

مطالعه بیان ژن‌های کلیدی در بیوستنز مونوترپن‌ها در بافت‌های مختلف و در پاسخ به ایستورهای

غیرزیستی در گیاه دارویی مرزه تابستانه (*Satureja hortensis*)سارا قبادی M.Sc.^۱، اسعد معروفی Ph.D.^{۲*}، محمد مجدی Ph.D.^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲- دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، سنندج، ایران

۳- دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، سنندج، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: a.maroufi@uok.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۸

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق بررسی بیان ژن‌های کلیدی ۱-دی‌اکسی دی‌زایلولز-۵-فسفات ردوکتوایزومراز (*DXR*) و گاماترپین سنتاز (*GTS*) در مسیر بیوستنز تیمول و کارواکرول در گیاه مرزه تابستانه (*Satureja hortensis*) یکی از گیاهان دارویی مهم متعلق به خانواده نعناعیان و از منابع مهم ترکیبات فوق بود.

مواد و روش‌ها: تیمار گیاهان با اسیدسالیسیلیک، متیل جاسمونات و اشعه UV-B انجام گرفت. RNA از گیاهان شاهد و تحت تیمار استخراج شد و سپس cDNA سنتز شد. آغازگرها جهت جداسازی و بیان ژنهای *DXR* و *GTS* طراحی شدند. بیان ژن‌های مورد مطالعه به روش RT-PCR نیمه کمی بررسی شد.

نتایج: قطعاتی از ژن‌های *DXR* و *GTS* توالی یابی شدند. نتایج بررسی بیان ژن در سطح رونوشت نشان داد که هر دو ژن *DXR* و *GTS* در بافت‌های مختلف (ریشه، ساقه، برگ و گل آذین) دارای بیان‌های متفاوتی هستند و در بافت‌های هوایی به‌ویژه گل آذین و برگ دارای بیان بیشتری می‌باشند. همچنین بیان این ژن‌ها تحت تاثیر ایستورهای غیر زیستی شامل اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و اشعه UV-B تغییرات چشم‌گیری نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: تحت شرایط کنترل شده با به‌کارگیری ایستورهای غیر زیستی شامل اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و اشعه UV-B می‌توان بیان ژن‌های *DXR* و *GTS* را بالا برده و احتمالاً تولید متابولیت ثانویه تیمول و کارواکرول را افزایش داد.

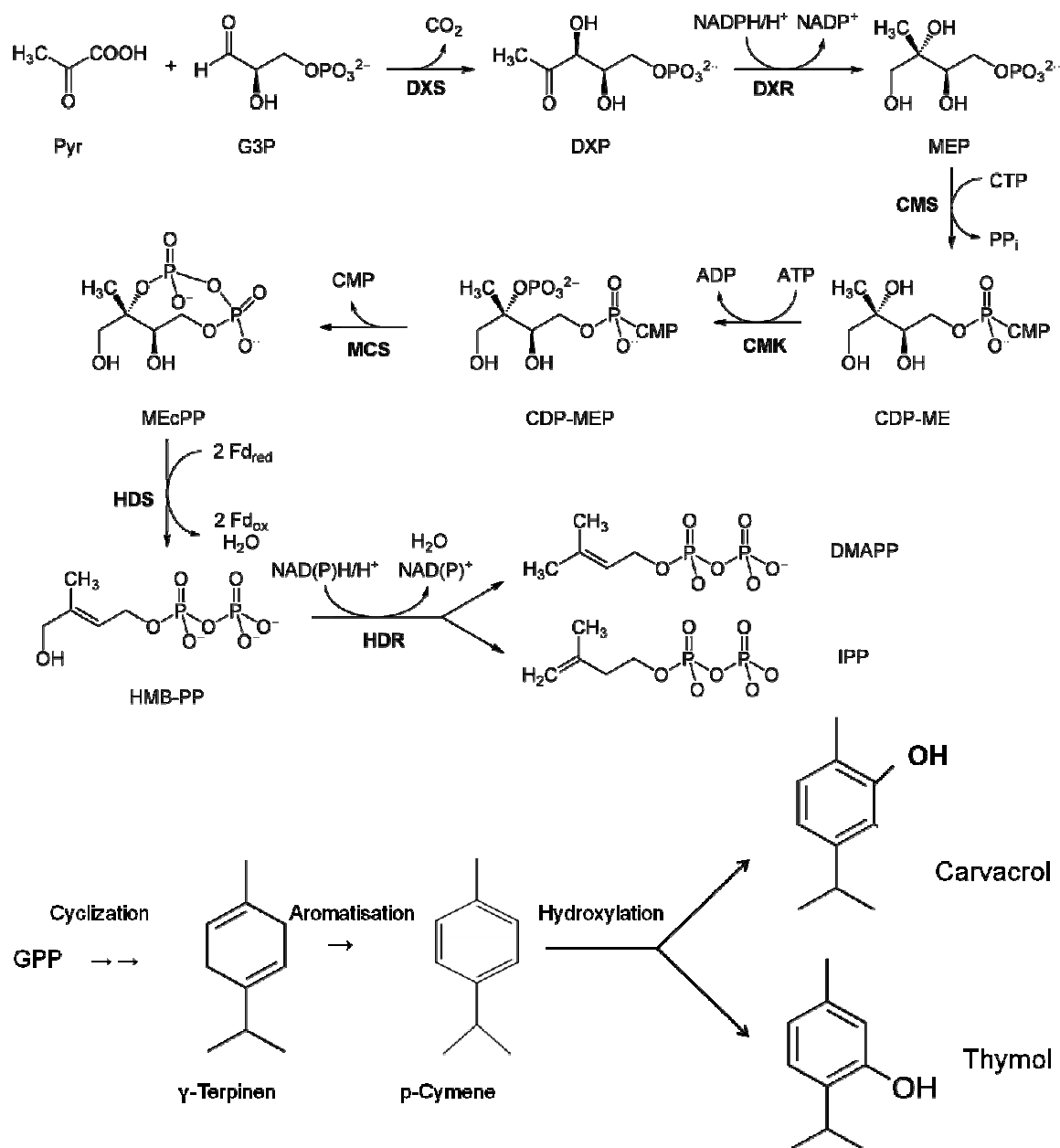
واژگان کلیدی: بیان ژن، تیمول و کارواکرول، مرزه تابستانه، مونوترپن، مهندسی متابولیت

مقدمه

گیاه مرزه تابستانه با نام علمی *Satureja hortensis* یک گیاه معطر و یک ساله، متعلق به خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است. قسمت‌های هوایی مرزه و برخی دیگر از گونه‌های جنس *Satureja* از قدیم به‌عنوان طعم دهنده غذاها و همچنین در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته اند (۱). بررسی‌های فیتوشیمیایی بر روی مرزه آشکار کرده است که مقادیر زیادی ترکیبات مونوترپن فنولیک در اسانس آن وجود دارد (۲). از مهم‌ترین ترکیبات مونوترپنی که در مرزه یافت شده است می‌توان به تیمول (Thymol)، کارواکرول (Carvacrol)، گاماترپنین (γ -terpinen)، پی سایمن (p-Cymene)، آلفاپینین (α -pinene) و بتاپینین (β -pinene) اشاره کرد (۳و۲). مونوترپن‌ها ترکیباتی بی‌رنگ، چربی دوست و فرار هستند که در دفاع در برابر انواع گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زا نقش دارند (۴). تیمول و کارواکرول به‌عنوان اجزای اصلی اسانس مرزه در بیشتر مطالعات معرفی شده اند (۵-۷). تیمول و کارواکرول دارای خواص اکسیداتیو، ضد میکروبی، ضد سرفه، خلط آور، ضد اسپاسم و ضد باکتری و قارچ هستند (۸-۱۱). اثرات ضد میکروبی آن‌ها به دلیل نفوذپذیر نمودن غشای سلول است که می‌توانند با کاتیون‌های سطح غشا کلاته شده و فعالیت‌های حیاتی را مختل کنند (۱۲). همچنین مشخص شده است که این ترکیبات باعث تغییرات در مورفولوژی و تجمع هیف در قارچ‌ها شده و در نتیجه قطر هیف کاهش یافته و باعث تجزیه دیواره می‌شوند (۱۳). بنابراین تیمول و کارواکرول که اجزای اصلی اسانس‌های مرزه می‌باشند به‌عنوان مهارکننده‌ی رشد در برابر باکتری‌ها و قارچ‌های مختلف شناخته شده اند.

به‌طور کلی ترپنوئیدها و از جمله مونوترپن‌ها در گیاهان علاوه بر مسیر موآلونات (mevalonate) که منجر به تولید ایزوپنتیل پیرو فسفات (Isopentenyl pyrophosphate) (IPP) می‌شود از طریق یک مسیر دیگر که مسیر غیر

موآلونات یا مسیر متیل اریتریتول فسفات (2-C-methyl-d-erythritol-4-phosphate) نامیده می‌شود، سنتز می‌شوند (۱۴). مسیر MEP در پلاستیدها اتفاق می‌افتد و شامل هفت واکنش آنزیمی دخیل برای تشکیل ایزوپنتیل دی‌فسفات (Isopentenyl diphosphate) (IPP) و دی‌متیل آلایل دی‌فسفات (Dimethylallyl diphosphate) (DMAPP) از پیرووات (Pyruvate) و دی‌گلیسرآلدئید ۳-فسفات (D-glyceraldehyde 3-phosphate) (GAP) می‌باشد (شکل ۱). واکنشی که توسط آنزیم ۱-دی‌اکسی دی‌زایلولز-۵-فسفات ردوکتوایزومراز (1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase) (DXR) کاتالیز می‌شود یک واکنش مهم است و دارای نقش کلیدی در کنترل بیوسنتز ایزوپرنوئیدها در پلاستیدها است (۱۵-۱۶). بیوسنتز ترپنوئیدها با اتصال سر به دم ایزوپنتیل دی‌فسفات (IPP) به ایزومر دی‌متیل آلایل دی‌فسفات (DMAPP) ادامه می‌یابد که با این اتصال ژرانیل دی‌فسفات (Geranyl diphosphate) (GPP) حاصل می‌شود. علاوه بر این، از اتصال GPP با واحدهای IPP، پرنیل دی‌فسفات‌های (Prenyl diphosphates) بزرگتر مانند فارنسیل دی‌فسفات (Farnesyl diphosphate) (FPP) و ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات (Geranylgeranyl diphosphate) (GGPP) را تشکیل می‌شوند (۱۴). محصول GPP و FPP طی فرآیندهای حلقوی شدن به ترتیب اسکلت‌های مونوترپن و سزکویی‌ترپنی را تشکیل می‌دهند. تشکیل تیمول و کارواکرول با مونوترپن گاماترپنین (γ -terpinen) (GT) شروع شده و در ادامه از طریق پی‌سایمن آروماتیک واکنش‌ها به سمت سنتز آن‌ها پیش می‌رود (۱۷). گاماترپنین که به وسیله آنزیم گاماترپنین سنتاز (γ -terpinen synthase) (GTS) کاتالیز می‌شود، پیش ماده مونوترپن‌های آروماتیک در ادامه مسیر بوده و بنابراین نقشی اساسی را در این مسیر ایفا می‌نماید (۱۸).



شکل ۱: مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول از طریق متیل اریتریتول فسفات (MEP). ۱-دئوکسی گزیلولوز ۵-فسفات سنتاز، ۱-دئوکسی گزیلولوز ۵-فسفات، DXR: ۱-دی‌اکسی دی‌زایلولوز-۵-فسفات ردوکتاز، MEP: متیل اریتریتول فسفات، CMS: ۲-سی متیل دی‌اریترول ۴ فسفات سیتیدیل ترانسفراز، CDP-ME: ۴-دی فسفوسیتیدیل ۲-سی متیل دی‌اریترول، CMK: ۴-دی فسفوسیتیدیل ۲-سی متیل دی‌اریترول کیناز، CDP-MEP: ۴-دی فسفوسیتیدیل ۲-سی متیل دی‌اریترول ۲-فسفات، MCS: ۲-سی-متیل دی‌اریترول ۲-فسفات، HDS: ۲-سی-متیل-دی-اریترول ۲-فسفات سنتاز، MEcPP: ۲-سی-متیل-دی-اریترول ۲-فسفات سنتاز، HMB-PP: ۲-سی-متیل-دی-اریترول ۲-فسفات سنتاز، HDR: ۴-دی-هیدروکسی-۳-متیل-بوت-۲-انیل پیروفسفات سنتاز، DMAPP: دی-متیل آلیل دی-فسفات، IPP: ایزوپنتنیل دی-فسفات، GPP: ژرانیل دی-فسفات.

مطالعات زیادی بر روی این ترکیبات صورت گرفته است. تیمول از مهم‌ترین روغن‌های ضروری در مرزه تابستانی است که خاصیت ضد قارچی و ضد عفونی آن از لحاظ

با توجه به اهمیت تیمول و کارواکرول که دارای خواص بسیار مهمی از جمله آنتی‌اکسیدانت، ضد میکروب و باکتری، ضد سرفه و اسپاسم می‌باشند (۸-۱۱)، تاکنون

گیاهان دارویی از طریق کشت‌های تحت کنترل، هیدروپونیک و کشت‌های سلولی به‌کار رفته‌اند. یکی دیگر از اثرات متقابل گیاهان و محیط در ارتباط با جذب اشعه‌های UV است. متابولیت‌های ثانویه در برابر تابش اشعه‌های UV و به‌ویژه UV-B نقش مهمی دارند و مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تابش اشعه UV-B یک تنظیم‌کننده مهم متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است (۲۵). بنابراین نقش و تاثیر آن بر روی بیان ژن‌ها و تغییرات متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی اطلاعات مناسبی را در راستای افزایش متابولیت‌های ثانویه در اختیار قرار می‌دهد. به‌طور کلی با توجه به اهمیت مرزه به‌عنوان یک گیاه دارویی که دارای ترکیبات مونوترپنوییدی با ارزشی مانند تیمول و کارواکرول است و همچنین نقش ژن‌های *DXR* و *GTS* به‌عنوان ژن‌های کلیدی در بیوسنتز مواد مذکور، تعیین توالی و بررسی میزان بیان آن‌ها تحت ایسیتورهای مختلفی مانند اسیدسالیسیلیک، جاسمونیک اسید و اشعه UV-B مهم به‌نظر می‌رسد. نتایج به‌دست آمده می‌تواند در جهت افزایش و بهره‌برداری تجاری ترکیبات ترپنوییدی تیمول و کارواکرول در مرزه به‌کار گرفته شود.

مواد و روش‌ها

کاشت مرزه و تیمار گیاهان با اسیدسالیسیلیک و جاسمونیک اسید: بذرهای گیاه مرزه از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. گیاهان در شرایط گل‌خانه در دمای حدود ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد پرورش یافتند. اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات به‌ترتیب با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی‌مولار بر روی برگ‌های گیاه مرزه (در مرحله گل‌دهی) و در شرایط رشدی گلخانه محلول پاشی شدند. قبل از اعمال تیمار (صفر) و در ۴، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها از برگ گیاهان نمونه‌گیری انجام شد. همچنین بر روی برگ گیاهان شاهد آب مقطر استریل پاشیده شد و در زمان‌های ذکر شده نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌های گیاهی جهت انجام مراحل بعدی در دمای ۸۰-

علمی ثابت شده است. کارواکرول نیز به‌عنوان افزودنی غذایی به‌دلیل خواص ضد باکتریایی آن استفاده می‌شود. با توجه به افزایش روز افزون مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز عوارض جانبی این داروها و همچنین استفاده رو به رشد نگه‌دارنده‌های شیمیایی غذایی که بسیاری از آن‌ها ممکن است سرطان‌زا باشند، توجه به عصاره و ترکیبات گیاهان دارویی و مواد ضد میکروبی طبیعی که حاوی تیمول و کارواکرول باشند، افزایش یافته است. در حال حاضر تولید تجاری بیشتر متابولیت‌های ثانویه از طریق گیاهان وحشی یا ارقام موجود انجام می‌گیرد اما روش‌های بیوتکنولوژی نیز امروزه در زمینه بررسی و تولید آن‌ها مورد توجه قرار دارند که می‌توان به روش‌های کشت بافت و سلول گیاهی، دست‌کاری‌های ژنتیکی، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت اشاره کرد (۱۹). در روش کشت بافت و سلول گیاهی علاوه بر شناخت چگونگی بیوسنتز متابولیت‌ها و همچنین مکانیسم تنظیمی آن‌ها راه‌کارهای مختلفی را به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌توان به‌کار برد، که از جمله می‌توان استفاده از ایسیتورها، افزودن پیش‌سازها و بهینه‌سازی محیط کشت را نام برد (۲۰). ایسیتورها مواد شیمیایی یا ترکیبات و عوامل زیستی و غیر زیستی متنوعی هستند که می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع برخی ترکیبات ثانویه و فیتوآلکسین‌ها را در گیاهان القا کنند (۲۱). به‌دلیل آن‌که متابولیت‌های ثانویه نقش دفاعی را در گیاهان بر عهده دارند، مقدار آن‌ها در اثر اعمال تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش می‌یابد. نقش اسیدسالیسیلیک در واکنش‌های دفاعی گیاه به‌خوبی نشان داده شده است (۲۲-۲۳). همچنین جاسمونیک‌اسید از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی را در سازوکار دفاعی گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی و به‌خصوص القای ژن‌های دفاعی در مواجهه با عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند (۲۳-۲۴). در نتیجه ایسیتورهایی مانند اسیدسالیسیلیک و متیل‌جاسمونات به‌طور کارآمدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در

درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

(cDNA) از کیت سنتز cDNA شرکت سیناژن طبق دستورالعمل استفاده شد.

تیمار گیاهان با اشعه UV-B: تاثیر UV-B به‌عنوان بخشی از اشعه ماورای بنفش (Ultraviolet) که به زمین می‌رسد، بر بیان ژن در گیاه مرزه مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا در زمان قبل از شروع تابش اشعه UV-B از گیاهان نمونه برگی تهیه شد (ساعت صفر)، سپس بلافاصله تعدادی از گیاهان به مدت ۲۴ ساعت تحت تابش اشعه UV-B زیر هود لامینار و تعدادی تحت تابش نور معمولی قرار داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت از آن گیاهان نمونه برگی تهیه شد.

طراحی آغازگرها و جداسازی ژن‌های مورد مطالعه: از آن‌جا که ژن‌های *GTS* و *DXR* تاکنون در جنس *Satureja* و خصوصاً گونه مرزه تابستانه توالی‌یابی نشده‌اند، برای تعیین توالی بخشی از آن‌ها ابتدا توالی این ژن‌ها در گیاهان هم‌خانواده مرزه از سایت NCBI دریافت شد و هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW (۲۶) انجام گرفت. براساس نواحی حفاظت شده این توالی‌ها و با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (۲۷) آغازگرها طراحی شدند. نهایتاً پس از جداسازی و تعیین توالی قسمت‌هایی از ژن‌های *GTS* و *DXR*، آغازگرهای اختصاصی جهت بررسی بیان این ژن‌ها در مرزه تابستانه طراحی شد (جدول ۱). با استفاده از نرم‌افزار Oligo calculator دایمر و مشخصات ترمودینامیکی پرایمرها بررسی شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: RNA از بافت‌های ریشه، ساقه، برگ و گل آذین گیاهان مورد مطالعه در مرحله گلدهی با روش تک مرحله‌ای مبتنی بر محلول تریزول (Trizol) استخراج شد. به این صورت که به ازای ۰/۱ گرم از بافت تازه، ۱ میلی‌لیتر تریزول اضافه شد و پس از طی مراحل کامل استخراج، در نهایت ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با دیس (DEPC) به رسوب به‌دست آمده اضافه شد. به‌منظور به‌دست آوردن RNA خالص و عاری از DNA، نمونه‌های RNA جدا شده با استفاده از آنزیم DNase1 شرکت فرمنتاز (Fermentase) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تیمار شدند. کیفیت RNA بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد تعیین و غلظت با دستگاه نانو دراپ (NanoDrop1000spectrophotometer) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مشخص شد. برای ساخت DNA مکمل

RT-PCR نیمه کمی: جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌های *GTS* و *DXR* به روش RT-PCR نیمه کمی از ژن عامل افزایش ۱ آلفا (Elongation factor 1 alpha) (EF1 α) (۲۸) به‌عنوان کنترل داخلی (ژن رفرنس) استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی به‌کار رفته در جدول ۱ ارائه شده است. همسان‌سازی غلظت‌های cDNA جهت هماهنگ سازی کلیه واکنش‌ها انجام گرفت. نسبت‌های مواد به‌کار رفته و چرخه‌های حرارتی در جدول ۲ و جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۱: مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی بیان ژن

اندازه قطعه	دمای اتصال	توالی آغازگر (۳ → ۵)	نام آغازگر
۷۰۰ جفت باز	۶۱/۲ درجه سانتی‌گراد	GCCTTTTGCCTTCCTCTTG	F-DXR
	۶۱/۶ درجه سانتی‌گراد	TCCGCTCGATGCTTGTCGC	R-DXR
۳۰۰ جفت باز	۵۱/۹ درجه سانتی‌گراد	CTCTTGGATTCAGACTCCTCAG	F-GTS
	۵۰/۹ درجه سانتی‌گراد	GAGGGAGAGCCAAAGAATG	R-GTS
۵۰۰ جفت باز	۵۶/۷ درجه سانتی‌گراد	AACCTCGACTGGTACAAGGGC	F-EF1 α
	۵۶/۲ درجه سانتی‌گراد	GGCTCCTTCTCCAGCTCCTT	R-EF1 α

F آغازگر مستقیم، R آغازگر معکوس

جدول ۲: نوع و غلظت مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR

مواد	غلظت در محلول پایه	حجم استفاده شده
cDNA	-	۱ میکرولیتر
آغازگر مستقیم یا معکوس	۵ pmol/ μ l	هر کدام میکرولیتر
آنزیم تک DNA پلی‌مراز	۱۰ u/ μ l	۰/۱ میکرولیتر
کلرید منیزیم	۵۰ mM	۰/۳ میکرولیتر
بافر PCR	۱۰ X	میکرولیتر
dNTP	۱۰ mM	۰/۲ میکرولیتر
آب	-	۵/۴ میکرولیتر
کل	-	۱۰ میکرولیتر

جدول ۳: چرخه حرارتی واکنش RT-PCR نیمه کمی

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما ($^{\circ}$ C)
۱	واسرشت اولیه	۴ (دقیقه)	۹۴
۲۸	واسرشت	۳۰ (ثانیه)	۹۴
	اتصال	۳۰ (ثانیه)	*
	بسط	** (ثانیه)	۷۲
۱	بسط نهایی	۷ (دقیقه)	۷۲

*بسته به نوع ژن (جدول ۱)، ** بسته به طول ژن (۶۰ ثانیه هر کیلو باز)

نتایج

تعیین توالی ژن‌های *GTS* و *DXR* و ارزیابی آن‌ها

با توجه به اینکه قطعات تکثیر شده که دارای سایزهای پیش‌بینی شده هستند، اولین مرحله از صحیح بودن همسانه‌سازی ژن‌ها می‌باشند، جهت اطمینان از صحت ژن‌های مورد مطالعه، محصولات تکثیر شده تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی در شکل‌های ۲ و ۳ ارائه شده است.

کمی کردن *RT-PCR* و *آنالیز داده‌ها*: عکس‌های مربوط به ژل (حاصل از RT-PCR نیمه کمی) با استفاده از نرم‌افزار GelQuantNET به داده‌های کمی و عددی تبدیل شدند. آنالیز واریانس داده‌ها براساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($p < 0.05$) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. نمودارهای مناسب جهت تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها توسط نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 رسم شد.

TGTCACCCCGATGCCAGATCCTTAGTCAGACCATGGTAAAAATCCCAAACCTTGGGCGTCCGGA
 TCTAGACCAAATGGCGAGGTGCGTTCCTACCATCGCCTCCGGCCTATCTGTGCCGCGCTCA
 TACACTGCAAGTGAAGAAGAAACCCGACGCTCCGGAACCTACCAGGCTCCCATTGGAAAC
 AACGGTTACATTCAATCTCTGCAGACTTTTGAATAAGGACGAGAAGGACTTGAATAGG
 AAAGAAGAGTTGATTGCGCAAGTGAAGATAATATTGAGTGAAGAAAAAGGGAGGCTGTAA
 ACAGTTGGAGTTGATCGATGACTTGAAGAATCTTGGATTGACTTATTATTTAAAGAAGA
 GATTAAGAAGATTCTAACTTCTATATATAATGAGCACAAGGGTTTCCAAAGTGGTCAAGT
 AGGGGATTTGTACTTCACATCTCTTGGATTTCAGACTCCTCAGATTGCATGGTTTTAATGT
 TTCACCAGATGTGTTAATTGTTTCAAGAACGAAGACGGAAGTGAATTTCAAGGCAAGCCT
 TGGCGAAGACACGAAACAAGTATTGGAATTTTACGAAGCATCTTGCCTCATCGGAGGAAG
 TGAAGATATACTTGCAGTAGCCAGAGTGGTTTCCACCAAACCTTCTGCACAAGAAAGTTGA
 TGAGGGAATCAAAGATCATAATCTATTGTTCATGGATTTCGCCATTCTTTGGCTCTCCCTCT
 TCATTGGAGGATCCAAAGGCTAGAGGCGAGATGGTTCTTAGACGCTTACGCCGCGAGGAA
 AGACATGAATCCCATCATTTTTCGAGCTTGGAAAACCTCGACTTCAGTATCATTCAAGCAGT
 ACAGCTAGAAGAAATCAAAGAGGTCTCAAGCTGGTGGGCTAAAACCAACCATGGCCGAGA
 ACTCCCCTTCGTGAGAGATAGAATGTGGAGTGTACTTTTGGGCGCTTGGGCTCTTCGA
 GCCACATGAATATGGATACCAGAGAATAATGGCTGCCATTATCATCACTTTCTGTTACGAT
 TATAGACGATGCTTACGACGTCTACGGTACATTAGACGAGCTGCAGCTGTTACAGACGC
 TGTCAAAAGATGGGACTTTGAATCAATAGGCACACTTCCCTTATTACATGCAAGTTTGCTA
 TTTGGCACTCTACACCTATGCTTCTGAGTTGGCTTATGATATCTCAAAGATCAAGGTTT
 CAACAGCATCGCATATCTTCAAAGATCGTGGCTAAGTTTGGTTGAAGGGTTTTCCAAAGA
 GGCAAAATGGTCTACGCGGGTTACACGCCAACCTAGCAGAAATTTAGAGAATGCCAA
 AGTTTCAATATCTCTCCTACAATATATCCCAAGTTTACTTCACGCTTCCGAATTTCGAC
 CGAGAGAACCGTTTTCGAAAATGTGTTGGGATAACCACAACATACTTTACCTCTCCGGAAT
 GATCCTGAGGCTCGCTGACGATCTTGGTACAACCTCAGTTTGAAGTGAAGAGAGGGGCGGT
 GCAAAAGGCAATCCAGTGTACATGAACGACAACAATGCTACGGAGGAAGAGGGGCGGA
 GCACGTGAGGTATCTGTTGAGAGAGGCGTGAAGGAGATGAACACGGCCATGGCCGACCC
 CGAATGCCCATGTCCGGAGGATTTGATCGATGCTGCTGCTAATCTGGTAAGAGCTTCGCC
 AGTTTCAATTTATCGGAAAGGAGATGGCCATGGCGTCCAGCACTC

شکل ۲: توالی به‌دست آمده برای ژن گاماتریپین‌سنتاز در گیاه مرزه (*Satureja hortensis*).

CATTGCTTTGGCCAATAAAGAGACACTAATCGCTGGAGGGCCTTTTGTCTTCCTCTTGC
 AAAGAAGCACACGTCAGATTCTTCTGCGACTCCGAACATTCCGCTATATTTTCAGTG
 TATCCAAGGCTTGCCAGAAGGTGCTTTGAGGGCTATAATTTTGAAGTGCATCGGAGGTGCT
 TTCAGGGATTTGCCGTTGAGAAAATTGAAAGAAGTGAAGTAGCAGATGCTTTAAAGCAT
 CCTAACTGGAACATGGGGAAAAAATCACAGTGGACTCTGCAACTCTCTTTAACAGGGT
 CTGGAAGTTATAGAAGCTCACTATTTGTTTGGGGCAGAATATGATGATATTGAGATTGTC
 ATCCATCCCCAATCCATCATACTCGATGGTCCGAAACACAGGATTCGTCAGTGTAGCT
 CAATTAGGATGGCCTGATATGCGTTTGCCTATTCTGTACACCTTATCATGGCCGGAGAGA
 ATCTACTGCTCTGAGATTACATGGCCTCGACTCGACCTCTGCAATGTCGATTTAACATTC
 AAGAAGCCCGATAATGTGAAATACCCATCTATGGATCTAGCGTACGCTGCTGGAAGAGCC
 GGAGGCACCATGACCGGAGTTCTGAGTGCAGCTAATGAGAAAGCAGTCCGAAATGTTTCATC
 GATGAGAAGATCGGGTACCTCGACATCTTCAAGGTCGTGGAGCTTACATGCCACAAGCAC
 CGATCGGAA

شکل ۳: توالی به‌دست آمده برای ژن DXR در گیاه مرزه (*Satureja hortensis*).

هستند. نتایج حاصل از بلاست و سایر اطلاعات مربوط به آن در جدول ۴ و جدول ۵ ارائه شده است. هم‌ردیفی ناحیه تعیین توالی شده ژن‌های *GTS* و *DXR* در گیاه مرزه با همین نواحی در سایر گیاهان هم‌خانواده آن‌ها نشان داد که این ژن‌ها بسیار مشابه و حفاظت شده هستند. این نتایج

جهت تایید نهایی توالی‌های به‌دست آمده برای ژن‌های مورد نظر این توالی‌ها در پایگاه داده‌ای NCBI بلاست (Blast x) شدند. با توجه به e-value و درصد یکسانی توالی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده، مشخص شد که توالی‌های به‌دست آمده مربوط به ژن‌های *GTS* و *DXR*

نشان می‌دهد که توالی‌های معرفی شده به احتمال زیاد (با توجه به e-value) متعلق به ژن‌های *GTS* و *DXR* باشند.

جدول ۴: بخشی از نتایج بلاست ناحیه توالی‌یابی شده ژن *GTS* در مرزه

gene (species)	e-value	Identity	accession number
putative gamma-terpinene synthase (<i>Thymus serpyllum</i>)	0.0	87%	AGT29345.1
putative gamma-terpinene synthase (<i>Origanum syriacum</i>)	0.0	86%	AEO27879.1
putative gamma-terpinene synthase (<i>Thymus vulgaris</i>)	0.0	86%	AFZ41788.1
putative monoterpene synthase (<i>Origanum majorana</i>)	0.0	86%	AGZ58667.1
Gamma-terpinene synthase, chloroplastic (<i>Origanum vulgare</i>)	0.0	86%	E2E2P0.1
gamma-terpinene (<i>Thymus caespitius</i>)	0.0	86%	AGK88254.1
gamma-terpinene synthase (<i>Thymus caespitius</i>)	0.0	86%	AGK88253.1
terpene synthase 2 (<i>Thymus vulgaris</i>)	0.0	86%	AGS42395.1
terpene synthase 2 (<i>Origanum vulgare</i>)	0.0	85%	ADK73620.1
putative gamma-terpinene synthase (<i>Thymus x citriodorus</i>)	0.0	85%	AGT29347.1
terpene synthase 5 (<i>Origanum vulgare</i>)	0.0	78%	ADK73617.1
sabinene synthase (<i>Salvia pomifera</i>)	0.0	67%	ABH07678.1
pinene synthase (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	0.0	66%	ABP01684.1
linalool synthase (<i>Perilla frutescens</i>)	0.0	64%	ACN42009.1
alpha-terpineol (<i>Thymus caespitius</i>)	0.0	64%	AGK88259.1

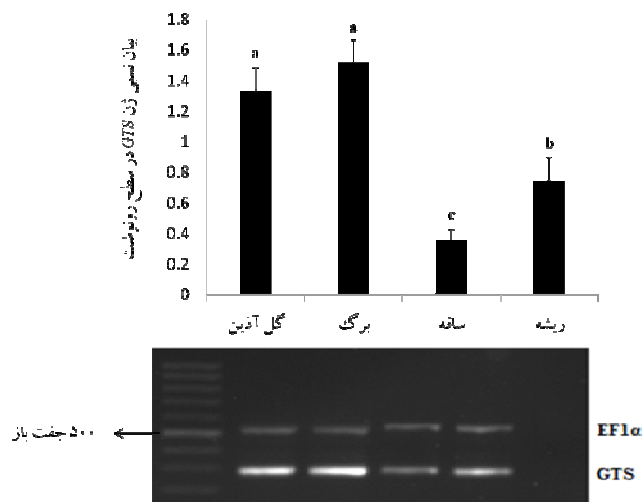
جدول ۵: بخشی از نتایج بلاست ناحیه توالی‌یابی شده ژن *DXR* در مرزه

gene (species)	e-value	identity	accession number
(<i>Mentha x piperita</i>) deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	3e-175	99%	Q9XES0.2
1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (<i>Salvia miltiorrhiza</i>)	2e-174	99%	ACK57535.1
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (<i>Lavandula angustifolia</i>)	3e-168	95%	AGQ04155.1
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (<i>Aquilaria sinensis</i>)	5e-167	95%	AHZ96598.1
chloroplast 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductase (<i>Eucommia ulmoides</i>)	7e-167	95%	AFU93070.1
1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	3e-166	94%	CAB43344.1
hypothetical protein MIMGU_mgv1a004650mg (<i>Mimulus guttatus</i>)	8e-167	95%	EYU42569.1
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, chloroplastic-like (<i>Camelina sativa</i>)	6e-166	94%	XP_010459323.1
putative 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (<i>Betula platyphylla</i>)	9e-166	93%	AHX36947.1
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, chloroplastic (<i>Cucumis melo</i>)	1e-165	94%	XP_008464564.1
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, chloroplastic (<i>Cleome hassleriana</i>)	2e-165	94%	XP_010546027.1
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (<i>Actinidia arguta</i>)	3e-165	94%	AID55340.1
PREDICTED: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (<i>Brassica rapa</i>)	4e-165	94%	XP_011071850.1
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (<i>Antirrhinum majus</i>)	4e-165	93%	AAW28998.1
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (<i>Plectranthus barbatus</i>)	9e-165	94%	AAR99081.1

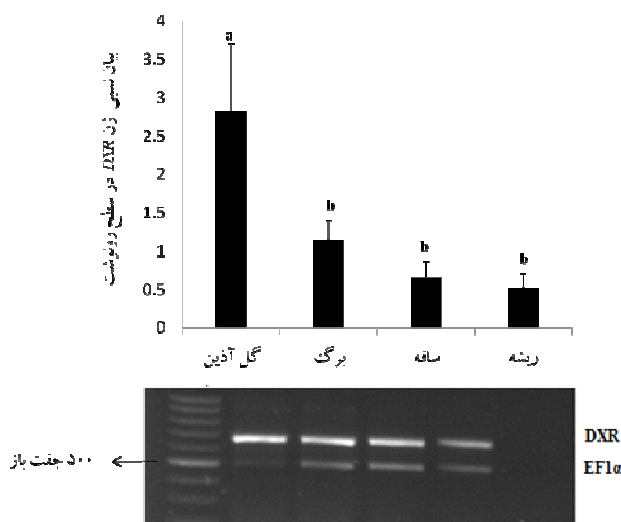
بیان ژن‌های *GTS* و *DXR* در بافت‌های مختلف مرزه

سپس ساقه (۰/۴) می‌باشد (شکل ۴). همچنین RT-PCR نیمه کمی برای ژن *DXR* و ژن رفرنس *EF1α* در بافت‌های مختلف انجام شد. نتایج به دست آمده برای این ژن نیز نشان می‌دهد که بیشترین میزان بیان *DXR* به ترتیب در بافت‌های گل‌آذین (۲/۸) و برگ (۱/۲) و کمترین میزان بیان مربوط به بافت ساقه (۰/۷) و سپس ریشه (۰/۵) می‌باشد (شکل ۵).

جهت بررسی بیان ژن در شرایط نرمال در گل‌خانه ابتدا از بافت‌های ریشه، ساقه، برگ و گل آذین نمونه‌گیری و سپس استخراج RNA با موفقیت انجام شد. RT-PCR نیمه کمی برای ژن *GTS* و ژن رفرنس *EF1α* در بافت‌های مختلف انجام شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که بیشترین میزان بیان به ترتیب در بافت‌های برگ (۱/۶) و گل‌آذین (۱/۴) و کمترین میزان بیان مربوط به بافت ریشه (۰/۸) و



شکل ۴: نمودار نسبی بیان ژن *GTS* در چهار بافت مختلف گیاه مرزه (بالا)، RT-PCR نیمه کمی برای ژن هدف *GTS* و ژن کنترل *EF1α* داخلی (پایین)، باند حدود ۵۰۰ جفت باز مربوط به ژن کنترل داخلی *EF1α* و باند حدود ۳۰۰ جفت باز مربوط به ژن *GTS* می‌باشد.

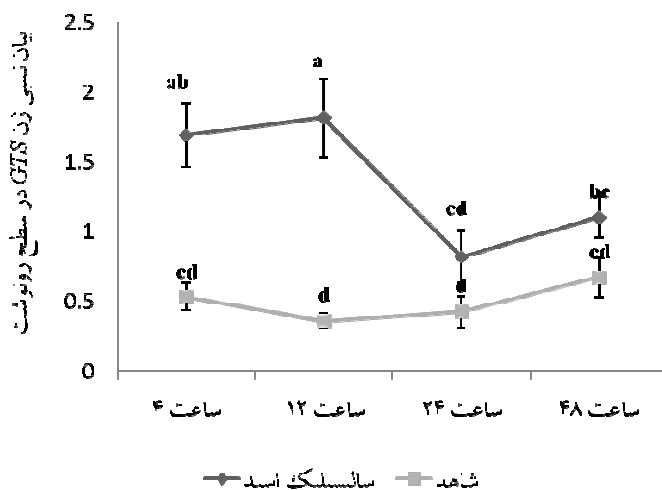


شکل ۵: نمودار نسبی بیان ژن *DXR* در چهار بافت مختلف گیاه مرزه (بالا)، RT-PCR نیمه کمی برای ژن هدف *DXR* و ژن کنترل *EF1α* داخلی (پایین)، باند حدود ۵۰۰ جفت باز مربوط به ژن کنترل داخلی *EF1α* و باند حدود ۷۰۰ جفت باز مربوط به ژن *DXR* می‌باشد.

به‌طوری‌که تا ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد افزایش بیان مشاهده می‌شود و بعد از ۲۴ ساعت میزان بیان کاهش می‌یابد تا در نهایت پس از ۴۸ ساعت میزان بیان به سطح گیاهان شاهد نزدیک می‌شود و تقریباً در همان سطح ۲۴ ساعت قرار می‌گیرد (شکل ۶). اما در گیاهان شاهد (عدم اعمال تیمار) تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان بیان ژن *GTS* مشاهده نمی‌شود (شکل ۶).

بیان ژن‌های *GTS* و *DXR* در برگ تحت تاثیر اسید سالیسیلیک

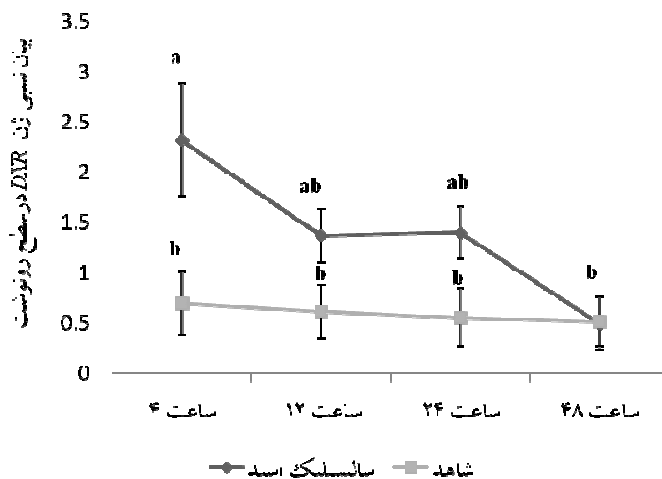
اثر اسید سالیسیلیک با غلظت ۱ میلی‌مولار بر روی میزان بیان ژن گاماترپین سنتاز در برگ‌ها و در زمان‌های متفاوت پس از اعمال تیمار بررسی شد. نتایج نشان داد که در گیاهان تحت تیمار و گیاهان شاهد (تیمار نشده) بیان ژن *GTS* دارای تغییرات معنی‌داری در سطح ۵ درصد است.



شکل ۶: نمودار الگوی بیان نسبی ژن *GTS* در زمان‌های متفاوت پس از اعمال تیمار با اسیدسالیسیلیک در برگ گیاه مرزه. حروف یکسان بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

بیان این ژن به سطح گیاهان تیمار نشده می‌رسد (شکل ۷). به‌طور کلی پس از چهار ساعت از اعمال تیمار بین گیاهان تیمار شده با تیمار نشده اختلاف قابل توجهی وجود ندارد.

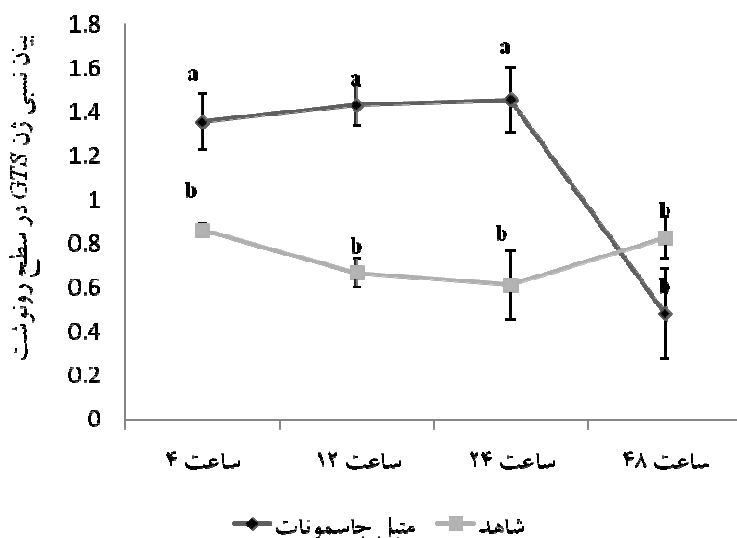
همچنین بررسی میزان بیان ژن *DXR* در برگ‌ها در اثر تیمار با اسیدسالیسیلیک با غلظت ۱ میلی‌مولار نشان داد که در گیاهان تیمار شده پس از چهار ساعت افزایش بیان مشاهده می‌شود (شکل ۷) و بعد از آن بیان *DXR* کاهش می‌یابد به‌طوری‌که پس از ۴۸ ساعت از اعمال تیمار سطح



شکل ۷: نمودار الگوی بیان نسبی ژن *DXR* در زمان‌های متفاوت پس از اعمال تیمار با اسید سالیسیلیک در برگ گیاه مرزه. حروف یکسان بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

GTS افزایش بیان معنی‌داری نشان می‌دهد و سپس بعد از ۴۸ ساعت از میزان بیان ژن کاسته شده به‌طوری‌که میزان آن تا سطح گیاهان تیمار نشده پایین می‌آید (شکل ۸). اما در گیاهان تیمار نشده تفاوت معنی‌داری در سطح بیان ژن گاماتریپین سنتاز مشاهده نمی‌شود (شکل ۸).

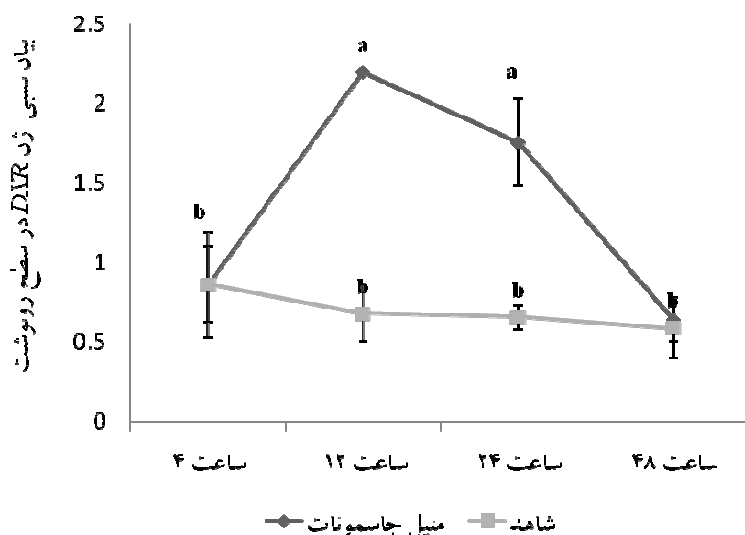
بیان ژن‌های *GTS* و *DXR* در برگ تحت تاثیر متیل جاسمونات بیان ژن *GTS* در گیاهان تحت تیمار با متیل جاسمونات با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نیز بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که بیان این ژن تحت تاثیر متیل جاسمونات قرار می‌گیرد، به‌طوری‌که تا ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار ژن



شکل ۸: نمودار الگوی بیان نسبی ژن *GTS* در زمان‌های متفاوت پس از اعمال تیمار با متیل جاسمونات در برگ گیاهان مرزه تحت تیمار و کنترل. حروف یکسان بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

بالاترین سطح خود می‌رسد و سپس میزان بیان به تدریج کاهش یافته و در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار به سطح میزان آن در گیاهان تیمار نشده نزدیک می‌شود (شکل ۹)، اما در گیاهان تیمار نشده اختلاف معنی‌داری در سطح بیان ژن *DXR* در زمان‌های متفاوت مشاهده نمی‌شود.

همچنین اثر تیمار با متیل جاسمونات روی میزان بیان ژن *DXR* در شکل ۹ نشان داده شده است. نتایج این بررسی نشان داد که بیان *DXR* در اثر اعمال تیمار متیل جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار دارای تغییرات است، به طوری که در ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار میزان بیان ژن *DXR* به

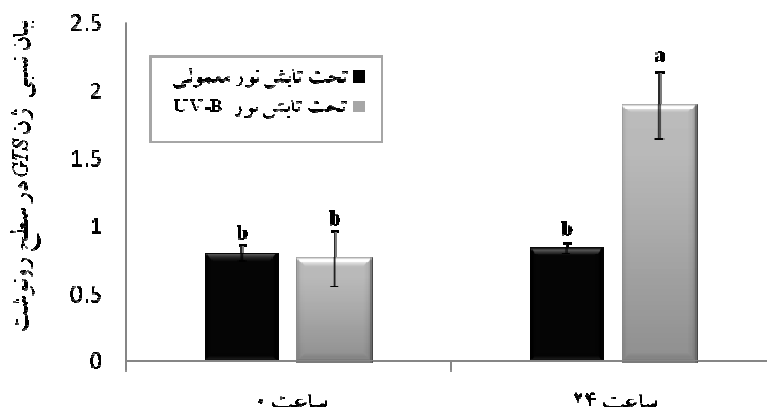


شکل ۹: نمودار الگوی بیان نسبی ژن *DXR* در زمان‌های متفاوت پس از اعمال تیمار با متیل جاسمونات در برگ گیاهان تیمار شده و گیاهان کنترل. حروف یکسان بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

بیان ژن‌های *GTS* و *DXR* تحت اشعه UV-B

بیان ژن مذکور ۲۴ ساعت بعد از اعمال تابش اشعه تحت تاثیر قرار می‌گیرد. در گیاهان کنترل (هم قبل از اعمال تابش اشعه UV-B وهم ۲۴ ساعت در معرض نور معمولی) یک روند یکنواخت در میزان بیان ژن *GTS* وجود داشت و تفاوت معنی‌داری در سطح بیان ژن در این گیاهان مشاهده نشد (شکل ۱۰).

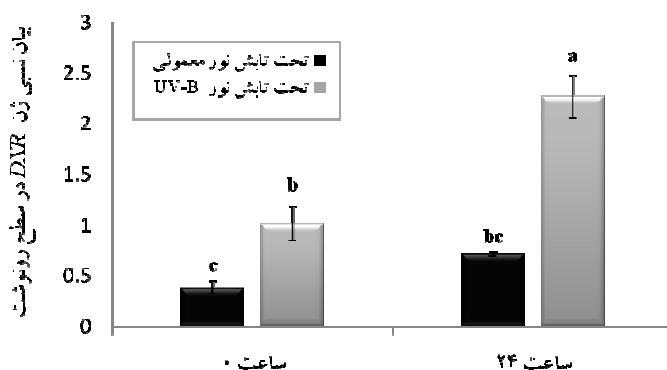
آنالیز داده‌های حاصل از RT-PCR نیمه کمی نشان داد که ژن *GTS* در گیاه مرزه تحت تابش اشعه UV-B پس از ۲۴ ساعت نسبت به گیاهان کنترل در ساعت صفر و نیز گیاهان کنترل در معرض ۲۴ ساعت نور معمولی افزایش بیان نشان می‌دهد (شکل ۱۰). بنابراین می‌توان گفت که



شکل ۱۰: نمودار الگوی بیان نسبی ژن *GTS* در برگ گیاه مرزه در زمان‌های ۰ (شاهد) و پس از اعمال تیمار با اشعه UV-B. حروف یکسان بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

نسبت به گیاهان کنترل (ساعت صفر) و همچنین گیاهان تحت تابش نور معمولی پس از ۲۴ ساعت، تحت تاثیر قرار گرفته و افزایش معنی‌داری یافته است (شکل ۱۱).

همچنین در بررسی بیان *DXR* در برگ گیاه مرزه تحت تیمار اشعه UV-B، نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیان این ژن در گیاهان تحت UV-B پس از ۲۴ ساعت



شکل ۱۱: نمودار الگوی بیان نسبی ژن *DXR* در برگ گیاه مرزه در زمان‌های ۰ (شاهد) و پس از اعمال تیمار با اشعه UV-B. حروف یکسان بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

هست که در صنایع غذایی و دارویی کاربرد ویژه ای دارند. بنابراین تقاضا برای این ترکیبات رو به افزایش است، اما

بحث
مرزه یک گیاه دارویی با ارزش است که دارای ترکیبات مهمی به نام مونوترپن‌ها، گروهی از متابولیت‌های ثانویه،

گونه‌های نعناع و مریم‌گلی از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است. بنابراین نتایج نشان می‌دهد که مشابهت بالایی بین توالی‌های پپتیدی ژن‌های هدف (*DXR* و *GTS*) در مرزه با توالی‌های ثبت شده در NCBI به‌ویژه برای گیاهان متعلق به خانواده نعنائیان (Lamiaceae) وجود دارد که به احتمال زیاد صحت توالی‌های به‌دست آمده را تایید می‌کند.

در بررسی بیان نسبی ژن در مرزه، میزان بیان ژن *GTS* در بافت برگ بیشتر از سایر بافت‌ها بود که این امر می‌تواند تایید کننده نقش مهم این ژن در بیوسنتز مونوترپن‌ها در برگ و احتمالاً کرک‌های غده‌ای باشد. زیرا مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که اکثر گیاهان خانواده نعنائیان دارای اسانس ترش‌چی در کرک‌های غده‌ای موجود بر روی اندام‌های رویشی و زایشی هوایی هستند (۳۳). در مطالعات انجام شده روی مرزه گونه *Satureja horvatii* نیز نشان داده شد که برگ‌ها دارای کرک‌های غده‌ای هستند که محل سنتز مونوترپن‌ها می‌باشند (۳۴). همچنین در بررسی بیان ژن *DXR* میزان بیان بالایی در بافت‌های گل‌آذین و برگ‌ها نسبت به بافت‌های ریشه و ساقه مشاهده شد که بیانگر تایید محل بیوسنتز مونوترپن‌ها در این اندام‌های هوایی است. در هماهنگی با این پژوهش، مطالعه‌ای روی بیان ژن *DXR* در گیاه آراییدوپسیس انجام شده که نشان‌دهنده وجود بالاترین میزان بیان در بافت گل‌آذین و پایین‌ترین میزان بیان در بافت ساقه می‌باشد (۳۵). همچنین در گیاه جینسنگ هندی (*Withania somnifera*) نشان داده شد که میزان بیان ژن *DXR* در بافت برگ نسبت به بافت ریشه خیلی بیشتر است (۳۶)، این امر می‌تواند به‌دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه در پلاستیدهای مستقر در برگ‌ها باشد که به‌میزان بالای بیان *DXR* نیاز هست و از آن‌جا که بافت ریشه عاری از این ترکیبات است، بنابراین بیان ژن *DXR* در بافت ریشه از سایر بافت‌ها بسیار پایین‌تر می‌باشد (۳۶).

اطلاعات در مورد بیان ژن‌های کلیدی موثر در مسیر

به‌دلیل محدودیت‌هایی از جمله شرایط آب و هوایی، خاک و تغییرات سطح کشت، که می‌توانند در محتوی، میزان پایین ترکیبات ثانویه و یا کاهش برداشت گیاهان مرزه موثر باشند، نیازمند به‌کارگیری راه‌کارهای متفاوتی جهت افزایش تولید آن‌ها هستیم. روش‌های متعددی از جمله کشت سلول و بافت، کشت ریشه‌های مویین، مهندسی ژنتیک و افزایش بیان ژن در مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه، جهت افزایش تولید آن‌ها معرفی شده است (۲۹-۳۲). دست‌ورزی ژنتیکی در راستای افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهی یکی از روش‌های مهم و کاربردی در عصر جدید است که در این زمینه شناسایی و دست‌کاری ژنتیکی ژن‌های موثر در سنتز متابولیت‌های ثانویه مانند مونوترپن‌ها دارای ارزش زیادی است. بنابراین اولین گام جهت به‌کارگیری روش مهندسی ژنتیک و افزایش بیان ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی، توالی یابی و مطالعه بیان ژن‌ها به‌ویژه ژن‌های کلیدی می‌باشد. در این راستا در گیاه مرزه توالی‌های بخشی از ژن‌های *DXR* و *GTS* شناسایی و بیان آن‌ها در بافت‌ها و تحت تاثیر دو الیسیاتور مهم شیمیایی اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات و همچنین اشعه UV-B به‌عنوان یکی از اجزای پراثری‌اشعه ماورای بنفش نور خورشیدی بررسی شد.

در این پژوهش برای دست یافتن به اهداف فوق، ابتدا با استفاده از توالی‌های مربوط به ژن‌های گام‌ترپین‌سنتز و *DXR* در گیاهان خویشاوند و نزدیک به مرزه، جفت آغازگرهایی در جهت مستقیم و معکوس جهت جداسازی این ژن‌ها طراحی شد و سایر مراحل تا تعیین توالی محصولات به‌دست آمده با موفقیت انجام گرفت. مقایسه توالی اسیدآمین به‌دست آمده برای ژن *GTS* با سایر گیاهان، نشان‌دهنده بیشترین درجه یکسانی (۸۷ درصد) با گیاهان متعلق به جنس *Withania* و پونه از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) می‌باشد. مقایسه توالی اسیدآمین‌های به‌دست آمده از ژن *DXR* نیز با توالی پروتئینی آن در سایر گیاهان نشان‌دهنده وجود درجه یکسانی بالاتر از ۹۰ درصد با

متابولیت‌های ثانویه و چگونگی تنظیم بیان آن‌ها می‌تواند در راستای افزایش سطح آنزیم‌های کد شونده به‌وسیله این ژن‌ها و نهایتاً افزایش متابولیت ثانویه به‌کار گرفته شود. بدین‌منظور بیان دو ژن *GTS* و *DXR* تحت تاثیر دو الیسیاتور شیمیایی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات و همچنین اشعه UV-B به‌عنوان اشعه غالب در زمین که همیشه گیاهان در معرض آن قرار دارند، بررسی شد. اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات نقش مهمی را در واکنش‌های دفاعی گیاه ایفا می‌کنند که افزایش مقدار آن‌ها منجر به تولید پیام‌هایی در گیاهان می‌شوند که در نهایت بیان گروه‌های خاصی از ژن‌ها به‌ویژه ژن‌های دفاعی افزایش می‌یابد (۲۱ و ۳۷). در این پژوهش هر دو ژن *GTS* و *DXR* در ابتدای اعمال تیمار اسیدسالیسیلیک (۴ ساعت پس از تیمار گیاهان) افزایش بیان و سپس روند کاهش نشان دادند. با توجه به ارتباط مستقیم بین متابولیت‌های ثانویه (مانند مونوترپن) و بیان ژن‌های کلیدی (مانند *GTS* و *DXR*)، به‌نظر می‌رسد که زمان مناسب اعمال تیمار در جهت افزایش مونوترپن در گیاه مرزه ابتدای اعمال تیمار با اسیدسالیسیلیک باشد. بنابراین تاثیر تیمارهای کوتاه مدت در راستای افزایش مونوترپن‌ها مفیدتر خواهد بود. در مطالعه ای که تاثیر تیمار اسیدسالیسیلیک بر گیاه جینسنگ هندی بررسی شد، بیان ژن *DXR* در ۶ ساعت پس از اعمال تیمار افزایش یافت و متعاقباً کاهش نشان داد (۳۶)، که این نتایج تقریباً مشابه با یافته‌های این تحقیق می‌باشد. پنولاس و همکاران (۳۸) نیز نشان دادند که متیل سالیسیلات، از مشتقات اسیدسالیسیلیک، نرخ انتشار مونوترپن در گیاه چوبی بلوط همیشه سبز (*Quercus ilex*) را افزایش می‌دهد. به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهند که اسیدسالیسیلیک می‌تواند به‌عنوان یک تقویت کننده بالقوه برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان از جمله مونوترپن‌ها در مرزه استفاده شود.

در بررسی اثر متیل جاسمونات بر بیان ژن‌های *GTS* و *DXR* در مرزه، در زمان‌های ۴ تا ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار

افزایش بیان معنی‌داری مشاهده شد و پس از زمان ۲۴ ساعت یک روند کاهش را نشان داد. در استفاده از متیل جاسمونات در گیاه جینسنگ هندی نیز میزان بیان ژن *DXR* در بافت برگ تا زمان ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار افزایش یافت (۳۸). در تحقیق دیگری روی گیاه ریحان شیرین (*Ocimum basilicum*) از متیل جاسمونات به صورت محلول‌پاشی روی گیاهان استفاده شد و کل محتوای فنلی از جمله ترپنوییدها به‌صورت قابل توجهی بعد از اعمال تیمار در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت (۳۹). با توجه به این نتایج به‌نظر می‌رسد که به‌کار بردن تیمار متیل جاسمونات نیز می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن‌های موثر در مسیر متابولیت‌های ثانویه شده و نهایتاً محتوی کل متابولیت‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین در مرزه می‌توان دوره ۴ تا ۲۴ ساعت را برای اعمال تیمار و افزایش بیان ژن‌هایی مانند *GTS* و *DXR* و نهایتاً افزایش مونوترپن‌ها در نظر داشت.

گیاهان همیشه در معرض انواع تنش‌های زنده و غیر زنده هستند و متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در مقابله با این تنش‌ها به‌صورت اثر متقابل با آن‌ها دارند. یکی از این اثرات متقابل گیاهان و محیط در ارتباط با جذب اشعه‌های UV است. متابولیت‌های ثانویه در برابر تابش اشعه‌های فرابنفش (UV) و به‌ویژه UV-B نقش مهمی دارند (۲۵). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تابش اشعه UV-B یک تنظیم کننده مهم متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است (۲۵). دوزهای پایین و در محدوده اکولوژیکی اشعه UV-B (۳۱۵ nm-۲۸۰) می‌تواند محتوی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی، کاروتنوئیدها و گلوکوزینولات‌ها را کاملاً تغییر دهد (۲۵ و ۴۰). بنابراین اعمال تیمار در دوز مناسب و کنترل شده اشعه UV-B ممکن است بتواند متابولیت‌های ثانویه در گیاهان را افزایش دهد. تحقیقات نشان داده اند که ژن‌های کلیدی بیوسنتز فلاونوئیدها توسط اشعه UV-B افزایش بیان نشان می‌دهند و محتوای فلاونوئیدهای سلولی افزایش می‌یابد (۲۵). در پژوهش

می‌دهند که متابولیت‌های ثانویه و ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتزی می‌توانند تحت تاثیر اشعه UV-B قرار گرفته و افزایش نشان می‌دهند. روی هم رفته، نتایج اولیه اثرات تیمار گیاهان مرزه با UV-B نشان می‌دهد که پتانسیل مناسبی جهت افزایش ترکیبات با ارزش متابولیت‌های ثانویه از این طریق وجود دارد.

نتیجه گیری

درک مسیر متابولیت‌های ثانویه و چگونگی تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با آن‌ها می‌تواند سطح بیان این ژن‌ها را تغییر دهند. با توجه به این‌که محتوی ترکیبات ثانویه تحت تاثیر بیان ژن‌ها ی درگیر در بیوسنتز آن‌هاست، بنابراین می‌توان با انتخاب الیسیتورهای مناسب و اعمال آن‌ها در زمان‌های مناسب بیان ژن‌های موثر در مسیر بیوسنتزی را افزایش داده و قاعدتا ترکیبات ثانویه از جمله ترکیبات مونوترپنی را در مرزه افزایش داد.

حاضر که تاثیر اشعه UV-B بر بیان ژن‌های *GTS* و *DXR* به‌عنوان دو ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها در مرزه، مورد ارزیابی قرار گرفت، هر دو ژن تحت تاثیر قرار گرفتند و افزایش بیان چشم‌گیری نشان دادند. در شرایط کم UV-B در آراییدوپسیس بیان فاکتور رونویسی *HY5* افزایش نشان داده است (۴۱). همچنین مقادیر فلاونوئیدها، آنتوسیانیدین‌ها و هیدروکسی بنزوئیک اسیدها در گیاهان انگور فرنگی سیاه (*Ribes nigrum*) که در معرض اشعه UV-B قرار گرفته بودند، افزایش محتوی نشان دادند (۴۲). هائو و همکاران (۴۳) در کشت کالوس گیاه *Ginkgo biloba* تحت تابش UV-B نشان دادند که نیتریک اکسید سنتاز و فنیل آلانین آمونیا لیاژ افزایش فعالیت بیشتری دارند. در چندین گونه گیاهی دیگر نیز تولید متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به UV-B به‌خوبی مستند شده است (۴۰، ۴۴-۴۵). به‌طور کلی نتایج نشان

منابع

- Hajhashemi V, Sadraei H, Ghannadi AR, Mohseni M. Antispasmodic and antidiarrheal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology. 2000; 71(1-2): 187-192.
- Gora J, Lis A, Lewandowski A. Chemical composition of the essential oil of cultivated summer savory (*Satureja hortensis* L. CVnSaturn). Journal of Essential Oil Research. 1996; 8: 427-428.
- Ghannadi A, Hajhashemi V, Sadraei H, Mohseni M. Composition of the essential oil of *Satureja hortensis* L. grown in Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2000; 2: 5-8.
- Langenheim JH. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. J Chem Ecol. 1994; 20(6): 1223-1280.
- Adiguzel A, Ozer H, Kilic H, Cetin B. Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi. Czech J. Food Sci. 2007; 25(2): 81-89.
- Mohammadhosseini M, Beiranvand M. Chemical Composition of the Essential Oil from the Aerial Parts of *Satureja hortensis* As a Potent Medical Plant Using Traditional Hydrodistillation. Journal of Chemical Health Risks. 2013; 3(4): 43-54.
- Kargar V, Alizadeh A, Namayandeh A. Essential oil constituents of *Satureja sahendica* Bornm. and *Satureja hortensis* L. cultivated in Iran. Intl J Farm & Alli Sci. 2014; 3(1): 91-94.
- Höferl M, Buchbauer G, Jirovetz L, et al. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. Journal of Essential Oil Research. 2009; 21(5): 459-463.
- Youdim KA, Damien Dorman HJ, Deans SG. The antioxidant effectiveness of thyme oil, α -tocopherol and ascorbyl palmitate on evening primrose oil oxidation. Journal of Essential Oil Research. 1999; 11(5): 643-648.
- Barnes, J, Anderson, LA, Philipson, JD. Herbal Medicines. 3th Ed. London: Pharmaceutical Press; 2007.
- Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 2000; 88(2): 308-316.
- Ultee A, Kets TPW, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology. 1999; 65(10): 4606-4610.
- Soylu S, Yigitbas H, Soyulu EM, Kurt S. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology. 2007; 103: 1021-1030.
- Ultee Dubey VS, Bhalla R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. Journal of Biosciences. 2003; 28(5): 637-646.
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, et al. Expression and molecular analysis of the Arabidopsis thaliana DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. Plant Physiol. 2002; 129:1581-1591.
- Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(17): 9879-9884.
- Poulose AJ, Croteau R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1978; 187(2): 307-314.
- Poulose AJ, Croteau R. γ -Terpinene synthetase: A key enzyme in the biosynthesis of aromatic monoterpenes. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1978; 191(1): 400-411.
- Zhou LG, Wu JU. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. Nat Prod Rep. 2006; 23(5): 789-810.
- Raoa SR, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotech Adv. 2002; 20(2): 101-153.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv. 2005; 23(4): 283-333.
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. J Exp Bot. 2011; 62(10): 3321-3338.
- Reymond P, Farmer EE. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. Current Opinion in Plant Biology. 1998; 1(5): 404-411.
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, et al. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key

- enzyme for jasmonate-regulated plant responses. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98(8): 4788-4793.
25. Schreiner M, Martínez-Abaigar J, Glaab J, Jansen M. UV-B induced secondary plant metabolites. Optik Photonik 2014; 9(2): 34-37.
26. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 1994; 22(22): 4673-4680.
27. Rosen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz SA. (eds). Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2000; 365-386.
28. Crocoll C, Asbach J, Novak J, Gershenzon J, et al. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. Plant Mol Biol. 2010; 73: 587-603.
29. Bourgaud F, Gravot A, Goniter E. Production of plant secondary metabolites. Plant science. 2002; 161(5): 839-851.
30. Rao SR, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances. 2002; 20(2): 101-153.
31. Mulabagal V, Tsay HS. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering. 2004; 2: 29-48.
32. Kumar J, Gupta PK. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports. 2008; 2(2): 93-112.
33. Werker E. Function of essential oil secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae – a review. Flavour and Fragrance Journal. 1993; 8: 249-255.
34. Marin M, Ascensao L, Lakusic B. Trichomes of *Satureja horvatiisilic* (Lamiaceae) - micromorphology and histochemistry. Archives of Biological Sciences. 2012; 64: 995-1000.
35. Carretero-Paulet L, Ahumada L, Cunillera N, Rodriguez-Concepcion, et al. Expression and molecular analysis of the Arabidopsis *DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. Plant Physiology. 2002; 129: 1581-1591.
36. Gupta P, Agarwal AV, Akhtar N, Sangwan RS, et al. Cloning and characterization of 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway genes for isoprenoid biosynthesis from Indian ginseng, *Withania somnifera*. Protoplasma. 2013; 250(2): 285-295.
37. Borad V, Sriram S.. Pathogenesis-related proteins for the plant protection. Asian J Exp Sci. 2008; 22:189-196.
38. Penuelas J, Llusia J, Filella I. Methyl salicylate fumigation increases monoterpene emission rates. Biologia Plantarum. 2007; 51(2): 372-376.
39. Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006; 54(6): 2327-2332.
40. Mewis I, Schreiner M, Nguyen CN, Krumbein A, et al. UV-B Irradiation Changes Specifically the Secondary Metabolite Profile in Broccoli Sprouts: Induced Signaling Overlaps with Defense Response to Biotic Stressors. Plant Cell Physiology. 2012; 53(9): 1546-1560.
41. Favory JJ. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. EMBO Journal. 2009; 28(5): 591-601.
42. Huyskens-Keil S, Eichholz I, Kroh LW, Rohn S. UV-B induced changes of phenol composition and antioxidant activity in black currant fruit (*Ribes nigrum* L.). J. Appl. Bot. Food Qual. 2007; 81:140-144.
43. Hao G, X Du, Zhao F, Shi R, Wang J. Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* callus. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2009; 97: 175-185.
44. Kakani VG, Reddy KR, Zhao D, Mohammed AR. Effects of ultraviolet-B radiation on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) morphology and anatomy. Ann. Bot. 2003; 91(7): 817-826.
45. Rai R, Meena RP, Smita SS, Shukla A, et al. UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.- An antimalarial plant. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2011; 105(3): 216-225.

Differential expression of the key genes involved in the biosynthesis of monoterpenes in different tissues and in response to abiotic elicitors in Summer savory (*Satureja hortensis*)

Ghobadi S. M.Sc.¹, Maroufi A. Ph.D.^{2*}, Majd M. Ph.D.³

1- M.Sc. Student, Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran.

2- Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran

3- Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran

* Email corresponding author: a.maroufi@uok.ac.ir

Received: 18 Jul. 2016

Accepted: 27 Dec. 2016

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the expression of key genes, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) and gamma-terpinene synthase (GTS), involve in thymol and carvacrol biosynthesis pathway in Summer savory (*Satureja hortensis*). This species is one of the important medicinal plants of the Lamiaceae family, and consider as an important source of the mentioned compounds.

Material and Methods: Plants were treated with salicylic acid, methyl jasmonate and UV-B rays. RNAs were extracted from control and treated plants and cDNAs were synthesized. Primers were designed for gene isolation and expression studies. Transcript expression analyses for the DXR and GTS were performed using semi-quantitative RT-PCR method.

Results: A partial segment for DXR and GTS genes was sequenced. The relative gene expression analyses showed differential expression of both genes at transcript level in different tissues (roots, stems, leaves and inflorescence), with higher levels of expression in leaf and inflorescence. The expression of both genes under the effect of abiotic elicitors including salicylic acid, methyl jasmonate and UV-B rays exhibited significant alteration.

Conclusion: Under controlled conditions, using abiotic elicitors such as: salicylic acid, methyl jasmonate and UV-B radiation could elevate the level of gene expression and possibly increase the production of secondary metabolite such as: thymol and carvacrol.

Keywords: Gene expression, Metabolic engineering, Monoterpen, Summer savory, Thymol and carvacrol