

ارزیابی بیان کمی ژن‌های درگیر در تولید رنگ گلبرگ گل محمدی در مراحل مختلف نموی

امید رسولی^۱، نیما احمدی^{۲*}، سجاد رشیدی منفرد^۲ و مرضیه احمدیان^۴
^۱ دانشجویان دکتری، ^۲ استادیاران گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
^۴ نویسنده مسئول: Ahmadin@modares.ac.ir

چکیده

گل محمدی یکی از زیباترین گل‌های معطر جهان است که از نظر باغبانی (زینتی - دارویی) دارای اهمیت است. به طوری که گلبرگ‌های آن منبعی مناسب برای ذخیره متابولیت‌های ثانویه مفید و ارزشمند مانند عطر و رنگ‌ها می‌باشند. آنتوسیانین‌ها و کارتنوئیدها دو رنگیزه غالب در گلبرگ گیاهان گل محمدی می‌باشند. این آزمایش با هدف ارزیابی مولکولی دو ژن *GGPPS* و *ANS* به ترتیب دخیل در سنتز کارتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها انجام گرفت. پس از جداسازی RNA و ساخت cDNA، برای نخستین بار توالی کامل ژن *GGPPS* از گلبرگ گل محمدی جداسازی شد و در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی مشخص ثبت گردید. پس از طراحی پرایمر، میزان نسبی بیان دو ژن با تکنیک Real-time PCR ارزیابی شدند. نتایج حاصله نشان دادند که میزان نسبی بیان این دو ژن در مراحل مختلف نموی دارای اختلاف معنی‌داری هستند. به طوری که بیان ژن *ANS* در مرحله نیمه‌باز گل دارای بیشترین مقدار است. اما در حالی که بیان ژن *GGPPS* در مرحله گل تمام باز بیشترین مقدار را نشان داد. این طور استنتاج می‌شود که ژن‌های *GGPPS* و *ANS* ژن‌های کلیدی در سنتز رنگدانه‌های گل محمدی می‌باشند و تغییرات رنگ در اندام گلبرگ با کم و زیاد شدن بیان این ژن‌ها در ارتباط هستند. علاوه بر این، ژن *GGPPS* در سنتز مواد معطر مسیر ترپنوئیدها نیز دخیل می‌باشند.

کلمات کلیدی: جداسازی ژن *GGPPS*، رنگ، گل محمدی، مراحل نموی رشد گلبرگ، و Real-time PCR

مقدمه

گل محمدی با نام علمی *Rosa damascena* متعلق به خانواده رزاسه^۱ می‌باشد. خاستگاه اصلی این گیاه کشور ایران است که از منطقه سوریه وارد اروپا شده است و در حال حاضر ایران، بلغارستان و ترکیه اصلی‌ترین تولیدکننده‌های این گیاه هستند. استفاده از محصولات حاصل از گلبرگ این گیاه به طور اقتصادی در صنعت آرایشی و دارویی کاربرد دارد (Khosh-Khui, 2014).

آنتوسیانین‌ها و کارتنوئیدها از رنگیزه‌های مهم دخیل در تولید رنگ گیاهان می‌باشند (Tanaka et al., 2008). بررسی‌ها نشان داده است که این دو رنگیزه در گلبرگ‌های گل رز نیز تولید می‌شوند که غالب‌ترین آن‌ها آنتوسیانین‌ها هستند (Anderson, 2006). این رنگیزه جزء ترکیبات فلاونوئیدی قابل حل در آب است که در سیتوسل‌ها تولید می‌شوند و در واکوئل‌ها ذخیره می‌شوند (Tanaka et al., 2008). ژن آنتوسیانین سنتتاز^۲ *ANS* از ژن‌های دخیل در سنتز آنتوسیانین‌ها می‌باشد که با افزایش بیان این ژن مقدار آنتوسیانین‌ها در گلبرگ افزایش می‌یابد (Zvi et al., 2012). بررسی شده است که مقدار بیان این ژن در مراحل مختلف نموی متفاوت است (Schmitzer et al., 2010).

¹ Rosaceae

² Anthocyanin synthesis

رنگدانه کارتنوئیدها جزء ترکیبات ۴۰ کربنه می‌باشند که قابل حل در چربی‌اند و در پلاستیدها ساخته می‌شوند (Tanaka *et al.*, 2008). ژن ژرانیل ژرانیل پیروفسفات سنتتاز^۱ (GGPPS) یکی از ژن‌های بالا دست دخیل در سنتز کارتنوئیدها است. مطالعات نشان داده است که بیان این ژن در کاهش و افزایش مقدار کارتنوئیدها مؤثر بوده است (Huang *et al.*, 2009).

گل محمدی یکی از گونه‌های مهم رز بومی ایران، هم به‌عنوان یک گیاه زینتی و هم به‌عنوان گیاه دارویی دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. با توجه به نیاز برنامه‌های اصلاحی گل محمدی به اطلاعات اساسی اولیه، این آزمایش با هدف جداسازی ژن GGPPS انجام گردید. سپس برای درک عمیق، مطالعات کمی بیان ژن‌های ANS و GGPPS به‌وسیله Real-time PCR در مراحل مختلف نموی رشد گلبرگ کمی سنجی شدند.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۵ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، انجام گرفت. گل‌ها از بوته‌های گل محمدی موجود در باغ تحقیقاتی شرکت باربج اسانس در شهر کاشان جدا شده و گلبرگ‌های جدا شده و پس از انجماد در ازلت مایع به فریزر ۸۰- انتقال داده شدند. برداشت گل‌ها، در سه مرحله گل‌غنچه (A)، گل نیمه‌باز (B) و گل باز (C) انجام شد.

سرهم سازی خوانش‌ها و شناسایی ژن GGPPS

برای شناسایی ژن GGPPS و به‌منظور طراحی آغازگر از ۴۱۰ EST موجود در کتابخانه NCBI استفاده شد. پس از این توالی‌ها بر اساس نرم‌افزار Codon Code Aligner v.5.1 سرهم سازی شدند و یک توالی توافقی برای ژن به دست آمد. برای ترجمه توالی توافقی به قرائت باز از برنامه ORF finder استفاده شد. براساس توالی توافقی و از چارچوب قرائت شده دو آغازگر Forward و دو آغازگر Reverse طراحی شدند (جدول شماره ۲).

استخراج RNA، تیمار DNase، ساخت cDNA و انجام PCR

به‌منظور استخراج RNA از کیت استخراج RNA^۵ Invisorb^R Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex) استفاده شد. سپس کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد در دستگاه الکتروفورز تعیین گردید. جهت انجام تیمار DNase، RNA ۱۴۱ μ، DNaseI ۲۵/۰۱ μ، RNase inhibitor ۵/۰۱ μ، DNase buffer 10X ۲ μ و ۱۰ μ آب دو بار تقطیر به یک میکروتیوب^۶ ۰/۲ میلی‌لیتری اضافه و میکروتیوب به مدت نیم ساعت در دستگاه ترموسایکلر (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. سپس EDTA ۲۱ μ به میکروتیوب اضافه و مجدداً ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر قرار داده شدند. سپس با استفاده از الکتروفورز و ژل آگارز یک درصد، از حذف DNA از نمونه‌های تیمار شده با DNase اطمینان حاصل گردید. همچنین به‌منظور ساخت cDNA از کیت (ساخت شرکت GeneAll Biotechnolgy Co. Ltd) طبق پروتوکل استفاده گردید. در این پژوهش، ژن UBC به‌عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور انجام واکنش PCR، ابتدا ۱ μl Master mix (شرکت Ampliqon)، ۱۱ μl پرایمر پیشرو و معکوس (۲/۵ پیکومول بر میکرولیتر) به میکروتیوب‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد به هر میکروتیوب میزان ۲۱ μ از محصول cDNA رقیق شده اضافه شد تا حجم نمونه به ۱۲۱ μ برسد و عمل تکثیر بصورت ذکر شده در جدول ۱ صورت گرفت. با استفاده از الگوی cDNA و انجام فرآیند PCR، تکثیر باندهای

¹ Geranylgeranyl diphosphate synthesis

² Assembly

³ Reads

⁴ National Center for Biotechnology Information

⁵ RNA Extraction Kit

⁶ Micro tube

⁷ Ubiquitin-conjugating enzyme

ژن GGPPS انجام گردید و محصولات PCR بصورت تجاری توالی‌یابی شدند. توالی‌یابی ژن‌های مورد مطالعه در این آزمایش، توسط شرکت ماکروژن (در کره جنوبی) صورت گرفت.

جدول ۱- برنامه واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر

مرحله	حرارت (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۳۰
واسرشته‌سازی	۵۸	۴۰
اتصال	۷۲	۳۰
طویل شدن	۷۲	۳۰۰

تعداد چرخه‌های تکثیر ۳۳ تا می‌باشد

بیان کمی ژن GGPPS و ANS به روش qPCR

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به‌منظور تکثیر پرایمر ژن (جدول ۲) و قطعه مورد نظر، واکنش در ۴۰ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه در حضور ماده رنگی سایبر گرین به‌وسیله Real-time PCR مدل (Rotor Gene 3000, Corbett Life Science Co) انجام شد. نرمال‌سازی داده‌ها در حضور ژن خانه‌داری^۱ UBC انجام پذیرفت.

جدول ۲- لیست پرایمرهای استفاده شده در PCR

Use	Gene name	Primer name	Sequence
Nested-PCR	GGPPS	For. 1	5'CCTTACCTATTCAGACCCAGC3'
		For. ORF	5'GACCCGTTTCCTTCGCTTCT3'
		Rev. ORF	5'CAACAGCAGAATCCCAACTCC3'
		Rev. 1	5'AGGTGCTCCAATCCCACATC3'
qRT-PCR	GGPPS	For.	5'CACAAAAGTGGGCTCTTCT3'
		Rev.	5'AGTCCTCCCAGCAGTCTTC3'
	ANS	For.	5'GCTCGTCAACAAGGAGAAGG3'
		Rev.	5'GGTAGAGG CGAGAGCTTCCT3'
	UBC	For.	5'CCAAAGGTTGCATTCAGGAC3'
		Rev.	5'ACTTCTGGGTCCAGCTCCTT3'

نتایج

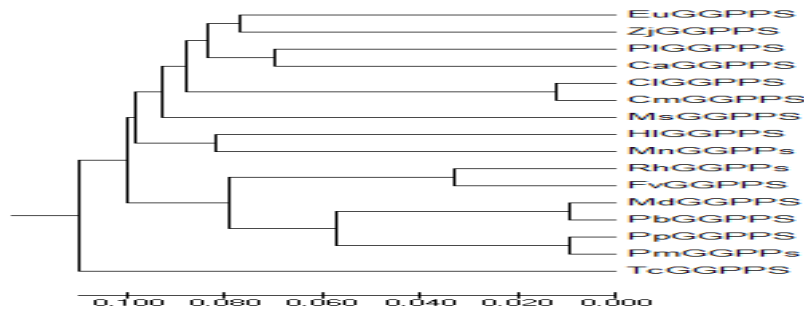
شناسایی، ثبت ژن در پایگاه NCBI و رسم ساختار درخت فیلوژنتیکی^۲

پس از توالی‌یابی، با استفاده از نتیجه به دست آمده، تمامی طول قطعه تکثیر شده ژن GGPPS شناسایی شد. آنالیزهای بیوانفورماتیکی نشان داد که طول چارچوب قرائت باز آن ۱۱۰۰ نوکلئوتید طول دارد و کد کننده ۳۶۳ آمینواسید است. سپس اطلاعات کامل ژن در پایگاه NCBI با شماره دسترسی KX661005 با عنوان ژرانیل ژرانیل پیروفسفات سنتتاز (GGPPS) ثبت شد. پس از شناسایی و ثبت، درخت فیلوژنتیکی توسط نرم‌افزار MEGA 6.06 به‌منظور تعیین رابطه عملکردی و تکاملی رسم گردید (شکل ۱).

¹Housekeeping gene

² Phylogenetic tree

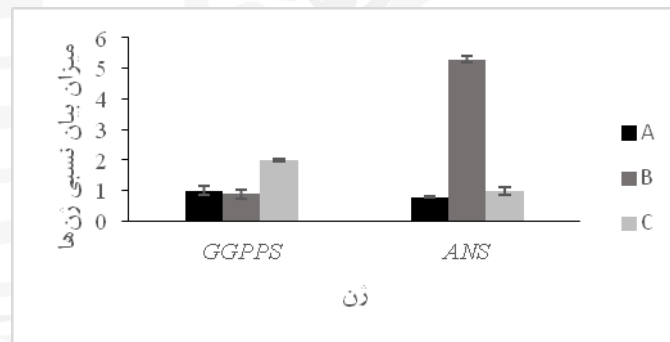
³ Open reading frame



شکل ۱- نمایش درخت فیلوژنتیکی عوامل رونویسی GGPPS

نتایج بررسی الگوی بیان ژن GGPPS و ANS

در این بخش به منظور درک بهتر از سنتز رنگیزه‌های کارتنوئید و آنتوسیانین، نتایج مقایسه الگوی بیان این دو ژن در سه مرحله نمو A، B و C در گلبرگ گل محمدی بررسی و ارائه شد. اساس بررسی بیان ژن در این حالت به صورت کمی است و با توجه به قابلیت نرم‌افزار به مرحله رشدی A عدد یک اختصاص داده شد. الگوهایی بیانی اختصاصی عامل رونویسی GGPPS و ANS در گونه *Rosa damascena* نشان دهنده اتصال صحیح و اختصاصی آغازگرها بوده است. بررسی میزان بیان ژن GGPPS در مراحل مختلف نمو رشد گلبرگ نشان داد (شکل ۲) که الگوی بیان آن بصورت افزایشی می‌باشد. بطوریکه بیان این ژن در مرحله آخر C دارای بیشترین مقدار بوده است و دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰.۵٪ با مرحله A داشته است. اما مقدار بیان این ژن در مرحله B به نسبت مرحله A تغییر چندانی نداشته است و تفاوت معنی‌داری با آن نداشته است. الگوی بیان ژن ANS با ژن GGPPS در مراحل مختلف نمو اندام گلبرگ متفاوت است. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است بیشترین میزان بیان این ژن در مرحله B بوده و تقریباً ۵/۹ برابر میزان شاهد افزایش بیان داشته است و دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰.۱٪ با شاهد را دارد.



شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن‌های GGPPS و ANS در مراحل مختلف نمو

بحث

رنگ موجود در گیاهان ناشی از وجود رنگیزه‌های گیاهی می‌باشند. کارتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها دو رنگیزه غالب در گیاهان هستند. بررسی‌ها نشان داده است که رنگ موجود در گلبرگ‌های گل رز عمدتاً ناشی از وجود آنتوسیانین‌ها می‌باشد. مقدار این رنگیزه به عوامل مختلفی مانند نوع واریته، مرحله نمو، pH و... بستگی دارد (Tanaka et al., 2008). کرمی و همکاران^۱ ۲۰۱۵ نشان دادند که مقدار آنتوسیانین‌ها در اندام گلبرگ در مراحل مختلف رویشی و در ژنوتیپ‌های مختلف گل محمدی متغیر است و بیشترین مقدار آن در مرحله غنچه نیمه‌باز گل محمدی می‌باشد. که

¹ Karami et al.

این تحقیق، با یافته‌های ما همخوانی داشت بطوریکه بیشترین بیان ژن ANS در مرحله B گلبرگ گل محمدی رخ داد. همچنین بررسی فیزیولوژیکی آنتوسیانین در این تحقیق تأیید کننده این یافته می‌باشد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). ژن *GGPPS* یکی از ژن‌های بالا دست در مسیر سنتز کارتنوئیدها می‌باشد. هوانگ و همکاران^۱ ۲۰۰۹ نشان دادند که کارتنوئیدها در اثر فعالیت یکسری ایزوژن‌ها شکسته می‌شوند و نهایتاً به ترکیبات کتونی β -damascenone که یکی از ترکیبات معطر گل محمدی هست تبدیل می‌شوند. ژن *GGPPS* برای اولین بار در این تحقیق شناسایی و ثبت در پایگاه داده NCBI شد. بررسی کمی بیان این ژن با تکنیک Real-time PCR نشان داد که بیان این ژن در طول دوره مختلف نموی گلبرگ در حال افزایش است. بیشترین بیان این ژن در مرحله C مشاهده شد و حدوداً ۲ برابر مرحله A افزایش بیان را نشان داد (شکل ۲). مطالعات فیزیولوژیکی محتوی کارتنوئیدها با این داده‌ها همخوانی داشت (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). پیشنهاد شده است که آنزیم‌های شکننده کارتنوئید^۲ مسئول تجزیه کارتنوئیدها می‌باشند و فعالیت این آنزیم‌ها در مراحل رو به پیری بالا می‌باشد (Takara *et al.*, 2008). پس فعالیت این آنزیم نیازمند سوبسترای کارتنوئیدی آن می‌باشد و افزایش بیان این ژن در این مطالعه در مرحله C بدین صورت قابل توجیه است. یا اینکه، با کاهش مقدار ساخت آنتوسیانین‌ها در بافت در مراحل پیری مسیر را برای سنتز کارتنوئیدها گیاهی مهیا می‌شود تا گیاه از این طریق رشد و بقاء خود را حفظ کند و بدین حالت، از طریق عطر و رنگ موجودات گرده‌افشان را به خود جذب کند.

منابع

- Anderson, N.O. ed. 2006. Flower breeding and genetics: issues, challenges and opportunities for the 21st century. Springer Science & Business Media.
- Huang, F.C., Horváth, G., Molnár, P., Turcsi, E., Deli, J., Schrader, J., Sandmann, G., Schmidt, H. and Schwab, W. 2009. Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. *Phytochemistry*; 70: 457-464.
- Karami, A., Niazi, A., Kavooosi, G., Khosh-Khui, M. and Salehi, H. 2015. Temporal characterization of 2-phenylethanol in strongly and weakly scented genotypes of damask rose. *Physiology and Molecular Biology of Plants*; 21:43-49.
- Khosh-Khui, M., 2014. Biotechnology of scented roses: a review. *International Journal of Horticultural Science and Technology*; 1: 1-20.
- Schmitzer, V., Veberic, R., Osterc, G. and Stampar, F., 2010. Color and phenolic content changes during flower development in groundcover rose. *Journal of the American Society for Horticultural Science*; 135: 195-202.
- Tanaka, Y., Sasaki, N. and Ohmiya, A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*; 54: 733-749.
- Zvi, M.M.B., Shklarman, E., Masci, T., Kalev, H., Debener, T., Shafir, S., Ovadis, M. and Vainstein, A. 2012. PAP1 transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. *New Phytologist*; 195:35-345.

¹ Huang *et al.*

² Carotenoid Cleavage

Characterization of Gene Expression Involving in Color Production During Flower Developmental of *Rosa Damascena*

Omid Rasouli¹, Nima Ahmadi^{*2}, Sajad Rashidi Monfared², Marziyeh Ahmadian¹

¹Department of Horticultural Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Department of Plant Breeding and Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding author: ahmadian@modares.ac.ir

Abstract

Rosa damascena Mill. is a beautiful aromatic flower with immense horticultural importance, signification from economical and research point of view. Petals of *Rosa damascena* are source of useful secondary metabolite such as volatile compounds and colors. Anthocyanin and carotenoids are main two pigments which produce in rose's petals plant. This research was conducted to study molecular characterization of *ANS* and *GGPPS* involving in Anthocyanin and carotenoids biosynthesis pathway, respectively. After RNA extraction and cDNA synthesis, complete sequences of *GGPPS* were isolated from *Rosa damascena* petals. *GGPPS* sequences were submitted in the NCBI databases. Relative expression of these gene were characterized by Real-time PCR. Results indicated a significant difference between relative expressions of genes in during flower development. Highest value of *ANS* gene were occurred in stage B during flower development. Meanwhile, highest value relative *GGPPS* gene expression were detected in open flower development (C). It can be concluded that *ANS* and *GGPPS* are key genes in pigments synthesis and the changes in flower's color which acquire an overexpression or suppression of these genes. In addition, the gene *GGPPS* may be play a key role in the biosynthesis of terpenoids compounds in *R. damascena*.

Keywords: color, *GGPPS* gene isolation, flower development, Real-time PCR, *Rosa damascena*

IrHC 2017
T e h r a n - I r a n