

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

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

^۱گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران- ایران
^{۲*}گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران- ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۱/۰۴)

چکیده

بابونه (*Tanacetum parthenium*) یکی از پرارزشترین گیاهان دارویی است که گل‌های خشک شده آن به دلیل وجود تعداد زیادی از ترپنوییدها و فلاونوییدها 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. نمونه برداری 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 بتاین آلدهید دهیدروژناز (BADH)، SOS1 (Salt Overly Sensitive)، 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 BADH، SOS1، Catalase و P5CS به ترتیب در غلظت‌های ۱۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۵۰ میلی مولار شوری بود و در غلظت‌های متفاوت متیل جاسمونات و زمان‌های مختلف 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 نمونه برداری 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 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 چندساله، 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 پراکسی زوم و گلی اکسیزوم تولید می شود، به همراه آنزیم آسکوربات پراکسیداز عمل کاتالیز پراکسید هیدروژن سمی را به آب و مولکول اکسیژن انجام می دهد (Vandenabeele *et al.*, 2004). آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش مهمی در فعالیت روزنه ها از طریق تنظیم غلظت پراکسید هیدروژن در سلول گیاهان تحت تنش شوری دارند، چرا که غلظت این ترکیب بعنوان یک علامت مهم در به حرکت در آوردن سلول محافظ روزنه عمل می کند (Misra *et al.*, 2015). مسیر تنظیمی SOS (Salt Overly Sensitive) نقش مهمی در تنظیم هم ایستایی یونی (Ionic homeostasis) و حفظ شرایط پایدار و ثابت یون ها در محیط داخلی دارد و از سه جزء اصلی تشکیل شده است. SOS1 آنتی پورتر Na^+/H^+ را کد می کند که نقش مهمی در خروج یون های سدیم از سلول دارد. SOS2 پروتئین کیناز سرین/ترئونین را کد می کند و SOS3 به عنوان حسگر Ca^{2+} عمل می کند (Ji *et al.*, 2013). از جمله راه هایی که گیاهان در مواجهه با تنش های زیستی از جمله تنش شوری انجام می دهند سنتز و تجمع ترکیباتی است که حفاظت کننده های اسمزی نامیده می شود. گلیسین بتاین در پاسخ به تنش در گیاهان تجمع پیدا می کند که سنتز این اسمولیت سازگار را آنزیم بتاین آلدهید دهیدروژناز طی واکنش دو مرحله ای کاتالیز می کند (Fitzgraral *et al.*, 2009). پرولین دارای نقش های حفاظتی مهمی در گیاه است مانند حفظ متابولیسم و سنتز، محافظ آنزیم های سلولی و ساختار پروتئین ها که به عنوان آنتی اکسیدان عمل می کند و معمولاً تحت تنش ها مخصوصاً شوری افزایش بیان دارد (Chinnusamy *et al.*; 2006).

اسید جاسمونیک و متیل استر آن (متیل جاسمونات) یکی از هورمون های درونزای گیاهی است که به عنوان محرک طبیعی تولید و تجمع متابولیت های ثانویه از طریق القاء تنش کاذب و به عنوان یک علامت درونی در پاسخ به تنش های زنده و غیر زنده عمل می کند (Divya *et al.*, 2014). براساس مطالعات انجام شده، متیل جاسمونات در گونه های گیاهی موجب بروز مجموعه ای از واکنش های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند انباشت متابولیت های مفید ثانویه و تجمع

معمولاً با نام feverfew یا گیاه تب بر شناخته می شود. این گیاه بومی کوه های بالکان اروپا است و دامنه پراکنش وسیعی در اروپا، آسیا و آمریکا دارد (Besharati-Seidani *et al.*, 2006; Koganov, 2009). این گیاه حاوی لاکتون های سزکویی ترپن، فلاونوئیدهای گلیکوزید، پینن ها و سایر ترکیبات است که به نظر می رسد پارتنولید مهم ترین عامل فعال زیستی در بابونه گاوی است که به عنوان یک درمان گیاهی مؤثر برای آرتروز، درد و میگرن عمل می کند (Ernst & Pittler, 2000; Pittler & Ernst, 2004; Kemper 2007; Pareek *et al.*, 2011).

شوری و تجمع املاح در سطح خاک و به دنبال آن خشکی فیزیولوژیکی، یکی از مهم ترین تنش های غیر زیستی می باشد که سبب بروز مشکلات کشاورزی و کاهش شدید رشد و تولیدات گیاهی در مناطق خشک و نیمه خشک می گردد. تنش شوری موجب اختلال در فعالیت ناقل ها و کانال های یونی در ریشه، کاهش جذب آب و مواد معدنی می شود. تنش شوری از طریق ایجاد تنش ثانویه ای به نام تنش اکسیداتیو، موجب تشکیل گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) در سلول های گیاهی می شود. ROS برای ارگانسیم ها بسیار سمی است و می تواند سبب تخریب کلروفیل، پروتئین ها، آمینواسیدها، آنزیم ها، اسیدهای نوکلئیک و تحریک پراکسیداسیون لیپیدهای غشا گردد (Davey *et al.*, 2005). گیاهان جهت غلبه بر تنش اکسیداتیو و از بین بردن انواع اکسیژن فعال دارای ساز و کارهای دفاعی آنتی اکسیدانت آنزیمی و غیر آنزیمی می باشند. در گیاهان تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی زیادی از جمله تغییر در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان از قبیل: آنزیم های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR)، بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH)، مونودیهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR) و دیهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) در مقاومت به تنش های غیر زیستی رخ می دهد (Kohler *et al.*, 2009; Gill & Tuteja, 2010). از آنزیم های آنتی اکسیداتیو کلیدی آنزیم کاتالاز است که خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را کاهش می دهد. آنزیم

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

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی: در این بررسی از نشاء بابونه تهیه شده از شرکت کبیر زرین استفاده گردید. نشاءها به گلدان‌های پلاستیکی با بستر کشت استاندارد شامل: ۱۵٪ ماسه، ۳۰٪ کوکوپیت، ۳۰٪ پرلیت و ۱۵٪ خاک مزرعه منتقل و تا زمان اعمال تنش 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 و ۱۵۰ میکرو مولار) و نمونه‌برداری در چهار زمان (۰، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت) بر روی نشاهای بابونه 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 میلی‌گرم 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 آمونیلایز (PAL) سبب فعال‌سازی مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شود (Dar et al., 2015). در پژوهشی مشخص شد که طی تنش‌های اکسیداتیو متیل جاسمونات پراکسیداسیون لیپید را به‌طور معنی‌داری کاهش داد که نشان‌دهنده‌ی کاهش خسارت اکسیداتیو به‌موجب استفاده از متیل جاسمونات می‌باشد (Asadi et al., 2016). با بررسی اثر متقابل تنش شوری و اسید جاسمونیک گزارش شده‌است که در شرایط شوری گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات دارای محتوای Na^+ ، Cl^- 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 تنش‌زای محیطی فعال می‌کند. در کاهش سرمازدگی، پوسیدگی، مقاومت به شوری با حفظ حالت تورگر و هم‌چنین در هنگام تنش شوری، کم‌آبی و جراحی باعث افزایش میزان بیان ژن‌های مختلف گیاهان مانند آنزیم سنتز کننده پرولین می‌شود (Rajeshwari and Bhuvaneshwari, 2017).

تنش 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 تنش ایجاد شده‌اند، نیاز به بررسی بیان ژن‌های موثر در تولید آنزیم‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و فاکتورهای کاهش دهنده تنش است. شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل به شوری و عوامل مؤثر بر بیان آن‌ها می‌تواند درک درستی از تعاملات بین مسیرها در پاسخ به تنش شوری ایجاد کند و امکان شناسایی بهتر ساز و

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

Primers	توالی آغازگر (3'-5')	Tm (°C)
P5CS -F	5'- CGATGCAGTAAGTACCAGGAAAGCTC - 3'	64.40
P5CS -R	5'- ATGAGACCATTCTGCCCAACAGC - 3'	64.04
Catalase- F	5'- GCACCCGACAGGCAAGATAGATT- 3'	61.97
Catalase- R	5'- CGAGTCACGTACATGGAGTTTA- 3'	60.40
SOS -F	5'-CCTTACACTGTCGCTCTTCTCGTTA-3'	61.84
SOS -R	5'- TTAGCTCCATATTCGAGAGATCCA -3'	60.61
BADH -F	5'- GGAGTTGGCATCTGTGACTTGTCTAG -3'	63.7
BADH -R	5'- CCATTCAGCAGCTACGTCAAGGTC -3'	64.36
EF- α -F	5'-TCACTCTTGGAGTGAAGCAGAT-3'	61.13
EF- α -R	5'-GACCTCCTTGACAATTTCTTCATAA -3'	60.31

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

طراحی آغازگرها برای کمیت سنجی با واکنش زنجیرهای

پلیمراس: برای طراحی آغازگرها 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 آغازگرها طول قطعه تکثیری ۲۰۰-۱۰۰ جفت باز، درصد GC بالای ۵۰ و طول آغازگر حدود ۲۰ جفت لحاظ شود. پس از طراحی آغازگرها، 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 پلی‌مراس کمی با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I کمپانی ABI انجام شد. شرایط بهینه برای اجرای واکنش Real-Time PCR در حجم ۵ میکرولیتر Real-Time 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 تریزول مطابق دستورالعمل شرکت سیناژن انجام گرفت.

پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ 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 مرحله‌ای شامل سنتز cDNA در مرحله اول و انجام واکنش PCR کمی در مرحله دوم انجام شد. از آنجایی که وجود احتمالی آلودگی DNA ژنومی در نمونه‌های RNA استخراج شده در انجام واکنش اختلال ایجاد می‌کند، یک میکروگرم از RNA هر یک از نمونه‌های آزمایشی با DNase تیمار گردید. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Vivantis مالزی صورت گرفت. برای آنالیز صحت سنتز cDNA، بر روی cDNA سنتزی واکنش RT-PCR با دستگاه ترموسایکلر (ABI Veriti) انجام شد. در واکنش پلی‌مراسی 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 Salt Overly Sensitive1 در تحمل به شوری در گیاهان تولید می‌شود. در مطالعه حاضر بیان ژن SOS1 نیز در غلظت‌های مختلف کلریسدیم تفاوت معنی‌داری نشان داد. با افزایش غلظت شوری بیان ژن SOS1 افزایش یافت. بیشترین میزان بیان ژن SOS1 در ۱۰۰ میلی‌مولار از غلظت کلریسدیم مشاهده گردید (B-۲) در حالی‌که 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 کلریسدیم تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار میزان بیان ژن آنزیم کاتالاز در تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل C-۲). 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 معنی‌داری در 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 A-۳)، 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:

$$\left[\text{Ct (کنترل)} - \text{Ct (کنترل)} \right] - \text{Ct (کنترل)} = \Delta C_t \text{ کنترل}$$

فرمول ۲:

$$\left[\text{Ct (تست)} - \text{Ct (تست)} \right] - \text{Ct (تست)} = \Delta C_t \text{ تست}$$

فرمول ۳:

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

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

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

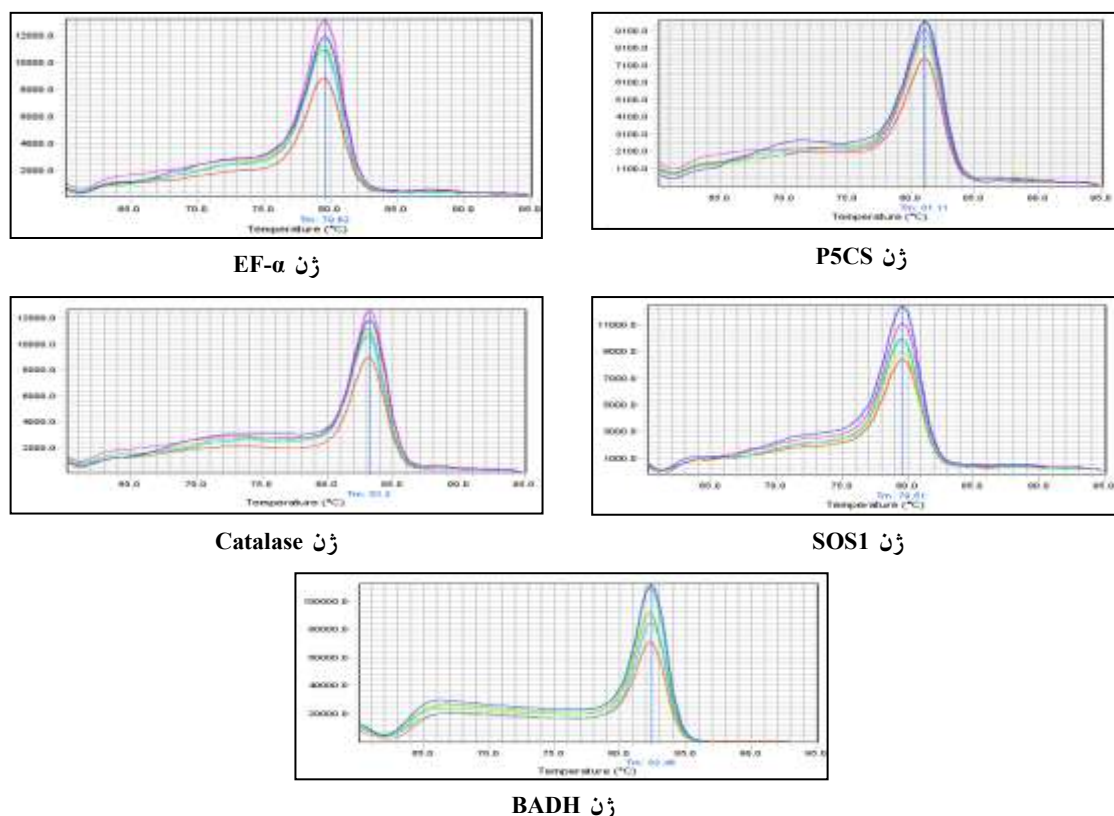
فرمول ۴:

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, SOS1 و BADH 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، ۷۹/۵۱ و ۸۲/۴۵ درجه سانتیگراد برای این ژن‌ها مشاهده شد.

بررسی بیان ژن‌های BADH, SOS1, Catalase و P5CS

تحت تیمار شوری و متیل جاسمونات: طبق شکل (A-۲) بیشترین میزان بیان برای آنزیم ژن بتاین آلدئید دهیدروژناز

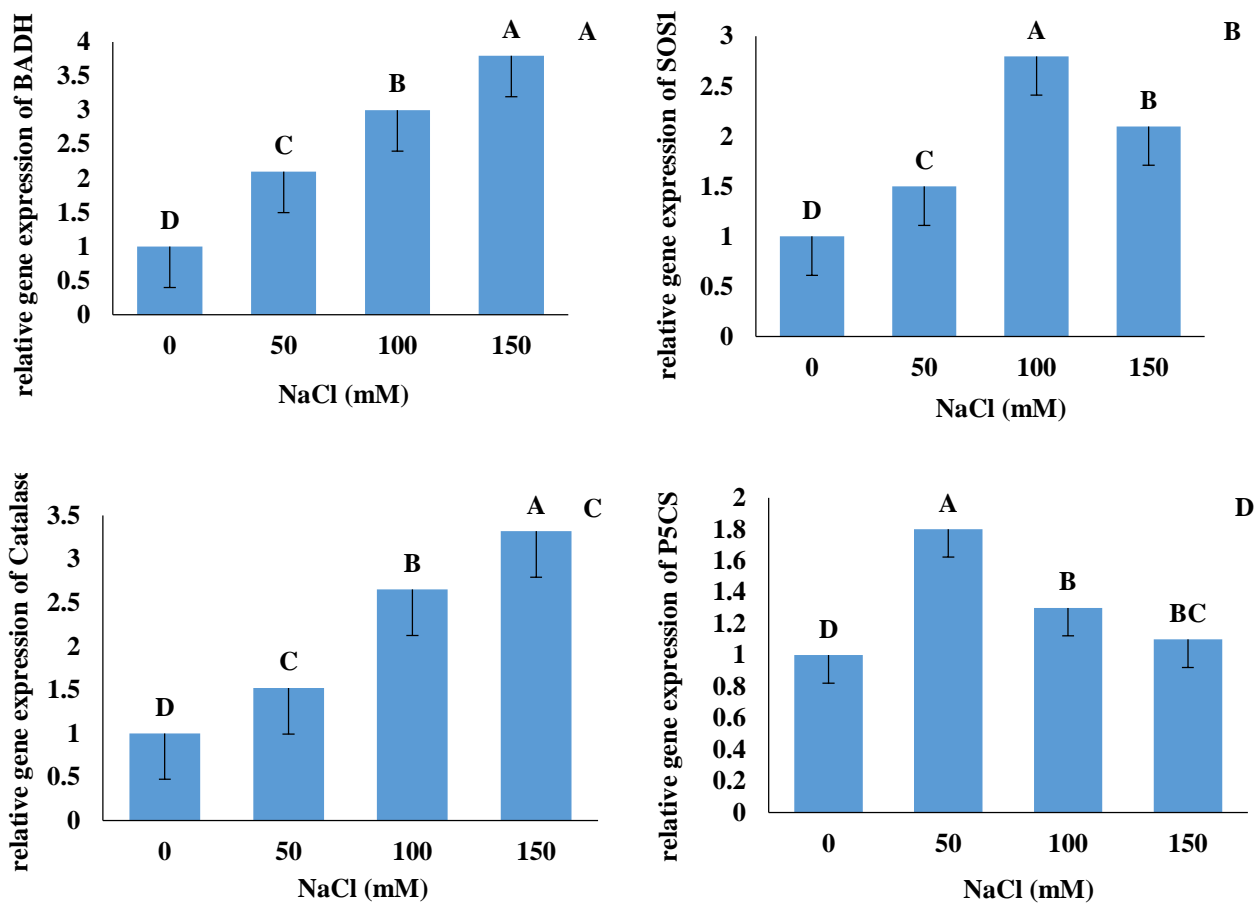


شکل ۱- منحنی ذوب ژن‌های P5CS, Catalase, SOS1, BADH, و EF-α در آنالیز Real-Time PCR

معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد. در قسمت دیگر از تحقیق حاضر اثرات متقابل تنش شوری و متیل جاسمونات و زمان نمونه برداری بر میزان بیان ژن‌های BADH, SOS1, Catalase, و P5CS بررسی گردید. بدین منظور بیان ژن‌های مذکور در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۱۰۰ میلی مولار NaCl در زمان‌های صفر، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمارها بررسی گردید. با توجه به نمودارها و نتایج حاصله مشخص است که بیان ژن‌های مورد بررسی تحت تنش شوری در نتیجه‌ی استفاده از تیمار متیل جاسمونات افزایش یافت (شکل ۴). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد به طور کلی بیشترین سطح بیان برای تمامی ژن‌های مورد ارزیابی در این پژوهش در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۱۰۰ میلی مولار NaCl در مدت زمان ۳۶ ساعت می‌باشد و کمترین سطح بیان برای تمامی ژن‌ها در تیمار شاهد مشاهده شد. بهترین زمان اعمال تیمارها که بیشترین سطح بیان ژن‌های 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 نمونه‌گیری روند افزایشی نشان داد. بیشینه مقدار بیان ژن کاتالاز در غلظت ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات پس از ۷۲ ساعت تیمار مشاهده گردید (شکل ۳-۳).

با بررسی تاثیر غلظت‌های متفاوت متیل جاسمونات (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) بر روی بیان ژن P5CS در زمان‌های مختلف صفر، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با متیل جاسمونات در گیاه بابونه، با توجه به شکل (۳-۴) 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 بیشینه‌ی بیان ژن P5CS در ۲۴ ساعت پس از تیمار مشاهده شد. ولی در تمام زمان‌ها و غلظت‌های متیل جاسمونات بیان ژن P5CS افزایش



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

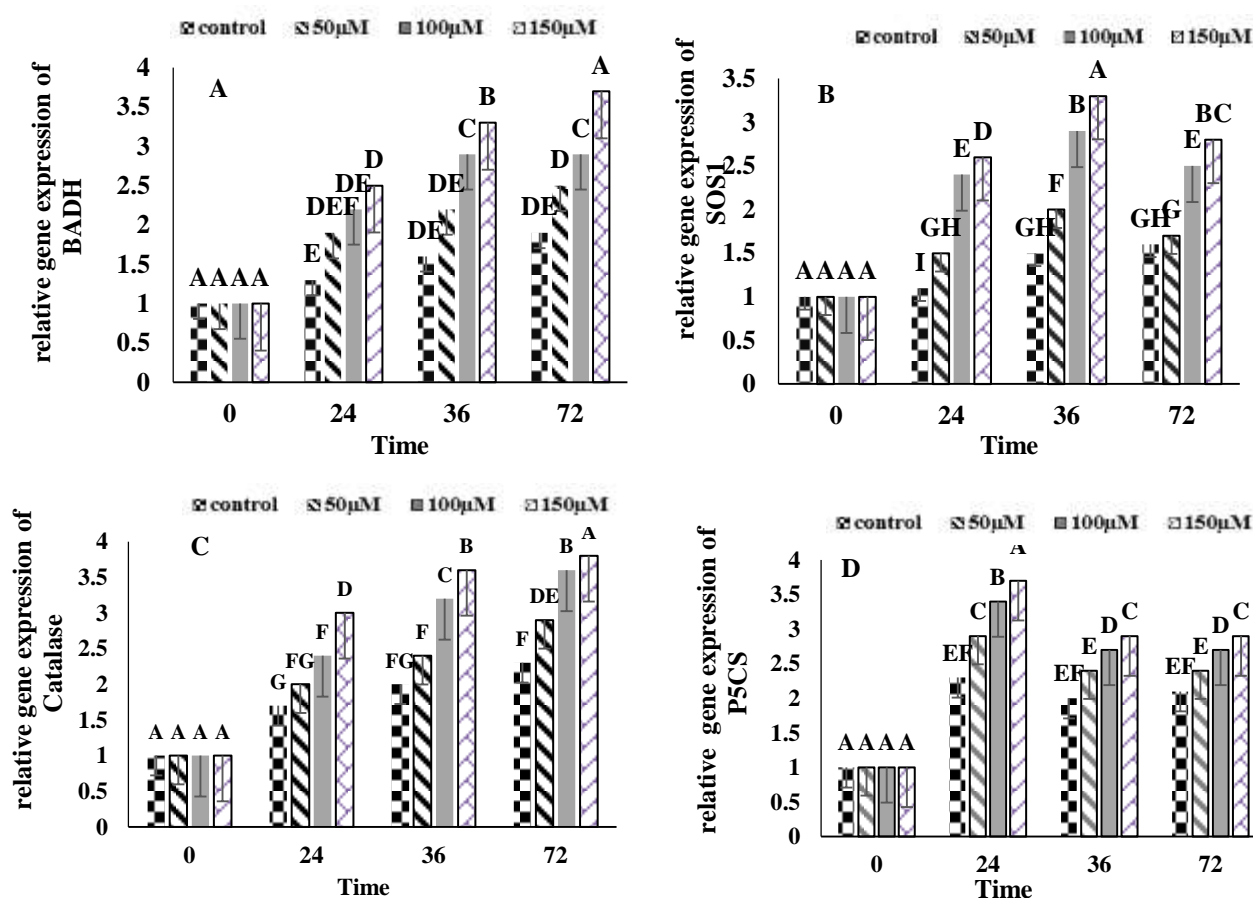
شده است (Tofighi *et al.*, 2016). در گیاهان تحت تنش بیان ژن آنزیم P5CS آمینواسید پرولین را از مسیر L گلوتامیک اسید با مصرف یک ATP و احیا شدن NADPH تولید می کند (Orcutt, 2000). گزارش شده که اسمولایت ها در سیتوسل موجب تعدیل فشار اسمزی، جلوگیری از تجمع یون های سمی مانند سدیم و نیز پایداری بیشتر آنزیم ها در شرایط شوری می شوند (Yam chi *et al.*, 2005). نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نیز افزایش بیان ژن P5CS را تحت تنش شوری نشان می دهد. با افزایش بیان ژن P5CS میزان سنتز پرولین بعنوان یک اسمولایت اولیه و مهم در شرایط تنش افزایش و از تولید گونه های ROS جلوگیری می کند. گلايسين بتائين از جمله محلول های سازگارکننده می باشد که توسط آنزیم BADH در مواجهه با تنش طی یک واکنش دو مرحله ای تولید

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

بحث

امروزه، تکنیک RT-PCR با استفاده از رنگ های فلورسانس، به میزان زیادی فرایند مطالعه بیان ژن ها را تسهیل می کند. (Schmittgen and Livak, 2008). در مطالعه ی 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 دایمر باشد دیده نشد.

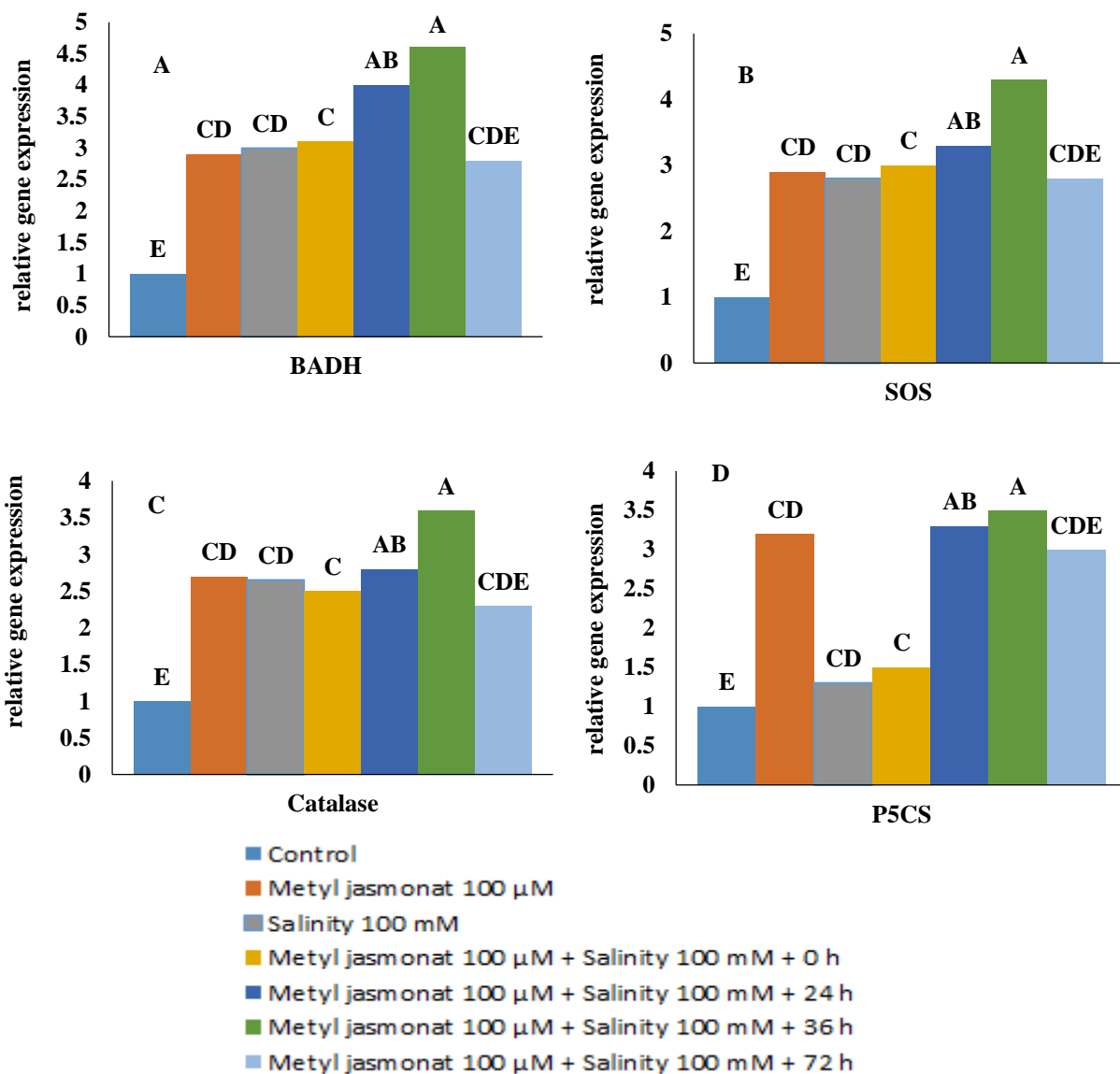
همبستگی بین ظرفیت آنتی اکسیدانی و پایداری اسموتیکی درون سلولی با تحمل به شوری در برخی گیاهان گزارش



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

در زمان مواجه گیاه بابونه با تنش شوری، بیان ژن کد کننده آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز افزایش یافت. در حالی‌که 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) می‌باشد. پراکسیزوم‌ها مکان‌های اصلی تولید H_2O_2 سلول‌های گیاهی در پاسخ به تنش شوری هستند. گزارش شده‌است 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 متیل‌جاسمونات 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 (Tofighi et al., 2016). با توجه به مشاهدات ما در این مطالعه



شکل ۴ - بررسی بیان ژن‌های (A) BADH، (B) SOS1، (C) Catalase و (D) P5CS تحت تیمار غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl در زمان‌های صفر، ۲۴، ۳۶ و ۷۲ ساعت در گیاه بابونه گاوی. (حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد).

توسط SOS2 و SOS3 کنترل می‌شود. 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 می‌شود (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 پلاسما است نقش مهمی در جوانه زدن و رشد گیاهان در محیط شور دارد (Shi *et al.*, 2000). در تنش‌های شوری و حضور کلرید سدیم 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

دفع یون سدیم از غشاء سلولی و هدایت و انتقال یون سدیم به واکوئل را بواسطه آنتی‌پورترهای موجود در غشاهای پلاسمایی و واکوئلی سبب می‌شود (Jamil et al., 2011). در بین سه دسته SOS1، SOS2 و SOS3، بزرگترین نقش در تحمل گیاه به شوری ناشی از کلرید سدیم دارد. در مقایسه با گیاهان جهش‌یافته SOS2 و SOS3، گیاهان جهش‌یافته SOS1 حتی نسبت به Na^+ و Li^+ حساسیت بیشتری دارند (Zhu 2003). در پژوهشی بیان ژن آنتی‌پورتر سدیم/پروتون SOS1 در گیاه *Aeluropus littoralis* تحت تنش شوری بررسی گردید و مشاهده شد سطوح نسخه‌برداری 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 مواجهه 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 بایونه در تمام سطوح شوری افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد که نشان‌دهنده 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 نشان‌دهنده‌ی تاثیر گزاره‌ی مثبت متیل جاسمونات بر بیان این ژن‌ها است.

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

دستگاه آنتی‌اکسیدانی مؤثر برای حفظ عملکردهای متابولسم در شرایط القا ضروریست تا از آسیب بیشتر جلوگیری شود (Farooq et al., 2016). دستگاه آنتی‌اکسیدان آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و گلوکاتایون ردوکتاز حفاظت علیه تأثیرات سمی ROS را بر عهده دارد. گزارش‌های متعددی مبنی بر اثرهای مثبت متیل جاسمونات بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی 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 سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و محتویات گلوکاتایون، کلروفیل افزایش داده است (Qiu et al., 2014). گزارش شده‌است که در میوه تمشک و توت‌های تیمار شده با متیل جاسمونات قدرت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است (Ghasemnezhad and Javaherdashti, 2008). در 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 آنتی‌اکسیدان‌ها 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 فعال 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 تنظیم‌کننده با افزایش بیان ژن‌های

پرولین سنتتاز، کاتالاز، بتاین آلدهید دهیدروژناز و SOS1 در شناخت بیشتر ساز و کارهای مقاومت گیاهان به تنش‌ها و در گیاهان بابونه گاوی تحت تنش شوری می‌تواند سبب افزایش تحمل گیاهان به تنش شود که این دست‌یابی می‌تواند برای نتیجه مقاومت، کشت و رشد بهتر گیاهان تحت تنش‌های محیطی حائز اهمیت باشد.

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 to 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.