

بررسی بیان نسبی ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها در بافت‌ها و مراحل مختلف نموی ژنوتیپ‌های بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*) با استفاده از PCR در زمان واقعی

محمد مجدی^{۱*}، قاسم کریم زاده^۲ و محمدعلی ملبوبی^۳

۱- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳- دانشیار، بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۰۱)

چکیده

بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* L.) گیاهی است دارویی از خانواده گل ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) که به دلیل وجود ترکیب ترپنی پارتنولید، توجه زیادی را به علت ارزش دارویی و فعالیت‌های فارماکولوژیکی (به‌عنوان پیشگیری کننده میگرن و درمان سرطان) به خود جلب کرده است. پارتنولید یک سزکویی‌ترین لاکتون می‌باشد که گفته می‌شود به‌طور عمده از مسیر MVA (Mevalonic acid) بیوسنتز می‌شود. اخیراً نشان داده شده است که مسیر MVA و مسیر MEP (Methyl erythritol phosphate) از طریق تبادل پیش‌ماده IDP (Isopentenyl diphosphate) برای بیوسنتز ترپن‌های مختلف با هم در ارتباط می‌باشند؛ بنابراین بیوسنتز پارتنولید می‌تواند تحت تأثیر مسیر MEP نیز قرار بگیرد. در تحقیق حاضر، بیان دو ژن کلیدی مسیر MVA (*TpHMGR* و *TpGAS*) و دو ژن کلیدی مسیر MEP (*TpDXR* و *TpHDR*) با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real time PCR) در برگ‌های مربوط به مرحله رویشی و زایشی و در گل‌های ژنوتیپ‌های مختلف بابونه کبیر بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها می‌تواند تحت تأثیر مرحله رشدی و ژنوتیپ تغییر کند، به نحوی که در برگ‌های مرحله رویشی و گل‌ها ژنوتیپ‌های مختلف فقط بیان ژن *TpGAS* تفاوت نشان داد، در حالی که در برگ‌های مرحله زایشی میزان بیان ژن‌های *TpHMGR*، *TpGAS* و *TpDXR* اختلاف معنی‌دار ($P < 0/01$) مشاهده شد.

واژگان کلیدی: بابونه کبیر، بیان ژن، سزکویی‌ترین، مرحله رشدی، مسیر MVA

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: m.majdi@uok.ac.ir

مقدمه

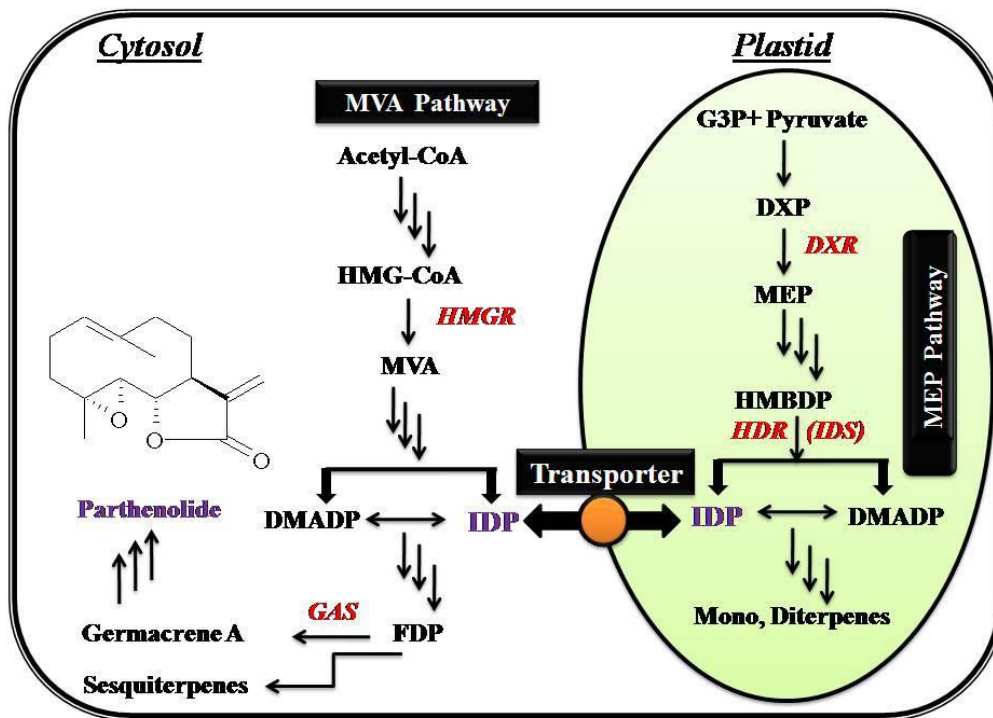
بابونه‌کبیر گیاهی علفی، چندساله و متعلق به خانواده گل ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) بوده و از لحاظ سطح کروموزومی دیپلوئید ($2n = 2x = 18$) و حاوی ترکیبات ترپنی متعددی می‌باشد (Groenewegen, 1992). ترپنوئیدها بزرگ‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه هستند که شامل بیش از ۲۰ هزار ترکیب شناخته شده می‌باشند (Davis and Correau, 2000). حدود ۳۰ سزکویی‌ترین لاکتون در بابونه‌کبیر شناسایی شده است و بیش از ۸۵ درصد کل سزکویی‌ترین‌های بابونه‌کبیر را پارتنولید تشکیل می‌دهد که به‌عنوان ماده مؤثره این گیاه شناخته شده است. فعالیت‌های بیولوژیکی زیادی برای پارتنولید گزارش شده است که شامل فعالیت ضد میگرنی، ضد سرطانی و ضد التهابی است (Brown et al., 1997; Cretniket et al., 2005; Williams et al., 1995). در گیاهان مسیر MEP (-2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) در پلاستیدها و مسیر MVA (Mevalonic acid) در سیتوسول مسئول بیوسنتز ترپن‌ها می‌باشند که تولید پیش‌ماده‌های عمومی ترپن‌ها یعنی ایزوپنتیل دی فسفات (IDP) و دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (DMADP) می‌کنند (شکل ۱) (Rohmer et al. 1993). مسیر MVA به‌وسیله تلفیق شدن استیل کوآنزیم A به ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآنزیم A توسط ژن HMGR (-3-hydroxy-3-methyl-) (glutaryl-coenzyme A reductase) صورت می‌پذیرد (Chappell, 1995). سزکویی‌ترین لاکتون‌ها عمدتاً از مسیر موالونات MVA مشتق می‌شوند (Van Klink et al., 2003). پارتنولید دارای ساختار ژرماکرونولیدی است و پیشنهاد شده است که کاستونولید پیش‌ماده مشترک تمام سزکویی‌ترین لاکتون‌های مشتق شده از ژرماکرونولید است. مرحله اول در بیوسنتز کاستونولید حلقوی شدن فارنسیل دی فسفات (FDP) به ژرماکرن A (Germacrene A) به‌وسیله یک سزکویی‌ترین سنتاز تحت عنوان ژرماکرن A سنتاز (Germacrene A synthase) می‌باشد (Bouwmeester et al., 2002; de Kraker et al., ...)

(1998). اولین مرحله مسیر MEP به‌وسیله متراکم شدن گلیسرآلدئید-۳- فسفات و پیروات برای ایجاد ۱-دئوکسی-D- زایلولوز-۵-فسفات به‌وسیله ژن DXR (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase) صورت می‌گیرد که ۱-دئوکسی-D- زایلولوز-۵-فسفات (DXP) را به متیل اریترول فسفات (MEP) تبدیل می‌کند. آخرین مرحله مسیر MEP نیز تبدیل HMBDP به پیش‌ماده‌های مورد نیاز ترپن‌ها یعنی (Isopentenyl diphosphate) IDP و DMADP (dimethylallyldiphosphate) می‌باشد.

با کشف مسیر MEP (-2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) در دهه اخیر اهمیت این مسیر در بیوسنتز ترپن‌ها تعیین شد و مشخص شد که این مسیر مرتبط با مسیر MVA می‌باشد. در نتیجه ممکن است در بیوسنتز ترکیبات سزکویی‌ترینی مانند پارتنولید مهم باشد؛ بنابراین در این تحقیق، الگوی بیان ژن بر روی دو ژن کلیدی مسیر MVA یعنی HMGR و GAS و دو ژن کلیدی مسیر MEP یعنی DXR و HDR در برگ‌های مربوط به مراحل رشد رویشی و زایشی و در گل‌های ژنوتیپ‌های مختلف بابونه‌کبیر دیپلوئید و تتراپلوئید انجام شد. ژن‌های *TpHMGR*, *TpGAS*, *TpDXR* و *TpHDR* اخیراً از بابونه‌کبیر جداسازی و همسانه‌سازی شده‌اند (Majdi et al., 2011; Majdi et al., 2014). مسیر بیوسنتزی MVA و MEP و موقعیت ژن‌های انتخاب شده در شکل ۱ ارائه شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، شرایط رشد و استخراج RNA: ژنوتیپ‌های مختلف بابونه‌کبیر (*Tanacetum parthenium* L.) شامل دو ژنوتیپ دیپلوئید "زرد بند" و "گل زرد" (شرکت زردبند) و یک ژنوتیپ تتراپلوئید (Majdi et al., 2010)، در شرایط کنترل شده در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ h و با شدت نور $320 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ و دمای روز و شب



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی پارتنولید و موقعیت ژن های *HMGR*, *GAS*, *DXR* و *HDR* در دو مسیر *MVA* و *MEP*
 Figure 1. The biosynthetic pathway of parthenolide and the location of *HMGR*, *GAS*, *DXR* and *HDR* genes in the *MVA* and *MEP* pathways

شد. با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس و بر اساس کیت iScript Bio Rad این کار صورت پذیرفت. واکنش **PCR** در زمان واقعی: مراحل تهیه پلیت لازم برای انجام **PCR** در زیر هود انجام شد و با استفاده از پیپت‌ها و تیپ‌های عاری از **DNA** مواد بر اساس جدول ۱ با هم مخلوط شدند و حجم نهایی واکنش ۲۰ μ l در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از پیپت‌های جداگانه به ترتیب برای واکنش‌های با دو تکرار تکنیکی ۲/۲ μ l از **cDNA** اضافه شد.

جدول ۱- اجزای واکنش **PCR** زمان واقعی
 Table 1. The components of Real time PCR reaction

مواد Materials	حجم (میکرو لیتر) Volume (μ .l)
سایبرگرین	22
2i Q SYBR Green super mix	
آب مقطر	11
Distilled water	
آغازگر مستقیم (3 μ M)	4.4
Forward primer (3 μ M)	
آغازگر معکوس (3 μ M)	4.4
Reverse primer (3 μ M)	

به ترتیب ۲۴ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در گلدان‌های حاوی پرلیت، پیست و خاک‌برگ رشد داده شدند. نمونه‌های برگ از مرحله رویشی و مرحله زایشی (در زمان گلدهی) و گل‌های کاملاً باز شده به منظور استخراج **RNA** سریعاً در ازلت مایع فریز شدند و در دمای $^{\circ}\text{C} -80$ نگهداری شدند. به منظور جداسازی **RNA** از محلول واکنش Tripure (Roche, Germany) استفاده شد. برای از بین بردن ناخالصی ناشی از **DNA** در **RNA** استخراج شده، از کیت Deoxyribonuclease I Kit (Invitrogen) استفاده شد. مقدار (1 μ g) از ۸۰ μ l از محلول **RNA**، ۹ μ l از بافر X DNase ۱۰، ۱ μ l از آنزیم DNaseI (2 U/ μ l) با هم مخلوط شدند و به مدت ۱۵ min در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۱۰ μ l از ۲۵ mM EDTA اضافه شد و به مدت ۱۰ min در $^{\circ}\text{C} 65$ به منظور توقف واکنش قرار داده شد. سپس با کیت RNeasy mini kit (Qiagen)، **RNA** خالص‌سازی شد و در ۶۰ μ l آب مقطر عاری از **RNase** حل شد. به منظور تهیه حدود ۵۰۰ ng از **RNA** تیمار شده با DNaseI و خالص‌سازی شده به کار گرفته

میزان بیان ژن‌ها در برگ‌های ژنوتیپ‌های مختلف در مراحل رویشی و زایشی: نتایج تجزیه واریانس به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مهم مسیر MVA و MEP در ژنوتیپ‌های مختلف در مرحله رویشی در جدول ۳ آمده است. نتایج حاصل نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها فقط از نظر میزان بیان ژن *TpGAS* اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0/01$) و تفاوت در میزان بیان ژن‌های *TpHMGR*، *TpDXR* و *TpHDR* مشاهده نشد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن نشان داد که ژن *TpGAS* در ژنوتیپ "تتراپلوئید" دارای میزان بیان بیشتری نسبت به ژنوتیپ "گل زرد" و "زرد بند" بود و میزان افزایش بیان ژن *TpGAS* در ژنوتیپ تتراپلوئید بیش از دو برابر مقداری بود که در ژنوتیپ‌های دیپلوئید "گل زرد" و "زرد بند" مشاهده شد ($P < 0/01$)، اما میزان بیان این ژن در ژنوتیپ "گل زرد" و "زرد بند" از لحاظ آماری متفاوت نبودند (جدول ۴). در نتیجه، افزایش میزان پارتولید در برگ‌های ژنوتیپ "تتراپلوئید" (Majdi et al., 2013) نسبت به بقیه می‌تواند با افزایش بیان ژن *TpGAS* ارتباط داشته باشد که نقش کلیدی را در بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها ایفا می‌کند (de Kraker et al., 1998; de Kraker et al., 2002; Bouwmeester et al., 2002).

جدول تجزیه واریانس به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مهم مسیر MVA و MEP در ژنوتیپ‌های مختلف در مرحله زایشی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از نظر میزان بیان ژن *TpHMGR* ($P < 0/05$)، *TpGAS* ($P < 0/01$)، *TpDXR* ($P < 0/05$) اختلاف معنی‌دار وجود دارد ولی تفاوتی در میزان بیان ژن *TpHDR* مشاهده نشد. نتایج مقایسه میانگین به وسیله آزمون دانکن نشان داد که ژن *GAS* در ژنوتیپ "تتراپلوئید" دارای میزان بیان بیشتری نسبت به ژنوتیپ "گل زرد" و "زردبند" بود. میزان

برای واکنش کنترل از بدون الگو (NTC) به‌جای cDNA، آب MQ اضافه شد. سپس به پلیت ۹۶ چاهکی با توجه به نقشه ۲۰ μ l از مخلوط واکنش اضافه شد. در مرحله بعدی پلیت با یک فیلم شفاف ویژه (Microseal, adhesive sealer; Micro seal B Opticalquality sealing tape) به‌طور کامل پوشانده شد. سپس پلیت RT-PCR به مدت ۲ min در ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ و بعد از این مرحله واکنش RT-PCR در دستگاه Real time iQ5 (شرکت Bio Rad) اجرا شد. به‌منظور آنالیز نتایج از نرم‌افزار BioRad iQ5 استفاده شد و برنامه اجرا به‌صورت Real time PCR پذیرفت که هر سری پذیرفت که هر سری حدود ۱۰۰ min طول کشید. همچنین برای اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده، در تکثیر ژن مورد نظر از منحنی ذوب (Melting curve) استفاده شد. لیست آغازگرهای استفاده شده برای Real time PCR در جدول ۲ ارائه شده است.

محاسبه میزان نسبی بیان ژن (RGE; Relative Gene Expression): برای نرمال‌سازی از ژن کنترل داخلی (*GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase)) استفاده شد. میزان نسبی بیان ژن با استفاده از ۳ تکرار زیستی و ۲ تکرار تکنیکی محاسبه شد. برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن از روش Δ Ct استفاده شد که بر اساس فرمول زیر است (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - (\text{ژن مورد نظر})$$

$$RGE = \text{POWER}(2; -\Delta Ct)$$

کارایی واکنش PCR با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR برای نمونه‌ها محاسبه شد.

آنالیزهای آماری: به‌منظور مقایسه بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن به وسیله نرم‌افزار SPSS ver. 18 صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

"زرد بند" می‌باشد. میزان افزایش بیان ژن *TpGAS* در ژنوتیپ "تتراپلوئید" نسبت به ژنوتیپ "گل زرد" مربوطه بیش از ۱/۵ برابر بود (جدول ۴). چنین الگویی برای میزان پارتنولید نیز نشان داده شده است (Majdi et al., 2013)، در این ارتباط نیز به نظر می‌رسد که رابطه مستقیم بین میزان رونوشت‌های یک ژن در مراحل انتهایی مسیر (مانند *GAS*) و میزان متابولیت مربوطه (مانند پارتنولید) به‌عنوان یک فاکتور کارآمد در جهت افزایش متابولیت عمل می‌کند. به‌عنوان مثال، در تحقیقی روی الگوی بیوشیمیایی و مولکولی در بیوستز ترپن‌ها و فنیل پروپن‌ها بر روی سه رقم ریحان که قابلیت متفاوتی در سنتز ترپن‌ها داشتند مشخص شد که در رقمی که به‌طور عمده لینالول (*linalool* - (R)) تولید می‌کرد میزان رونوشت ژن لینالول سنتاز (*linalool synthase* - (R)) خیلی بیشتر بود. در عین حال، نشان داده شد که میزان فعالیت نسبی ژرانیل دی فسفات سنتاز (*Geranyl diphosphate synthase*) و فارنسیل دی فسفات سنتاز (*Farnesyl diphosphate synthase*) اگرچه با میزان تولید ترپن‌ها رابطه‌ای ندارد، ولی با نسبت کلی مونوترپن‌ها به سزکویی‌ترپن‌های گیاه در ارتباط است (Ijima et al., 2004). با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوستزی ترپن‌ها شامل ژن‌های *TpGAS*، *TpHMGR*، *TpDXR* و *TpHDR* در بابونه‌کبیر تحت تأثیر ژنوتیپ و مرحله رشدی قرار می‌گیرد. بررسی بیان ژن‌های مختلف نشان داد که از بین ژن‌های بررسی شده در این تحقیق، ارتباط نزدیکی بین میزان بیان ژن *TpGAS* و پارتنولید وجود دارد؛ بنابراین، بیوستز پارتنولید در این گیاه بیشتر به مسیر *MVA* وابسته است. به‌همین دلیل می‌توان گفت که افزایش میزان پارتنولید در ژنوتیپ "تتراپلوئید" نسبت به ژنوتیپ دیپلوئید "گل زرد" مربوطه می‌تواند به‌علت افزایش بیان ژن *TpGAS* باشد که نقش کلیدی را در بیوستز پارتنولید ایفا می‌کند.

افزایش بیان ژن *GAS* در ژنوتیپ "تتراپلوئید" حدود ۲۲ برابر مقدار بیان در ژنوتیپ "گل زرد" مربوطه بود اما نسبت به ژنوتیپ "زرد بند" میزان افزایش ۱/۵ برابر بود. در ژنوتیپ زرد بند میزان بیان دو ژن *TpHMGR* و *TpDXR* نسبت به دو ژنوتیپ دیگر بیشتر بود، اما میزان تغییر در بیان این ژن‌ها به نسبت خیلی کمتر از ژن *TpGAS* بود (جدول ۴). در این مرحله نیز در مقایسه با مرحله رویشی کاهش میزان بیان *TpGAS* در ژنوتیپ "گل زرد" می‌تواند مرتبط با کاهش پارتنولید باشد و همچنین افزایش پارتنولید در ژنوتیپ "زرد بند" و ژنوتیپ "تتراپلوئید" نیز نسبت به مرحله رویشی (Majdi et al., 2013) می‌تواند در نتیجه ارتباط مستقیم با بیان بیشتر ژن *TpGAS* باشد. در آفتابگردان (*Helianthus annuus*) نیز افزایش رونوشت‌های ژن *GAS* در طی مرحله فعال ترشحی و کاهش میزان بیان این ژن بعد از مرحله فعال ترشحی گزارش شده است و نشان داده شده است که بیان این ژن به مرحله نموی وابسته است (Gopfert et al., 2009). همچنین در گیاه درمنه خزری (*Artemisia annua*) رابطه مثبتی بین میزان دی هیدرو آرتیمیزینیک اسید به‌عنوان پیش‌ماده آرتیمیزینین و میزان بیان ژن‌های *ADS* و *CYP71AV1* گزارش شده است (Arsenault et al., 2010). در ارتباط با تنظیم نموی، تغییر مقدار و اجزای اسانس گیاه بابونه‌کبیر در طی مراحل مختلف نموی گزارش شده است (Omidbaigi et al., 2007).

میزان بیان ژن‌های در گل: جدول تجزیه واریانس به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مختلف در گل ژنوتیپ‌های مختلف (جدول ۳) نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مختلف فقط از لحاظ میزان بیان ژن *TpGAS* تفاوت بسیار معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.01$) و از لحاظ میزان بیان ژن‌های *TpHMGR*، *TpDXR* و *TpHDR* تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. مقایسه میانگین‌ها با روش دانکن نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن *TpGAS* به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ "تتراپلوئید"، "گل زرد" و

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده برای بررسی بیان ژن‌های مختلف از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Tm = 55 °C)

ژن Gene	آغازگر مستقیم Forward 5'-3'	آغازگر معکوس Reverse 5'-3'
<i>GAPDH</i>	GTTGACTTGACTGTGAGACTTGAG	CCTTGAGGTTGCCTTCGGATTC
<i>HMGR</i>	CTTCATAGAGGTTGGCACAGTTG	GAGCGTTTGAGCCTGGTGATTC
<i>GAS</i>	TGCTATCTCGGGTACTTTCAAGG	TTCTCCTTTATTCTCAACTGTGC
<i>DXR</i>	CTAATGTCACACTTCTTGCGGAAC	TGTAATCGGAACCAGCCAAAGC
<i>HDR</i>	CTGAGTGGCGTCACAGATGG	GAAGGGAGAAACAGAGGAGATAGG

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان بیان ژن‌های مختلف در برگ‌های مرحله رویشی، زایشی و گل در ژنوتیپ‌های مختلف بابونه کبیر

Table 3. Analysis of variance of gene expressions of different genes in the leaves derived from the vegetative and generative phase and in the flowers of different feverfew genotypes

ژن‌ها Genes	درجه آزادی DF	میانگین مربعات MS		
		گل‌ها Flowers	برگ‌های مرحله زایشی Leaves of generative phases	برگ‌های مرحله رویشی Leaves of vegetative phases
<i>TpHMGR</i>	2	0.029 ^{ns}	0.017 [*]	0.003 ^{ns}
<i>TpGAS</i>	2	3.220 ^{**}	0.429 ^{**}	0.069 ^{**}
<i>TpDXR</i>	2	0.017 ^{ns}	0.031 [*]	0.006 ^{ns}
<i>TpHDR</i>	2	0.002 ^{ns}	0.021 ^{ns}	0.569 ^{ns}

^{ns}، * و **: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

^{ns}, * and **: Not significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

جدول ۴- مقایسه میانگین میزان نسبی بیان ژن‌های مختلف در ژنوتیپ‌های مختلف بابونه کبیر در برگ‌های مربوط به مرحله رویشی، مرحله زایشی و در گل‌ها

Table 4. Mean comparisons of relative gene expressions of different genes in feverfew genotypes and in the leaves derived from the vegetative and generative phases, also in flowers

دوره رشد	Growth period	ژنوتیپ	Genotype	مسیر / ژن Path / Gene			
				MVA		MEP	
				TpHMGR	TpGAS	TpDXR	TpHDR
رویشی	Generative	زردبند	Zardband	0.41 a	0.17 b	0.23 a	1.80 a
		گل زرد	Golzard	0.45 a	0.18 b	0.17 a	1.81 a
		تتراپلوئید	Tetraploid	0.40 a	0.40 a	0.23 a	1.15 a
زایشی	Vegetative	زردبند	Zardband	0.19 a	0.47 b	0.23 a	1.54 a
		گل زرد	Golzard	0.05 a	0.03 c	0.09 ab	1.40 a
		تتراپلوئید	Tetraploid	0.11 a	0.67 a	0.06 b	1.44 a
گل‌ها	Flowers	زردبند	Zardband	0.50 a	0.80 c	0.36 a	1.11 a
		گل زرد	Golzard	0.61 a	1.67 b	0.40 a	1.12 a
		تتراپلوئید	Tetraploid	0.66 a	2.59 a	0.27 a	1.15 a

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی دار هستند.

Means followed by similar letters in each column are not significantly different.

References

- Arsenault, P.R., Vail, D., Wobbe, K.K., Erickson, K. and Weathers, P.J.** (2010). Reproductive development modulates gene expression and metabolite levels with possible feedback inhibition of artemisinin in *Artemisia annua*. *Plant Physiology*, **154**: 958-968.
- Bouwmeester, H.J., Jan Kodde, F.W.A., Verstappen, I.G., De Kraker, J.W. and Wallaart, T.E.** (2002). Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiology*, **129**: 134-144.
- Brown, A.M.G., Edwards, C.M., Davey, M.R., Power, J.B. and Lowe, K.C.** (1997). Effects of extracts of *Tanacetum* species on human polymorphonuclear leucocyte activity *in vitro*. *Phytotherapy Research*, **11**: 479-484.
- Chappell, J.** (1995). Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthesis pathway in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**: 521-547.
- Cretnik, L., Skerget, M. and Knez, Z.** (2005). Separation of parthenolide from feverfew: performance of conventional and high-pressure extraction techniques. *Separation and Purification Technology*, **41**: 13-20.
- Davis, E. and Croteau, R.** (2000). Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes In: *Biosynthesis* (Leeper, F.L. and Vederas, J.C., Eds) pp. 53-95, Springer Berlin Heidelberg, Washington, USA.
- De Kraker, J.W., Franssen, M.C. R., De Groot, A., Konig, W.A. and Bouwmeester, H.J.** (1998). (+)-Germacrene A biosynthesis - The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiology*, **117**: 1381-1392.
- De Kraker, J.W., Franssen, M.C.R., Joerink, M., De Groot, A. and Bouwmeester, H.J.** (2002). Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiology*, **129**: 257-268.
- Gopfert, J.C., MacNevin, G., Ro, D.K. and Spring, O.** (2009). Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitulate glandular trichomes. *BioMed Central Plant Biology*, **9**: 86-103.
- Groenewegen, W.A. and Heptinstall, S.** (1992). Progress in the medicinal chemistry of the herb, feverfew. *Progress in Medicinal Chemistry*, **29**: 217-238.
- Ijima, Y., Davidovich-Rikanati, R., Fridman, E., Gang, D.R., Bar, E., Lewinsohn, E. and Pichersky, E.** (2004). The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant Physiology*, **136**: 3724-36.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Majdi, M., Karimzadeh, G., Malboobi, M.A., Omidbaigi, R. and Mirzaghaderi, G.** (2010). Induction of tetraploidy to feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz. Bip): morphological, physiological, cytological and phytochemical changes. *Hortscience*, **45**: 16-21.
- Majdi, M., Karimzadeh, G. and Malboobi, M.A.** (2014). Spatial and developmental expression of key genes of terpene biosynthesis in feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Biologia plantarum*, **58**: 379-384.
- Majdi, M., Charnikhova, T. and Bouwmeester, H.** (2013). Genetical, developmental and spatial factors influencing parthenolide and its precursor costunolide in feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Industrial Crops and Products*, **47**: 270-276.
- Majdi, M., Qing, L., Karimzadeh, G., Malboobi, M.A., Beekwilder, J., Cankar, K., De Vos, R., Todorović, S., Simonović, A. and Bouwmeester, H.** (2011). Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry*, **72**: 1739-1750.
- Omidbaigi, R., Dadman, B. and Yavari, S.** (2007). Various harvest times of *Tanacetum parthenium* cv. Zardband flowers affecting its oil content and compositions. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **10**: 287-291.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. and Sahn, H.** (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemistry Journal*, **295**: 517-524.
- Van Klink, J., Becker, H., Andersson, S. and Boland, W.** (2003). Biosynthesis of anthecotuloide, an irregular sesquiterpene lactone from *Anthemis cotula* L. (Asteraceae) via a non-farnesyl diphosphate route. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **1**: 1503-1508.
- Williams, C. A., Hoult, J. R. S. Harborne, J. B. Greenham, J. and Eagles, J.** (1995). Biologically-active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*, **38**: 267-270.

The Study of Relative Gene Expression of Key Genes of Terpene Biosynthesis in Tissues and Different Developmental Stages of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) Genotypes Using Real-Time PCR

Mohammad Majdi^{1,*}, Ghasem Karimzade² and Mohammad Ali Malboobi³

- 1- Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Research Center for Medicinal Plant Breeding and Development, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran
- 2- Associate Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

(Received: April 8, 2014 – Accepted: July 23, 2014)

Abstract

Feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.) is a medicinal herb belonging to the Asteraceae which recently raised researcher's attention due to its medicinal value and pharmacological activities, especially as a migraine prophylaxis agent and also for treatment of cancer. Parthenolide has a sesquiterpene lactone structure which is most likely synthesized through the mevalonic acid (MVA) pathway. Recently, it has been shown that there is cross talk between the MVA and the MEP pathways through IDP (Isopentenyl diphosphate) exchange as a precursor for the biosynthesis of different terpenes; hence, parthenolide biosynthesis could be affected by the MEP pathway as well. In the present work, the relative gene expression of two key genes of the MVA pathway, including 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (*HMGR*) and germacrene A synthase (*GAS*) and two key genes of the MEP pathway including 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (*DXR*) and hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase (*HDR*) were examined in leaves derived from the vegetative or generative phases, also in flowers using real time PCR. The results of our study showed that expression of these genes depend on the growth stage and genotype. Moreover, in which in the flowers and leaves derived from vegetative phase in different genotypes only the *TpGAS* gene expression showed a significant difference, while in the leaves derived of generative phase the relative gene expression showed a significant difference for *TpHMGR*, *TpGAS* and *TpDXR*.

Keywords: *Tanacetum parthenium*, Sesquiterpene, Gene expression, MVA pathway, Growth stage

* Corresponding Author, E-mail: m.majdi@uok.ac.ir