

جداسازی ژن مونوترپن سنتاز (*NsTPS2*) 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 به دلیل خواص دارویی آن مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. اهمیت پزشکی سیاهدانه عمدتاً به مونوترپن‌های اکسیژن‌دار آن نسبت داده می‌شود که از طریق مسیر متیل‌اریتریترول‌فسفات در پلاستیدها بیوسنتز می‌شوند. در این تحقیق ترکیبات اسانس برگ، گل و مراحل نموی بذر، شامل بذره‌های 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 (*NsTPS2*) با استفاده از روش RACE-PCR از گیاه سیاهدانه جدا شد. این مونوترپن‌سنتاز از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA از بذره‌های سیاه‌نرم سیاهدانه شناسایی شد. به‌جز وجود موتیف بسیار حفاظت‌شده DDXXD در *NsTPS2* 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 *NsTPS2* 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

مقدمه

گیاهان دارویی به دلیل 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 به خصوص 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 کشورهایمانند 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 پلاستییدی 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 پیرووات 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 ترپن‌سنتاز 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 ماده تیموکینون (۱۱/۸ درصد) و بعد از آن به‌ترتیب پی‌سیمن (۹ درصد)، لونجی‌فولن (۵/۷ درصد)، لیمونن (۴/۳ درصد)، کارواکرول (۳/۷ درصد) و آلفاتوجن (۲/۴ درصد) تخمین‌زده شد (Gerige et al., 2009). در مسیر بیوسنتز تربنویدها، ترپن‌سنتازها در نقطه انشعاب قرار می‌گیرند و آنزیم‌های کلیدی برای بیوسنتز تربنویدها 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 تربنویدها 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 کاربوفیلن‌سنتاز از بابونه گاوی (*Tanacetum parthenium*) (Majdi et al., 2011)، گاماترپین‌سنتاز از پونه کوهی (*Origanum vulgare*) (Crocòll et al., 2010)، لیمونن‌سنتاز از اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) (Munõz-

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 به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق تکان داده شدند و سپس به مدت 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 کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (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

(Bertomeu et al., 2008) و گاماترپین‌ستاز و لینالول‌ستاز از گشنیز *Coriandrum sativum* (Galata et al., 2014) جداسازی شده‌اند. ژن بتا‌آمرین‌ستاز 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). گاماترپین‌ستاز 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 گاماترپین‌ستاز از گیاه سیاهدانه جداسازی و تعیین خصوصیت گردید. در مطالعه قبلی یک توالی جزئی مونوترپین‌ستاز 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 مونوترپین‌ستاز 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

PCR، باند موردنظر را تکثیر نمود که قطعه موردنظر توسط کیت NucleoSpin Gel and PCR Clean up از ژل آگارز خالص سازی شد. برای همسانه سازی قطعه موردنظر، ابتدا ترانسفورم باکتری *E. coli* NEB10 توسط وکتور نو ترکیب pJET حاوی قطعه مورد نظر با کیت CloneJET PCR cloning kit system (Fermentas) انجام گرفت و سپس باکتری های ترانسفورم شده توسط کلونی PCR با آغازگرهای pJET مستقیم (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') و معکوس (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') مورد ارزیابی قرار گرفتند. کلونی های حاوی ناقل نو ترکیب توسط کیت "NucleoSpin Plasmid Kit" (Macherey-Nagel, Düren, Germany) (SigmaAldrich Chemicals) استخراج شدند و توالی یابی به صورت از دو سر خوانش انجام شد.

آنالیز توالی و رسم درخت فیلوژنتیکی: ناحیه تعیین توالی شده ژن *NsTPS2* پس از ترجمه به توالی اسید آمینه توسط برنامه برخط ExpASY-Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) و انتخاب چارچوب صحیح، با دیگر توالی های اسید آمینه ای پروتئین مونوترپن سنتاز گیاهان دیگر با استفاده از برنامه آنالین Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) هم ردیف شدند (شکل ۲). دندروگرام مربوط به ژن توالی یابی شده *NsTPS2* از گیاه سیاهدانه با سایر مونوترپن سنتازهای موجود در پایگاه داده ها رسم شد. رابطه تکاملی با استفاده از روش Neighbor-Joining در MEGAX با ۱۰۰۰ تکرار برای بوت استرپ استنباط شد. اعداد نشان داده شده بر روی دندروگرام مقادیر بوت استرپ شاخه ها برحسب درصد بودند.

نتایج و بحث

به منظور بررسی ترکیب شیمیایی اسانس در بافت های مختلف سیاهدانه شامل برگ، گل و دانه آنالیز GC-MS انجام شد. نمونه برداری از بافت بذر در چندین مرحله نمودی انجام شد که شامل نیمه دانه های نیمه سیاه، سیاه نرم و سیاه سخت می باشد. بین بافت ها از نظر ترکیب ترپنوییدی تفاوت معنی داری وجود داشت ($P < 0.01$). بر اساس نتایج GC-MS مشخص شد که دانه ها محل اصلی بیوسنتز و تجمع مونوترپن ها هستند، در

درجه سانتی گراد کار می کرد. شناسایی طیف ها به کمک بانک اطلاعات جرمی، مطالعه طیف های جرمی هریک از اجزای عصاره و بررسی الگوهای شکست آنها و مقایسه آنها با طیف های استاندارد صورت گرفت. درصد کمی هر ترکیب نیز با محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرامها محاسبه شد.

استخراج RNA از بذر سیاه نرم و آنالیز داده ها: RNA از دانه های سیاه نرم مطابق شیوه نامه سازنده با (RNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Germany) 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 (۲۱۲/۴ نانوگرم در میکرولیتر) برای تهیه کتابخانه NovaSeq 6000 PE150 RNA Illumina (Illumina Inc., UK) استفاده شد. آداپتورها و قرائت های با کیفیت پائین حذف شدند. سپس از نرم افزار FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) برای بررسی خصوصیات کتابخانه و همچنین تأیید کارایی پیرایش داده ها استفاده شد. داده های با کیفیت بالا برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به این که ژنوم گیاه سیاهدانه توالی یابی نشده است، برای یکپارچه سازی خوانش ها از روش سرهم بندی نوپدید (*De novo assembly*) استفاده شد. نتایج با سایر توالی های مونوترپن سنتازی موجود در پایگاه داده NCBI بلاست نوکلئوتیدی شدند (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و نواحی حفاظت شده آنها تعیین شد. بر اساس نواحی حفاظت شده آغازگر مناسب برای تکثیر توالی های مونوترپن سنتاز طراحی شد.

جداسازی توالی ترین سنتاز: برای این منظور 3'-RACE cDNA سنتز شد. تمام واکنش های PCR در SMART RACE Advantage (BD Biosciences, CA, USA) با استفاده از کیت Polymerase Mix 2 طبق شیوه نامه صورت پذیرفت. آغازگر (5'-CTCTGGAGCTTCCCTTACATTGG-3') برای تکثیر انتهای 5' استفاده شد. نتایج حاصل از واکنش

مراحل نموی رشد دانه‌ها داشت. در تحقیقی که روی وجود ترین‌های فرار در دانه‌های سیاهدانه صورت گرفت، مشخص شد که تیموکینون، تیموهیدروکینون، دیتیموکینون، پی‌سیمن، α -توجن، γ -ترینین، کارواکرول، α -پینین، β -پینین، 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 (۲۸/۶۱ درصد)، آلفا توجن (۳/۸ درصد)، کارواکرول (۲/۳۱ درصد) و بتاپینین (۱/۳۶ 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 مونوترپن‌ستازهای موجود در پایگاه داده قطعه‌ای به طول 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 مونوترپن‌ستاز است که اسم آن مونوترپن‌ستاز فرضی (*NsTPS2*) گذاشته شد.

نتایج حاصل از هم‌ردیفی صحت توالی مربوط به ژن فرضی *NsTPS2* به‌دست آمده در گیاه سیاهدانه را تأیید نمود. نتایج نشان داد که توالی پروتئینی مربوط به ژن *NsTPS2* با گیاه هم‌خانواده اش *Aconitum carmichaelii* که هر دو متعلق به خانواده Ranunculaceae هستند به‌خوبی هم‌ردیف شده‌اند. نتایج نشان داد که *NsTPS2* حاوی موتیف حفظ‌شده DDXXD می‌باشد که به‌طور معمول در مونوترپن‌ستازها دیده می‌شود و برای عملکرد ترین‌ستازها 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., 2009; Degenhardt et al., 1998).

حالی که هیچ ترکیب مونوترپنی در برگ‌ها و گل‌ها مشاهده نشد. جدول ۱ غلظت ترین‌ها را در طول بلوغ بذر نشان می‌دهد. به‌ترتیب ۱۴، ۱۴ و ۱۷ ترکیب در دانه‌های نیمه‌سیاه، سیاه‌نرم و سیاه‌سخت شناسایی شد. مونوترپن‌ها (بیش از ۹۹ درصد) و سزکویی‌ترین‌ها (کمتر از ۱ درصد) از اسانس را تشکیل می‌دهند. دانه‌های نیمه‌سیاه حاوی مونوترپن‌های هیدروکربنی (۹۴/۵۹ درصد)، مونوترپن‌های کتونی (۳/۴۶ درصد)، مونوترپن‌های الکلی (۱/۸۲ درصد) و سزکویی‌ترین‌ها (۰/۱۱ درصد) بودند. دانه‌های سیاه‌نرم حاوی مونوترپن‌های هیدروکربنی (۸۴ درصد)، مونوترپن‌های کتونی (۱۳/۵۳ درصد)، مونوترپن‌های الکلی (۲/۳۴ درصد)، مونوترپن‌های استری (۰/۰۶ درصد) و سزکویی‌ترین‌ها (۰/۰۵ درصد) بودند و دانه‌های سیاه‌سخت حاوی مونوترپن‌های هیدروکربنی (۶۷/۹۲ درصد)، مونوترپن‌های کتونی (۲۸/۱۵ درصد)، مونوترپن‌های الکلی (۱/۴۹ درصد)، مونوترپن‌های استری (۰/۱ درصد) و سزکویی‌ترین‌ها (۰/۹۴ درصد) بودند. در دانه نیمه‌سیاه اصلی‌ترین ماده γ -ترینین (۶۴/۵۴ درصد) و بعد از آن به‌ترتیب α -توجن (۱۴/۲۵ درصد)، پی‌سیمن (۵/۰۷ درصد)، α -ترینین (۳/۶۲ درصد)، β -پینین (۳/۵۴ درصد)، تیموکینون (۳/۴۶ درصد)، α -پینین (۲/۸ درصد)، لیمونن (۱/۷۹ درصد)، کارواکرول (۱/۶۹ درصد)، میرسن (۰/۶۲ درصد)، α -فلاندرین (۰/۳۶ درصد) و ترینین-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 سزکویی‌ترین‌ها در دانه‌های سیاه‌سخت (۰/۹۴ 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 -ترینین، α -توجن، تیموکینون، تیموهیدروکینون تشکیل شده‌اند. آن‌ها همچنین سطوح پایین‌تری از سزکویی‌ترین‌ها، 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., 2009; Rahimmalek et al., 2005; Nickavar et al., 2020). در پژوهش حاضر، تجمع اسانس در سیاهدانه ارتباط نزدیکی با

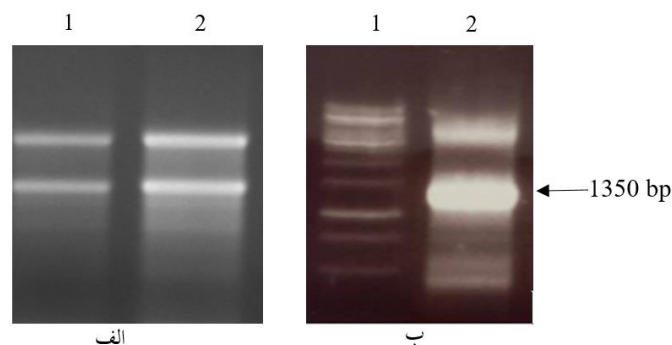
جدول ۱- ترکیب ترپنوئیدها در مراحل نمو دانه‌های سیاهدانه

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
(کل) Total	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
(کل) Total	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
(کل) Total	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
(کل) Total	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
(کل) Total	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 *NsTPS2* روی ژل آگارز یک درصد.

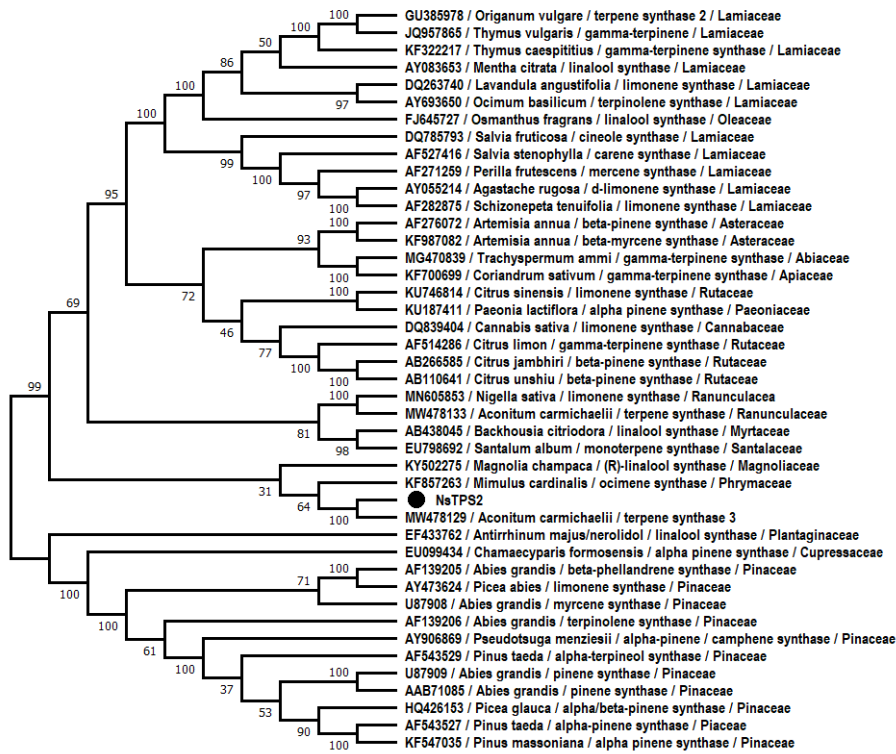
Figure 1. A: Results of RNA extraction on 1% agarose gel; 1 and 2: RNA. B: PCR results of *NsTPS2* gene on 1% agarose gel.

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

1: Marker (1Kb) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), 2: PCR product of *NsTPS2*

موتیف DDXXD در بین توالی آمینواسیدی *NsTPS2* و سایر مونوترپن سنتازهای گیاهان دیگر حفظ شده بود (شکل ۲). جهت تعیین خصوصیت کردن ژن *GmNES* در گیاه سویا، توالی پروتئینی آن با توالی پروتئینی ژن‌های مونوترپن سنتازی گیاهان آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، ریحان (*Ocimum*)

با توجه به حفظ‌شدگی تعداد کمی از اسیدهای آمینه *NsTPS2* نسبت به توالی مونوترپن سنتازهای گیاهان خانواده‌های دیگر، می‌توان این انتظار را داشت که مونوترپن سنتازها در گیاهان مختلف تشابه فراوانی به یکدیگر ندارند و میزان شباهت آن‌ها محدود به اسید آمینه‌های حفظ‌شده می‌باشد که در این مطالعه



شکل ۳- دندروگرام مربوط به ژن NsTPS2 و مونوترپن سنتازهای گونه‌های گیاهی دیگر

Figure 3. Dendrogram of NsTPS2 and selected monoterpene synthases genes from other plant species

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، پیش‌بینی 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 این گونه متابولیت‌های ثانویه به‌طور هم‌زمان با تحلیل داده‌های ترنسکریپتومی، خصوصاً در بافت‌های مختلف که مقادیر

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 مونوترپن سنتازها، جداسازی و شناسایی ژن‌های کدکننده‌ی مونوترپن سنتازها بسیار حائز اهمیت است. به‌طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر مشخص شد که دانه‌ها محل اصلی بیوسنتز و تجمع مونوترپن‌ها هستند، در حالی که 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 تربنوییدسنتاز می‌تواند تحت تأثیر مرحله رشدی و ژنوتیپ تغییر کند. به نظر می‌رسد که اگر هدف جداسازی ترپن سنتازهای مختلف است، بذر سیاهدانه بافت مناسبی جهت آنالیزهای مولکولی و بررسی مسیر بیوسنتزی است. در تحقیق حاضر، یک توالی مونوترپن سنتاز فرضی (NsTPS2) از گیاه سیاهدانه جداسازی شد. با توجه به این‌که برای جداسازی قطعه‌ی موردنظر از

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.

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 مونوترپن‌سنتزهای مختلف از سیاهدانه و همچنین در نیل به اهداف مورد نظر در دست‌ورزی ژنتیکی و مهندسی متابولیک ترکیبات مشابه، مفید باشد.

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., Raofzai, 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.
- Crococ, 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., Majidi, 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.

- 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. *Internatoina Immunopharmacology*, **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., Pruffer, 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).

- 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 Kalembe, 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. *Plöse One*, **8(10)**: e75972.

Isolation of Monoterpene Synthase Gene (*NsTPS2*) and Evaluation of Terpenoid Compounds in Black Cumin Medicinal Plant (*Nigella sativa* L.)

Rizan Elyasi¹, Mohammad Majdi^{1,*} and Abdolbaset Azizi²

- 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 Ranunculaceae 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 (*NsTPS2*) 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 *NsTPS2* which is necessary to validate monoterpene synthases, no other conserved regions of other identified monoterpene synthases were observed. Dendrogram analysis revealed that *NsTPS2* 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 Ranunculaceae family. This indicates that the genetic information of plants of the Ranunculaceae 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