دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز تانشینون‌ها در گیاهان تتراپلوئید مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.)

فاطمه حسن‌زاده[۱]، رسول اصغری زکریا[۲]، رضا درویش‌زاده[۳] و نورالدین حسین‌پور آزاد[۴]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲- استاد گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (نویسنده مسوول: r-asghari@uma.ac.ir)
۳- استاد گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴- استادیار دانشکده کشاورزی مشکین‌شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۹
صفحه: ۱۸۴ تا ۱۹۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: پلی‌پلوئیدی یکی از عوامل اصلی سازگاری در گیاهان است که می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه را در گیاهان افزایش دهد. مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) گیاهی چند ساله از خانواده Lamiaceae با سابقه طولانی استفاده در صنایع دارویی است و تانشینون‌ها از ترکیبات فعال حیاتی هستند که در این گیاه تولید می‌شوند. این مطالعه با هدف تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز تانشینون‌ها در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید مریم‌گلی و مقایسه بین آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها: پلی‌پلوئیدی در مریم‌گلی از طریق تیمار بذور آن با کلشی‌سین ۰/۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت القاء شد و گیاهان تتراپلوئید با استفاده از فلوسیتومتری، مشاهدات کروموزومی، خصوصیات مورفولوژیکی و تعداد روزنه انتخاب و تأیید شدند. استخراج RNA از برگ نمونه‌های گیاهی دیپلوئید و تتراپلوئید مریم‌گلی، سنتز cDNA و سپس بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز تانشینون‌ها شامل *KSL*، *IPPI*، *CMK* و *DXR* با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real time PCR) انجام شد. به منظور بررسی بیان ژن‌های مورد نظر با روش RT-PCR در نمونه‌های برگی مریم‌گلی، از ژن *18srRNA* به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های مورد نظر توسط روش Real time PCR، شامل فعال‌سازی اولیه آنزیم، مرحله واسرشت‌سازی و اتصال آغازگرها بود. صحت تکثیر محصول مربوط به هر یک از ژن‌ها توسط منحنی ذوبی مربوط به هر ژن تأیید و درستی تکثیر توسط الکتروفورز ژل مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی کیفیت RNAهای استخراج‌شده با ژل آگارز یک درصد نشان‌دهنده کیفیت نسبتاً خوب RNAهای استخراج‌شده بود. منحنی‌های ذوب به دست آمده از واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس برای ژن‌های هدف نشان داد که آغازگرها در دمای مشخص شده به درستی به جایگاه‌های هدف متصل شده و باعث تکثیر اختصاصی آنها می‌شوند.نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی نشان داد که بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز تانشینون‌ها شامل *KSL*، *IPPI*، *CMK* و *DXR* در گیاهان تتراپلوئید به طور قابل توجه و معنی‌داری در مقایسه با گیاهان دیپلوئید افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: در گیاهان تتراپلوئید بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تانشینون‌ها افزایش یافت و این می‌تواند تولید این متابولیت‌های ثانویه را افزایش دهد. تجزیه و تحلیل بیان ژن در سری‌های مختلف پلی‌پلوئیدی می‌تواند شناخت ما را از سازوکار مولکولی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و بهبود تولید آن‌ها از طریق القای پلی‌پلوئیدی افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: القای پلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین، متابولیت‌های ثانویه، مریم گلی، RT-PCR

مقدمه

گیاهان دارویی حاوی مواد و یا پیش‌سازهای دارویی مفیدی هستند که می‌توانند برای اهداف درمانی مورد استفاده قرار گیرند (۲۷). مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) گیاهی چندساله با تعداد کروموزوم $2n=2x=14$ از خانواده Lamiaceae است. ویژگی بارز جنس *Salvia* گرده‌افشانی غیرمعمول آن است. گل مریم‌گلی دارای دو پرچم است (به جای چهار پرچم که در سایر اعضای تیره نعناع یافت می‌شود) و دو پوشش روی هر پرچم با یک اتصال طولانی از یکدیگر جدا می‌شوند که تشکیل یک سازوکار اهرمی را فراهم می‌کنند (۹). این اهرم در اکثر گونه‌های مریم‌گلی به گونه‌ای است که توسط بسیاری از گرده‌افشان‌های پرنده و زنبور با اشکال و اندازه‌های مختلف آزاد شود (۱۰). جنس *Salvia* با داشتن ۹۰۰ گونه در دنیا و ۵۵ گونه در ایران، بزرگ‌ترین جنس این خانواده بوده و گیاهان این جنس در سراسر جهان رشد می‌کنند (۳۳). این گونه در مناطق مختلفی از ایران شامل نواحی اطراف تهران، دماوند، فیروزکوه، گچسر، گرگان، کلاردشت، دیلمان، رودبار، شمال سمنان، دامغان، اصفهان، خوانسار، خرم‌آباد، آذربایجان، دشت مغان، کلیبر، اهر، اشنویه، کرمان و خراسان پراکنش دارد (۱۴). مریم‌گلی گیاه بوته‌ای چندساله بومی مناطق مدیترانه‌ای است و یکی از محبوب‌ترین گیاهان دارویی و آشپزی است که در جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). مریم‌گلی را می توان به وسیله بذر یا از راه رویشی تکثیر کرد . ماده مؤثره مریم‌گلی در برگ آن بیشتر است و باید توجه کرد که در هنگام برداشت، ساقه‌های چوبی که همراه با دیگر قسمت‌های گیاه است به‌طور آشکاری بر کیفیت مواد دارویی گیاه تأثیر می‌گذارد (۲۸). عملکرد تر گل ۸/۲۵ تن در هکتار و بیشترین عملکرد اسانس ۱۰ کیلوگرم در هکتار است (۶).

پلی‌پلوئیدی، به‌عنوان فرایندی در تکامل گیاه و ایجاد تنوع در گیاه مطرح است (۳۵) که نقش اساسی در تکامل و اصلاح گیاهان داشته و می‌تواند تنوع زیادی در فنوتیپ گیاه ایجاد کند. پلی‌پلوئیدی در گیاهان با یک روند کند و تدریجی رخ می‌دهد اما می‌توان آن را در مدت زمان کوتاه‌تر با استفاده از مواد ضدمیتوز مانند کلشی‌سین که در میتوز سلول‌ها تداخل ایجاد می‌کنند، القاء کرد. القای پلی‌پلوئیدی با استفاده از

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]

کلشی‌سین از مدت‌ها پیش در برنامه‌های اصلاح نباتات و مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (۱،۴،۱۲). به طور کلی پلی‌پلوئیدها ممکن است با خصوصیات مورفولوژیکی، اکولوژیکی، فیزیولوژیکی و سیتولوژیکی مانند برگ‌های پهن‌تر، عملکرد بالا و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و بیماری‌ها از اقسام دیپلوئید خود متفاوت باشند (۱۱،۲۱،۴۱). افزایش اندازه سلول در پلی‌پلوئیدها بر فعالیت و کارکرد آنزیم‌ها تأثیر می‌گذارد (۱۳) و اغلب منجر به تغییر مورفولوژی گیاه می‌شود (۱۸). گفته می‌شود متیله‌شدن DNA و تغییرات هیستونی با تغییر سطح رونویسی در حالت پلی‌پلوئیدی مرتبط است (۷). ژن‌های دو برابر شده در پلی‌پلوئیدها فرصتی را برای افزایش فعالیت متابولیکی، بیان ژن و افزایش غلظت متابولیت‌های ثانویه در بافت‌ها و اندام‌های گیاهی فراهم می‌کنند (۱۷).

مریم‌گلی به طور سنتی برای درمان اختلالات گوارشی و گردش خون، سرفه، آسم، آنژین، افسردگی، بیماری‌های پوستی و بسیاری از بیماری‌های دیگر استفاده می‌شود. روغن‌های اسانس مریم‌گلی در معالجه طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند بیماری‌های سیستم عصبی، دستگاه گوارش، سیستم تنفسی، گردش خون و قلب و بیماری‌های متابولیک و غدد درون‌ریز مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵). خواص درمانی بالقوه گونه‌های *Salvia* به دلیل روغن‌های اسانس آنهاست. روغن اسانس مریم‌گلی حاوی سینوئول، بورنول و تیوجن است. برگ مریم‌گلی حاوی اسید تانیک، اسید اولئیک، اسید اورسنیک، نیاسین، نیکوتین آمید، فلاون‌ها، گلیکوزیدهای فلاونوئید، اسید فوماریک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و استروژنیک است (۳۰).

مریم‌گلی یک گیاه دارویی شناخته شده است که ریشه آن حاوی دو دسته عمده مواد شیمیایی است، یک دسته از رنگدانه‌های کینون دی‌ترپن محلول در لیپیدها، که به طور کلی به عنوان تانشینون شناخته می‌شوند و دسته دیگر اسیدهای فنولی محلول در آب، از جمله سالویانولیک اسید، رزمارینیک اسید، لیتوسپرمیک اسید و اسید ۳،۴–دی هیدروکسی فنیل‌لاکتیک هستند (۳۲). ترپنوئیدها بزرگ‌ترین دسته از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند، همچنین به عنوان ایزوپرونوئید شناخته می‌شوند که در رشد و توسعه، سوخت و ساز بدن و دفاع در برابر عوامل بیماریزا نقش مهمی را بازی می‌کنند. تانشینون‌ها از دی‌ترپنوئیدها مشتق می‌شوند. به طور کلی مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها را می‌توان به سه مرحله تقسیم کرد. مرحله اول منجر به سنتز ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP)[1] و دی‌متیل‌آلیل پیروفسفات (DMAPP)[2] از طریق مسیر متیل اریتول فسفات (MEP)[3] و یا مسیر موالونات (MVA)[4] می‌شود (۲۴). در مرحله دوم پیش‌سازهای دی‌فسفات سنتز می‌شود و آخرین مرحله شامل تشکیل ترپنوئیدها از طریق کوپالیل فسفات سینتاز (CPS)[5] و سیکلاز شبه کائورن سینتاز (KSL)[6] است (۲۹،۳۷،۳۹،۸) (شکل ۱).

در گیاه مریم‌گلی فقط یک ژن *DXR* وجود دارد که شامل ۱۲ اگزون و ۱۱ اینترون است. این ژن عامل تنظیم و تجمع تولید تانشینون در گیاه مریم‌گلی است. بیان Sm*DXR* در برگ، ساقه، گل و به مقدار کم ریشه است (۳۶،۳۸). دو ژن *IDI* یا همان *IPPI* در ژنوم مریم‌گلی شناخته شده‌اند. Sm*IDI1* در ریشه مویی مریم‌گلی در بیوسنتز تانشینون درگیر است و Sm*IDI2* به تازگی شناسایی شده است. Sm*IDI1* در سیتوزل و Sm*IDI2* در کلروپلاست وجود دارد (۲۴). KSL یک ترپنوئید آلکانوات مهم است که دو ژن آن (Sm*KSL1* و Sm*KSL2*) در ژنوم مریم‌گلی شناسایی شده است. Sm*KSL1* در بیوسنتز تانشینون درگیر است و Sm*KSL2* یک *KSL* فرعی است که به تازگی شناسایی شده است. Sm*KSL1* با بالاترین سطح بیان در ساقه و به دنبال آن برگ، ریشه و گل است در حالی که سطح بیان Sm*KSL2* در همه بافت‌ها شبیه هم است (۲۵). با توجه به این که افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان از طریق تغییر بیان ژن‌ها بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه تأثیرگذار بوده و باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌شود (۲۰،۲۱)، این مطالعه با هدف تجزیه و تحلیل بیان تعدادی از ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز تانشینون‌ها در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید مریم‌گلی و مقایسه آن‌ها با یکدیگر انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گلخانه دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران انجام شد. مواد آزمایشی مورد استفاده، گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید *S. officinalis* حاصل از القای پلی‌پلوییدی بود. گیاهان تتراپلوئید به وسیله القای پلی‌پلوئیدی با استفاده از غوطه‌وری بذور توده بومی این گیاه (تهیه شده از شرکت پاکان بذر) در کلشی‌سین ۰/۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت به دست آمدند. بذور تیمار شده همراه با بذور دیپلوئید در شرایط گلخانه با رطوبت نسبی ۴۰ و دمای ۲۵–۱۵ درجه سانتیگراد درون گلدان‌هایی که با خاک مناسب (قسمت مساوی از ماسه بادی، خاک معمولی و خاک‌برگ) پر شده بود کشت شدند. گیاهان پلی‌پلوئید حاصل با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی (طول برگ، عرض برگ، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، تعداد گره و طول میان‌گره)، خصوصیات سیتولوژیکی (تعداد و اندازه روزنه)، تعداد کروموزوم و تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری مورد تأیید قرار گرفتند (۱۶). این گیاهان به همراه گیاهان شاهد دیپلوئید جهت بررسی بیان برخی از ژن‌های درگیر در مسیر سنتز تانشینون‌ها شامل *KSL*، *IPPI*، *CMK* و *DXR* مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱).

استخراج RNA

استخراج RNA از نمونه‌های برگی گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید، با استفاده از محلول استخراج RNX-Plus TM (شرکت سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. برای ارزیابی کیفیت استخراج RNA از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. فرآیند جداسازی در الکتروفورز با ولتاژ ۷۰ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه و عکس‌برداری با استفاده از دستگاه ژل‌داک انجام شد. برای ارزیابی کیفیت RNA استخراجی از دستگاه نانودراپ استفاده شد.

1- Isopentenyl diphosphate (IPP) 2- Dimethylallyl diphosphate (DMAPP) 3- Methylerythritol phosphate (MEP)
4- Mevalonate (MVA) 5- Copalyl diphosphate synthase (CPS) 6- Kaurene synthase-like cyclase (KSL)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]

سنتز cDNA

به‌منظور ساخت cDNA از کیت Revert Aid First strand cDNA synthesis (شرکت فرمنتاز، آلمان) مطابق با پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، انجام شد. برای این منظور تیوپ حاوی ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۶ میکرولیتر RNA استخراجی و ۱ میکرولیتر آغازگر Oligo dT، به‌منظور اتصال آغازگرهای Oligo dT به رشته‌های RNA، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. سپس مقدار ۴ میکرولیتر بافر واکنش (5x)، یک میکرولیتر آنزیم Ribolook RNase Inhibitor (20u/µl)، دو میکرولیتر dNTP mix (۱۰ میلی‌مولار) و یک میکرولیتر آنزیم Revert Aid M– mul–v RT(200 u/µl) به منظور بسط به تیوب حاوی مواد اضافه شده و در دستگاه ترموسایکلر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲°C قرار گرفتند. برای بررسی صحت ساخت cDNA، از واکنش کنترل منفی[1]RT- و بدون الگو NTe[2] و هم چنین از واکنش کنترل مثبت مطابق پروتکل کیت سنتز cDNA استفاده شد. این واکنش‌ها برای تشخیص وجود آلودگی DNA در نمونه‌های RNA استخراجی مهم است. در این واکنش‌ها، در مرحله تکثیر ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از این cDNA نباید باندی دیده شود.

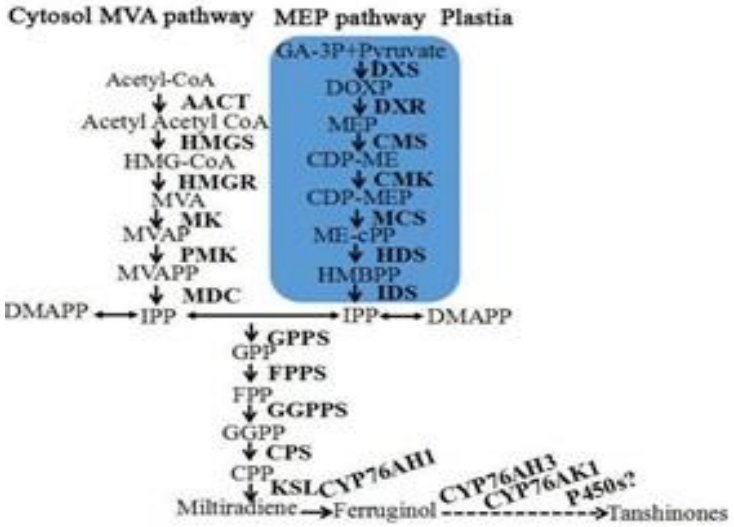
بررسی بیان ژن‌های موردنظر با تکنیک RT-PCR

برای انجام تکنیک RT-PCR، از دستگاه Rotor gene Q-pure Detection-Qiagen مدل ۶۰۰۰ (Qiagen آمریکا) استفاده شد. به منظور بیان ژن‌های مورد نظر با روش Real time PCR در نمونه‌های برگی مریم‌گلی، از ژن *18srRNA* به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. واکنش Real time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر، حاوی ۶/۲۵ میکرولیتر از کیت Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR mastermix(5x)، ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها و ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA انجام شد. آغازگرهای ژن‌ها توسط پایگاه داده NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) طراحی شده و سپس توسط شرکت سیناکلون (کرج، ایران) ساخته شد (جدول ۱).

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های مورد نظر توسط روش Real time PCR، به این صورت بود که فعال‌سازی اولیه آنزیم در دمای ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه در یک چرخه انجام گردید و سپس ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه و اتصال آغازگرها در دماهای اتصال مربوط به هر ژن (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه انجام گردید. بعد از انجام واکنش Real time PCR، منحنی تکثیری و ذوبی با افزایش دما از ۴۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد در هر ثانیه ۰/۵ درجه سانتی‌گراد برای هر یک از ژن‌ها رسم گردید و صحت تکثیر محصول مربوط به هر یک از ژن‌ها توسط منحنی ذوبی مربوط به هر ژن تأیید و درستی تکثیر توسط الکتروفورز ژل مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز داده‌های مربوط به بیان ژن

به‌منظور بررسی افزایش و یا کاهش بیان ژن‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به واکنش RT-PCR با استفاده از نرم‌افزار REST انجام شده و با تعیین *p*-value سطح معنی‌داری نتایج مشخص گردید. این نرم‌افزار میزان قطعیت تغییر بیان ژن‌ها (سطح معنی‌داری) را با روش bootstrapping مورد بررسی قرار می‌دهد. برای نرمال‌سازی داده‌های Real time PCR از ژن *18srRNA* به عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۱).



شکل ۱– مسیر سنتز تانشینون‌ها در گیاهان (۳۷)

Figure 1. The biosynthesis pathway of tanshi nones in plants (37)

1- Reverse transcriptase

2- No template negative control

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real time PCR

Table 1. The sequences of primers used in Real-time PCR reactions

Gene	Seq (5′ →3′)	Tm (ºC)	Amplicon length (bp)
CMK	FW: GACTGTTCAGAGGAGGAAATGGAG RV: TTGGTTTCGCAGCATCAATCTTC	60.5	175
DXR	FW: GAAGCCCGACAATGTGAAATACCC RV: GCATGTCACCTCCACAACCTTG	62	169
IPPI	FW: CTTCAGCAACGATCCACGACTAAG RV: GAGCAGCATTCCTCACACCAAG	62	127
KSL	FW: ACAGTAAACGAGTTGGCAGAGATG RV: TGACACCCACGACGAAGACAAG	61.5	171
18srRNA	FW: CCAGGTCCAGACATAGTAAG RV: GTACAAAGGGCAGGGACGTA	58	177

نتایج و بحث

استخراج RNA از برگ نمونه‌های گیاهی دیپلوئید و تتراپلوئید مریم‌گلی انجام گرفت. غلظت نمونه‌های RNA با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد و کیفیت آنها با ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرارگرفت (شکل ۲). RNAهای استخراج شده از کیفیت نسبتاً خوبی برخوردار بوده و دارای هر سه زیر واحد 28Sی rRNA، 18S و 5S بودند. با توجه به نتایج نانودراپ، جذب نور در ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر کمترین و در طول موج ۲۶۰ نانومتر حداکثر بود و نسبت A260/A280 عصاره RNA در محدوده ۱/۸ تا ۲ بود که نشانگر عدم وجود پروتئین یا آلودگی فنلی در نمونه‌های RNA و خلوص مناسب RNAهای استخراج شده بود. شکل ۳ منحنی ذوب ژن‌های *KSL*، *IPPI*، *CMK* و *DXR* را در نمونه‌های گیاهی دیپلوئید و تتراپلوئید *S. officinalis* طی واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای پیشرو و بازگشتی نشان می‌دهد. مطابق نمودارهای به دست آمده از واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس برای ژن‌های هدف در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید *S. officinalis* مشخص شد که آغازگرها در دمای مشخص شده به درستی به جایگاه‌های هدف متصل شده و باعث تکثیر آنها می‌شوند. با توجه به وجود تنها یک پیک در تمام محصولات PCR ژن‌های مورد مطالعه می‌توان گفت که تکثیر همه قطعات به طور اختصاصی و بدون محصولات غیر اختصاصی مانند دیمرهای آغازگر انجام شده است. همچنین الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ برای محصولات RT-PCR نمونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید (شکل ۴) نشان داد که اندازه قطعات تکثیری با مقادیر مورد انتظار مطابقت دارد.

نتایج بررسی میزان بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST نیز در شکل ۳ نشان داده شده است. بیان ژن *KSL* بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد برای بیان ژن مذکور بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بود که نشان می‌دهد بیان این ژن به طور معنی‌داری در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئیدها بیشتر است. همچنین بیان ژن‌های *IPPI*، *CMK*، *DXR* نیز افزایش معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان داد. این افزایش از ۳/۳۳ برابر در ژن *DXR* تا ۷/۴۰ برابر در ژن *CMK* متغیر بود (شکل ۵).

همچنان که در شکل ۱ مشاهده می‌شود مسیر بیوسنتز تانشینون‌ها شامل سه مرحله است (۸). در مرحله اول پیش‌سازهای ترپنوئیدی شامل ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP) و ایزومر آن دی متیل آلیل پیرو فسفات (DMAPP) از طریق دو مسیر بیوسنتز موالونات (MVA) و متیل اریتریتول فسفات (MEP) تولید می‌شوند. ژن‌های *DXR*، *CMK* و *IPPI* یا *IDI* هر سه در این مرحله نقش دارند که دو ژن *DXR*، *CMK* به ترتیب آنزیم‌های ۱-دئوکسی-D-زیلولوز ۵-فسفات ردوکتوایزومراز (DXR)[1] و ۴-دی فسفوسیتیدیل ۱-۲-C-متیل-D-اریتریتول کیناز (CMK)[2] را در مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP)، و ژن *IPPI*، آنزیم ایزوپنتنیل پیرو فسفات ایزومراز را کد می‌کنند. در مرحله دوم IPP و DMAPP توسط ژرانیل‌ژرانیل پیرو فسفات سینتاز (GGPPS) کاتالیز شده و ژرانیل‌ژرانیل پیرو فسفات (GGPP) را تشکیل می‌دهد که منجر به ساخت اسکلت تانشینونی می‌شود. مرحله سوم تشکیل تانشینون‌های پیچیده است و در حال حاضر، اطلاعات کمی در مورد این مرحله در دست است. دو آنزیم ۲،۶ کوپالیل دی فسفات سینتاز (CPS) و سیکلاز شبه کائورن سینتاز (KSL) دو ترپنوئید سینتاز کلیدی هستند که در این مرحله از بیوسنتز تانشینون‌ها نقش دارند. سیکلاز شبه کائورن سینتاز (KSL) که توسط ژن *KSL* کد می‌شود تولید میلتیرادین[3] را کاتالیز می‌کند. میلتیرادین پیش ماده تانشینون است که در ادامه توسط سیتوکروم-P450ها (CYPs)، دهیدروژنازها، متیلازها و آنزیم‌های دیگر ترکیبات ساختاری مختلفی از جمله فروسینول و سپس تانشینون‌ها از آن تولید می‌شود (۸).

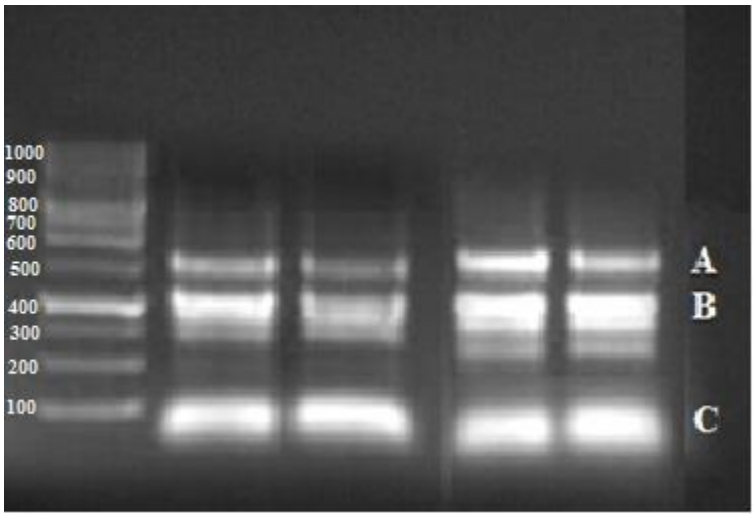
گزارش‌هایی در مورد افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی وجود دارد. به طور مثال گزارش شده است که در گیاهان تتراپلوئید *Catharanthus roseus* L.، ژن‌های *tdc*، *g10h*، *sls*، *str*، *dat* و *prx1* سطح بیان بالاتری را نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان دادند (۳۶). همچنین در بررسی بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز مورفین در *Papaver somniferum* L. افزایش بیان این ژن‌ها در تتراپلوئیدها گزارش شد (۲۰). ژو و همکاران (۴۲) نشان دادند که افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر تانشینون‌ها با استفاده از عصاره مخمر به عنوان یک الیسیتور زیستی باعث افزایش تجمع این مواد در گیاه*Salvia miltiorrhiza* Bunge

1- Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR)
2- Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (CMK)
3- Miltiradiene

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]

می‌شود. همچنین تاوان و همکاران (۳۱) گزارش کردند که بیان ژن‌های *SQE* و *LUS* در تترا- و میکسوپلوئیدهای *S. officinalis* L. در مقایسه با دیپلوئیدها به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.

در گیاهان تتراپلوئید، تولید متابولیت‌های ثانویه، از جمله تانشینون‌ها افزایش می‌یابد، و این در نتیجه بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تانشینون‌ها افزایش است (۲۳). تتراپلوئیدی می‌تواند محتوای آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئید (TIA) را در گیاه *Catharanthus roseus* افزایش دهد (۲۲،۵،۳۳). اثر پلی‌پلوئیدی بر بیان ژن‌ها، با استفاده از فناوری ریزآرایه در سطح رونویسی یا الکتروفورز دو بعدی در سطح پروتئوم مورد مطالعه قرار گرفته است (۲،۲۶). همه این مطالعات نشان داده است که پلی‌پلوئیدی باعث ایجاد تغییر در بیان برخی از ژن‌ها می‌شود. این پدیده ممکن است به این دلیل باشد که پس از پلی‌پلوئیدی کروماتین با غشای هسته‌ای تماس بیشتری دارد و در نتیجه فعالیت ژن را افزایش می‌دهد (۱۸). طبق نتایج ما، اتوتتراپلوئیدی بیان ژن را تحت تأثیر قرار داد و تغییر قابل توجهی در رونویسی ژن‌ها در تتراپلوئیدهای *S. officinalis* مشاهده شد. سلول‌های با سطح پلوئیدی بالاتر، بزرگتر هستند و انتظار می‌رود که سطح رونویسی بالاتری نسبت به سلول‌های با سطح پلوئیدی کمتر داشته باشند. بنابراین انتظار می‌رود که بیان بسیاری از ژن‌ها با سطح پلوئیدی در سلول افزایش یابد (۳). یافته‌های مشابه در *Atropa belladonna* L. به دست آمده است، که در آن مشاهده شد تمام هیوسیامین به دلیل افزایش بیان ژن کدکننده هیوسسیامین – β۶–هیدروکسیلاز[1] به اسکوپولامین تبدیل می‌شود (۴۰). در کل می‌توان نتیجه گرفت که تتراپلوئیدی سطح بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز تانشینون‌ها، به ویژه ژن‌های *KSL*، *IPPI*، *CMK*، *DXR* را در *S. officinalis* افزایش می‌دهد که به نوبه خود می‌تواند منجر به افزایش تولید این متابولیت‌های ثانویه شود.



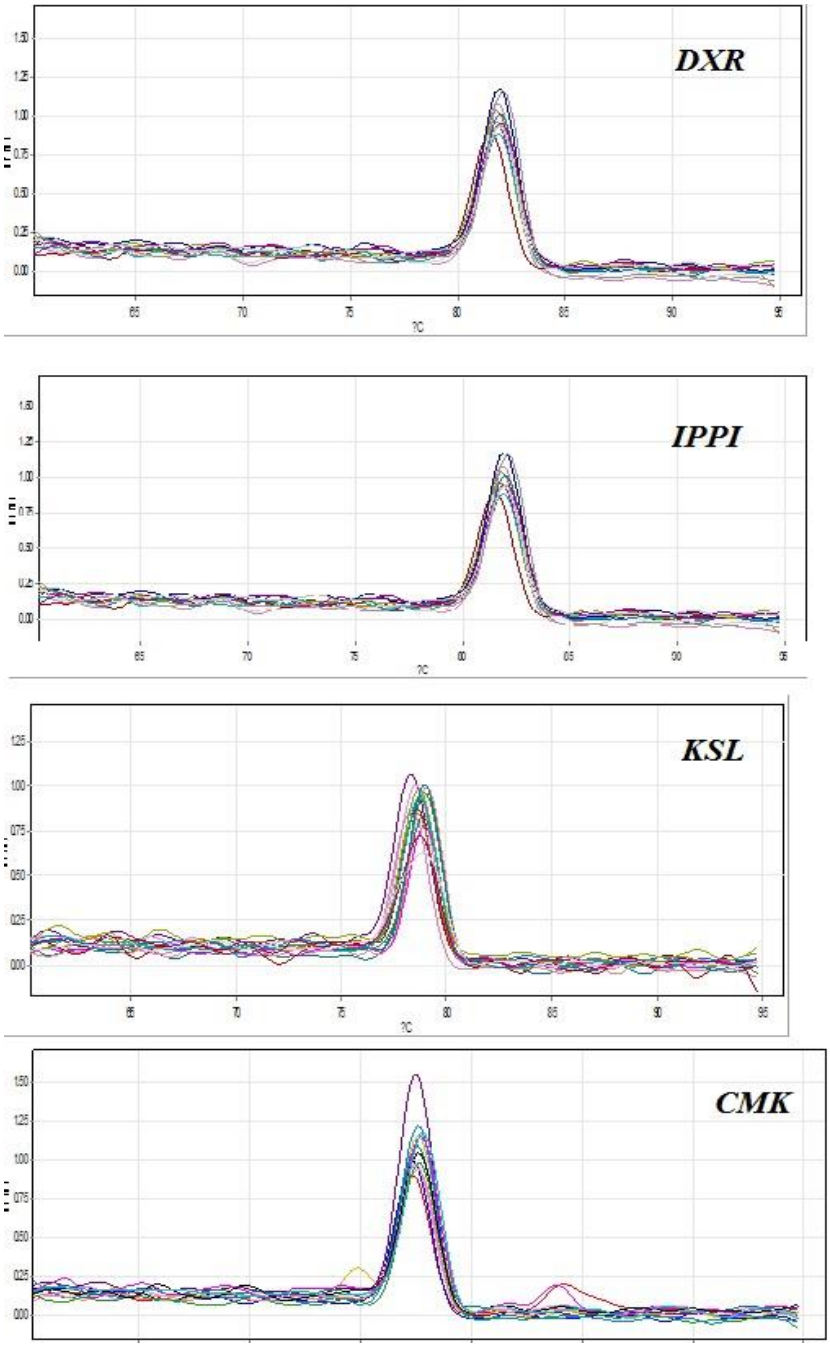
شکل ۲- تصویر الکتروفورز ژل آگارز یک درصد جهت بررسی کیفیت RNA استخراجی نمونه‌های مریم‌گلی (*S. officinalis*) باندها نشان‌دهنده زیر واحدهای 28S rRNA (A)، 18S rRNA (B) و 5S rRNA (C) هستند. اندازه لدر 100 bp است.

Figure 2. 1% agarose gel electrophoresis for quality control of the RNA extracted from plant samples (*S. officinalis*). The bands represent 28S rRNA (A), 18S rRNA (B), and 5S rRNA (C) subunits, respectively. The size of the ladder is 100 bp.

1- Hyoscyamine-6β-hydroxylase

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]

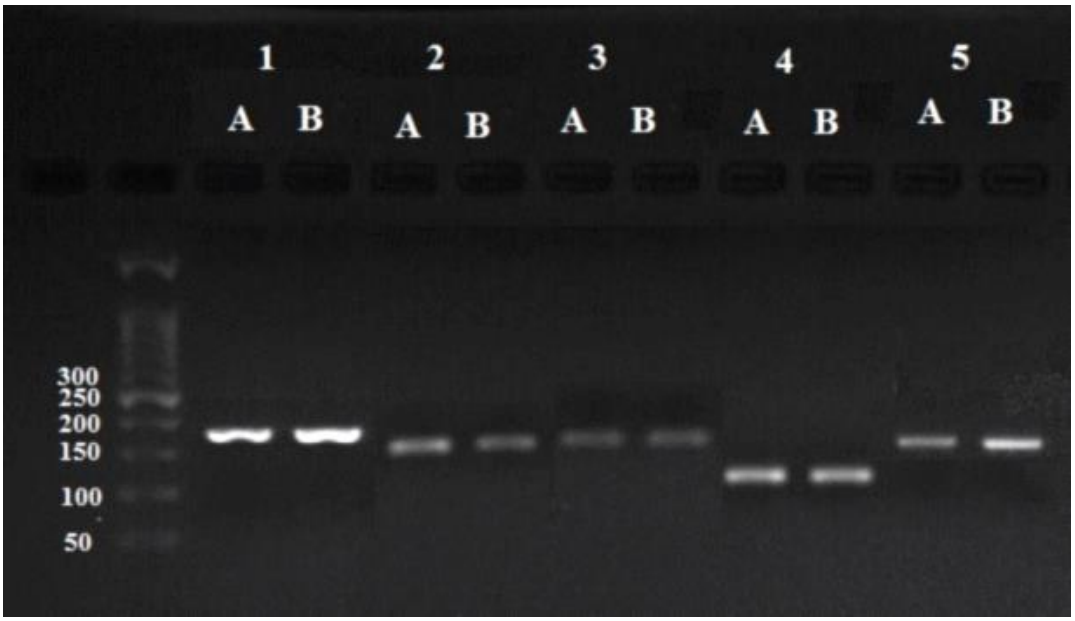


شکل ۳- منحنی ذوب ژن‌های *KSL*، *IPPI*، *CMK* و *DXR* در زمان تکثیر با RT-PCR

Figure 3. Melting curve of *KSL*, *IPPI*, *CMK* and *DXR* genes at amplification by RT-PCR

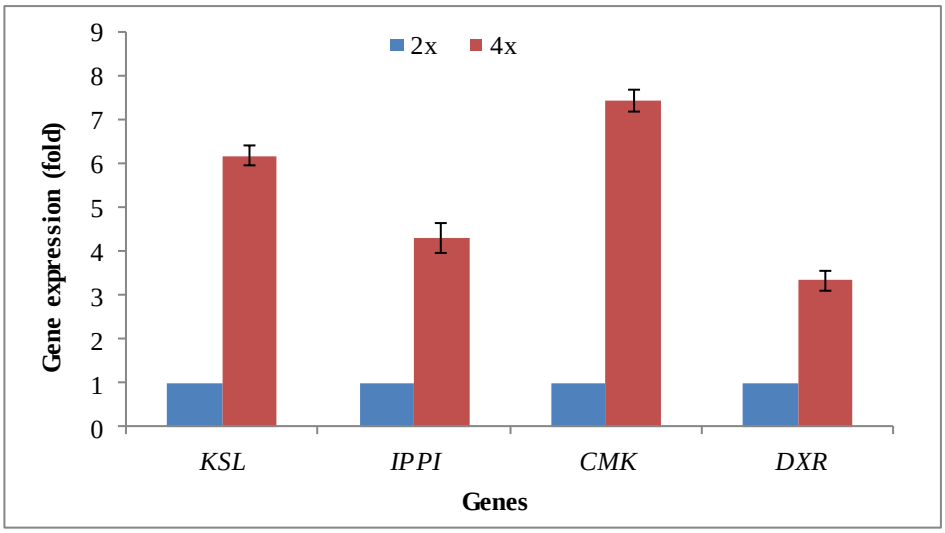
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]



شکل ۴- الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ برای محصولات RT-PCR نمونه‌های دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) *Salvia officinalis*، ۱ *CMK*، ۲ *DXR*، ۳ *IPPI*، ۴ *KSL*.

Figure 4. 1.5% agarose gel electrophoresis for RT-PCR products of diploid (A) and tetraploid (B) *S. officinalis*. 1 *CMK*, 2 *DXR*, 3 *IPPI*, 4 *KSL*



شکل ۵- مقایسه بیان ژن‌های درگیر در مسیر سنتز تانشینون‌ها در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید مریم‌گلی (*S. officinalis*) ** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0.01$). خطوط خطا مقادیر انحراف استاندارد (n=۳) را نشان می‌دهند.

Figure. 5. Comparing of expression of *KSL*، *IPPI*، *CMK* and *DXR* genes in diploid and tetraploid plants of *S. officinalis* L. Bars represent means ± SE (n = 3)

منابع

1. Akbari, R., L. Fahmideh and B. Fazeli-Nasab. 2021. Effect of colchicine on polyploidy induction and morphophysiological characteristics of Ajowan (*Carum copticum* L.) population of Sistan geographical area. Journal of Crop Breeding, 13(38): (In press) (In Persian).
2. Albertin, W., T. Balliau and P. Brabant. 2006. Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. Genetics, 173(2): 1101-1113.
3. Albuzio, A., P. Spettoli and G. Cacco. 2006. Changes in gene expression from diploid to autotetraploid status of *Lycopersicon esculentum*. Physiologia Plantarum, 44: 77-80.
4. Ardabili S.G., R. Asghari Zakaria, N. Zare and L. Ghaffarzadeh Namazi. 2020. Effect of colchicine dose and treatment duration on morphophysiological characteristics of Bride Rose Poppy (*Papaver Fugax* Poir.) using different explants. Journal of Crop Breeding, 12(35): 69-79 (In Persian).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]

5. Ayora-Talavera, T., J. Chappell, E. Lozoya-Gloria and V.M. Loyola-Vargas. 2002. Overexpression in *Catharanthus roseus* hairy roots of a truncated hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. Applied Biochemistry and Biotechnology, 97(2): 135-145.
6. Bahadori, F., A. Maddah and M. Amirjan. 2017. Cultivation and production of endemic clary saga (*Salvia sclarea* L.) in different agro ecosystems: potentials and opportunities. Scientific letter, 52-58 (In Persian).
7. Baubec, T., H.Q. Dinh, A. Pecinka, B. Rakic, W. Rozhon, B. Wohlrab, A. von Haeseler and O.M. Scheid. 2010. Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic states in *Arabidopsis*. Plant Cell, 22: 34-47.
8. Chang, Y., M. Wang, J. Li and S. Lu. 2019. Transcriptomic analysis reveals potential genes involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. Scientific reports, 9(1): 1-12.
9. Clasen-Bockhoff, R. 2004. The staminal lever mechanism in Salvia L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptive radiation. Organisms Diversity and Evolution, 4(3): 189-205.
10. Classen-Bockhoff, R., M. Crone and E. Baikova. 2004. Stamen development in Salvia L.: Homology reinvestigated. International Journal of Plant Sciences, 165(4): 475-498.
11. Comai, L. 2005. The advantages and disavantages of being polyploidy. Nature Reviews Genetics, 6: 836-846.
12. Eng, W.H. and W.S. Ho. 2019. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. Scientia Horticulturae, 246: 604-617.
13. Galitski, T., A.J. Saldanha, C.A. Styles, E.S. Lander and G.R. Fink. 1999. Ploidy regulation of gene expression. Science, 285: 251-254.
14. Ghahraman, A. 1983. Flora of Iran. Research Institue of Forests and Ranglands Publication, 4, NO. 475.
15. Hamidpour, R., S. Hamidpour and M. Shahlari. 2014. Chemistry pharmacology, and medicinal property of Sage (*Salvia*) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease and cancer. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 4l: 82-88.
16. Hassanzadeh, F., R. Asghari Zakaria and N. Hosseinpour Azad. 2020. Polyploidy induction in *Salvia officinalis* L. and its effects on some morphological and physiological characteristics. Cytologia, 85: 157-162.
17. Lavania, U.C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetic Resources, 3(2): 170-177.
18. Levin, D.A. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. New York: Oxford University Press, 240 pp.
19. Massumi, M., M. Fazeli, S. Alavi and Y. Ajani. 2007. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. Fruits, Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 3(3): 171-6.
20. Mishra. B.K., S. Pathak, A. Sharma, P.K. Trivedi and S. Shukla. 2010. Modulated gene expression in newly synthesized autotetraploid of *Papaver somniferum* L. South African Journal of Botany, 76: 447-452.
21. Osborn, T.C., J. Chris Pires, J.A. Birchler, D.L. Auger, Z.J. Chen, H.S. Lee, L. Comai, A. Madlung, R.W. Doerge, V. Colot and R.A. Martienssen. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics, 19(3): 141-147.
22. Pan, Q.Y., U. Chen and Q. Wang. 2010. Effect of plant growth regulators on the biosynthesis of vinblastine, vindoline and catharanthine in *Catharanthus roseus*. Plant Growth Regulation, 60(2): 133-141.
23. Peebles, C.A.M., E.H. Hughes, J.V. Shanks and K.A.Y. San. 2009. Transcriptional response of the terpenoid indole alkaloid pathway to the overexpression of ORCA3 along with jasmonic acid elicitation of *Catharanthus roseus* hairy roots over time. Metabolic Engineering, 11(2): 76-86.
24. Ramos-valdivia, A.C., R. Heijden and R. Verpoorte. 1997. Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. Natural Product Reports, 14(6): 591-603.
25. Ramsay, H., L.H. Rieseberg and K. Ritland. 2009. The correlation of evolutionary rate with pathway position in plant terpenoid biosynthesis. Molecular Biology and Evolution, 26: 1045-1053.
26. Riddle, N.C., H. Jiang, L. An, R.W. Doerge and J.A. Birchle. 2010. Gene expression analysis at the intersection of ploidy and hybridity in maize. Theoretical and Applied Genetics, 120(2): 341-353.
27. Safowora, E.A. 2008. Medicinal plant and traditional medicine in Africa. John Wiley and sons Ltd, 256 pp.
28. Samsam Sharia, H. 1995. Cultivation and propagation of medicinal plants. Mani Publications.
29. Shi, M., X.Q. Luo, G.H. Ju, X.H. Yu, X.L. Hao, Q. Huang, J.B. Xiao, L.J. Cui and G.Y. Kai. 2014. Increased accumulation of the cardio-cerebrovascular disease treatment drug tanshinone in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by the enzymes 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. Funct. Integr. Genomics, 14: 603-615.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]

30. Tang, W. and G. Eisenbrand. 1992. Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine. Berlin: Springer-Verlag.
31. Tavan, M., H. Sarikhani, M.H. Mirjalili, M.M. Rigano and A. Azizi. 2021. Triterpenic and phenolic acids production changed in *Salvia officinalis* via in vitro and in vivo polyploidization: A consequence of altered genes expression. Phytochemistry 189, 112803.
32. Thomas, P.D.R. and N.J. Montvale. 2004. Physicians' desk reference (PDR) for herbal medicines. Clove-*Syzygium aromaticum*. Edn, 3: 204-208.
33. Wang, C.T., H. Liu, X.S. Gao and H.X. Zhang. 2010. Overexpression of G10H and ORCA3 in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production. Plant Cell Reports, 29(8): 887-894.
34. Wendel, J.F. 2002. Genome evolution in polyploids. Plant Molecular Biology, 42(1): 225-249.
35. Wu, S.J., M. Shi and J.Y. Wu. 2009. Cloning and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene for diterpenoid tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage) hairy roots. Biotechnology and Applied Biochemistry, 52: 89-95.
36. Xing, S.H., X.B. Guo, Q. Wang, Q.F. Pan, Y.S. Tian, P. Liu, J.Y. Zhao, G.F. Wang, X.F. Sun and K.X. Tang. 2011. Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011: 1-10.
37. Xu, X., Q. Jiang, X. Ma, Q. Ying, B. Shen, Y. Qian, H. Song and H. Wang. 2014. Deep sequencing identifies tissue-specific microRNAs and their target genes involving in the biosynthesis of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza*. PLoS ONE 9(11): e111679. journal.pone.0111679.
38. Yan, X., L. Zhang, L. Wang, P. Liao, Y. Zhang, R. Zhang and G. Kai. 2009. Molecular characterization and expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia Miltiorrhiza*. Acta Physiologiae Plantarum, 31: 1015-1022.
39. Yang, J., M.A. Adhikari, H. Liu, H. Xu, G. He, R. Zhan, J. Wei and W. Chen. 2012. Characterization and functional analysis of the genes encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the two enzymes in the MEP pathway, from *Amomum villosum* Lour. Molecular Biology Reports, 39: 8287-8296.
40. Yun, D.J. 1992. Metabolic engineering of medicinal plants transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89: 11799-11803.
41. Zhang, X.Y., C.G. Hu and J.L. Yao. 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. Journal of Plant Physiology, 167(2): 88-94.
42. Zhou, W., Q. Huang, X. Wu, Z. Zhou, M. Ding, M. Shi, F. Huang, Sh. Li, Y. Wang and G. Kai. 2017. Comprehensive transcriptome profiling of *Salvia miltiorrhiza* for discovery of genes associated with the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids. Scientific Reports, 7(1): 1-12.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]

Enhanced Expression of Genes Involved in the Biosynthesis Pathway of Tanshinones in Tetraploid Plants of *Salvia Officinalis* L.

Fatemeh Hassanzadeh[1], Rasool Asghari Zakaria[2], Reza Darvishzadeh[3] and Nooralddin Hosseinpour Azad[4]

1- Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, (Corresponding author: r-asghari@uma.ac.ir)
3- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Urmia University, Urmia, Iran
4- Assistant Professor, Meshkin Shahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Received: 26 July, 2021 Accepted: 20 September, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Polyploidy is one of the main factors in plant adaptation that can increase secondary metabolites production in plants. *Salvia officinalis* L. is a perennial plant from the Lamiaceae family with a long history of use in the medicinal industry. Tanshinones are crucial active compounds biosynthesized in *Salvia*. This study was aimed to analyze the expression of genes involved in the tanshinones biosynthesis pathway in diploid and tetraploid sage plants and compare between them.

Material and Methods: polyploidy in *S. officinalis* was induced by seed treatment with 0.5% colchicine for 24 h, and tetraploid plants were selected and confirmed by flow cytometry, chromosomal observations, morphological characteristics, and the number of stomata. RNA was extracted from the leaves samples of diploid and tetraploid plants of sage and then cDNA synthesis and the gene expression analysis of genes involved in the biosynthesis of tanshinones including *KSL*, *IPPI*, *CMK*, and *DXR* genes was performed using real-time PCR. In order to investigate the expression of genes by RT-PCR in sage leaf samples, the *18srRNA* gene was used as a reference gene to normalize the data. The thermal program for amplification of the target genes by the RT-PCR method included the initial activation of the enzyme, the steps of denaturation, and binding of primers. The amplification accuracy of the genes product was confirmed by the melting curve of each gene and the amplification validity was checked by gel electrophoresis.

Results: Evaluation of the quality of extracted RNAs with 1% agarose gel showed a relatively good quality of the extracted RNAs. The melting curves obtained from the RT-PCR reaction using forward and reverse primers for the target genes showed that the primers bind correctly to the target sites at the specified temperature and cause their specific amplification. The results of RT-PCR showed that the expression of the genes involved in the biosynthesis pathway of tanshinones including *KSL*, *IPPI*, *CMK*, and *DXR* genes in tetraploid plants was significantly increased compared with diploids.

Conclusion: In tetraploid plants, the expression of genes involved in the biosynthesis of tanshinones increased and this could increase the production of these secondary metabolites. Analysis of gene expression in different polyploidy series can increase our knowledge of the molecular mechanisms of biosynthesis of secondary metabolites and improve their production through polyploidy induction.

Keywords: Colchicine, Polyploidy induction, RT-PCR, *Sage*, Secondary metabolites

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.184]