DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2011.6390

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران

جلد ۲۷، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۵۰۸-۴۹۵ (۱۳۹۰)

بیان متفاوت ژن لیمونن سینتاز در اندام‌ها و مراحل نموی زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.)

مریم قنادنیا[۱]، رحیم حداد[۲]، فاطمه زرین‌کمر[۳*] و مظفر شریفی[٤]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

۳*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

پست الکترونیک: zarinkamar@modares.ac.ir

٤- استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۹

چکیده

در این تحقیق بیان ژن لیمونن سینتاز با استفاده از روش SQ-RT-PCR در اندام‌ها و مراحل رشد و نموی مختلف گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) بومی ایران بررسی شد. پس از کشت گیاهان و نمونه‌برداری از ریشه، ساقه و برگ (هر کدام یک مرحله) و گل‌ها (در چهار مرحله نموی)، نتایج مشخص کرد که این ژن در گل‌های بسیار کوچک (<۲mm)، کوچک (۳-٤mm) و نیز بافت رویشی ساقه بیان شده، در حالیکه در ریشه، برگ و گل‌های با اندازه‌های متوسط (٤-۵mm) و بزرگتر از آن بیان نمی‌شود. حداکثر بیان ژن لیمونن سینتاز در ساقه بوده و پس از آن بیشترین بیان در گل‌های بسیار کوچک و بعد کوچک مشاهده شد. بیان ژن لیمونن سینتاز در جوانترین مراحل نموی گل‌ها زیاد بوده و به تدریج کاهش یافته و متوقف گردید. همچنین نتایج نشان داد که این ژن در مراحل مختلف رشد و نموی گیاهان کامل، از گیاهچه‌های دو برگی تا مرحله گلدهی بیان می‌شود. بیان ژن لیمونن سینتاز با ورود گیاهان به مرحله زایشی افزایش یافته که نشان‌دهنده بیان همزمان آن در اندام‌های رویشی و زایشی گیاه می‌باشد. نتایج حاصل از تعیین توالی جزیی ژن لیمونن سینتاز زیره سبز در این تحقیق، شباهت آن با برخی از گیاهان را بین ٦٤-۵۸٪ نشان داد. مطالعات آناتومیکی وجود کانال‌های ذخیره‌کننده روغن‌های فرّار در بافت میوه را مشخص کرد. در مجموع، نتایج حاصل از این پژوهش بیان بالای ژن لیمونن سینتاز در اندام‌های جوان زایشی مولد را تأیید نمود، در حالیکه بیان زیاد آن در بافت رویشی ساقه و کل دوره زندگی گیاه نیز قابل توجه بود.

واژه‌های کلیدی: SQ-RT-PCR، زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.)، ژن لیمونن سینتاز.

مقدمه

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* L. گیاهی علفی از خانواده چتریان Apiaceae است که به دلیل رایحه خاص، خواص دارویی، درمانی و خوراکی دارای ارزش اقتصادی زیادی می‌باشد (Sowbhagya *et al.*, 2008).

Abbreviations: DEPC, Dimethylpyrocarbonate; DXS, 1-Deoxy-Dxylulose-5-phosphate synthase; GPP, Geranyl diphosphate; MEP, 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate; RCF, Relative centrifugal force; SQ-RT-PCR, Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction.

از مهمترین کشورهای تولیدکننده آن می‌توان به ایران، مصر و مراکش اشاره کرد (Hashemi *et al.*, 2008).برخی ویژگی‌های دارویی مهم آن خواص آنتی‌اکسیدانی (Thippeswamy & Naidu, 2005)، ضدباکتریایی (Sagdıc & Ozcan, 2003) و ضدقارچی (Sekine *et al.*, 2007) می‌باشد. دانه‌های (میوه) این گیاه دارای حدود ۵-۲ درصد روغن فرّار است (Parthasarathy *et al.*, 2008؛ Kan *et al.*, 2007؛ Behera *et al.*, 2004) که حدود ۶۵-۴۰ درصد آن را کومین‌آلدئید (cuminaldehyde) تشکیل می‌دهد (Parthasarathy *et al.*, 2008). کومین‌آلدئید، سیمن (cymene) و ترپنوئیدها عمده اجزای تشکیل‌دهنده روغن‌های فرّار این گیاه هستند (Thippeswamy & Naidu, 2005). طعم خاص زیره به مونوترپن‌ها و دئیدروکومین‌آلدئید (dihydrocuminaldehyde) آن بستگی دارد (Parthasarathy *et al.*, 2008). ترپنوئیدها بزرگترین گروه از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند. برخی از انواع فرّار آنها در واکنش‌های دفاعی گیاهان نقش دارند (Dudareva *et al.*, 2006). انواعی دیگر خواص دارویی، ضدمیکروبی و ویروسی دارند (Asres *et al.*, 2005). اخیراً مطالعات در زمینه تغییرات بیوسنتزی ترپنوئیدها در گیاهان دارویی و معطر به شدت مورد توجه قرار گرفته‌است. دو مسیر بیوسنتزی جهت تشکیل ترپنوئیدها وجود دارد (Gomez-Galera *et al.*, 2007؛ Munoz-Bertomeu *et al.*, 2008؛ Schilmiller *et al.*, 2009). لیمونن از ساده‌ترین مونوترپن‌های حلقوی است که در روغن فرّار بسیاری از گیاهان مانند خانواده‌های Lamiaceae، Rutaceae، Pinnaceae و Apiaceae وجود دارد که به تدریج و با تغییرات بعدی به مشتقات فراوانی مانند کومین‌آلدئید و پریل‌آلدئید (perillaldehyde) تبدیل می‌شود. تولید لیمونن به‌عنوان اولین حدواسط در این مسیر بیوسنتزی به نظر یک مرحله محدودکننده است (Mahmoud *et al.*, 2004) که از تغییرات عمده اکسیداسیون احیایی آن ترکیب های متنوعی تولید می‌گردد (McConkey *et al.*, 2000). لیمونن سینتاز یک آنزیم سیکلاز در مسیر بیوسنتزی برخی ترکیب های روغن بوده و به‌عنوان عامل مهمی در بیوسنتز روغن فرّار به‌شمار می‌رود که واکنش تبدیل پیش‌ماده GPP به لیمونن را کاتالیز می‌کند (Munoz-Bertomeu *et al.*, 2008).

برخلاف برخی از گیاهان زراعی مانند برنج که حتی نقشه ژنتیکی آن کامل شده‌است، اطلاعات کمی درباره ژنتیک متابولیسم ثانویه گیاهان دارویی وجود دارد، به‌طوری‌که ژن‌های بسیاری از مسیرها مشخص نشده و اطلاعات کمی درباره تنظیم و عملکرد انواع آنها وجود دارد. تکثیر تعدادی از گیاهان دارویی به دلیل فقدان اطلاعات کافی در رابطه با نیازهای خاص آنها جهت تولیدمثل جنسی، خواب و نمو دانه، جوانه‌زنی و رشد گیاه مشکل است (Canter *et al.*, 2005). استفاده از این نوع گیاهان در زمینه‌های مختلف سبب برداشت بیش از حد آنها از طبیعت شده و می‌تواند تعداد زیادی از این نوع گیاهان را در معرض انقراض قرار دهد (Leaman, 2001). بنابراین، توسعه روشهای تکثیری این نوع گیاهان در شرایط کنترل شده، تغییرات مواد شیمیایی، مهندسی ژنتیک، تنظیم و نقش متابولیت‌های ثانویه در رشد و نمو گیاه می‌تواند زمینه این گونه تحقیقات را فراهم سازد (Cole *et al.*, 2007). مونوترپن سینتازها در مراحل تنظیمی مسیر بیوسنتزی به دلیل مشخص نمودن نقاط انشعاب مسیر متابولیکی و کاتالیز اولین مرحله منتهی به تشکیل

خانواده‌های مونوترپنی متفاوت مهم هستند. بنابراین هر گونه دست‌ورزی در بیان ژن‌های آنها می‌تواند موجب تغییر ترکیب‌های موجود در روغن‌های فرّار گیاهی (مانند عطر و اسانس)، تولید مونوترپن‌ها در اندام‌هایی از گیاه که آنها را تولید نمی‌کنند و یا حتی گونه‌هایی که فاقد آنها هستند، شوند. تاکنون تحقیقات کمی در گونه‌های معطر انجام شده‌است (Munoz-Bertomeu *et al.,* 2008). متابولیت‌های ثانویه ترپنوئیدی در تعدادی از برهم‌کنش‌های بین گیاهان با سایر موجودات، انواع حشرات مفید و مضر، علفخوارها و پاتوژن‌ها به‌عنوان مولکول‌های سیگنال عمل می‌کنند (Bohlmann *et al.,* 1998).

بررسی بیان ژن به‌وسیله روش RT-PCR نیمه‌کمی روشی اختصاصی و حساس است که می‌تواند با مقایسه رونوشت‌های ژن مورد نظر و ژن کنترل، تفاوت در بیان ژن‌ها به مقادیر بسیار جزیی را مشخص کند. این روش نسبت به روشهایی مانند نورترن بلات (Northern blotting) مقادیر بسیار کمتری RNA لازم داشته و در زمان کوتاهتری قابل انجام است. همچنین نسبت به روش real-time PCR ساده‌تر بوده و به هزینه کمتری نیاز دارد. از آنجا که لیمونن پیش‌ماده بسیاری از مواد مؤثره ترپنوئیدی موجود در گیاهان است و لیمونن سینتاز به‌عنوان یک ژن کلیدی در ابتدای مسیر بیوسنتزی ترکیب‌های خاص گیاه در اندام‌های مختلف و در مراحل متفاوت رشد و نموی به‌شمار می‌آید و با توجه به وجود متابولیت‌های ثانویه ترپنوئیدی در زیره سبز، این پژوهش با هدف کشف ژن لیمونن سینتاز، تعیین توالی جزئی و بررسی بیان آن در اندام‌های مختلف این گیاه انجام شد.

مواد و روشها

ضدعفونی و کشت گیاهان در گلخانه

بذر گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) بومی شهرستان نیشابور استان خراسان رضوی، از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذرها به مدت ۱۵-۱۲ ساعت در آب جاری قرار گرفته و سپس به‌وسیله وایتکس ۲٪ به مدت سه دقیقه و محلول قارچ‌کش گوگردی (shulphur 80% DF) به مدت دو دقیقه ضدعفونی شدند. بذرها طی دو مرحله فوق و نیز در انتها ۳ مرتبه با آب مقطر سترون آب‌کشی شدند. بذرهای سترون شده در گلدانهای حاوی پیت‌ماس (Klasmann-Deilmann, potgrond H) کشت شده و در شرایط یکنواخت گلخانه‌ای (۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۳±۲۶ ^{o}C) قرار داده شدند. پس از جوانه‌زنی و طی نمودن دوره رویشی، گیاهان وارد مرحله زایشی شدند. جهت بررسی چگونگی بیان ژن لیمونن سینتاز در اندام‌های مختلف گیاه از ریشه، ساقه و برگ گیاهان و نیز چهار اندازه مختلف از گل‌ها شامل: بسیار کوچک (<۲mm)، کوچک (۴-۳mm)، متوسط (۵-۴mm) و بزرگ (>۵mm) نمونه‌برداری انجام شد و پس از تثبیت با ازت مایع در ۸۰^{o}C- نگهداری شدند (شکل ۱). همچنین جهت بررسی زمان آغاز بیان ژن، از گیاهان کامل در مراحل رشد و نموی مختلف شامل دو برگی مرحله یک و دو، سه، چهار، پنج و چند برگی و نیز پیش گلدهی و آغاز گلدهی نمونه‌برداری و تثبیت شد (شکل ۲). برای هر آزمایش از دو نمونه گیاهی که هر کدام حداقل از سه گیاه جداگانه تهیه شده بود، استفاده گردید.

استخراج RNA

جهت استخراج RNA مقدار ۰/۲-۰/۱ گرم از بافت گیاهی در ازت مایع پودر شد. سپس ۵۰۰µl از محلول کیت استخراج RNX-plus (شرکت سیناژن) به آن اضافه شده و پس از ورتکس شدید به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از آن ۲۰۰µl کلروفرم اضافه شده، پس از ۱۵ ثانیه لرزش، ۵ دقیقه در دمای ۴°C قرار داده و سپس در RCF= ۱۳۶۸۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ (مدل Hettich, Mikro 200 R) شد. به میزان ۲۵۰µl از محلول شفاف رویی با مقدار هم حجم ایزوپروپانول مخلوط و پس از چند بار لرزش به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴°C قرار گرفته و دوباره سانتریفوژ گردید. رسوب RNA با اتانول ۷۵٪ شستشو شده و پس از سانتریفوژ در RCF= ۵۳۴۰g به مدت ۸ دقیقه و خشک شدن در جریان هوای استریل، در ۴۰µl آب مقطر DEPC حل شد. کمیت و کیفیت RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل (آگارز ۱/۲٪ و فرمالدئید) با استفاده از رنگ‌آمیزی اتیدیوم برمایید تأیید گردیده و برای مراحل بعدی در ۸۰°C- نگهداری شد.

سنتز cDNA

مقدار ۵µg از RNA استخراج شده با ۱µl از $Oligo(dt)_{18}$ (شماره کاتالوگ K1621، محصول شرکت Fermentas) به غلظت ۱۰۰pmol به تیوب ۰/۲ml منتقل و با آب DEPC به حجم ۱۳µl رسیده، به آرامی مخلوط و به‌طور مختصر سانتریفوژ گردید. سپس تیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار داده شد. پس از انتقال به یخ، مقدار ۴µl بافر×۵ (برای غلظت نهایی×۱) و مخلوط dNTP (10Mm) به مقدار ۲µl (برای غلظت نهایی ۱Mm) به آن اضافه گردیده پس از مخلوط‌سازی، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده‌شد. پس از آن آنزیم نسخه‌برداری معکوس (شماره کاتالوگ K1621، محصول شرکت Fermentas) به حجم ۱Unit به آن اضافه و جهت انجام واکنش سنتز cDNA به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲°C قرار داده شد. در نهایت جهت غیرفعال‌سازی آنزیم نسخه‌برداری معکوس، تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت. cDNA سنتز شده جهت نگهداری به فریزر ۲۰°C- انتقال داده شد.

آغازگرهای مورد استفاده

به علت ناشناخته بودن ترادف ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز، همولوژی آن در چند گیاه از جنس‌های مختلف *Mentha*، *Perilla* و *Citrus* در پایگاه اطلاعاتی NCBI بدست آمد. برای قطعه‌ای به طول ۴۹۰ نوکلئوتیدی پرایمر degenerate طراحی و پس از بهینه‌سازی شرایط PCR با استفاده از شیب دمایی و تغییر غلظت پرایمرها و cDNA مورد استفاده و مشخص شدن باند مورد نظر یک جفت پرایمر خاص برای آن انتخاب گردید. برای کنترل داخلی (شاهد) از ژن آلفاتوبولین استفاده شد (جدول ۱).

RT-PCR نیمه‌کمی

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Techne TC-515) و با غلظت یک چهارم از cDNA انجام شد. برنامه دستگاه شامل واسرشته‌سازی ابتدایی در دمای ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، پس از آن ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۴۲/۵°C برای پرایمرهای لیمونن سینتاز و دمای ۵۴/۸°C برای پرایمرهای توبولین سینتاز هر کدام به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام

شد. فرآورده‌های PCR به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۷٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مشخص شده و به‌وسیله دستگاه ترنس ایلومیناتور (UVP Bioimaging Transilluminator (system تصویربرداری گردید.

خالص‌سازی و تعیین توالی محصول PCR

جهت خالص‌سازی محصولات PCR، از کیت استخراج DNA، محصول شرکت Fermentas با شماره کاتالوگ K0513 استفاده شد. به این منظور ۲۵۰ میکرولیتر از محصولات PCR با ۰/۱ حجم بافر بارگذاری ×٦ مخلوط و همراه با ۲ میکرولیتر خط‌کش وزن مولکولی ۱kb در ژل آگارز ۱٪ (w/v) بارگذاری و سپس به مدت یک ساعت با ولتاژ ۸۵ ولت الکتروفورز گردید. برای رنگ‌آمیزی DNA، ژل آگارز به مدت ۱۰ دقیقه در یک محلول اتیدیوم بروماید با غلظت نهایی ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار داده شد. در نهایت محصولات PCR به‌وسیله دستگاه ترانس ایلومیناتور آشکارسازی و باند مربوط به قطعه مورد نظر، به سرعت توسط تیغ جراحی تیز از ژل بریده شد. سپس DNA به‌وسیله کیت نام برده شده و مطابق با روش تشریح شده به‌وسیله شرکت سازنده، از ژل استخراج و خالص‌سازی گردید. پس از خالص‌سازی DNA مورد نظر، ۱ میکرولیتر از محصول آن با استفاده از الکتروفورز در یک ژل آگارز ۱/۲٪ (w/v) مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR پس از تخمین غلظت، جهت تعیین توالی به شرکت Geneservice انگلستان ارسال شد.

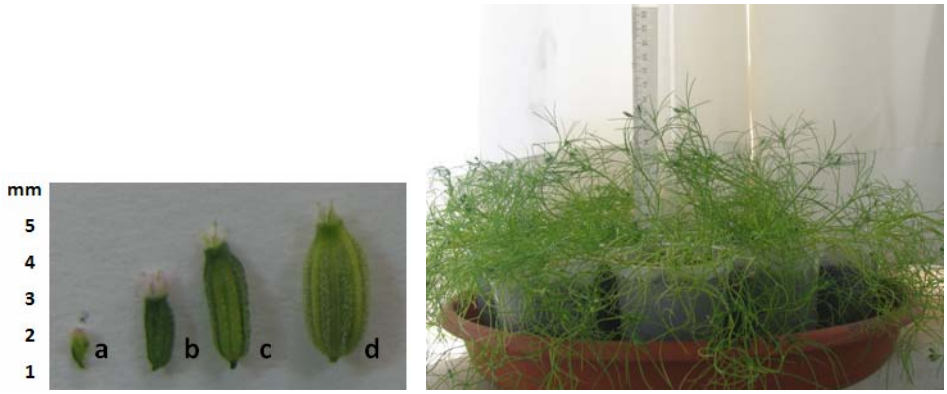
آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری

جهت مطالعه و بررسی موقعیت کانال‌های روغن‌های فرّار در این گیاه پس از تثبیت گل‌ها در فیکساتور الکل- گلیسرین (به نسبت ۱ به ۳ حجمی) به مدت حداقل یک هفته، از آنها برش‌گیری دستی (عرضی) انجام شد. پس از شستشو، به منظور شفافیت، نمونه‌ها به مدت ۵-۳ دقیقه در آب ژاول ۱٪ قرار داده شدند. برای رنگ‌آمیزی نمونه‌ها ۱۰ دقیقه در کارمن زاجی و ۳۰ ثانیه در سبز متیل قرار گرفتند. پس از هر بار نمونه‌ها با آب مقطر شستشو شده و نهایتاً با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.

نتایج

با توجه به عدم تشکیل باند مربوط به قطعه مورد نظر از ژن لیمونن سینتاز (۴۹۰bp) در ریشه، برگ و گل‌های متوسط (۵mm-۴) و بزرگ (۵mm<) مشخص شد که ژن لیمونن سینتاز در این اندام‌ها بیان نمی‌گردد. ظهور باند ۴۹۰bp در ساقه و گل‌های بسیار کوچک (۲mm>) و کوچک (۴mm-۳) نشانگر بیان این ژن در آنها بود (شکل ۳). حداکثر بیان ژن لیمونن سینتاز در ساقه مشاهده شده و پس از آن گل‌های بسیار کوچک و کوچک بیشترین مقدار بیان را نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی زمان آغاز بیان ژن لیمونن سینتاز در طی مراحل رشد و نموی گیاه زیره سبز در این تحقیق که با استفاده از گیاهان کامل در مراحل مختلف دو برگی مرحله یک و دو، سه، چهار، پنج و چند برگی و نیز پیش گلدهی و آغاز گلدهی انجام شد نشان داد که این ژن در تمام مراحل فوق بیان می‌شود که شدت بیان آن با ورود گیاه به مرحله گلدهی افزایش می‌یابد (شکل ٤). نتایج تعیین توالی قطعه ۲۷۹ نوکلئوتیدی در گل و قطعه ۳۸۱ نوکلئوتیدی در ساقه (از بخش ۴۹۰ نوکلئوتیدی مورد نظر) در پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص کرد که ژن لیمونن سینتاز گل در گیاه زیره سبز بین ٦٤-٦٠٪ و در ساقه بین ٦٣-٥٨٪ می‌باشد که با برخی

از سایر گیاهـان دارای آن تشـابه دارد (جـدول ۲). نتیجـه مقایسه توالی جزئی ژن لیمونن سینتاز گل در زیره سـبز و لیمو *Citrus limon* نشان‌دهنده ٦٤٪ تشابه در تـوالی آنهـا می‌باشد (شـکل ۵). همچنـین نتـایج حاصـل از مطالعـات آناتومیکی در این پژوهش مشخص کـرد کـه روغـن‌هـای فرار دارای مونوترپن‌هایی مانند لیمونن، در کانال‌هـایی در دیواره میوه (گل) زیره سبز وجود دارند (شکل ٦).



شکل ۱- راست: زیره سبز در مرحله گلدهی، چپ: اندازه گل‌ها به میلی‌متر در چهار مرحله نموی

(a: <۲mm، b: ۳-٤mm، c: ٤-۵mm، d: >۵mm)

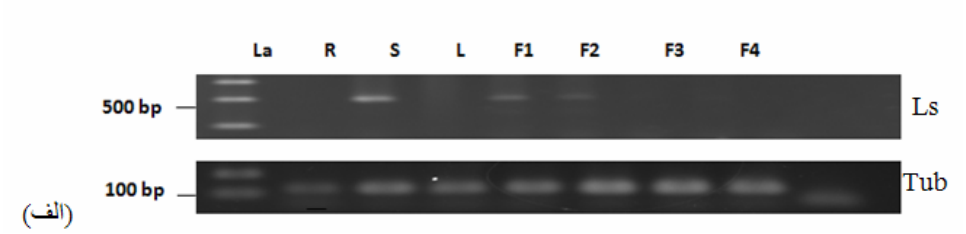
شکل ۲- اندازه گیاه زیره سبز در مراحل مختلف نموی

(به‌ترتیب a: دو برگی مرحله یک، b: دو برگی مرحله دو، c: سه برگی، d: چهار برگی، e: پنج برگی، f: چند برگی، g: پیش‌گلدهی،h: آغاز گلدهی و i: گلدهی)

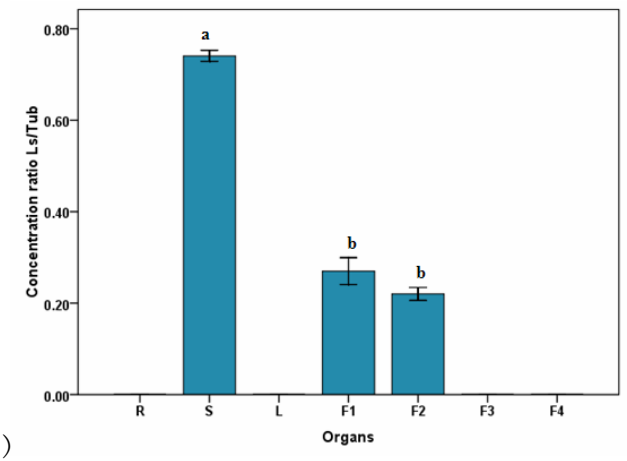
جدول ۱- ترادف پرایمرهای مورد استفاده

(Ls: لیمونن سینتاز، TUB: توبولین سینتاز، F: پرایمر forward، R: پرایمر reverse)

نام ژن	پرایمرها (5→ 3′)	طول قطعه تکثیر شده (bp)
LS	F GATGATATTTACGATGTCTATGGTAC R GAATTGATTTCGGCACATCGCCTC	٤۹۰
TUB	F GAGCCAGATCTTCACGAGCTT R CTTCTCGCGCATTGACCATA	۱۱۹



(الف)



(ب)

شکل ۳- بررسی بیان ژن لیمونن سینتاز در اندام‌های مختلف زیره سبز

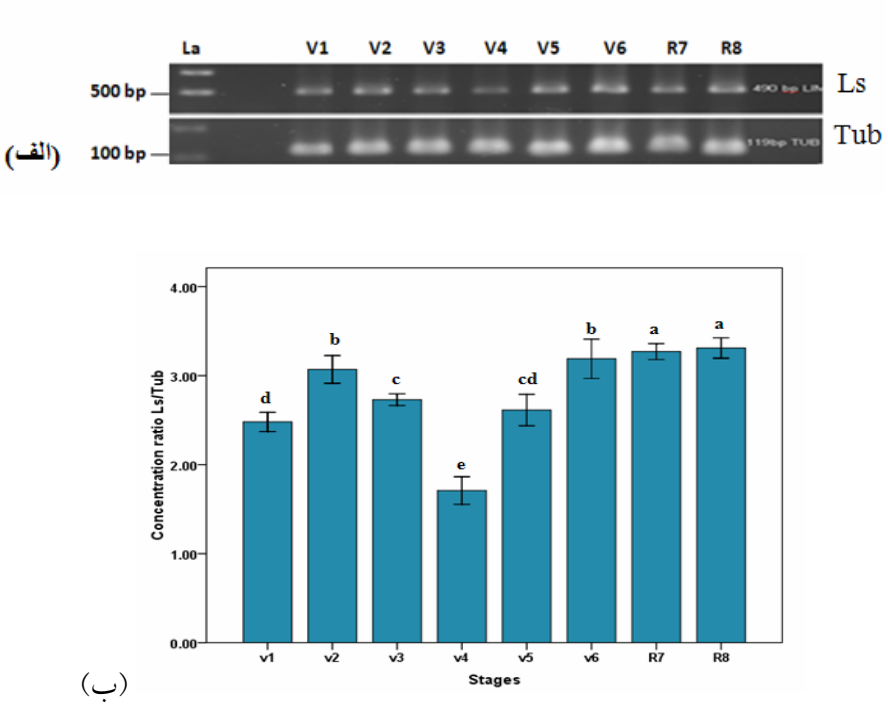
الف) تصویر الکتروفورزی محصول PCR ژن لیمونن سینتاز Ls و توبولین Tub (ژن کنترل) در اندام‌های مختلف زیره سبز

ب) اندازه‌گیری مقدار نسبی بیان ژن Ls در اندام‌های مختلف

R: ریشه، S: ساقه، L: برگ، F1: گل‌های ۲mm>، F2: گل‌های ۴mm-۳، F3: گل‌های ۵mm-۴، F4: گل‌های ۵mm<

معیار خطای نمونه‌برداری‌ها بر روی هر ستون رسم شده‌است.

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱٪ انجام شده و حروف غیرمشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد.



شکل ٤- بررسی بیان ژن لیمونن سینتاز در طی مراحل رشد و نموی زیره سبز

الف)- تصویر الکتروفورزی محصول PCR ژن لیمونن سینتاز Ls و توبولین Tub (ژن کنترل) در مراحل مختلف رشد و نموی

ب)- اندازه‌گیری مقدار نسبی بیان ژن Ls در مراحل رشدی مختلف

La V1: ladder: دو برگی مرحله ۱، V2: دو برگی مرحله ۲، V3: سه برگی، V4: چهار برگی، V5: پنج برگی، V6: چند برگی، R7: پیش گلدهی، R8: آغاز گلدهی.

معیار خطای نمونه‌برداری‌ها بر روی هر ستون رسم شده‌است.

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱٪ انجام شده و حروف غیرمشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۲- درصد تشابه ترادف ژن لیمونن سینتاز از گل و ساقه زیره سبز با برخی گیاهان، Ls: لیمونن سینتاز

Max identity		Accession	Description
shoot	flower		
٪٦٣	٪٦٣	AB266584.1	*Citrus jambhiri Ls.*
٪٦٣	٪٦٣	AF514287.1	*Citrus limon Ls.*
٪٦٣	٪٦٣	AB110637	*Citrus unshiu Ls.*
٪٥٨	٪٦٠	XM002512822.1	*Ricinus communis Ls.*
٪٦٣	٪٦٤	AF514289.1	*Citrus limon Ls.*

```
Cuminum         ----TTAACAATTTCGCCAGCGAGATTGCTTTCGACGTCCTCAGCGAGCAGAATGTCAAT 56
Citrus          GCGCTTTACAACTTTGTTAATGAATTTGCTTATTACGTTCTCAAACAACAGGATTTTGAT 1260
                    ** **** ** *  *  **  ******   **** ****   * *** ** *  **

Cuminum         GTTTTCCCGCAACTAAGAAATGCATGGATTGAATTGTCGAAACGCTACATGGTGGAGGCT 116
Citrus          ATGCTTCTGAGCATAAAAAATGCATGGCTTGGCTTAATACAAGCCTACTTGGTGGAGGCG 1320
                 *  * * *    *** ********** ***  **     **  **** **********

Cuminum         CGGTGGTATTACAGTGGATATAAACCTACATTTCAGGAGTACTTGAGCAATGGACTGGTG 176
Citrus          AAATGGTACCATAGCAAGTACACACCGAAACTGGAAGAATACTTGGAAAATGGATTGGTG 1380
                   *****  * **    ** * *** * * *  * ** ******   ****** *****

Cuminum         AGTATAACGGGGCCTTCGATAGTACTTCATTCTTATATCTTCTCATCAAATCCAATCAAG 236
Citrus          TCTATAACGGGCCCTTTAATTATAGCGATTTCATATCTTTCTGGTACAAATCCAATCATT 1440
                  ********* ****  **  **     *** *** * *      ************

Cuminum         AAAGAAGCAATGGAATTCTTAGAGGAAAATCGGGATATCGTAC----------------- 279
Citrus          AAGAAGGAACTGGAATTTCTAGAAAGTAATCCAGATATAGTTCACTGGTCATCCAAGATT 1500
                **  * * * *******  ****    ****  ***** ** *
```

شکل ۵- بخشی از توالی هم‌ردیف شده ژن لیمونن سینتاز گل از گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum*) و لیمو (*Citrus limon*) با شماره ثبت AF514289.1 در NCBI

شکل ٦- راست: برش عرضی از گل‌های جوان زیره سبز، فلش‌های سیاه رنگ محل کانال‌های روغن فرّار را نشان می‌دهند؛ چپ: یک کانال

✧ محل دستجات آوندی، ⇦ کرک های سطحی، ⇨ برآمدگی های سطح میوه.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق وجود ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز را برای اولین بار ثابت کرد. بیان این ژن در اندام‌های جوان ساقه و گل در مطابقت با نتایج محققان قبلی است که مشخص نموده‌اند مقدار مونوترپن (لیمونن) در مراحل ابتدایی نمو اندام‌هایی مانند برگ و میوه جوان افزایش یافته و به تدریج با نمو آنها کاهش می‌یابد. برای مثال، بیوسنتز مونوترپن‌ها در برگ‌های گیاه *Salvia officinalis* و *Majorana hortensis*، میوه‌های *Carum carvi* و شاخ و برگ *Pinus pinaster* محدود به دوره کوتاه در مرحله نموی اندام است (Gershenzon *et al.*, 2000) و تولید مونوترپن در کرک‌های غده‌ای گیاه Peppermint به برگ‌هایی با سن ۲۰-۱۲ روز محدود می‌شود (McConkey *et al.*, 2000). در گیاهان مختلف

این ژن در اندام‌های جوان ذخیره‌ساز آن و متابولیت‌های ثانویه مشتق از آن مانند برگ و میوه بیان گردیده و با نمو تدریجی اندام از میزان لیمونن که پیش‌ماده بسیاری از ترکیب‌های مشتق است کاسته می‌گردد (Bouwmeester *et al.*, 1998؛ Lucker *et al.*, 2004؛ Munoz-Bertomeu *et al.*, 2008) که با نتایج حاصل از این تحقیق در مورد گل‌ها مطابقت دارد. در همین رابطه نتایج سایر تحقیقات با استفاده از روش عصاره‌گیری و تجزیه به‌وسیله GC در مراحل مختلف نموی زیره سیاه مشخص کرد که مقدار لیمونن در میوه‌های جوان زیاد بوده و به تدریج در طی نمو میوه از مقدار آن کاسته شده و ذخیره‌سازی آن به مراحل ابتدایی نمو میوه محدود و در مراحل نهایی تولید آن متوقف می‌گردد (Bouwmeester *et al.*, 1998). همچنین نتایج استفاده از روش RNA-blot مشخص نمود که افزایش بیوسنتز مونوترپن‌ها در گیاه Peppermint در مرحله بیان ژن تنظیم می‌شود و پس از رونوشت‌برداری، فرایند ترجمه به سرعت در ابتدای مسیر بیوسنتزی، در طول یک دوره نسبتاً کوتاه از نمو برگ انجام شده و پس از آن آنزیم‌ها تغییر کرده و تولید مونوترپن‌ها متوقف می‌شود. نتایج برخی تحقیقات دیگر نیز ثابت کرده‌است که بیوسنتز مونو، دی و سسکویی‌ترپن‌ها در سطح رونوشت‌برداری تنظیم می‌شوند (McConkey *et al.*, 2000). زیاد بودن پیش‌ماده سنتز مونوترپن‌ها (GPP) در بافت‌های جوان می‌تواند سبب تولید سریع مونوترپن‌ها در این بافت‌ها جهت دفع علف‌خوارها و یا جذب شکارگرهای آنها شده و در نتیجه سبب محافظت آنها گردد. همچنین زیاد بودن این پیش‌ماده در گل‌ها عامل محدودکننده‌ای جهت تولید ترپن‌ها نمی‌باشد. نتایج تحقیقات در رابطه با گیاه توتون تراریخت شده با ژن لیمونن سینتاز مشخص کرد که در طول نمو گل از مقدار لیمونن منتشر شده از آن به محیط اطراف کاسته می‌شود (Lucker *et al.*, 2004). تمام قسمت‌های گل در گیاه *Rosa damascene* دارای روغن‌های فرّار بوده که معمولاً وقتی گلبرگ‌ها فنجانی شکل و پرچم‌ها زرد رنگ می‌شوند به حداکثر مقدار خود می‌رسد. از آن‌جایی که ترپن‌ها اجزاء اصلی روغن‌های فرّار گیاهان را تشکیل می‌دهند (Sangwan *et al.*, 2001)، مقدار روغن‌های فرّار می‌تواند به‌عنوان شاخصی از میزان ترپن‌های گیاه در نظر گرفته شود.

میزان بالای بیان ژن لیمونن سینتاز در ساقه این گیاه در تأیید برخی نتایج تحقیقات پیشین، در مورد برخی گیاهان دیگر است. فتوپریود و درجه حرارت تأثیر قابل توجهی بر مقدار روغن فرّار و ترکیب‌های آن در گیاه *Micromeria fruticosa* L. نداشته و مهمترین عامل مؤثر بر آنها مرحله نموی است که می‌تواند بر درصد برخی از ترکیب‌های موجود در روغن در طی بلوغ برگ این گیاه تأثیر بگذارد (Dudai *et al.*, 2001) به‌طوری‌که مقدار لیمونن و پولگون (pulegone) در طی نمو کاهش و ترکیب‌هایی مانند ایزوپولگون (isopulegon) و نئوایزومنتون (neoisomenthone) افزایش می‌یابد. در این گیاه در انتهای ساقه مقدار لیمونن زیاد بوده با نمو گیاه میزان آن کاهش یافته و در اندام‌های مسن به صفر می‌رسد، در حالیکه سطوح الکل‌های مونوترپنی مانند پولگول (pulegol) ایزومنتول (isomenthol) و ایزوپولگول (isopulegol) در انتهای ساقه و برگ‌های جوان وجود نداشته ولی به تدریج در برگ‌های مسن افزایش می‌یابد. احتمالاً الکل‌های مونوترپنی از پیش‌ساز لیمونن و حدواسط‌های ستونی مونوترپنی مشتق می‌شوند. ساقه‌های جوان نیز مانند برگ‌ها مقادیر زیادی لیمونن و پولگون داشته که در بخش‌های پایین‌تر گیاه از

مقدار آن کاسته می‌شود. تغییرات فصلی در ترکیب‌های شیمیایی روغن فرّار گیاه *Micromeria fruticosa* L. به شکل عمده به بلوغ برگ بستگی داشته و مستقیماً به شرایط محیطی ارتباط ندارد که احتمالاً این نوع تغییرات به نقش اکولوژیکی ترکیب‌های ذخیره شده در روغن‌های فرّار ذخیره شده در این گیاه در دوران مختلف رشد و نموی بستگی دارد (Dudai *et al.*, 2001).

بررسی زمان آغاز بیان ژن لیمونن سینتاز در طی مراحل نموی گیاه زیره سبز مشخص کرد از آنجا که فقط ساقه و گل‌ها این ژن را بیان می‌کنند، تا قبل از مرحله زایشی این ژن در ساقه بیان شده و حداکثر بیان در طی نمو گیاه در مرحله گلدهی می‌باشد. با توجه به این که دوره رویشی در گیاه کوتاه بوده (حدود چهار هفته)، سنتز مونوترپن (لیمونن) می‌تواند نشانه‌ای از عملکرد بالای سلول‌ها باشد. با توجه به فعالیت بالای سلول‌ها در این دوره، بیان بالای آن قابل توجیه است. نتایج برخی از محققان مشخص نموده که تعدادی از مونوترپن سینتازها می‌توانند چند محصول تولید کنند، برای مثال، لیمونن سینتاز گیاه نعنا ترنسفورم می‌تواند پیش‌ماده GPP را به لیمونن، پینن و میرسن تبدیل کند (Munoz-Bertomeu *et al.*, 2008). از آنجا که این مواد خاصیت دفاعی گیاه را افزایش می‌دهند، احتمالاً تولید آنها گیاهان را در طی مراحل رشد و نموی از عوامل بیماری‌زا و علف‌خواری محافظت می‌نماید (Ibrahim *et al.*, 2001) که می‌تواند یکی از دلایل بیان دائم ژن لیمونن سینتاز در طول دوره زندگی گیاه باشد. همچنین در تأیید نتایج حاصل از بیان ژن در طی اونتوژنی گیاه، نتایج محققان مشخص نموده که یکی از مهمترین ویژگی‌های ذخیره‌سازی روغن‌های فرّار و ترپن‌های موجود در آن مانند لیمونن، وابسته به مرحله نموی گیاه و در نتیجه اندام، بافت و سلول‌های آن می‌باشد. تقریباً در همه موارد تولید این مواد در اوایل دوره رشدی گیاه بوده‌است (Sangwan *et al.*, 2001). همچنین در گیاه نعنا ژاپنی (*Mentha arvensis*) بالاترین مقدار روغن فرّار و منتول در مرحله ایجاد جوانه‌های گل در گیاه گزارش شده‌است (Duriyaprapan *et al.*, 1986). در طی اونتوژنی گیاه شمعدانی (*Plargonium* spp.) معمولاً مقدار روغن فرّار با آغاز گلدهی افزایش یافته و در مرحله شکوفایی به حداکثر رسیده، سپس به سرعت کاهش یافته‌است (Francis, 1971). ارتباط قوی بین تولید روغن‌های فرّار با مرحله نموی گیاه و بافت، ارتباط آن با فعالیت‌های بیوشیمیای اولیه خاصی را نشان می‌دهد (Sangwan *et al.*, 2001). همچنین نتایج برخی از سایر تحقیقات، ارتباط مستقیمی را بین بیان ژن لیمونن سینتاز و مقدار لیمونن تولید شده نشان نداده‌است که می‌توان استنباط کرد که سنتز لیمونن هم در مرحله رونوشت‌برداری و هم پس از آن (ترجمه و بعد از ترجمه) قابل تنظیم است (Gershenzon *et al.*, 2000؛ McConkey *et al.*, 2000؛ Munoz-Bertomeu *et al.*, 2008). بنابراین بیان بالای این ژن دلیل قطعی برای زیاد بودن لیمونن در ساقه نبوده و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. همچنین در بافت‌های جوان گل و گیاهچه‌ها از آنجا که محدودیت کمتری جهت تأمین پیش‌ماده GPP وجود دارد بیان ژن مونوترپن سینتاز (لیمونن سینتاز) زیاد است. از سوی دیگر بیان هم زمان برخی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تنظیمی مسیر MEP مانند DXS با ژن‌های سنتزی مونوترپن‌ها می‌تواند تولید مقادیر بیشتری از مونوترپن‌های خاص گیاه (لیمونن) در مراحل فوق را سبب شود (Munoz-Bertomeu *et al.*, 2008) که در این

مورد تحقیقات بیشتری مورد نیاز است. مقایسه نتایج حاصل از درصد تشابه جزئی توالی نوکلئوتیدی ژن لیمونن سینتاز زیره سبز در این بررسی با برخی دیگر از سایر گیاهان مشخص‌کننده مشابهت بالای ساختار این ژن در بین خانواده‌های مختلف گیاهی می‌باشد. احتمالاً این ژن در طی تکامل گونه‌ها دارای مناطق حفاظت‌شده زیادی بوده (Buchanan *et al.*, 2000) و ترپن سینتازها منبع تکامل مشترکی دارند (Bohlmann *et al.*, 1998).

نتایج حاصل از مطالعات آناتومیکی در این پژوهش مطابق با نتایج تحقیقات قبلی در این زمینه می‌باشد (Parthasarathy *et al.*, 2008). نتایج سایر محققان مشخص کرده‌است که روغن‌های فرّار در یک سری از ساختارهای خاص مزوفیلی یا اپیدرمی که ویژه گروه‌های تاکسونومیکی متفاوت هستند سنتز و سپس ذخیره شده و یا در محیط منتشر می‌شوند. این ساختارها در گونه‌های مختلف می‌توانند در برگ، ریشه، ساقه، گل و یا میوه‌های گیاه وجود داشته باشند. این ساختارها ممکن است به شکل سلول‌های حاوی روغن، غده‌های ترشحی، کرک‌های غده‌ای و یا انواع دیگر دیده شوند (Fahn, 1988). همچنین مونوترپن‌هایی مانند لیمونن به مقدار زیادی در روغن‌ها و رزین‌ها وجود دارند و ذخیره‌سازی آنها اغلب با ساختارهای ترشحی پیچیده مانند کرک‌های غده‌ای، حفرات ترشحی یا مجاری رزینی ارتباط دارد. سنتز زیاد مونوترپن‌ها با فعالیت بالای سلول‌های این ساختارها که محل بیوسنتز و ذخیره آنها هستند ارتباط دارد و عمدتاً در بافت‌های جوان مولد، بیشترین فعالیت را دارند (Gershenzon *et al.*, 2000).

در مجموع نتایج این تحقیق مشخص نمود که در گیاه زیره سبز بیان ژن لیمونن سینتاز در طی نمو از گل‌های بسیار کوچک (۲mm-۱) تا بزرگ (۵mm<) کاهش می‌یابد که با توجه به پیش‌ساز بودن لیمونن برای بسیاری از ترکیب‌ها قابل توجیه می‌باشد. کاهش مقدار لیمونن در بافت‌های بالغ به علت تبدیل آن به مواد مشتق است. از سوی دیگر برخی ویژگی‌های شیمیایی لیمونن در مقابل عوامل بیماری‌زا و علف‌خواری می‌تواند یکی از دلایل بیان قابل‌ملاحظه آن در ساقه و نیز در طول زندگی گیاه باشد، اگر چه بیان آن در ساقه احتمالاً تولید و انتقال بیشتری از این پیش‌ماده به گل‌ها جهت مراحل بعدی بیوسنتزی و ذخیره‌ای در طول مرحله زایشی گیاه را سبب می‌شود. درصد قابل ملاحظه شباهت بین ژن لیمونن سینتاز در زیره سبز و سایر گیاهان می‌تواند دلیلی بر محافظت این ژن در طی تکامل باشد. در رابطه با علت بیان ژن لیمونن سینتاز در ساقه گیاه زیره سبز، بررسی‌های بیشتری لازم است. همچنین بررسی ژن‌هایی که در تولید پیش‌ماده GPP مانند DXS شرکت دارند و نیز در فرایندهای فتوسنتزی و فیزیولوژیکی مرتبط با تولید مونوترپن‌ها مشارکت دارند، ضروری به نظر می‌رسد.

منابع مورد استفاده

- Asres, K., Seyoum, A., Veeresham, C., Bucar, F. and Gibbons, S., 2005. Naturally derived anti-HIV agents. Phytotherapy Research, 19(7): 557-581.
- Behera, S., Nagarajan, S. and Mohan Rao, L.J., 2004. Microwave heating and conventional roasting of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) and effect on chemical composition of volatiles. Food Chemistry, 87(1): 25-29.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. and Croteau, R., 1998. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the united states of America, 95(8): 4126-4133.
- Bouwmeester, H.J., Gershenzon, J., Konings, M.C.J.M. and Croteau, R., 1998. Biosynthesis of the Monoterpenes Limonene and Carvone in the Fruit of Caraway. Plant Physiology, 117(3): 901-912.

- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L., 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1367p.
- Canter, P.H., Thomas, H. and Ernst, E., 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. Trends in Biotechnology, 23(4): 180-185.
- Cole, I.B., Saxena, P.K. and Murch S.J., 2007. Medicinal biotechnology in the genus scutellaria. In Vitro Cellular and Devlopmental Biology-Plant, 43(4): 318-327.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. and Orlova, I., 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. Critical Reviews in Plant Sciences, 25(5): 417-440.
- Dudai, N., Larkov, O., Ravid, U., Putievsky, E. and Lewinsohn, E., 2001. Developmental Control of Monoterpene Content and Composition in *Micromeria fruticosa* (L.) Druce. Annals of Botany, 88(3): 349-354.
- Duriyaprapan, S., Britten, E. J. and Basford, K. E., 1986. The effect of temperature on growth, oil yield and oil quality of Japanese mint. Annals of Botany, 58(5): 729-736.
- Fahn, A., 1988. Secretory tissues in vascular plants. New Phytologist, 108: 229-257.
- Francis, M.J.O., 1971: 29-51. In: Goodwin, T.W., (Ed.). Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry. Academic Press, London, 441p.
- Gershenzon, J., McConkey, M.E. and Croteau, R.B., 2000. Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint. Plant Physiology, 122(1): 205-214.
- Gomez-Galera, S., Pelacho, A.M., Gene, A., Capell, T. and Christou, P., 2007. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. Plant Cell Reports, 26(10): 1689-1715.
- Hashemi, P., Yarahmadi, A., Azizi, K. and Sabouri, B., 2008. Study of the Effects of N Fertilization and Plant Density on the Essential Oil Composition and Yield of *Cuminum cyminum* L. Seeds by HS-SME. Chromatographia, 67: 253-257.
- Ibrahim, M.A., Kainulainen, P., Aflatuni, A., Tiilikkala, K. and Holopainen, J.K., 2001. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. Agricultural and Food Science in Finland, 10: 243-259.
- Kan,Y., Kartal, M., Özek, T., Aslan, S. and Baser, K.H.C., 2007. Composition of essential oil of *Cuminum cyminum* L. according to harvesting times. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 4(1): 25-29.
- Leaman, D., 2001. Conservation, Trade, Sustainability and Exploration of Medicinal Plant Species: 1-15. In: Saxena, P.K., (Ed.). Development of Plant-Based Medicines: Conservation, Efficacy and Safety. Kluwer Academic Publishers, 280p.
- Lucker, J., Schwab, W., Hautum, B.V., Blaas, J., Plas, L.H.W., Bouwmeester, H.J. and Verhoeven, H.A., 2004. Increased and Altered Fragrance of Tobacco Plants after Metabolic Engineering Using Three Monoterpene Synthases from Lemon. Plant Physiology, 134(1): 510-519.
- Mahmoud, S.S., Williams, M. and Croteau, R., 2004. Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. Phytochemistry, 65(5): 547-554.
- McConkey, M.E., Gershenzon, J. and Croteau, R.B., 2000. Developmental Regulation of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Peppermint. Plant Physiology, 122(1): 215-224.
- Munoz-Bertomeu, J., Ros, R., Arrillaga, I. and Segura, J., 2008. Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. Metabolic Engineering, 10(3-4): 166-177.
- Parthasarathy, V.A., Chempakam, B. and Zachariah, T.J., 2008. Chemistry of Spices. CABI, 445p.
- Sagdıc, O. and Ozcan, M., 2003. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. Food Control, 14(3): 141-143.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F. and Sangwan, R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation, 34(1): 3-21.
- Schilmiller, A.L., Schauvinhold, I., Larson, M., Xu, R., Charbonneau, A.L., Schmidt, A., Wilkerson, C., Last, R.L. and Pichersky, E., 2009. Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the united states of America, 106(26): 10865-10870.
- Sekine, T., Sugano, M., Majid, A. and Fujii, Y., 2007. Antifungal Effects of Volatile Compounds from Black Zira (*Bunium persicum*) and Other Spices and Herbs. Journal of Chemical Ecology, 33(11): 2123-2132.
- Sowbhagya, H.B., Sathyendra Rao, B.V. and Krishnamurthy, N., 2008. Evaluation of size reduction and expansion on yield and quality of cumin (*Cuminum cyminum*) seed oil. Journal of Food Engineering, 84(4): 595-600.
- Thippeswamy, N.B. and Naidu, K.A., 2005. Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. Eurpean Food Research and Technology, 220(5-6): 472-476.

Different expression of limonene synthase gene in organs and developmental stages of cumin (*Cuminum cyminum* L.)

M. Ghannadnia[1], R. Haddad[2], F. Zarinkamar[3]* and M. Sharifi[1]

1- Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
3*- Corresponding Author, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
E-mail: zarinkamar@modares.ac.ir

Received: August 2010 Revised: October 2010 Accepted: October 2010

Abstract

In this study, limonene synthase (Ls) gene expression was investigated with SQ-RT-PCR method in organs and also during some developmental stages of cumin (*Cuminum cyminum* L.) native to Iran. After culture and sampling of roots, shoots and leaves (one stage of each) and flowers (four stages of developmental phases), results revealed that this gene was expressed in very small (<2mm) and small (3-4mm) flowers in size and shoot vegetative tissue, while it was not expressed in roots, leaves, medium (4-5mm) and larger flowers. Maximum gene expression of limonene synthase was observed in shoot, very small and small flowers, respectively. During developmental stages of the flowers, LS gene expression was highest in the youngest stage, but this was gradually declined and ceased at later developmental stages. Results revealed that this gene was expressed during different growth and developmental phases from two leaves to flowering of intact plants, with an increase during generative phase that confirmed synchronize gene expression on both vegetative and reproductive organs. Partial sequencing of limonene synthase gene revealed that cumin is 58%-64% identical to that of some other plants. Anatomical studies indicated that essential oil ducts were located on the fruit tissue. The overall results of the present research showed high expression of LS gene in young reproductive organs, while the high level of expression in shoot vegetative tissue and during whole period of plant life cycle was a remarkable point.

Key words: SQ-RT-PCR, Cumin (*Cuminum cyminum* L.), limonene synthase gene.