

مطالعه تظاهر و خصوصیات عملکردی ژن اسکوالن سنتاز در بافت‌های

مختلف سه مرحله نمو لاله واژگون با استفاده از qPCR

Functional properties and expression analysis of squalene synthase candidate gene in different Crown Imperia tissues, during three developmental stages using q-PCR

مهسا اسحاقی^۱، بهروز شیران^{۱*}، رودابه راوش^۱، حسین فلاحی^۲

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهرکرد،

شهرکرد

۲- استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

Eshaghi M¹, Shiran B^{*1}, Ravash R¹, Fallahi H²

1- MSc Student, Professor, Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Shahrekord University, Iran

2- Assistant Professor, Razi University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: beshiran45@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

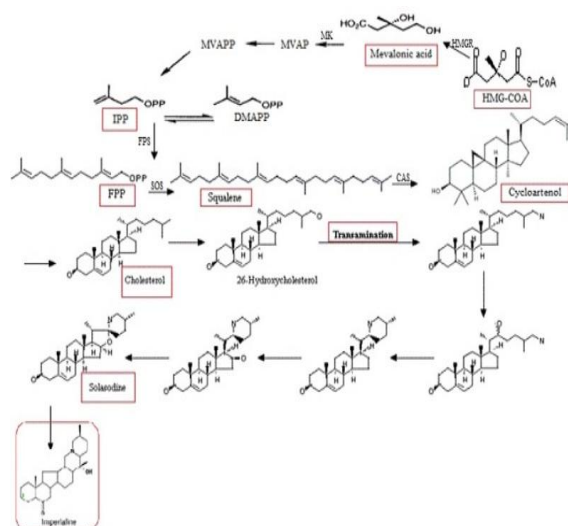
چکیده

لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*) از جمله گیاهان دارویی و زینتی با ترکیبات دارویی متعدد می‌باشد که در طب سنتی استفاده می‌شود. استروئید آکالوئید به‌عنوان ترکیب مؤثر اصلی در این گیاه است که دارای خواص ضدتوموری، ضدآلرژی و خنثی‌کننده اثر استیل کولین می‌باشد. در این مطالعه اسکوالن سنتاز (SQS) به‌عنوان ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز استروئید آکالوئیدها از داده‌های ترنسکرپتوم حاصل از RNA-Seq لاله واژگون انتخاب شد. توالی این ژن شباهت معنی‌داری با توالی‌های ژن SQS گیاهان گلدار موجود در پایگاه اطلاعات داده‌های NCBI از طریق Blastx نظیر *Fritillaria thunbergii*، *Phoenix dactylifera* و *Fritillaria unibracteata* داشت. نتایج حاصل از انجام هم‌ردیفی با clustal w نشان داد که این توالی‌ها در نواحی حفاظت شده منطبق بودند. نتایج تجزیه پروموتور نشان داد که پروموتور ژن SQS در لاله واژگون شامل عناصر پاسخ به نور، خشکی، جاسمونیک اسید، اکسین، عنصر پروموتوری هسته، تقویت‌کننده و سایر عناصر دیگر بود. حضور این عناصر تنظیمی نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن در مراحل مختلف رشدی، پاسخ به محیط و تولید متابولیت ثانویه را نمایان می‌کند. تجزیه و تحلیل بیان ژن SQS در بافت‌های مختلف (برگ، پیاز، گلبرگ، کاسبرگ، تخمدان، بساک و میوه) در سه مرحله‌ی مختلف نمو (شامل مرحله‌ی طولی شدن ساقه، مرحله‌ی توسعه گل و مرحله‌ی پر شدن دانه) ارزیابی شد. بالاترین میزان بیان ژن SQS در تخمدان، مرحله‌ی طولی شدن ساقه به‌دست آمد. بیان زیاد پتانسیل این ژن را در بهینه‌سازی تولید متابولیت ثانویه نشان می‌دهد. بررسی آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن SQS لاله واژگون در بافت‌ها و طی مراحل نمو مختلف وجود دارد.

واژه‌های کلیدی

استروئید آکالوئیدها
ژن اسکوالن سنتاز (SQS)
بیان ژن
لاله واژگون

لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*) یا اشک مریم از جمله ذخایر ارزشمند طبیعی و از ژئوفیت‌های زینتی، دارویی و بومی ایران است. این گیاه از زیر گروه تک‌لپه‌ها و یکی از ۲۲۰ جنس متعلق به خانواده لیلیاسه می‌باشد که مراحل عمده‌ی رشدی در لاله واژگون مرحله‌ی جوانه گل، مرحله‌ی رویشی، مرحله گل‌دهی و میوه دهی می‌باشد (Mustafa and Abdul-Razaq 2015). از *F. imperialis* برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله گلو درد، سرفه، آسم، برونشیت، سل، تورم غدد لنفاوی گردن، اختلالات غدد تومور و سوزش ادرار استفاده می‌شود (Bailey 1966; Perry and Metzger 1980). استروئید آلکالوئیدها ماده مؤثره اصلی در لاله واژگون می‌باشد (Akhtar et al. 2003). بیوسنتز استروئید آلکالوئیدها یک روند عمومی مسیر سنتز استروئید یا تریترین را در گیاهان طی می‌کند (Cordell 2008). ترکیباتی از جمله استیل کوآنزیم آ، موالونیک اسید، ایزوپنتیل پیروفسفات، فارنسیل پیروفسفات، اسکوالن سیسلوآرتینول و کلسترول در این مسیر وجود دارند که بسیاری از اکسیدازها، ایزومرازا و ترانسفرازا در تبدیل کلسترول به استروئید آلکالوئیدها شرکت دارند (شکل ۱).

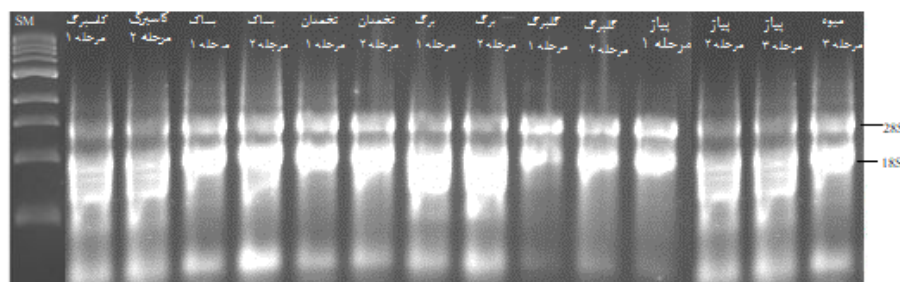


شکل ۱- مسیر بیوستز استروئید آکالوئیدها در لاله واژگون با استفاده از KEGG. هیدروکسی متیل کو آنزیم آ (HMG)، مولونیک اسید (MA)، ایزوپنتیل پیروفسفات (IPP)، فارنسیل پیروفسفات (FPP)، اسکوالن (squalene)، سیسولوارتنول (cycloarteno) و کلسترول (cholesterol) و سلونیدین (Solasonine) و امپالین (imperialine)

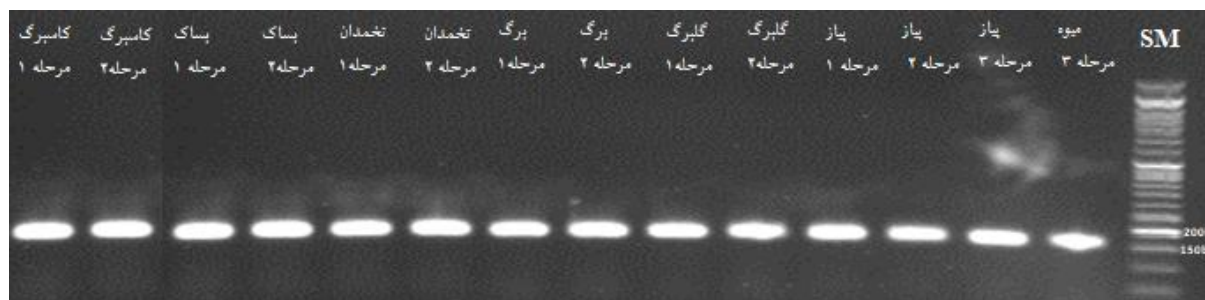
دارد (به دلیل فقدان گونه نزدیک با لاله واژگون که توالی یابی ژنوم آن صورت گرفته باشد از برنج استفاده شد). بنابراین برای آنالیز پروموتور، توالی معادل ۲ کیلوباز بالا دست ژن های هم ردیف شده با ژنوم برنج استخراج شد. سپس این توالی ها برای به دست آوردن عناصر تنظیم کننده و از طریق سایت Plant CARE مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه برداری از بافت های مختلف لاله واژگون شامل بساک، تخمدان، گلبرگ، کاسبرگ، ساقه، برگ و پیاز صورت گرفت. این نمونه ها در سه مرحله نمو شامل طویل شدن ساقه (زمانی که ارتفاع گیاه حدود ۶ سانتی متر و به صورت روزت تازه از خاک بیرون زده بود)، مرحله توسعه گل و غنچه سالم، پر شدن دانه در ماه های فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۹۵ از دشت لاله واژگون کوه رنگ (مختصات: ۳۲°۳۴'۸" شمالی ۵۰°۱۲'۶.۲۴" شرقی) جمع آوری شدند. نمونه ها تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. جداسازی RNA کل به روش تراپزول (TRIzol® reagent) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (شکل ۲). به منظور ساخت رشته اول cDNA از ۲ میکروگرم RNA و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه برداری معکوس thermo استفاده شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و برای واکنش خاتمه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. الگوی بیان ژن اسکوالن سنتاز به عنوان ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز استروئید آلکالوئیدها در بافت های مختلف لاله واژگون و در مراحل مختلف نمو با qPCR مورد بررسی قرار گرفت. به منظور طراحی آغازگر برای این ژن از نرم افزار آنلاین پرایمر ۳ (<http://primer3.ut.ee>) استفاده شد. پس از طراحی، آغازگر جهت سنتز به شرکت ماکروژن کره سفارش

داده شد. توالی آغازگرهای اختصاصی مستقیم 5'AGGGTCATGGACCAACAAA3' و معکوس 5'GCATCCCCTTTTATTCAGCA3' بود. در این تحقیق گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز که بیشترین ثبات بیان را داشت به عنوان ژن کنترل داخلی جهت نرمال سازی ژن مورد بررسی استفاده شد. توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس مربوط به *GAPDH* به ترتیب 5'GTGGTCCAGGGGTCTTACTC3' و 5'CTGACTTCAACAGCGACACC3' بودند. واکنش qPCR با استفاده از مخلوط واکنش Takara حاوی SAYBR Green و آغازگر مربوط به ژن صورت گرفت. مخلوط واکنش در حجم کل ۱۲ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر cDNA (diluted 1:2)، آغازگر رفت و برگشت هر کدام ۰/۸ μM و مخلوط Takara Mix به میزان ۶ میکرولیتر بود و نمونه ها در دستگاه Roter-Gene Q (Qiagen) قرار داده شدند. چرخه دمایی استفاده شده در واکنش qPCR تحت شرایط ۹۵ درجه سانتی گراد در مدت ۳۰ ثانیه به منظور واسرشت سازی اولیه، سپس ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد یک دقیقه در ۴۰ سیکل انجام گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و با safe stain رنگ آمیزی شدند (شکل ۳). برای آنالیز شدت بیان در بافت های مختلف از روش Comparative Quantitation (روشی برای مقایسه بین چند حالت) (McCurdy et al. 2008) توسط نرم افزار Rotor-Gene software, Corbett) استفاده شد. هم چنین از میزان بیان برگ مرحله توسعه گل به عنوان کالیبراتور بافتی جهت مقایسه بین حالت های مختلف (دارای کم ترین میزان بیان در بین بافت ها و مراحل نمویی مختلف) استفاده شد.



شکل ۲- ژل الکتروفورز مربوط به استخراج RNA در بافت های مختلف کاسبرگ، بساک، تخمدان، برگ، گلبرگ، پیاز و میوه سه مرحله نمو لاله واژگون



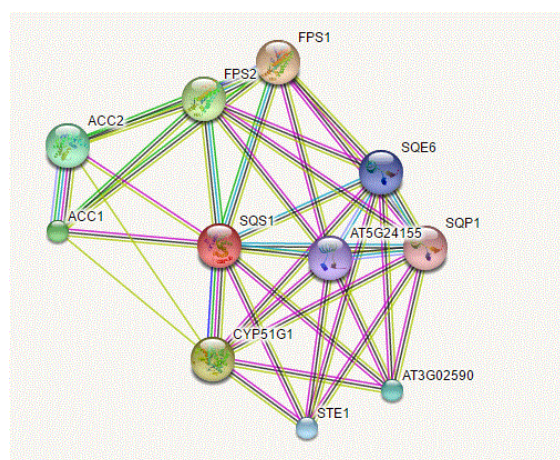
شکل ۳- ژل الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژن SQS در بافت‌های مختلف سه مرحله‌ی نموی لاله واژگون (اندازه محصول ۱۷۷bp).

ژن SQS در بسیاری از گیاهان از جمله *Fritillaria thunbergii*، *Elaeis guineensis*، *Phoenix dactylifera* و *Fritillaria unibracteata* در پایگاه اطلاعات داده NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) از طریق Blastx شناسایی و جداسازی شده‌است. مقایسه توالی مربوط به ژن SQS در این گیاهان که از رکوردهای اولیه حاصل از Blastx با $E\text{-value cut off} > 10^{-5}$ انتخاب شدند با لاله واژگون، همولوژی بالای (بیش از ۸۰ درصد) این ژن در لاله با گیاهان مذکور را مشخص کرد. انجام هم‌ردیفی با clustal w نشان داد که این توالی‌ها در نواحی حفاظت شده منطبق بودند و اختلافات موجود مربوط به نواحی غیر کننده بود (شکل ۵). نتایج حاصل از بررسی پروموتور ژن SQS وجود تعداد متنوعی عناصر تنظیمی با نقش‌های متفاوت را در این گیاه نمایان نمود (جدول ۱).

<i>Fritillaria unibracteata</i>	NGHKEALHPEDLYLVVKHRAAAQVEKQIPDPHAFCTYHLQKVSRSFAPVQQLGT
<i>Fritillaria thunbergii</i>	NGHKEALHPEDLYLVVKHRAAAQVEKQIPDPHAFCTYHLQKVSRSFAPVQQLGT
<i>Fritillaria imperialis</i>	NGHKEALHPEDLYLVVKHRAAAQVEKQIPDPHAFCTYHLQKVSRSFAPVQQLGT
<i>Phoenix dactylifera</i>	HRMLGAIVEHPEELVPLVKHAAARZKQZGEPHAFCTYHLQKVSRSFALVIZQQLGP
<i>Elaeis guineensis</i>	NGHKGATHEHPEDLYLVVKHAAADRZKQZGEPHAFCTYHLQKVSRSFALVIZQQLGL
<i>Fritillaria unibracteata</i>	DLRNACVFYLVLRALDTVEDGTSIPEDIKVPILESFHRHIVNPKHFCSTGDKYKVLMD
<i>Fritillaria thunbergii</i>	DLRNACVFYLVLRALDTVEDGTSIPEDIKVPILESFHRHIVNPKHFCSTGDKYKVLMD
<i>Fritillaria imperialis</i>	DLRNACVFYLVLRALDTVEDGTSIPEDIKVPILESFHRHIVNPKHFCSTGDKYKVLMD
<i>Phoenix dactylifera</i>	ELRNACVFYLVLRALDTVEDGTSIPEDIKVPILESFHRHIVNPKHFCSTGDKYKVLMD
<i>Elaeis guineensis</i>	ELRNACVFYLVLRALDTVEDGTSIPEDIKVPILESFHRHIVNPKHFCSTGDKYKVLMD
<i>Fritillaria unibracteata</i>	NFRNISTAFLELGSQVEGIEDITERNGRGAHFKICEVETVDVDEYCHYVAGLVGLGL
<i>Fritillaria thunbergii</i>	NFRNISTAFLELGSQVEGIEDITERNGRGAHFKICEVETVDVDEYCHYVAGLVGLGL
<i>Fritillaria imperialis</i>	NFRNISTAFLELGSQVEGIEDITERNGRGAHFKICEVETVDVDEYCHYVAGLVGLGL
<i>Phoenix dactylifera</i>	KFYHVSATFLELGSQVEGIEDITERNGRGAHFKICEVETVDVDEYCHYVAGLVGLGL
<i>Elaeis guineensis</i>	KFYHVSATFLELGSQVEGIEDITERNGRGAHFKICEVETVDVDEYCHYVAGLVGLGL
<i>Fritillaria unibracteata</i>	SKLFYASGSEDLAEDHLSNGLFLQKTNITRDYLEDINEPKSRMFHPRATISKYVDKL
<i>Fritillaria thunbergii</i>	SKLFYASGSEDLAEDHLSNGLFLQKTNITRDYLEDINEPKSRMFHPRATISKYVDKL
<i>Fritillaria imperialis</i>	SKLFYASGSEDLAEDHLSNGLFLQKTNITRDYLEDINEPKSRMFHPRATISKYVDKL
<i>Phoenix dactylifera</i>	SKLFYASGSEELAPDSLSNGLFLQKTNITRDYLEDINEPKSRMFHPRATISKYVASKL
<i>Elaeis guineensis</i>	SKLFYASGSEELAPDSLSNGLFLQKTNITRDYLEDINEPKSRMFHPRATISKYVASKL
<i>Fritillaria unibracteata</i>	EDLKYENSTQAVQCLNDVNTNALLHAQDCLKYLSDKLSNFRFCAIPQIAIGTLALC
<i>Fritillaria thunbergii</i>	EDLKYENSTQAVQCLNDVNTNALLHAQDCLKYLSDKLSNFRFCAIPQIAIGTLALC
<i>Fritillaria imperialis</i>	EDLKYENSTQAVQCLNDVNTNALLHAQDCLKYLSDKLSNFRFCAIPQIAIGTLALC
<i>Phoenix dactylifera</i>	EDLKYENSTQAVQCLNDVNTNALLHAQDCLKYLSDKLSNFRFCAIPQIAIGTLALC
<i>Elaeis guineensis</i>	EDLKYENSTQAVQCLNDVNTNALLHAQDCLKYLSDKLSNFRFCAIPQIAIGTLALC
<i>Fritillaria unibracteata</i>	YNNVEIFRGVVKRRGVARVNDQTRTSDVVGAFEFSSLLKSKIDNDPNIANLTRRI
<i>Fritillaria thunbergii</i>	YNNVEIFRGVVKRRGVARVNDQTRTSDVVGAFEFSSLLKSKIDNDPNIANLTRRI
<i>Fritillaria imperialis</i>	YNNVEIFRGVVKRRGVARVNDQTRTSDVVGAFEFSSLLKSKIDNDPNIANLTRRI
<i>Phoenix dactylifera</i>	YNNVEIFRGVVKRRGLTARVNDQTRTSDVVGAFEFSSLLKSKIDNDPNIANLTRRV
<i>Elaeis guineensis</i>	YNNVEIFRGVVKRRGLTARVNDQTRTSDVVGAFEFSSLLKSKIDNDPNIANLTRRV
<i>Fritillaria unibracteata</i>	EAIQNSCVKSGMLNKRGRHYRSPAYNSVITLALLVSLFAVIATK
<i>Fritillaria thunbergii</i>	EAIQNSCVKSGMLNKRGRHYRSPAYNSVITLALLVSLFAVIATK
<i>Fritillaria imperialis</i>	EAIQNSCVKSGMLNKRGRHYRSPAYNSVITLALLVSLFAVIATK
<i>Phoenix dactylifera</i>	EAIHKACISSGMLNKRGRHYRSPAYNSVITLALLVSLFAVIATK
<i>Elaeis guineensis</i>	EAIHKACISSGMLNKRGRHYRSPAYNSVITLALLVSLFAVIATK

شکل ۵- هم‌ردیفی ژن اسکوالن سنتاز در لاله واژگون با *Fritillaria thunbergii*، *Phoenix dactylifera*، *Fritillaria unibracteata* و *Elaeis guineensis*

جهت مقایسه بافت‌های مختلف و در مراحل مختلف نموی از روش مقایسه میانگین دانکن با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری ۰/۰۵ از نرم‌افزار STATISTICA استفاده شد. در واقع تولید متابولیت ثانویه در نتیجه همکاری چند ژن در مسیر بیوسنتز استروئید آلکالوئیدها می‌باشد که ژن اسکوالن سنتاز نقش مهمی در این مسیر ایفا می‌کند. بررسی برهم کنش پروتئینی در سایت ExPASy نشان می‌دهد که ژن SQS محصول ژن FPS واقع در سوبسترای FPS را برای اسکوالن سنتاز (SQS) فراهم می‌آورد (Tholl and Sungbeon 2011). با توجه به نقش *CYP51G1* در هیدروکسیله کردن استروئیدها در آرکیدوپسیس (Choe et al. 1998) پیش‌بینی می‌شود که محصول ژن SQS توسط *CYP51G1* در مسیر بیوسنتز استروئید آلکالوئیدها در لاله واژگون هیدروکسیله شود. بررسی برهم کنش پروتئینی حضور ژن‌های شناخته شده‌ای نظیر ACC و SQP نشان می‌دهد که در سنتز انواع استرول‌های گیاهی دخیل می‌باشند (شکل ۴).



شکل ۴ - برهم‌کنش پروتئینی پیش بین شده برای ژن SQS در مسیر بیوسنتز استروئیدها از طریق سایت ExPASy (www.ExPASy.org) (۲۰۱۷).

مطالعات نشان داد که نور از جمله عوامل محیطی مهم در تنظیم بیان ژن می‌باشد. همچنین عناصر تنظیمی در پاسخ به تنش‌های محیطی نظیر خشکی و نیز موتیف‌های تنظیم‌کننده متعددی مانند G-box, G-Box, GT1-motif به عنوان عناصر پاسخ‌دهنده به واکنش‌های نوری در پروموتور ژن مورد مطالعه حضور دارند. نظر به اهمیت هورمون‌های گیاهی در کنترل شرایط رشد و نمو در شرایط مختلف محیطی و تولید متابولیت‌های ثانویه مثل استروئید آلکالوئیدها (Mahalakshmi et al. 2013)، حضور موتیف‌های تنظیمی پاسخ‌دهنده به هورمون‌های گیاهی از جمله موتیف‌های ABRE (پاسخ‌دهنده به آبسزیک اسید)، TGA-element (عنصر پاسخ دهنده به اکسین)، P-box (عنصر پاسخ جیبرلین) در بررسی

عناصر تنظیمی موجود در پروموتور ژن مذکور قابل توجه است. بنابراین این عوامل می‌توانند روی بیان ژن اسکوالن سنتاز مؤثر باشد. نتایج حاکی بر وجود عناصر تنظیمی متصل شونده به MYB از جمله MBS می‌باشد که MYB از جمله پروتئین‌های تنظیمی مهم است که در فرآیندهای مختلفی مانند فرآیندهای رشد و نمو، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، تمایز و فرآیندهای متابولیسمی به‌ویژه در تولید متابولیت ثانویه دخیل می‌باشد (Ambawat et al. 2013). همچنین عمده‌ترین عنصر تنظیمی مربوط به TATA-box از جمله عناصر پروموتوری هسته‌ای، فعال در نظر گرفته می‌شود (Yang et al. 2007).

جدول ۱- پیش‌بینی عناصر تنظیمی در پروموتور ژن SQS در لاله واژگون با استفاده بانک اطلاعاتی Plant CARE.

نام عنصر تنظیمی	توالی	عملکرد موتیف	تعداد موتیف
5UTR Py-rich stretch	TTTCTTCTCT	دارای سطح رونویسی بالا	۱
AAGAA-motif	GAAAGAA	-	۳
ABRE	GCCGCGTGGC و TAC GTG	عنصر پاسخ‌دهنده به آبسزیک اسید	۲
ACE	ACTACGTTGG	عنصر تنظیمی پاسخ به نور	۱
ARE	TGGTTT	عنصر تنظیمی ضروری برای القای هوازی	۲
ATCT-motif	AATCTAATCC	بخشی از ناحیه محافظت شده DNA دخیل در پاسخ نوری	۲
Box I	TTTCAAA	عنصر پاسخ به نور	۱
CAAT-box	CAAAT	عنصر رایج در پروموتور و ناحیه تقویت کننده	۲۱
CCAAT-box	CAACGG	ناحیه اتصال MYBHv1	۲
CGTCA-motif	CGTCA	عنصر تنظیمی دخیل در پاسخ متیل جاسمونات	۱
CTAG-motif	ACTAGCAGAA	-	۱
G-Box	CACGTA	عنصر تنظیمی دخیل در پاسخ نوری	۱
G-box	CACGAC و GTACGTG و TACGTG و CACGAC	عنصر تنظیمی دخیل در پاسخ نوری	۴
GT1-motif	AATCCACA	عنصر پاسخ نوری	۱
MBS	TAACGTG و CAACGTG	اتصال به ناحیه MYB دخیل در القای خشکی	۲
MNF1	GTGCCC(A/T)(A/T)	عنصر پاسخ نوری	۱
MRE	AACCTAA	اتصال به ناحیه MYB دخیل در پاسخ نوری	۳
P-box	CCTTTTG	عنصر پاسخ جیبرلین	۱
Sp1	CC(G/A)CCC	عنصر پاسخ نوری	۱
TA-rich region	TATATATATATATATATATA	تقویت کننده	۲
TATA-box	TATAAAT و TTTTA و TATATAA	عنصر پروموتوری هسته‌ای	۱۰۱
TGA-element	AACGAC	عنصر پاسخ دهنده به اکسین	۲
TGACG-motif	TGACG	عنصر تنظیمی پاسخ نوری	۱
Unnamed__1	CGTGG	-	۳
Unnamed__13	TCCAAGTATA	-	۱
Unnamed__3	CGTGG	-	۳
Unnamed__4	CTCC	-	۱۴

حفاظتی این ترکیبات و برهمکنش گیاه و پاتوژن‌ها باشد. نتایج مربوط به بیان متفاوت ژن SQS در مسیر بیوسنتز استروئیدها در بافت‌های مختلف *Euphorbia pekinensi*, *Solanum nigrum* (Sun et al. 2012; zheng) و تنباکو توسط محققان بررسی شده است (Devarenne et al. 2002; et al. 2013). همچنین بیان متفاوت این ژن در مراحل مختلف رویشی در *Dioscorea zingiberensis* مشخص شده است (Ye et al. 2014). مقایسه شدت بیان این ژن در بافت‌های مختلف آرابیدوپسیس با شماره دسترسی AT4G34640 در پایگاه مرورگر (<http://www.bar.utoronto.ca>) نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن SQS در بافت گل از جمله در اندام زایشی نر و ماده گزارش داده شده است (Winter et al. 2007) و در لاله واژگون نیز در تخمدان به عنوان بافت زایشی بیشترین بیان مشاهده شد. بیان هزار برابری SQS در تخمدان در مرحله‌ی توسعه گل می‌تواند پتانسیل این ژن را در مهندسی متابولیت ثانویه جهت تولید پیش‌سازهای استروئیدی در مسیر بیوسنتز استروئید آلکالوئیدها نسبت به سایر بافت‌ها در مراحل نموی مختلف نشان دهد. مطالعات مربوط به بررسی آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و افزایش بیان ژن‌ها گامی مهم در طراحی استراتژی‌های هدف‌دار جهت افزایش تولید متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی می‌باشد به‌ویژه در لاله واژگون که به عنوان یکی از ژئوفیت‌های دارویی و بومی ایران شناخته می‌شود. همچنین این مطالعات می‌تواند رهنمودی هدفمند برای مهندسی متابولیت و مطالعات ژنومیک عملکردی و مقایسه‌ای تلقی شود.

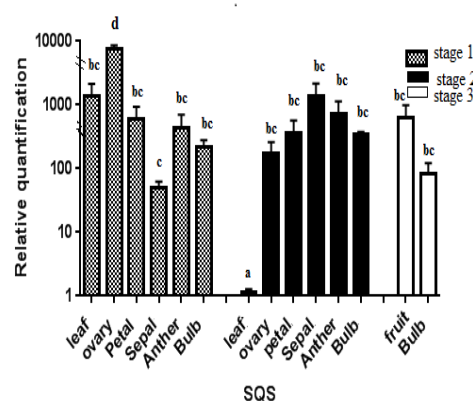
سپاسگزاری

از دانشگاه شهرکرد برای فراهم نمودن بخشی از هزینه‌های این تحقیق کمال تشکر را داریم.

منابع

Akhtar MN, Choudhary MI, Sener B, Erdogan I and Tsuda Y (2003). New class of steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis*. *Phytochemistry* 63:115-122.

نتایج حاصل از qPCR در لاله واژگون برای ژن *FiSQS* نشان داد که افزایش بیان قابل توجه در بافت تخمدان مرحله طویل شدن ساقه در بین تمام بافت‌ها سه مرحله نموی وجود دارد. همچنین کمترین بیان در بافت برگ مرحله توسعه گل نسبت به سایر بافت‌ها و مراحل نموی مختلف مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین دانکن نشان داد که در بافت پیاز سه مرحله نموی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین بساک و گلبرگ در مرحله طویل شدن ساقه و توسعه گل نیز اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. در مرحله پر شدن دانه بین بافت‌های میوه و پیاز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما بافت‌های برگ، کاسبرگ و تخمدان در مرحله طویل شدن ساقه و توسعه گل اختلاف معنی‌داری نشان دادند (شکل ۶).



شکل ۶- الگوی بیان ژن *FiSQS* در بافت‌های مختلف تخمدان، بساک، میوه، برگ، گلبرگ، کاسبرگ و پیاز سه مرحله نموی گیاه لاله واژگون با مقایسه میانگین آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد

بررسی آماری میزان بیان ژن در گیاه لاله واژگون بیانگر بیان متفاوت در بافت‌های مختلف و طی مراحل نمو بود. تفاوت بیان در بافت‌های مختلف در گیاهان ممکن است مربوط به ماهیت، وظیفه، عملکرد بافت، نقش در مسیرهای تمایزی، نمو و

Ambawat S, Sharma P, Yadav NR, and Yadav RC (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19:307-321.

- Badfar-Chaleshtori S, Shiran B, Kohgard M, Mommeni H, Hafizi A, Khodambashi M, Mirakhorli N and Sorkheh K. (2012). Assessment of genetic diversity and structure of Imperial Crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations in the Zagros region of Iran using AFLP, ISSR and RAPD markers and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 42: 35-48.
- Bailey LH (1966) Manual of cultivated plants. Mac Millan Company. New York 218-219.
- Cordell GA (2008) The alkaloids: chemistry and biology. Academic Press, California, USA 109-144.
- Devarenne TP, Ghosh A and Chappell J (2002) Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in *tobacco*. *Plant Physiology* 129:1095-1106.
- Kelly LJ, Renny-Byfield S, Pellicer J, Macas J, Novák P, Neumann P, Lysak MA, Day PD, Berger M, Fay MF and Nichols RA (2015) Analysis of the giant genomes of *Fritillaria* (Liliaceae) indicates that a lack of DNA removal characterizes extreme expansions in genome size. *New Phytologist* 208:596-607.
- Mahalakshmi R, Eganathan P, Parida A (2013) Salicylic acid elicitation on production of scondray metabolite by cell cultures of *Jatropha curcas* L. 5:655-659
- McCurdy RD, McGrath JJ and Mackay-Sim A (2008) Validation of the comparative quantification method of real-time PCR analysis and a cautionary tale of housekeeping gene selection. *Gene Molecular Biology* 12:15-24.
- Mustafa LH, Abdul-Razaq RT (2015) A Comparative Systematic Study of the Genus *Fritillaria* L. (Liliaceae) in Iraqi Kurdistan Region. *Advances in BioResearch* 6:14-24.
- Perry LM, Metzger J (1980) Medicinal plants of east and south-east Asia: attributed properties and uses. Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, Massachusetts, USA 236-237.
- Sun Y, Zhao Y, Wang L, Lou H, Cheng A (2012) Cloning and expression analysis of squalene synthase, a key enzyme involved in antifungal steroidal glycoalkaloids biosynthesis from *Solanum nigrum*. *Drug Discoveries and Therapeutics* 6:242-248.
- Tholl D, Sungbeon L (2011) Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. The *Arabidopsis* Book. The American Society of Plant Biologists Press. Washington, USA 143-146.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson G.V and Provart N.J (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS One* 2:718-725.
- Yang, C, Bolotin E, Jiang T, Sladek F.M, Martinez E (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene Journal* 389:52-65.
- Ye Y, Wang R, Jin L, Shen J Li X, Yang T, Zhou M, Yang Z, Chen Y (2014) Molecular cloning and differential expression analysis of a squalene synthase gene from *Dioscorea zingiberensis*, an important pharmaceutical plant. *Molecular Biology Reports* 41:6097-6104.
- Zheng Z, Cao X, Li C, Chen Y, Yuan B, Xu Y, Jiang J (2013) Molecular cloning and expression analysis of a squalene synthase gene from a medicinal plant *Euphorbia pekinensis* Rupr. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:3007-3014.