افزایش بیان ژنهای چاویکول O-متیل ترنسفراز و سینامات ٤-هیدرو کسیلاز تحت تأثیر متیل جاسمونات در گیاه دارویی ریحان (.Ocimum basilicum L) لیلا حسنی^۱، بابک عبدالهی مندولکانی^۲*، رضا درویش زاده^۳ و عباس حسنی^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه ۲*- **نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه (b.abdollahi@urmia.ac.ir) ۳- استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگده کشاورزی، دانشگاه ارومیه ۴- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲

چکیدہ

اسانس ریحان سرشار از تر کیبات فنیل پروپانوئیدی بوده و آنزیم چاویکول O-متیل ترنسفراز (CVOMT) و سینامات ٤-هیدروکسیلاز (C₄H) از آنزیمهای مؤثر در تولید این تر کیبات میباشد. بهمنظور بررسی تـاثیر متیـل جاسمونات بهعنوان محرک بر میزان بیان ژنهای کدکننده این دو آنزیم، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. محلولپاشی متیل جاسمونات با سه غلظت صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی مولار در مرحلـه گلدهی کامل بر روی بر گهای گیاهان سالم انجام گرفت. نمونههای بر گی صفر، ۲/۱ و ۰/۵ میلی مولار در مرحلـه محلولپاشی برداشت و میزان بیان نسبی ژنها با Real time PCR بررسی شد. تجزیه واریانس دادهها با در نظر گوفتن غلظت متیل جاسمونات بهعنوان عامل اصلی و زمان بهعنوان عامل فرعی بهصورت طرح اسپیلیت پلات در زمان انجام شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین دادهها، بیشترین میزان بیان نسبی ژن TVOMT متیل جاسمونات و زمان بعد از محلولپاشی و مقایسه میانگین دادهها، بیشترین میزان بیان نسبی ژن در غلظت ۰/۵ میلی مولار و زمان ٤٨ ساعت بعد از محلولپاشی حاصل شد (20.0). اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات و زمان بعد از محلولپاشی بر میزان بیان نسبی ژن ۲۰ معنی دار بود (20.5). بیشترین میزان به بیشترین میزان در غلظت ۱/۵ میلی مولار بود. هم چنین میزان بیان نسبی این ژن ۶۸ ساعت بعد از محلولپاشی به بیشترین مقدار رسید. هر دو غلظت متیل جاسمونات باعث افزایش معنی دار بیان ژن ۲۰۵ ساعت بعد از محلولپاشی مذکور شد که احتمالاً می تواند منجر به افرایش تولید تر کیبات فنیل پروپانوئیدی مانند چاویکول و متیل چاویکول در ریحان شود.

كليد واژهها : متيل جاسمونات، ريحان، Real Time PCR چاويكول O-متيل ترنسفراز.

می کند (Marotti et al., 1997) می کند (Marotti et al., 1997). 2004). تولید کننده عمده ریحان در کشور، استان خوزستان است. سطح زیر کشت آن در ایران ۱۳۹۹ هکتار می باشد که ۲۳/۰ درصد از سطح زیر کشت کل سبزیجات و ۲۰۰۹ درصد سطح زیر کشت از کل محصولات زراعی در ایران به این گیاه دارویی اختصاص دارد (Kuchaki et al., 2014). تولید سالیانه اسانس

مقدمه

ریحان (اسیموم باسیلیکوم ال^۱) متعلق به خانواده لامیاسه^۲ و زیر خانواده نپتودیا^۳ می باشد. این گیاه دگرگردهافشان، دیپلوئید (۲۸=۲۲) و یکساله با گلهای بنفش است که معمولاً در هند و دیگر مناطق آسیا رشد

¹⁻ Ocimum basilicum L.

²⁻ Lamiaceae

³⁻ Nepetoideae

ریحان به عنوان یک محصول مهم اقتصادی در سرتاسر جهان، ۱۰۰ تن و ارزش فروش گلدانی آن به ۱۵ میلیون دلار میرسد (Begum *et al.*, 2002).

ريحان جزء ده گياه دارويي برتر از ديدگاه انجمن گیاهان دارویی آمریکا بوده و برای درمان بیماری های تنفسي، نقص كليه و انواع سرطانها از جمله سرطان معده مفید می باشد. اسانس آن در بهداشت، عطرسازی، برای كنترل آفات، به عنوان يك ماده بيهوشي، به عنوان يك آنتیاکسیدان و ترکیبی که دارای فعایت ضد میکروبی است دارای اهمیت می باشد (, Da Costa et al. 2015). برگھای ریحان غنے از اسانس است (Grayer et al., 2004). متابوليت هاى ثانويه به عنوان جزئی از اسانس به سه گروه ترکیبات نیتروژندار، ترین ها و فنول تقسیم می شوند (Bourgaud et al., 2001). بیشتر متابولیتهای ثانویه نیتروژندار از آمینواسیدهای مشترکی ساخته می شوند. آلکالوئیدها یک گروه متنوع از ترکیبات نیتروژندار با وزن مولکولی کم هستند. تعداد آلکالوئیدهای شـناخته شـده حدود ۱۵۰۰ ذکر شده است و بهطور تقریبی در ۲۰ درصد از گیاهان آوندی یافت می شوند گروه دیگر متابولیتهای ثانویه یعنی ترپنها یا ترپنوئیدها، بزرگترین گروه متابولیت ثانویه را در گیاهان شامل میشوند. بیشتر ترین ها اعمال مشخصی در رشد و نمو گیاه به عهده دارند. بهعنوان مثال پیش ماده آبسیزیک اسید، یک سزکوئی ترین است. استروئیدها، مشتقات تری ترین ها بوده و از اجزای ضروری غشای پلاسمایی محسوب مي شوند (Esmailzadeh behabadi and Sharifi, 2013). گروه آخر متابوليتهاي ثانويه، فنيل یرویانوئیدها یا مولکولهای کوچک فنلی هستند که دارای یک حلقه فنیلی و یک زنجیره سه کربنی هستند. این ترکیبات از مسیر بزرگ فنیل پروپانوئیدی در شرایط تنش سنتز میشوند. ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مثل متیل چاویکول، اوژنول و مشتقاتشان یا ترینوئیدهایی مثل مونوترين الكل لينالول، متيل سينامات و ليمونن از ارزش

اقتصادى بالايى برخوردار مى باشند (Taile et al., 2010). متيل جاسمونات بر روى مسير توليد اين ترکيبات از جمله اسيد p-کوماريک و متيل چاويکول مؤثر مىباشد و وقتى بەصورت خارجى بكار بردە می شود به صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده و منجر به بیان یک سری از ژنهای دخیل در بیوسنتز فنیل يرويانوئيدها مے شود (Tahsili et al., 2011). در مسير بيوسنتز متيل چاويكول، فنيـل آلانـين پـيش مـاده اولیه است. سیس دو مسیر از آن نتیجه می شود که از مسیر اول متیل چاویکول و از مسیر دوم متیل اوژنول سنتز می شود. ابتدا با د آمینه شدن فنیل آلانین به وسیله آنزيم فنيل آلانين آمونيالياز (PAL) سيناميك اسيد توليد مىشود. سينامات ۴-ھيدروكسيلاز (C₄H)^۲ اضافه کردن گروه هیدروکسیل به کربن ۴ سینامیک اسید و تبديل آن به p-كوماريك اسيد را كاتاليز مى كند (Ramos et al., 2001). سیس شکل های آلدئیدی و الكلي يارا-كوماريك تشكيل شده و درنهايت چاويكول ایجاد می شود. مرحله انتهایی هم متیله شدن OH-۴ چاویکول، به وسیله آنزیم چاویکول O–متیل ترانسفراز (CVOMT)[°]و تشکیل متیل چاویکول می باشد (Gang et al., 2001). آخرين مرحله بيوسنتز متيل چاویکول، به وسیله یک O-متیل ترنسفراز وابسته به S-آدنوزیل متیونین کاتالیز می شود که قادر است پیش ماده چاویکول را در پارا-هیدروکسی به متیل چاویکول تبدیل کند. متیل ترنسفرازها آنزیمهایی هستند که انتقال یک گروہ متیل را از S-آدنوزیل متیونین بے یک سوبسترای پذیرنده کاتالیز می کنند و مشتقات O-متیا، N-متیا، S-متیا، C-متیا و S-آدنوزیا هوموسيستئين را ميسازند و اختصاصي عمل مي كننـد .(Lewinsohn et al., 2000)

Zare Mehrjerdi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که در گیاه درمنه متیل جاسمونات تأثیر مثبتی در

¹⁻ Phenylalanine ammonia lyase

²⁻ Cinnamate 4-hydroxylase

³⁻ Chavicol o-methyl teransferase

۱۰۳

بیان ژنهای دخیل در سنتز آرتمیزینین (یک سز کوئی ترپن) دارد. همچنین گزارش های متعددی مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم PAL در کشتهای سلولی بعد از استعمال متیل جاسمونات موجود است که از آن جمله می توان به کشتهای سلولی تو تون و سویا اشاره کرد (Rauf fard, 2014).

Ellard-Iver and Douglas (۱۹۹۶) گزارش کردند که متیل جاسمونات در القای بیان ژنهای در گیر در تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در جعفری مؤثر میباشد. با توجه به تأثیر متیل جاسمونات در بیان ژنهای دخیل در بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها در گیاهان دارویی و با توجه به این که در بین ترکیبات فنیل پروپانوئیدی، متیل چاویکول و اسید p-کوماریک دارای اهمیت اقتصادی و بررسی تأثیر متیل جاسمونات بر بیان نسبی ژنهای تاکنون تأثیر متیل جاسمونات بر بیان ژنهای مذکور تاکنون تأثیر متیل جاسمونات بر بیان ژنهای مذکور مطالعه نشده و نتایج حاصله می تواند زمینه لازم برای دستکاری ژنتیکی مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و افزایش میزان متابولیتهای ثانویه را فراهم سازد.

مواد و روشها

کشت و تیمار مواد گیاهی

به منظور اجرای این تحقیق، آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در تابستان سال ۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا گردید. در این آزمایش از بذور اصلاح شده رقم کشکنی لولوی ریحان که از بخش گیاهان دارویی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی تهیه شده بود، استفاده شد. گلدانها با نسبت دو خاک مزرعه الک شده، یک نسبت ماسه و یک نسبت گیاخاک پر شدند. پس از یک آبیاری سطحی با اسپری که به منظور مرطوب شدن سطح خاک بود، تعداد ۲۰ تا ۳۰ سوراخ در سطح خاک ایجاد شد و بذرها در عمق یک سانتی متری فرو برده شد و پس

گلدانها هر روز آبیاری می شدند و پس از جوانهزنی هر دو روز یکبار آبیاری انجام گرفت. دمای روزانه گلخانه ۲۵ تا ۳۰ و دمای شبانه آن ۲۰ تا ۲۵ درجه سـانتی گـراد و فشار حدود ۸۳۰ یاسکال و شدت نور ۱۰۰۰۰ تا ۸۰۰۰ لوكس بود. پس از سبز شدن، بو ته ها در چند مرحله تنك گردیده و نهایتاً در داخل هر گلدان هفت بوته نگهداری شد. سه غلظت از متيل جاسمونات (,Sigma Aldrich USA) شامل صفر، ۱/۰ و ۰/۵ میلی مولار به طور جداگانه در بطری یک لیتری تهیه شد. از پنج میلیلیتر الکل ۹۶ درصد برای حلالیت متیل جاسمونات در هر بطری بهطور جداگانه استفاده شد و سپس محلول تهیه شده بـهصـورت اسـپري بـر روي بـرگهـاي گياهـان در مرحله گلدهی (۴۵ روز پس از رشد) پاشیده شد بهطوری که کل بوته به محلول آغشته شد. برای محلول پاشی گیاهان شاهد نیز از آب دو بار تقطیر استفاده شد. نمونهبرداری از برگهای انتهایی و جوان، در چهار زمان صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی انجام شد و نمونه ها برای نگهداری به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA با استفاده از محلول -RNX با ستفاده از محلول -RNX المي و PLUS طبق پروتكل شركت سازنده (سيناكلون، ايران) انجام گرفت. پس از ارزيابى كميت و كيفيت RNA با دستگاه بيوفتومتر و ژل آگارز ۱ درصد، واكنش سنتز RevertAidTM First و كيت RevertAidTM First بوتكل Strand cDNA Synthesis Kit نشركت سازنده (فرمنتاز، آلمان) انجام شد. براى اطمينان از صحت واكنش سنتز DNA و عدم وجود آلودگى واكنش طبق دستورالعمل شركت سازنده كيت مذكور واكنش طبق دستورالعمل شركت سازنده كيت مذكور آرتى که تمامى اجزاى واكنش سنتز به جز آنزيم ريورس ترنسكريتاز استفاده مى شوند و به منظور كنترل

¹⁻ RT: -Reverse transcriptase

آلودگی DNA ژنومی می باشد. کنترل بعدی شامل کنترل منفی بدون RNA^۱ می باشد. در این کنترل تمامی اجزای واکنش به جز RNA مورد استفاده وارد می شوند و برای کنترل عدم وجود آلودگی در مواد واکنش می باشد. کنترل بعدی (کنترل مثبت) سنتز cDNA با استفاده از RNA موش موجود در کیت بود که برای اطمینان از صحت انجام واکنش سنتز cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام می گرفت.

طراحـی آغـاز گر و واکـنش.هـای Real time PCR

توالی mRNA مربوط به ژن s-rRNA (ژن نر مال کننده) و ژن های CVOMT و C4H از بانک های اطلاعاتی ذخیره شد و آغاز گرهای اختصاصی (جدول ۱) با استفاده از نرمافزارهای فست پیسی آر¹ و جین رانر^۳ طراحي شد (Yu et al., 2015). جهت اطمينان از اختصاصبی بودن آغاز گرها، بلاست آنها در برابر توالیهای نو کلئوتیدی در سایت NCBI انجام گرفت. برای شناسایی دمای اتصال آغاز گر و همچنین اطمینان از صحت محصول تکثیری مربوط بـه هـر ژن، PCR بـرای هر ژن در حجه ۲۰ میکرولیتر حاوی بافر ۱۰ PCR برابر، N/G MgCl₂ میلی مولار، ۱/۵ MgCl مولار، ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغاز گرها، ۰/۵ واحد آنزیم polymerase Taq DNA و سه میکرولیتر cDNA رقیق نشده در دستگاه ترموسایکلر ایندورف انجام گرفت. الگوی دمایی واکنش های PCR شامل واسرشتسازی اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشتسازی در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ تا ۵۹/۸ (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و سرانجام بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. الکتر وفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر TBE نیم برابر در ولتاژ ثابت

۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. برای رنگ آمیزی ژلها از اتیدیوم بروماید استفاده شد. پس از اطمینان از صحت محصول تكثيري، واكنش هاي Real time PCR با در نظر گرفتن ۲ تکرار بیولوژیک در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از کیت Maxima SYBER Green/Flourescein qPCR Master Mix بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده (فرمنتاز، آلمان) در دستگاه روتور جين کيو (کياژن، آمريکا) انجام گرفت. شرایط دمایی واکنش های Real time PCR شامل فعالسازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال از ۵۸ تا ۵۹/۸ (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه بود. از ژن s-rRNA نیز بهعنوان ژن مرجع جهت نرمالسازی دادهها استفاده شـد. پس از انجام واکنش،ها، منحنی ذوب مربوط به هر کـدام از ژنها (شکلهای ۱، ۲ و ۳) مورد آنالیز قرار گرفت و با توجه به پیکهای بهدست آمده اختصاصی بودن محصولات و عدم وجود پرايمر دايمر مورد تأييد قرار گرفت.

تجزيه دادهها

آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار آماری اجرا گردید. کمیت نسبی به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ با نرمافزار روتور جین کیو تعیین گردید. پس از اتمام واکنشها مقدار حد آستانه⁶ طوری در نظر گرفته شد که سیگنالهای فلورسنت را در فاز نمایی واکنش قطع کند. پس از محاسبه ۲۲ با این نرمافزار، مقدار بیان نسبی ژنهای مورد مطالعه نسبت به تیمار شاهد (تیمار صفر میلی مولار متیل جاسمونات) طبق روش ΔΔCT محاسبه شد. تجزیه آماری دادهها با در نظر گرفتن غلظت متیل جاسمونات به عنوان عامل اصلی و زمان به عنوان

¹⁻ Negative template control: NTC

²⁻ Fast PCR

³⁻ Gene Runner

⁴⁻ Rotor-Gene Q

⁵⁻ Threshold

نرمافزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت. قبل از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن دادهها و اشتباهات مدل به روش کلموگراف-اسمیرنوف با نرمافزار MINITAB نسخه ۱۶ بررسی شد. مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال 0.05≤p با نرمافزار SAS نسخه ۱/۹ انجام گرفت.

نتايج و بحث

تجزیه واریانس دادهها (جدول ۲) نشان داد که اثر متقابل زمان در غلظت برای صفت میزان بیان ژن CVOMT معنی دار (0.01) ولی برای میزان بیان ژن C4H معنی دار نمی باشد. همچنین غلظت متیل جاسمونات و زمان بعد از محلول پاشی اثر معنی داری بر میزان نسبی بیان ژن C4H داشت (0.05)

تأثير متيل جاسمونات بر بيان ژن CVOMT

طبق نتایج مقایسات میانگین به روش دانکن در سطح احتمال ۱ درصد، بیان ژن CVOMT در غلظت ۰/۵ میلی مولار متیل جاسمونات و ۴۸ ساعت پسس از

محلول پاشی به بیشترین میزان رسید (شکل ۴). متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید به عنوان مولکول های انتقال دهنده پیام در مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی عمل میکنند (Memelink, 2009).

در غلظت ۵/۰ میلی مولار متیل جاسمونات میزان بیان ژن CVOMT در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی به تر تیب به میزان ۱۳، ۲/۰۷ و ۲۲ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافته است. در غلظت ۱/۰ میلی مولار متیل جاسمونات نیز میزان بیان این ژن در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به تر تیب به میزان ۲۴/۷ ۲/۴۷ و ۲/۱۷ برابر نسبت به زمان صفر افزایش نشان داد. در بسیاری از تحقیقات اشاره شده است که کاربرد خارجی بسیاری از ترکیبات سیگنالینگ مانند متیل جاسمونات، سالسیلیک اسید و اتیلن بر بیان ژن های پاسخدهنده به پاتوژنها و بسیاری از ژنهای مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مؤثر میباشد (et al., 2005)

| of the studied genes | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------------|---|----------------------------------|---|--|--|--|--|--|
| اندازه محصول (جفت باز) Amplicon size (bp) | دمای اتصال Annealing temperature | نام ژن Gene name | شماره دسترسی Accession number | کر Primer | | | | | |
| 65 | 58.8 | 18srRNA | AK059783 | رفت Forward: 5'- CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA-3' برگشت Reverse: 5'- ACACTTCACCGGACCATTCAA-3' | | | | | |
| 298 | 59.8 | چاویکول o -متیل ترانسفراز Chavicol o-methyl transferase | AB530137.1 | رفت Forward: 5'-GACCACCCAATGACACTTTCC-3' بر گشت Reverse: 5'-GGTGGCGTGGTTCTCATGTTTA-3' | | | | | |
| 119 | 58 | سينامات ۴-ھيدرو كسيلاز Cinnamate 4-hydroxylase | HM990150 | رفت Forward: 5'-GCCAACAACCCCGCTCAATG-3' بر گشت Reverse:5'-CCAACGCCGAAGGGGAGGTATC-3' | | | | | |

| جدول ۱- توالی آغازگر، شماره دسترسی، دمای اتصال و اندازه محصول تکثیری ژنهای مورد مطالعه | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Table 1. Primer sequence, accession number, annealing temperature and amplicon size | | | | | | | |
| of the studied genes | | | | | | | |



Fig. 3. Melt curve of 18s-rRNA gene

1.7

Table 2. Mean of squares for the effects of methyl jasmonate on the relative expression of chavicole O-methyl transferase and cinnamate 4-hydroxylase genes compared to control treatment in basil c.v. Keshkeni luvelou

| Kesikem luvelou | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------------------|------------|------------------------------|---------------------|--|--|--|--|--|
| سينامات ٤-هيدروكسيلاز | چاویکول O-متیل ترنسفراز | درجه آزادی | منبع تغييرات | | | | | | |
| Cinnamate-4- hydroxylase | Chavicol-o-methyl transferase | df | Source of variations | | | | | | |
| 345.30 [*] | 22.11** | 1 | Concentration | غلظت | | | | | |
| 3.34 | 1.49 | 4 | Main error | اشتباه اصلى | | | | | |
| 226.47^{*} | 50.11** | 3 | Time | زمان | | | | | |
| 8.36 ^{ns} | 9.99** | 3 | $Concentration \times time$ | زمان × غلظت | | | | | |
| 2.98 | 1.10 | 12 | Minor error | اشتباه فرعي | | | | | |
| 12.75 | 24.67 | | Coefficient of variation (%) | ضريب تغييرات (درصد) | | | | | |

ns، * و ** بهتر تیب عدم وجود اختلاف معنیدار، معنیدار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد میباشد.

ns, * and ** no significant differences, significant at the 5 and 1 % probability level, respectively.



Fig. 4. Mean comparison for interaction of time*methyl jasmonate concentration on relative expression of chavicole O-methyltransferase (CVOMT) gene compared to control in basil C.V. Keshkeni luvelou (non-identical characters show significant differences)

دارد ۴۸ ساعت بعد از محلول پاشی افزایش می یابد. مطالعات مختلفی در گیاهان دیگر نشان داده است که بیان این ژنها و در نتیجه سننتز میزان متابولیتهای ثانویه از جمله فنیل پروپانوئیدها تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله محرکها، تنشهای زیستی و غیرزیستی تغییر می کند (Werker et al., 1993). همچنین مطالعات ژن CVOMT یکی از ژنهای در گیر در این مسیر میباشد. در غلظت ۰/۵ میلی مولار متیل جاسمونات میزان این مولکول پیامدهنده بیشتر می شود بنابراین میزان گلو کز بیشتری وارد مسیر شیکمیک اسید می شود و بیان ژهای در گیر در این مسیر از جمله ژن CVOMT که در انتهای مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی قرار گلدهی با محلول سالسیلیک اسید ۲ میلی مولار تیمار کردند و یک، دو، سه و پنج روز پس از اعمال تیمار نمونهبرداری انجام گرفت. نتایج بهدست آمده با روش Real time PCR نشان داد میرزان بیان ژن CVOMT در روز سوم بعد از تیمار افزایش یافته ولی در روز پنجم میرزان بیران آن کراهش یافت (Zarei et al., 2015) كه با يافته هاى حاصل از اين تحقيق مطابقت دارد. در گزارشی دیگر تأثیر متیل جاسمونات یک و ۰/۱ میلی مولار بر میزان متیل چاویکول در گیاه مریم گلی مورد بررسی قرار گرفت. در بین زمانهای مورد بررسی میزان تولید متیل چاویکول در زمان ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی به اوج خود میرسد. احتمالاً متیل جاسمونات از طریق افزایش بیان ژن کدکنندهی آنزیم CVOMT منجر به تولید متیل چاویکول شده است (Rauf fard et al., 2011). در تحقيق حاضر نیز میزان بیان ژن CVOMT در ۴۸ ساعت به اوج خود رسیده است. بنابراین این نتایج به نحوی می تواند تأييدكنندهي نتايج بهدست آمده از تحقيق حاضر باشد.

$\mathbf{C}_4 \mathbf{H}$ تأثیر متیل جاسمونات بر بیان ژن

در این تحقیق غلظت ۱/۰ میلی مولار متیل جاسمونات بیشترین تأثیر را در افزایش میزان بیان ژن C4H به عنوان یک آنزیم واسطه برای تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی داشت. افزایش غلظت متیل جاسمونات باعث کاهش معنی دار بیان این ژن شد (شکل ۵).

میزان بیان این ژن پس از اعمال تیمار ۱/۰ میلی مولار متیل جاسمونات افزایش یافته به طوری که ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی به بیشترین میزان نسبت به تیمار شاهد رسید و پس از آن کاهش یافت (شکل ۶). غلظت ۱/۰ و ۵/۰ میلی مولار متیل جاسمونات میزان بیان نسبی ژن ام/۰ میلی مولار متیل جاسمونات میزان بیان نسبی زن در اله ترتیب ۱۸/۹ و ۹/۸ برابر نسبت به تیمار شاهد زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۲۲ ساعت پس از محلول پاشی بهتر تیب ۷/۷۱، ۲۰/۲۲ و ۹۸/۶ برابر افزایش یافت. محصول ژن ۲4H به عنوان یک آنزیم واسطه برای تولید

قبلی با استفادہ از روش RT-PCR نشان میدھد کہ بیان این ژنها در طی دوره نموی افزایش مییابد که این افزایش با افزایش اسانس ریحان در دوره زایشی همراه می باشد (Gang et al., 2001). در آزمایشی دیگر تيمار گياه ريحان با سالسيليک اسيد ۲ ميلي مولار باعث افزایش میزان بیان ژن CVOMT در روز سوم بعد از تيمار شد ولي در روز پنجم ميزان بيان اين ژن كاهش یافت (Zarei et al., 2015). همچنین استفاده از کیتوزان در ریحان به عنوان یک محرک میزان بیان ژن CVOMT را ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار به میزان دو برابر نمونه شاهد افزایش داد. البته میزان بیان ایـن ژن در روز پنجم پس از اعمال کیتوزان کاهش یافت (Naderi et al., 2014). در گزارشی دیگر تیمار یک میلی مولار متیل جاسمونات در گیاه آگاستاکه بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت از شروع تیمار، منجر به افزایش معنی دار فعالیت آنزیمهای فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و ۴-کومارات لیگاز (4CL) نسبت به تیمار ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات و تیمار شاهد در همین زمان گردیـد و به ترتیب باعث افزایش ۳۰ درصدی و ۱۶۵ درصدی فعالیت این دو آنزیم در مقایسه با تیمار شاهد در همین زمان شد (Rauf fard et al., 2014). القاى فعاليت این دو آنزیم نشانه فعال شدن مسیر فنیل پروپانوئیدی توسط متیل جاسمونات میباشد. طبق این گزارشات محرکهای به کار رفته میزان بیان ژنهای موردنظر را نسبت به گیاهان شاهد افزایش دادهاند. در این گزارشات زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار اوج بیان ژن CVOMT بوده است که احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع و غلظت محرک به کار رفته باشد. پروتئین هایی ک در غشای پلاسمایی گیاهان بهعنوان رسپتور فعالیت می کنند در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار فعال شده و شروع به سیگنالدهی می کنند. تفاوت در گیاه مورد تيمار نيز ممكن است يكي از دلايل اين تفاوت باشد زيرا هر گیاه خصوصیات فیزیولوژیکی خاص خود را دارا میباشد. در گزارشی دیگر گیاه ریحان را در مرحله پیش

¹⁻⁴⁻Coumarate Ligase

افزایش دهند و باعث افزایش بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها شوند. در گیاه نخود محرک قارچی، mRNA مربوط به ژن C₄H را تا ۳/۷۶ برابر افزایش داده است (Frank) et al., 1996). اساسی در بیوسنتز لیگنین و سیستم دفاعی از طریق بیوسنتز فلاونوئیدها دارد (Liu et al., 2009). توسعه تنظیم بیان ژن C4H با لیگنینی شدن و محلهای فعال دیگر متابولیسم فنیل پروپانوئیدها در ارتباط است. گزارش شده است که محرکها می توانند بیان این ژن را









زمان پس از محلول پاشی متیل جاسمونات (ساعت) Time after methyl jasmonate spraying (hour)

Fig. 6. Mean comparison for the effect of different times after methyl jasmonate spraying on the relative expression of cinnamate 4-hydroxylase (C_4H) gene compared to control in basil c.v. Keshkeni luvelou (non-identical characters show significant differences)

Hahlbrock *et al.*,) دفاعی راهاندازی می شوند (1995). در نتیجه میزان بیان ژن C₄H را افزایش داده و در ۴۸ ساعت میزان بیان این ژن را به حداکثر می رساند. که متناسب با افزایش میزان بیان ژن C₄H توسط متیل جاسمونات در تحقیق حاضر می باشد.

نتيجه گيري

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که متیل جاسمونات به عنوان یک محرک بیان ژن های CVOMT و C4H را افزایش می دهد و احتمالاً کاربرد خارجی این محرک می تواند میزان بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی را افزایش دهد. لازم به ذکر است که مطالعه بیان سایر ژن های در گیر در این مسیر شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز این ترکیبات و نیز مکانیسم تنظیمی آن ها فراهم خواهد ساخت و امکان دستکاری ژنتیکی ژن های دخیل در مسیر می سازد. پیشنهاد می شود اثر محرک های دیگر نیز بر بیان ژن های دخیل در این مسیر در گیاه ریحان و گیاهان دارویی دیگر مطالعه شود تا امکان افزایش تولید ترکیبات با ارزش در این گیاهان فراهم شود.

سپاسگزاری نویسندگان مقاله از گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه بخاطر مساعدتها و فراهمسازی امکانات این تحقیق قدردانی مینماید.

آنالبز Real time PCR در گیاه گون نشان داد میزان بیان ژن C₄H تحت تیمار با عصاره مخمر (۱۰ گرم بر لیتر) به مدت ۶ ساعت "۱۳.۲۴" برابر نسبت به گیاه شاهد افزایش می یابد (Turgut-Kara and Ari, 2011). در برگ&های یولاف تحت تیمار با N⊣ستیل کیتوالیگوساکارید مقدار بیان ژن C₄H در ۶ و ۱۲ ساعت بعد از تیمار افزایش یافته و در ۴۸ ساعت به حداکثر میرسد و بعد از آن کاهش می یابد (Ishihara et al., 1999) كه نتايج اين تحقيق با تحقيق حاضر مطابقت دارد. در گیاه برنج تیمار برگ با متیل جاسمونات و متيل سالسيلات در مرحله ۴ بر گی، فعاليت آنــزیم PAL را ۸۰/۱ درصــد و C₄H را ۶۷ درصــد افزایش داد. همچنین متیل جاسمونات ۰/۰۵ میلی مولار در گیاه برنج میزان ترنسکریپتهای مربوط به ژن C₄H را افزایش داد (Bi et al., 2007). در زمینه تأثیر غلظتها و زمانهاي مختلف اليسيتورها به خصوص جاسمونات ها بر میزان بیان ژن C₄H اطلاعات اندکی موجود میباشد. در اندک بررسی های صورت گرفته اليسيتورها ميزان بيان ژن C₄H را افزايش دادهاند. N-استيل كيتواليگوساكاريد همانند متيل جاسمونات مسیر انتقال سیگنال و فعالیت گیرنده های هورمونی را راهاندازی می کند و در نتیجهی افزایش نفوذیذیری غشای سیتویلاسمی میزان هیدروژن بیشتری وارد سيتوپلاسم سلول مي شود. بنابراين ميزان فسفوريلاسيون و دفسفوريلاسيون افزايش مي يابد و در نهايت واكنش هاي

References

- 1. Begum, F., Amin, M.N., and Azad, M. 2002. In vitro rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. Plant Tissue Culture, 12: 27-35.
- 2. Bi, H.H., Zeng, R.S., and Su, L.M. 2007. An M and Luo SM. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. Journal of Chemical Ecology, 33(5): 1089-103.
- 3. Bourgaud, F., Gravot, A., and Miles, S. 2001. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. Plant Science, 161(5): 839-851.
- 4. Da Costa, A.S., de Fatima, M., Blank, A., Filho, J.L.S., de Santana, A.D.N.D.,

Santos, D.A.P.B., and Arie, F.B. 2015. Chemical Diversity in Basil (*Ocimum* sp.) Germplasm. The Scientific World Journal, 1-9.

- 5. Ellard Ivey, M. and Douglas, C.J. 1996. Role of jasmonates in the elicitor and wound inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. Plant Physiology, 112: 183-192.
- Esmailzadeh behabadi, S. and Sharifi, M. 2013. Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. Journal of Cell and Tissue, 4(2): 119-128. [In Farsi]
- 7. Frank, M.R., Deyneka, J.M., and Schuler, M.A. 1996. Cloning of wound induced cytochrome P450 monooxygenases expressed in pea. Plant Physiology, 110: 1035-1046.
- 8. Gang, D.R., Wang, J. Nam, K.H., Simon, J.E., Lewinsohn, E., and Putivisky, E. 2001. An investigation of the storage and biosynthasis of phenylpropenes in sweet basil. Plant Physiology, 125: 539-555.
- 9. Grayer, R.J., Vieira, R.F., Price, A.M., Kite, G.C., Simon, J.E., and Paton, A.J. 2004. Characterization of cultivars within species of ocimum by exudate flavonoid profiles. Biochemical Systematics and Ecology, 32(10): 901-913.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nurnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R., and Schmelzer, E. 1995. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 4150-4157.
- 11. Ishihara, A., Ohtsu, Y., and Iwamura, H. 1999. Induction of biosynthetic enzymes for avenanthramides in elicitor-treated oat leaves. Planta, 208: 512-518.
- 12. Kuchaki, A., Nasiri Mahallati, M., Hassanzadeye avval, F., and Mansuri, H. 2013. Vegetables biodiversity assessment in Iran agroecologys. Iranian journal of Applied Ecology, 2(4): 1-11. [In Farsi]
- Lewinsohn, E., ZivRaz, I., Dudai, N., Tadmor, Y., Lastochkin, E., Larkov, O., Chaimovitsh, D., Ravid, U., Putievsky, E., Pichersky, E., and Shoham, Y. 2000. Biosynthesis of estragole and methyleugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. Plant Science, 160: 27-35.
- 14. Liu, S., Hu, Y., Wang, X., Han, L., Song, S., Cheng, H., and Lin, Z. 2009. Isolation and characterization of a gene encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Parthenocissus henryana*. Molecular Biology Reports, 36:1605-1610.
- 15. Marotti, M., Dellacecca, V., Piccaglia, R., and Glovanelli, E. 1997. Agronomic and chemical evaluation of three varieties of *Foeniculum vulgare* Mill. Acta Horticulturae, 331: 63-69.
- 16. Memelink, J. 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. Phytochemistry, 70 (13-14): 1560-1570.
- 17. Naderi, S., Fakheri, B., and Esmailzadeh bahabadi, S. 2014. Increasing of chavicol o-methyl transfrase gene expression and catalase and ascorbate peroxidase enzymes

117

activity of *Ocimum basilicum* by chitosan. Journal of Crop Biotechnology, 3(6):1-9. [In Farsi]

- 18. Ramos, R., Tovar, F., Junqueira1, R., Lino, F., and Martins, G. 2001. Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. Genetics and Molecular Biology, 24: 235-241.
- 19. Raouf Fard, F., Omidbaigi, R., Sharifi, M., Sefidkon, F., and Behmanesh, M. 2011. Effect of methyl jasmonate on essential oil content and composition of agastache foeniculum. Journal of Medicinal Plants Research, 6(45): 5701-5705.
- Rauf Fard, F. Sharifi, M., Omidbaigi, R., Sefidkon, F., Behmanesh, M., and Ahmadi, N. 2014. Effect of methyl jasmonate on metabolic enzymes and phenolics, in agastache foeniculum [pursh] kuntze. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 3: 361-369.
- 21. Salzman, R.A., Brady, J.A., Finlayson, S.A., Buchanan, C.D., Sun, F., Klein, P.E., Klein, R. R., Pratt, L. H., Cordonnier-Pratt, M.M., and Mullet, J.E. 2005. Transcriptional profiling of sorghum induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses. Plant Physiology, 138: 352-368.
- Tahsili, J., Sharifi, M., Behmanesh, M., and Ziaei, M. 2011. Gene expression of eugenol o-methyl transferase and components of essential oils in (*Ocimum basilicum* L.) at different stages of growth. Iranian Journal of Biology, 18: 23-25. [In Farsi]
- 23. Taile, H.A.A., Salama, Z.A., and Radwan, S. 2010. Potential activity of basil plants as a source of antioxidants and anticancer agents as affected by organic and bioorganic fertilization. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38: 119-127.
- 24. Turgut-kara, N. and Ari, S. 2011. Analysis of elicitor inducible cytochrome P450 induction in *Astragalus chrysochlorus* cells. Plant Omics, 4(5): 264-269.
- 25. Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U. Dudai, N., and Katzir, I. 1993. Glandularh and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Annals of Botany, 71: 43-50.
- 26. Yu, Z.X., Wang, L.J., Zhao, B., Shan, C.M., Zhang, Y.H., Chen, D.F., and Chen, X.Y. 2015. Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in arabidopsis and patchouli (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors. Molecular Plant, 8: 98-110.
- Zare Mehrjerdi, M., Bihamta, M.R., Omidi, M., Naghavi, M.R., and soltanloo, H. 2014. Study on Artemisia annua and Arabidopsis thaliana trichome genes in response to methyl jasmonate and salicylic acid elicitors. Modern Genetics Journal, 3: 329-332. [In Farsi]
- 28. Zarei, H. Fakheri, B.A., Bahabadi, S.E., and Solouki, M. 2015. Increasing of chavicol o-methyl transferase gene expression (CVOMT) and methyl chavicol value of basil (*Ocimum basilicum*) by salicylic acid. Journal of Biodiversity and Environmental Science, 6(3): 46-53.