بر طبق انتظار به ترتیب قطعاتی با طولهای ۴۳۰، ۵۶۰ و ۱۵۰ جفت باز را از cDNA های سنتز شده تکثیر کردند (شکل ۱).



شکل ۱- قطعات تکثیر شده ژنهای فنچول سنتاز (۴۳۰ جفت باز)، برنئول سنتاز (۵۶۰ جفت باز) و ژن مرجع بتا اکتین (۱۵۰ جفت باز) توسط آغازگرهای اختصاصی در واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز.

الگوی بیان ژن فنچول سنتاز تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید در گیاه اسطوخودوس قبل و بعد از گلدهی: نتایج بررسی بیان ژن فنچول سنتاز تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت یک میلی مولار در گیاهان اسطوخودوس، قبل و بعد از گلدهی (شکل ۲)، حاکی از تغییر بیان این ژن در هر دو مرحله بود (شکل ۳ الف و ب).

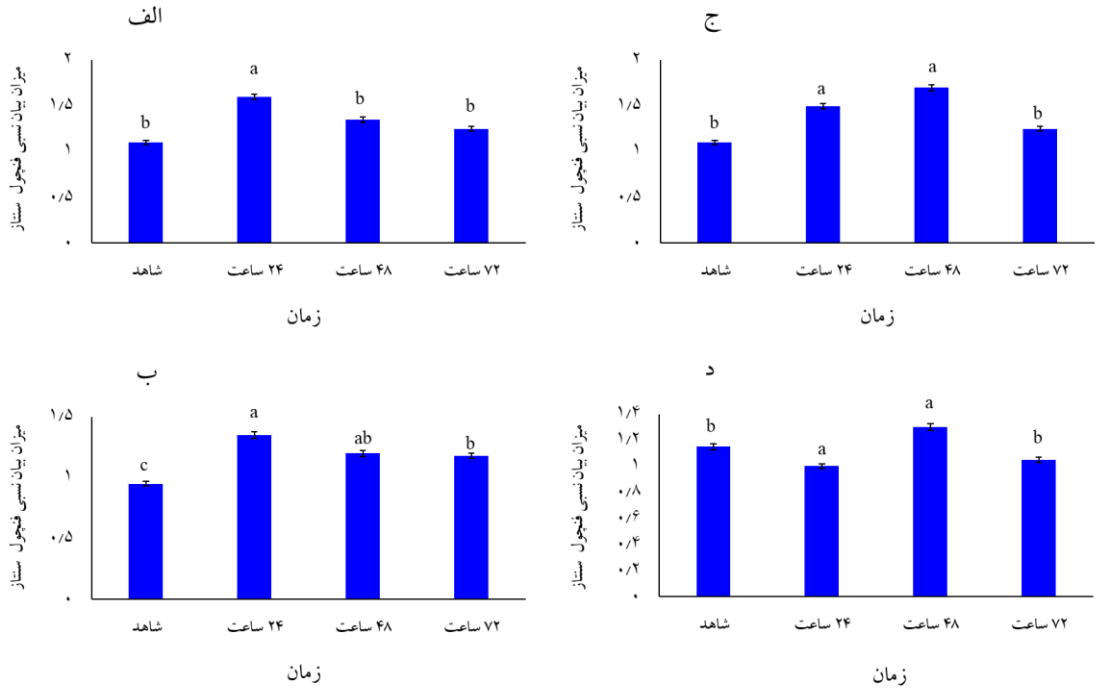
در مرحله قبل از گلدهی بعد از ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار بیان ژن کاملا افزایشی است (۱/۶ برابر نسبت به شاهد) و سپس شروع به کاهش میکند و در ۷۲ ساعت به میزان سطح شاهد (کنترل) نزدیک میشود (شکل ۳ الف). در مرحله بعد از گلدهی نیز بعد از ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار بیان ژن روند افزایشی معنی داری را نشان می دهد و سپس شروع به کاهش میکند و تا ۷۲ ساعت میزان بیان همچنان از میزان سطح شاهد بیشتر است (شکل ۳ ب). در مرحله قبل از گلدهی سطح بیان ژن تنها در ۲۴ ساعت پس از تیمار نسبت به شاهد معنی دار است، در حالی که در مرحله بعد از گلدهی در هر سه زمان سطح بیان ژن نسبت به شاهد بیشتر و معنی دار بود به طوری که در ۲۴ ساعت ۱/۴ برابر، در ۴۸ ساعت ۱/۳ برابر و در ۷۲ ساعت ۱/۲۵ برابر بود.

الگوی بیان ژن فنچول سنتاز تحت تاثیر تیمار متیل‌جاسمونات در گیاه اسطوخودوس قبل و بعد از گلدهی: نتایج بیان ژن فنچول سنتاز تحت تاثیر تیمار متیل‌جاسمونات با غلظت یک میلی مولار در گیاهان اسطوخودوس، قبل و بعد از گلدهی (شکل ۴) نشان داد که این تیمار باعث تغییر بیان ژن فنچول سنتاز در هر دو مرحله قبل و بعد از گلدهی می گردد. بیان این ژن در مرحله قبل از گلدهی بعد از اعمال تیمار گیاهان با متیل‌جاسمونات (شکل ۳ ج) در ۲۴ ساعت (۱/۴۵ برابر نسبت به شاهد) و ۴۸ ساعت (۱/۳۵ برابر نسبت به شاهد) کاملا افزایشی و معنی دار است ولی در ۷۲ ساعت بیان ژن

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

کاهش می یابد و به میزان سطح بیان در شاهد نزدیک می‌شود. در مرحله بعد از گلدهی نیز در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار گیاهان با متیل‌جاسمونات بیان ژن فنچول سنتاز روند افزایشی و معنی داری را نسبت به شاهد نشان می دهد و در زمان ۷۲ ساعت میزان بیان این ژن کاهشی است و سرانجام به سطح میزان بیان در شاهد نزدیک می‌شود (شکل ۳ د).

شکل ۲- واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژنهای فنچول سنتاز و بتا اکتین در اثر تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت یک میلی‌مولار، الف) قبل از گلدهی و ب) بعد از گلدهی در گیاه اسطوخودوس.



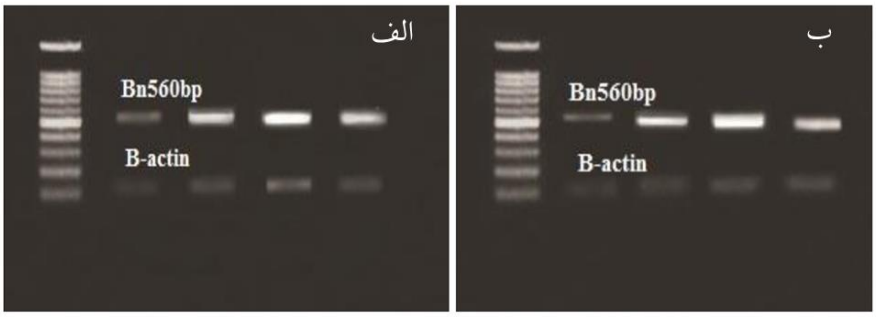
شکل ۳- بیان نسبی ژن فنچول سنتاز در گیاه اسطوخودوس تیمار شده با سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات (غلظت یک میلی مولار)، الف) قبل ازگلدهی و تیمار سالیسیلیک اسید ب) بعد از گلدهی و تیمار سالیسیلیک اسید، ج) قبل ازگلدهی و تیمار متیل‌جاسمونات د) بعد از گلدهی و تیمار متیل‌جاسمونات، حروف یکسان نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4

شکل ۴- واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژن‌های فنچول سنتاز و بتا اکتین در اثر تیمار متیل جاسمونات با غلظت یک میلی‌مولار، الف) قبل از گلدهی و ب) بعد از گلدهی در گیاه اسطوخودوس.

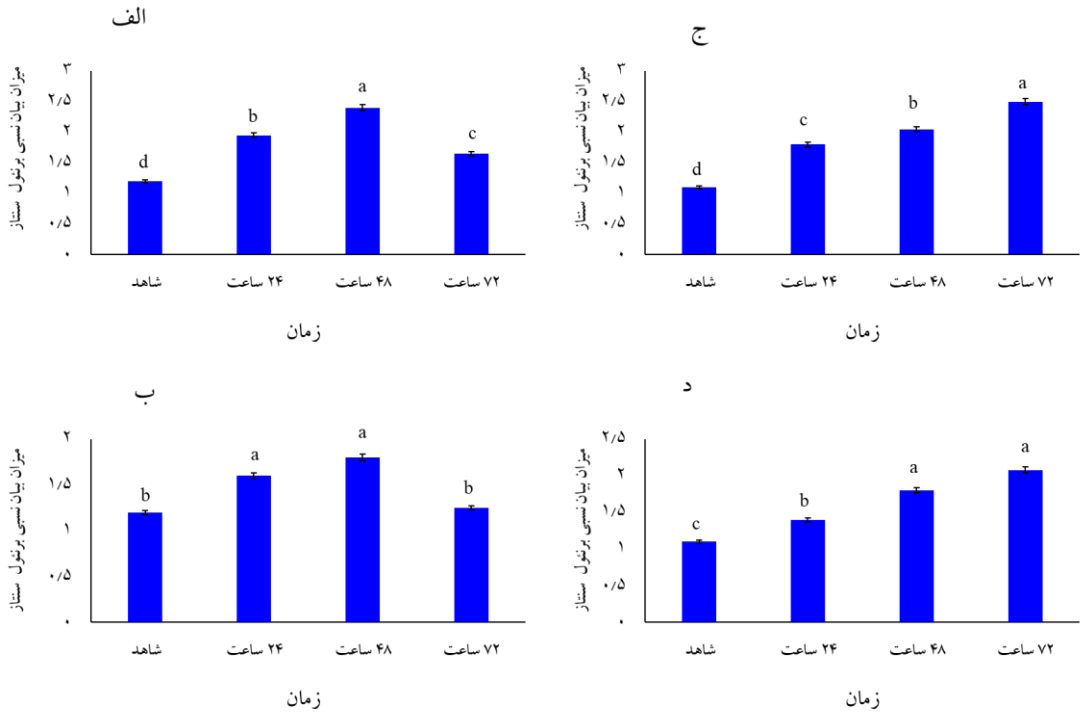
الگوی بیان ژن برنئول سنتاز تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید در گیاه اسطوخودوس قبل و بعد از گلدهی: بیان ژن برنئول سنتاز تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت یک میلی مولار در گیاهان اسطوخودوس، قبل و بعد از گلدهی بررسی شد (شکل ۵). بر اساس داده های به دست آمده استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید یک میلی مولار قبل از گلدهی در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سبب افزایش معنی دار بیان ژن برنئول سنتاز می شود و تا ۴۸ ساعت روند افزایشی بیان ژن مشاهده می شود و بعد از ۷۲ ساعت مقداری سطح بیان ژن کاهش نشان می دهد، هر چند در ۴۸ ساعت (۲ برابر نسبت به شاهد) بالاترین سطح بیان ژن قابل مشاهده است (شکل ۶ الف). بعد از گلدهی نیز پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش معنی دار بیان ژن برنئول سنتاز مشاهده می شود و تا ۴۸ ساعت روند بیان ژن افزایشی است ولی بعد از ۷۲ ساعت سطح بیان ژن کاهش معنی داری می یابد و به سطح میزان بیان ژن برنئول سنتاز در شاهد می رسد (شکل ۶ ب). در مرحله بعد از گلدهی نیز در زمان ۴۸ ساعت بالاترین سطح بیان ژن قابل مشاهده است (۱/۶۲ برابر نسبت به شاهد).

الگوی بیان ژن برنئول سنتاز تحت تاثیر تیمار متیل‌جاسمونات در گیاه اسطوخودوس قبل و بعد از گلدهی: بیان ژن برنئول سنتاز تحت تاثیر تیمار متیل‌جاسمونات با غلظت یک میلی مولار در گیاهان اسطوخودوس، قبل و بعد از گلدهی بررسی شد (شکل ۷).



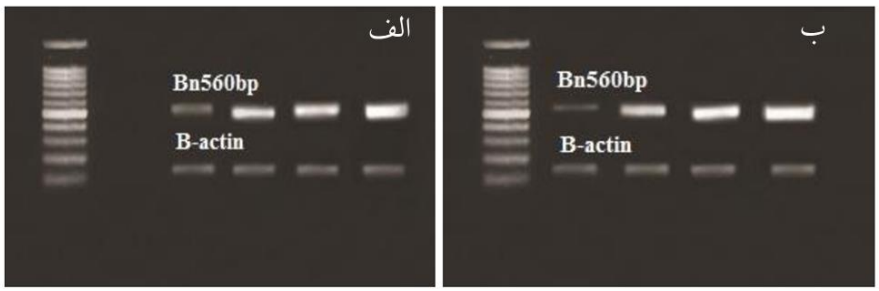
شکل ۵- واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژنهای برنئول سنتاز و بتا اکتین در اثر تیمار سالیسیلیک اسید یک میلی مولار، الف) قبل از گلدهی و ب) بعد از گلدهی در گیاه اسطوخودوس.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی



شکل ۶- بیان نسبی ژن برنئول سنتاز در گیاه اسطوخودوس تیمار شده با سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات (غلظت یک میلی مولار)، الف) قبل ازگلدهی و تیمار سالیسیلیک اسید ب) بعد از گلدهی و تیمار سالیسیلیک اسید، ج) قبل ازگلدهی و تیمار متیل‌جاسمونات د) بعد از گلدهی و تیمار متیل‌جاسمونات، حروف یکسان نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است.

به طور کلی بیان این ژن تحت تاثیر متیل‌جاسمونات در هر دو مرحله قبل و بعد از گلدهی روندی کاملا افزایشی و معنی داری را نشان می دهد. در مرحله قبل از گلدهی بالاترین میزان بیان ژن برنئول سنتاز در ۷۲ ساعت (۲/۴ برابر نسبت به شاهد) پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات به دست آمد که این میزان نسبت به بیان در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز معنی دار است (شکل ۶ ج). تقریبا همین روند افزایشی برای مرحله بعد از گلدهی نیز مشاهده شد و پس از ۷۲ ساعت میزان بیان برنئول سنتاز تحت تاثیر تیمار متیل‌جاسمونات به مقدار دو برابر بیشتر از شاهد بود. همچنین، در ۷۲ ساعت و ۴۸ ساعت اختلاف معنی داری درسطح بیان این ژن مشاهده نشد (شکل ۶ د). به طور کلی، در هر دو مرحله قبل و بعد از گلدهی در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، اختلاف معنی داری در سطح بیان ژن برنئول سنتاز نسبت به شاهد مشاهده می شود.



شکل ۷- واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژنهای برنئول سنتاز و بتا اکتین در اثر تیمار متیل جاسمونات یک میلی مولار، الف) قبل از گلدهی و ب) بعد از گلدهی در گیاه اسطوخودوس.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4

بحث و نتیجه گیری

برای عملکرد صحیح یک موجود، ژنها باید در زمان و بافت مناسب بیان شوند. سلول‌ها سنتز پروتئین‌ها و یا RNAهای عملکردی را از طریق اطلاعات رمزگذاری شده در ژنها کنترل و تنظیم می‌کنند. در گیاهان به ویژه هنگام مواجه شدن با تنش‌های زنده و غیر زنده تنظیم و کنترل بیان ژنها از اهمیت بالایی برخوردار است و تنظیم رونویسی یک فرآیند اصلی در مصونیت گیاهان است. القاء یا سرکوب ژنهای دفاعی و کلیدی مسیرهای متابولیکی به کمک شبکه های علامت رسانی کنترل می شوند که توسط هورمون های گیاهی و مولکول‌های علامت‌رسان از جمله سالیسیلیک اسید و اسید جاسمونیک تنظیم می شوند (۱۳). با توجه به اینکه اسطوخودوس دارای مونوترپن‌های با ارزشی نظیر لینالول، لینالول استات، برنئول، کامفور و سینئول است، افزایش مقدار این ترکیبات در بافت‌های گیاهی، مستلزم بررسی ژنهای مهم مسیر تولید و درک مکانیسم های مولکولی تنظیم کننده آنها می باشد. در این مطالعه بیان دو ژن کلیدی (فنچول سنتاز و برنئول سنتاز) مسیر بیوسنتز مونوترپنها تحت تاثیر سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات در گیاه اسطوخودوس بررسی شد. نتایج بررسی بیان دو ژن فنچول سنتاز و برنئول سنتاز در گیاه اسطوخودوس تحت تاثیر این دو الیسیتور قبل و بعد از گلدهی نشان داد که اعمال این تیمارها باعث تغییرات معنی داری در الگوی بیان این ژنها می‌شوند. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که سالیسیلیک اسید و خصوصا متیل‌جاسمونات در القای بیان ژنهای فنچول سنتاز و برنئول سنتاز در زمانهای متفاوت پس از اعمال تیمار موثر است و احتمالا در افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاه اسطوخودوس نقش داشته باشند. در مورد ژن فنچول سنتاز تحت تیمار سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات قبل و بعد از گلدهی در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار افزایش بیان ژن بیشتری مشاهده می شود اما نمایش بیان ژن برنئول سنتاز تا حدودی متفاوت است و به ویژه در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تحت تیمار متیل جاسمونات قبل و بعد از گلدهی افزایش بیان معنی داری را نشان می دهد. به نظر می رسد در مورد فنچول سنتاز در هر دو مرحله قبل و بعد از گلدهی و تحت هر دو تیمار سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات تفاوت چندانی در میزان و روند بیان آن در زمانهای متفاوت دیده نمی شود، اما ژن برنئول سنتاز در مرحله قبل از گلدهی دارای میزان بیان بیشتری است هر چند روند بیان ژن در زمانهای مورد مطالعه در هر دو مرحله قبل و بعد از گلدهی تحت هر دو تیمار سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات یکنواخت است.

تا کنون تاثیر محرک های سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات بر روی ژنهای مختلف درگیر در بیوسنتز ترپنوئیدها در گونه های دیگر به ویژه از خانواده نعنائیان مطالعه شده است و نتایج حاکی از القای بیان ژنها و افزایش متابولیتهای ثانویه بوده است. به عنوان مثال مطالعه بیان ژن‌های سیکلوآرتنول سنتاز (CAS)، اسکوآلن سنتاز (SQS) و اسکوآلن مونواکسیژناز (SMO) در گیاه شنبلیله در اثر اعمال تیمار سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات نشان داد که متیل‌جاسمونات در یک دوره زمانی ۴۸ ساعتی موجب القای بیان این ژن ها می شود (۱۱). در گیاه بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* subsp. millefolium) نیز میزان بیان ژنهای دئوکسی گزیلولوز ۵-فسفات ردوکتاز ایزومراز (DXR) و ژرانیل دی فسفات سنتاز (GPPS) از ژن‌های کلیدی در بیوسنتز مونوترپن‌ها مطالعه شد و نتایج نشان داد این ژنها در مراحل مختلف نموی و تحت تیمار متیل‌جاسمونات در بافت‌های برگ و گل تغییرات بیان معنی داری را نشان می دهند (۸).

مطالعات متعددی نشان می‌دهند که متیل‌جاسمونات در گونه های مختلف گیاهی از جمله در مرزه تابستانه (*Satureja hortensis*) و در گیاه جینسینگ (*Panax ginseng*)

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4

موجب القای بیان ژنهای درگیر در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها نظیر ژن های گاما-ترپینن سنتاز (GTS) ، اکسیدو اسکوالن سیکلاز (OSC)، اسکوالن سنتاز (SQS)، و اسکوالن آپوکسیداز (SQLE) شده است (۱۲). در یونجه (*Medicago truncatula*) نیز تحت تیمار متیل‌جاسمونات ژن‌هایی که در متابولیسم فنیل پروپانوئید نقش دارند به میزان پنج برابر نسبت به شاهد افزایش بیان نشان دادند (۲۵). همچنین در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) متیل جاسمونات باعث افزایش معنی دار بیان ژن های کدکننده دو آنزیم چاویکول O-متیل ترنسفراز (CVOMT) و سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C4H) شد (۳). در گیاه بابا آدم (*Arctium lappa* L.) بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) تحت تیمار هورمون متیل‌جاسمونات با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با هورمون مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد میزان بیان ژن پس از ۲۴ ساعت افزایش نشان می دهد (۷). با توجه به اینکه جاسمونات‌ها از جمله متیل‌جاسمونات مولکولهای پیام‌رسان کلیدی هستند و به عنوان یک گروه مهم از انتقال دهنده های پیام در دفاع گیاه در برابر زخم ها، حشرات و حمله پاتوژن ها نقش دارند (۲۲)، بنا براین این مولکولها در فرآیند القاء و بیان بسیاری از ژنهای مسیر بیوسنتزی گیاهان که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند، تاثیر گذار هستند (۲۸). هر چند در گیاهان اثرات جاسمونات ها بسته به نوع گونه گیاهی، مرحله نموی و غلظت به کار رفته متفاوت است (۲۰). مطالعات نشان داده است هنگامی که این مولکول های علامت رسان به صورت خارجی در گیاهان به کار برده می شوند به صورت سیستمیک حرکت کرده و منجر به بیان برخی از ژن ها می شوند که در نهایت ممکن است بیوسنتز ترکیبات خاصی را در سیستم سلولی زنده تحریک و یا بهبود ببخشند (۱۸).

نقش سالیسیلیک اسید نیز به عنوان یکی از هورمون‌های گیاهی در افزایش مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌ها ثابت شده است (۲۷). مطالعات زیادی نشان داده اندکه سالیسیلیک اسید می تواند در القاء بسیاری از ژنهای مسیرتولید متابولیت‌های ثانویه مثل ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها نقش داشته باشد (۱۸، ۲۳). بررسی الگوی بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز درگیر در مسیر بیوسنتزی مونوترپنها در گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa*. L) در اثـر تیمار با اسیدسالیسیلیک نشان داد که این ژن دارای تغییرات بیانی است و تحت تیمار اسیدسالیسـیلیک القا می‌شود (۱). بررسی میزان بیان ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH) در سیب زمینی تحت تیمار اسید سالیسیلیک نشان داد که بیان این ژن در غلظت یک میلی مولار نسبت به شاهد افزایش یافت (۱۱). همچنین در گیاه خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*) ژن کدئین ردوکتاز (COR) از ژنهای مهم آلکالوئیدهای مورفینان تحت تاثیر تیمار اسیدسالیسـیلیک افزایش بیان را نسبت به شاهد نشان داد (۲). در گیاه بادرنجبویه سالیسیلیک اسید به عنوان یک مولکول پیام‌رسان اثرهای مضر حاصل از تنش کادمیوم را کاهش داد و سبب بهبود تحمل بیشتر گیاهان شد به طوری افزودن سالیسیلیک اسید باعث بهبود شاخص‌های رشد شد (۴). همچنین تیمار سالیسیلیک اسید بر فعالیت پلی آمین اکسیداز در کالوس آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) باعث افزایش وابسته به غلظت فعالیت پلی آمین اکسیداز گردید. در کالوس تحت تیمار سالیسیلیک اسید کاهش فعالیت پراکسیداز محلول و افزایش H_2O_2 گزارش شد. تنظیم سطوح H_2O_2 توسط سالیسیلیک اسید از طریق تاثیر بر پلی آمین اکسیداز احتمالا در هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نقش دارد که برای فرآیندهای نمو درون شیشه ای سلول های گیاهی ضروری میباشد (۵).

با توجه به نتایج آنالیز بیان ژنهای مسیر بیوسنتز مونوترپن ها در گیاه اسطوخودوس تحت تیمار سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات به نظر می‌رسد که بیان این ژنها در سطح رونوشت در هر دو مرحله قبل و بعد از گلدهی تحت تاثیر قرار گرفته به طوری که تا ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

روند هر دو ژن فنچول سنتاز و برنئول سنتاز افزایشی است. همچنین میزان بیان این ژنها در مرحله قبل از گلدهی بیشتر از مرحله بعد از گلدهی می باشد. به علاوه به نظر می رسد متیل‌جاسمونات نقش القای بیشتری در افزایشی بیان ژن ها را اسطوخودوس داشته باشد. به طور کلی به واسطه القای بیان افزایشی ژنهای فنچول سنتاز و برنئول سنتاز به تیمارهای سالیسیلیک اسید و به ویژه متیل‌جاسمونات می توان انتظار داشت که مونوترپن های با ارزشی مانند کامفور در گیاه اسطوخودوس افزایش مقدار نشان دهند. به علاوه نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در جهت استفاده در مطالعات وسیع‌تری مورد بهره برداری قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از پرسنل و کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی- دانشگاه کردستان خانم پگاه شهیدی جهت همکاری و کمک در راستای اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می کنند.

منبع مالی پژوهش: دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان.

منابع

۱- الیاسی، ر. مجدی، م. بهرام نژاد، ب. میرزاقادری، ق. ۱۳۹۴. بررسی الگوی بیان ژنهای دخیل در مسیر بیوسنتزی مونوترپنها و تریترپنها تحت تأثیرتیماراسیدسالیسیلیک در گیاه دارویی سیاهدانه. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، شماره۲۳، ص ۱۷۴-۱۶۴.

۲- بهزادی راد، م. نقوی م. ر شاه نجات بوشهری، ع. ۱۳۹۵. تاثیر الیسیتورهای غیر زیستی بر بیان ژن آلکالوئیدهای گیاه شقایق ایرانی (*Papaver bracteatum*). ژنتیک نوین، دوره ۱۱، شماره ۴، ص ۴۹۰-۴۸۳.

۳- حسنی، ل. عبدالهی مندولکانی، ب. درویش زاده، ر. حسنی، ع. ۱۳۹۵. افزایش بیان ژن های چاویکول O-متیل ترنسفراز و سینامات ۴-هیدروکسیلاز تحت تاثیر متیل جاسمونات در گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.). تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی) دوره ۳۹ ، شماره ۳، ص ۱۲۲-۱۰۱.

۴- حیدری، م. اسمعیل زاده بهابادی، ص. سنگتراش، م. ۱۴۰۰. بررسی اثر سالیسیسلیک اسید بر شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی بادرنجبویه تحت تنش کادمیوم. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) دوره ۳۴، شماره ۳ ، ص ۷۰۷-۶۹۴.

۵- شاهرودی، ا. فرانسواز، ب. مینایی تهرانی، د. حسنی، س. ب. ۱۳۹۹. اثر تحریکی سالیسیلیک اسید بر فعالیت پلی آمین اکسیداز در کالوس آویشن دنایی. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) دوره ۳۳، شماره ۱ ، ص ۱۵۷-۱۴۷.

۶- علیرضایی، ف. کیارستمی، خ. ۱۳۹۹. بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill). مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) دوره ۳۳، شماره ۳ ، صفحه ۳۴۸-۳۳۷.

۷- غلامیان ،ف. طالبی، م. سید طباطبایی،ب. شیران، ب. اثر هورمون متیل جاسمونات بر بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز بابا آدم. ۱۳۹۷، ژنتیک نوین، دوره ۱۳، شماره ۳، ص ۳۴۱-۳۳۳.

۸- فتحی، ا. مجدی، م. معروفی، ا. دستان، د. ۱۳۹۹. بررسی بیان برخی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی ترپنوییدها و فنیل‌پروپانوییدها در بافت‌ها، مراحل نموی و تحت تیمار متیل‌جاسمونات در بومادران. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، دوره ۳۳، شماره ۱، ص ۸۷-۱۰۲.

۹- فخیمی، ف. مطلبی آذر،ع. زارع نهندی،ف. سخندان بشیر، ن. گوهری، غ. ۱۳۹۸. اثر اسید سالیسیلیک بر رونوشت برداری از ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز در سیبزمینی (*Solanum tuberosum* L) رقم آگریا تحت تنش شوری. تنش های محیطی در علوم زراعی جلد ۱۳، شماره ۱، ص ۸-۱.

۱۰- قبادی، س. معروفی ا. مجدی، م. ۱۳۹۵. مطالعه بیان ژن‌های کلیدی در بیوسنتز مونوترپن‌ها در بافت‌های مختلف و در پاسخ به الیسیتورهای غیرزیستی در گیاه دارویی مرزه تابستانه (*Satureja hotensis*). مجله سلول وبافت، جلد ۷، شماره ۳، ص ۲۹۱-۲۷۵.

۱۱- لطفی، م. معروفی، ا. اسماعیلی، ا. دستان، د.بررسی بیان ژنهای کلیدی بیوسنتز دیوسژنین در گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella*

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4

foenum-graecum) در پاسخ به سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). انتشار آنلاین.

12- Boeckelmann, A. (2008). Monoterpene production and regulation in Lavenders, University of British Columbia, Canada. Dissertation, MSc.

13- Caarls, L., Pieterse, C.M.J. and Van Wees, S.C.M. (2015) How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. Frontier Plant Sciences 6:170

14- Choi, D.W., Jung, J. Ha, Y.I. Park, H.W. In, D.S. Chung, H.J. and Liu, J.R. (2005) Analysis of transcripts inmethyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosidesand other secondary metabolites. Plant cell reports 23(8): 557-566

15- Chu, C.J. and Kemper, K.J. (2001) Lavender (*Lavandula spp*.) Retrieved Aug 15, 2012 fromhttp://www.longwoodherbal.org/lavender/lavender.pdf

16- Davis, E.M. and Croteau, R. (2000) Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes biosynthesis. In: Leeper F.J. and Vederas J.C. (eds) Biosynthesis. Topics in Current Chemistry, vol 209. Springer, Berlin, Heidelberg.

17- Degenhardt, J., Koellner, T.G. and Gershenzon, J. (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. Phytochemistry 70:1621-1637

18- Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.D., Yang, J.K. and Choi, M.S. (2004) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science 166: 745-751

19- Lukman, S.S., Zerihun, D. A. and Soheil, M. S. (2013). Cloning of a sesquiterpene synthase from *Lavandula x intermedia* glandular trichome. *Planta*, 238: 983–989.

20- Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J. and Bohlmann, J. (2002) Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. Plant Physiology 129: 1003-1018

21- Mazzara, M. and James, D.J. (2000) The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria* × *ananassa* duch.) tissue. Molecular Biotechnology 15(3): 237–241

22- Memelink, J. (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. Phytochemistry 70: 1560-1570

23- Pastírová, A., Repčák, M. and Eliašová, A. (2004) Salicylic acid induced of coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. Plant Science 167: 819-824

24- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M. and Kole, C.R. (1997) Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios 89(358): 39-46

25- Suzuki, H., Reddy, M.S.S., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G.D., Huhman, D.V., Sumner, L.W., Blount, J.W., Mendes, P. and Dixon, R.A. (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: 698-707

26- Upson, T., Andrews, S., Harriott, G., King, C. and Langhorne, J. (2004) *The genus Lavandula*, 1st ed, Timber Press, Inc., USA.

27- Wang, Y. and Liu, J. (2012) Exogenous treatment with salicylic acid attenuates occurrence of citrus canker in susceptible navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). Journal of Plant Physiology 169: 1143-1149

28- Wasternack, C. and Strnad, M. (2016) Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. New Biotechnology 33(5): 604-613

29- Wolfe, N. and Herzberg, J. (1996) Can aromatherapy oils promote sleep in severely demented patients. International Journal of Geriatr Psychiatry 10(11): 926-27

30- Xu, H.X., Blair, N.T. and Clapham, D.E. (2005) Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid- independent mechanism. Journal of Neuroscience 25(39): 8924-8937

31- Zwenger, S. and Basu, C. (2008) Plant terpenoids: applications and future potentials. Biotechnology and Molecular Biology Reviews 3: 1-7

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

Relative expression analysis of the monoterpene biosynthesis genes in Lavender (*Lavandula angustifolia*) in response to salicylic acid and methyl jasmonate

Hosseini S.[1], Maroufi A.[2*] and Hassani S.H.[1]

[1] Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

[2] Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran

Abstract

Important monoterpenes such as camphor and fenchol are components of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil. Monoterpene synthases are suitable target genes for metabolic engineering in Lavender. This study was performed to analyze the expression and induction of the two key genes (borneol synthase and fenchol synthase) involved in monoterpenes biosynthetic pathway in lavender after elicitation by methyl jasmonate and salicylic acid. First, plants in the pre-flowering and post-flowering stages were treated separately by methyl jasmonate and salicylic acid, each at a concentration of 1 mM. Then, plant leaves were harvested 0 (control), 24, 48 and 72 hours after treatments for gene expression analysis. The results showed that the expression of these genes was affected by salicylic acid and methyl jasmonate treatment. In general, the expression of both genes in the pre-flowering stage was higher than that of post-flowering. Moreover, the expression of borneol synthase was more affected by methyl jasmonate, so that its expression trend was completely increased up to 72 hours. Given the increased expression of borneol synthase and fenchol synthase in plants treated with salicylic acid, and methyl jasmonate it could be expected that the content of valuable monoterpenes such as camphor and fenchol increase in lavender.

Key words: *Lavandula angustifolia*, gene expression, secondary metabolites, metabolic engineering, elicitor