

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

ساکار حسینی^۱، اسعد معروفی^{۲،۳*} و سید حسن حسینی^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. ژن‌های مونوترپن سنتاز اهداف 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 بیوستتز 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 می‌گیرند. 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 کاملاً افزایشی بود. به واسطه بیان افزایشی این ژن‌ها در تیمارهای سالیسیلیک اسید و به ویژه متیل‌جاسمونات می‌توان انتظار داشت که مقدار مونوترپن‌های با ارزشی مانند کامفور و فنچول در گیاه اسطوخودوس افزایش نشان دهند.

واژه‌های کلیدی: اسطوخودوس، بیان ژن، متابولیت‌های ثانویه، مهندسی متابولیک، الیسیتور

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

مقدمه

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 شوینده‌ها به کار می‌رود (۱۲). از گل‌های گیاه اسطوخودوس در گذشته برای معطر کردن لباس‌ها و دفع حشرات استفاده می‌کردند. در فارماکوپه‌های معتبر از

اسطوخودوس از گیاهان گلدار متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) 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

بسیار باارزشی در رابطه با افزایش مقدار این ترکیبات و دستکاری از طریق مهندسی ژنتیک را در اختیار محققین قرار دهد. الیستورها نیز می‌توانند از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی گیاهان باعث القای بیان ژنها و تشکیل متابولیت‌های ثانویه شوند. بنابراین کاربرد این ترکیبات اطلاعات مناسبی را از نحوه واکنش ژنهای مورد مطالعه در اختیار قرار می‌دهد. در یک مطالعه اثر سالیسیلیک اسید بر روی توده‌های کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اسطوخودوس بررسی شد و محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها اندازه‌گیری 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 الیستورهایی مانند سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات در گیاه دارویی اسطوخودوس موجود می‌باشد. 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 الیستورها 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 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد کشت شدند. الگوی بیان ژنهای فنچول سنتاز و برنئول سنتاز، از مونوترپین سنتازهای مهم، تحت تیمارهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید (هر یک با غلظت یک میلی‌مولار)، قبل و بعد از گلدهی، در چهار آزمایش جداگانه، بررسی

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 (۱۵، ۲۹). مونوترپنها به علت طعم و بوی خاص و همچنین خواص دارویشان در صنایع داروسازی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۱). فراوانترین مونوترپنها 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 ترین سنتازهای مختلف بوجود می‌آیند (۱۷). اولین گام مهم در بیوسنتز مونوترپنها، کاتالیز آنها توسط مونوترپین سنتازها می‌باشد (۱۶)، بنابراین مونوترپین سنتازها، ژنهای هدف مناسبی برای مهندسی این ترکیبات می‌باشند. علاوه بر این، از آنجایی که مونوترپین سنتازها ممکن است به عنوان عامل محدودکننده در بیوسنتز باشند، دستکاری بیان این ژنها می‌تواند منجر به افزایش بازده و تغییر در الگوی کمی مونوترپنها گیاهان هدف شود. مونوترپین کامفور از برنئول سنتاز از طریق واکنش دی‌هیدروژناز 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 مونوترپینی با ارزش دیگر است از طریق آنزیم فنچول سنتاز کاتالیز می‌شود و کلون کردن و بررسی بیان آن می‌تواند اطلاعات

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

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

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان نسبی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز منوترین‌ها در اسطوخودوس

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

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

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

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 چرخه‌ها طبق جدول ۲ استفاده شدند. واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژنهای برنئول سنتاز (BRS)،

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 متیل جاسمونات در گیاه اسطوخودوس قبل و بعد از گلدهی: نتایج بیان ژن فنچول سنتاز تحت تاثیر تیمار متیل جاسمونات 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 متیل جاسمونات (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

فنچول سنتاز (FES) و بتا اکتینین (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 داده های 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

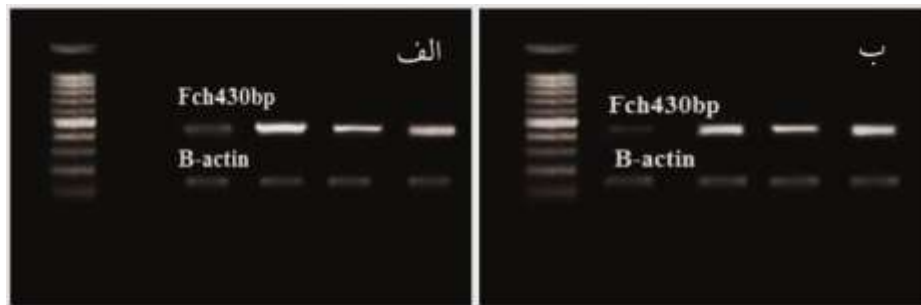
استخراج RNA، ساخت cDNA و تکثیر ژنها: RNA با کمیت و کیفیت مناسب از برگهای گیاه دارویی اسطوخودوس استخراج شدند. آغازگرهای طراحی شده که جهت جداسازی ژنهای فنچول سنتاز، برنتول سنتاز و بتا اکتینین طراحی شدند، بر طبق انتظار به ترتیب قطعاتی با طولهای ۴۳۰، ۵۶۰ و ۱۵۰ جفت باز را از cDNA های سنتز شده تکثیر کردند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



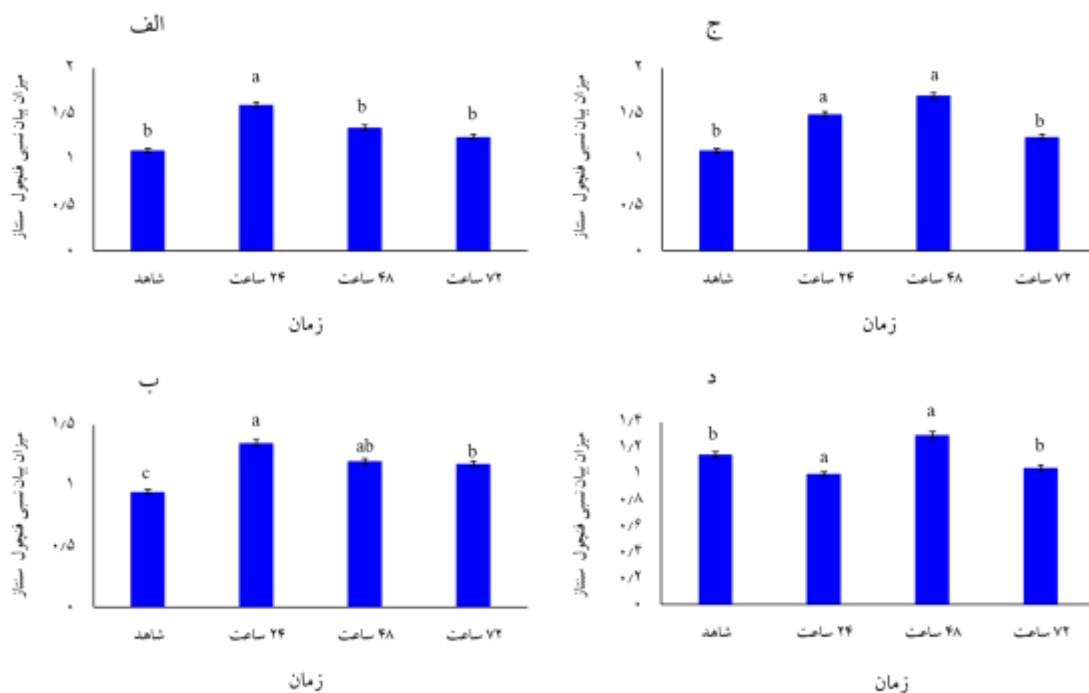
شکل ۱- قطعات تکثیر شده ژنهای فنچول سنتاز (۴۳۰ جفت باز)، برنتول سنتاز (۵۶۰ جفت باز) و ژن مرجع بتا اکتینین (۱۵۰ جفت باز) توسط آغازگرهای اختصاصی در واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز.

نشان می‌دهد و در زمان ۷۲ ساعت میزان بیان این ژن کاهش می‌یابد 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 معنی‌داری را نسبت به شاهد

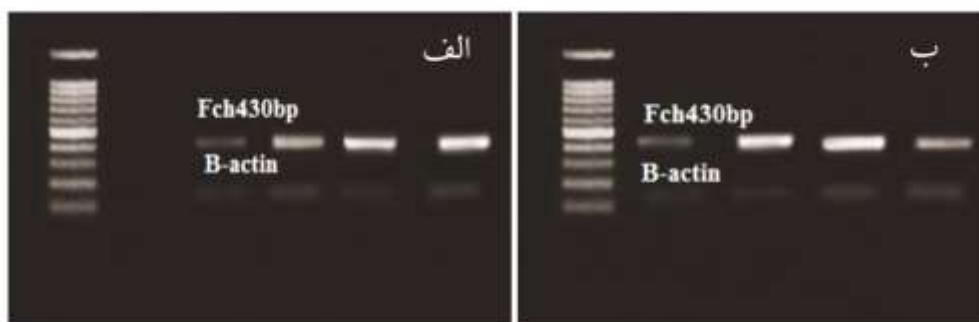
کاهش می‌یابد و به میزان سطح بیان در شاهد نزدیک می‌شود. در مرحله بعد از گلدهی نیز در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار گیاهان با متیل‌جاسمونات بیان ژن فنچول سنتاز روند افزایشی و معنی‌داری را نسبت به شاهد



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 میلی‌مولار، الف) قبل از گلدهی و تیمار سالیسیلیک اسید ب) بعد از گلدهی و تیمار سالیسیلیک اسید، ج) قبل از گلدهی و تیمار متیل‌جاسمونات د) بعد از گلدهی و تیمار متیل‌جاسمونات، حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است.

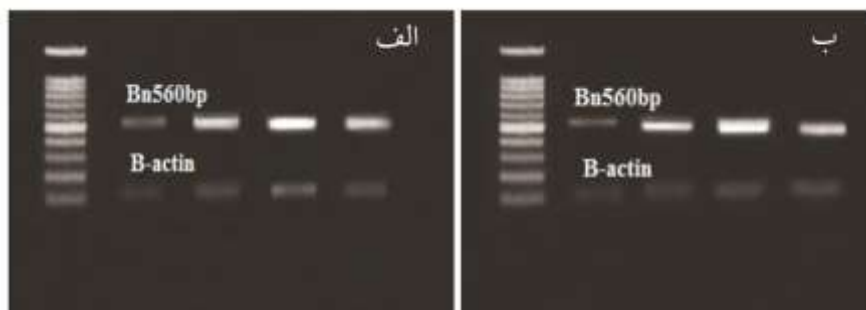


شکل ۴- واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژن‌های فنچول سنتاز و بتا اکتین در اثر تیمار متیل جاسمونات با غلظت یک میلی‌مولار، الف) قبل از گلدهی و ب) بعد از گلدهی در گیاه اسطوخودوس.

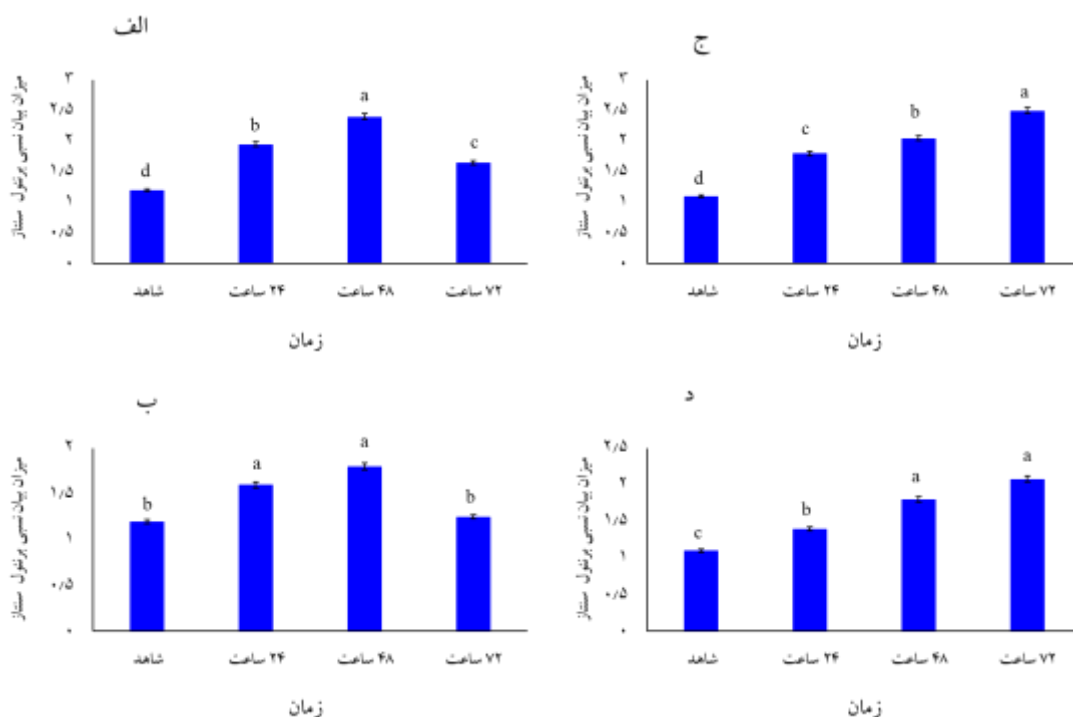
ژن برنتول سنتاز مشاهده می‌شود و تا ۴۸ ساعت روند بیان ژن افزایشی است ولی بعد از ۷۲ ساعت سطح بیان ژن کاهش معنی داری می‌یابد و به سطح میزان بیان ژن برنتول سنتاز در شاهد می‌رسد (شکل ۶ ب). در مرحله بعد از گلدهی نیز در زمان ۴۸ ساعت بالاترین سطح بیان ژن قابل مشاهده است (۱/۶۲ برابر نسبت به شاهد).

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

الگوی بیان ژن برنتول سنتاز تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید در گیاه اسطوخودوس قبل و بعد از گلدهی: بیان ژن برنتول سنتاز تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت یک میلی‌مولار در گیاهان اسطوخودوس، قبل و بعد از گلدهی بررسی شد (شکل ۵). بر اساس داده‌های به دست آمده استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار قبل از گلدهی در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سبب افزایش معنی دار بیان ژن برنتول سنتاز می‌شود و تا ۴۸ ساعت روند افزایشی بیان ژن مشاهده می‌شود و بعد از ۷۲ ساعت مقداری سطح بیان ژن کاهش نشان می‌دهد، 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



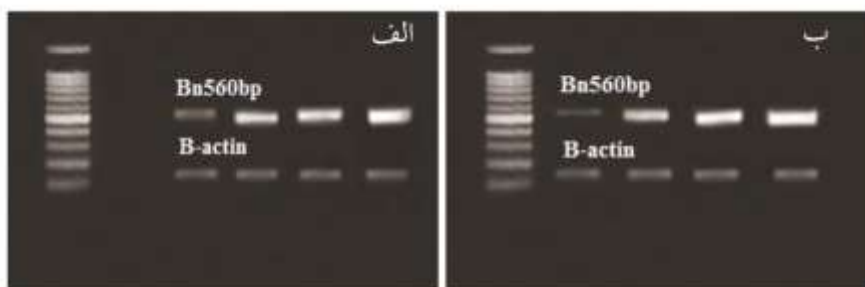
شکل ۵- واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژنهای برنتول سنتاز و بتا اکتین در اثر تیمار سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار، الف) قبل از گلدهی و ب) بعد از گلدهی در گیاه اسطوخودوس.



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

پس از ۷۲ ساعت میزان بیان برنئول سنتاز تحت تاثیر تیمار متیل جاسمونات به مقدار دو برابر بیشتر از شاهد بود. همچنین، در ۷۲ ساعت و ۴۸ ساعت اختلاف معنی داری در سطح 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.

به طور کلی بیان این ژن تحت تاثیر متیل جاسمونات در هر دو مرحله قبل و بعد از گلدهی روندی کاملاً 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 متیل جاسمونات به دست آمد که این میزان نسبت به بیان در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز معنی دار است (شکل ۶ ج). تقریباً همین روند افزایشی برای مرحله بعد از گلدهی نیز مشاهده شد و



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.

بحث و نتیجه گیری

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 می‌دهد. به نظر می‌رسد در مورد فنچول سنتاز در هر دو مرحله قبل و بعد از گلدهی و تحت هر دو تیمار سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات تفاوت چندانی در میزان و روند بیان آن در زمانهای متفاوت دیده نمی‌شود، 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 متیل جاسمونات یکنواخت است.

تا کنون تاثیر محرک های سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر روی ژنهای مختلف درگیر در بیوستنز 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)، اسکوالن سنتاز (SQS) و اسکوالن مونواکسیژناز (SMO) در گیاه شنبلیله در اثر اعمال تیمار سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات نشان داد که متیل جاسمونات در یک دوره زمانی ۴۸ ساعتی موجب القای بیان این ژن‌ها می‌شود (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 بیوستنز مونوترپن‌ها مطالعه شد و نتایج نشان داد این ژنها در مراحل مختلف نموی و تحت تیمار متیل جاسمونات در بافت‌های برگ و گل تغییرات بیان معنی داری را نشان می‌دهند (۸).

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

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 علامت‌رسانی کنترل می‌شوند که توسط هورمون های گیاهی و مولکول‌های علامت‌رسان از جمله سالیسیلیک اسید و اسید جاسمونیک تنظیم می‌شوند (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 می‌باشد. در این مطالعه بیان دو ژن کلیدی (فنچول سنتاز و برنئول سنتاز) مسیر بیوستنز مونوترپنها تحت تاثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در گیاه اسطوخودوس بررسی شد. نتایج بررسی بیان دو ژن فنچول سنتاز و برنئول سنتاز در گیاه اسطوخودوس تحت تاثیر این دو الیستور 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 متیل جاسمونات 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 متیل جاسمونات قبل و بعد از گلدهی در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار افزایش بیان ژن بیشتری مشاهده می‌شود اما

سالیسیلیک اسید می‌تواند در القاء بسیاری از ژنهای مسرتولید متابولیت‌های ثانویه مثل ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها نقش داشته باشد (۱۸)، (۲۳). بررسی الگوی بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در گیاه در مسیر بیوستتزی مونوترپنها در گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa*. L) در اثر تیمار با اسیدسالیسیلیک نشان داد که این ژن دارای تغییرات بیانی است و تحت تیمار اسیدسالیسیلیک القا می‌شود (۱). بررسی میزان بیان ژن بتائین آلدئید 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 اسیدسالیسیلیک 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 دناپی (*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 بیوستتزی 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

موجب القای بیان ژنهای درگیر در مسیر بیوستتزی ترپنوئیدها نظیر ژن های گاما-ترپین 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 چاوایکول O-متیل ترنسفرراز (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 می‌دهد (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 زخم‌ها، حشرات و حمله پاتوژن‌ها نقش دارند (۲۲)، بنا براین این مولکولها در فرآیند القاء و بیان بسیاری از ژنهای مسیر بیوستتزی گیاهان که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند، تاثیر گذار هستند (۲۸). هر چند در گیاهان اثرات جاسمونات‌ها بسته به نوع گونه گیاهی، مرحله نموی و غلظت به کار رفته متفاوت است (۲۰). مطالعات نشان داده است هنگامی که این مولکول‌های علامت‌رسان به صورت خارجی در گیاهان به کار برده می‌شوند به صورت سیستمیک حرکت کرده و منجر به بیان برخی از ژن‌ها می‌شوند که در نهایت ممکن است بیوستتزی 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 اند که

در جهت استفاده در مطالعات وسیع‌تری مورد بهره‌برداری 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 می‌کنند.

منبع مالی پژوهش: دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان.

روند هر دو ژن فنچول سنتاز و برنتول سنتاز افزایشی است. همچنین میزان بیان این ژنها در مرحله قبل از گلدهی بیشتر از مرحله بعد از گلدهی می‌باشد. به علاوه به نظر می‌رسد متیل‌جاسمونات نقش القای بیشتری در افزایشی بیان ژن‌ها را اسطوخودوس داشته باشد. به طور کلی به واسطه القای بیان افزایشی ژنهای فنچول سنتاز و برنتول سنتاز به تیمارهای سالیسیلیک اسید و به ویژه متیل‌جاسمونات می‌توان انتظار داشت که مونوترپن‌های با ارزشی مانند کامفور در گیاه اسطوخودوس افزایش مقدار نشان دهند. به علاوه نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند

منابع

- ۱- الیاسی، ر. مجدی، م. بهرام نژاد، ب. میرزاقادری، ق. ۱۳۹۴. بررسی الگوی بیان ژنهای دخیل در مسیر بیوستزی مونوترپنها و تریتربنها تحت تأثیر تیمار اسیدسالیسیلیک در گیاه دارویی سیاهدانه. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، شماره ۲۳، ص ۱۷۴-۱۶۴.
- ۲- بهزادی راد، م. نقوی م. ر شاه نجات بوشهری، ع. ۱۳۹۵. تأثیر الیستورهای 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 ژن‌های چاوکیول O-متیل ترنسفرز و سینامات ۴-هیدروکسیلاز تحت تأثیر 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 سالیسیسیلیک اسید بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی بادرنجبویه تحت تنش کادمیوم. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی 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 دناپی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) دوره ۳۳، شماره ۱، ص ۱۵۷-۱۴۷.
- ۶- علیرضایی، ف. کیارستمی، خ. ۱۳۹۹. بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی 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 بیوستزی ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها در بافت‌ها، مراحل نمو و تحت تیمار متیل‌جاسمونات در بومادران. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، دوره ۳۳، شماره ۱، ص ۸۷-۱۰۲.
- ۹- فخریمی، ف. مطلبی آذر، ع. زارع نهنیدی، ف. سخندان بشیر، ن. گوهری، غ. ۱۳۹۸. اثر اسید سالیسیلیک بر رونوشت برداری از ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز در سبزی مینی (*Solanum tuberosum* L) رقم آگریا تحت تنش شوری. تنش‌های محیطی در علوم زراعی جلد ۱۳، شماره ۱، ص ۸-۱.
- ۱۰- قبادی، س. معروفی، ا. مجدی، م. ۱۳۹۵. مطالعه بیان ژن‌های کلیدی در بیوستز مونوترپن‌ها در بافت‌های مختلف و در پاسخ به الیستورهای غیرزیستی در گیاه دارویی مرزه تابستانه (*Satureja hotensis*). مجله سلول و بافت، جلد ۷، شماره ۳، ص ۲۹۱-۲۷۵.
- ۱۱- لطفی، م. معروفی، ا. اسماعیلی، ا. دستان، د. بررسی بیان ژنهای کلیدی بیوستز دیوسژنین در گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella*

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 in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and 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 from <http://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 *foenum-graecum* در پاسخ به سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست
- 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

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