

Investigation of the expression changes of some genes involved in the biosynthesis of thymoquinone upon methyl jasmonate treatment in black cumin (*Nigella sativa* L.)

Masoomeh Karami Hoomani¹, Mohammad Majdi¹(ORCID: 0000-0001-6959-4845), Ghader Mirzaghaderi¹

1. Department of Plant Production and Genetics, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Correspondence:
Mohammad Majdi
Email: majdi60@gmail.com

Received: 14, Dec. 2024
Accepted: 19, Jan. 2025

How to cite:

Karami Hoomani, M., Majdi, M., & Mirzaghaderi, Gh. (2025). Investigation of the expression changes of some genes involved in the biosynthesis of thymoquinone upon methyl jasmonate treatment in black cumin (*Nigella sativa* L.). *Crop Biotechnology*, 14 (3), 69-82. (DOI: [10.30473/cb.2025.72958.1993](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72958.1993))

ABSTRACT

Thymoquinone, the main compound of black cumin(*Nigella sativa*) oil, has numerous therapeutic effects. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductase (*DXR*) and geranylgeranyl diphosphate synthase (*GTS*) are two key genes in the biosynthetic pathway of thymoquinone. In this study, the expression changes of genes *DXR* and *GTS* were investigated in two ecotypes of Iranian black cumin with the highest and lowest levels of thymoquinone, including ecotype H (Semirum) and ecotype K (Eqolid), as well as the effect of methyl jasmonate treatment on the expression of these genes. Sampling was conducted at 12, 24, and 48 hours after the application of methyl jasmonate at a concentration of 100 μ M during the immature seed stage. Gene expression was analyzed using RT-qPCR. The results at a 5% significance level showed that the expression of both genes in ecotype H is significantly higher than in ecotype K. The expression level of the *GTS* gene in both ecotypes was influenced by methyl jasmonate, initially decreasing in the first 12 hours, then gradually increasing and reaching a maximum at 48 hours, which was significantly different from the control. However, the expression of the *DXR* gene varied between the two ecotypes: in ecotype H, the expression of this gene significantly decreased, reaching its minimum at 48 hours, while in ecotype K, it initially increased at 12 hours and then decreased to a minimum at 48 hours. Overall, these findings indicate that the gene expression of *GTS* and *DXR* genes involved in the thymoquinone biosynthetic pathway in *N. sativa* is genotype-dependent, and methyl jasmonate treatment can effectively induce the expression of these genes, depending on the genotype and time which consequently can increase the thymoquinone content.

KEYWORDS

Nigella sativa , thymoquinone, methyl jasmonate, gene expression



«مقاله پژوهشی»

بررسی تغییرات بیان برخی ژن های دخیل در بیوسنتز تیموکینون تحت اثر متیل جاسمونات در سیاهدانه (*Nigella sativa*)

معصومه کرمی هومانی^۱، محمد مجدی^۱ (ارکیده: ۴۸۴۵-۶۹۵۹-۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰)، قادر میرزاقدری^۱

چکیده

تیموکینون، ترکیب اصلی روغن بذر سیاهدانه، اثرات درمانی متعددی دارد. ۱-دی اکسی زایلوز-۵-فسفات ردوکتاز (DXR) و گاماترپین سنتاز (GTS) دو ژن کلیدی مسیر بیوسنتزی تیموکینون هستند. در این پژوهش تغییرات بیان ژن های DXR و GTS در دو اکوتیپ سیاهدانه ایرانی با بیشترین و کمترین میزان تیموکینون شامل اکوتیپ H (سمیرم) و اکوتیپ K (اقلید) و نیز تأثیر تیمار متیل جاسمونات بر بیان این ژن ها بررسی شد. نمونه برداری در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و در مرحله ی بذر نارس انجام شد. بیان ژن ها با استفاده از RT-qPCR بررسی گردید. نتایج در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد بیان هر دو ژن در اکوتیپ H به صورت معناداری بالاتر از اکوتیپ K است. همچنین میزان بیان ژن GTS در هر دو اکوتیپ تحت تیمار متیل جاسمونات پس از کاهش بیان در ۱۲ ساعت اول به تدریج افزایش و در ۴۸ ساعت به حداکثر رسید، که نسبت به شاهد بسیار معنا دار بود. میزان بیان ژن DXR تحت اثر متیل جاسمونات در دو اکوتیپ متفاوت بود. در اکوتیپ H، بیان ژن DXR به طور معناداری نسبت به شاهد کاهش یافت و حداقل میزان بیان آن در ۴۸ ساعت مشاهده شد. در اکوتیپ K، بیان ژن DXR ابتدا در ۱۲ ساعت به طور معناداری افزایش پیدا کرد و سپس طی یک روند کاهشی در ۴۸ ساعت به حداقل رسید. این نتایج نشان داد که بیان ژن های DXR و GTS مسیر بیوسنتزی تیموکینون سیاهدانه تحت تأثیر ژنوتیپ قرار دارد، همچنین متیل جاسمونات می تواند در القای بیان این ژن ها مؤثر باشد و این تأثیر تحت اثر ژنوتیپ و زمان قرار دارد.

واژه های کلیدی

سیاهدانه، تیموکینون، متیل جاسمونات، بیان ژن.

۱. گروه ژنتیک و تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

نویسنده مسئول:

محمد مجدی

رایانامه: majdi60@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۳۰

استناد به این مقاله:

کرمی هومانی؛ معصومه، مجدی، محمد و میرزاقدری، قادر (۱۴۰۳). بررسی تغییرات بیان برخی ژن های دخیل در بیوسنتز تیموکینون تحت اثر متیل جاسمونات در سیاهدانه (*Nigella sativa*)، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۳)، ۶۹-۸۲.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72958.1993](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72958.1993))



مقدمه

گیاهان دارویی به دلیل کاربردهای درمانی خود از زمان‌های قدیم مورد توجه قرار گرفته‌اند و امروزه نقش قابل توجهی در سیستم‌های درمان ایفا می‌کنند، به‌طوری‌که بسیاری از کشورهای جهان، که تقریباً دو سوم جمعیت را شامل می‌شوند، به دلیل مقبولیت فرهنگی بیشتر، سازگاری بهتر با بدن و عوارض جانبی کمتر به داروهای گیاهی وابسته‌اند (Sandberg, 2001; Oladeji., 2016; Mbuni et al., 2020).

گیاه سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی از خانواده‌ی آلاله^۱ است. سیاهدانه گیاهی علفی، یک‌ساله، دیپلوئید و دولپه می‌باشد، که در خاورمیانه، افریقای شرقی و هند به منظور درمان سردرد، آسم، تب، برونشیت، روماتیسم، آنفولازا، دفع کرم‌های روده و اگرما مورد استفاده قرار گرفته است. دانه‌های سیاهدانه حاوی روغن، پروتئین، آلکالوئید، ساپونین و اسانس هستند که هر کدام اثرات زیستی خاصی را سبب می‌شوند (Burits et al., 2000; Ali et al., 2003; Yar et al., 2008). ترکیب اصلی روغن فرار در دانه‌های سیاهدانه را مونوترپن‌ها^۲ تشکیل می‌دهند. مونوترپن‌ها در گیاهان از طریق مسیر متیل-ارتریترول-فسفات^۳ (MEP) که در پلاستیدها قرار دارد بیوسنتز می‌شوند. ابتدا پیروات^۴ و دی‌گلیسرآلدئید-۳-فسفات^۵ با یکدیگر ترکیب شده و پس از انجام واکنش‌های بیوشیمیایی لازم دی‌اکسی زایلوز^۵-فسفات^۶ توسط آنزیم ۱-دی‌اکسی زایلوز^۵-فسفات سنتاز^۷ تولید می‌شود، که تحت اثر آنزیم ۱-دی‌اکسی زایلوز^۵-فسفات ردوکتاز^۸ (DXR) به سی‌متیل اریترول^۴ فسفات^۹ تبدیل می‌گردد. این ماده به وسیله‌ی یک سری واکنش‌ها، دی‌متیل آلیل‌دی‌فسفات^{۱۰} (DMAPP) و ایزوپنتیل فسفات^{۱۱} (IPP) که قابل تبدیل به

یکدیگر هستند را ایجاد می‌کند. با اتصال این دو ماده توسط آنزیم ژرانیل دی‌فسفات سنتاز^{۱۲}، ژرانیل دی‌فسفات^{۱۳} پیش‌ساز عمومی مونوترپن‌ها سنتز می‌شود، که این ماده توسط آنزیم‌های مونوترپن سنتازی، به مونوترپن‌های مختلف تبدیل می‌گردد (Burke et al., 1999; Lichtenthaler, 2009; Mir et al., 2008; Sallaud et al., 2009). از جمله مونوترپن‌های موجود در دانه‌های بالغ سیاهدانه می‌توان به پی‌سیمن^{۱۴}، گاماترپین^{۱۵}، تیموکینون^{۱۶}، آلفاتوجن^{۱۷}، تیموهیدروکینون^{۱۸} و کارواکرول^{۱۹} اشاره کرد (Botnick et al., 2012; Liu et al., 2013).

بخش عمده‌ی ارزش دارویی سیاهدانه به دلیل وجود ترکیب دارویی تیموکینون است. تیموکینون موجود در روغن سیاهدانه جزء ترکیبات اصلی بذر است و در مطالعات زیادی اثرات درمانی آن از قبیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی (Hosseinzadeh et al., 2012)، ضد التهابی (Gazzar et al., 2006)، ضد سرطانی (Gali et al., 2008) (Muhtasib et al., 2008) ضد باکتری (Halawani, 2009)، ضد قارچی (Saad et al., 2013) و ضد تشنج (Hosseinzadeh et al., 2004) گزارش شده است. هر چند تیموکینون در گیاهان معطر غنی از مونوترپن‌ها مانند آویشن، مرزه و پونه‌ی کوهی نیز موجود است، اما این میزان در مقایسه با سیاهدانه به مقدار کمتری در این گیاهان وجود دارد (Skoula et al., 1999; Crocoll et al., 2010; Grosso et al., 2010; Botnick et al., 2012). آنزیم DXR و گاماترپین سنتاز^{۲۰} (GTS) از آنزیم‌های محدود کننده سرعت واکنش در ابتدا و انتهای مسیر بیوسنتزی تیموکینون هستند و مطالعات مختلفی نقش ژن‌های DXR و GTS را در مسیر بیوسنتزی MEP تأیید کرده‌اند، این بررسی‌ها نشان داده است که با افزایش بیان ژن‌های DXR و GTS میزان مونوترپن‌ها افزایش

12. Geranyl diphosphate synthase (GPPS)

13. Geranyl diphosphate (GDP)

14. P-Cymene

15. γ -Terpinene

16. Thymoquinone

17. α -thujene

18. Thymohydroquinone

19. Carvacrol

20. Gamma terpinene synthase

1. Ranunculaceae

2. Monoterpenes

3. Methyl erythritol phosphate

4. Pyruvate

5. D-glyceraldehyde-3-phosphate

6. Deoxyxylulose-5-phosphate

7. 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS)

8. 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase

9. 2-C-methylerythritol-4-phosphate

10. Dimethylallyldiphosphate

11. Isopentenylidiphosphate

تیموکینون است، بدیهی است نتایج این بررسی می‌تواند راه را برای درک بهتر مسیرهای افزایش میزان تیموکینون از طریق انتخاب ژنوتیپ مناسب، افزایش بیان ژن‌های کلیدی و یا استفاده از سایر سیستم‌های تولیدی و نیز پی بردن به ارتباط بین میزان رونوشت این ژن‌ها و متابولیت‌های تولید شده در گیاه هموار کند.

پیشینه پژوهش

شبکه‌ی متابولیکی گیاهان نسبت به سایر موجودات بسیار گسترده‌تر است. متابولیت‌ها در گیاهان به دو گروه عمده‌ی متابولیت‌های اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. متابولیت‌های اولیه عمدتاً شامل قندها، اسیدهای آمینه، لیپیدها و منابع انرژی هستند. به غیر از متابولیت‌های اولیه گیاهان دامنه‌ی گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که در حفاظت گیاهان در برابر عوامل میکروبی، قارچی، ویروسی و حشرات، آلوپاتی و سیگنالینگ نقش دارند (Dixon, 1999; Schwab, 2003). ارتباط بین جریان متابولیت‌های اولیه و انباشت متابولیت‌های ثانویه بسیار پیچیده است، زیرا نیاز به در نظر گرفتن کل شبکه‌ی متابولیتی دارد تا منابع متابولیت‌های اولیه را بدون اختلال در گیاه به متابولیت‌های ثانویه هدایت کند. امروزه توسعه‌ی دانش در درک متابولیسم‌های گیاه، به‌منظور شناسایی ظرفیت متابولیکی گیاهان و نحوه‌ی تنظیم فعالیت متابولیکی آن‌ها در جهت بهره‌وری بهتر از ترکیبات ارزشمند گیاهی محور اصلی در تحقیقات گیاهی است (Ghisla et al., 2012).

آنزیم‌های کلیدی مسیرهای بیوستزی از عوامل بسیار تأثیرگذار بر میزان تولید متابولیت‌ها هستند. مطالعات مختلفی نقش آنزیم‌های کلیدی بر میزان تولید متابولیت‌های هدف را تأیید کردند. در یک بررسی روی آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) مشخص شد که مسیر بیوستزی فلاونوئیدها مستقیماً توسط چندین آنزیم کلیدی تنظیم می‌شود (Zhao et al., 2013; Afrin et al., 2014). در مطالعه‌ای دیگر بیش بیان ژن ترپن‌ستاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر متابولیکی تولید تیمول، باعث افزایش میزان این ماده در گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi*) گردید (Nomani et al.,

2000; Mahmoud et al., 2001; Carretero-Paulet et al., 2002; Crocoll et al., 2010; Krause et al., 2021; Kianersi et al., 2021).

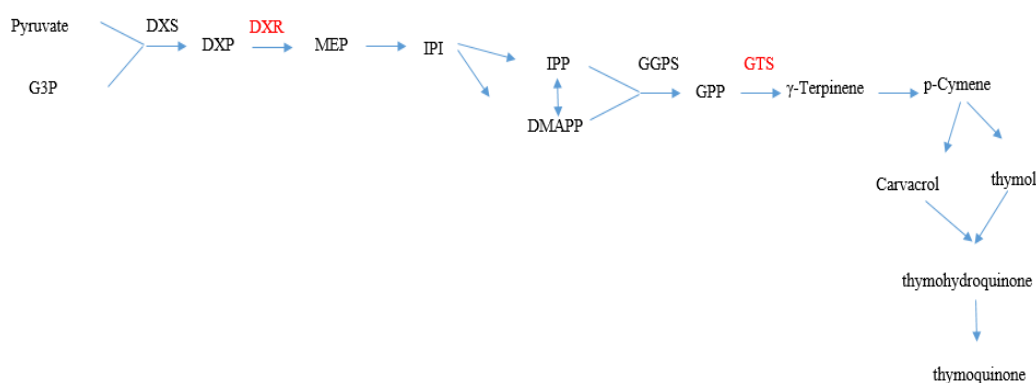
در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی در زمینه‌ی تأثیر اثرات القاکننده‌های زیستی و غیرزیستی از قبیل اشعه‌ی UV، ترانس سینامیک اسید^۱، متیل جاسمونات^۲، سالیسیک اسید^۳ و نانوذرات^۴ در بیوستز متابولیت‌های ثانویه انجام گرفته است (Hatami et al., 2014; Kianersi et al., 2021). استفاده از القاکننده‌ها با تغییر در الگوهای بیانی ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوستزی مورد مطالعه در درک بهتر مسیرهای بیوستزی بسیار کمک کننده خواهند بود. طبق بررسی‌های گذشته نقش متیل جاسمونات در تحریک متابولیت‌های ثانویه از جمله ترپن‌ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی تأیید شده است. در این گیاهان، متیل جاسمونات به‌عنوان یک القاکننده‌ی فیتوهورمونی باعث ایجاد جریانی از واکنش‌های فیزیولوژیکی می‌شود که مورفولوژی گیاه را تغییر داده و منجر به تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (De Geyter et al., 2012; Moreira-Rodríguez et al., 2017).

مطالعات گذشته در گیاهانی از قبیل آویشن و پونه‌ی کوهی منجر به جداسازی و تعیین خصوصیت برخی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوستزی تیموکینون شده است (Krause et al., 2021). علاوه بر این مطالعات گذشته روی گیاه سیاهدانه منجر به شناسایی و معرفی ژن‌های DXR (داده‌ها انتشار نیافته) و GTS (Elyasi et al., 2022) در این گیاه شده است، ولی کنون گزارشی در مورد میزان بیان این دو ژن ارائه نشده است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان بیان ژن‌های ابتدا (ژن DXR) و انتهای (ژن GTS) مسیر بیوستزی تیموکینون در دو اکوتیپ مختلف سیاهدانه به منظور روشن‌سازی بهتر مسیر بیوستزی تیموکینون و نیز بررسی اثر القاکننده‌ی متیل جاسمونات بر میزان بیان ژن‌های دخیل در بیوستز

1. Trans-cinnamic acid
2. Methyl jasmonate
3. Salicylic acid
4. Nanoparticles

ایجاد گاماترپنین از ژرانیل دی سولفات می گردد، از آنزیم های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تیموکینون است (Carretero-Paulet *et al.*, 2002; Botnick *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2021; Azimzadeh *et al.*, 2023). طی بررسی که روی بذر گیاه سیاهدانه با استفاده از توالی یابی RNA انجام شده است ژن گاماترپنین سنتاز به عنوان یکی از آنزیم های کلیدی در مسیر بیوسنتزی مونوترپن ها جداسازی و تعیین خصوصیت شد (Elyasi *et al.*, 2022). علاوه بر این طی تحقیقی دیگر روی بذر گیاه سیاهدانه با استفاده از توالی یابی RNA، توالی نوکلئوتیدی ژن *DXR* معرفی شد (داده ها انتشار نیافته). نقش متیل جاسمونات به عنوان القاکننده ی زیستی به منظور بیوسنتز متابولیت های ثانویه به ویژه القای متابولیسم ترپن ها در گونه های مختلف گیاهی از قبیل سیاهدانه (Elyasi *et al.*, 2016)، آویشن (Kianersi *et al.*, 2021) و بابونه کبیر^۲ (Majdi *et al.*, 2015) اثبات شده است. طی بررسی که روی میزان تیمول و کارواکرول روی تعدادی از گونه های آویشن ایرانی تحت اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات انجام شد، افزایش میزان این دو ماده اثبات گردید و بالاترین میزان تولید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شد (Krause *et al.*, 2021).

همچنین در گزارشی دیگری که روی گیاه پونه (*Origanum vulgare* L.) انجام شد نقش مستقیم میزان بیان آنزیم کلیدی مونوترپن سنتاز در کنترل ترکیب اسانس اثبات گردید (Crocchi *et al.*, 2010). مطالعات گذشته روی مسیر بیوسنتزی ترپن ها حاکی از آن است که، شناسایی ژن های مرتبط با بیوسنتز اسکلت ترپن ها می تواند در دستوری این مسیرها به منظور افزایش ترپن های ویژه مؤثر باشد. طبق مطالعاتی که در گیاه نعنای فلفلی^۱ (Wildung *et al.*, 2005)، آرابیدوپسیس تراریخت (Carretero-Paulet *et al.*, 2006) و گوجه فرنگی (Enfissi *et al.*, 2005) انجام شده است بیش بیان ژن *DXR* باعث افزایش معنادار تولید و تجمع ترپن در این گیاهان شده است. علی رغم مطالعاتی که انجام گرفته تا کنون مسیر بیوسنتزی تیموکینون در گیاه سیاهدانه به صورت کامل مشخص نشده است، اما با توجه به بررسی هایی که در گیاهانی از قبیل آویشن و پونه ی کوهی صورت گرفته است مسیر بیوسنتزی تیموکینون به صورت زیر پیش بینی می گردد (شکل ۱). بر طبق بررسی های گذشته ژن *DXR* به علت نقش تعیین کننده در هدایت میان واسطه ها به سمت مسیر IPP و DMAPP به عنوان عامل کنترلی مهمی در مسیر MEP عمل می کند. همچنین گاماترپنین سنتاز که باعث



شکل ۱. مسیر پیشنهادی بیوسنتزی تیموکینون در سیاهدانه (رنگ قرمز بیانگر ژن های مورد مطالعه در این پژوهش است).

Figure 1. Proposed biosynthetic pathway of thymoquinone in *N. sativa* (The red color indicates the genes studied in this research).

1. *Mentha piperita*

2. *Tanacetum parthenium*

روش‌شناسی پژوهش

کشت گیاه و تیمار متیل جاسمونات

با استفاده از داده‌های حاصل از آنالیز GC-MS که توسط الیاسی و همکاران (داده‌ها انتشار نیافته) روی محتوی تیموکینون در بذر اکوتیپ‌های مختلف گیاه سیاهدانه انجام شده است، اکوتیپ H (سمیروم) با میزان تیموکینون بیشتر و اکوتیپ K (اقلید) با میزان تیموکینون کمتر انتخاب شدند. هر دو اکوتیپ در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. مطالعات گذشته نشان داده است که میزان تیموکینون در سیاهدانه همراه با رسیدگی دانه به حداکثر می‌رسد و پس از بلوغ کامل، مقدار آن دوباره کمی کاهش می‌یابد (Botnick *et al.*, 2012)، به همین دلیل در این پژوهش گیاهان در مرحله قبل از بلوغ کامل بذر به منظور انجام آزمایش‌های بعدی جمع‌آوری و در فریزر ۸۰- نگه‌داری شدند. علاوه بر این به دلیل بررسی اثر متیل جاسمونات، گیاهان با استفاده از محلول متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار در ۳ زمان ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در سه تکرار محلول‌پاشی شدند (نمونه‌های شاهد به وسیله آب محلول پاشی شد) و پس از گذشت زمان مورد نظر بذرهای جمع‌آوری و در فریزر ۸۰- نگه‌داری شدند.

طراحی آغازگر به منظور جداسازی ژن‌های

مورد بررسی

توالی نوکلئیدی ژن *DXR* در سیاهدانه با شماره دسترسی MN561851.1، ژن گاما ترپنین سنتاز از گیاه سیاهدانه با شماره دسترسی OM856342.1، ژن دی گلیسرآلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) در سیاهدانه با شماره دسترسی LC719288.1 و ژن یوبیکویتین (*Ubiquitin*) در گیاه آرابیدوسیس با شماره دسترسی NM_116090.3 از پایگاه داده در *NCBI* دانلود شد و طراحی آغازگرها با استفاده از برنامه‌های *oligoanalyzer* و *Primer3* انجام شد (جدول ۱).

بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از RT-qPCR^۱

به منظور بررسی تفاوت در الگوی بیان ژن‌های کلیدی *GTS* و *DXR* مسیر بیوسنتزی تیموکینون دو اکوتیپ، از روش ریل تایم پی سی آر استفاده شد. همچنین، تأثیر متیل جاسمونات بر بیان این ژن‌ها در ساعات مختلف پس از تیمار نیز مورد بررسی قرار گرفت. RNA از بذرهای جمع‌آوری شده با استفاده از کیت ترايزول شرکت روزه ساخت کشور ایران استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA ی استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانو دراپ تعیین گردید و با استفاده از آنزیم DNase1 شرکت سیناکلون آلودگی احتمالی به DNA ژنومی، حذف گردید. پس از تیمار RNA با آنزیم DNase1، یک میکروگرم RNA به منظور سنتز cDNA و بر اساس دستورالعمل موجود در کیت سنتز cDNA شرکت Addbio ساخت کشور کره جنوبی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تأیید صحت سنتز cDNA واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی cDNA های سنتز شده با استفاده از آغازگرهای یوبیکویتین با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از مستر میکس Amplicon انجام شد. همچنین به منظور بررسی آلودگی احتمالی در واکنش PCR، از RNA استخراجی به عنوان الگو نیز در واکنش استفاده گردید.

پس از تأیید سنتز cDNA از RNA های استخراج شده، آزمایش ریل تایم پی سی آر با استفاده از مخلوط واکنش امپلیکون حاوی سایبر گرین انجام شد. به منظور تأیید صحت انجام واکنش رونویسی معکوس و نیز به منظور مطالعه‌ی میزان بیان ژن‌های هدف در این بررسی از ژن‌های *GAPDH* و یوبیکویتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد (Mazrooei *et al.*, 2017).

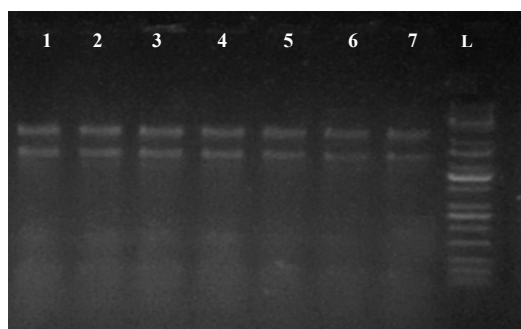
واکنش Real time PCR با استفاده از سه تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی و با استفاده از دستگاه micPCR مدل 48 چاهکی انجام شد. این دستگاه با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR کارایی آغازگرها را برای هر چاهک به صورت جداگانه محاسبه می‌کند.

جدول ۱. مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن.

Table 1. Specifications related to the primers used for gene expression analysis.

ژن Gene	توالی (۵'-۳') Sequences (5'-3')	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing Temperature (°C)	طول قطعه تکثیر شده (جفت‌باز) Amplicon Size (bp)
GAPDH-F	TGCTGCTCATTGAAGGGTG	۶۳	۱۵۶
GAPDH-R	AGTGGAGCAAGGCAGTTGT		
Ubiquitin-F	GATGCAGATCTTCGTGAAAACC	۶۳	۱۱۲
Ubiquitin-R	TGGGATTCTTCCTTGCTCTTG		
GTS-F	AGTTCCCAAGTCATCAGCAAG	۶۳	۱۲۵
GTS-R	AAGGATACAAGCCAACCTTGA		
DXR-F	AGGCACCATGACTGGAGTTC	۶۳	۱۵۰
DXR-R	TCGAGGCTTGTTTGGTTAC		

۲۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود و نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ در محدوده ۱/۷ تا ۱/۹ قرار داشت. به منظور حذف آلودگی DNA، از آنزیم DNase I استفاده شد و سپس نمونه‌ها بر روی ژل یک درصد آگارز بارگذاری گردیدند که کیفیت RNA استخراج شده را تأیید کرد (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج استخراج RNA از بذر سیاهدانه. چاهک ۱-۷:

استخراج RNA: L؛ مارکر مولکولی ۱kb.

Figure 2. RNA extraction results from *N. sativa* seeds. Well 1-7: RNA extraction, L: molecular marker 1kb.

در مرحله بعد، سنتز cDNA انجام شد. به منظور تأیید cDNA سنتز شده، آزمایش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های یوبیکوتین به منظور تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۱۲ جفت‌باز انجام شد (شکل ۳). سپس برای تأیید شناسایی و تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد بررسی، آزمایش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

همچنین از الگویابی منحنی ذوب جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش استفاده گردید. علاوه بر این به منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر بعد از انجام آزمایش ریل تایم پی‌سی‌آر محصولات حاصل روی ژل آگارز ۱/۲ درصد بارگذاری شدند و از نظر مشاهده یک باند اختصاصی با سایز مورد پیش‌بینی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین انجام توالی‌یابی روی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد بررسی انجام گرفت.

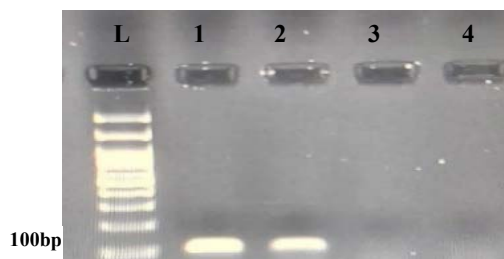
محاسبه میزان نسبی بیان ژن و آنالیز آماری

مقایسه بیان ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش با استفاده از پکیج *mirzaghaderi/rtqcr* (Mirzaghaderi, 2024) نرم‌افزار R انجام شد. این پکیج که می‌تواند بیان نسبی را بر اساس دو یا تعداد بیشتری از ژن رفرنس به همراه کارایی تکثیر محاسبه کند، خطای استاندارد را بر اساس روش Taylor و آنالیزهای آماری با استفاده از روش Ganger انجام می‌دهد (Ganger et al, 2017; Taylor et al, 2019). مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از این پکیج در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از روش LSD انجام شد.

نتایج و بحث

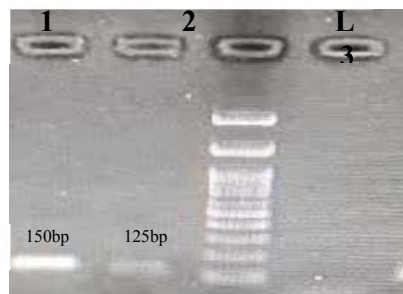
پس از استخراج RNA، غلظت آن با استفاده از نانودراپ اندازه‌گیری شد. غلظت نمونه‌ها بین ۱۰۰۰ تا

هر ژن انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان دهنده حضور یک باند اختصاصی با اندازه مورد نظر بود (شکل ۴).



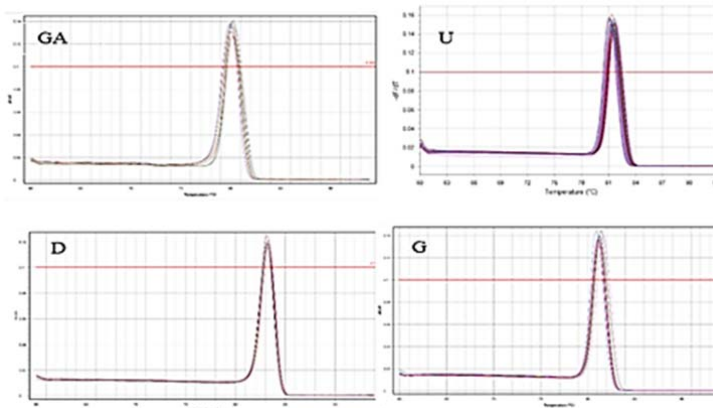
شکل ۳. تأیید سنتز cDNA. L: مارکر مولکولی ۱kb، چاهک ۱ و ۲: cDNA سنتز شده، چاهک ۳: کنترل منفی با استفاده از آب، چاهک ۴: کنترل منفی با استفاده از RNA

Figure 3. Confirmation of cDNA synthesis. L: molecular marker 1kb, wells 1 and 2: synthesized cDNA, well 3: negative control using water, well 4: negative control using RNA.



شکل ۴. نتیجه تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر با استفاده از PCR. چاهک ۱: ژن DXR، چاهک ۲: ژن GTS، چاهک ۳: کنترل منفی PCR. چاهک ۴: مارکر مولکولی ۱kb، چاهک ۳: کنترل منفی PCR.

Figure 4. Results of specific amplification of target genes using PCR. Well 1: DXR gene, well 2: GTS gene, L: molecular marker 1kb, well 3: PCR negative control.



شکل ۵. منحنی ذوب. GA: ژن GAPDH، U: ژن یوبیکوئین، D: ژن DXR، G: ژن GTS.

cDNAهای تأیید شده برای بررسی تفاوت بیان با استفاده از واکنش Real time PCR استفاده شد و پس از انجام واکنش، Ct مربوط به هر نمونه توسط دستگاه با توجه به نمودار تکثیر تعیین شد و مورد بررسی و کمی سازی قرار گرفت. سپس در مرحله بعد واکنش منحنی ذوب Melt Curve برای تأیید تکثیر اختصاصی انجام شد (شکل ۵). علاوه بر این، نتایج توالی‌یابی محصولات PCR با توالی‌های شناسایی شده در پایگاه NCBI مقایسه شد و همولوژی ۱۰۰ درصد و ۹۱ درصد به ترتیب برای ژن‌های DXR و GTS مشاهده گردید.

مقایسه میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در دواکوئپ

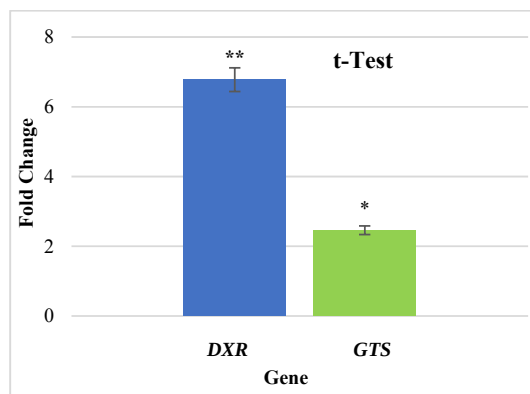
مقایسه بیان ژن‌های مورد مطالعه در دواکوئپ H و K با استفاده از آزمون t-test پکیج [mirzaghaderi/rttPCR](#) نرم افزار R نشان داد که میزان بیان ژن‌های DXR و GTS در اکوتیپ H بالاتر می‌باشد و این اختلاف بیان در سطح ۵ درصد به صورت معنادار است (شکل ۶). تفاوت میزان بیان ژن‌های مذکور در دو اکوتیپ نشان دهنده نقش ژنوتیپ در میزان بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی تیموکینون می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط مجدی و همکاران (Majdi et al., 2014) روی گیاه بابونه کبیر انجام گرفت مشخص شد که میزان بیان ژن‌های ترپنویید سنتز می‌تواند تحت تأثیر ژنوتیپ متغیر باشد.

Figure 5. Melting curve. GA: *GAPDH*, U: Ubiquitin gene, D: *DXR* gene, G: *GTS* gene.

میکرومولار متیل جاسمونات نشان داد که میزان بیان ژن در ۱۲ ساعت بعد از تیمار به صورت معناداری نسبت به شاهد افزایش داشته است و بعد از آن میزان بیان روند کاهشی را نسبت به تیمار ۱۲ ساعت طی می‌کند تا اینکه در ۴۸ ساعت بعد از تیمار میزان بیان به حداقل می‌رسد (شکل ۷). طی تحقیقی که روی گیاه مرزه (*Satureja hortensis*) انجام شد مشخص شد که بیان ژن *DXR* در ۱۲ ساعت بعد از اعمال تیمار متیل جاسمونات به بالاترین سطح خود می‌رسد و پس از آن میزان بیان به تدریج کاهش یافته و در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار به سطح گیاه شاهد نزدیک می‌شود (Ghobadi et al., 2016). مطالعه دیگر روی نقش متیل جاسمونات در میزان بیان ژن *DXR* در گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) نشان داد در ۲۴ ساعت اول اعمال تیمار بیان ژن *DXR* افزایش می‌یابد و بعد از آن بیان ژن *DXR* روند کاهشی را طی می‌کند (Jamshidi et al., 2019).

آنالیز بیان ژن *GTS* در دو اکوتیپ تحت تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در سطح ۵ درصد انجام شد. آنالیز بیان این ژن در اکوتیپ H نشان داد که میزان بیان این ژن در ۱۲ ساعت بعد از تیمار روند کاهشی معناداری را نسبت به شاهد دارد. و بعد از آن روند تغییر میزان بیان به صورت افزایشی است به طوری که میزان بیان در ۴۸ ساعت بعد از تیمار به حداکثر می‌رسد. این افزایش بیان نسبت به گیاه شاهد در ۲۴ ساعت بعد از تیمار غیرمعنادار و در ۴۸ ساعت بعد از تیمار بسیار معنادار بوده است. آنالیز بیان ژن *GTS* در اکوتیپ K تحت تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات نشان داد که میزان بیان این ژن نسبت به گیاه شاهد در ۱۲ ساعت بعد از تیمار تغییر قابل توجهی را نشان نمی‌دهد و بعد از آن در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار روند افزایشی معناداری را نشان می‌دهد به طوری که در ۴۸ ساعت بعد از تیمار به حداکثر می‌رسد (شکل ۸). این مشاهدات با نتایج بررسی بیان ژن گاماترپنین سنتاز در گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) تحت تیمار متیل جاسمونات مطابقت دارد. نتایج این بررسی در گیاه زنیان

همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط موریرا و همکاران (Moreira et al., 2019) روی گیاه *Baccharis salicifolia* انجام گرفت مشخص شد که میزان مونوترپن در این گیاه تحت تأثیر ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است. میزان بیان بالای این دو ژن در اکوتیپ H نسبت به اکوتیپ K و نیز بالا بودن میزان تیموکینون در اکوتیپ H نسبت به اکوتیپ K (میزان تیموکینون توسط الیاسی و همکاران بررسی شده است) نشان دهنده اهمیت بیان این ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی تیموکینون و احتمالاً میزان تیموکینون تولید شده در بذر گیاه سیاهدانه است.



شکل ۶. مقایسه تغییرات بیان ژن *DXR* و *GTS* اکوتیپ H نسبت به اکوتیپ K با استفاده از آزمون t جفت نشده نرم افزار R. *: سطح معناداری.

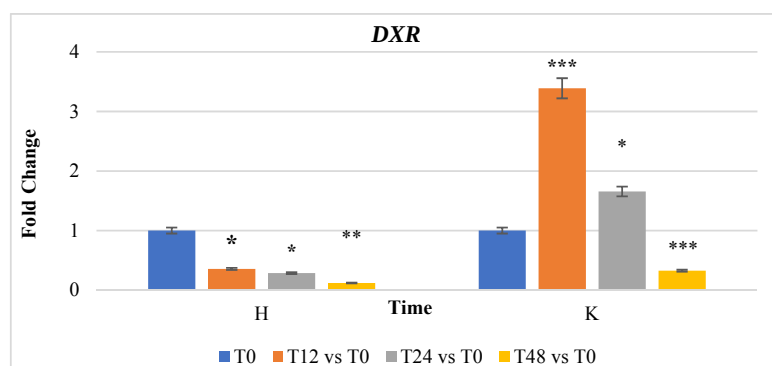
Figure 6. Comparison of *DXR* and *GTS* gene expression changes in ecotype H compared to ecotype K using an unpaired t-test in R software. *: Significance level.

مقایسه میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در دو اکوتیپ تحت اثر متیل جاسمونات

آنالیز بیان ژن *DXR* در دو اکوتیپ تحت تیمار متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار در سطح ۵ درصد انجام شد. آنالیز بیان این ژن در اکوتیپ H نشان داد که میزان بیان این ژن در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار روند کاهشی معناداری را نسبت به نمونه شاهد طی کرده است، و در ۴۸ ساعت بعد از تیمار به حداقل رسیده است. همچنین نتایج آنالیز بیان این ژن در اکوتیپ K تحت تیمار ۱۰۰

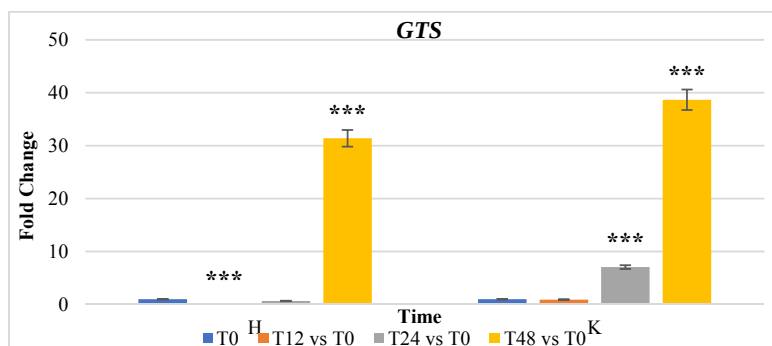
کارواکرول در سه ژنوتیپ آویشن تحت اعمال تیمار ۲۴ ساعت متیل جاسمونات انجام گرفت، نقش متیل جاسمونات به عنوان افزایش دهنده میزان بیان این ژن تأیید شد، با این حال این بررسی نشان داد تأثیر متیل جاسمونات بر روی سطوح بیان ژن *TPS2* در بین گونه‌های مختلف آویشن وابسته به ژنوتیپ است و تحت تأثیر ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است، که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. با توجه به نقش این ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی تیموکینون، استفاده از تیمار متیل جاسمونات با افزایش بیان این ژن‌ها احتمالاً می‌تواند منجر به افزایش میزان تیموکینون در بذر سیاهدانه گردد.

نشان داد در ۲۴ ساعت اول اعمال تیمار بیان ژن گاماترپنین‌سنتاز افزایش می‌یابد (Jamshidi et al., 2019). با توجه به پیچیدگی مسیر بیوسنتزی متابولیت‌ها و نیز با توجه به اثرات چند وجهی الیستورها نوسانات بیان در ساعات مختلف اعمال دور از انتظار نمی‌باشد، اما آنچه اهمیت دارد، تأیید نقش متیل جاسمونات در افزایش بیان ژن‌های *DXR* و *GTS* است. این اطلاعات نشان می‌دهد که زمان اعمال تیمار و ژنوتیپ نقش مهمی در افزایش میزان بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی تیموکینون دارد. در مطالعه‌ای که توسط کیان ارثی و همکاران (Kianersi et al., 2021) بر روی بیان ژن *TPS2* از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی تیمول و



شکل ۷. میزان بیان ژن *DXR* نسبت به شاهد در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات. H: اکوتیپ H، K: اکوتیپ K، T0: زمان کنترل، T12: ۱۲ ساعت بعد از تیمار، T24: ۲۴ ساعت بعد از تیمار، T48: ۴۸ ساعت بعد از تیمار، * معناداری در سطح ۵ درصد.

Figure 7. The expression level of the *DXR* gene is relative to the control in two ecotypes of *N. sativa* under methyl jasmonate treatment. H: ecotype H, K: ecotype K, T0: control time, T12: 12 hours after treatment, T24: 24 hours after treatment, T48: 48 hours after treatment, * significance at the 5% level.



شکل ۸. میزان بیان ژن *GTS* نسبت به شاهد در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات. H: اکوتیپ H، K: اکوتیپ K، T0: زمان کنترل، T12: ۱۲ ساعت بعد از تیمار، T24: ۲۴ ساعت بعد از تیمار، T48: ۴۸ ساعت بعد از تیمار، * معناداری در سطح ۵ درصد.

Figure 8. The expression level of the *GTS* gene is relative to the control in two ecotypes of *N. sativa* under methyl jasmonate treatment. H: ecotype H, K: ecotype K, T0: control time, T12: 12 hours after treatment, T24: 24 hours after treatment, T48: 48 hours after treatment, * significance at the 5% level.

نسبت به ۲۴ ساعت ۵/۴۷ برابر افزایش بیان را نشان داده است (جدول ۲). مقایسه میانگین میزان بیان ژن *DXR* در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات در زمان‌های مختلف نشان داد که اعمال تیمار در اکوتیپ H باعث کاهش میزان بیان این ژن می‌گردد و بیشترین میزان کاهش بیان در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار بوده است. نتایج مقایسه میانگین‌ها در اکوتیپ K نشان داد که اعمال تیمار متیل جاسمونات در ۱۲ ساعت پس از تیمار باعث افزایش ۳/۳۸ برابری میزان بیان در این اکوتیپ نسبت به شاهد می‌گردد. همچنین اعمال تیمار در ۲۴ ساعت پس از تیمار هر چند باعث افزایش بیان ۱/۶۵ برابری نسبت به گیاه شاهد می‌شود اما نسبت به ۱۲ ساعت کاهش بیان معناداری را نشان داده است. علاوه بر این نتایج نشان داد که بیشترین کاهش میزان بیان ژن *DXR* در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار اتفاق می‌افتد (جدول ۳). به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که اعمال تیمار متیل جاسمونات می‌تواند بر میزان بیان هر دو ژن در هردو اکوتیپ سیاهدانه مؤثر باشد اما این تأثیر وابسته به زمان اعمال و ژنوتیپ متفاوت است. علاوه بر این می‌توان با اعمال تیمار ۲۴ ساعت متیل جاسمونات بیان این دو ژن را و احتمالاً میزان تیموکینون را در بذر گیاه سیاهدانه افزایش داد.

مقایسه میانگین میزان بیان ژن *GTS* و *DXR* در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار با استفاده از آزمون LSD نرم‌افزار R در سطح ۵ درصد انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که در هر دو اکوتیپ بیشترین میزان بیان ژن *GTS* در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار بوده است، به طوری که در اکوتیپ H میزان بیان نسبت به شاهد ۳۱/۳۹ برابر و در اکوتیپ K این میزان ۳۸/۶۷ نسبت به شاهد مشاهده شد. همچنین بررسی‌ها نشان داد که اگرچه اعمال تیمار متیل جاسمونات در اکوتیپ H در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار نسبت به ۱۲ ساعت افزایش بیان ۱۰/۵۳ برابری را داشته است، اما میزان بیان در این اکوتیپ در شرایط ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار نسبت به شاهد کاهش داشته است، که این کاهش بیان در ۱۲ ساعت معنادار و در ۲۴ ساعت غیرمعنادار بوده است. این در حالی است که در اکوتیپ K میزان بیان این ژن در ۱۲ ساعت بعد از اعمال تیمار کاهش غیر معناداری را نسبت به شاهد داشته است و سطح بیان تقریباً برابر با گیاه شاهد بوده است و بعد از آن میزان بیان روند صعودی را طی کرده است، به صورتی که در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار نسبت به ۱۲ ساعت ۷/۶۹ برابر و در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار

جدول ۲. مقایسه میانگین میزان بیان ژن *GTS* در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات در زمان‌های مختلف.

Table 2. Comparison of the mean expression level of *GTS* gene in two ecotypes of *N. sativa* under methyl jasmonate treatment at different times.

مقایسه Contrast	تغییر بیان ژن Fold Change		خطای استاندارد Standard Error		p. value		معناداری Significance	
	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H
T12 vs T0	۰/۹۱۹۰۸	۰/۰۶۳۲	۰/۳۷۰۰۱۶	۰/۳۷۰۲۵۳۶	۰/۶۶۴۱	<۰/۰۰۰۱	ns	***
T24 vs T0	۷/۰۶۷۸۳	۰/۶۶۶۱	۰/۳۷۰۰۱۶	۰/۳۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۷۳۱	***	ns
T48 vs T0	۳۸/۶۷۳۱۹	۳۱/۳۹۰۸	۰/۳۷۰۰۱۶	۰/۳۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	***	***
T24 vs T12	۷/۶۹۰۱۲	۱۰/۵۳۰۸	۰/۳۷۰۰۱۶	۰/۳۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	***	***
T48 vs T12	۴۲/۰۷۷۱۰	۴۹۶/۳۰۰۹	۰/۳۷۰۰۱۶	۰/۳۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	***	***
T48 vs T24	۵/۴۷۱۵۸	۴۷/۱۲۸۵	۰/۳۷۰۰۱۶	۰/۳۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	***	***

ns و ***: به ترتیب غیر معناداری و معناداری در سطح احتمال ۵ درصد.

ns and ***: indicate non-significance and significance at the 5% probability level, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین میزان بیان ژن *DXR* در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات در زمان‌های مختلف.

Table 3. Comparison of the mean expression level of *DXR* gene in two ecotypes of *N. sativa* under methyl jasmonate treatment at different times.

مقایسه Contrast	تغییر بیان ژن Fold Change		خطای استاندارد Standard Error		p. value		معناداری Significance	
	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H
T12 vs T0	۳/۳۸۸۳۱۳	-۰/۳۵۶۶۲	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	-۰/۰۰۰۳	-۰/۰۲۸۸	***	*
T24 vs T0	۱/۶۵۷۱۶۹	-۰/۲۸۵۴۱۶	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	-۰/۰۳۸۸	-۰/۰۱۳۲	*	*
T48 vs T0	-۰/۳۲۶۳۶۹	-۰/۱۱۹۴۲۶	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	-۰/۰۰۰۶	-۰/۰۰۱۱	***	**
T24 vs T12	-۰/۴۸۹۰۸۴	-۰/۸۰۰۲۴۳	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	-۰/۰۰۸۱	-۰/۵۵۹۱	**	ns
T48 vs T12	-۰/۰۹۶۳۳۲	-۰/۳۳۴۸۴۴	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	<۰/۰۰۰۱	-۰/۰۲۲۹	***	*
T48 vs T24	-۰/۱۹۶۹۴۴	-۰/۴۱۸۴۲۸	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	<۰/۰۰۰۱	-۰/۰۵۲۱	***	ns

ns, *, ** و ***: به ترتیب غیر معناداری و معناداری در سطح احتمال ۵ درصد.

ns and ***: indicate non-significance and significance at the 5% probability level, respectively.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

علی‌رغم اهمیت گیاه سیاهدانه به‌عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند تا کنون مطالعات بسیار اندکی در خصوص شناسایی ژن‌ها و مسیرهای متابولیسمی موجود در آن صورت گرفته است. تحقیق حاضر به بررسی تفاوت میزان بیان ژن‌های کلیدی (*DXR* و *GTS*) مسیر بیوسنتزی تیموکینون در دو اکوتیپ گیاه سیاهدانه با میزان متفاوت تیموکینون پرداخته است. این بررسی نشان داد که سطوح بیان ژن‌های *DXR* و *GTS* در دو اکوتیپ متفاوت است و میزان بیان این ژن‌ها در اکوتیپ با میزان بیشتر تیموکینون به‌طور معناداری بالاتر است. با توجه به اینکه طبق مطالعات مختلف میزان رونوشت ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی با میزان تولید ترکیبات ترپنی ارتباط مستقیم دارد (Nagegowda *et al.*, 2010)، و نیز با توجه به نقش کلیدی ژن‌های *DXR* و *GTS* در مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها، افزایش بیان این ژن‌ها می‌تواند

نشان‌دهنده نقش این ژن‌ها در افزایش میزان تولید تیموکینون در بذر سیاهدانه باشد. همچنین بررسی‌ها نشان داد که استفاده از تیمار متیل جاسمونات می‌تواند به‌طور مؤثری بیان ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتزی تیموکینون را بسته به زمان اعمال و نوع ژنوتیپ افزایش دهد. به‌طور کلی یافته‌های این پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات بیشتری در جهت شناسایی بهتر مسیر بیوسنتزی تیموکینون و نیز افزایش تولید آن در سیاهدانه باشد. در همین راستا به‌نظر می‌رسد به تحقیقات بیشتری پیرامون مطالعه بیان سایر ژن‌های مهم مرتبط با مسیر بیوسنتزی تیموکینون و همچنین ارتباط آن‌ها با تجمع تیموکینون تحت تأثیر متیل جاسمونات و یا تیمار با سایر محرک‌های شیمیایی لازم باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

- Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14 (5), 323-328. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q)
- Burke, C. C., Wildung, M. R., & Croteau, R. (1999). Geranyl diphosphate synthase: Cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (23), 13062-13067. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13062>
- Botnick, I., Xue, W., & Bar, E. *et al.* (2012). Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. *Molecules*, 17 (9), 10159-10177. <https://doi.org/10.3390/molecules170910159>
- Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., & Cunillera, N. *et al.* (2002). Expression and molecular analysis of the Arabidopsis *DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiology*, 129 (4), 1581-1591. <https://doi.org/10.1104/pp.003798>

- Carretero-Paulet, L., Cairo, A., & Botella-Pavia, P. *et al.* (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Molecular Biology*, 62 (4), 683-695. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9051-9>
- Crocoll, C., Asbach, J., & Novak, J. *et al.* (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 73 (6), 587-603. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9636-1>
- Nagegowda, D. A. (2010). Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters*, 584 (14), 2965-2973. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.045>
- De Geyter, N., Gholami, A., & Goormachtig, S. *et al.* (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, 17 (6), 349-359. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.001>
- Dixon, R. A. (1999). Plant natural products: The molecular genetic basis of biosynthetic diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 10 (2), 192-197. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)80034-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80034-2)
- El Gazzar, M., El Mezayen, R., & Marecki, J.C. *et al.* (2006). Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology*, 6 (7), 1135-1142. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.02.004>
- Elyasi, R., Majdi, M., & Bahramnejad, B. *et al.* (2016). Spatial modulation and abiotic elicitors responses of the biosynthesis related genes of mono/triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*). *Industrial Crops and Products*, 79, 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.005>
- Elyasi, R., Majdi, M., & Krause, S. *et al.* (2022). Identification and functional characterization of a γ -terpinene synthase in *Nigella sativa* L (black cumin). *Phytochemistry*, 202: Article 112466. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113290>
- Enfissi, E.M., Fraser, P.D., & Lois, L.M. *et al.* (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate forming pathways for the production of health promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 3 (1), 17-27. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00091.x>
- Estevez, J.M., Cantero, A., & Romero, C. *et al.* (2000). Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124 (1), 95-104. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.95>
- Ganger, M.T., Dietz, G.D., & Ewing, S.J. (2017). A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics*, 18: Article 1949. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1949-5>
- Ghisla, S., Bouwmeester, H., & Beyer, P., *et al.* (2012). The path from β -carotene to carlactone: a strigolactone-like plant hormone. *Science*, 335 (6074), 1348-1351. <https://doi.org/10.1126/science.1218094>
- Ghobadi, S., Maroufi, A., & Majd, M. (2016). Differential expression of the key genes involved in the biosynthesis of monoterpenes in different tissues and in response to abiotic elicitors in summer savory (*Satureja hortensis*). *Journal of Cell Tissue*, 7 (3), 275-291. (in Persian)
- Halawani, E. (2009). Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of **Nigella sativa* L.*, and their interaction with some antibiotics. *Advances in Biological Research*, 3 (5), 148-152.
- Hatami, M., & Ghorbanpour, M. (2014). Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. *Turkish Journal of Biology*, 38 (1), 130-139. <https://doi.org/10.3906/biy-1304-64>
- Hosseinizadeh, H., & Parvardeh, S. (2004). Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine*, 11 (1), 56-64. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00376>
- Hosseinizadeh, H., Taiari, S., & Nassiri-Asl, M. (2012). Effect of thymoquinone, a constituent of *Nigella sativa* L., on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385 (5), 503-508. <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0726-2>
- Huang, Y., Xie, F. J., & Cao, X. *et al.* (2021). Research progress in biosynthesis and regulation of plant terpenoids. *Biotechnology Biotechnological Equipment*, 35 (1), 1799-1808. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.2020162>
- Jamshidi, M., Sadat-Noori, S.A., & Mortazavian, S.M.M. (2019). Study the quantitative expression pattern of some involved genes on monoterpene biosynthesis pathway and identification of essential compounds affected by methyl jasmonate in Ajowan plant. *Agricultural Biotechnology Journal*, 11 (3), 133-152. (in Persian)

- Kianersi, F., Pour-Aboughadareh, A., & Majdi, M. *et al.* (2021). Effect of methyl jasmonate on thymol, carvacrol, phytochemical accumulation, and expression of key genes involved in thymol/carvacrol biosynthetic pathway in some Iranian Thyme species. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (20), 11124. <https://doi.org/10.3390/ijms222011124>
- Krause, S. T., Liao, P., & Crocoll, C. *et al.* (2021). The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118 (52), e2110092118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110092118>
- Lichtenthaler, H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 50 (1), 47-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.47>
- Liu, X., Park, J.H., & Abd El-Aty, *et al.* (2013). Isolation of volatiles from *Nigella sativa* seeds using microwave-assisted extraction: effect of whole extracts on canine and murine cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (34), 8107-8113. <https://doi.org/10.1002/bmc.2887>
- Mahmoud, S.S., & Croteau, R.B. (2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (15), 8915-8920. <https://doi.org/10.1073/pnas.141237298>
- Majdi, M., Karimzadeh, G., & Malboobi, M.A. (2014). 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. *Plant Genetic Researches*, 1 (2), 25-32. (in persian)
- Majdi, M., Abdollahi, M.R., & Maroufi, A. (2015). Parthenolide accumulation and expression of genes related to parthenolide biosynthesis affected by exogenous application of methyl jasmonate and salicylic acid in *Tanacetum parthenium*. *Plant Cell Reports*, 34 (11), <https://doi.org/1909-1918.10.1007/s00299-015-1837-2>
- Mazrooei, S.S.A., & Ghazala, W.S. (2018). Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Nigella sativa*. *Molecular Biology Reports*.
- Mirzaghaderi, G. (2024). rtPCR: A package for statistical analysis of real-time PCR data in R. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4193266/v1>
- Mbuni, M., Wang, S., & Mwangi, B. N. *et al.* (2020). Medicinal plants and their traditional uses in local communities around Cherangani Hills, Western Kenya. *Plants* (Basel), 9 (3), 331. <https://doi.org/10.3390/plants9030331>
- Nomani, M., Noori, S. A. S., & Tohidfar, M. *et al.* (2019). Overexpression of TPS2 gene to increase thymol content using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Trachyspermum ammi* (Qom ecotype). *Industrial Crops and Products*, 130, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.076>
- Oladeji, O. (2016). The characteristics and roles of medicinal plants: Some important medicinal plants in Nigeria. *Natural Product Industry Journal*, 12 (3), 102.
- Saad, A. H., & Darweesh, M. F. (2013). Efficacy of thymoquinone against vaginal candidiasis in prednisolone-induced conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*. <https://doi.org/10.5555/20133188818>
- Sallaud, C., Rontein, D., & Onillon, S. *et al.* (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *The Plant Cell*, 21: 301-317. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057885>
- Sandberg, F., & Corrigan, D. (2001). Natural remedies: Their origins and uses. Abingdon: Taylor Francis. <https://doi.org/10.1201/9781420024692>
- Sapir-Mir, M., Mett, A., & Belausov, E. *et al.* (2008). Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiology*, 148 (3), 1219-1228. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127951>
- Schwab, W. (2003). Metabolome diversity: Too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*, 62 (6), 837-849. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00723-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00723-9)
- Taylor, S.C., Nadeau, K., & Abbasi, M. *et al.* (2019). The ultimate qPCR experiment: Producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in Biotechnology*, 37 (7), 761-774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- Wildung, M.R., & Croteau, R.B. (2005). Genetic engineering of peppermint for improved essential oil composition and yield. *Transgenic Research*, 14 (4), 365-372. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-5475-2>
- Yar, T., El-Hariri, M., & El-Bahai, M. *et al.* (2008). Effects of *Nigella sativa* supplementation for one month on cardiac reserve in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 52 (2), 141-148.
- Zhao, L., Gao, L., & Wang, H. *et al.* (2013). The R2R3-MYB, bHLH, WD40 and related transcription factors in flavonoid biosynthesis. *Functional and Integrative Genomics*, 13 (1), 75-98. <https://doi.org/10.1007/s10142-012-0301-4>