ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸
صفحه ۱۸۷ - ۱۷۹

تاثیر متیل جاسمونات در بیان نسبی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان (*Glycirrhiza glabra*)

The effect of methyl jasmonate on the relative expression of genes involved in the pathway of glycyrrhizin biosynthesis in cell suspension culture of licorice (*Glycirrhiza glabra*)

مریم اله دو*[۱]، منصور امیدی[۲]، محمدرضا بی همتا[۲]، علیرضا عباسی[۳]، براتعلی فاخری[٤]

۱- دانش‌آموخته دکتری، دانشگاه تهران و عضو هیات علمی دانشگاه زابل

۲- استادان، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران

٤- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل

Allahdou M[*1], Omidi M[2], Bihamta M[2], Abbasi AR[3], Fakheri BA[4]

1. PhD Graduated of Plant Breeding, University of Tehran and Faculty member of University of Zabol
2. Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran
3. Associated Professor, Department of Biotechnology, University of Tehran
4. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: maryam.allahdo@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱)

چکیده

ریشه‌ها و استولن‌های شیرین‌بیان یکی از مهم‌ترین داروهای گیاهی در دنیا را تشکیل داده و حاوی مقادیر زیادی ماده موثره گلیسیریزین که یک نوع تریترپن ساپونین است، می‌باشد. در این تحقیق بیان نسبی ژن‌های موثر در مسیر بیوسنتز این متابولیت ثانویه شامل ژن‌های *bAS*، *SQS*، *CYP88D6* و *CYP72A154* در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان در حضور متیل‌جاسمونات مورد بررسی قرار گرفت. متیل‌جاسمونات در غلظت صد میکرومولار در فاز رشدی ثابت به‌همراه تیمار کنترل (بدون متیل جاسمونات) به سوسپانسیون سلولی اضافه و سلول‌ها در فواصل زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت برداشت و میزان بیان نسبی هر ژن محاسبه و نمودارها ترسیم شد. نتایج نشان داد که دو ژن *bAS* و *CYP88D6* در ٤۸ ساعت بعد از تیمار و ژن‌های *SQS* و *CYP72A154* در ۷۲ ساعت بعد از تیمار بیش‌ترین میزان بیان را نشان دادند. ژن‌های *bAS* و *SQS* افزایش بیان بیشتری نسبت به ژن‌های *CYP88D6* و *CYP72A154* نشان دادند زیرا ژنهای *bAS* و *SQS* در مسیر اولیه بیوسنتز دخالت داشته و نیز در بیوسنتز سایر ساپونین‌ها مانند سویاساپونین نیز دخالت دارند در حالی‌که ژن‌های *CYP88D6* و *CYP72A154* در مسیر نهایی بیوسنتز گلیسیریزین دخالت دارند. با توجه به اینکه قبلاً حضور گلیسیریزین در ریشه تایید شده بود، این تحقیق نیز به‌دلیل افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز و نیز پایداری نسبی بیان آن‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان، حضور گلیسیریزین را در کشت سلولی این گیاه تایید کرد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
سوسپانسیون سلولی
شیرین‌بیان
متیل‌جاسمونات

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.6.4]

مقدمه

گیاهان مقادیر زیادی از متابولیت‌های مخصوص که به‌عنوان منابع طبیعی شناخته شده و یک منبع غنی از داروهای مدرن می‌باشند، تولید و ذخیره می‌کنند. در چین برای هزاران سال است که گیاهان برای مصارف دارویی استفاده می‌شوند (Yang et al. 2016). برآورد شده است که تقریبا ۲۰۰ هزار متابولیت ثانویه در گیاهان وجود دارد (Harvey et al. 2015) که بر اساس منابع بیوسنتزی، می‌تواند داخل گروه‌های عمده: فنیل پروپانوئید، ترپنوئید و الکالوئیدها، به‌اضافه گروه‌های دیگری با فراوانی کمتر طبقه‌بندی شوند (Qiu 2007). تعدادی از گونه‌های گیاهی نظیر شیرین بیان، جینسینگ و همچنین گیاهان زراعی مانند لگوم‌ها و یولاف، تریترپنوئید ساپونین را به‌عنوان بخشی از برنامه‌های نرمالشان در رشد و توسعه سنتز می‌کنند. این‌ها اغلب گیاهانی هستند که به‌عنوان منابع داروئی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Haralampidis et al. 2002).

ریشه‌ها و استولن‌های گونه‌های شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*, *Glysyrrhiza inflata*, *Glycyrrhiza uralensis*) یکی از مهم‌ترین داروهای گیاهی در دنیا را تشکیل می‌دهند و محتوی مقادیر زیادی از ماده مؤثر گلیسیریزین (۲ تا ۸ درصد از ماده خشک) که یک نوع تریترپنوئید ساپونین است، می‌باشند (Seki et al. 2011). گلیسیریزین عمدتاً در بخش‌های چوبی ریشه‌های ضخیم و استولن‌ها وجود داشته، در حالی‌که سویاساپونین‌ها، اولئونان- نوعی تریترپن ساپونین، عمدتا در بذرها و ریشه چه‌های شیرین بیان وجود دارد (Hayashi et al. 1993). از طرف دیگر میزان بتولینیک اسید- یک نوع تریترپن لوپان، در لایه‌های کرکی ریشه‌های ضخیم شیرین‌بیان زیاد است (Hayashi et al. 1998). سطح استفاده شیرین‌بیان به‌دلیل خصوصیات دارویی آن بالا است در حالی‌که منابع این گیاه مناطق محدودی از دنیا را در بر گرفته‌است. قبلاً کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه شامل کشت‌کالوس، کشت سوسپانسیون سلولی و کشت ریشه‌های مویی انجام گرفته است (Yoo and Kim 1976; Hayashi et al. 1988; Toivonen and Rosenqvist, 1999; Li et al. 2000). فقط دو گزارش از شناسایی گلیسیریزین در مطالعات آزمایشگاهی وجود دارد (Yoo and Kin 1976; Wongwicha et al. 2007). در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان گونه *glabra* هیچ گلیسیریزین قابل مشاهده‌ای تولید نشد (Hayashi et al. 1998) در حالی‌که دو تریترپنوئید سویاساپونین (Hayashi et al. 1990) و بوتیلیک اسید (Hayashi et al. 1988) در کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه تولید شده بود. کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان گونه *Inflata* با بیوراکتور ۷/۵ لیتری محتوی ۵۰ گرم در لیتر وزن ترسلول، ماکزیمم بیومس ۱۹٤/٤ گرم وزن تر را بعد از ۱۸ روز از کشت نشان داده و آنالیز کروماتوگرافی مایع (Lc-MS/MS) حضور گلیسیریزین در عصاره سلولی را در مقایسه با استاندارد نشان داد (Ya-li et al. 2012).

در سال‌های اخیر گزارش شده‌است که کاربرد الیسیتورها می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه را در کشت سلولی گیاه بهبود بخشد. استعمال خارجی متیل‌جاسمونات، تجمع چندین گروه از الکالوئیدها را در چندین گونه گیاهی تحریک کرده است (Saenz-Carbonell et al. 1997). علاوه بر آن گزارش شده بود که جاسمونیک‌اسید و متیل‌جاسمونات در یک بخش از مسیر عبوری، سیگنال‌هایی که آنزیم‌های مخصوصی را القا می‌کنند تا واکنش بیوشیمی را به‌منظور تشکیل ترکیبات دفاعی با وزن مولکولی پایین در گیاهان، نظیر پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها، کیونین‌ها، ترپنوئیدها و پلی‌پپتیدها کاتالیزکنند، درگیر هستند (Mizukami et al. 1993). هم‌چنین متیل‌جاسمونات در کشت سلولی گیاه جنسینگ تولید ساپونین را تحریک کرده است (Lu et al. 2001) و کاربرد آن درکشت سلولی شیرین بیان گونه *glabra* بیوسنتز سویاساپونین را تحریک کرده بود (Hayashi et al. 2003). بیوسنتز گلیسیریزین شامل سیکل‌های اولیه ۲، ۳-اکسیدوسکوالن، معمول در هر دوی تریترپن و فیتوسترول، می‌باشد در حالی‌که در تریترپن آمیرین یکسری واکنش‌های اکسیداتیو در جایگاه C-11 (اکسیداسیون دو مرحله‌ای) و C-30 (اکسیداسیون سه مرحله‌ای) و گلوکونوریلاسیون گروه C-3 هیدروکسیل به دنبال آن اتفاق می‌افتد، اگرچه ترتیب دقیق محصول میانی ناشناخته است. دو ژن که آنزیم‌های دخیل در مراحل اولیه تشکیل اسکلوتن تریترپن را رمزیابی می‌کنند، عبارتند از *SQS* (squalene synthase) و *bAS* (β amyrin synthase) که به‌طور موفقیت‌آمیزی از شیرین بیان گونه *glabra* ایزوله شده‌اند. با این وجود هیچ پیشرفتی در جهت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.6.4]

شناسایی ژن‌های دخیل در اکسیداسیون متعدد و گلیکوزیلی شدن از آمین به گلیسیریزین صورت نگرفته است (Seki et al.2008). سیتوکروم‌های P450 یک نقش بحرانی در واکنش اکسیداتیو در طی بیوسنتز محصولات متنوع طبیعی گیاهی، شامل تریترپن‌ها بازی می‌کنند. با آنالیز ESTها یک ژن به‌نام *CYP88D6* از خانواده سیتوکروم P450، شناسایی شد که این ژن بتا آمیرین ۱۱-اکسیداز، یک آنزیم در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین، را رمزیابی می‌کند (Seki et al. 2008) و نیز ژن *CYP72A154* نیز که در مسیر نهایی بیوسنتز گلیسیریزین دخالت دارد از گونه *Uralensis* جداسازی شده‌است (Seki et al. 2011).

در این مطالعه الگوی بیان ژن‌های *SQS* و *bAS* که در مراحل اولیه بیوسنتز گلیسیریزین و نیز ژن‌های *CYP88D6* و *CYP72A154* که در مراحل نهایی بیوسنتز دخالت دارند، در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان گونه *glabra* و در حضور متیل‌جاسمونات بررسی شد و این اولین گزارش از الگوی بیان این ژن‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی در حضور الیسیتور متیل‌جاسمونات بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی استفاده شده در این تحقیق با بررسی‌های انجام شده از منطقه سمیرم اصفهان جمع‌آوری شد. بذور ابتدا در آب‌مقطر استریل محتوی یک قطره مایع ظرفشویی شستشو داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در اسید سولفوریک غلیظ قرار گرفته و سه مرتبه به مدت یک دقیقه با آب‌مقطر استریل شستشو داده شد. بذور پس از خراش دهی در زیر هود استریل با هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه شستشو و سپس در محیط کشت $\frac{1}{2}MS$ به منظور تولید ساقه کشت گردید.

با توجه به اینکه ریشه و برگ در شیرین‌بیان مقدار کالوس کمی تولید می‌کردند، از هیپوکوتیل برای تولید کالوس استفاده شد. در شیرین‌بیان با افزایش غلظت هورمون BA تولید کالوس افزایش می‌یابد. در اکثر منابع غلظت دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA یا 2/4-D بیشترین تولید کالوس را در بر داشته‌اند و زمانی که از هورمون NAA استفاده شده بود رشد کالوس و تراکم و رنگ آن بهتر از 2/4-D بود. (Parsaiemehr and Mousavi 2009). برای تولید کالوس از هیپوکوتیل استفاده شد. هیپوکوتیل گیاهچه‌های دو هفته‌ای کشت شده در محیط کشت نیم MS، به قطعات نیم سانتی‌متری تقسیم و به پتری دیش‌های اتوکلاو شده محتوی محیط کشت MS محتوی۳ درصد ساکارز و تنظیم کننده‌های رشد شامل: ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA و نیم میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA قرار گرفت (Parsaiemehr and Mousavi 2009). در هر پتری‌دیش حدود ۲۰ تا ۲۵ قطعه از هیپوکوتیل قرار گرفت. به‌منظور کاهش در قهوه‌ای شدن کالوس از اسیداسکوربیک به میزان هشتاد یا صد میلی‌گرم در لیتراستفاده شد (Allahdou et al. 2019). برای استریل کردن اسیداسکوربیک از فیلترهای ۰/۲۲میکرون استفاده شد و زمانی‌که دمای محیط کشت به حدود پنجاه تا شصت درجه رسید، اسیداسکوربیک به محیط کشت اضافه شد. بعد از انتقال گیاهچه‌ها به محیط کشت محتوی تنظیم کننده‌های رشد و آنتی اکسیدان‌ها، پتری دیش‌ها در تاریکی و دمای بیست و پنج درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. چهار هفته بعد از کشت، کالوس‌ها جمع‌آوری و در محیط کشت‌های جدید محتوی صد میلی‌گرم در لیتراسید اسکوربیک قرار گرفت و سپس هر بیست و یک روز واکشت انجام می شد.

حدود نیم گرم کالوس به ارلن‌های محتوی ۴۰ سی سی محیط کشت MS مایع محتوی تنظیم کننده‌های رشد منتقل و در دمای بیست و پنج درجه سانتی‌گراد، اتاق تاریک و شیکر با صد و پنجاه دور در دقیقه قرار گرفت.

به‌منظور القای متابولیت‌های ثانویه از الیسیتور متیل‌جاسمونات (شرکت سیگما آلدریچ) استفاده و بعد از ضد عفونی با عبور ازفیلترهای ۰/۲۲ میکرون، در هجدهمین روز از کشت سوسپانسیون سلولی (Li et al. 2012) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در سه تکرار به ارلن‌هایی که اطراف آن‌ها با فویل آلومنیوم پوشیده شده بود، اضافه شد. به تیمار کنترل نیز ۴۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و ارلن‌ها به انکوباتورشیکردار با دور ۱۵۰ دور در دقیقه و اتاق تاریک منتقل شد. سپس در فاصله ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت برداشت سلولی انجام گرفت، بدین صورت که سلول‌ها در زیر هود استریل از صافی عبور و با محلول PBS با غلظت 1X شستشو داده شد. در هنگام برداشت سلولی شاخص رشد سلول با استفاده از فرمول زیرمحاسبه شد و تکرارهای دارای رشد

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.6.4]

مطلوب برای آنالیز بیان ژن و دیگر مطالعات در دمای منفی ۷۰ نگه‌داری شد.

$$G_i = \left(\frac{W_2 - W_1}{W_1}\right) \times 100$$ (Zahedzadeh et al. 2014)

در این فرمول: Gi، شاخص رشد کالوس (تفاوت وزن ثانویه و اولیه کالوس تقسیم بر وزن ثانویه ضرب‌در ۱۰۰)، W_1، وزن اولیه کالوس، W_2، وزن ثانویه کالوس می باشد.

استخراج RNA از نمونه‌های فریز شده به روش CTAB-Litum chloride (Chang et al.1993; Zareie et al. 2012) انجام گرفت و برای بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراجی، از الکتروفورز ژل آگارز یک و نیم درصد و دستگاه نانودراپ استفاده شد. برای حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی با RNA استخراجی با آنزیم DNase I (شرکت Thermo Scientific) تیمار و مقدار ۵۰۰ نانوگرم از آن برای ساخت cDNA توسط کیت سنتز cDNA شرکت تاکارا ژاپن (شماره کاتالوگRR037A) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. cDNA سنتز شده توسط دستگاه نانودراپ تعیین غلظت و غلظت‌ها یکسان سازی شدند. به‌منظور بررسی میزان بیان نسبی ژن‌ها واکنش Real Time PCR با استفاده از سایبرگرین SYBER PREMIx EX TAq شرکت تاکارا ژاپن (شماره کاتالوگ RR820Q) و دستگاه Rotor-Gene Q QIAGEN در چهار تکرار برای هر تیمار انجام گرفت.

در این تحقیق از آغازگرهای مربوط به ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین استفاده شد. ژن‌های این مسیر بیوسنتزی عبارتند از *bAS*، *SQS*، *CYP88D6* (Seki et al. 2013) و *CYP72A154* (Seki et al. 2015). برای طراحی آغازگرهای مورد نظر از نرم‌افزار Primer 3 (نسخه ۰/۰٤) استفاده و ویژگی‌های جفت آغازگرها از لحاظ تشکیل ساختارهای ثانویه، همودایمر، هترودایمر و غیره با نرم‌افزار Oligoanalyzer (نسخه ۳/۱) بررسی و تایید شدند. ژن خانه دار Actin به‌عنوان مرجع برای نرمال کردن داده‌های بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Zhang et al. 2018).

مخلوط واکنش qPCR شامل ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین (شرکت تاکارا)، یک میکرولیتر cDNA، دو میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۰/٤ میکروگرم در لیتر بوده که با آب‌مقطر استریل عاری از RNase به حجم ۱۵ میکرولیتر رسید. برنامه PCR شامل ٤۰ سیکل: ۹۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۵۷ تا ۵۸ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه انجام گرفت. برای تمام نمونه ها هر واکنش RT-PCR در چهار تکرار (دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی) اجرا شد. میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از فرمول $\text{Fold Chang}=2^{-\Delta\Delta ct}$ (Pfaffi 2001) در نرم‌افزار Excell نسخه ۲۰۱٦ محاسبه و نمودارها برای هر ژن نیز ترسیم شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرها برای بررسی بیان نسبی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین در شیرین بیان

پرایمر	Accession number	توالی ′3→′5	TM	اندازه امپلیکون
bASF	GU072921.1	TGCGAATTCTTGGAGAAG	۵۸	۱۸۱
bASR	GU072921.1	AGGATCCAAAACTCAGG	۵۸	۱۸۱
SQSF	GQ266153.1	GTTGAGCAGGCTGGAAGCTA	۵۸	۱٦۱
SQSR	GQ266153.1	GGCGGTTGGCAGAGAGATAA	۵۸	۱٦۱
Cyp88D6F	KB851192(*glabra*)*	CCACGTCTTCATGGGCTCTT	۵۸	۱۳۸
Cyp88D6R	AB433179(*uralensis*)*	TTACGTGCCTCGAGTGCTTT	۵۸	۱۳۸
Cyp72A154F	AB558153	TTCCACACCAGGGGCTATCT	۵۸	۱۱۳
Cyp72A154R	AB558153	GCCTTTCCAACCTCTTTGGC	۵۸	۱۱۳
GuactinF	EU 190972.1	CCTCAACCCAAAGGTCAACAG	۵۷	۲۰۰
GuactinR	EU 190972.1	GACCAGCGAGATCCAAACGAA	۵۷	۲۰۰

*از هم‌ردیفی توالی مربوط به accession دو گونه و نواحی consensus طراحی شد.

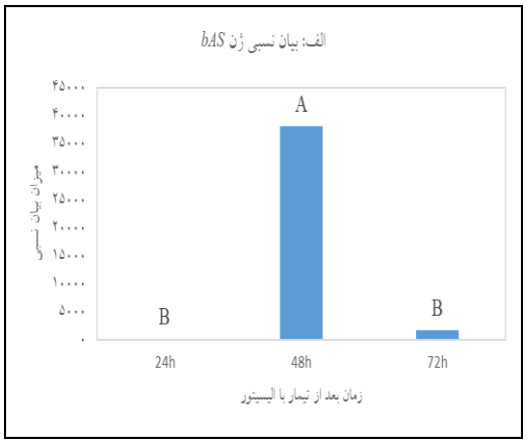
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

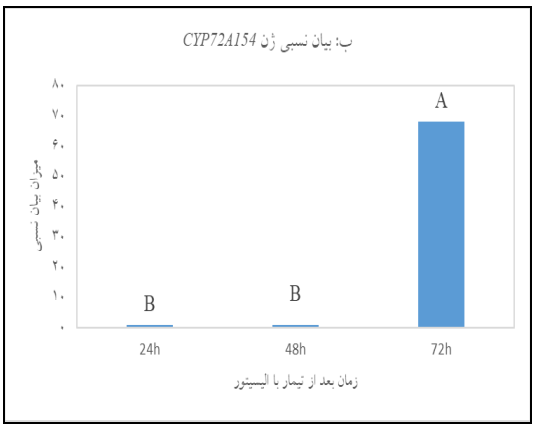
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.6.4]

نتایج

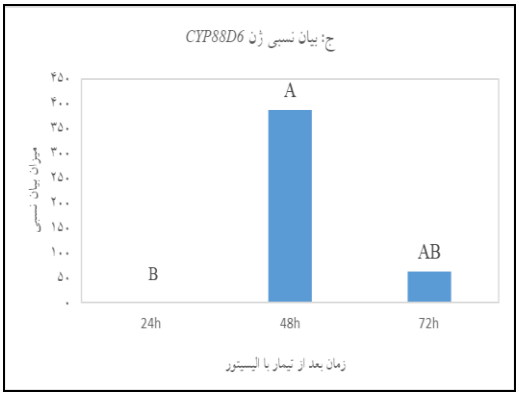
نتایج تکثیر سلول‌های سوسپانسیون سلولی در حضور متیل جاسمونات با ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین نشان داد که این ژن‌ها در کالوس بیان می‌شوند. ژن *bAS* که اولین ژن در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین است، در ٤٨ ساعت بعد از تیمار با الیسیتور متیل جاسمونات با غلظت ١٠٠ میکروگرم در لیتر بیشترین بیان و در ٢٤ ساعت بعد از تیمار تفاوت چندانی با تیمار کنترل نشان نداد (شکل ١). بررسی بیان نسبی ژن *CYP88D6* نیز نتایجی مشابه با ژن *bAS* نشان داده و در ٤٨ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات بیشترین بیان و در زمان ٧٢ ساعت بعد از برداشت، نسبت به کنترل افزایش ولی نسبت به زمان ٤٨ ساعت بعد از تیمار روند کاهشی داشت (شکل ١). ژن *CYP72A154* در ٢٤ و ٤٨ ساعت بعد از تیمار نسبت به کنترل کاهش ولی میزان بیان آن در ٧٢ ساعت بعد از تیمار افزایش یافته بود (شکل ١). ژن *SQS* که اولین ژن دخیل در این مسیر بیوسنتزی است نیز، در ٧٢ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات، بیشترین بیان نسبی را نشان داد، درحالی‌که در ٢٤ و ٤٨ ساعت اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد (شکل ١).

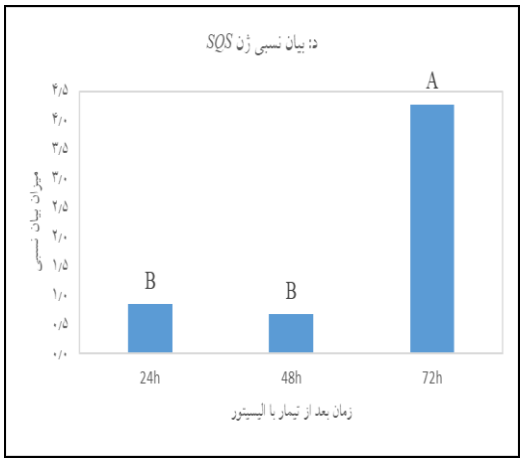
بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین نیز نشان داد که ژن *bAS* در ٢٤ ساعت بعد از تیمار افزایش ٢/٤٥ برابر، در ٤٨ ساعت بعد از تیمار ٧٦٢٢٩ برابر و در ٧٢ ساعت بعد از تیمار ٣٢٩٦/٠٤ برابر بیان نسب به کنترل نشان دادند. ژن *CYP72A154* در ٢٤ ساعت بعد از تیمار ٠/٥٦٤ برابر، در ٤٨ ساعت ٠/٥٩٨ برابر که نشان‌دهنده کاهش بیان نسبت به کنترل و در ٧٢ ساعت بعد از تیمار، ١٣٤/٦٥ برابر نسبت به کنترل که نشان‌دهنده افزایش بیان در زمان ٧٢ ساعت بعد از تیمار با الیسیتور بود. ژن *CYP88D6* نیز مشابه ژن *bAS* و ژن *SQS* مشابه ژن *CYP72A154* از نظر افزایش بیان نسبت به کنترل عمل نمودند (جدول ٢).





[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.6.4]





شکل ۱- بیان نسبی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین، الف: *bAS*، ب: *CYP72A154*، ج: *CYP88D6* و د: *SQS*

جدول۲- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان

	میانگین Fold Chang			
ژن/ زمان بعد از تیمار	*bAS*	*CYP72A154*	*CYP88D6*	*SQS*
۲٤ ساعت	۲/٤٥	۰/٥٦٤	۲/۸۸	۰/۷۰۳
٤۸ ساعت	۷٦۲۲۹	۰/٥۹۸	۷۷۱/۸٥	۰/۳٥۷
۷۲ ساعت	۳۲۹٦/۰٤	۱۳٤/٦٥	۱۲٤/٤	۷/٥٥

بحث

دو ژن که آنزیم‌های دخیل در مراحل اولیه تشکیل اسکلوتن تریترپن به نام اسکئولن سنتاز (*SQS*) و بتاآمیرین سنتاز (*bAS*)، را رمزیابی می‌کنند، از شیرین‌بیان گونه *glabra* جدا شده‌اند، ولی هیچ پیشرفتی برای شناسایی ژن‌های دخیل در مسیر چندگانه اکسیداسیون و گلیکوزیلاسیون از بتاآمیرین به گلیسیریزین انجام نشده بود (Seki et al. 2008). تلاش برای کشف ژن‌ها با استفاده از ژنومیکس کاربردی منجر به شناسایی چندین ژن سیتوکروم P450 دخیل در مسیر بیوسنتز تریترپن‌ها در گونه‌های تاکسول (Schoendorf et al. 2001; Jennewein et al. 2001) و درمنه (Teoh et al. 2006) شده بود. دو ژن دخیل در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین در مراحل نهایی مسیر به نام‌های *CYP88D6* در گونه *uralensis* (Seki et al. 2008) و در گونه *glabra* (Aalami et al. 2016) و ژن *CYP72A154* در گونه *uralensis* از شیرین‌بیان (Seki et al. 2011) شناسایی شده بود. در این مطالعه تاثیر الیسیتور متیل‌جاسمونات در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان بر بیان این دو ژن در مسیر نهایی بیوسنتز و دو ژن *bAS* و *SQS* در مراحل اولیه بیوسنتز گلیسیریزین بررسی شد. ژن‌های *bAS* (در

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.6.4]

مسیر اولیه بیوسنتز) و ژن *CYP88D6* (در مرحله نهایی بیوسنتز)، ٤٨ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات در فاز ثابت، بیشترین بیان را دارا بودند. ژن *CYP88D6* در ریشه‌ها و استولن‌های شیرین‌بیان، بیان شده و از نظر الگوی بیان مشابه ژن *bAS* بوده که عمدتاً در بخش‌های زیرزمینی شیرین‌بیان، بیان می شود و به‌طور قوی نقش کلیدی این ژن (*CYP88D6*) به‌عنوان بتاآمیرین‌اکسیداز در بیوسنتز گلیسیریزین پیشنهاد شده بود (Seki et al. 2008). در این مطالعه نیز این دو ژن (*bAS* و *CYP88D6*) تحت تیمار متیل‌جاسمونات در فاز ثابت کشت سوسپانسیون سلولی، بیشترین میزان بیان را در ٤٨ ساعت بعد از تیمار دارا بوده که می تواند دال بر تشابه عملکرد این دو ژن در گونه‌های شیرین‌بیان باشد. میزان بیان این دو ژن در ٧٢ ساعت بعد از تیمار نسبت به ٤٨ ساعت بعد از تیمار، کاهش‌یافته بود که نشان‌دهنده تغییر بیان این ژن‌ها در کشت سلولی شیرین‌بیان می باشد. سطح mRNA سیکلوازتنول سنتاز در کشت سلولی شیرین‌بیان نسبتاً پایدار بود در حالی‌که سطح mRNA بتاآمیرین‌سنتاز در کشت سلولی شیرین‌بیان به شدت تغییر کرده بود (Hayashi et al. 2001). در این مطالعه میزان بیان ژن *bAS* بعد از تیمار با متیل‌جاسمونات بیشتر از ژن *CYP88D6* بود زیرا ژن *bAS* در مسیر بیوسنتز سویاساپونین و گلیسیریزین (در مراحل اولیه بیوسنتز) ولی ژن *CYP88D6* فقط در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین دخالت دارد. (2000) .et al Hayashi نیز سطح mRNA بتاآمیرین‌سنتاز بالایی را مشاهده کردند، به‌طوری‌که همزمان در کشت سلولی شیرین‌بیان نیز سویاساپونین به طور فعال تولید شده بود. سطح mRNA بتاآمیرین‌سنتاز در کشت سلولی شیرین‌بیان با کاربرد صد میکرومولارمتیل جاسمونات افزایش و با کاربرد ١٠ تا ١٠٠ میکرومولار اسیدجیبرلیک کاهش یافته بود (.Hayashi et al 2004) که با نتایج این مطالعه با کاربرد متیل‌جاسمونات با غلظت ١٠٠ میکرومولار مطابقت دارد. با توجه به افزایش سطح mRNA این ژن‌ها در حضور متیل جاسمونات در کشت سلولی می‌توان گفت فرایند سنتز گلیسیریزین علاوه بر ریشه‌ها و استولن‌های شیرین بیان (Seki et al. 2008)، در کالوس نیز مشاهده می‌شود. به‌نظر می‌رسد آنچه که باعث تولید گلیسیریزین در کشت سلولی شده باشد، متیل جاسمونات بوده که باعث فعال‌سازی رونویسی ژن‌ها و تحریک تولید گلیسیریزین در این بافتها شده‌است. هم‌چنین حضور هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد مانند BA و NAA به‌عنوان القا کننده تولید کالوس نیز می‌تواند بر تحریک سنتز گلیسیریزین تاثیر گذار باشد، زیرا در مطالعات قبلی نیز تولید گلیسیریزین در حضور ترکیب هورمون‌های BA و NAA و هورمون TDZ سنتز ولی در حضور ترکیب هورمون‌های 2/4-D و Kin این متابولیت تولید نشده بود (Wongwich et al. 2008). کاربرد قارچ مایکوریز در شرایط تنش خشکی در شیرین‌بیان گونه *uralensis*، میزان گلیسیریزین را افزایش داده و با بیان ژن‌های *SQS1*، *bAS*، *CYP88D6* و *CYP72A154* همبستگی مثبت نشان داد (Xie et al. 2018). ژن‌های القا شده به‌وسیله متیل‌جاسمونات در اکثر گیاهان مدل نظیر آرابیدوپسیس شناسایی شده بود ولی بیان اکثر این ژن‌های القا شده بوسیله متیل‌جاسمونات ناپایدار بود (Sasaki et al. 2001). سطوح بالای mRNA ژن‌های *bAS* و *SQS* در کشت سلولی شیرین‌بیان گونه *glabra* در حضور ١٠٠ میکرومولار متیل جاسمونات برای بیشتر از سه روز بعد از تیمار دوام آورد در حالی‌که تجمع mRNA ژن PKR درگیر در بیوسنتز ٥ داکسی فلاونوئید ناپایدار بود (Hayashi et al. 2003). در این مطالعه نیز ژن *bAS* و *CYP88D6* در ٢٤ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات در غلظت ١٠٠ میکرومولار نسبت به کنترل افزایش بیان نشان داده و تا ٧٢ ساعت بعد از تیمار نیز نسبتاً پایدار و نسبت به کنترل افزایش بیان نشان دادند که این پایداری نسبی بیان در ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز می‌تواند دال بر وجود گلیسیریزین در کشت سلولی این گونه از شیرین‌بیان باشد. افزایش سطح mRNA ژن‌های *bAS* و *SQS*، تجمع بالای سویاساپونین در سلول‌های تیمار شده با متیل جاسمونات را تایید کرد (Hayashi et al. 2003) هم‌چنین در این مطالعه چون ژن *CYP88D6* در مسیر نهایی بیوسنتز گلیسیریزین دخالت دارد، افزایش بیان آن در ٤٨ ساعت و پایداری نسبی آن در ٧٢ ساعت بعد از تیمار، حضور گلیسیریزین را در سلولهای تیمار شده با متیل جاسمونات تایید کرد.

تاثیر متیل‌جاسمونات و جاسمونیک‌اسید در کشت سلولی گیاه *Catharanthus roseus* بررسی و مشاهده شده بود که سلول‌های کشت شده در حضور اکسین هیچ آلکالوئیدی تولید نکرده، در

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.6.4]

حالی‌که در حضور متیل‌جاسمونات و جاسمونیک اسید، توانایی تولید آلکالوئیدها در این گیاه القا شده بود (Gantet et al. 1998). در این مطالعه نیز افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین، نشان دهنده توانایی تولید این متابولیت در کشت سوسپانسیون سلولی شیرین‌بیان در حضور متیل‌جاسمونات می‌باشد در حالی‌که مطالعات قبلی عدم توانایی تولید گلیسیریزین را در کشت سلولی این گیاه نشان داده بود (Ayabe et al. 1990) و نیز بر اساس مطالعات انجام شده در گونه *inflate* حضور گلیسیریزین در کشت سلولی به اثبات رسیده بود (Le et al. 2014). تولید سنتلوزوئیدها و فیتوسترول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی *Centella asiatica* در حضور متیل‌جاسمونات بررسی شده و بیشترین میزان بیان ژن بتا آمیرین سنتاز (*CabAS*) که تشکیل سنتلوزاید را باعث می‌شود، در فاز ثابت رشدی سلول‌های تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولارمتیل جاسمونات، نسبت به کنترل مشاهده شد در حالی‌که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات تولید سنتلوزوئید نسبت به کنترل افزایش نیافته و افزایش بیان ژن بتاآمیرین‌سنتاز نیز مشاهده نشد (Bonfil et al. 2011). در این تحقیق نیز افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین در سلول‌های تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات درفاز ثابت رشدی در مقایسه با کنترل مشاهده شد. کاربرد ۲۲ میکرومولار متیل جاسمونات در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه درمنه در ۳۰ دقیقه بعد از تیمار بیشترین افزایش بیان را در ژن *CYP71AV1* و کاربرد ۲۰۰ میکرومولار مایکونازول نیز در ۳۰ دقیقه و ٤ ساعت بعد از تیمار به‌ترتیب بیشترین افزایش بیان را در ژن‌های *DBR2* و *CPR* را در برداشتند در حالی‌که در ٢٤ ساعت و ۵ روز بعد از تیمار نیز کاهش بیان در این ژن‌ها مشاهده شد (Caretto et al. 2011). در این مطالعه نیز ژن‌های *bAS*، *CYP88D6* در ٤٨ ساعت و ژن‌های *SQS* و *CYP72A154* ۷۲ ساعت بعد از تیمار بیشترین میزان بیان را داشته و بعد از آن روند کاهشی مشاهده شد که این افزایش بیان در زمان نسبتاً کوتاه می‌تواند نشان دهنده پاسخ نسبتاً سریع متیل‌جاسمونات در میزان بیان و تاثیر آن در افزایش بیان این ژن‌ها باشد. کاربرد ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در کشت سوسپانسیون سلولی سویا در روز سوم بعد از تیمار باعث افزایش بیان ژن‌های *GmCHS7* و *GmIFS2* (دخیل در مسیر بیوسنتز ایزوفلاونوئیدها در سویا) شد (Jeong et al. 2018) که با نتایج این تحقیق در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات درکشت سوسپانسیون سلولی شیرین بیان مطابقت دارد.

منابع

Allahdou M, Omidi M, Bihamta M, Abbasi A, Fakheri B (2019) Study of the effect of different antioxidants in reducing the browning of callus and its biomass production in two species of licorice. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 27: 120-131.

Ayabe S, Takano H, Fujita T, Furuya T, Hirota H, Takahashi T (1990) Triterpenoid biosynthesis in tissue cultures of *Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera. Plant Cell Reports 9: 181-184.

Bonfill M, Mangas S, Moyano E, Cusido R.M, Palazo J (2011) Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*. Plant Cell Tissue Organ Culture 104:61-67.

Caretto S, Quarta A, Durante M, Nisi R, De Paolis A, Blando F, Mita G (2011) Methyl jasmonate and miconazole differently affect arteminisin production and gene expression in *Artemisia annua*. Plant Biology 13: 51-58.

Chang S, Puryear S, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter 11: 113-116.

Hayashi H, Huang P, Kirkosyan A, Inoue K, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Kushiro T, Shibuya M Ebizuka,Y (2001). Cloning and Characterization of a cDNA Encoding b-Amyrin Synthase Involved in Glycyrrhizin and Soyasaponin Biosyntheses in Licorice. Biological and Pharmaceutical Bulletin 24: 912-916.

Hayashi H, Fukui H, Tabata M (1988) Examination of triterpenoids produced by callus and cell suspension cultures of *Glycyrrhiza glabra*. Plant Cell Reports 7: 508-511.

Hayashi H, Sakai T, Fukui H, Tabata M (1990) Formation of soyasaponins in licorice cell suspension cultures. Phytochemestry 29: 3127-3129.

Hayashi H, Huang P, Inoue P (2003) Up-regulation of Soyasaponin Biosynthesis by Methyl Jasmonate in Cultured Cells of *Glycyrrhiza glabra*. Plant Cell Physiology 44: 404-411.

Henry M, Marty B (1984) Isolation of licorice protoplasts (*Glycyrrhiza glabra* L. var. typica Reg. et Hed.) from cell suspension cultures not producing glycyrrhetinic acid. C. R. Academic Science Paris 3: 899-903.

Jennewein S, Rithner C-D, Williams R-M, Croteau R-B (2001) Taxol biosynthesis: taxane 13-hydroxylase is a

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.6.4]

cytochrome P450-dependent monooxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98:13595-13600.

Jeong Y, Han Han C, Park S-C, Pyun JW, Lee J-Y, Kim SW, Kim H-S, Kim YR, Jeong J.C, Kim CY (2018) Methyl jasmonate increases isoflavone production in soybean cell cultures by activating structural genes involved in isoflavonoid biosynthesis. Journal of Agricultural and Food Chemestry 9:1-38.

Li W, Asada Y, Yoshikawa T (2000) Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Photochemistry 55: 447-456.

Li Y, Yang Y, Fu C, Yu L (2012) Production of Glycirrhizin in cell suspension of *Glycirrhiza inflate* batalin cultured in Bioractor. Biotechnology & Biotechnological Equipment 26: 3231-3235.

Lu M.B, Wong H.L, Teng W.L (2001) Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. Plant Cell Reports 20: 674-677.

Mizukami H, Tavira Y, Ellis BE (1993) Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Reports 12:706-709.

Parsaeimehr A, Mousavi B (2009) Producing Friable Callus for suspension Culture in *Glycyrrhiza glabra*. Advances in Environmental Biology 3: 125-128.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29:45.

Saenz-Carbonell L, Loyola-Vargas, VM (1997) Datura stramonium hairy roots tropane alkaloid content as a response to changes in Gamborg's B5 medium. Applied Biochemistry and Biotechnology 61:321-337.

Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y. Kanako T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda T, Shimada H, Takamiya,K, Ohta H, Tabata S (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA microarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. DNA Research 8: 153-161.

Schoendorf A, Rithner C-D, Williams R-M, Croteau, R-B (2001) Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10-hydroxylase cDNA from Taxus and functional expression in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98:1501-1506.

Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T (2008) Licorice -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) 105: 14204-14209.

Seki H, Sawai S, Ohyama K, Mizutani M, Ohnishi T (2011) Triterpene Functional Genomics in Licorice for identification of *CYP72A154* involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. The Plant Cell 23: 4112-4123.

Shirazi Z, Aalami A, Tohidfar M, Sohani M.M (2016) Isolation, cloning and bioinformatics analysis of β-amyrin 11-oxidase coding sequence from licorice. Plant Omics Journal 9:165-171.

Teoh K-H, Polichuk D-R, Reed D-W, Nowak G, Covello P-S (2006) Artemisia annua L. (*Asteraceae*) trichome-specific cDNAs reveal *CYP71AV1*, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. FEBS Letters 580:1411-1416.

Toivonen L, Rosenqvist H (1995) Establishment and growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Plant Cell Tissue Organization 41:249-258.

Wongwicha W, Tanaka H, Shoyama W, Tuvshintogtokh I, Putaluna W (2008) Production of Glycyrrhizin in Callus Cultures of Licorice. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen, 63c:413-417.

Xie W, Hao Z, Zhou X, Jiang X, Xu L, Wu S, Zhao A, Zhang X, Chen B (2018) Arbuscular mycorrhiza facilitates the accumulation of glycyrrhizin and liquiritin in *Glycyrrhiza uralensis* under drought stress. Mycorrhiza 28:285-300.

Yoo S, Kim S (1976) Studies in tissue culture of medicinal plants (II). Tissue culture of *Glycyrrhiza glabra* L. var. glandulifera Reg. et Herder. Korean. Journal of Pharmacology 7:55-57.

Zarei A, Zamani Z, Mousavi A, Fatahi R, Karimi Alavijeh M, Dehsara B, Salami S.A (2012) An effective protocol isolation of high-quality RNA from Pomegranate seeds. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology 6: 32-37.

Zhang X, Ding X, Ji Y, Wang S, Chen Y, Luo J, Shen Y, Li P (2018) Measurement of metabolite variations and analysis of related gene expression in Chinese liquorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants under UV-B irradiation. Scientific Reports 8: 1-17.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.6.4]