

اثر متیل جاسمونات بر میزان بیان ژن‌های کاتالاز، پرولین سنتتاز، بتایین آلدھید دهیدروژناز و SOS1 در گیاه دارویی بابونه تحت تنش شوری

زهرا قاسمی^۱، رویا رضوی زاده^{*۲} و نگار نورمهناد^۱

^۱گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۳۶۹۵، ۱۹۳۹۵، تهران- ایران

^۲گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۳۶۹۵، ۱۹۳۹۵، تهران- ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۱/۰۴)

چکیده

بابونه (*Tanacetum parthenium*) یکی از پر ارزش‌ترین گیاهان دارویی است که گل‌های خشک شده آن به دلیل وجود تعداد زیادی از ترپن‌ویدها و فلاونوویدها خاصیت دارویی دارد. یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد گیاهان در جهان و به ویژه مناطق خشک و نیمه خشک شوری می‌باشد. در این پژوهش به منظور بررسی اثر متیل جاسمونات بر روی بیان تعدادی از ژن‌های موثر در تحمل به تنش شوری در گیاه بابونه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا گردید. تیمارهای شوری در چهار سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار) و متیل جاسمونات در چهار سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو مولار) اعمال شدند. نمونه‌برداری در چهار زمان (۰، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت) پس از اعمال تنش انجام گرفت و اثر متقابل بین زمان و تیمار شوری و متیل جاسمونات بر میزان بیان ژن‌های بتایین آلدھید دهیدروژناز (BADH)، کاتالاز (Catalase) و پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در غلظت‌های متفاوت شوری نشان داد که بیشترین بیان ژن‌های SOS1 (Salt Overly Sensitive)، کاتالاز (Catalase) و پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) مورد ترتیب در غلظت‌های ۱۵۰، ۱۰۰ و ۵۰ میلی مولار شوری بود و در غلظت‌های متفاوت متیل جاسمونات و زمان‌های مختلف اعمال تیمار، بیان ژن‌های BADH و Catalase با افزایش غلظت متیل جاسمونات و زمان نمونه‌گیری روند افزایشی داشتند. بیشترین مقدار بیان ژن‌های P5CS و SOS1 در غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به ترتیب بعد از ۲۴ و ۳۶ ساعت حاصل شد. نتایج اثر متقابل تنش شوری، تیمار متیل جاسمونات و زمان نمونه‌برداری بر میزان بیان ژن‌ها نشان داد که بیشترین سطح بیان برای تمامی ژن‌های مورد ارزیابی در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۱۰۰ میلی مولار NaCl و در مدت زمان ۳۶ ساعت مشاهده شد و کمترین سطح بیان در تیمار شاهد گزارش گردید. نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد متیل جاسمونات به عنوان یک تنظیم کننده با افزایش سطح بیان ژن‌ها در گیاهان بابونه تحت تنش شوری می‌تواند سبب افزایش تحمل گیاهان به تنش شود.

کلمات کلیدی: بابونه گاوی، بیان ژن، تنش شوری، متیل جاسمونات

مقدمه

دو یا چند ساله، متعلق به خانواده آستراسه و یکی از قدیمی‌ترین

و مهم‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده در سراسر دنیا است که

بابونه گاوی (*Tanacetum parthenium*) گیاهی است بوته‌ای،

کاتالاز که در پراکسیزوم و گلی اکسیزوم تولید می‌شود، به همراه آنزیم آسکوربات پراکسیداز عمل کاتالیز پراکسید هیدروژن سمی را به آب و مولکول اکسیژن انجام می‌دهد (Hidrobozhen smi ra be ab o molkoul aksejzen angjam mi dehden). آنزیم آسکوربات پراکسیداز (Vandenabeele *et al.*, 2004) نقش مهمی در فعالیت روزنه‌ها از طریق تنظیم غلاظت پراکسید هیدروژن در سلول گیاهان تحت تنش شوری دارند، چرا که غلاظت این ترکیب بعنوان یک علامت مهم در به حرکت در آوردن سلول محافظت روزنه عمل می‌کند (Misra *et al.*, 2015). نقش مهمی در مسیر تنظیمی SOS (Salt Overly Sensitive) تنظیم همایستایی یونی (Ionic homeostasis) و حفظ شرایط پایدار و ثابت یون‌ها در محیط داخلی دارد و از سه جزء اصلی تشکیل شده است. SOS1 آنتیپورتر Na^+/H^+ را کد می‌کند که نقش مهمی در خروج یون‌های سدیم از سلول دارد. SOS2 آنتیپورتر Ca^{2+} را کد می‌کند و SOS3 به عنوان پروتئین کیناز سرین/ترئونین را کد می‌کند (Ji *et al.*, 2013). از جمله راههایی که گیاهان در مواجه با تنش‌های زیستی از جمله تنش شوری انجام می‌دهند سترز و تجمع ترکیباتی است که حفاظت کننده‌های اسمزی نامیده می‌شود. گلاسین بتایین در پاسخ به تنش در گیاهان تجمع پیدا می‌کند که سترز این اسمولیت سازگار را آنزیم بتایین آلدھید دهیدروژناز طی واکنش دو مرحله‌ای کاتالیز می‌کند (Fitzgrarald *et al.*, 2009). پرولین دارای نقش‌های حفاظتی مهمی در گیاه است مانند حفظ متابولیسم و سترز، محافظت آنزیم‌های سلولی و ساختار پروتئین‌ها که به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کند و معمولاً تحت تنش‌ها مخصوصاً شوری افزایش بیان دارد (Chinnusamy *et al.*; 2006).

اسید جاسمونیک و متیل استر آن (متیل جاسمونات) یکی از هورمون‌های درون‌زای گیاهی است که به عنوان محرك طبیعی تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه از طریق القاء تنش کاذب و به عنوان یک علامت درونی در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده عمل می‌کند (Divya *et al.*, 2014). براساس مطالعات انجام شده، متیل جاسمونات در گونه‌های گیاهی موجب بروز مجموعه‌ای از واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند انباست متابولیت‌های مفید ثانویه و تجمع

معمولًاً با نام feverfew یا گیاه تبر شناخته می‌شود. این گیاه بومی کوههای بالکان اروپا است و دامنه پراکنش وسیعی در اروپا، آسیا و آمریکا دارد (Besharati-Seidani *et al.*, 2006; Koganov, 2009). این گیاه حاوی لاتکتون‌های سزکوبی ترپن، فلاونوئیدهای گلیکوزید، پین‌ها و سایر ترکیبات است که به نظر می‌رسد پارتنولید مهم‌ترین عامل فعال زیستی در بابونه گاوی است که به عنوان یک درمان گیاهی مؤثر برای آرتروز، درد و میگرن عمل می‌کند (Ernst & Pittler, 2000; Pittler & Ernst, 2004; Kemper *et al.*, 2007; Pareek *et al.*, 2011).

شوری و تجمع املاح در سطح خاک و به دنبال آن خشکی فیزیولوژیک، یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی می‌باشد که سبب بروز مشکلات کشاورزی و کاهش شدید رشد و تولیدات گیاهی در مناطق خشک و نیمه خشک می‌گردد. تنش شوری موجب اختلال در فعالیت ناقل‌ها و کانال‌های یونی در ریشه، کاهش جذب آب و مواد معدنی می‌شود. تنش شوری از طریق ایجاد تنش ثانویه‌ای به نام تنش اکسیداتیو، موجب تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) در سلول‌های گیاهی می‌شود. ROS برای ارگانیسم‌ها بسیار سمی است و می‌تواند سبب تخرب کلروفیل، پروتئین‌ها، آمینواسیدها، آنزیم‌ها، اسیدهای نوکلئیک و تحریک پراکسیداسیون لیپیدهای غشا گردد (Davey *et al.*, 2005). گیاهان جهله بر تنش اکسیداتیو و از بین بردن انواع اکسیژن فعال دارای ساز و کارهای دفاعی آنتی اکسیدانت آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند. در گیاهان تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی زیادی از جمله تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان از قبیل: آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسیدیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، بتایین آلدھید دهیدروژناز (BADH)، مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR) و دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) در مقاومت به تنش‌های غیر زیستی رخ می‌دهد (Kohler *et al.*, 2009; Gill & Tuteja, 2010). از آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو کلیدی آنزیم کاتالاز است که خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. آنزیم

کارهای پیچیده پاسخ گیاهان به تنفس شوری را فراهم کند. این پژوهش به منظور بررسی بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در مقاومت به تنفس شوری در گیاه دارویی باونه صورت گرفت و هدف تحقیق ارزیابی الگوی بیان ژن‌های منتخب دخیل در سنتز آنزیم‌های کاتالاز، پرولین سنتتاز، بتایین آلدھید دهیدروژناز و SOS1 در گیاه باونه تحت تنفس شوری و تیمار متیل جاسمونات بود تا تیمارهای موثر در بهبود مقاومت و همچنین چگونگی پاسخ این گیاه ارزشمند دارویی به تنفس شوری تحت تیمار متیل جاسمونات بررسی گردد. نتایج حاصل می‌تواند در مطالعات مربوط به افزایش تحمل به تنفس شوری گیاهان حائز اهمیت باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی: در این بررسی از نشاء باونه تهیه شده از شرکت کبیر زرین استفاده گردید. نشاء‌ها به گلخانه‌های پلاستیکی با بستر کشت استاندارد شامل: ۱۵٪ ماسه، ۳۰٪ کوکوپیت، ۳۰٪ پرلیت و ۱۵٪ خاک مزرعه متقل و تا زمان اعمال تنفس در مرحله‌ی ظهور گل آذین در گلخانه نگهداری شدند. سطوح شوری به کار برده شده با اضافه کردن نمک طعام (NaCl) به آب آبیاری به مدت هفت تا ده روز اعمال و محلول پاشی متیل جاسمونات نیز همزمان با شوری بر روی بستر کشت انجام گرفت. این تحقیق بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با سه فاکتور (شاهد جزء)، شوری در چهار سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار)، متیل جاسمونات در چهار سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰، او ۱۵۰ میکرو مولار) و نمونه‌برداری در چهار زمان (۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت) بر روی نشاء‌ای باونه در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و Excel انجام گرفت. مقایسه میانگین بر اساس آزمون Duncan و سطوح معنی‌دار بودن تیمارها در سطح $p \leq 0.05$ انجام گرفت.

استخراج RNA: جهت استخراج RNA، ۱۰۰ میلی گرم از

برخی از پروتئین‌های درون سلولی موسوم به پروتئین‌های غشای تیلاکوئیدی می‌شود (Popova *et al.*, 2003; Liechti & Farmer, 2002; Rezaei *et al.*, 2011). اسید جاسمونیک با افزایش رونویسی از mRNA آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) سبب فعال‌سازی مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شود (Dar *et al.*, 2015). در پژوهشی مشخص شد که طی تنفس‌های اکسیداتیو متیل جاسمونات پراکسیداسیون لیپید را به‌طور معنی‌داری کاهش داد که نشان‌دهنده‌ی کاهش خسارت اکسیداتیوی به‌وجب استفاده از متیل جاسمونات می‌باشد (Asadi *et al.*, 2016). با بررسی اثر متقابل تنفس شوری و اسید جاسمونیک گزارش شده‌است که در شرایط شوری گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات دارای محتوای Cl^- - Na^+ کمتری نسبت به گیاهان شاهد می‌باشند (Fedina and Dimova, 2000). در کل اسید جاسمونیک و متیل استر آن به صورت مولکول‌های علامتی سیستم‌های دفاعی گیاهان را در مقابل عوامل تنفس‌زای محیطی فعال می‌کند. در کاهش سرمادگی، پوسیدگی، مقاومت به شوری با حفظ حالت تورگر و همچنین در هنگام تنفس شوری، کم آبی و جراحت باعث افزایش میزان بیان ژن‌های مختلف گیاهان مانند آنزیم سنتز کننده پرولین می‌شود (Rajeshwari and Bhuvaneshwari, 2017)

تنفس شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد گیاهان بوده و با کاهش فعالیت‌ها و متابولیسم‌های گیاه موجب کاهش رشد و نمو گیاهان که منجر به میلیاردها دلار خسارت هر ساله به محصولات کشاورزی در سطح جهان می‌شود. توسعه ارقام مقاوم در برابر شوری رویکردی جذاب و مقرون به صرفه برای حل این مشکل است. برای شناخت و فهمیدن فرایندهای داخلی درون سلولی که در نتیجه تنفس ایجاد شده‌اند، نیاز به بررسی بیان ژن‌های موثر در تولید آنزیم‌ها و آنتی اکسیدان‌ها و فاکتورهای کاهش دهنده تنفس است. شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل به شوری و عوامل مؤثر بر بیان آن‌ها می‌تواند درک درستی از تعاملات بین مسیرها در پاسخ به تنفس شوری ایجاد کند و امکان شناسایی بهتر ساز و

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده به منظور انجام واکنش Real-Time PCR

Primers	توالی آغازگر (۵'-۳')	Tm (°C)
P5CS -F	5'- CGATGCAGTAAGTACCAAGGAAAGCTC - 3'	64.40
P5CS -R	5'- ATGAGACCATTCTGCCAACAGC - 3'	64.04
Catalase- F	5'- GCACCCGACAGGAAGATAGATT- 3'	61.97
Catalase- R	5'- CGAGTCACGTACATGGAGTTA- 3'	60.40
SOS -F	5'-CCTTACACTGCGCTTCTCGTTA-3'	61.84
SOS -R	5'- TTAGCTCCATATTCGAGAGATCCA -3'	60.61
BADH -F	5'- GGAGTTGGCATCTGTGACTTGTCTAG -3'	63.7
BADH -R	5'- CCATTTCAGCAGCTACGTCAAGGTC -3'	64.36
EF- α -F	5'-TCACTCTGGAGTGAAGCAGAT-3'	61.13
EF- α -R	5'-GACCTCCTTGACAATTCTTCATAA -3'	60.31

بررسی کیفیت قطعات ژنی پس از تکثیر، باندهای مورد انتظار بدون وجود اسمیر (Smear) برای ژن‌های P5CS، Catalase، SOS1، BADH، EF- α و SOS1 در ژل مشاهده گردید.

طراحی آغازگرهای برای کمیت سنجی با واکنش زنجیرهای پلیمراز: برای طراحی آغازگرهای ابتدا توالی رونوشت ژن‌های مورد نظر از بانک اطلاعاتی NCBI دریافت و آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی مستقیم و معکوس توسط نرم افزار Oligo 3.1 طراحی گردید. سعی شد در طراحی آغازگرهای طول قطعه تکثیری ۱۰۰-۲۰۰ جفت باز، درصد GC بالای ۵۰ و طول آغازگر حدود ۲۰ جفت لحاظ شود. پس از طراحی آغازگرهای، اختصاصیت تکثیر آنها برای ژن مورد نظر به کمک Primer Blast موجود در NCBI مورد بررسی و تایید قرار گرفت. برای استفاده از پرایمر این محلول رقیق سازی گردید و با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر وارد واکنش نهائی شد (جدول ۱).

آنالیز بیان ژن با روش Real Time PCR: واکنش زنجیرهای پلیمراز کمی با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I کمپانی ABI انجام شد. شرایط بهینه برای اجرای Real-Time PCR در حجم ۵ میکرولیتر واکنش Real-Time PCR، PCR Master Mix، آغازگر رفت و برگشت ۰/۲ میکرولیتر، نمونه cDNA ۱ میکرولیتر و آب عاری از نوکلئاز ۳/۶ میکرولیتر فراهم گردید. جهت انجام واکنش از چرخه حرارتی ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، چهل سیکل شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. جهت بررسی نمودار منحنی ذوب نیز، میزان جذب فلورسنس توسط آمپلیکن‌ها در دامنه

گیاه بابونه گاوی را به وسیله نیتروژن مایع درون هاون چینی دارای دمای پایین و استریل پودر نموده و به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری سرد انتقال داده شدند. استخراج RNA توسط کیت استخراج ترایزول مطابق دستورالعمل شرکت سیناژن انجام گرفت.

پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت آن با استفاده از دستگاه نانودرایپ و ژل آگارز یک درصد ارزیابی گردید. نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر و غلظت RNA هر نمونه تعیین گردید و باندهای ۱۸S و ۲۸S مرتبط با RNA ریبوزومی به عنوان شاخص کیفیت RNA استخراج شده مد نظر قرار گرفتند. واکنش PCR با رونویسی معکوس Real time دو مرحله‌ی شامل سترز cDNA در مرحله اول و انجام واکنش PCR کمی در مرحله دوم انجام شد. از آنجایی که وجود احتمالی آولدگی DNA ژنومی در نمونه‌های استخراج شده در انجام واکنش اختلال ایجاد می‌کند، یک میکروگرم از RNA هر یک از نمونه‌های آزمایشی با DNase تیمار گردید. سپس سترز cDNA با استفاده از کیت سترز cDNA شرکت Vivantis مالزی صورت گرفت. برای آنالیز صحت سترز cDNA، بر روی cDNA سترزی واکنش RT-PCR با دستگاه ترموسایکلر (ABI Veriti) انجام شد. در واکنش پلیمرازی از آغازگر رفت و برگشت ژن‌های P5CS، EF- α (Elongation Factor- α) و BADH، SOS1، Catalase استفاده شد. همچنین در این مرحله جهت بدست آوردن غلظت مناسب DNA الگو برای واکنش PCR، از رقت‌های مختلف DNA استفاده شد، پس از پایان واکنش، به منظور

BADH در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار شوری و کمترین میزان در غلظت ۵۰ میلی‌مولار شوری مشاهده شد. در واقع با افزایش غلظت شوری بیان ژن BADH نیز افزایش یافت.

پروتئین Overly Sensitive1 در تحمل به شوری در گیاهان تولید می‌شود. در مطالعه حاضر بیان ژن SOS1 نیز در غلظت‌های مختلف کلریدسدیم تفاوت معنی‌داری نشان داد. با افزایش غلظت شوری بیان ژن SOS1 افزایش یافت. بیشترین میزان بیان ژن SOS1 در ۱۰۰ میلی‌مولار از غلظت کلریدسدیم مشاهده گردید (B-۲) در حالی که تمام غلظت‌ها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن نشان دادند. همچنین تیمار شوری تاثیر معنی‌داری بر میزان بیان ژن کاتالاز بعنوان یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داشت. به طوری که با افزایش غلظت کلریدسدیم تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار میزان بیان ژن آنزیم کاتالاز در تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۲-C). در مورد ژن P5CS بیشترین میزان بیان ژن در شوری سطح ۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد. مطابق شکل (D-۲)، با افزایش غلظت شوری از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌مولار میزان بیان ژن کاهش معنی‌داری داشت ولی با افزایش غلظت شوری از ۱۰۰ به ۱۵۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری در بیان ژن P5CS بین این دو سطح مشاهده نگردید. در کل در تمام تیمارهای شوری افزایش معنی‌دار بیان ژن P5CS نسبت به شاهد مشاهده گردید.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن BADH در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات و زمان‌های مختلف اعمال تیمار (زمان صفر، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت) مشخص کرد که بیان ژن BADH با افزایش غلظت متیل جاسمونات و زمان نمونه‌گیری روند افزایشی نشان داد (شکل ۳-A)، در غلظت ۱۵۰ میکرومولار و در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت بیشینه بیان این ژن نسبت به غلظت‌های دیگر متیل جاسمونات مشاهده گردید. با توجه به شکل (B-۳) با افزایش غلظت متیل جاسمونات میزان بیان ژن SOS1 نیز افزایش یافت ولی با افزایش زمان نمونه‌گیری از ۳۶ ساعت بیشتر کاهش بیان ژن SOS1 قابل مشاهده است. بیان ژن SOS1 پس از ۳۶ ساعت

دمایی ۶۰ تا ۹۵ مورد بررسی قرار گرفت. میانگین چرخه‌های آستانه (Ct) برای هر ژن محاسبه گردید و براساس چرخه‌های آستانه بدست آمده از نمونه‌ها و قرار دادن آنها در فرمول ۱ نسبت میزان بیان ژن‌های هدف و مرجع با یکدیگر مقایسه شد.

فرمول ۱:

$$(\text{کنترل}) \text{ ژن مرجع } mC_t - (\text{کنترل}) \text{ ژن مورد نظر } t \Delta C_t = [mC_t - (\text{کنترل}) \text{ ژن مورد نظر } t]$$

فرمول ۲:

$$(\text{تست}) \text{ ژن مرجع } mC_t - (\text{تست}) \text{ ژن مورد نظر } t \Delta C_t = [mC_t - (\text{تست}) \text{ ژن مورد نظر } t]$$

فرمول ۳:

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t - (\text{کنترل})$$

در ادامه نسبت تغییرات بیانی بین دو نمونه تست و کنترل با استفاده از فرمول ۴ تعیین شد:

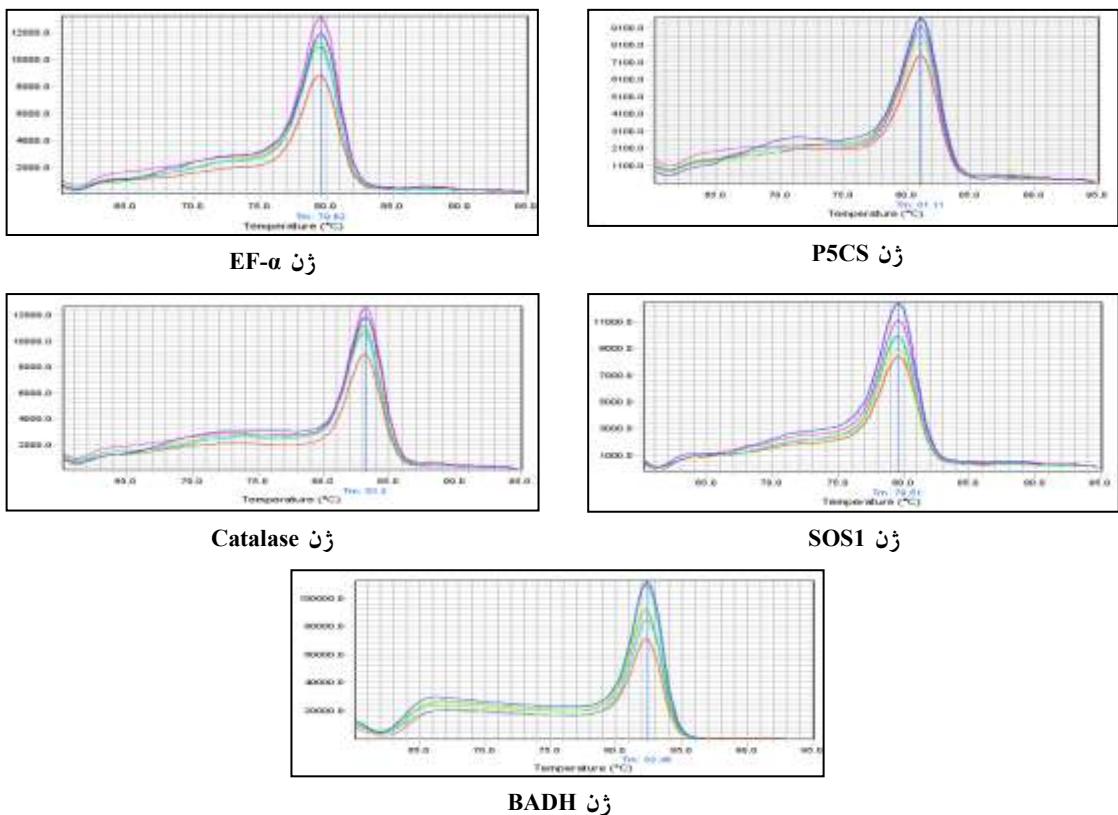
فرمول ۴:

$$2^{-\Delta \Delta C_t}$$

نتایج

Real-Time PCR: اولین مرحله جهت مطالعه تغییرات الگوی بیان ژن‌ها، استخراج RNA می‌باشد که بررسی کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد در نمونه های مورد مطالعه، کیفیت مناسب RNA های استخراج شده را نشان داد. آنالیز منحنی ذوب (Melting Curve Analysis) بیانگر تکثیر اختصاصی هر یک از ژن‌ها با نقطه ذوب مشخص بود که در آنالیز Real-Time PCR با ظهور پیک مشخص در دمای معین بالاتر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد تعیین می‌گردد. انتخاب ژن مرجع مناسب جهت نرمال کردن بیان ژن‌های هدف تحت شرایط مختلف تنش می‌باشد. منحنی ذوب محصولات PCR ژن‌های EF-α (به عنوان ژن مرجع)، P5CS، Catalase و BADH و SOS1 تکثیر اختصاصی ژن را نشان داد که نقطه ذوب آن‌ها با توجه به نمودار شکل ۱ به ترتیب در دماهای ۸۱/۱۱، ۷۹/۶۲، ۸۳/۲ و ۸۲/۴۵ و ۷۹/۵۱ درجه سانتی‌گراد برای این ژن‌ها مشاهده شد.

بررسی بیان ژن‌های SOS1، BADH و Catalase تحت تیمار شوری و متیل جاسمونات: طبق شکل (۲-A) بیشترین میزان بیان برای آنزیم ژن بتایین آلدئید دهیدروژنаз

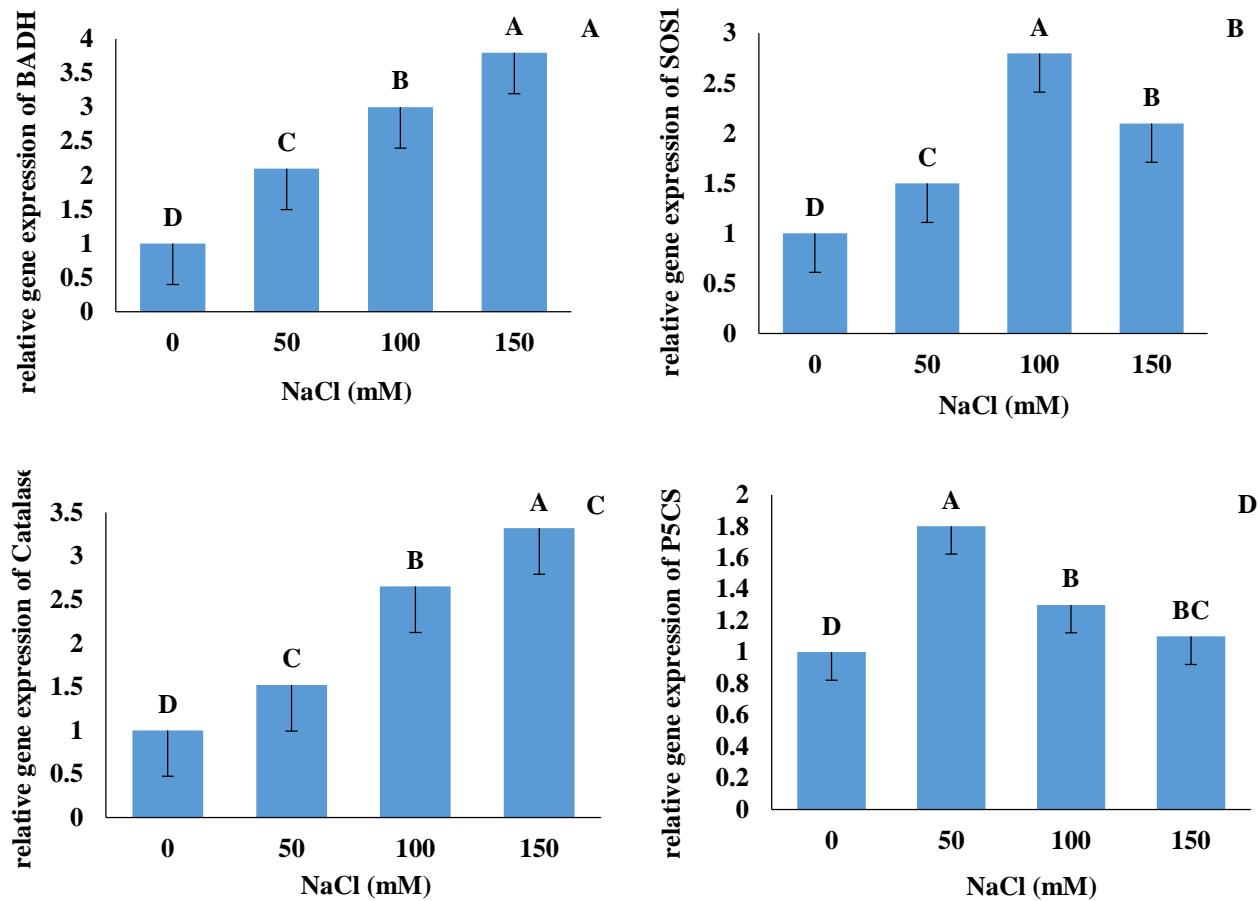


شکل ۱- منحنی ذوب ژن‌های EF- α ، P5CS، Catalase، SOS1 و BADH در آنالیز Real-Time PCR

معنی داری را نسبت به نمونه های شاهد نشان داد. در قسمت دیگر از تحقیق حاضر اثرات متقابل تنش شوری و متیل جاسمونات و زمان نمونه برداری بر میزان بیان ژن های EF- α ، P5CS، Catalase، SOS1 و BADH بررسی گردید. بدین منظور بیان ژن های مذکور در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۱۰۰ میلی مولار NaCl در زمان های صفر، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمارها بررسی گردید. با توجه به نمودارها و نتایج حاصله مشخص است که بیان ژن های مورد بررسی تحت تنش شوری در نتیجه هی استفاده از تیمار متیل جاسمونات افزایش یافت (شکل ۴). نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد به طور کلی بیشترین سطح بیان برای تمامی ژن های مورد ارزیابی در این پژوهش در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۱۰۰ میلی مولار NaCl در مدت زمان ۳۶ ساعت می باشد و کمترین سطح بیان برای تمامی ژن ها در تیمار شاهد مشاهده شد. بهترین زمان اعمال تیمارها که بیشترین سطح بیان ژن های مورد نظر مشاهده شد زمان ۳۶

در غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات بیشترین مقدار را نشان داد و کمترین میزان بیان این ژن در غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده گردید. بیان ژن کاتالاز نیز با افزایش غلظت متیل جاسمونات و زمان نمونه گیری روند افزایشی نشان داد. بیشینه مقدار بیان ژن کاتالاز در غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات پس از ۷۲ ساعت تیمار مشاهده گردید (شکل C-۳).

با بررسی تاثیر غلظت های متفاوت متیل جاسمونات (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) بر روی بیان ژن P5CS در زمان های مختلف صفر، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با متیل جاسمونات در گیاه بابونه، با توجه به شکل (۳-D) بیشترین بیان ژن P5CS در غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات و زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار مشاهده شد. در هر سه غلظت متیل جاسمونات به کار رفته در این آزمایش بیشینه بیان ژن P5CS در ۲۴ ساعت پس از تیمار مشاهده شد. ولی در تمام زمان ها و غلظت های متیل جاسمونات بیان ژن P5CS افزایش



شکل ۲- تأثیر غلظت های متفاوت شوری بر روی بیان ژن‌های P5CS(D) Catalase(C) SOS1(B) BADH(A) در گیاه بابونه گاوی(حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد)

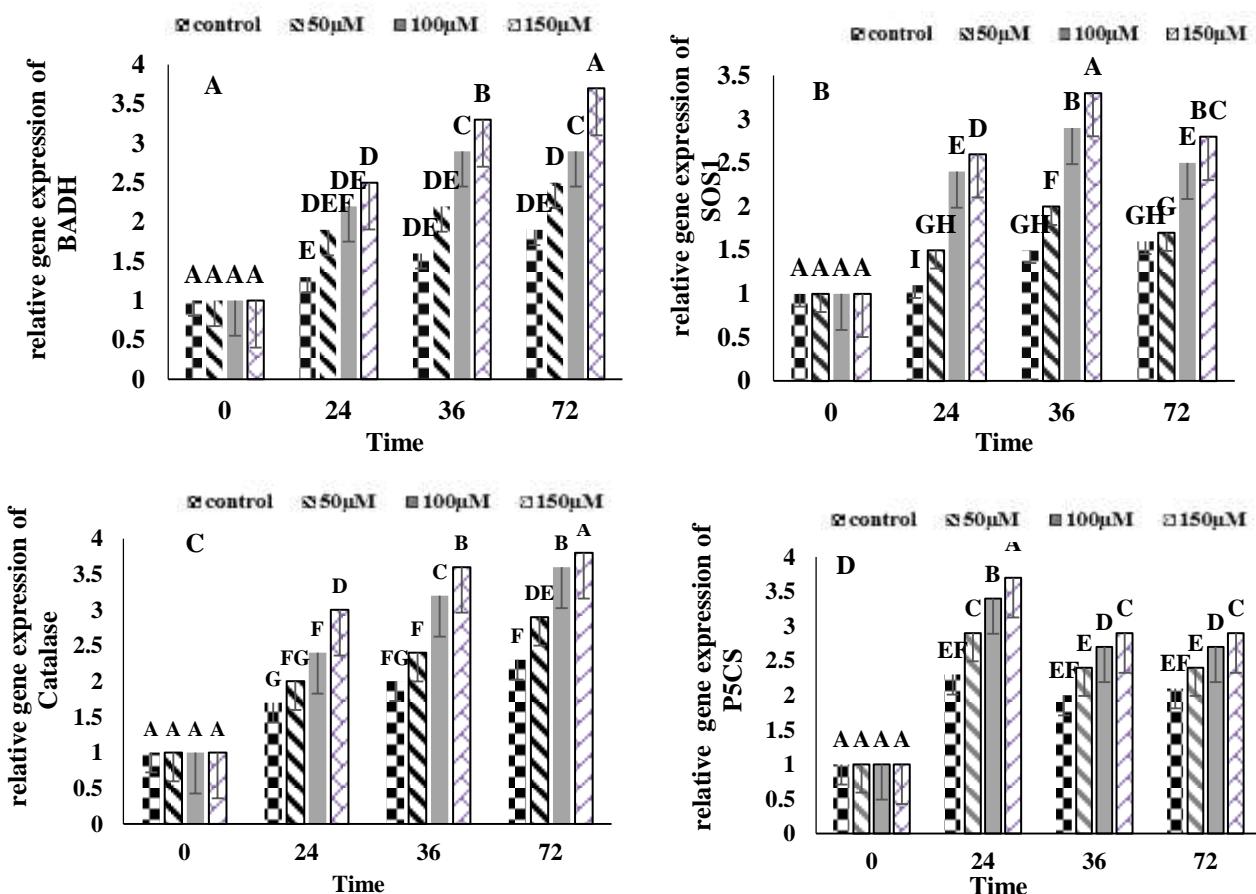
شده است (Tofighi *et al.*, 2016). در گیاهان تحت تنش بیان ژن آنزیم P5CS آمینواسید پرولین را از مسیر L گلوتامیک اسید با مصرف یک ATP و احیا شدن NADPH تولید می کند (Orcutt, 2000). گزارش شده که اسمولایت‌ها در سیتوسل موجب تعديل فشار اسمزی، جلوگیری از تجمع یون‌های سمی مانند سدیم و نیز پایداری بیشتر آنزیم‌ها در شرایط شوری می‌شوند (Yam chi *et al.*, 2005). نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نیز افزایش بیان ژن P5CS را تحت تنش شوری نشان می‌دهد. با افزایش بیان ژن P5CS میزان ستر پرولین بعنوان یک اسمولایت اولیه و مهم در شرایط تنش افزایش و از تولید گونه‌های ROS جلوگیری می‌کند. گلایسین بتائین از جمله محلول‌های سازگارکننده می‌باشد که توسط آنزیم BADH در مواجهه با تنش طی یک واکنش دو مرحله‌ای تولید

ساعت است. کمترین سطح بیان در تیمار شاهد ظاهر گردید.

بحث

امروزه، تکنیک RT-PCR با استفاده از رنگ‌های فلورسانس، به میزان زیادی فرایند مطالعه بیان ژن‌ها را تسهیل می‌کند (Schmittgen and Livak, 2008). در مطالعه‌ی ما، آنالیز منحنی ذوب تنها یک پیک با دمای ذوب مشخص را نشان داد که نتایج حاصله پس از طراحی صحیح آغازگرها و تکثیر اختصاصی ژن مورد نظر بود. در واقع هیچ نوع پیک اضافی که حاکی از تکثیر غیراختصاصی ژن مورد نظر و وجود پرایمر دایم باشد دیده نشد.

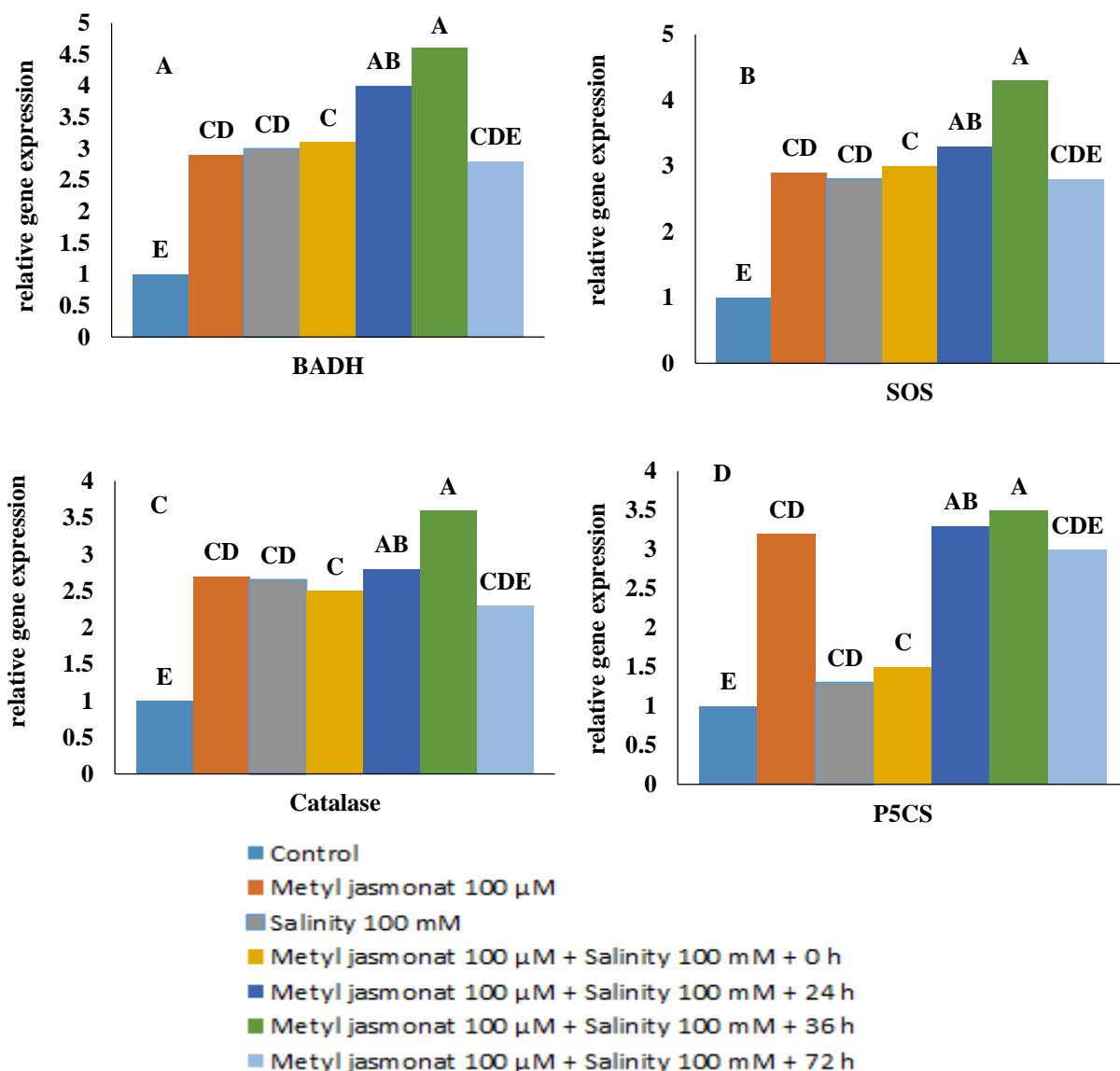
همبستگی بین ظرفیت آنتی اکسیدانی و پایداری اسموتیکی درون سلولی با تحمل به شوری در برخی گیاهان گزارش



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر روی بیان ژن (A) BADH(B)، SOS1(C) و P5CS(D) در زمان‌های مختلف در گیاه بابونه گاوی (حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد)

در زمان مواجه گیاه بابونه با تنش شوری، بیان ژن کد کننده آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژنаз افزایش یافت. در حالی که اعمال تیمار متیل جاسمونات به گیاهان بابونه تحت تنش شوری باعث افزایش بیشتر سطح بیان این ژن گردید. آنزیم کاتالاز جاروب و تنظیم‌کننده سطح پراکسید هیدروژن (H_2O_2) سلول‌های می‌باشد. پراکسیزوم‌ها مکان‌های اصلی تولید H_2O_2 سلول‌های گیاهی در پاسخ به تنش شوری هستند. گزارش شده است که تنش‌های محیطی سبب افزایش یا کاهش فعالیت CAT بسته به شدت، مدت و نوع تنش می‌شود (Sharma *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای گزارش شده تنش شوری سبب افزایش فعالیت کاتالاز در رقم‌های مقاوم گندم می‌شود (Siram *et al.*, 2003) که با نتایج این تحقیق مبنی بر افزایش سطح نسخه‌برداری و فعالیت کاتالاز در گیاهان بابونه تحت تنش شوری مطابقت دارد.

می‌شود (Chen *et al.*, 2008). با انتقال ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز به کلروپلاست سلول‌های گیاهی هویج گزارش شد که گیاهان تولیدی به این روش قادر به تحمل غلظت‌هایی از نمک شدند که تنها در هالوفیت‌ها گزارش شده بود (Daniel *et al.*, 2001). مطالعه اثر شوری بر روی گیاه هالوفیت سیاه شور (*Suaeda salsa*) افزایش بیان در ژن BADH پس از ۱۵ روز در غلظت ۱۷۰ میلی‌مولار شوری نشان داد (Wu *et al.*, 2012). کاربرد متیل جاسمونات در غلظت ۵۰ میکرومولار سبب افزایش فعالیت آنزیم BADH در قلمه‌های آلو تحت تنش خشکی گردید (Gao *et al.*, 2004). افزایش مقدار اسمولیت سازگار گلیسین بتائین و تغییرات آن در افزایش تحمل گندم به تنش شوری گزارش شده است (Tofiqhi *et al.*, 2016). با توجه به مشاهدات ما در این مطالعه



شکل ۴ - بررسی بیان ژن‌های (A) SOS1(B)، BADH (C)، SOS (D) و Catalase (E) تحت تیمار غلاظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۱۰۰ میکرومولار NaCl در زمان‌های صفر، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت در گیاه بابونه گاوی. (حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد).

توسط SOS3 و SOS2 کنترل می شود. تجزیه و تحلیل ژنتیکی تأیید کرد که عملکرد SOS1-SOS3 در یک مسیر مشترک تحمل به شوری است. SOS3 یک حسگر Ca^{2+} ، علامت تنش شوری را در پایین دست دریافت، پروتئین SOS2 را فعال و به سمت غشای سلولی هدایت کرده تا در نهایت این مجموعه SOS3-SOS2 فعال کننده آنتی پورت Na^+/H^+ از SOS1 شده و از این طریق هموستازی یونی سلول را منجر می شود (Mahajan *et al.*, 2008). مطالعات نشان داد که بیان ژن SOS1 موجب افزایش بیان آنتی پورت Na^+/H^+ شده و

تیمار متیل جاسمونات سبب افزایش بیشتر در بیان ژن کاتالاز در تحقیق حاضر شد.

ژن آنتی پورترسدیم/پروتون SOS1 ۱۲۷ کیلو دالتونی که حسگر یون‌ها در غشای پلاسمما است نقش مهمی در جوانه زدن و رشد گیاهان در محیط شور دارد (Shi *et al.*, 2000) در تنش‌های شوری و حضور کلریدسدیم این پروتئین در خروج یون‌های سدیم از سلول و ایجاد مقاومت به شوری در گیاهان نقش دارد (Blumwald, 2000). بیان ژن SOS1 در گیاهان در پاسخ به تنش NaCl تنظیم شده است که این تنظیم

دستگاه آنتی اکسیدانی مؤثر برای حفظ عملکردهای متابولیسم در شرایط القا ضروریست تا از آسیب بیشتر جلوگیری شود (Farooq *et al.*, 2016). دستگاه آنتی اکسیدان آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز حفاظت علیه تأثیرات سمی ROS را بر عهده دارد. گزارش‌های متعددی مبنی بر اثرهای مثبت متیل جاسمونات بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیابی گیاهان مختلف وجود دارد. اسید جاسمونیک بیرونی تحمل نهال گندم به تنش شوری را با کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید ارادیکال‌های سوپراکسید و H_2O_2 ، افزایش سطح رونوشت‌ها و فعالیت‌های سویر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و محتویات گلوتاتیون، کلروفیل افزایش داده است (Qiu *et al.*, 2014). گزارش شده است که در میوه تمشک و توت‌های تیمار شده با متیل جاسمونات قدرت و فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته است (Ghasemnezhad and Javaherdashti, 2008).

بررسی نهال‌های برنج تحت تنش شوری مشخص شد که غلظت اسید جاسمونیک در گیاهان رقم حساس به شوری نسبت به گیاهان مقاوم به شوری کمتر است و پس از تیمار اسید جاسمونیک خارجی نهال‌های برنج به شرایط شوری مقاوم‌تر می‌شوند، علاوه بر این، غلظت سدیم به طور چشمگیری توسط اسید جاسمونیک کاهش می‌یابد (kang *et al.*, 2005). در بررسی حاضر حضور متیل جاسمونات سبب افزایش بیان ژن‌های دخیل در تولید آنتی اکسیدان‌ها و عوامل مقابله‌کننده با شوری گردید که در نهایت این فاکتورها می‌توانند سبب کاهش اثرات تخریبی تنش شوری در گیاه شوند. این نتایج به وضوح نشان داد که استفاده از اسید جاسمونیک خارجی در گیاهان نقش مهمی در فعل نمودن فرآیند دفاع سلولی در طول تنش دارد و یک کاربرد عملی برای بهبود تحمل به تنش در گیاهان می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد متیل جاسمونات به عنوان یک تنظیم کننده با افزایش بیان ژن‌های

دفع یون سدیم از غشاء سلولی و هدایت و انتقال یون سدیم به واکوئل را بواسطه آنتی پورترهای موجود در غشاها پلاسمایی و واکوئلی سبب می‌شود (Jamil *et al.*, 2011). در بین سه دسته SOS1، SOS2، SOS3 بزرگترین نقش در تحمل گیاه به شوری ناشی از کلرید سدیم دارد. در مقایسه با گیاهان جهش یافته SOS2 و SOS3، گیاهان جهش یافته SOS1 حتی نسبت به Na^+ و Li^+ حساسیت بیشتری دارند (Zhu 2003). در پژوهشی بیان ژن آنتی پورتر سدیم/پروتون SOS1 در گیاه *Aeluropus littoralis* تحت تنش شوری بررسی گردید و مشاهده شد سطوح نسخه برداری ژن SOS1 در پاسخ به تنش کلرید سدیم در همه بافت‌ها افزایش یافت (Zhu 2003). گزارش شده که مسیر SOS1 نقش مرکزی در هماهنگ کردن فعالیت‌های چندین سیستم انتقالی دارد. گیاهان در هنگام مواجه با تنش شوری غلظت‌های بالای یون پتاسیم و غلظت‌های پایین یون سدیم در سیتوزول را با تنظیم بیان و فعالیت ترانسپورترهای پتاسیم و سدیم و پمپ‌های یون پروتون حفظ می‌نمایند. در تحقیق حاضر نیز بیان ژن SOS1 در گیاهان بابونه در تمام سطوح شوری افزایش معنی داری نسبت به شاهد نشان داد که نشان دهنده نقش این ژن در افزایش مقاومت به تنش شوری می‌باشد. استعمال خارجی متیل جاسمونات باعث بهبود ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان در هنگام تنش می‌شود (Dar *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017).

براساس نتایج مطالعه این تحقیق، بیان ژن‌های مورد نظر در زمان اعمال تیمار متیل جاسمونات به میزان زیادی نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت که این خود نشان دهنده تاثیر گزاری مثبت متیل جاسمونات بر بیان این ژن‌ها است.

بیوسنتر متیل جاسمونات در برگ‌ها رخ می‌دهد و شواهدی از مسیر مشابه در ریشه وجود دارد. در ضمن، اندامک‌های سلولی مانند کلروپلاست‌ها و پراکسیزوم‌ها به عنوان محل اولیه بیوسنتر اسید جاسمونیک شناخته می‌شوند (Cheong and Do Choi, 2003). به دلیل اینکه متیل جاسمونات تولید ROS را در گیاهان القا می‌کند، بنابراین یک

شناخت بیشتر ساز و کارهای مقاومت گیاهان به تنفس‌ها و در نتیجه مقاومت، کشت و رشد بهتر گیاهان تحت تنفس‌های محیطی حائز اهمیت باشد.

پرولین سنتاز، کاتالاز، بتائین آلدہید دھیدروژناز و SOS1 در گیاهان با بونه گاوی تحت تنفس شوری می‌تواند سبب افزایش تحمل گیاهان به تنفس شود که این دستیابی می‌تواند برای

منابع

- Asadi, K. E., Asrar, Z. and Keramat, B. (2015) Impact of methyl jasmonate on reducing of oxidative stress in *Garden cress* (*Lepidium sativum* L.) under copper stress. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 28 (4): 684-694.
- Besharati-Seidani, A., Jabbari, A., Yamini, Y. and Saharkhiz, M. J. (2006) Rapid extraction and analysis of volatile organic compounds of Iranian feverfew (*Tanacetum parthenium*) using headspace solvent microextraction (HSME), and gas chromatography/mass spectrometry. Flavour and Fragrance Journal 21(3): 502-509.
- Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. Current Opinion in Cell Biology 12: 431-434.
- Chen, T. H. and Murata, N. (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. Trends in Plant Science 13(9): 499-505.
- Cheong, J. and Do Choi, Y. (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. Trends in Genetics 7: 409-413.
- Chinnusamy, V. and Zhu, J. K. (2006) Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. In Genetic Engineering 141-177.
- Dar, T.A., Uddin, M., Khan, M. M. A., Hakeem, K. R. and Jaleel, H. (2015) Jasmonates counter plant stress: a review. Environmental and Experimental Botany 115: 49-57.
- Divya, P., Puthusseri, B. and Neelwarne, B. (2014) The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compounds in foliage of coriander. LWT-Food Science and Technology 56(1): 101-110.
- Daniell, H., Muthukumar, B.M. and Lee, S. B. (2001) Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. Current Genetics 2: 109-116.
- Farooq, M. A., Gill, R. A., Islam, F., Ali, B., Liu, H., Xu, J. and Zhou, W. (2016) Methyl jasmonate regulates antioxidant defense and suppresses arsenic uptake in *brassica napus* L. Frontiers in Plant Science 7: 1-16
- Fedina, S. I. and Dimova, L. M. (2000) Methyl jasmonate-induced polypeptides in *Pisum sativum* roots soluble proteins. Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences 10: 10-59.
- Fitzgerald, T. L., Waters, D. L. and Henry, R.J. (2009) Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. Plant Biology 11(2): 119-130.
- Ghasemnezhad, M. and Javaherdashti, M. (2008) Effect of methyl jasmonate treatment on antioxidant capacity, internal quality and postharvest life of raspberry fruit. Caspian Journal of Environmental Sciences 6(1): 73-78.
- Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2011) Gene expression profiling of plants under salt stress. Critical Reviews in Plant Sciences 30: 435-458.
- Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A. and Li, X. (2013) The salt overly sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. Molecular Plant 6(2): 275-286.
- Kang, D. J., Seo, Y. J., Lee, J. D., Ishii, R., Kim, K. U. and Shin, D. H. (2005) Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. Journal of Agronomy and Crop Science 191: 273-282.
- Kemper, K.J. (2007) Available at: <http://www.longwoodherbal.org/feverfew/feverfew.pdf>. Accessed 2 November 2007.
- Kim, J. Y., Mahé, A., Brangeon, J. and Prioul, J. L. (2000) A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. Plant Physiology 124: 71-84.
- Koganov, M. (2009) U.S. Patent No. 7,537,791. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Mahajan, S., Pandey, G. K. and Tuteja, N. (2008) Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. Archives of Biochemistry and Biophysics 471: 146-158.
- Orcutt, D M. and Nilsen, E. T. (2000) The physiology of plants under stress: soil and biotic factors (Vol. 2).
- Pareek, A., Suthar, M., Rathore, G. S. and Bansal, V. (2011) Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. Pharmacognosy Reviews 5(9): 103.
- Qiu, Z., Guo, J., Zhu, A., Zhang, L. and Zhang, M. (2014) Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. Ecotoxicology and Environmental Safety 104: 202-208.
- Rajeshwari, V. and Bhuvaneshwari, V. (2017) Salicylic acid induced salt stress tolerance in plants. International Journal of Plant Biology and Research 5(3): 1067.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols 3: 1101.

- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. and Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 217037.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J. K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 6896-6901.
- Tofighi, K., Khavari Nejad, R., Najafi, F., Razavi, K. and Rejali, F. (2016) Interaction effect investigation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth regulator brassinolide on enhancing wheat tolerance to salinity tension. *Crop Physiology Journal* 8: 5-19.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H. K. and Van Breusegem, F. (2004) High light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39(1): 45-58.
- Wu, H., Liu, X., You, L., Zhang, L., Zhou, D., Feng, J. and Yu, J. (2012) Effects of salinity on metabolic profiles, gene expressions, and antioxidant enzymes in halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Plant Growth Regulation* 31(3): 332-341.
- Yamchi, A., Jazii, F. R., Mousavi, A. and Karkhane, A. A. (2007) Proline accumulation in transgenic tobacco as a result of expression of *Arabidopsis* $\Delta 1$ -Pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during osmotic stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 16(1): 9-15.
- Zhang, H., Zhang, Q., Zhai, H., Li, Y., Wang, X., Liu, Q. and He, S. (2017) Transcript profile analysis reveals important roles of jasmonic acid signalling pathway in the response of sweet potato to salt stress. *Scientific Reports* 7:40819.
- Zhu, J. K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 441-445.