بررسی بیان ژنهای کلیدی بیوسنتز دیوسژنین در گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) در پاسخ به سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

مرضیه لطفی[۱]، اسعد معروفی*[۲]، احمد اسماعیلی[۳] و دارا دستان[۴]

[۱] **ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی**

[۲] **ایران، سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات**

[۳] **ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات**

[۴] **ایران، همدان، دانشگاه علوم‌پزشکی همدان، دانشکده داروسازی، گروه داروسازی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۳

چکیده

شنبلیله یک گیاه دارویی مهم است که دارای متابولیتهای ثانویه با ارزشی است. دیوسژنین یک ساپونین استروئیدی است که به مقدار مناسب درگیاه شنبلیله تولید می شود و داری خواص درمانی زیادی می باشد. فعالیت ضدسرطانی دیوسژنین در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. به منظور سنجش بیان برخی ژنهای کلیدی در مسیر بیوسنتز دیوسژنین این پژوهش اجرا شد. ابتدا اعمال تیمارهای متیل جاسمونات با غلظت نیم میلی‌مولار و سالیسیلیک اسید با غلظت یک میلی‌مولار در آزمایشات جداگانه بر روی گیاهان انجام گرفت. سپس در زمانهای ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار نمونه‌برداری از برگها برای بررسی مراحل بیان ژن انجام شد. RNA کل از برگها استخراج و سپس cDNA سنتز شد. ژنهای کلیدی انتخاب شده شامل سیکلوآرتنول سینتاز (CAS) ، اِسکوالن سینتاز (SQS) و اِسکوالن منواکسیژناز (SMO) بودند. جهت اطمینان از توالی ژنها، قطعه تکثیر شده این ژنها در وکتور pTG19-T همسانه سازی و ناحیه هدف آنها توالی‌یابی شد. پس از اطمینان از صحت توالی، بیان نسبی ژنها با روش Real-Time PCR (qRT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان‌دهنده عدم تغییر بیان ژن CAS در گیاهان تحت تیمار با سالیسیلیک اسید نسبت به گیاهان شاهد بود، ولی ژنهای SQS و SMO در برخی زمانها افزایش بیان نشان دادند. در صورتی‌که، ژنهای CAS، SQS و SMO در گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد داشتند. بررسی بیان این ژنها در مسیر بیوسنتز دیوسژنین نشان می‌دهد که احتمالاً دیوسژنین در پاسخ به سالیسیلیک اسید و به‌ویژه متیل جاسمونات افزایش می‌یابد.

واژه های کلیدی: شنبلیله، بیان ژن، متابولیت ثانویه، Real-Time PCR .

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

مقدمه

یکی از مهم‌ترین زمینه‌های تحقیقی در مورد گیاهان دارویی، بررسی شرایط مختلف محیطی تأثیرگذار بر میزان عملکرد کمی و کیفی این گیاهان است. شاید بتوان گفت یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های تولیدکنندگان گیاهان دارویی علاوه بر میزان کمی محصول، تولید با کیفیت بالا است. از آنجا که هدف نهایی از کشت گیاهان دارویی استفاده از مواد مؤثره موجود در آنهاست، مسلماً هر چه مقدار این مواد مؤثره و متابولیتهای ثانویه در واحد وزن گیاه بیشتر باشد از نظر اقتصادی نفع بیشتری حاصل خواهد شد. گیاهان دارویی به دلیل داشتن ترکیبات با ارزش به عنوان

منبعی برای درمان بیماریها شناخته شده اند (۱۸). همچنین امروزه گیاهان دارویی سهم بزرگی را در کشف داروهای جدید در اختیار قرار داده‌اند. تجزیه و تحلیل تعدادی از عوامل درمانی و منابع آنها نشان می دهد که بیش از ۶۰ درصد داروهای تأیید شده دارای ترکیبات حاصل از گیاهان دارویی هستند (۱۵).

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* L. و نام انگلیسی Fenugreek یک گیاه دولپه‌ای است. این گیاه به زیرخانواده پروانه‌آساها از خانواده لگوم‌ها یا باقلائیان (Fabaceae) و جنس *Trigonella* تعلق دارد (۱۷). شنبلیله به دلیل خواص دارویی به طور گسترده در سراسر جهان استفاده می‌شود. در پزشکی سنتی از جمله در هند و چین شنبلیله برای درمان بیماریهایی مانند صرع، فلج، نقرس، ورم، سرفه مزمن، دیابت، سینوس، گرفتگی ریه، التهاب و عفونت به کار می رود (۱۲ و ۲۸). دیوسژنین، یک ساپونین استروئیدی طبیعی است که در حبوبات، سیب‌زمینی شیرین *(Dioscorea sp.)* و شنبلیله یافت می‌شود. دیوسژنین یک پیش ماده استروئیدی است که به طور گسترده در صنایع دارویی استفاده می‌شود (۳۰). چهار آنزیم شامل سیکلوآرتنول سینتاز (CAS)، اسکوالن سینتاز (SQS)، فارنسیل پیروفسفات سینتاز (FPPS) و ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوتاریل کوآنزیم آردوکتاز (HMGR)، به‌عنوان آنزیمهای کلیدی مسئول بیوسنتز تری‌ترپن دیوسژنین در گیاهان شناخته شده‌اند. مسیر بیوسنتزی دیوسژنین را بدین صورت ترسیم کرده‌اند که ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوتاریل کوآنزیم آ (HMG-CoA) توسط آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوتاریل-کوآنزیم آ ردوکتاز (HMGR) به موالونات تبدیل می‌شود، موالونات به‌وسیله مجموعه‌ای از واکنشهای چندگانه به ترکیبات پیش ماده دیوسژنین تبدیل می شود، در نهایت دیوسژنین از اسکوالن با دو روش تولید می‌شود: ۱) با تشکیل کلسترول از لانسترول و ۲) با تشکیل سیتواسترول از سیکلوآرتنول و تبدیل آن به استرول ۳-بتا-دی‌گلیکوزید و در نهایت آنزیم استرول ۳-بتا-گلیکوزیل ترانسفراز (STRL) باعث تبدیل استرول ۳-بتا-دی‌گلیکوزید به دیوسژنین می‌شود (۱۲).

وقتی گیاهان در معرض تنشهای مختلف قرار می‌گیرند، مسیرهای فیتوهورمونی مختلفی برای سازش با تنشها فعال می‌شود که معمولاً منجر به افزایش تولید ترکیبات ثانویه می شود. جاسمونیک اسید و مشتقات آن مانند متیل جاسمونات یکی از فیتوهورمونها می باشند که جزء ترکیبات سیگنالینگ و تنظیم‌کننده‌های درونی رشد گیاه هستند و نقش مهمی در رشد و نمو گیاه و نیر در پاسخ به تنشهای محیطی ایفاء می‌کنند (۲۱). همچنین نقش سالیسیلیک اسید به عنوان یک سیگنال دفاعی در گیاهان مطرح است که در برابر انواع تنشهای زنده و غیرزنده به عنوان یک مولکول در القای استرس اکسیداتیو و بیان ژنهای دفاعی عمل می‌کند (۱۹). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سالیسیلیک اسید در تحریک تولید بسیاری از متابولیتهای ثانویه همچون ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها مؤثر هستند (۲۲ و ۲۹). با توجه به اینکه متابولیتهای ثانویه در گیاهان بیشتر نقش دفاعی را ایفاء می‌کنند، بنابراین القای ژنهای کلیدی مسیر متابولیتهای ثانویه مانند دیوسژنین در شنبلیله توسط سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات می‌تواند تأثیرات زیادی بر افزایش این ترکیبات با ارزش داشته باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی، سنتز cDNA و طراحی پرایمر: بذور رقم اردستانی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد.گیاهان حاصل از کشت بدور در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان نگهداری شدند. خاک مورد استفاده در کشت گلدانی شامل خاک معمولی، ماسه و کود حیوانی به نسبت ۱:۱:۱ بود. سالیسیلیک اسید با غلظت ۱ میلی‌مولار و متیل جاسمونات با غلظت نیم میلی‌مولار به صورت جداگانه بر روی برگهای گیاهان شنبلیله یک ماه پس از رشد محلول‌پاشی شدند و در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از

اعمال تیمار (قبل از مرحله گلدهی) از برگها نمونه‌گیری انجام شد. درست قبل از اعمال تیمار، نمونه برگی تهیه شد و به عنوان شاهد (ساعت صفر) در نظر گرفته شد. گلدانها در سه تکرار و در هر گلدان یک گیاه وجود داشت و از گیاهان بعد از اعمال تیمارها در زمانهای مقرر نمونه های برگ جدا شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس از نمونه‌های برگ با استفاده از کیت RNX-Plus شرکت سیناژن RNA استخراج شد، بعد از تعیین کمیت و کیفیت RNA و هم‌غلظت کردن آنها cDNA توسط کیت شرکت سیناکلون سنتز و واکنشهای qRT-PCR انجام گرفت.

ژنهای سیکلوآرتنول سینتاز (CAS) و اسکوالن سینتاز (SQS) و اسکوالن منواکسیژناز (SMO) از ژنهای کلیدی مسیر بیوسنتزی دیوسژنین هستند که بیان آنها در این تحقیق مطالعه شد. توالی ژنهای شنبلیله از پایگاه داده شنبلیله گرفته شد (https://glbrc.bch.msu.edu/fenugreek). ژن عامل افزایش طول ۱ آلفا (EF1α) نیز به عنوان ژن رفرنس جهت نرمال‌سازی داده‌ها و اندازه‌گیریهای بیان ژنها انتخاب شد. برای ژنهای مورد استفاده پرایمرهای اختصاصی با استفاده از برنامه آنلاین Primer3 طراحی شد. در جدول ۳ مشخصات پرایمرها و طول قطعات نشان داده شده است.

همسانه‌سازی ژنها: به منظور اطمینان از توالی ژنهای مورد مطالعه، همسانه‌سازی آنها انجام شد. برای این کار وکتورهای نوترکیب حاوی قطعات تکثیر شده ژنها به باکتری *E.coli* سویه DH5α منتقل شدند. وکتور مورد استفاده pTG19-T از شرکت سیناکلون بود. از کشتهای شبانه حاوی باکتری ترانسفورم شده با وکتورهای نوترکیب، استخراج پلاسمید به روش سمبروک و راسل (۳۱) انجام شد. سپس پلاسمیدهای نوترکیب توالی‌یابی شدند. بعد از اطمینان از وجود پلاسمید نوترکیب، با آنزیم *Eco*R1 برش داده شدند. وکتور pTG19-T برای این آنزیم تنها یک جایگاه برش دارد و در محل برش به صورت صاف DNA را بریده و پلاسمید خطی ایجاد می‌کند. پلاسمیدهای نوترکیب خطی حاوی قطعاتی از ژنهای مورد مطالعه از ژل تخلیص و جهت محاسبه کارایی PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

کارایی PCR : مفهوم کارایی PCR یا PCR Efficiency ، به معنی میزان افزایش محصولات در هر سیکل از واکنش PCR می‌باشد. به منظور محاسبه کارایی PCR ژنهای مورد مطالعه کلون و سپس خطی شده و رقتهای متوالی آنها در واکنش ریل‌تایم بررسی شدند. منحنی استاندارد هر ژن ترسیم و با محاسبه شیب خط میزان کارایی PCR محاسبه شد. پنج رقت برای هر کدام از ژنها در نظر گرفته شد.

Real-Time PCR (qRT-PCR) : بیان کمی ژنهای CAS, SMO, SQS شنبلیله با روش Real-Time PCR (qRT-PCR) بررسی شدند. واکنشهای PCR نمونه‌های cDNA تهیه شده در دستگاه Real-Time مدل Step one ABI انجام شد. اجزا واکنش در جدول ۱ آورده شده است. در نهایت پس از انجام واکنشهای PCR طبق جدول ۲، Ct (Cycle threshold) مربوط به هر ژن و هر نمونه برای گیاهان شاهد و تحت تیمار سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات به‌دست آمد. این داده‌ها با استفاده از فرمول زیر به داده‌های کمی بیان نسبی ژن تبدیل شده و نمودارهایی برای هر کدام از ژنها تحت تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در زمانهای مختلف نسبت به شاهد رسم شدند.

فرمول محاسبه بیان نسبی ژنها:

$$\text{Fold change} = \frac{(\text{E target})\Delta\text{Ct(target)}}{(E\ reference)\ \Delta Ct(reference)}$$

نتایج

استخراج RNA و سنتز cDNA : استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب از بافت برگ گیاهان شنبلیله انجام شد (شکل ۱).

جدول ۱- اجزاء و مقادیر آنها در واکنش PCR

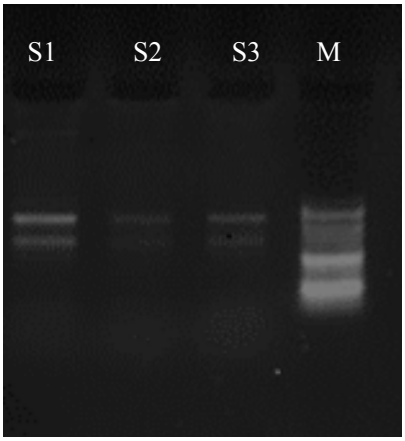
اجزاء واکنش	حجم(µl)
SYBR Premix including *Taq* II	۱۰
پرایمر فروارد (10 pm/µl)	۱
پرایمر معکوس (10 pm/µl)	۱
cDNA	۲
آب	۶
کل	۲۰

جدول ۲- چرخه های حرارتی و زمان واکنش PCR

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما
۱	واسرشت اولیه	۴ دقیقه	۹۵
۴۰	واسرشت	۲۰ ثانیه	۹۵
	اتصال و گسترش	۲۰ ثانیه	۶۰
۱	ذوب	۵ دقیقه	۷۰ تا ۹۵

نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در نمونه‌ها، حدود ۱/۸ تا ۱/۹ و میانگین غلظت RNA ها حدود ۸۴۰ نانوگرم بر میکرولیتر به‌دست آمد. پس از حذف DNA، سنتز cDNA برای تمام نمونه‌ها انجام شد. برای اطمینان از سنتز cDNA، PCR با پرایمر ژن رفرنس انجام شد. دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مناسب برای اتصال ژنها به دست‌آمد. سایزهای قطعات تکثیر شده نیز طبق انتظار بودند (جدول ۳).

همسانه‌سازی و تعیین توالی پلاسمیدهای نوترکیب: به منظور اطمینان از توالی ژنهای مورد مطالعه، همسانه‌سازی قطعه‌های حاصل از RT-PCR ژنهای EF-1-α، CAS, SQS و SMO در وکتور pTG19-T انجام شد.



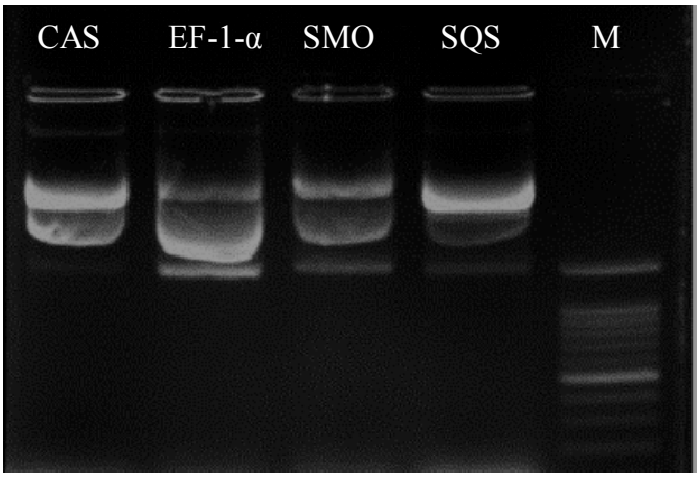
شکل ۱ – RNA استخراج شده از برگ سه گیاه شنبلیله (S1,S2,S3)، M: مارکر DNA1kb

جدول ۳- مشخصات و شرایط آغازگرهای طراحی شده برای تجزیه و تحلیل بیان ژن

نام آغازگر	شماره دسترسی توالی بانک ژن (NCBI)	توالی آغازگر (5' - 3')	دمای اتصال (°C)	طول قطعه (bp)
EF-1-α-F EF-1-α-R	XM_003618727.3	CATCTGCTTCACTCCAAGGGT TCCCAGGCTGATTGTGCTGTT	۶۰	۱۲۶
CAS-F CAS-R	KX148475.1	GGTTGGGGAGAGACTTAT TTAGCCTGTTCAGCCTCAATGA	۶۰	۱۲۲
SQS-F SQS-R	KX148477	TCGCTTTTGTGCTATTCCTCAG GCACCATAGACATCAGCCATAT	۶۰	۱۵۳
SMO-F SMO-R	XM_013610490.1	CTGGAGCCGTACTGATGGGA CAAAGTGCAGGTGCATCGTTC	۶۰	۱۴۲

وکتورهای نوترکیب حاوی قطعات ژنها به باکتری منتقل و باکتریهای تراریخت بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک مشاهده شدند. استخراج پلاسمید انجام شد (شکل ۲). برای اثبات وجود قطعه مورد نظر در

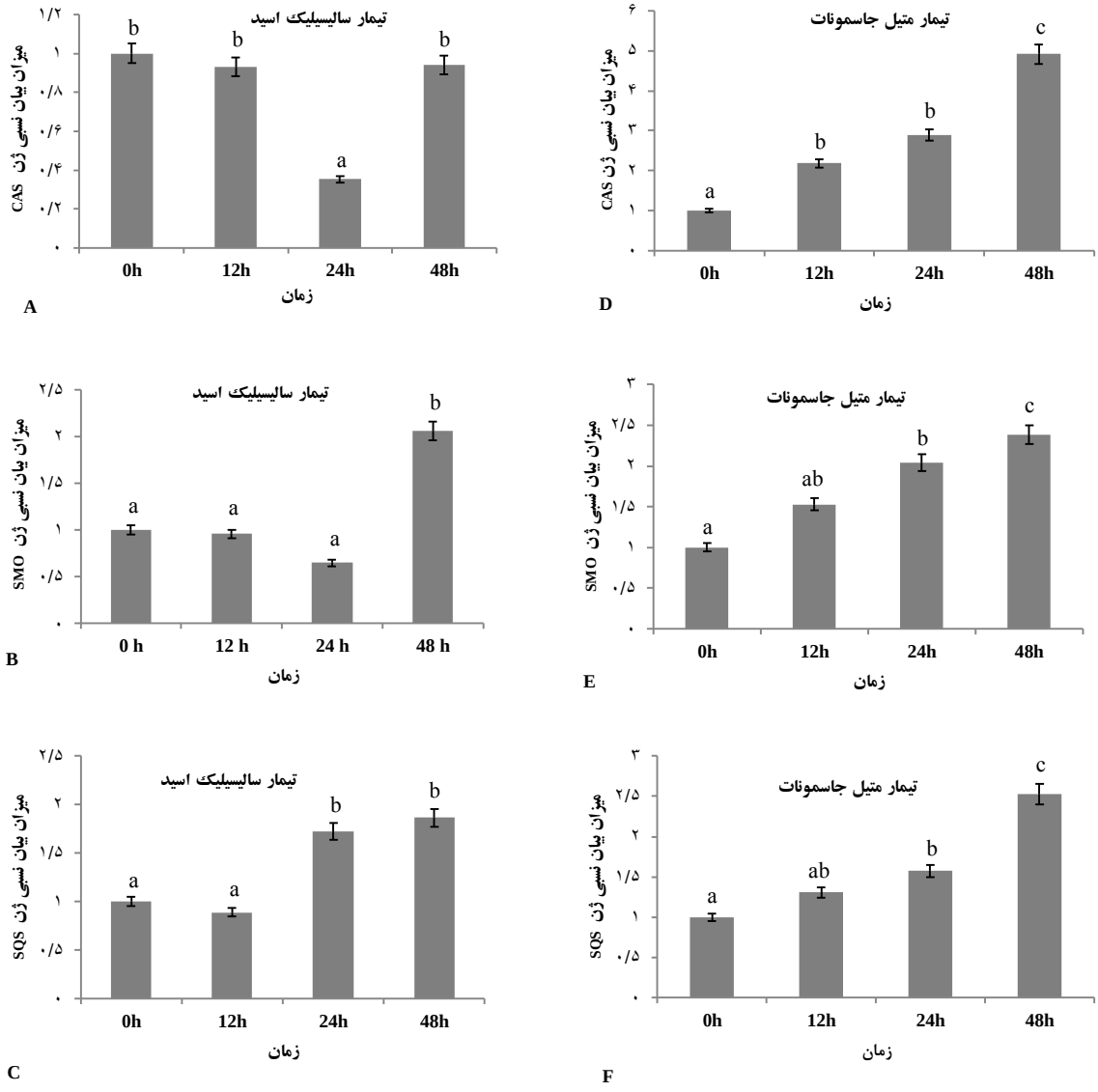
پلاسمیدها، ابتدا PCR با آغازگرهای (مستقیم و معکوس) اختصاصی و M13 انجام شد که سایزهای پیش‌بینی شده تکثیر شدند. پس از اطمینان از نوترکیب بودن پلاسمیدها، تعیین توالی توسط شرکت توپاز ژن در دو جهت مستقیم و معکوس انجام شد، که نتایج به دست آمده با توالیهای رفرنس داده پایگاه شنبلیله کاملاً یکسان بود.



شکل ۲ – استخراج پلاسمیدهای نوترکیب حاوی قطعات ژنهای CAS، EF-1-α ، SMO و SQS در در چند کلون مورد بررسی، :M مارکر DNA1kb

بیان ژنهای CAS، SQS و SMO در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات: نتایج واکنشهای PCR در دستگاه ریل‌تایم به صورت Ct دریافت شد. برای هر تیمار در زمانهای مختلف برای هر سه ژن مورد بررسی، داده‌های خام (Ct) به بیان نسبی ژن تبدیل شدند که نتایج حاصل به صورت داده‌های کمی در قالب نمودار به شرح زیر است.

درالگوی بیان ژن CAS در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید، در بازه زمانی صفر (شاهد) تا ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل۳ A) ولی ژن CAS تحت تأثیر متیل جاسمونات در بازه زمانی صفر (شاهد) تا ۴۸ ساعت روند افزایشی بیان نشان داد به طوری‌که سطح بیان ژن بعد از ۴۸ ساعت به بالاترین میزان خود رسید (شکل۳ D). نتایج بررسی میزان بیان ژن SMO تحت تاثیر سالیسیلیک اسید نشان داد که ژن مذکور بعد از ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار، نسبت به شاهد افزایش بیان معنی‌داری را نشان می‌دهد (شکل۳ B). در حالی که بیان ژن SMO در اثر تیمار متیل جاسمونات در بازه زمانی صفر تا ۴۸ ساعت کاملا روند افزایشی را نشان داد به طوری که پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف میزان بیان نسبت به شاهد معنی‌دار بودند و در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار به میزان بیان ژن SMO در اثر تیمار با متیل جاسمونات به بالاترین سطح رسید (شکل۳ E). همچنین میزان بیان ژن SQS در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید در ساعتهای اولیه پس از اعمال تیمار (۱۲ ساعت) تغییر معنی‌داری احساس نشد اما به تدریج بیان ژن SQS روند افزایشی را نشان داد، هر چند که مشاهدات این تحقیق نشان داد که این تغییرات خیلی زیاد نیست (شکل۳ C). اما نتایج الگوی بیان ژن SQS پس از اعمال تیمار با متیل جاسمونات نشان داد که میزان بیان ژن SQS در بازه زمانی مورد مطالعه روند افزایشی را نشان می دهد به طوری که پس از ۴۸ ساعت بالاترین میزان بیان ژن SQS نسبت به شاهد مشاهده می‌شود که البته این اختلاف معنی‌دار است (شکل۳ F).



شکل ۳ – بیان ژنهای CAS، SMO و SQS در در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در زمانهای مختلف، حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح یک درصد است.

بحث

در تحقیق حاضر بیان سه ژن کلیدی(CAS، SQS و SMO) مسیر بیوسنتزی دیوسژنین در گیاه شنبلیله در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات، نشان داد که اعمال این تیمارها باعث تغییرات در بیان این ژنهای کلیدی می‌شود. برای افزایش تولید متابولیتهای ثانویه در گیاهان ترکیبات متعددی وجود دارند، الیسیتورهای با منشاء زیستی یا غیر زیستی جزء این ترکیبات هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیتهای ثانویه می‌شوند (۳۶). نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که سالیسیلیک اسید و به ویژه متیل‌جاسمونات در القای بیان ژن و احتمالاً افزایش متابولیتهای ثانویه در شنبلیله مؤثر باشند. چودری و همکاران (۱۲) تاثیر متیل‌جاسمونات بر روی افزایش تولید دیوسژنین در گیاه شنبلیله را مطالعه و نشان دادند که با افزایش متیل‌جاسمونات، میزان سنتز دیوسژنین نیز افزایش یافت. در تحقیقی بر روی گیاه

ریحان *(Ocimum basilicum)* از متیل جاسمونات به صورت محلول‌پاشی روی گیاهان استفاده شد و کل محتوای فنلی از جمله ترپنوئیدها به‌صورت قابل توجهی بعد از اعمال تیمار در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش نشان داد (۲۵). در مطالعه‌ای روی مرزه تابستانه *(Satureja hortensis)* به کار بردن متیل‌جاسمونات منجر به افزایش بیان ژنهای مؤثر در مسیر متابولیتهای ثانویه شد (۷). جاسمونات‌ها به عنوان مولکولهای پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا و بیان بسیاری از ژنها که منجر به تجمع متابولیتهای بسیاری می‌شوند، معرفی شده‌اند (۳۵). در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) تیمار با متیل جاسمونات، اسید جیبرلیک و سالیسیلیک اسید منجر به افزایش بیان ژن و فعالیت بیشترآنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز شد (۶). همچنین تیمار سوسپانسیون سلولی تنباکو با متیل‌جاسمونات منجر به افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و افزایش ترکیب اسکوپولتین شد (۳۲). در گیاه جینسینگ (*Panax ginseng*) تیمار با متیل جاسمونات باعث افزایش متابولیت ثانویه جینسنوساید (Ginsenosides) شد، تجزیه و تحلیل متابولیتهای ثانویه نشان داد تعدادی از ژنهایی که درگیر در بیوسنتز جینسنوساید هستند، مانند ژن اکسیدو اسکوالن سیکلاز همراه با اسکوالن سینتاز و اسکوالن آپوکسیداز ، افزایش بیان نشان دادند (۱۳). بررسی اسکوالن سینتاز و اسکوالن آپوکسیداز در کشت بافت ریشه مویین گیاه جینسینگ (*Panax ginseng*) پس از ۵ هفته تیمار با متیل جاسمونات ۰/۱ میلی مولار ، نشان داد این ژنها در شرایط تیمار نسبت به شاهد (بدون متیل جاسمونات) افزایش بیان نشان دادند، هر چند افزایش بیان ژن سیکلو آرتنول سینتاز به مقدار کمتری بود (۲۶). در گیاه بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* subsp. millefolium) نیز میزان بیان ژنهای ۱-دی‌اکسی دی‌زایلوز-۵-فسفات ردوکتوایزومراز (DXR) و ژرانیل دای فسفات سنتاز (GPPS) از ژنهای مهم در بیوسنتز مونوترپن‌ها و ژنهای فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز (PAL) و چالکون سنتاز (CHS) از ژنهای مهم در بیوسنتز فنیل پروپانوییدها در مراحل مختلف نموی و تحت تیمار متیل‌جاسمونات در بافتهای برگ و گل در گیاهان تیمار شده با متیل‌جاسمونات تغییرات بیان نشان دادند (۸). در مطالعه‌ای بر روی شنبلیله به منظور شناسایی ژنهای درگیر در مسیر بیوسنتزی دیوسژنین گیاهان تحت تیمار متیل‌جاسمونات یا دادن پیش ماده مانندکلسترول و اسکوالن قرار گرفتند که نتایج حاکی از بیان بالای ژنهای مسیر بیوسنتری بود (۱۴). تیمارگیاهچه ها ی شنبلیله با متیل جاسمونات حاکی از افزایش دیوسژنین نسبت به گیاهچه های شاهد بود (۱۶). در بررسی تیمار گیاه یونجه *(Medicago truncatula)* با متیل جاسمونات مشخص شد که بیان ژنهایی که در متابولیسم فنیل پروپانوئید نقش دارند به میزان ۵ برابر نسبت به شاهد افزایش داشته است (۳۳). اثرات متقابل متیل جاسمونات (سطوح صفر و ۷۰ میکرومولار) و کلرید سدیم (در سطوح صفر،۸۰ ،۱۶۰ و ۲۴۰ میلی مولار) بر کیفیت و کمیت اسانس و برخی پارامترهای فیزیولوژیکی در گیاه شنبلیله بررسی شد که بر اساس نتایج پیشنهاد شد که تیمار گیاهان با متیل جاسمونات مقاومت آنها را به تنش بهبود می‌بخشد (۲). امروزه کاربرد سالیسیلیک اسید نیز به عنوان یکی از هورمونهای گیاهی در افزایش مقاومت گیاهان به تنشها به اثبات رسیده است (۳۴). مطالعات متعدد نشان داده است که سالیسیلیک اسید به عنوان یک ترکیب با ارزش در القاء تولید بسیاری از متابولیتهای ثانویه مثل ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها نقش دارد (۲۲ و ۲۹). استفاده از غلظتهای بالای دو الیسیتور سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر در کشت سلولی پونه (*Mentha pulegium*) نشان داد میزان متابولیتهای ثانویه بتاکاریوفیلن نسبت به گیاه طبیعی به طور معنی‌داری افزایش یافت (۵). سالیسیلیک اسید سیستم دفاعی گیاه را از طریق القای رونویسی گروه مشخصی از ژنهای مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک تحریک می‌کند. در توتون میزان بیان

برخی پروتئینهای مرتبط با پاتوژنها (Pathogenesis-related proteins) بعد از تیمار گیاهچه‌ها با سالیسیلیک اسید افزایش نشان داده است (۲۷). مطالعات متعددی نیز نشان داده‌اند که سالیسیلیک اسید در افزایش میزان برخی از متابولیتهای ثانویه به ویژه آنهایی که در ساز و کارهای دفاعی گیاه دخیل هستند، نقش دارد (۱). خلیلی و همکاران (۲۴) با به کار بردن محرک سالیسیلیک اسید روی ریشه‌های مویین خار مریم (*Silybum marianum*)کاهش وزن ریشه‌ها و در مقابل افزایش ماده مؤثر سیلیمارین و فلاونولیگنان‌ها وکاهش ایزوسیلیسین را گزارش نمودند. همچنین در گیاه بامیه (*Hibiscus esculentus* L.) تیمار با آسکوربات و سالیسیلیک اسید و ترکیب توأم این دو ماده باعث کاهش میزان فلاونوئیدها و فعالیت پراکسیداز شده است (۳).

مطالعات نشان می‌دهد که کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید باعث افزایش میزان محصول در شنبلیله می شود (۱۰). همچنین کاربرد سالیسیلیک اسید باعث افزایش آنزیمهای آنتی اکسیدان، کلروفیل و وزن خشک گیاه در سیب زمینی می‌شود (۹). در آرابیدوپسیس نشان داده شد که سالیسیلیک اسید در شرایط نامساعد محیطی منجر به افزایش لیپیدها شده که یک مکانیسم دفاعی در شرایط تنش است (۱۱). محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید روی بخشهای هوایی گیاهان ریحان و مرزنگوش نیز باعث افزایش ارتفاع گیاه، تعداد شاخ و برگ، وزن تر و خشک، پلی آمینها و کربوهیدراتها و همچنین کیفیت و درصد اسانس شد (۲۰)، افزایش میزان اسانس در اثر محلول‌پاشی گیاهان با سالیسیلیک اسید ممکن است در اثر افزایش رشد رویشی، جذب مواد غذایی بیشتر توسط ریشه‌ها به دلیل افزایش فعالیتهای فتوسنتزی گیاه و نیز تغییر در جمعیت غده‌ها و کرکهای تولید کننده اسانس در برگ و گلها باشد (۲۰). مطالعه بر روی ارقام کلزا نشان داد که صفات ارتفاع گیاه، تعداد غلاف در گیاه، تعداد دانه، وزن ۱۰۰ دانه، عملکرد دانه و زیست توده گیاه کلزا علاوه بر رنگدانه فتوسنتزی به طور قابل توجهی تحت تأثیر تیمار با سالیسیلیک اسید قرار گرفته است (۲۳). در پژوهشی نیز اعمال سالیسیلیک اسید بر گیاه مرزه، باعث افزایش ترکیبات گاماترپینن، آلفاترپینین، بتامیرسن و پاراسیمن شد که به‌نظر می‌رسد بالا رفتن میزان این ترکیبات برای تنظیم سازگاری این گیاهان نسبت به عوامل نامساعد و تنشهای محیطی صورت گرفته باشد و به منزله به‌کار افتادن یک جریان دفاعی همسو با سالیسیلیک اسید در جهت استمرار تعادل فعالیتهای حیاتی گیاه در شرایط تنش به حساب می‌آید (۴).

با توجه به نتایج آنالیز بیان ژن به کمک روش دقیق Real-Time PCR به نظر می‌رسد که بیان ژنهای CAS، SQS و SMO در گیاه شنبلیله در اثر اعمال تیمار سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات تغییر می‌کند، به طوری‌که تیمار با متیل‌جاسمونات روند افزایشی را در یک دوره زمانی ۴۸ ساعتی القاء می‌کند، که ممکن است به دلیل اثر و نحوه عمل متفاوت این ترکیب باشد. تغییرات افزایشی بیان ژنها که متاثر از تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات است می‌توانند در جهت افزایش دیوسژنین که یک ماده دارویی ارزشمند در شنبلیله است، مورد مطالعه وسیع‌تر قرار گیرند.

منابع

۱- اسمعیل زاده بهابادی، ص.، و رضایی نودهی، آ. (۱۳۹۳). افزایش تولید تری گونلین تحت تاثیر سالیسیلیک اسید در کشت سلولی شنبلیله *(Trigonella foenum-graecum)*. مجله سلول و بافت. 5(2): 165-172.

۲- بادیرست، ح.، نجفی، ف.، و حسنلو، ط. (۱۳۸۹). بررسی اثر متیل جاسمونات و تنش شوری بر روی اسانس و برخی پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه شنبلیله *(Trigonella foenum-graecum L.)* . پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم-گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم، ۱۱۴ صفحه.

۳- باقی زاده، ا.، حاج محمدرضایی، م.، توحیدی، ز. (۱۳۹۷). بررسی اثر متقابل تنش خشکی با آسکوربات وسالیسیلیک اسید بر فعالیت برخی آنزیمهای آنتی اکسیدان و فلاونوئیدها در گیاه بامیه (*Hibiscus esculentus* L.). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. انتشار آنلاین.

۴- حیاتی، پ.، و روشن، و. (۱۳۹۰). بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر پارامترهای رشدی و کمیت و کیفیت اسانس گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.) . تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. 29(4): 808-817.

۵- درویشی، ا.، کهریزی، د.، بهرامی‌نژاد، ص. و منصوری، م. (۱۳۹۵). بررسی اثر الیسیتورهای عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید بر درصد زنده‌مانی سلول و میزان متابولیتهای ثانویه بتاکاریوفیلن و ایزوپولگون در کشت سلولی پونه *(Mentha pulegium)*. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). 29(4): 370-381.

۶- عبدخانی، س.، سلوکی، م.، و شیری، ی. ۱۳۹۳. تاثیر هورمون‌های اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL) در مراحل مختلف رشد *Ocimum basilicum L.* . مجله علمی-پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی. 8: 21-30.

۷- قبادی، س.، معروفی ا. و 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. 7(3): 275-291.

۸- مجدی، م.، فتحی، ا.، معروفی، ا.، دستان، د. (۱۳۹۷). 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. انتشار آنلاین.

9- Alhoshan, M. Zahedi, M. Ramin, A.A. and Sabzalian, M.R. (2018). Exogenous Application of Salicylic Acid and Glycine Betaine as Tools to Enhance Biomass and Tolerance of Potato Cultivars. Gesunde Pflanzen. 71(1): 25-35.

10- Babar, S. Siddiqi, E.H. Hussain, I. Bhatti, K.H.and Rasheed, R. (2014). Mitigating the effects of salinity by foliar application of salicylic acid in fenugreek. Physiol. J. 6 pp.

11- Borsani, O. Valpuesta, V. and Botella, M. A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. Plant Physiol. 126: 1024-1030.

12- Chaudhary, S. Chikara, S. Sharma, M. Chaudhary, A. Alam, Syed B. Chaudhary, P. Mehta, A. Patel, M. Ghosh, A. and Iriti, M. (2015). Elicitation of Diosgenin Production in *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) Seedlings by Methyl Jasmonate. International Journal of Molecular Sciences. 16(12): 29889-29899.

13- 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.

14- Ciura, J. Szeliga, M. Grzesik, M. and Tyrka, M. (2017). Next-generation sequencing of representational difference analysis products for identification of genes involved in diosgenin biosynthesis in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). Planta. 245(5): 977-991.

15- Cragg, G.M. Newman, D.J. and Snader, K.M. (1997). Natural products in drug discovery and development. J. Nat. Prod. 60: 52-60.

16- De, D. and De, B. (2011). Elicitation of diosgenin production in *Trigonella foenum-graecum* L. seedling molecules. Acta Physiol Plant. 33: 1585-1590.

17- Dini, M (2006). Scientific name of medicinal plants used in traditional medicine. Forest and Rangeland Research Institute Publication. pp. 299-300.

18- Farnsworth, N.R. Akerele, O. Bingel, A.S. Soejarto, D.D and Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. Bull. World Hlth. Org. 63: 965981.

19- Ganesan, V. and Thomas, G. (2001). Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H_2O_2 accumulation and oxidative stress. Plant Sci. 160:1095-106.

20- Gharib, F.A.E. (2007). Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and majoram. International Journal of Agriculture and Biology. 9 (2): 294-301.

21- Huang, H. Liu, B. Liu, L. and Song, S. (2017). Jasmonate action in plant growth and development. J Exp Bot. 68(6):1349-1359.

22- Kang, S. Jung, H. Bahk, J. and Yang, J. (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.

23- Keshavarz, H. and Modarres Sanavy, S.A.M. (2016). How Salicylic Acid Modulate Photosynthetic Pigments, Yield and Yield Components of Canola Plant. J Genet Resour. 2(1):1-9.

24- Khalili, M. Hasanloo, T. Tabar, K.S.K. and Rahnama, H. (2009). Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in the hairy root cultures of *Silybum marianum*. Cell biology international. 33(9): 988-994.

25- Kim, H.J. Chen, F. Wang, X. and Rajapakse, N.C. (2006). Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(6): 2327- 2332.

26- Kim, O.T. Bang, K.H. Kim, Y.C. Hyun, D.Y. Kim, M.Y. and Cha, S.W. (2009). Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC). 98(1): 25-33.

27- Liu, Y. Wang, L. Cai, G. Jiang, S. Sun, L. and Li, D. (2013). Response of tobacco to the Pseudomonas syringae pv. Tomato DC3000 is mainly dependent on salicylic acid signaling pathway. FEMS Microbiology Letters. 344: 77-85.

28- Mostafaie, A. Kahrizi, D. Mohammadi, M. Yari, K. Rostami, H. Yaghotipoor, A. Beheshti Ale Agha, A. Amjadian, O.A. Yari, P. and Mostafaie, H. (2018). Effect of planting time and vermicompost on the proteomic pattern of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). Cell Mol Biol. 64(9):46-51.

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

30- Raju, J. and Rao V.Ch (2011). Diosgenin, a steroid saponin constituent of yams and fenugreek: emerging evidence for applications in medicine. Bioactive Compounds in Phytomedicine, Croatia: InTech : 125-142.

31- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2006). The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

32- Sharan, M. Taguchi, G. Gonda, K. Jouke, T. Shimosaka, M. Hayashida, N. and Okazaki, M. (1998). Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin in tobacco cell cultures. Plant Science. 132: 13-19.

33- 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.

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

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

36- Zhao, J. Davis, L.C. and Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Adv. 23: 283-333

Relative expression of the key genes of Diosegnin biosynthesis in fenugreek (*Trigonella foenum-graesum*) in response to salicylic acid and methyl jasmonat

Lotfi M.[1], Maroufi A.[2], Ismaili A.[3] and Dastan D.[4]

[1] Dept. of Agricultural Biotechnology, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

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

[3] Dept. of Agronomy and Plant breeding, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

[4] Dept. of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Medicinal Plants and Natural Products Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R. of Iran

Abstract

Fenugreek is an important medicinal plants that has valuable secondary metabolites. Diosgenin, a steroid saponin, occurs abundantly in fenugreek which has many medicinal properties. Anticancer activity of diosgenin has been reported in many studies. In this study the expression of some key genes involved in the biosynthesis of diosgenin, was assessed. First, plants (before flowering stage) were treated with 0.5 mM methyl jasmonate and 1 mM salicylic acid in separate experiments. Then, at 0, 12, 24, and 48 hours after treatment, leaves were sampled for further investigation. The total RNA was extracted from the leaves and afterward cDNA was synthesized. Selected key genes included cycloartenol synthase (CAS), squalene synthase (SQS), and squalene monooxygenase (SMO). To verify the sequence of the genes, the amplified fragments of them were separately cloned into the pTG19-T vector and their targeted regions were finally sequenced. After confirming the sequence of selected genes, the relative expression level of all of the target genes was evaluated using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. The results showed that the expression level of CAS in salicylic acid-treated plants did not change compared to control plants, however, expression levels of SQS and SMO were increased at some time courses. While, CAS, SQS and SMO expression levels in methyl-jasmonate treated plants were significantly increased in comparison with control plants. Considering the expression of the key genes in the biosynthesis pathway of diosgenin suggests that diosgenin is likely to increase in response to salicylic acid and in particular methyl jasmonate.

Key words: gene expression, fenugreek, secondary metabolite, Real-Time PCR