

بررسی نحوه پاسخ ژن‌های تریکومی *Artemisia annua* و *Arabidopsis thaliana* به الیستورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید

Study on *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana* trichome genes in response to methyl jasmonate and salicylic acid elicitors

محبوبه زارع مهرجردی^{*}، محمدرضا بی‌همتا^۱، منصور امیدی^۲، محمدرضا نقوی^۳ و حسن سلطانلو^۴

۱-دانشجوی دوره دکتری و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲-استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Zare Mehrjerdi M^{*1}, Bihamta MR², Omidi M³, Naghavi MR⁴, Soltanloo H⁵

۱,2,3,4. PhD Student, Professors, University College of Agricultural and Natural Resources,
University of Tehran

5. Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan,
Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mzarem@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹)

چکیده

آرتمیزینین یک سزکوئی تربن لاكتون است که در تریکومهای چند سلولی غده‌ای ترشحی گیاه *Artemisia annua* (درمنه) تولید می‌شود و در درمان بیماری‌های مختلف از جمله مalaria و سلطان کاربرد دارد. به دلیل پایین بودن میزان تولید این ترکیب دارویی ارزشمند در گیاه درمنه، تلاش برای افزایش تولید آن ضروری است. در این مطالعه، به منظور روش‌شن شدن اثر احتمالی کاربرد برون زاد متیل جاسمونات (MeJA) و سالیسیلیک اسید (SA) بر روی تولید آرتمیزینین از طریق تأثیر بر روی تریکومها، تغییرات بیانی ژن‌های شناخته شده موثر در تشکیل و نمو تریکوم در گیاه درمنه در پاسخ به این دو محرك، به کمک روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای بدست آوردن اطلاعات بیشتر در ارتباط با نحوه پاسخ ژن‌های موثر در تشکیل و نمو تریکوم به این دو عامل محرك و با توجه به کمبود اطلاعات در زمینه ژن‌های تریکومی در گیاه درمنه، داده‌های میکرواری موجود در بانک اطلاعاتی EBI مربوط به ژن‌های تریکومی گیاه مدل آراییدوپسیس در پاسخ به آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که MeJA با تأثیر مثبت بر روی بیان ژن‌های دخیل در شکل گیری، اندازه و جهت گیری رشد تریکوم، بر روی تریکومها تأثیر گذاشته و SA دارای تأثیر منفی بر روی آنها است. همچنین ژن TTGI درمنه هم به عنوان کاندیدای مناسب برای انجام مطالعات بیشتر جهت استفاده از آن در مهندسی تریکوم به منظور افزایش تولید آرتمیزینین معرفی شد.

واژه‌های کلیدی

آرتمیزینین
تریکوم
سالیسیلیک اسید
متیل جاسمونات
Artemisia annua

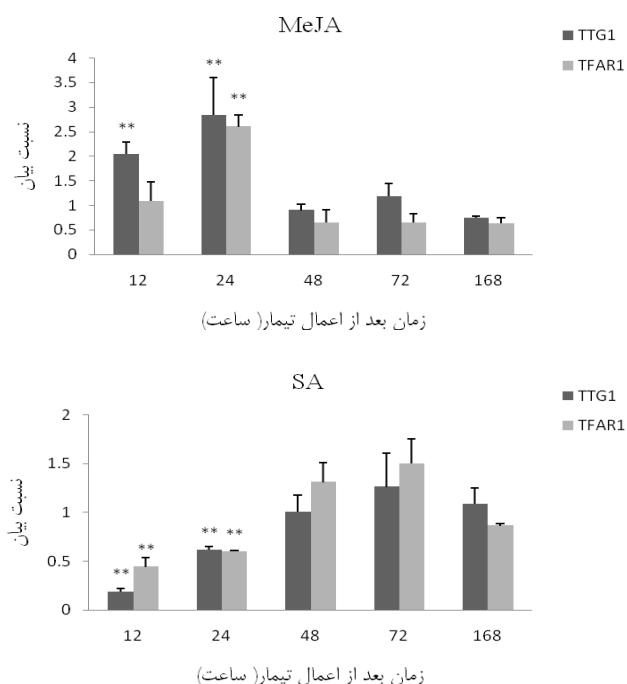
بذرهای گیاه درمنه مطابق مطالعه Zare et al. (1391) کشت شدند و پس از سه ماه گیاهانی که موقعیت رشدی یکسانی داشتند، برای انجام آزمایش انتخاب شدند. سپس محلول‌های μM SA ($300\text{ }\mu\text{M}$ MeJA (حل شده در اتانول $0/8$ درصد) و mM یک (حل شده در آب (تنظیم PH 7 با استفاده از NaOH) تهیه شدند. محلول‌های تهیه شده در ساعت هشت صبح، به طور مجزا بر روی واحدهای آزمایشی مربوطه، به کمک مه پاش و به میزان یک لیتر برای هر واحد آزمایشی اسپری شدند و گیاهان شاهد مربوط به هر تیمار هم با حلالهای ذکر شده در بالا مورد اسپری قرار گرفتند. نمونه برداری از پنج برگ بالایی که زیر سومین برگ قابل مشاهده از نوک گیاه قرار داشتند در 12 , 24 , 48 , 72 و 168 ساعت پس از اعمال تیمار انجام گرفت و نمونه‌ها در دمای -80°C قرار گرفتند (Pu et al. 2009). توالی مربوط به ژن EST از TTG1 (TTG1 Liu et al. 2009) و توالی مربوط به ژن TFARI از TFARI (TFARI Liu et al. 2009) و توالی مربوط به ژن ۱۸SrRNA از ۱۸SrRNA Zeng et al. (Zeng et al. 2008) انتخاب شدند.

RNA توسط کیت کیاژن^۲ (RNeasy Plant Mini Kit) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سپس از هر نمونه RNA به میزان یک μg برداشته شده و cDNA با استفاده از کیت فرمتاز^۳ (RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit) و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. واکنش Real time PCR با مقادیر $10\text{ }\mu\text{l}$ SYBR Green میکرولیتر، $10\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر، آغازگرهای پیشرو و برگشته هر کدام یک میکرولیتر و

آرتیمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون است که در تریکومهای چند سلولی غده ای ترشحی گیاه *Artemisia annua* (درمنه) که برروی برگ‌ها، ساقه‌ها و گل آذین‌ها قرار دارند، تولید می‌شود (Olsson et al. 2009). این ترکیب و مشتقاتش در درمان بیماری های مالاریا و سرطان دارای کاربرد می‌باشد (Liu et al. 2006). با توجه به اهمیت آرتیمیزینین در درمان بیماری‌ها و نیز به دلیل عملکرد پائین و تولید $0/01-0/08$ درصدی آن در گیاه درمنه (Abdin et al. 2003)، تلاش به منظور افزایش تولید آن ضروری است. در مطالعه قبلی ما مشخص شد که در پی کاربرد برون زاد دو عامل محرك^۱ متیل جاسمونات (MeJA) و سالیسیلیک اسید (SA) بر روی گیاه درمنه، MeJA باعث افزایش مدارومی در تولید آرتیمیزینین شده و SA تاثیر منفی بر روی تولید آن داشت (Zare et al. 1391). یک دلیل احتمالی برای مشاهده چنین رویدادی می‌تواند ناشی از تاثیر متفاوت این دو عامل محرك بر روی تعداد و اندازه تریکومهای گیاه درمنه (محل تولید آرتیمیزینین) باشد. چنانکه در مطالعه‌ای که بر روی گیاه آرابیدوپسیس انجام شده است، اثر مثبت کاربرد MeJA بر روی شکل گیری، تعداد و اندازه تریکومها در این گیاه گزارش شده است و بیان شده که SA دارای تاثیر منفی بر روی آنها است (Traw and Bergelson 2003). همچنین در مطالعات دیگر تاثیر مثبت کاربرد JA یا جاسمونیک اسید (JA) بر روی افزایش تراکم تریکوم در گوجه Boughton et al. 2005; فرنگی و درمنه نیز گزارش شده است (Liu et al. 2009; Maes et al. 2011). برای بررسی تاثیر احتمالی MeJA و SA بر روی تریکومهای گیاه درمنه، اثر آنها در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمار بر روی بیان تنها ژن‌های شناخته شده تریکومی این گیاه (TFARI و TTG1 Liu et al. 2009; Maes et al. 2011) مورد توجه قرار گرفت. همچنین برای بدست آوردن اطلاعات بیشتر، تغییرات بیان ژن‌های دخیل در شکل گیری و نمو تریکوم آرابیدوپسیس به این دو عامل نیز با استفاده از داده‌های میکروواری موجود در بانک اطلاعاتی EBI مورد بررسی قرار گرفت.

² Qiagen³ Fermentas¹ Elicitor

ژن *TTG1*, ژنی است که در تشکیل تریکوم نقش دارد و در بالادست سایر ژن‌های القا تشکیل تریکوم (*EGL3*, *GL3* و *GL1*) قرار گرفته است (Zhao et al. 2008). بنابراین با توجه به نتایج، احتمالاً با تاثیر بر روی این ژن و سپس افزایش تعداد تریکوم منجر به افزایش تولید آرتمیزینین می‌شود و تاثیر منفی بر روی تولید آرتمیزینین نیز ناشی از تاثیر منفی آن بر روی *SA* بیان این ژن می‌باشد. ژن *TFARI* نیز با ژن *CER4* آراییدوپسیس که در بیوستر موم کوتیکولی نقش داشته و در تریکوم برگ‌های آراییدوپسیس به طور قوی بیان می‌شود، خوبیشاوندی نزدیکی دارد (Maes et al. 2011). بنابراین بررسی تغییرات بیانی ژن *TFARI* نیز تاییدی بر تاثیر مثبت *MeJA* و تاثیر منفی *SA* بر روی تریکوم‌ها بود.



شکل ۱- اثر کاربرد هورمون‌های *MeJA* و *SA* بر بیان ژن‌های *TTG1* و *TFARI* در درمنه. داده‌ها نشان دهنده $\Delta\Delta CT \pm$ انحراف معیار هستند. مقادیر معنی دار از لحاظ آماری ($P < 0.05$) به صورت * و مقادیر بسیار معنی دار ($P < 0.01$) با ** نشان داده شدند.

آب دو بار تقطیر ۵ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه iQ5 BIO-(RAD) انجام شد. برنامه مورد استفاده ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه در ابتدا و سپس ۳۵ چرخه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه و ۷۲ ۲۰ چرخه، ۱۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه بود. آزمایش در دو تکرار زیستی و سه تکرار آزمایشی انجام شد. آنالیز داده‌های Real time PCR با استفاده از روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta CT$ انجام شد (Livak and Schmittgen 2001) و داده‌های بدست آمده به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شدند. آنالیز آماری آنها با روش T-test و با نرم افزار Excel انجام گرفت. به منظور بررسی نحوه پاسخ ژن‌هایی که در شکل‌گیری و نمو تریکوم در آراییدوپسیس نقش دارند، به محرك‌های *MeJA* و *SA*، داده‌های نرمال شده مربوط به آزمایش میکروواری این تیمارها (E-GEOD-14961)، (E-CAGE-21)، (E-CAGE-51)) از سایت EBI دریافت شد. داده‌های نرمال شده مربوط به ژن‌های تریکومی شناخته شده در آراییدوپسیس (*GL1*, *MYB23*, *KAK*, *SIM*, *GL2*, *ETC2*, *ETC1*, *CPC*, *TRY*, *EGL3*, *GL3*, *KLK*, *GRL*, *ZWI*, *STI*, *AN*, *HYP6*, *RHL2*, *CPR5*, *SPY*, *CER4* و *CRK*, *WRM*, *DIS2*, *DIS1*, *ROP2*, *BRICK1*) آزمایش استخراج شده و آنالیز آماری آنها با روش T-test و با نرم افزار Excel انجام شد. سطح معنی داری، ۵ درصد در نظر گرفته شد و تغییرات معنی دار در بیان ژن‌ها در پاسخ به تیمارهای *MeJA* و *SA* مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که در گیاهان درمنه تیمار شده با *MeJA* در ۱۲ ساعت پس از کاربرد محرك، سطح بیان ژن *TTG1* در مقایسه با شاهد دو برابر افزایش بیان نشان داده و این افزایش در ۲۴ ساعت نیز با میزان ۲/۸ برابر افزایش، ادامه پیدا کرد. همچنین این محرك باعث افزایش ۲/۶ برابری در بیان ژن *TFARI* در ۲۴ ساعت پس از کاربرد آن در مقایسه با شاهد شد (شکل ۱). در گیاهان تیمار شده با *SA* نیز، مشاهده شد که بیان دو ژن مطالعه شده در ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از کاربرد، از ۱/۶ تا ۵/۳ برابر در مقایسه با شاهد کاهش نشان دادند (شکل ۱).

كمبود اطلاعات در ارتباط با ژن‌های تریکومی درمنه، یافتن همولوگ ژن‌هایی که در تشکیل، اندازه، جهت گیری و هدایت رشدی تریکومها در آراییدوپسیس نقش دارند، در گیاه درمنه و مطالعه بر روی آنها می‌تواند به استفاده از آنها در جهت افزایش اندازه تریکوم و احتمالاً افزایش میزان آرتمیزینین کمک کند.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران با شماره ۷۱۰۱۰/۱۰۳ صورت گرفته است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Abdin MZ, Israr M, Rehman RU, Jain SK (2003) Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approach for enhanced production. *Planta Medica* 69:289-299.
- Boughton AJ, Hoover K, Felton GW (2005) Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology* 31: 2211-2216.
- Liu C, Zhao Y, Wang Y (2006) Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalaria drug. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 11-20.
- Liu SQ, Tian N, Li J, Huang JN, Liu ZH (2009) Isolation and identification of novel genes involved in Artemisinin production from flowers of *Artemisia annua* using suppression subtractive hybridization and metabolite analysis. *Planta Medica* 75: 1542-1547.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Maes L, Van Nieuwerburgh FCW, Zhang YS, Reed DW, Pollier J, Castele S, Inze D, Covello PS, Deforce DLD, Goossens A (2011) Dissection of the phytohormonal regulation of trichome formation and biosynthesis of the antimalarial compound artemisinin in *Artemisia annua* plants. *New Phytologist* 189: 176-189.

همچنین بررسی تغییرات ژن‌های تریکومی آراییدوپسیس در پاسخ MeJA و SA، نشان دهنده این امر بود که دارای تاثیر مثبتی بر روی شکل گیری، اندازه و مرفوولوژی تریکوم است و بیان ژن‌هایی که در القاء تشکیل تریکوم، رشد و افزایش اندازه آن نقش دارند، با کاربرد MeJA افزایش می‌یابد، در مقابل آن SA تاثیر منفی بر روی تریکوم دارد. این نتایج منطبق با مشاهدات Traw and Bergelson (2003) بود.

با توجه به نتایج بدست آمده ژن *TTG1*، با توجه به اینکه در بالادست سایر ژن‌های القاء تشکیل تریکوم قرار دارد، بهترین کاندید برای شروع انجام مطالعات بیشتر است. همچنین به دلیل

Olsson ME, Olofsson LM, Lindahl AL, Lundgren A, Brodelius M, Brodelius PE (2009) Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. *Phytochemistry* 70: 1123-1128.

Pu GB, Ma DB, Chen JJ, Ma LQ, Wang H, Li GF, Ye HC, Liu BY (2009) Salicilic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Reports* 28:1127-1135.

Traw MB, Bergelson J (2003) Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1367-1375.

Zare Mehrjerdi M, Bihamta M, Omidi M, Naghavi M (1391) Effects of some elicitors on artemisinin production in *Artemisia annua* plant. *Iranian Journal of Horticultural sciences* 43: 323-330. (In Farsi).

Zeng QP, Zhao C, Yin LL, Yang RY, Zeng XM, Huang Y, Feng LL, Yang XQ (2008) Cloning of artemisinin biosynthetic cDNAs and novel ESTs and quantification of low temperature-induced gene overexpression. *Science in China Series C-Life Sciences* 51: 232-244.

Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, Grotewold E, Lloyd A (2008) The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* 135: 1991-1999.