جداسازی ژن مونوترپن‌سنتاز (*Ns*TPS2) و بررسی ترکیبات ترپنوئیدی در گیاه دارویی سیاهدانه (*Nigella sativa* L.)

ریزان الیاسی[۱]، محمد مجدی[۲،*] و عبدالباسط عزیزی[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۲- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۳- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۶)

چکیده

سیاهدانه (*Nigella sativa*) گیاهی دارویی از خانواده Ranunculacea است که به‌دلیل خواص دارویی آن مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. اهمیت پزشکی سیاهدانه عمدتاً به مونوترپن‌های اکسیژن‌دار آن نسبت داده می‌شود که از طریق مسیر متیل‌اریتریتول‌فسفات در پلاستیدها بیوسنتز می‌شوند. در این تحقیق ترکیبات اسانس برگ، گل و مراحل نموی بذر، شامل بذرهای نیمه‌سیاه، سیاه‌نرم و سیاه‌سخت در گیاه سیاهدانه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. درحالی‌که هیچ ترکیب ترپنی در گل‌ها و برگ‌ها مشاهده نشد، مشخص شد که دانه‌ها محل اصلی بیوسنتز و تجمع ترپن‌ها هستند و مقدار ترکیبات ترپنی طی بلوغ بذر تغییر می‌کند. مونوترپن‌ها (بیشتر از ۹۹ درصد) و سزکویی‌ترپن‌ها (کم‌تر از ۱ درصد) اسانس را تشکیل دادند. به‌منظور بهبود درک ما از متابولیسم مونوترپن‌ها، توالی جزئی یک مونوترپن‌سنتاز فرضی (*Ns*TPS2) با استفاده از روش RACE-PCR از گیاه سیاهدانه جدا شد. این مونوترپن‌سنتاز از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA از بذرهای سیاه‌نرم سیاهدانه شناسایی شد. به‌جز وجود موتیف بسیار حفاظت‌شده DDXXD در *Ns*TPS2 که برای تأیید شناسایی مونوترپن‌ها ضروری است، نواحی حفاظت‌شده دیگری از سایر مونوترپن‌سنتازهای شناسایی شده از سایر گونه‌های گیاهی مشاهده نشد. نتایج حاصل از درخت فیلوژنی نشان داد که *Ns*TPS2 بیشترین شباهت را با یک ترپن‌سنتاز (۷۲/۸۹ درصد) از گیاه تاج‌الملوک (*Aconitum carmichaelii*) دارد و در یک گروه قرار گرفتند. سیاهدانه و تاج‌الملوک هر دو به خانواده‌ی آلاله تعلق دارند و این نشان می‌دهد که می‌توان از اطلاعات ژنتیکی گیاهان هم‌خانواده سیاهدانه برای جداسازی مونوترپن‌سنتازهای مختلف استفاده کرد. اطلاعات حاصل از این تحقیق می‌تواند در راستای اهداف دست‌ورزی ژنتیکی و مهندسی متابولیک در سیاهدانه بسیار مفید باشد.

واژگان کلیدی: ترپن‌سنتازها، توالی‌یابی RNA، سیاهدانه، متابولیت‌های ثانویه

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

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

مقدمه

گیاهان دارویی به‌دلیل کاربردهای درمانی از زمان‌های قدیم مورد توجه ویژه بوده‌اند. از آنجا که بیشتر داروهای گیاهی بدون عوارض جانبی یا دارای عوارض جانبی کمی نسبت به داروهای شیمیایی هستند، تمایل به استفاده از محصولات گیاهی در سرتاسر جهان در حال افزایش است (Salem *et al*., 2005). سیاهدانه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد که متعلق به راسته‌ی گل ساعتی‌ها و خانواده‌ی آلاله است. سیاهدانه از لحاظ سطح کروموزومی دیپلوئید ($2n = 2x = 12$) می‌باشد. این گیاه حاوی مواد مؤثره متنوع، مفید و با ارزش درمانی بالایی است. دانه گیاه سیاهدانه منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه به‌خصوص مونوترپن‌ها می‌باشد که کاربردهای صنعتی، تجاری و پزشکی فراوانی برای آن‌ها ذکر شده است (Iqbal *et al*., 2010). سیاهدانه گیاهی یک‌ساله، دولپه، علفی و دارای گل‌های سفید یا آبی کم‌رنگ تا آبی پررنگ است. این گیاه به‌طور گسترده در جنوب اروپا، شمال آفریقا و آسیا و در کشورهایی مانند هند، ایران و کشورهای عربی یافت می‌شود (Tiruppur Venkatachallam *et al*., 2010). از جمله خواص دارویی که در بسیاری از مطالعات از این گیاه ذکر شده است این است که اسانس دانه‌ی سیاهدانه دارای خاصیت ضدقارچی (Özmen *et al*., 2007)، ضدتشنج (Akhondian *et al*., 2011)، کاهش‌دهنده‌ی چربی، قند و فشارخون می‌باشد (Ferdous *et al*., 1992). اسکلت اصلی ترپن‌ها از مولکول‌های پنج‌کربنه ایزوپنتیل‌پیروفسفات (IPP) و ایزومر آن دی‌متیل‌آلیل‌پیروفسفات (DMAPP) تشکیل شده است که هردوی آن‌ها از مسیر سیتوزولی موالونیک‌اسید (MVM) و مسیر پلاستیدی متیل‌اریترول‌فسفات (MEP) سنتز می‌شوند. مسیر MVA با سه واحد استیل‌کوآنزیم A آغاز و منتهی به تولید فارنسیل‌پیروفسفات (FPP) می‌شود. FPP از الحاق دو واحد IPP و یک واحد DMAPP حاصل شده و پیش‌ماده تمامی سزکوئی‌ترپن‌ها و تری‌ترپن‌هاست. مسیر MEP در پلاستیدها واقع شده و با گلیسرآلدهاید-۳- فسفات و پیروات آغاز می‌شود. با الحاق یک مولکول DMAPP و یک مولکول IPP، ژرانیل‌دی‌فسفات (GPP) حاصل می‌شود که پیش‌ماده تمامی مونوترپن‌ها، دی‌ترپن‌ها و تتراترپن‌ها است (Sapir-Mir *et al*., 2008; Sallaud *et al*., 2009). در مراحل بعد، اسکلت کربنی خطی GPP و FPP به‌وسیله آنزیم‌های ترپن‌ستاز به اسکلت اصلی ترپنی تبدیل می‌شوند (Degenhardt *et al*., 2009). با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی گازی و مایع با کارایی بالا می‌توان ترکیباتی که از لحاظ خصوصیات فیزیکی تفاوت‌های بسیار کمی دارند را از هم جدا و تفکیک کرد. در تحقیقی که روی میزان تیموکینون موجود در ۱۰ ژنوتیپ مختلف دانه سیاهدانه از مناطق مختلف ترکیه با استفاده از روش HPLC صورت گرفت، مشخص شد که تیموکینون مهم‌ترین ماده مؤثره موجود در سیاهدانه می‌باشد (Isik *et al*., 2017). همچنین در بررسی اسانس آن با GC-MS، اصلی‌ترین مـاده تیموکینون (۱۱/۸ درصد) و بعد از آن به‌ترتیب پی‌سیمن (۹ درصد)، لونجیفولن (۵/۷ درصد)، لیمونن (٤/۳ درصد)، کارواکرول (۳/۷ درصد) و آلفاتوجن (۲/٤ درصد) تخمین‌زده شد (Gerige *et al*., 2009). در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها، ترپن‌ستازها در نقطه انشعاب قرار می‌گیرند و آنزیم‌های کلیدی برای بیوسنتز ترپنوئیدها هستند (Chen *et al*., 2011). اهمیت ترپن‌ها باعث شده است تا مطالعات زیادی در مورد مسیر بیوسنتز آن‌ها در گیاهان مختلف انجام شود و ژن‌های دخیل در بیوسنتز این ترکیبات طبیعی همسانه‌سازی و تعیین خصوصیت شوند. در تعداد زیادی از گیاهان ژن‌های دخیل در بیوسنتز ترپنوئیدها همسانه‌سازی شده و توالی آن‌ها شناسایی شده است که می‌توان از آن‌ها برای ارزیابی عملکرد آن‌ها استفاده کرد. به‌عنوان مثال ژن‌های ژرماکرن A سنتاز و کاریوفیلن‌ستاز از بابونه گاوی *Tanacetum parthenium* (Majdi *et al*., 2011)، گاماترپینن‌ستاز از پونه کوهی *Origanum vulgare* (Crocoll *et al*., 2010)، لیمونن‌ستاز از اسطوخودوس *Lavandula angustifolia* (Mun˜oz-

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

Bertomeu *et al*., 2008) و گاماترپینن‌سنتاز و لینالول‌سنتاز از گشنیز *Coriandrum sativum* (Galata *et al*., 2014) جداسازی شده‌اند. ژن بتاآمیرین‌سنتاز که یکی از آنزیم‌های مهم در مسیر بیوسنتز تری‌ترپن‌ها می‌باشد از سیاه‌دانه جداسازی و تعیین خصوصیت شده است (Scholz *et al*., 2009). ماده مؤثره‌ی اصلی سیاهدانه تیموکینون می‌باشد که دارای اهمیت بالایی از نظر دارویی است (Goyal *et al*., 2017; Forouzanfar *et al*., 2014). گاماترپینن‌سنتاز یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز تیموکینون می‌باشد که نقش اصلی را در تنظیم تولید این ترکیب دارد و به‌عنوان آنزیم محدودکننده‌ی سرعت واکنش در این مسیر شناخته شده است. در تحقیقی که توسط الیاسی و همکاران صورت گرفت (داده‌ها منتشر نشده‌اند) ژن کدکننده‌ی آنزیم گاماترپینن سنتاز از گیاه سیاهدانه جداسازی و تعیین خصوصیت گردید. در مطالعه قبلی یک توالی جزئی مونوترپن‌سنتاز فرضی (MTS) از *N. sativa* جدا شده است (Elyasi *et al*., 2016). با توجه به این‌که سیاهدانه گیاهی با اثرات دارویی زیادی می‌باشد توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده است و تحقیقات علمی زیادی خصوصاً در مباحث اثرات دارویی آن انجام شده و یا در حال انجام است. در زمینه‌ی تحقیقات مولکولی روی گیاه سیاهدانه مطالعات محدودی انجام شده است. هدف از تحقیق حاضر بررسی غلظت ترکیبات ترپنوئیدی با استفاده از روش GC-MS و جداسازی ژن مونوترپن‌سنتاز از گیاه دارویی سیاهدانه با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA حاصل از بذر سیاه‌نرم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: دانه‌های سیاهدانه (*Nigella sativa*) از شرکت آلمانی Rühlemann's herbs خریداری شدند و در گلخانه‌ی تحقیقاتی دپارتمان داروسازی دانشگاه مارتین لوتر شهر هاله در آلمان جهت رشد و رسیدن به مرحله مناسب جهت استخراج RNA کشت شدند. نمونه‌های برگ، گل، دانه‌های نیمه‌سیاه، سیاه‌نرم و سیاه‌سخت برداشت شدند و به‌سرعت در نیتروژن مایع منجمد شدند و سپس تا تجزیه و تحلیل بیشتر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی ترپن‌ها از برگ، گل و دانه‌های گیاه سیاهدانه: پودر (۸۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم) نمونه سیاهدانه آسیاب شده در نیتروژن مایع برای تجزیه و تحلیل متابولیت استفاده شد. حدود ۸۸۰ میکرولیتر هگزان به هر نمونه اضافه شد و ۲۰ میکرولیتر نونیل‌استات به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. پس از ورتکس کوتاه، نمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق تکان داده شدند و سپس به‌مدت یک دقیقه در ۲۰۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. مایع‌رویی به ویال‌های شیشه‌ای منتقل شد. آنالیز ترپن‌ها با کروماتوگرافی گازی (GC 2010, Shimadzu, Duisburg, Germany) انجام شد.

روش کروماتوگرافی‌گازی–طیف‌سنجی‌جرمی (GC-MS): آنالیز GC-MS بر اساس روش توسعه‌یافته ارائه‌شده با اعمال تغییرات جزئی انجام شد (Irmisch *et al*., 2012). آنالیز اسانس با کروماتوگرافی گازی مجهز به یک انژکتور بدون شکاف (دمای انژکتور، ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد؛ حجم تزریق ۱ میکرولیتر) و همراه با یک آشکارساز انتخابی جرمی چهارقطبی (Shimadzu, Japan) انجام شد. گاز هیدروژن با نرخ جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل به‌کار گرفته شد. نمونه‌ها روی یک ستون Supreme-5 MS (۳۰ متر طول، ۰/۳۲ میلی‌متر قطر داخلی، ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت فیلم، Chromatographie Service GmbH, Germany) آنالیز شدند. طیف‌سنج جرمی با دمای خط انتقال ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد، دمای منبع ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد، دمای چهار قطبی ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، پتانسیل یونیزاسیون ۷۰ eV و محدوده اسکن ۵۰–۳۵۰ amu کار می‌کرد. از یک آشکارساز FID برای تعیین کمیت ترکیبات بر اساس میکروگرم بر گرم وزن تازه استفاده شد که در دمای ۲۵۰

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

درجه سانتی‌گراد کار می‌کرد. شناسایی طیف‌ها به کمک بانک اطلاعات جرمی، مطالعه طیف‌های جرمی هریک از اجزای عصاره و بررسی الگوهای شکست آن‌ها و مقایسه آن‌ها با طیف‌های استاندارد صورت گرفت. درصد کمی هر ترکیب نیز با محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرام‌ها محاسبه شد.

استخراج RNA از بذر سیاه‌نرم و آنالیز داده‌ها: RNA از دانه‌های سیاه‌نرم مطابق شیوه‌نامه سازنده با (RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Ger کیت استخراج شد و سپس با آنزیم DNase I تیمار شد. کیفیت و کمیت RNA استخراجی با بارگذاری روی ژل آگارز یک درصد و تعیین غلظت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر بر اساس جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ مشخص گردید. سپس ۱۵ میکرولیتر RNA (۲۱۲/٤ نانوگرم در میکرولیتر) برای تهیه کتابخانه Illumina NovaSeq 6000 PE150 RNA (Illumina Inc., UK) استفاده شد. آداپتورها و قرائت‌های با کیفیت پائین حذف شدند. سپس از نرم‌افزار FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) برای بررسی خصوصیات کتابخانه و همچنین تأیید کارایی پیرایش داده‌ها استفاده شد. داده‌های با کیفیت بالا برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به این‌که ژنوم گیاه سیاهدانه توالی‌یابی نشده است، برای یکپارچه‌سازی خوانش‌ها از روش سرهم‌بندی نوپدید (*De novo* assembly) استفاده شد. نتایج با سایر توالی‌های مونوترپن‌ستازی موجود در پایگاه داده NCBI بلاست نوکلئوتیدی شدند (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) و نواحی حفاظت‌شده آن‌ها تعیین شد. بر اساس نواحی حفاظت‌شده آغازگر مناسب برای تکثیر توالی‌های مونوترپن‌ستاز طراحی شد.

جداسازی توالی ترپن‌ستاز: برای این منظور 3´-RACE cDNA سنتز شد. تمام واکنش‌های PCR در SMART RACE Advantage (BD Biosciences, CA, USA) با استفاده از کیت 2 Polymerase Mix طبق شیوه‌نامه صورت پذیرفت. آغازگر (5´-CTCTGGAGCTTCCCTTACATTGG-3´) برای تکثیر انتهای ´۵ استفاده شد. نتایج حاصل از واکنش PCR، باند موردنظر را تکثیر نمود که قطعه موردنظر توسط کیت NucleoSpin Gel and PCR Clean up از ژل آگارز خالص‌سازی شد. برای همسانه‌سازی قطعه موردنظر، ابتدا ترانسفورم باکتری *E. coli* NEB10 توسط وکتور نوترکیب pJET حاوی قطعه مورد نظر با کیت CloneJET PCR cloning kit system (Fermentas) انجام گرفت و سپس باکتری‌های ترانسفورم شده توسط کلونی PCRبا آغازگرهای pJET مستقیم (5´-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3´) و معکوس (5´-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3´) مورد ارزیابی قرار گرفتند. کلونی‌های حاوی ناقل نوترکیب توسط کیت "NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) (SigmaAldrich Chemicals) استخراج شدند و توالی‌یابی به‌صورت از دو سر خوانش انجام شد.

آنالیز توالی و رسم درخت فیلوژنتیکی: ناحیه تعیین توالی شده ژن *Ns*TPS2 پس از ترجمه به توالی اسیدآمینه توسط برنامه برخط ExPASy-Translate tool (http://web.expasy.org/translate/) و انتخاب چارچوب صحیح، با دیگر توالی‌های اسیدآمینه‌ای پروتئین مونوترپن‌ستاز گیاهان دیگر با استفاده از برنامه آنلاین Clustalw (http//:www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) هم‌ردیف شدند (شکل ۲). دندروگرام مربوط به ژن توالی‌یابی شده *Ns*TPS2 از گیاه سیاهدانه با سایر مونوترپن‌ستازهای موجود در پایگاه داده‌ها رسم شد. رابطه تکاملی با استفاده از روش Neighbor-Joining در MEGAX با ۱۰۰۰ تکرار برای بوت‌استرپ استنباط شد. اعداد نشان داده شده بر روی دندروگرام مقادیر بوت‌استرپ شاخه‌ها برحسب درصد بودند.

نتایج و بحث

به‌منظور بررسی ترکیب شیمیایی اسانس در بافت‌های مختلف سیاهدانه شامل برگ، گل و دانه آنالیز GC-MS انجام شد. نمونه‌برداری از بافت بذر در چندین مرحله نموی انجام شد که شامل نیمه دانه‌های نیمه‌سیاه، سیاه‌نرم و سیاه‌سخت می‌باشد. بین بافت‌ها از نظر ترکیب ترپنوئیدی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.01$). بر اساس نتایج GC-MS مشخص شد که دانه‌ها محل اصلی بیوسنتز و تجمع مونوترپن‌ها هستند، در

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

حالی‌که هیچ ترکیب مونوترپنی در برگ‌ها و گل‌ها مشاهده نشد. جدول ۱ غلظت ترپن‌ها را در طول بلوغ بذر نشان می‌دهد. به‌ترتیب ۱٤، ۱٤ و ۱۷ ترکیب در دانه‌های نیمه‌سیاه، سیاه‌نرم و سیاه‌سخت شناسایی شد. مونوترپن‌ها (بیش از ۹۹ درصد) و سزکویی‌ترپن‌ها (کمتر از ۱ درصد) از اسانس را تشکیل می‌دهند. دانه‌های نیمه‌سیاه حاوی مونوترپن‌های هیدروکربنی (۹٤/۵۹ درصد)، مونوترپن‌های کتونی (۳/٤٦ درصد)، مونوترپن‌های الکلی (۱/۸۲ درصد) و سزکوئی‌ترپن‌ها (۰/۱۱ درصد) بودند. دانه‌های سیاه‌نرم حاوی مونوترپن‌های هیدروکربنی (۸٤ درصد)، مونوترپن‌های کتونی (۱۳/۵۳ درصد)، مونوترپن‌های الکلی (۲/۳٤ درصد)، مونوترپن‌های استری (۰/۰٦ درصد) و سزکویی‌ترپن‌ها (۰/۰۵ درصد) بودند و دانه‌های سیاه‌سخت حاوی مونوترپن‌های هیدروکربنی (٦۸/۹۲ درصد)، مونوترپن‌های کتونی (۲۸//۱۵ درصد)، مونوترپن‌های الکلی (۱/٤۹ درصد)، مونوترپن‌های استری (۰/۱ درصد) و سزکویی‌ترپن‌ها (۰/۹٤ درصد) بودند. در دانه نیمه‌سیاه اصلی‌ترین ماده γ–ترپینن (٦٤/٥٤ درصد) و بعد از آن به‌ترتیب α–توجن (۱٤/۲۵ درصد)، پی‌سیمن (۵/۰۷ درصد)، α–ترپینن (۳/٦۲ درصد)، β–پینن (۳/٥٤ درصد)، تیموکینون (۳//٤٦ درصد)، α–پینن (۲/۸ درصد)، لیمونن (۱/۷۹ درصد)، کارواکرول (۱/٦۹ درصد)، میرسن (۰/٦۲ درصد)، α–فلاندرن (۰/۳٦ درصد) و ترپینن–4–ال (۰/۱۳ درصد) تخمین زده شد (جدول ۱). مقدار تیموهیدروکینون و تیموکینون در دانه‌های سیاه‌سخت نسبت به دانه‌های نیمه‌سیاه و سیاه‌نرم بیشتر بود. مقدار سزکویی‌ترپن‌ها در دانه‌های سیاه‌سخت (۰/۹٤ درصد) بیشتر از نیمه‌سیاه (۰/۱۱ درصد) و سیاه‌نرم (۰/۰۵ درصد) بود. این با نتایج بوتنیک و همکاران (Botnick *et al*., 2012) مطابقت دارد که نشان دادند که مواد فرار بذر عمدتاً از پی‌سیمن، γ–ترپینن، α–توجن، تیموکینون، تیموهیدروکینون تشکیل شده‌اند. آن‌ها همچنین سطوح پایین‌تری از سزکویی‌ترپن‌ها، عمدتاً لونگیفولن را مشاهده کردند.

بسیاری از گیاهان دارویی ظرفیت تولید اسانس را در انواع بافت‌ها، مراحل مختلف رشدی و شرایط محیطی دارند (Li *et al*., 2020; Nickavar *et al*., 2005; Rahimmalek *et al*., 2009). در پژوهش حاضر، تجمع اسانس در سیاهدانه ارتباط نزدیکی با مراحل نموی رشد دانه‌ها داشت. در تحقیقی که روی وجود ترپن‌های فرار در دانه‌های سیاهدانه صورت گرفت، مشخص شد که تیموکینون، تیموهیدروکینون، دیتیموکینون، پی‌سیمن، α–توجن، γ–ترپینن، کارواکرول، α–پینن، β–پینن، لونگیفولن، کارون، لیمونن و سیترونلول ترکیبات اصلی هستند (Kabir *et al*., 2020; Rchid *et al*., 2004; Wajs *et al*., 2008; Hamrouni-Sellami *et al*., 2008; Ahmad *et al*., 2018; Piras *et al*., 2013; Solati *et al*., 2014). در بررسی متابولیت‌های سیاهدانه مشخص شد که عمده آن‌ها شامل تیموکینون (۳۸/۲۳ درصد)، پی‌سیمن (۲۸/٦۱ درصد)، آلفا توجن (۳/۸ درصد)، کارواکرول (۲/۳۱ درصد) و بتاپینن (۱/۳٦ درصد) می‌باشد (Liu *et al*., 2013).

با توجه به نتایج GC-MS مشخص شد که ترکیبات مونوترپنی عمدتاً در بذر تجمع می‌یابند. برای دستیابی به ترنسکریپتوم سیاهدانه که دارای حداکثر تعداد ژن‌های مرتبط با بیوسنتز مونوترپن‌ها می‌باشد، RNA از بذر سیاه‌نرم استخراج شد و برای توالی‌یابی ارسال شد (شکل ۱– الف). آغازگر طراحی شده بر اساس بلاست نتایج توالی‌یابی RNA کل از بافت بذر سیاه‌نرم با سایر توالی‌های مونوترپن‌سنتازهای موجود در پایگاه داده قطعه‌ای به‌طول ۱۳۵۰ جفت‌باز را تکثیر کرد که در حال ثبت در بانک ژن می‌باشد (شکل ۱– ب). نتیجه حاصل از توالی‌یابی در پایگاه داده NCBI بلاست شد و با توجه به E-value و درصد یکسانی توالی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه مشخص شد که توالی به‌دست آمده متعلق به مونوترپن‌سنتاز است که اسم آن مونوترپن‌سنتاز فرضی (*Ns*TPS2) گذاشته شد.

نتایج حاصل از هم‌ردیفی صحت توالی مربوط به ژن فرضی *Ns*TPS2 به‌دست آمده در گیاه سیاهدانه را تأیید نمود. نتایج نشان داد که توالی پروتئینی مربوط به ژن *Ns*TPS2 با گیاه هم‌خانواده‌اش *Aconitum carmichaelii* که هر دو متعلق به خانواده Ranunculaceae هستند به‌خوبی هم‌ردیف شده‌اند. نتایج نشان داد که *Ns*TPS2 حاوی موتیف حفظ‌شده DDXXD می‌باشد که به‌طور معمول در مونوترپن‌سنتازها دیده می‌شود و برای عملکرد ترپن‌سنتازها بسیار حیاتی است. موتیف DDXXD برای اتصال کوفاکتورهای یون فلزی دوظرفیتی (معمولاً Mg^{+2} یا Mn^{+2}) در طی واکنش مهم است (Williams *et al*., 1998; Degenhardt *et al*., 2009).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

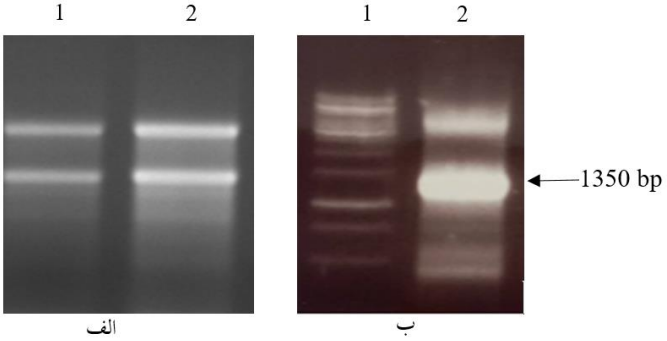
جدول ۱- ترکیب ترپنوئیدها در مراحل نموی دانه‌های سیاهدانه

Table 1. Terpenoids composition in developmental stages of *N. sativa* seeds

ترکیب Compound	دانه نیمه‌سیاه Half black seed		دانه سیاه‌نرم Soft black seed		دانه سیاه‌سخت Hard black seed	
	µg/g F.W.	% (W/W)	µg/g F.W.	% (W/W)	µg/g F.W.	% (W/W)
Monoterpene hydrocarbons						
γ-terpinene	921.56 ± 30.73	62.54 ± 0.05	634.36 ± 49.17	40.33 ± 0.42	29.45 ± 1.71	2.09 ± 0.02
α-Thujen	209.92 ± 5.24	14.25 ± 0.13	251.87 ± 22.26	16 ± 0.25	234.68 ± 15.75	16.67 ± 0.02
p-Cymene	74.71 ± 1.77	5.07 ± 0.05	233.08 ± 18.66	14.81 ± 0.14	503.05 ± 33.13	35.76 ± 0.08
α-Terpinene	53.41 ± 1.50	3.62 ± 0.02	40.67 ± 3.18	2.59 ± 0.02	8.98 ± 0.56	0.64 ± 0.02
β-Pinene	52.13 ± 1.71	3.54 ± 0.0	61.39 ± 5.18	3.90 ± 0.04	62.61 ± 4.12	4.45 ± 0.01
α-Pinene	41.32 ± 0.71	2.80 ± 0.05	50.12 ± 0.39	3.18 ± 0.07	63.32 ± 2.75	4.51 ± 0.11
Limonene	26.43 ± 0.38	1.79 ± 0.04	36.63 ± 3.03	2.33 ± 0.05	65.31 ± 1.55	4.66 ± 0.21
Myrcene	9.20 ± 0.10	0.62 ± 0.01	9.91 ± 1.08	0.63 ± 0.02	0.76 ± 0.12	0.05 ± 0.02
α-Phalendrene	5.32 ± 0.20	0.36 ± 0.0	3.97 ± 0.36	0.25 ± 0.01	0.59 ± 0.05	0.04 ± 0.01
Carene	nd	nd	nd	nd	0.71 ± 0.06	0.05 ± 0.01
Total (کل)	1393.98	94.59	1322	84	969.46	68.92
Monoterpene alcohols						
Carvacrol	24.91 ± 2.80	1.69 ±0.13	34.45 ± 1.34	2.21 ± 0.09	12.74 ± 1.62	0.91 ± 0.05
Terpinen-4-ol	1.95 ± 0.03	0.13 ± 0.0	2.15 ± 0.09	0.14 ± 0.01	6.36 ± 0.51	0.45 ± 0.01
Thymohydroquinone	nd	nd	nd	nd	1.99 ± 1.06	0.14 ± 0.07
Total (کل)	26.86	1.82	36.6	2.34	19.1	1.49
Monoterpene ketones						
Thymoquinone	51.12 ± 5.22	3.46 ± 0.24	212.18 ± 8.54	13.53 ± 0.52	396.74 ± 37.08	28.15 ± 0.7
Total (کل)	51.12	3.46	212.18	13.53	396.74	28.15
Monoterpene ester						
Bornyl acetate	nd	nd	1.01 ± 0.09	0.06 ± 0.01	1.35 ± 0.15	0.11 ± 0.02
Total (کل)	nd	nd	1.01	0.06	1.35	0.1
Sesquiterpenes						
Beta- Longipinene	1.59 ± 0.0	0.11 ± 0.0	0.81 ± 0.17	0.05 ± 0.01	10.96 ± 0.65	0.78 ± 0.01
Alpha- Longipinene	nd	nd	nd	nd	2.18 ± 0.07	0.16 ± 0.01
Total (کل)	1.59	0.11	0.8	0.05	10.96	0.94
Total identified	1473.55	100	1573.21	100	1397.61	100

مواد فرار با هگزان استخراج و با GC-MS شناسایی شدند. nd = شناسایی نشده

The volatiles were extracted with hexane and identified by GC-MS. nd = not detected.



شکل ۱- الف- نتایج استخراج RNA روی ژل آگارز یک درصد؛ چاهک ۱ و ۲: RNA. ب- نتایج PCR ژن *Ns*TPS2 روی ژل آگارز یک درصد.

Figure 1. A: Results of RNA extraction on 1% agarose gel; 1 and 2: RNA. B: PCR results of *Ns*TPS2 gene on 1% agarose gel.

چاهک ۱: نشانگر مولکولی 1 kb (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) ، چاهک ۲: محصول PCR

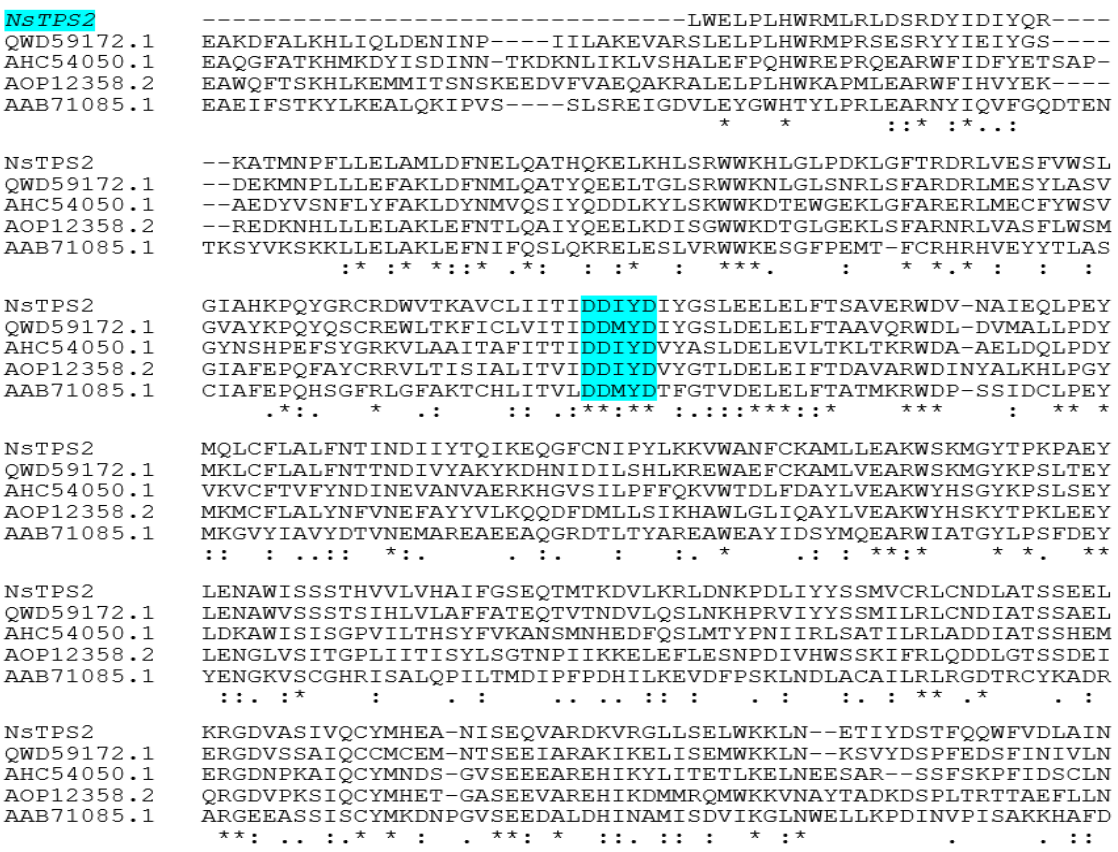
1: Marker (1Kb) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), 2: PCR product of *Ns*TPS2

با توجه به حفظ‌شدگی تعداد کمی از اسیدهای آمینه *Ns*TPS2 نسبت به توالی مونوترپن‌ستازهای گیاهان خانواده‌های دیگر، می‌توان این انتظار را داشت که مونوترپن‌ستازها در گیاهان مختلف تشابه فراوانی به یکدیگر ندارند و میزان شباهت آن‌ها محدود به اسیدآمینه‌های حفظ‌شده می‌باشد که در این مطالعه موتیف DDXXD در بین توالی آمینواسیدی *Ns*TPS2 و سایر مونوترپن‌ستازهای گیاهان دیگر حفظ‌شده بود (شکل ۲). جهت تعیین خصوصیت کردن ژن *GmNES* در گیاه سویا، توالی پروتئینی آن با توالی پروتئینی ژن‌های مونوترپن‌ستازی گیاهان آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، ریحان (*Ocimum*

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

basilicum)، یونجه (*Medicago truncatula*) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) هم‌ردیف شدند و بر اساس وجود موتیف حفظ‌شده DDXXD مشخص شد که ژن *GmNES* یک مونوترپن‌ستاز است (Zhang *et al.*, 2013). با توجه به این نتایج می‌توان گفت که با وجود موتیف حفظ‌شده بین پروتئین‌های مختلف می‌توان به عملکرد احتمالی ژن‌های مونوترپن‌ستازی بر اساس تشابه توالی تا حدودی پی برد.

مقایسه‌ی توالی‌های نوکلئوتیدی *Ns*TPS2 در سیاه‌دانه با همین ناحیه در گیاهان دیگر نشان داد که این ژن بیشترین درجه یکسانی را با یک ترپن‌ستاز (۷۲/۸۹ درصد) از تاج‌الملوک (*Aconitum carmichaelii*) که هم‌خانواده سیاهدانه می‌باشد، دارد. در ادامه بررسی فیلوژنی توالی پروتئینی در میان جنس‌های مورد بررسی نشان داد که این توالی پروتئینی بیشترین شباهت را با پروتئین شبه مونوترپن‌ستاز گیاه تاج‌الملوک دارد. درواقع گیاه سیاهدانه و تاج‌الملوک هر دو به خانواده‌ی آلاله تعلق دارند و دارای مقادیر قابل‌توجهی ترکیبات مونوترپنی هستند. توالی‌های پروتئینی مونوترپن‌ستازهای فرضی دو گیاه سیاهدانه و تاج‌الملوک در یک خوشه قرار گرفته‌اند و با توجه به نتایج به‌دست آمده در واقع گیاهانی که با بوت‌استرپ بالایی در کنار هم قرار گرفته‌اند بیشتر مربوط به یک خانواده گیاهی و یا خانواده‌های نزدیک به هم می‌باشند (شکل ۳). با توجه به این یافته می‌توان چنین نتیجه گرفت که PCR مبتنی‌بر همولوژی ممکن است یک استراتژی مطلوب برای جداسازی ترپن‌ستازهای بیشتر در *N. sativa* براساس همولوژی با سایر گیاهان خانواده Ranunculacea باشد.



شکل ۲- قسمتی از هم‌ردیفی اسیدآمینه‌ای *Ns*TPS2 و مونوترپن‌ستازهای دیگر گونه‌های گیاهی

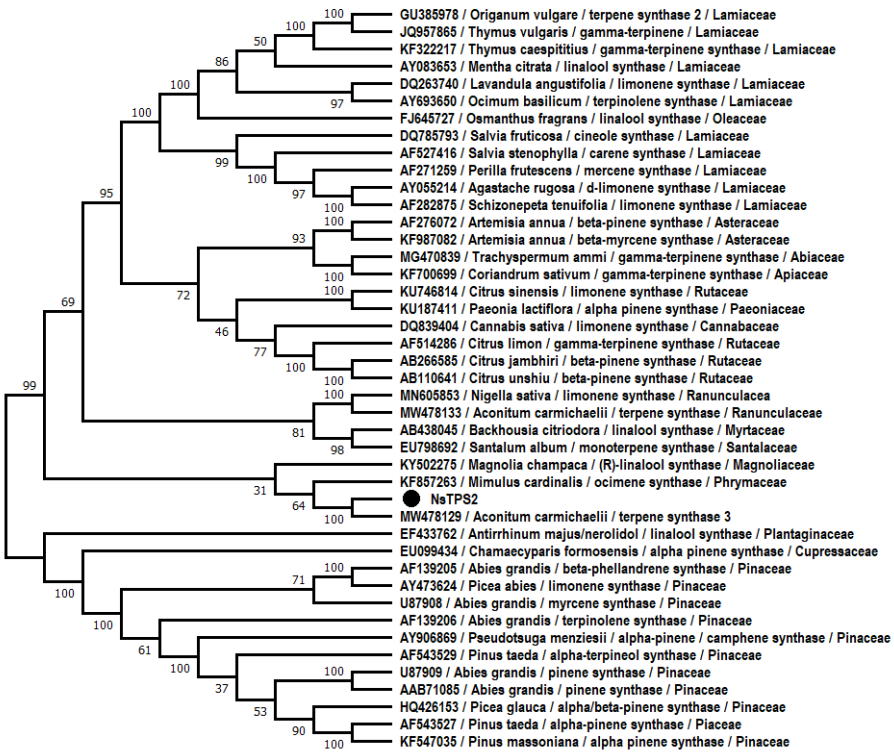
Figure 2. A part of amino acid sequence alignment of *Ns*TPS2 and monoterpene synthases from other plant species

موتیف حفظ‌شده DDXXD به‌صورت هایلایت نشان داده شده است.

The conserved DDXXD motif is highlighted.

QWD59172.1: terpene synthase 3 (*Aconitum carmichaelii*), AHC54050.1: gamma-terpinene synthase (*Coriandrum sativum*), AOP12358.2: limonene synthase (*Citrus sinensis*), AAB71085.1: (*Abies grandis*) pinene synthase.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]



شکل ۳- دندروگرام مربوط به ژن *Ns*TPS2 و مونوترپن‌سنتازهای گونه‌های گیاهی دیگر

Figure 3. Dendrogram of *Ns*TPS2 and selected monoterpene synthases genes from other plant species

با توجه به اهمیت مونوترپن‌ها در داروسازی و کاربردهای متفاوت آن‌ها در صنعت و همچنین با توجه به اهمیت نقش مونوترپن‌ها در گیاه دارویی سیاهدانه و کاتالیز شدن مسیر بیوسنتز آن‌ها توسط مونوترپن‌سنتازها، جداسازی و شناسایی ژن‌های کدکننده‌ی مونوترپن‌سنتازها بسیار حائز اهمیت است. به‌طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر مشخص شد که دانه‌ها محل اصلی بیوسنتز و تجمع مونوترپن‌ها هستند، در حالی‌که هیچ ترکیب مونوترپنی در برگ‌ها و گل‌های سیاهدانه مشاهده نشد. با توجه به نتایج یک مطالعه که توسط مجدی و همکاران (Majdi *et al.*, 2014) صورت گرفته مشخص شده است که میزان بیان ژن‌های ترپنوئیدسنتاز می‌تواند تحت تأثیر مرحله رشدی و ژنوتیپ تغییر کند. به نظر می‌رسد که اگر هدف جداسازی ترپن‌سنتازهای مختلف است، بذر سیاهدانه بافت مناسبی جهت آنالیزهای مولکولی و بررسی مسیر بیوسنتزی است. در تحقیق حاضر، یک توالی مونوترپن‌ستاز فرضی (*Ns*TPS2) از گیاه سیاهدانه جداسازی شد. با توجه به این‌که برای جداسازی قطعه‌ی موردنظر از داده‌های حاصل از RNA-Seq استفاده شد؛ این نتایج نشان می‌دهد که با این نوع استراتژی می‌توان اقدام به تکثیر رونوشت، ژن‌های ناشناخته کرد و ژن‌ها و ایزوفرم‌های مختلف آن را جدا کرد که این مورد از لحاظ مطالعات مربوط به مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه بسیار ارزشمند خواهد بود. در واقع حتی با ناشناخته بودن ژنوم گیاه مورد نظر این امکان وجود دارد که بتوان ژن‌های ناشناخته را جداسازی و شناسایی کرد. توالی‌یابی RNA می‌تواند شناسایی ژن‌های کلیدی مرتبط با ساخت متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تسهیل و تسریع نماید (Soltani *et al.*, 2018). شناسایی توالی ژن‌های مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها می‌تواند زمینه‌ساز پژوهش‌های آینده در جهت مطالعه بیشتر، بیش‌بیان و مهندسی متابولیت این ژن‌ها باشد. با توجه به اهمیت اقتصادی ترکیب‌های ترپنی که خزانه غنی را برای ترکیبات دارویی فراهم می‌سازد، آشکارسازی تغییرات پویای این‌گونه متابولیت‌های ثانویه به‌طور هم‌زمان با تحلیل داده‌های ترنسکریپتومی، خصوصاً در بافت‌های مختلف که مقادیر

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

مختلفی از این ترکیبات وجود دارد، باعث فهم بهتر شبکه‌های تنظیمی بیوسنتز این ترکیبات خواهد شد. اطلاعات حاصل از این تحقیق می‌تواند در راستای جداسازی مونوترپن‌سنتازهای مختلف از سیاهدانه و همچنین در نیل به اهداف مورد نظر در دست‌ورزی ژنتیکی و مهندسی متابولیک ترکیبات مشابه، مفید باشد.

سپاسگزاری

از دپارتمان داروسازی دانشگاه مارتین لوتر شهر هاله در آلمان به‌خاطر کمک‌های مالی و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و پرسنلی برای اجرای این پژوهش نهایت تشکر را داریم.

References

Ahmad, N., Ahmad, R., Al-Layly, A., Al-Shawi, H., Al-Ali, A. and Amir, M. (2018). Ultra-highperformance liquid chromatography-based identification and quantification of thymoquinone in *Nigella sativa* extract from different geographical regions. *Pharmacognosy Magazine*, **14(57):** 471-480.

Akhondian, J., Kianifar, H., Raoofziaee, M., Moayedpour, A., Toosi, M.B. and Khajedaluee, M. (2011). The effect of thymoquinone on intractable pediatric seizures (pilot study). *Epilepsy Research*, **93(1):** 39-43.

Botnick, I., Xue, W., Bar, E., Ibdah, M., Schwartz, A., Joel, D.M., Lev, E., Fait, A. and Lewinsohn, E. (2012). Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. *Molecules*, **17(9):** 10159-10177.

Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J. and Pichersky, E. (2011). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant Journal*, **66:** 212-229.

Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J. and Degenhardt, J. (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, **73:** 587–603.

Degenhardt, J., Köllner, T.G. and Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, **70(15):** 1621-1637.

Elyasi, R., Majdi, M., Bahramnejada, B. and Mirzaghaderi, G. (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.

Ferdous, A.J., Islam, S.N., Ahsan, M., Hasan, C.M. and Ahmed, Z.U. (1992). *In vitro* antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds against multiple drug-resistant isolates of Shigella spp. and isolates of Vibrio cholerae and Escherichia coli. *Phytotherapy Research*, **6(3):** 137-140.

Forouzanfar, F., Bazzaz, B. and Hosseinzadeh, H. (2014). Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **17(12):** 929-938.

Galata, M., Sarker, L.S. and Mahmoud, S.S. (2014). Transcriptome profiling, and cloning and characterization of the main monoterpene synthases of *Coriandrum sativum* L. *Phytochemistry*, **102:** 64-73.

Gerige, S.J., Gerige, M.K.Y. and Rao, M. (2009). GC-MS analysis of *Nigella sativa* seeds and antimicrobial activity of its volatile oil. *Brizilian Archives of Biology and Technology*, **52(5):** 1189-1192.

Goyal, S.N., Prajapati, C.P. and Gore, P.R. (2017). Therapeutic potential and pharmaceutical development of thymoquinone: a multitargeted molecule of natural origin. *Frontiers in Pharmacology*, **8:** 656.

Hamrouni-Sellami, I., Kchouk, M.E. and Marzouk, B. (2008). Lipid and aroma composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds from Tunisia. *Journal of Food Biochemistry*, **32(3):** 335-352.

Iqbal, M.S., Nadeem, S.H., Mehbood, S.H., Chafoor, A., Rajoka, M.I., Qureshi, A.S. and Niaz, B. (2011). Exploration of genotype specific fingerprinting of *Nigella sativa* L. using RAPD markers. *Turkish Journal Agriculture and Forestry*, **35:** 569-578.

Irmisch, S., Krause, S.T., Kunert, G., Gershenzon, J., Degenhardt, J. and Köllner, T.G. (2012). The organ-specific expression of terpene synthase genes contributes to the terpene hydrocarbon composition of chamomile essential oils. *BMC Plant Biology*, **12:** 84.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

Isik, S., Kartal, M. and Erdem, S.A. (2017). Quantitative analysis of thymoquinone in *Nigella sativa* L. (Black cumin) seeds and commercial seed oils and seed oil capsule from Turkey. *Ankara University Eczacılık Fakulties Dergisi*, **41(1):** 34-41.

Kabir, Y., Akasaka-Hashimoto, Y., Kubota, K. and Komai, M. (2020). Volatile compounds of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds cultivated in Bangladesh and India. *Heliyon*, **6:** e053432.

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R. and Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **148:** 80-89.

Liu, X., Park, J.H., Assayed, M.C., Shimoda, M. and Shim, J.H. (2013). Isolation of volatiles from *Nigella sativa* seeds using microwave assisted extraction: effect of whole extracts on canine and murine CYP1A. *Biomedical Chromatography*, **27(7):** 938-945.

Majdi, M., Liu, Q., Karimzadeh, G., Malboobi, M.A., Beekwilder, J., Cankar, K., Vos, R.D., Todorovic, S., Simonovic, A. and Bouwmeester, H. (2011). Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry*, **72(14):** 1739-1750.

Majdi, M., Karimzade, G. and 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).

Mun˜oz-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):** 166-177.

Nickavar, B. and Esbati, N. (2012). Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three Thymus species. *Journal of Acupuncture & Meridian Studies*, **5(3):** 119-125.

Özmen, A., Basbulbul, G. and Aydin, T. (2007). Antimitotic and antibacterial effects of the *Nigella sativa* L. seed. *Caryologia*, **60(3):** 270-272.

Piras, A., Rosa, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Falconieri, D. and Dessì, M.A. (2013). Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, **46:** 317-323.

Rahimmalek, M., Tabatabaei, B.E.S., Etemadi, N., Goli, S.A.H., Arzani, A. and Zeinali, H. (2009). Essential oil variation among and within six Achillea species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. *Industrial Crops and Products*, **29(2):** 348-355.

Rchid, H., Nmila, R., Bessiere, J.M., Sauvaire, Y. and Chokaïri, M. (2004). Volatile components of *Nigella damascene* L. and *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Essential Oil Research*, **16(6):** 585-587.

Salem, M.L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Intternatoina Immunopharmacollogy*, **5(13):** 1749-1770.

Sallaud, C., Rontein, D., Onillon, S., Jabès, F., Duffé, P., Giacalone, C., Thoraval, S., Escoffier, C., Herbette, G. and Leonhardt, N. (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z -farnesyl pyrophosphate in the wild tomato Solanum habrochaites. *The Plant Cell*, **21:** 301-317.

Sapir-Mir, M., Mett, A., Belausov, E., Tal-Meshulam, S., Frydman, A., Gidoni, D. and Eyal, Y. (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.

Scholz, M., Lipinski, M., Leupold, M., Luftmann, H., Harving, L., Ofir, R., Fischer, R., Prufer, D. and Muller, K. (2009). Methyl jasmonate induced accumulation of kalapanaxsaponin I in *Nigella Sativa*. *Phytochemistry*, **70:** 517-522.

Solati, Z., Baharin, B.S. and Bagheri, H. (2014). Antioxidant property, thymoquinone content and chemical characteristics of different extracts from *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **91(2):** 295-300.

Soltani Howyzeh, M., Sadat Noori, S.A., Shariati, V. and Amiripour, M. (2018). Large scale identification of SSR molecular markers in Ajowan (*Trachyspermum ammi*) using RNA sequencing. *Plant Genetic Researches*, **6(1):** 31-46 (In Persian).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

Tiruppur Venkatachallam, S.K., Pattekhan, H., Divakar, S. and Kadimi, U. (2010). Chemical composition of *Nigella sativa* L. seed extracts obtained by supercritical carbon dioxide. *Food Science and Technology International*, **47(6):** 598-605.

Wajs, A., Bonikowski, R. and Kalemba, D. (2008). Composition of essential oil from seeds of *Nigella sativa* L. cultivated in Poland. *Flavour and Fragrance Journal*, **23(2):** 126-132.

Williams, D.C., McGarvey, D.J., Katahira, E.J. and Croteau, R. (1998). Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemical Journal*, **37(35):** 12213-12220.

Zhang, M., Liu1. J., Li, K. and Yu, D. (2013). Identification and characterization of a novel monoterpene synthase from Soybean restricted to neryl diphosphate precursor. *Plose One*, **8(10):** e75972.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]

Plant Genetic Researches, Vol. 8, No. 2

Isolation of Monoterpene Synthase Gene (*Ns*TPS2) and Evaluation of Terpenoid Compounds in Black Cumin Medicinal Plant (*Nigella sativa* L.)

Rizan Elyasi[1], Mohammad Majdi[1,*] and Abdolbaset Azizi[2]

1- Ph.D. Student, Department of Production Engineering and Plant Genetics, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2- Associate Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

(Received: November 7, 2021 – Accepted: February 15, 2022)

Abstract

Black cumin (*Nigella sativa*) is a medicinal plant of the Ranunculacea family which raised attention due to its pharmaceutical properties. Medical significance of *N. sativa* mainly attributed to its oxygenated monoterpenes which are biosynthesized via the methyl erythritol phosphate (MEP) pathway located in plastids. In this study, the essential oil components of leaves, flowers, and developmental stages of seed including half black seeds, soft black seeds, and hard black seeds were analyzed in *N. sativa*. Whereas no terpene was detected in flowers and leaves, seeds were found to be the major site of biosynthesis and accumulation of terpenes, and the amount of terpene compounds changed during seed maturation. The essential oil consists of monoterpenes (more than 99%) and sesquiterpenes (less than 1%). In order to improve our understanding of monoterpene metabolism, the partial sequence of a hypothetical monoterpene synthase (*Ns*TPS2) was isolated from *N. sativa* plant using RACE-PCR technique. This monoterpene synthase was identified from RNA sequencing data from soft black seeds. Except of the highly conserved DDXXD motif in *Ns*TPS2 which is necessary to validate monoterpene synthases, no other conserved regions of other identified monoterpene synthases were observed. Dendrogram analysis revealed that *Ns*TPS2 had the highest homology with a terpene synthase (72.89%) from *Aconitum carmichaelii* and these two sequences were grouped in the same group. *Nigella sativa* and *Aconitum carmichaelii* both belong to the Ranunculacea family. This indicates that the genetic information of plants of the Ranunculacea family can be used to isolate different monoterpene synthase. The results of this research can be useful in genetic manipulation and metabolic engineering of *Nigella sativa.*

Keywords: *Nigella sativa*, RNA sequencing, Secondary metabolites, Terpene synthase

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

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.10.6]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.3]