

## تولید فورسکولین و بیان ژن ۱-دی‌اکسی-D-زایلولوز-۵-فسفات ردوکتوایزومراز در گیاه حسن یوسف (*Coleus forskohlii*) تیمار شده با مس

### Forskolin Production and Gene Expression of 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase in Treated *Coleus forskohlii* Plant with Cu

عفت شهبازی<sup>۱</sup> و علی ریاحی مدوار<sup>۲\*</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۰۲

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۲۲

#### چکیده

فورسکولین، ماده مؤثره گیاه *Coleus forskohlii* است که خواص درمانی متعددی دارد. در این تحقیق، میزان تولید فورسکولین و همچنین بیان ژن آنزیم ۱-دی‌اکسی-D-زایلولوز-۵-فسفات ردوکتوایزومراز (DXR) در گیاه *C. forskohlii* تیمار شده با غلظت‌های مختلف (صفر (به‌عنوان گیاه شاهد)، ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار) الیسیتور مس به مدت ۱۶ ساعت بررسی گردید. نتایج نشان‌دهنده افزایش تولید فورسکولین تا غلظت ۸ میکرومولار است، به طوری که در این تیمار، مقدار فورسکولین حدود ۱/۵ برابر مقدار آن در نمونه شاهد افزایش یافت که با تغییرات سطح بیان ژن DXR همخوانی داشت. ثابت شده است که حضور اضافی مس باعث تولید مولکول‌های فعال اکسیژن می‌شود که به‌طور مستقیم و یا با واسطه مولکول‌های سیگنالینگ دیگر، بیان ژن‌های درگیر در سیستم دفاعی گیاه را فعال می‌کنند. با توجه به نقش دفاعی دی‌ترین‌ها، احتمال داده می‌شود نتیجه افزایش بیان ژن DXR تحت تیمار با این الیسیتور، افزایش تولید فورسکولین است که نقش محافظتی در برابر تنش‌های را داراست.

واژه‌های کلیدی: الیسیتور، بیان ژن، کاروتنوئید، کلروفیل

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان  
۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

Email: riahi.ali@gmail.com

\*: نویسنده مسئول

گیاه حسن یوسف با نام علمی *Coleus forskohlii* متعلق به خانواده نعناعیان<sup>۱</sup> است. این گیاه بومی هند است و در حال حاضر کشت آن در سراسر دنیا گسترش یافته است (آمون و مولر<sup>۲</sup>، ۱۹۸۲). حسن یوسف گیاهی دائمی است که طول آن به ۴۵ تا ۶۰ سانتی‌متر می‌رسد. ساقه این گیاه چهارگوش و منشعب است و غده‌های آن کرکین و برگ‌های آن اشکی شکل و باریک شده به سمت برگچه‌ها می‌باشند (دوبی<sup>۳</sup> و همکاران، ۱۹۸۱). گل‌های این گیاه معمولاً کامل و درون کاسه گل کرکین است (بایلی<sup>۴</sup>، ۱۹۴۲). ریشه‌های این گیاه قهوه‌ای طلایی ضخیم بوده که به‌طور شعاعی منشعب شده است. تمام بخش‌های گیاه معطر است ولی برگ‌ها و غده‌ها رایحه مختلف دارند (شاه و همکاران<sup>۵</sup>، ۱۹۸۰). این گیاه دارویی است و در کشورهای مختلف برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (آگاروال و پارکس<sup>۶</sup>، ۱۹۸۳). اثرات دارویی این گیاه شامل: درمان بیماری‌های قلب، قولنج شکمی، بی‌نظمی‌های تنفسی، بی‌خوابی، تشنج، آسم، برونشیت، بی‌نظمی‌های روده‌ای، یبوست، بیماری صرع و گلودرد است (میسر<sup>۷</sup> و همکاران، ۱۹۹۴). گیاه *C. forskohlii* منبعی سرشار از الکالوئیدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، استروئیدها، تریپنویئیدها و پلی‌ساکاریدها است (آمون و مولر، ۱۹۸۲). فورسکولین<sup>۸</sup> نوعی دیترپن و مهم‌ترین ماده مؤثره این گیاه است که اهمیت دارویی به‌سزایی دارد (آمون و مولر، ۱۹۸۲؛ دسوزا و شاه<sup>۹</sup>، ۱۹۸۸).

فورسکولین با تحریک آدنیلات سیکلاز و در نتیجه افزایش سطح سیکلیک آدنوزین منوفسفات (cAMP) (سیامون<sup>۱۰</sup>، ۱۹۸۴) هم‌راستا با جلوگیری از ترکیب با مواد قلیایی و آزادسازی هیستامین (مارون<sup>۱۱</sup> و همکاران، ۱۹۸۷)، فشار خون و فشار داخل مردمک چشم را کاهش می‌دهد (دوبی و همکاران، ۱۹۷۴؛ کاپریولی<sup>۱۲</sup> و همکاران، ۱۹۸۴) و از تجمع پلاکت‌های

خون جلوگیری می‌نماید (وانگ<sup>۱۳</sup> و همکاران، ۱۹۹۳)، آماس رگ‌های خون را افزایش می‌دهد، ترشح هورمون تیروئید و تجزیه چربی در سلول‌های چربی را تحریک می‌کند (های<sup>۱۴</sup> و همکاران، ۱۹۸۵؛ روگر<sup>۱۵</sup> و همکاران، ۱۹۸۶). این ماده، به‌عنوان یک عامل درمانی قوی برای درمان بیماری‌هایی مانند نارسایی‌های قلبی، فشار خون، آب‌سیاه چشم، لخته خون در عروق و آسم کاربرد دارد (بویویر<sup>۱۶</sup> و همکاران، ۲۰۰۶).

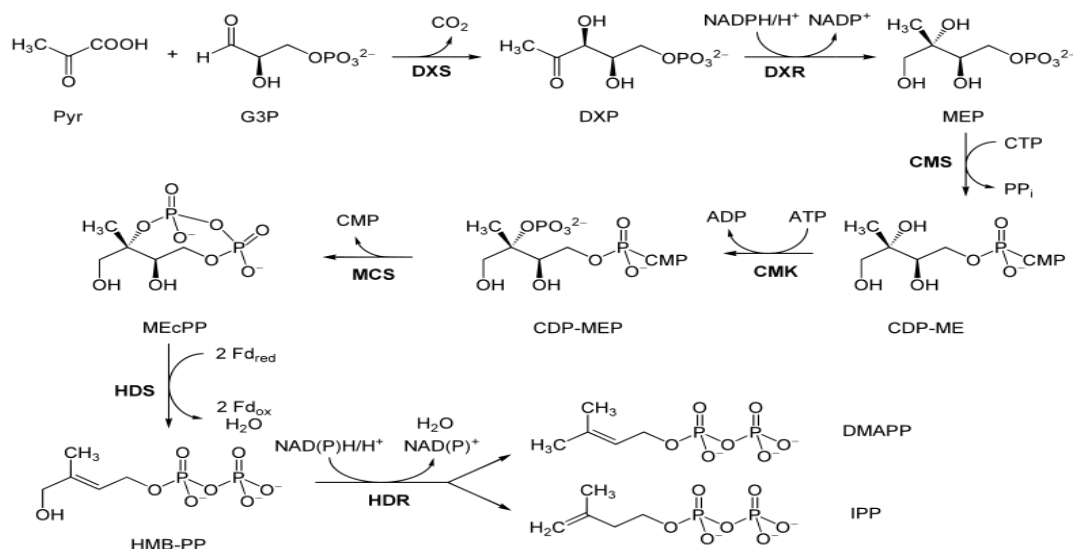
شاه و همکاران (۱۹۸۰) گزارش کردند که این ماده مؤثره به مقدار زیاد در گیاه *C. forskohlii* وجود دارد و ترکیب اصلی ریشه‌ها (دوبی و همکاران، ۱۹۸۴) است. ثابت شده است که آنزیم DXR یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر سنتز ماده ایزوپنتیل پیروفسفات<sup>۱۷</sup> (IPP) پیش‌ساز فورسکولین است (کانتریل<sup>۱۸</sup>، ۲۰۰۸). DXR در مسیر MEP تبدیل ۱-دی‌اکسی-D-زایلولوز-۵-فسفات (DXP) به متیل اریتریول فسفات (MEP) را کاتالیز می‌کند (شکل ۱) (رادیکویز<sup>۱۹</sup> و همکاران، ۲۰۰۰). ژن کدکننده این آنزیم توسط انگیر/اسرت<sup>۲۰</sup> و همکاران (۲۰۰۴) از گیاه *C. forskohlii* توالی‌یابی شد. طول توالی cDNA، ژن DXR در این گیاه شامل ۱۴۰۷ نوکلئوتید است که یک زنجیره پلی‌پپتیدی با ۴۶۹ اسیدآمین به کد می‌نماید.

مس یک عنصر کم‌مصرف ضروری برای رشد گیاهان است و در سوخت و ساز قند و ازت و همچنین در بیوسنتز اتیلن به عنوان یک هورمون رشد نقش مهمی دارد، این عنصر، کوفاکتور برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها از قبیل مس/روی سوپراکسید دیسموتازها، سیتوکروم c اکسیداز، گیرنده اتیلن، آسکوربات اکسیداز و دی‌آمین اکسیداز است (یارولا<sup>۲۱</sup>، ۲۰۰۹).

در این مطالعه، میزان تولید فورسکولین در ریشه‌ها و بیان ژن DXR و همچنین محتوی کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در برگ‌های مربوط به قلمه‌های ریشه‌دار شده گیاه *C. forskohlii* در تیمار با الیسیاتور مس بررسی گردید.

1. Lamiaceae
2. Ammon and Muler
3. Dubey
4. Bailery
5. Shah
6. Agarwal and Parks
7. Misr
8. Forskolin
9. De Souza and Shah
10. Seamon
11. Marone
12. Coprioli

13. Wong
14. Haye
15. Roger
16. Bouvier
17. Isopentenyl pirophosphate
18. Cantrill
19. Radykewicz
20. Engprasert
21. Yruela



شکل ۱: مسیر بیوسنتز ایزوپنتیل پیروفسفات (IPP). DXR واکنش تبدیل ۱-دی‌اکسی-۵-زایلولوز-۵-فسفات (DXP) به متیل اریتریول فسفات (MEP) را کatalیز می‌کند

Fig. 1: Biosynthesis pathway of isopentenyl diphosphate (IPP). DXR catalyze the reaction of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) to 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP)

جهت اندازه‌گیری بیان ژن DXR و محتوی کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها استفاده شد. به این منظور برگ‌ها پس از جمع‌آوری در حضور نیتروژن مایع فریز و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۸۰- نگه‌داری شدند.

### استخراج و اندازه‌گیری مقدار فورسکولین

جهت اندازه‌گیری مقدار فورسکولین از روش اسکنبرگ و خان<sup>۲</sup> (2003) استفاده شد. به این منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم از ریشه‌های خشک شده در هاون سائیده شد سپس ۶ میلی‌لیتر استونیتریل به پودر حاصله اضافه گردید. محلول به‌دست آمده به فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و در دستگاه بن‌ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت، تا فورسکولین از داخل سلول‌ها آزاد شود. مخلوط حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. در ادامه، محلول رویی به فالكون دیگری منتقل و حجم آن با استونیتریل به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول به‌دست آمده توسط فیلتر سرسرنگی (۰/۲۲ μm) صاف و به ستون ZORBAXSB-C18 (5 μm) دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۳</sup> (HPLC) (Agilent 1100, USA) تزریق شد. فاز متحرک شامل استونیتریل و آب به نسبت برابر و شدت جریان

### مواد و روش‌ها

#### تولید ساقه‌های ریشه‌دار شده گیاه *C. forskohlii* و تیمار آن‌ها

به‌منظور تولید ساقه‌های ریشه‌دار شده، سرشاخه‌های یک‌ماهه گیاه حسن‌یوسف با طولی حدود ۱۰±۲ سانتی‌متر بریده و در محیط موراشیگ و اسکوگ<sup>۱</sup> (1962) (MS) مایع تکمیل شده با ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۶ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA) در ارلن شیشه‌ای قرار داده شدند. ارلن‌ها به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند تا قلمه‌ها ریشه‌دار شوند.

در این تحقیق، از سولفات مس (CuSO<sub>4</sub>) تهیه شده از شرکت سیگما) به‌عنوان یک الیسیتور غیرزنده استفاده شد. به این منظور، غلظت‌های صفر (به‌عنوان شاهد)، ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار نمک سولفات مس تهیه و به هر یک از ارلن‌ها اضافه گردید. ارلن‌ها به مدت ۱۶ ساعت بر روی شیکر اریتالی با دور ۸۰ rpm در دمای آزمایشگاه شیک شدند. سپس گیاهان جمع‌آوری و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر سترون، آگیری شدند سپس برگ‌ها و ریشه‌ها از هر نمونه جدا گردید. برای اندازه‌گیری میزان فورسکولین، ریشه‌ها جمع‌آوری شده در هوای آزاد دور از نور و گرما خشک شدند. از برگ‌های جدا شده

2. Schaneberg and Khan  
3. High Performance Liquid Chromatography

1. Murashige and Skoog

تولید فورسکولین و بیان ژن ۱-دی اکسی-D-زایلولوز-۵-فسفات...

۱ mL/min بود و برای شناسایی ترکیب از طول موج ۲۲۰ نانومتر و استاندارد فورسکولین (Sigma) استفاده گردید.

## آنالیز مولکولی

### استخراج RNA کل، سنتز cDNA و تکثیر ژن

به منظور بررسی بیان ژن DXR، استخراج RNA کل از برگ‌های فریز شده با استفاده از کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن، شماره کاتالوگ: RN7713C) و مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. سپس کیفیت خلوص محصول به دست آمده بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی گردید. از RNA استخراج شده با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT)<sup>۱</sup> (از شرکت فرمنتاز) و پرایمر عمومی الیگو dT، کتابخانه cDNA ساخته شد. به طور خلاصه، حدود ۲ میکروگرم از RNA کل به تیوپ‌های ۰/۲ اضافه گردید، سپس ۲ میکرولیتر پرایمر به هریک از تیوپ‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از انتقال تیوپ‌ها بر روی یخ، یک میکرولیتر آنزیم RT، ۲/۵ میکرولیتر بافر RT (10X)، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۷۵ میکرولیتر RNase inhibitor، و در نهایت آب دیونیزه سترون (RNase free) تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به تیوپ‌ها اضافه گردید. واکنش ساخت cDNA به مدت ۸۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در انتهای واکنش به منظور غیرفعال شدن آنزیم RT، تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. همچنین به منظور حذف آلودگی‌های اضافی RNA از آنزیم RNase A (یک میکرولیتر، ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد (رضائی<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۱۳).

تکثیر ژن DXR و ژن توبولین با استفاده از کتابخانه cDNA به عنوان الگو و آنزیم Taq DNA پلیمرز در حضور پرایمرهای اختصاصی انجام شد. پرایمرهای اختصاصی تکثیر ژن DXR شامل پرایمر پیشرو<sup>۳</sup> 5'-ATG GCT CTT AAT CTG GAA ATC-3' و پرایمر معکوس<sup>۴</sup> 5'-TCA TAC AAG AGC AGG ACT AAG-3'، از ژن DXR گیاه *C. forskohlii* طراحی شد.

واکنش تکثیر این ژن شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۰ سیکل تکثیر شامل (۹۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد یک

دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه) و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

تکثیر ژن توبولین به عنوان کنترل داخلی در حضور پرایمرهای اختصاصی پیشرو (5'-GCT TTC AAC ACC TTC 3'-TTC AGT G-3') و معکوس (5'-CTT TCT CAG CTG 3'-AGA TCA CTG G-3') با شرایطی مشابه تکثیر ژن DXR (با این تفاوت که دمای اتصال پرایمرها ۵۷ درجه سانتی‌گراد بود) انجام گرفت.

میزان بیان ژن DXR نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد، از روش نیمه کمی RT-PCR و از روی شدت باند تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱٪ پس از نورمالیز کردن با ژن توبولین تکثیر شده مربوطه، توسط نرم‌افزار Gene tools انجام شد (Al-Bader<sup>۵</sup>، ۲۰۰۶ پلاس<sup>۶</sup> و همکاران، ۲۰۰۸).

### سنجش محتوی رنگیزه‌های

محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی بر اساس روش لیچتن‌تالر<sup>۷</sup> و همکاران (۱۹۸۷) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه ۰/۲ گرم برگ تازه (فریز شده) با ترازوی دقیق آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ وزن و در هاون چینی که حاوی ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ بود سائیده شد. سپس سوسپانسیون حاصله توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر استون به آن اضافه و سپس حجم محلول به ۱۵ میلی‌لیتر رسانده شد. میزان جذب محلول حاصله در طول موج‌های ۶۴۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Australia Varian, Cary 50) اندازه‌گیری شد. از استون ۸۰٪ به عنوان شاهد استفاده گردید. جهت محاسبه مقادیر کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید از فرمول‌های زیر استفاده شد.

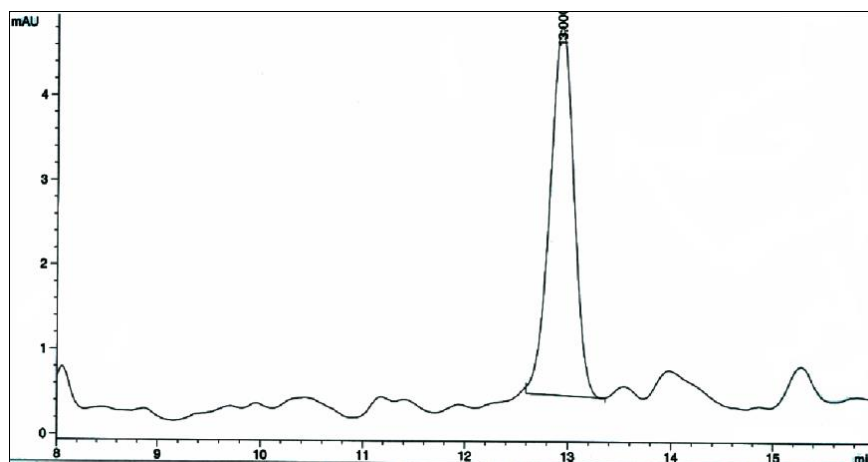
Chlorophyll a = (12.25 × OD<sub>663.2 nm</sub> - 2.79 × OD<sub>646.8 nm</sub>)  
Chlorophyll b = (21.21 × OD<sub>646.4 nm</sub> - 5.1 × OD<sub>663.2 nm</sub>)  
Total Chlorophyll = Chlorophyll a + Chlorophyll b  
Carotenoids = [(1000 × OD<sub>470 nm</sub> - 1.8 × Chlorophyll a - 85.02 × Chlorophyll b)/198]

### آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها با سه تکرار مستقل در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS توسط آزمون دانکن با در نظر گرفتن سطح اطمینان P ≤ 0.05، مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفت.

5. Al-Bader  
6. Place  
7. Lichenthaler

1. Reverse transcriptase  
2. Rezaee  
3. Forward  
4. Rivers



شکل ۲: کروماتوگرام HPLC مربوط به نمونه استاندارد فورسکولین. زمان نگهداری نمونه در ستون حدود ۱۳ دقیقه است.

Fig. 2: HPLC chromatogram of forskolin standard sample. Retention time of sample in column is about 13 minutes.

## نتایج

### محتوی فورسکولین در ریشه قلمه‌های ریشه‌دار شده

جهت تشخیص پیک مربوط به فورسکولین در نمونه‌ها و همچنین سنجش محتوی آن به ترتیب از زمان نگهداری<sup>۱</sup> نمونه استاندارد در ستون و سطح زیر منحنی مربوطه استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود پیک فورسکولین در نمونه استاندارد ۱۳ دقیقه پس از تزریق به ستون مشاهده گردید. علاوه بر این، پیک مربوط به نمونه‌های شاهد و تیمار شده نیز در همین زمان مشاهده گردید، به‌طوری‌که با اضافه نمودن نمونه استاندارد به نمونه شاهد پیک بلندتری در همین زمان مشاهده شد (نتایج نشان داده نشده است).

محتوی فورسکولین در ریشه قلمه‌های تیمار شده در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل قابل مشاهده است، با افزایش غلظت الیسیتور تا ۸ میکرومولار، محتوی فورسکولین افزایش می‌یابد. درحالی‌که تولید این ماده در تیمار با غلظت ۴ میکرومولار به‌صورت جزئی (غیرمعنی‌دار در سطح ۵ درصد) افزایش یافته است، افزایش معنی‌دار تولید آن در تیمار با غلظت ۸ میکرومولار مشاهده می‌شود. نکته قابل توجه، کاهش معنی‌دار تولید این ماده مؤثره در تیمار با غلظت ۱۶ میکرومولار در مقایسه با غلظت ۸ میکرومولار مس است که تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد ندارد.

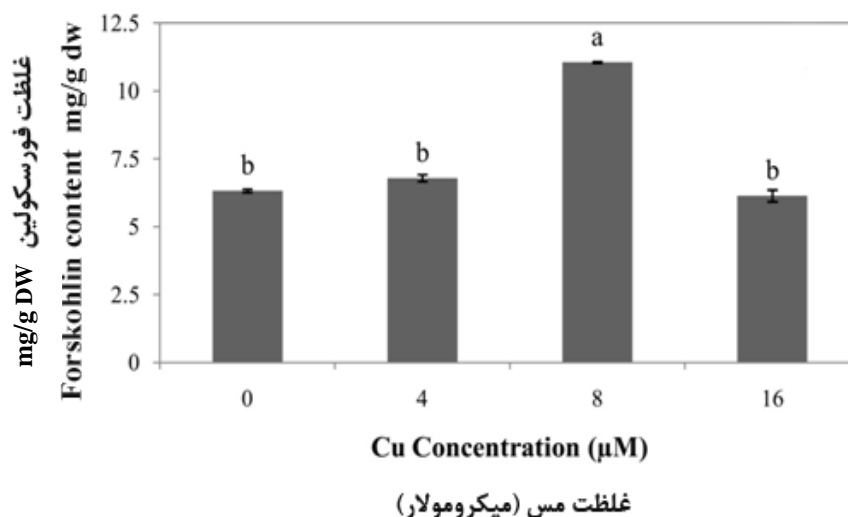
## بیان ژن DXR

کیفیت RNA استخراج شده با تفکیک باندهای rRNA بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، دو باند مربوط به 28s و 18s rRNA نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA تخلیص شده و دست‌نخورده بودن آن است.

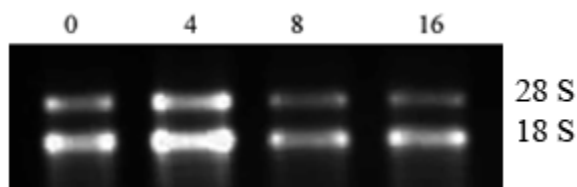
از RNA استخراج شده، با استفاده از پرایمرهای عمومی الیگو dT و آنزیم DNA پلی‌مراز وابسته به RNA<sup>۲</sup>، کتابخانه cDNA مربوط به هر نمونه ساخته شد. از cDNA ساخته شده در حضور پرایمرهای اختصاصی دو ژن DXR و توبولین تکثیر شدند. مطابق شکل ۵، A قطعه تکثیر شده DXR بانندی معادل ۱۴۰۷ bp و برای ژن توبولین (شکل ۴، B) بانندی معادل ۷۰۰ bp بر روی ژل مشاهده شد.

با وجود آزمایش‌های متعدد، به دلیل بیان بسیار پایین این ژن در ریشه‌ها، سنجش میزان بیان آن در این اندام میسر نگردید. با توجه به مطالعات گذشته که نشان دادند بیان این ژن در برگ‌ها بیشتر است (انگپراسرت و همکاران، ۲۰۰۴)، جهت بررسی سطح بیان این ژن با محتوی فورسکولین سنتز شده، از برگ‌های مربوط به قلمه‌های ریشه‌دار شده استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن DXR در برگ‌های مربوط به قلمه‌های ریشه‌دار شده نشان داد که بیان این ژن با روندی مشابه روند تأثیر الیسیتور بر میزان تولید فورسکولین تغییر می‌کند (شکل ۶).



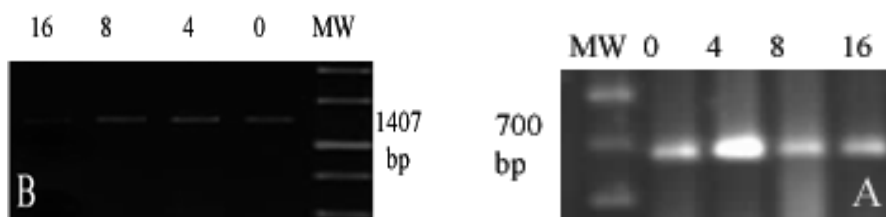
شکل ۳: محتوی فورسکولین تولید شده در ریشه‌های گیاه *C. forskohlii* تیمار شده به مدت ۱۶ ساعت با غلظت‌های مختلف الیسیتور مس. حروف متفاوت بالای نمودارها بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد است

Fig. 3: Forskolin content in the roots of *C. forskohlii* plant which treated for 16 hours with different concentrations of copper elicitor. Signs with different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$



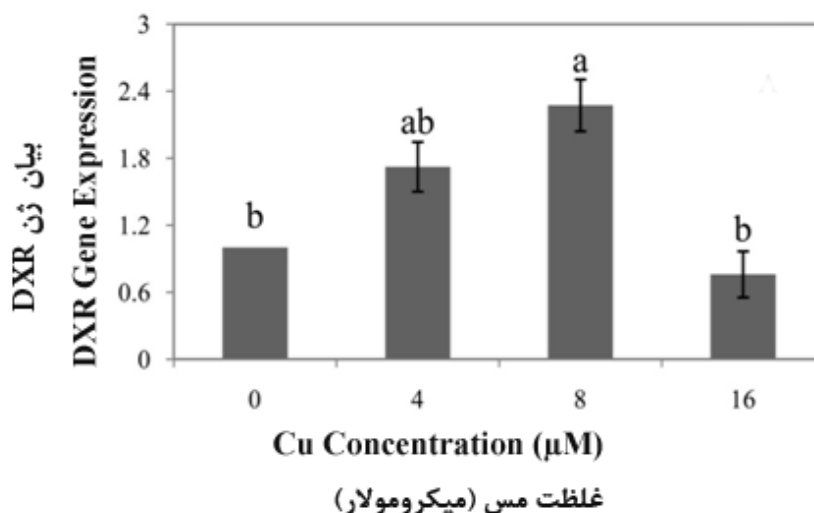
شکل ۴: نمونه‌ای از RNA کل استخراج شده از برگ‌های گیاه *C. forskohlii* شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف الیسیتور مس. در ژل، دو باند مربوط به rRNA 28s و 18s به وضوح قابل مشاهده می‌باشند. اعداد صفر، ۴، ۸ و ۱۶ به ترتیب مربوط به RNA استخراج شده از نمونه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار می‌باشند

Fig. 4: A sample of total RNA extracted of leaves of *C. forskohlii* plant which treated with different concentrations of copper elicitor for 16 hours. In the gel, two rRNA bands; 18s and 28s are clearly revealed. Numbers of 0, 4, 8 and 16 are shown the RNA extracted of control and treated sample with 4, 8 and 16 μM Cu elicitor respectively



شکل ۵: محصول تکثیر شده ژن توبولین (A) و DXR (B) از برگ‌های گیاه *C. forskohlii* تیمار شده با غلظت‌های مختلف الیسیتور مس. قطعه تکثیر شده از ژن DXR، باندی معادل ۱۴۰۷ bp و برای ژن توبولین باندی معادل ۷۰۰ bp بر روی ژل آگارز یک درصد در کنار باند مربوط به مارکر وزن مولکولی (WM) ظاهر گردید

Fig. 5: Products amplified of Tubulin (A) and DXR (B) genes of leaves of *C. forskohlii* plant which treated with different concentrations of Cu elicitor for 16 hours. The DXR and Tubulin genes show a band about 1407 bp and 700 bp next to the molecular weight marker (WM) on 1% agarose gel respectively



شکل ۶: مقایسه بیان نیمه کمی ژن DXR در برگ‌های گیاه *C. forskohlii* تیمار شده به مدت ۱۶ ساعت با غلظت‌های مختلف الیسیتور مس. حروف متفاوت بالای نمودارها بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد است

Fig. 6: Comparison of DXR gene expression level in leaves of treated *C. forskohlii* with different concentrations of Cu elicitor for 16 hours. Signs with different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$

استفاده کاهش محتوی کاروتنوئیدها قابل توجه است (جدول ۱).

#### بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق، تولید ماده مؤثره گیاه *C. forskohlii* در ریشه‌های قلمه‌های یک ماهه این گیاه تحت تیمار با الیسیتور فلزی مس بررسی گردید. فورسکولین نوعی دیتیرین است (لاول<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۳) که بیشتر در ریشه‌ها ساخته می‌شود. این ترکیب اهمیت دفاعی برای گیاه دارد (شان<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۰۸) و از مسیر بیوسنتزی متیل اریتریتول فسفات (MEP) سنتز می‌گردد که آنزیم DXR یکی از آنزیم‌های کلیدی در این مسیر است. شایان ذکر است که فیتول پیش‌ساز سنتز کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها نیز از طریق همین مسیر سنتز می‌شوند.

همان‌طور که در شکل قابل مشاهده است، با افزایش غلظت الیسیتور تا ۸ میکرومولار میزان بیان ژن DXR افزایش یافته است. در حالی که افزایش بیان ژن در تیمار با غلظت ۴ میکرومولار در مقایسه با نمونه شاهد معنی‌دار نیست، افزایش معنی‌دار آن در تیمار با غلظت ۸ میکرومولار مشاهده گردید. از طرف دیگر با افزایش غلظت الیسیتور در محیط تا ۱۶ میکرومولار میزان بیان کاهش یافته است که در سطح ۵ درصد نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار نمی‌باشد.

#### محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی

همان‌طور که در جدول ۱ قابل مشاهده است، بیش‌ترین محتوی کلروفیل‌ها در برگ‌های مربوط به ساقه‌های ریشه‌دار شده با غلظت ۴ میکرومولار مشاهده می‌شود که نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. ولی با افزایش غلظت الیسیتور در محیط محتوی آن کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که تفاوت معنی‌داری بین نمونه شاهد و تیمار شده با غلظت ۸ میکرومولار مشاهده نشد، با افزایش غلظت الیسیتور در محیط کاهش معنی‌داری محتوی کلروفیل‌ها (به جز کلروفیل b) در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده گردید. نکته جالب توجه این‌که، محتوی کاروتنوئیدها در برگ‌ها، روندی مشابه محتوی کلروفیل‌ها در این اندام را نشان می‌دهند، به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار این ترکیبات در تیمار با غلظت ۴ میکرومولار مشاهده می‌شود، و با افزایش غلظت الیسیتور در محیط، مقدار آن کاهش یافته و در بالاترین غلظت مورد

1. Laule  
2. Shan

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف الیسیتور مس بر محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در برگ‌های مربوط به ساقه‌های ریشه‌دار شده گیاه حسن‌یوسف

Table 1: The effects of different concentrations of Cu elicitor on chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoid contents in leaves of rooted cutting of *C. forskohlii*

محتوی کاروتنوئید carotenoid content (mg/mL)	محتوی کلروفیل کل Total chlorophyll content (mg/mL)	محتوی کلروفیل b chlorophyll b content (mg/mL)	محتوی کلروفیل a chlorophyll a content (mg/mL)	غلظت‌های مس Cu concentration ( $\mu$ M)
0.57± 0.02 <sup>b</sup>	3.34± 0.00 <sup>b</sup>	1.29± 0.00 <sup>b</sup>	2.04± 0.00 <sup>b</sup>	0
1.25± 0.19 <sup>a</sup>	6.29± 0.05 <sup>a</sup>	2.04± 0.02 <sup>ab</sup>	4.25± 0.02 <sup>a</sup>	4
0.78± 0.05 <sup>b</sup>	4.59± 0.00 <sup>ab</sup>	1.60± 0.00 <sup>ab</sup>	2.99± 0.00 <sup>b</sup>	8
0.04± 0.01 <sup>c</sup>	1.37± 0.00 <sup>c</sup>	0.75± 0.00 <sup>cb</sup>	0.62± 0.00 <sup>c</sup>	16

در هر ستون حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد است  
Signs with different letters in each group indicate significant differences at  $p \leq 0.05$

افزایش بیان آن در سطح ۵ درصد نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار نمی‌باشد، افزایش دو برابری بیان این ژن در غلظت ۸ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد مشاهده گردید ولی با افزایش غلظت الیسیتور در محیط میزان بیان آن کاهش یافت. این نتایج با روند تولید فورسکولین در ریشه‌های همخوانی دارد (شکل ۳). در مقابل، افزایش معنی‌دار محتوی کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در پایین‌ترین غلظت الیسیتور مشاهده گردید که با افزایش غلظت الیسیتور در محیط، محتوی آن‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

با وجود اهمیت مس در رشد و نمو گیاهان، زمانی که مس به مقدار اضافی در اختیار گیاه قرار گیرد باعث ایجاد علائم سمیت در گیاه می‌شود. مس اضافی باعث کاهش رشد و فعالیت فتوسنتزی و باعث ایجاد آسیب در غشاها و دستگاه ژنتیکی و پروتئین‌ها و سرکوب فعالیت آنزیم‌ها می‌گردد (ولکر و ویل<sup>۵</sup>، ۱۹۸۱). بنابراین کاهش بیان ژن در غلظت‌های بالا و همچنین کاهش محتوی کلروفیل و کاروتنوئیدها در این شرایط می‌تواند به‌دلیل اثرات منفی تجمع مس در گیاه باشد. مس جزء فلزات سنگین طبقه‌بندی می‌گردد و مطالعات گذشته نشان دادند که جذب بیش از حد نیاز آن به گیاه باعث تنش اکسیداتیو می‌شود (آدریانو<sup>۶</sup>، ۲۰۰۱). رشد گیاهان در حضور غلظت‌های بالای مس به‌طور معمول با کاهش بیومس و علائم کلروز همراه است که با کاهش میزان کلروفیل، تغییر و تبدیل ساختار کلروپلاست، در برگ‌ها همراه است (روهمر، ۲۰۰۳). از طرف دیگر، کاهش بیان ژن DXR در غلظت‌های بالا، (۱۶ میکرومولار الیسیتور) می‌تواند به‌دلیل اثرات منفی تجمع مس در گیاه باشد (آدریانو، ۲۰۰۱).

مولکول کلروفیل شامل دو قسمت، کلروفید (از پیش‌ساز ۵-آمینولولینات سنتز می‌شود) و فیتول (که ایزوپرنوئیدی است و از مسیر DXS سنتز می‌شود) است. فیتول همچنین یک پیش‌ساز برای سنتز توکوفرول‌ها است که از طریق ترکیب شدن با هموژنتیسیک اسید مشتق شده از مسیر اسید شیکمات، تولید می‌شود (روهمر<sup>۱</sup>، ۲۰۰۳). کاروتنوئیدها، تتراترپن‌های ۴۰ کربن‌های هستند که در کلروپلاست و از طریق مسیر DXS سنتز می‌شوند. به‌دلیل خصوصیات شیمیایی و نقش مهم آن‌ها در حفاظت سیستم فتوسنتزی، ترکیبات ضروری همه ارگانیسم‌های فتوسنتزی می‌باشند (هیرسبرگ<sup>۲</sup>، ۲۰۰۱). مطالعات گذشته نشان دادند که مس در چندین مسیر فیزیولوژیکی از قبیل ساخت و ثبات کلروفیل و رنگدانه‌های گیاهی و همچنین در عملکرد بسیاری از آنزیم‌های اکسیدکننده که در تنفس نقش دارند، موثر است (بوستین و درودی<sup>۳</sup>، ۱۹۹۸).

نتایج نشان‌دهنده تأثیرگذاری این الیسیتور بر تولید فورسکولین در ریشه‌های گیاه تیمار شده است. ثابت شده است که فلزات سنگین از طریق تحریک سنتز یک‌سری مولکول‌های سیگنالی‌نگ از قبیل رادیکال‌های آزاد ( $H_2O_2$ ) و جاسمونات‌ها بر بیان ژن‌های درگیر در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان تأثیر می‌گذارند و محتوی متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (زحو<sup>۴</sup> و همکاران، ۲۰۱۰).

همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده، حضور یون مس در محیط تا غلظت ۸ میکرومولار سبب افزایش بیان ژن DXR شده است، درحالی‌که در تیمار با پایین‌ترین غلظت الیسیتور،

1. Rohmer
2. Hircchberg
3. Bustin and Dorudi
4. Zhou

5. Walker and Webl
6. Adriano



### سیاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران با قرارداد شماره ۱/۴۰۳۶ انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

در مجموع پیشنهاد می‌گردد، تیمار این گیاه با غلظت‌های پایین مس، شرایط بهبود رشد را برای گیاه فراهم می‌کند که با افزایش محتوی کلروفیل و کاروتنوئیدها همراه است. درحالی‌که افزایش غلظت آن در محیط (تا ۸ میکرومولار) سبب فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ و در نتیجه افزایش بیان ژن‌های درگیر در سیستم دفاعی گیاه شده که نتیجه آن افزایش مقدار فورسکولین می‌باشد. در عین حال، افزایش بیشتر الیسیتور در محیط با کاهش بیان ژن‌ها و محتوی کلروفیل و کاروتنوئیدها همراه می‌باشد.

- Adriano, D. C. 2001. Trace elements in terrestrial environments; Biochemistry, Bioavailability and Risk of Metals, Springer-Verlag, New York.
- Agarwal, A. G. and Parks, R. E. 1983. Forskolin: a potential antimetastatic agent. *International Journal of Cancer*, 32: 801-804.
- Al-Bader, M. D. 2006. Estrogen receptors alpha and beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real time PCR and western blotting. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 28: 4-13.
- Ammon, H. P. T. and Muller, A. B. 1985. Forskolin: from an ayurvedic remedy to a modern agent. *Planta Medica* 46: 473-477.
- Bailey, L. H. 1942. *Standard Cyclopedia of Horticulture*, Macmillan, New York.
- Bouvier, F., Rahier, A. and Camara, B. Biogenesis, 2006. Molecular regulation and function of plan Isoprenoids, Institut de Biologie Moleculaire des Plantes du CNRS.
- Bustin, S. A. and Dorudi, S. 1998. Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays, *Molecular Medicine Today*, 4: 389-396.
- Cantrill, R. 2008. Reviewed by Yoko Kawamura, Phytosterols, phytostanols and their esters, *Chemical and Technical Assessment*.
- Caprioli, J., Sears, M., Bausher, L., Gregory, D. and Mead, A. 1984. Forskolin lowers intraocular pressure by reducing aqueous inflow. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 25: 268-277.
- Schaneberg, B.T. and Khan, I.A. 2003. Quantitative analysis of forskolin in *Coleus forskohlii* (Lamiaceae) by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 86(3) :467-70.
- De Souza, N. J. and Shah, V. 1988. Forskolin an adenylate cyclase activating drug from an Indian herb. *Economic and Medicinal Plant Research* 2: 1-16.
- Dubey, M. P., Srimal, R. C., Patnaik, G. K. and Dhawan, B. N. 1974. Blood pressure lowering and antispasmodic effects of *C. forskohlii* Briq. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 6:15.
- Dubey, M.P., Srimal, R. C., Nityanand, S. and Dhawan, B. N. 1981. Pharmacological studies on Coleonol, a hypotensive diterpene from *Coleus forskohlii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 3: 1-13.
- Engprasert, S., Taura, F., Kawamukai, M. and Shoyama, Y. 2004. Molecular cloning and functional expression of geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Coleus forskohlii* Briq, *BMC Plant Biology*, 18:18.
- Haye, B., Aublin, J. L. and Champion, S. 1985. Chronic and acute effects of forskolin on isolated thyroid cell metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 43: 41-50.
- Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 210-218.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P. B., Gruissem, W., and Lange, B. M. 2003. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100: 6866-6871.
- Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A. and Rohmer, M. 2002. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a Mevalonate-independent pathway. *Planta*, 216: 271-274.
- Marone, V., Columbo, M., Triggiani, M., Cirillo, R., Genovese, A. and Formisano, S. 1987. Inhibition of IgE mediated release of histamine and peptide leukotriene from human basophils and mast cells by forskolin. *Biochemical Pharmacology*, 36: 13-20.
- Misr, L. N., Tyagi, B. R., Ahmad, A. and Bahl, J.R. 1994. Variability in the chemical composition of the essential oil of *Coleus forskohlii* genotypes. *Journal of Essential Oil Research*, 6: 243-247.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15: 473-497.
- Place, R. F., Li L. C., Pookot, D., Noonan, E. J. and Dahiya, R. 2008. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 8-13.
- Radykewicz, T., Rohdich, F., Wungsinthaweeikul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, Zenk, M. H. and Arigoni, D. 2000. Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase, *Febs Letters*, 465: 157-160.
- Rezaee, F, Ghanati, F. and Behmanesh, M. 2013. Antioxidant activity and expression of catalase gene of *Eustoma grandiflorum* L. in response to boron and aluminum. *South African Journal of Botany*, 84: 13-18.
- Roger, P. P., Servais, P. and Dumont, J. E. 1987. Regulation of dog thyroid epithelial cell cycle by forskolin and adenylate cyclase activator. *Experimental Cell Research*, 172: 282-292.
- Rohmer, M. 2003. Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis, *Elucidation and distribution. Pure and Applied Chemistry*, 75: 375-387.
- Seamon, K. B. 1984. Forskolin and adenylate cyclase: New opportunities in drug design. In: *Annual Report on Medical Chemistry*. (D. M., Bailey eds.). Academic Press, New York, 19: 293-302.
- Shah, V. Bhat, S. V. Bajwa, B. S. Dornaeur, H. and De Souza, N. N. J. 1980. The occurrence of forskolin in Labiatae. *Planta Medica*, 39: 183-185.
- Shan, Y., Xu, L., Lu, Y., Wang, X., Zheng, Q., Kong, L. and Niwa, M. 2008. Diterpenes from *Coleus forskohlii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56: 52-56.
- Walker, C.D. and Webl, J., 1981. Copper in plants. Form and behaviours, in: *Loner-agan J. F., Robson A.D. and Graham R. D., (Eds.), Copper in soils and plants. Academic Press, London, 189-212.*

- Wong, S., Mok, W., Phaneuf, S., Katz, S. and Salari, H. 1993. Forskolin inhibits platelet-activating factor binding to platelet receptors independently of adenylyl cyclase activation. *European Journal of Pharmacology*, 245: 55-61.
- Yruela, I. 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36: 409-430.
- Zhou, M. L., Zhu, X. M., Shao, J. R., Wu, Y. M. and Tang, Y. X. 2010. Transcriptional response of the catharanthine biosynthesis pathway to methyl jasmonate/nitric oxide elicitation in *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88: 737-750.

## Forskolin Production and Gene Expression of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase in Treated *Coleus forskohlii* Plant with Cu

Shahbazi<sup>1</sup>, E. and Riahi-Madvar<sup>2\*</sup>, A.

### Abstract

Forskolin is an effective compound found in *Coleus forskohlii* plant which has different therapeutic properties. In this research, production of forskolin and gene expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) were investigated in *C. forskohlii* plant after treatment with different concentrations of copper elicitor (0; as control, 4, 8 and 16  $\mu$ M) for 16 hours. Results showed that forskolin concentration is increased up to 8  $\mu$ M in such a way that the concentration can be estimated 1.5 fold more than the control sample, which consisted with changes of DXR gene expression level. It has been proved that excess concentration of copper, causes triggering of reactive oxygen species that directly or mediated through others signaling molecules induce gene expression level of defensive system. Considering the defensive role of diterpens, it is proposed that increase in DXR gene expression level by copper elicitor leads to increase in forskolin concentration as protective compound against stresses.

**Keywords:** Elicitor, Gene expression, Carotenoid, Chlorophyll

---

1. MSc Graduate student, Department of Biotechnology, Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman

2. Assistant professor of Biochemistry, Department of Biotechnology, Institute of Science and Higher Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman

\*: Corresponding author      Email: ariahi@icst.ac.ir