

افزایش بیان ژن‌های چاویکول O-متیل ترنسفراز و سینامات ۴-هیدروکسیلاز تحت تأثیر متیل جاسمونات در گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

لیلا حسنی^۱، بابک عبدالهی مندولکانی^{۲*}، رضا درویش‌زاده^۳ و عباس حسنی^۴

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، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۴- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۳۰

چکیده

اسانس ریحان سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوییدی بوده و آنزیم چاویکول O-متیل ترنسفراز (CVOMT) و سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C₄H) از آنزیم‌های مؤثر در تولید این ترکیبات می‌باشد. به منظور بررسی تأثیر متیل جاسمونات به عنوان محرک بر میزان بیان ژن‌های کدکننده این دو آنزیم، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. محلول پاشی متیل جاسمونات با سه غلظت صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی مولار در مرحله گلدهی کامل بر روی برگ‌های گیاهان سالم انجام گرفت. نمونه‌های برگ‌گی صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی برداشت و میزان بیان نسبی ژن‌ها با Real time PCR بررسی شد. تجزیه واریانس داده‌ها با در نظر گرفتن غلظت متیل جاسمونات به عنوان عامل اصلی و زمان به عنوان عامل فرعی به صورت طرح اسپیلیت پلات در زمان انجام شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین میزان بیان نسبی ژن CVOMT در غلظت ۰/۵ میلی مولار و زمان ۴۸ ساعت بعد از محلول پاشی حاصل شد ($p \leq 0.01$). اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات و زمان بعد از محلول پاشی بر میزان بیان نسبی ژن C₄H معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$). بیشترین میزان بیان نسبی این ژن در غلظت ۰/۱ میلی مولار بود. هم‌چنین میزان بیان نسبی این ژن ۴۸ ساعت بعد از محلول پاشی به بیشترین مقدار رسید. هر دو غلظت متیل جاسمونات باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های کدکننده دو آنزیم مذکور شد که احتمالاً می‌تواند منجر به افزایش تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی مانند چاویکول و متیل چاویکول در ریحان شود.

کلید واژه‌ها: متیل جاسمونات، ریحان، Real Time PCR، چاویکول O-متیل ترنسفراز.

می‌کند (Grayer et al., Marotti et al., 1997)

(2004). تولیدکننده عمده ریحان در کشور، استان

خوزستان است. سطح زیر کشت آن در ایران ۱۱۳۹

هکتار می‌باشد که ۰/۲۳ درصد از سطح زیر کشت کل

سبزیجات و ۰/۰۰۹ 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 نپتودیاسه^۳ می‌باشد. این گیاه

دگرگرفته افشان، دیپلوئید (2n=48) و یک‌ساله با گل‌های

بنفش است که معمولاً در هند و دیگر مناطق آسیا رشد

1- *Ocimum basilicum* L.

2- Lamiaceae

3- Nepetoideae

اقتصادی بالایی برخوردار می‌باشند (Taile et al., 2010). متیل جاسمونات بر روی مسیر تولید این ترکیبات از جمله اسید p-کوماریک و متیل چاویکول مؤثر می‌باشد و وقتی به صورت خارجی بکار برده می‌شود به صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده و منجر به بیان یک سری از ژن‌های دخیل در بیوسنتز فنیل پروپانویدها می‌شود (Tahsili et al., 2011). در مسیر بیوسنتز متیل چاویکول، فنیل آلانین پیش ماده اولیه است. سپس دو مسیر از آن نتیجه می‌شود که از مسیر اول متیل چاویکول و از مسیر دوم متیل اوژنول سنتز می‌شود. ابتدا با د آمینه شدن فنیل آلانین به وسیله آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)^۱ سینامیک اسید تولید می‌شود. سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C₄H)^۲ اضافه کردن گروه هیدروکسیل به کربن ۴ سینامیک اسید و تبدیل آن به p-کوماریک اسید را کاتالیز می‌کند (Ramos et al., 2001). سپس شکل‌های آلدئیدی و الکی پارا-کوماریک تشکیل شده و در نهایت چاویکول ایجاد می‌شود. مرحله انتهایی هم متیله شدن ۴-OH چاویکول، به وسیله آنزیم چاویکول O-متیل ترانسفراز (CVOMT)^۳ و تشکیل متیل چاویکول می‌باشد (Gang et al., 2001). آخرین مرحله بیوسنتز متیل چاویکول، به وسیله یک O-متیل ترانسفراز وابسته به S-آدنوزیل متیونین کاتالیز می‌شود که قادر است پیش ماده چاویکول را در پارا-هیدروکسی به متیل چاویکول تبدیل کند. متیل ترانسفرازها آنزیم‌هایی هستند که انتقال یک گروه متیل را از S-آدنوزیل متیونین به یک سوبسترای پذیرنده کاتالیز می‌کنند و مشتقات O-متیل، N-متیل، S-متیل، C-متیل و S-آدنوزیل هوموسیستین را می‌سازند و اختصاصی عمل می‌کنند (Lewinsohn et al., 2000).

Zare Mehrjerdi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش

کردند که در گیاه درمنه متیل جاسمونات تأثیر مثبتی در

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).

ریحان جزء ده گیاه دارویی برتر از دیدگاه انجمن گیاهان دارویی آمریکا بوده و برای درمان بیماری‌های تنفسی، نقص کلیه و انواع سرطان‌ها از جمله سرطان معده مفید می‌باشد. اسانس آن در بهداشت، عطرسازی، برای کنترل آفات، به عنوان یک ماده بیهوشی، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان و ترکیبی که دارای فعالیت ضد میکروبی است دارای اهمیت می‌باشد (Da Costa et al., 2015). برگ‌های ریحان غنی از اسانس است (Grayer et al., 2004). متابولیت‌های ثانویه به عنوان جزئی از اسانس به سه گروه ترکیبات نیتروژن‌دار، ترپن‌ها و فنول تقسیم می‌شوند (Bourgau et al., 2001). بیشتر متابولیت‌های ثانویه نیتروژن‌دار از آمینواسیدهای مشترکی ساخته می‌شوند. آلکالوئیدها یک گروه متنوع از ترکیبات نیتروژن‌دار با وزن مولکولی کم هستند. تعداد آلکالوئیدهای شناخته شده حدود ۱۵۰۰ ذکر شده است و به طور تقریبی در ۲۰ درصد از گیاهان آوندی یافت می‌شوند گروه دیگر متابولیت‌های ثانویه یعنی ترپن‌ها یا ترپنوئیدها، بزرگترین گروه متابولیت ثانویه را در گیاهان شامل می‌شوند. بیشتر ترپن‌ها اعمال مشخصی در رشد و نمو گیاه به عهده دارند. به عنوان مثال پیش ماده آبسزیک اسید، یک سزکوئی ترپن است. استروئیدها، مشتقات تری ترپن‌ها بوده و از اجزای ضروری غشای پلاسمایی محسوب می‌شوند (Esmailzadeh behabadi and Sharifi, 2013). گروه آخر متابولیت‌های ثانویه، فنیل پروپانویدها یا مولکول‌های کوچک فنلی هستند که دارای یک حلقه فنیلی و یک زنجیره سه کربنی هستند. این ترکیبات از مسیر بزرگ فنیل پروپانوییدی در شرایط تنش سنتز می‌شوند. ترکیبات فنیل پروپانوییدی مثل متیل چاویکول، اوژنول و مشتقاتشان یا ترپنوئیدهایی مثل مونوترپن الکل لینالول، متیل سینامات و لیمونن از ارزش

1- Phenylalanine ammonia lyase

2- Cinnamate 4-hydroxylase

3- Chavicol o-methyl transferase

گلدان‌ها هر روز آبیاری می‌شدند 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 سانتی‌گراد و فشار حدود ۸۳۰ پاسکال و شدت نور ۱۰۰۰۰ تا ۸۰۰۰ لوکس بود. پس از سبز شدن، بوته‌ها در چند مرحله تنک گردیده و نهایتاً در داخل هر گلدان هفت بوته نگهداری شد. سه غلظت از متیل جاسمونات (Sigma Aldrich, USA) شامل صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار به‌طور جداگانه در بطری یک لیتری تهیه شد. از پنج میلی‌لیتر الکل ۹۶ درصد برای حلالت متیل جاسمونات در هر بطری به‌طور جداگانه استفاده شد و سپس محلول تهیه شده به‌صورت اسپری بر روی برگ‌های گیاهان در مرحله گلدهی (۴۵ روز پس از رشد) پاشیده شد به‌طوری‌که کل بوته به محلول آغشته شد. برای محلول‌پاشی 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 محلول‌پاشی انجام شد و نمونه‌ها برای نگهداری به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA با استفاده از محلول RNX-PLUS طبق پروتکل شرکت سازنده (سیناکلون، ایران) انجام گرفت. پس از ارزیابی کمیت و کیفیت RNA با دستگاه بیوفتومتر و ژل آگارز ۱ درصد، واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit طبق پروتکل شرکت سازنده (فرمنتاز، آلمان) انجام شد. برای اطمینان از صحت واکنش سنتز cDNA و عدم وجود آلودگی DNA ژنومی و اجزای واکنش، انواع کنترل‌ها در واکنش طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت مذکور در نظر گرفته شد. این کنترل‌ها شامل: کنترل منفی بدون آر تی^۱ که تمامی اجزای واکنش سنتز به جز آنزیم ریورس ترانسکریپتاز استفاده می‌شوند و به‌منظور کنترل

بیان ژن‌های دخیل در سنتز آرتمیزینین (یک سزکوئیترین) دارد. هم‌چنین گزارش‌های متعددی مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم PAL در کشت‌های سلولی بعد از استعمال متیل جاسمونات موجود است که از آن جمله می‌توان به کشت‌های سلولی توتون و سویا اشاره کرد (Rauf fard, 2014).

Ellard-Iver and Douglas (۱۹۹۶) گزارش کردند که متیل جاسمونات در القای بیان ژن‌های درگیر در تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی در جعفری مؤثر می‌باشد. با توجه به تأثیر متیل جاسمونات در بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز فنیل پروپانویدها در گیاهان دارویی و با توجه به این‌که در بین ترکیبات فنیل پروپانوییدی، متیل چاویکول و اسید p-کوماریک دارای اهمیت اقتصادی و دارویی فراوانی می‌باشد بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تأثیر متیل جاسمونات بر بیان نسبی ژن‌های CVOMT و C₄H بود. لازم به توضیح است که تاکنون تأثیر متیل جاسمونات بر بیان ژن‌های مذکور مطالعه نشده و نتایج حاصله می‌تواند زمینه لازم برای دستکاری ژنتیکی مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی و افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه را فراهم سازد.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار مواد گیاهی

به‌منظور 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 گیاهخاک پر شدند. پس از یک آبیاری سطحی با اسپری که به‌منظور مرطوب شدن سطح خاک بود، تعداد ۲۰ تا ۳۰ سوراخ در سطح خاک ایجاد شد و بذرها در عمق یک سانتی‌متری فرو برده شد و پس از کشت، آبیاری مفصلی انجام شد. تا زمان جوانه‌زنی،

1- RT: -Reverse transcriptase

۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. برای رنگ آمیزی ژل‌ها از اتیدیوم بروماید استفاده شد. پس از اطمینان از صحت محصول تکثیری، واکنش‌های 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 (فرمتاز، آلمان) در دستگاه روتور جین کیو^۴ (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. شرایط دمایی واکنش‌های 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 ۱۸ نیز به عنوان ژن مرجع جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. پس از انجام واکنش‌ها، منحنی ذوب مربوط به هر کدام از ژن‌ها (شکل‌های ۱، ۲ و ۳) مورد آنالیز قرار گرفت و با توجه به پیک‌های به دست آمده اختصاصی بودن محصولات و عدم وجود پرایمر دایمر مورد تأیید قرار گرفت.

تجزیه داده‌ها

آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار آماری اجرا گردید. کمیت نسبی به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ با نرم‌افزار روتور جین کیو تعیین گردید. پس از اتمام واکنش‌ها مقدار حد آستانه^۵ طوری در نظر گرفته شد که سیگنال‌های فلورسنت را در فاز نمایی واکنش قطع کند. پس از محاسبه C_t با این نرم‌افزار، مقدار بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه نسبت به تیمار شاهد (تیمار صفر میلی مولار متیل جاسمونات) طبق روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد. تجزیه آماری داده‌ها با در نظر گرفتن غلظت متیل جاسمونات به عنوان عامل اصلی و زمان به عنوان عامل فرعی به صورت طرح اسپیلیت پلات در زمان با

آلودگی DNA ژنومی می‌باشد. کنترل بعدی شامل کنترل منفی بدون RNA^۱ می‌باشد. در این کنترل تمامی اجزای واکنش به جز RNA مورد استفاده وارد می‌شوند و برای کنترل عدم وجود آلودگی در مواد واکنش می‌باشد. 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 می‌گرفت.

طراحی آغازگر و واکنش‌های Real time PCR

توالی mRNA مربوط به ژن s-rRNA ۱۸ (ژن نرمال‌کننده) و ژن‌های CVOMT و C₄H از بانک‌های اطلاعاتی ذخیره شد و آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزارهای فست پی‌سی آر^۲ و جین رانتر^۳ طراحی شد (Yu et al., 2015). جهت اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرها، بلاست آن‌ها در برابر توالی‌های نوکلئوتیدی در سایت NCBI انجام گرفت. برای شناسایی دمای اتصال آغازگر و هم‌چنین اطمینان از صحت محصول تکثیری مربوط به هر ژن، PCR برای هر ژن در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی بافر PCR ۱۰ برابر، ۰/۲ dNTP میلی مولار، ۱/۵ MgCl₂ میلی مولار، ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرها، ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و سه میکرولیتر cDNA رقیق نشده در دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گرفت. الگوی دمایی واکنش‌های 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. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر TBE نیم برابر در ولتاژ ثابت

1- Negative template control: NTC

2- Fast PCR

3- Gene Runner

4- Rotor-Gene Q

5- Threshold

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

در غلظت ۰/۵ میلی مولار متیل جاسمونات میزان بیان ژن CVOMT در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی به ترتیب به میزان ۱۳، ۴۲/۷ و ۲۲ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافته است. در غلظت ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات نیز میزان بیان این ژن در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب به میزان ۳/۴۷، ۶/۲۸ و ۱/۱۶ 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، سالیسیک اسید و اتیلن بر بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به پاتوژن‌ها و بسیاری از ژن‌های مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی مؤثر می‌باشد (Salzman et al., 2005).

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 $p \leq 0.05$ با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر متقابل زمان در غلظت برای صفت میزان بیان ژن CVOMT معنی‌دار ($p \leq 0.01$) ولی برای میزان بیان ژن C_4H معنی‌دار نمی‌باشد. هم‌چنین غلظت متیل جاسمونات و زمان بعد از محلول پاشی اثر معنی‌داری بر میزان نسبی بیان ژن C_4H داشت ($p \leq 0.05$).

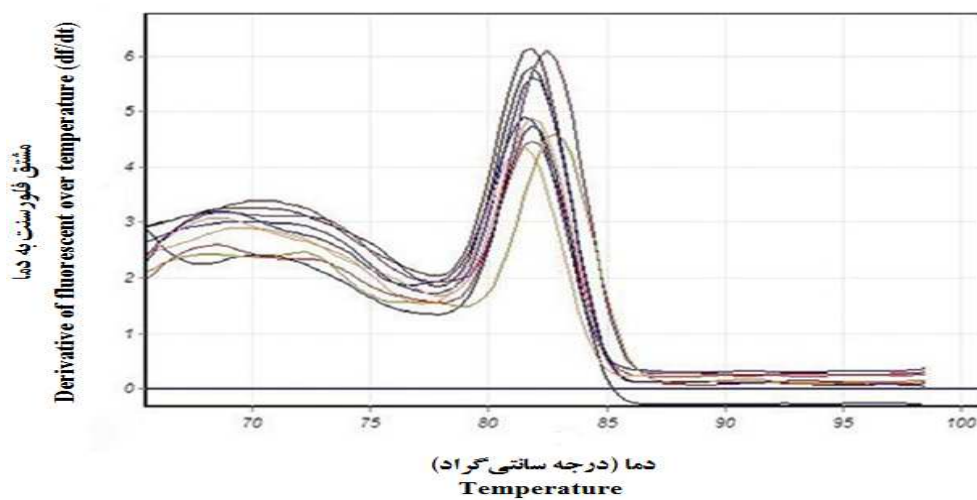
تأثیر متیل جاسمونات بر بیان ژن CVOMT

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 پس از

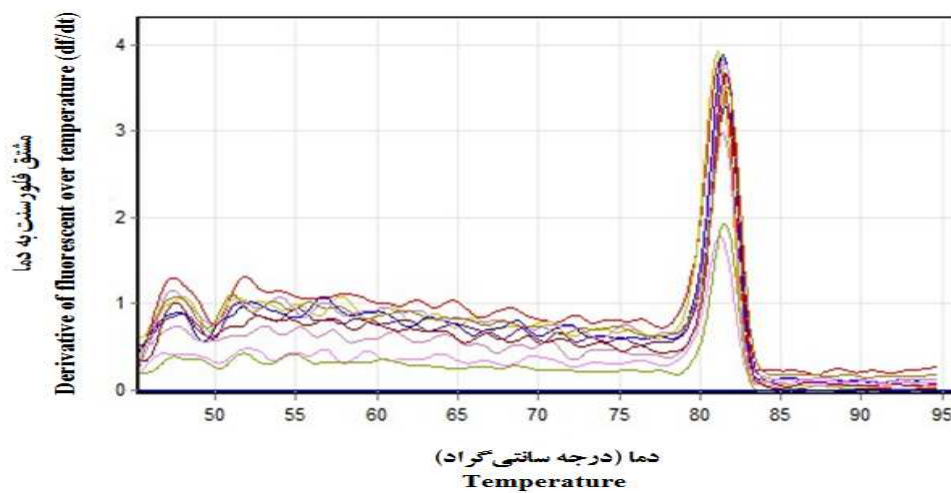
جدول ۱- توالی آغازگر، شماره دسترسی، دمای اتصال و اندازه محصول تکثیری ژن‌های مورد مطالعه

Table 1. Primer sequence, accession number, annealing temperature and amplicon size of the studied genes

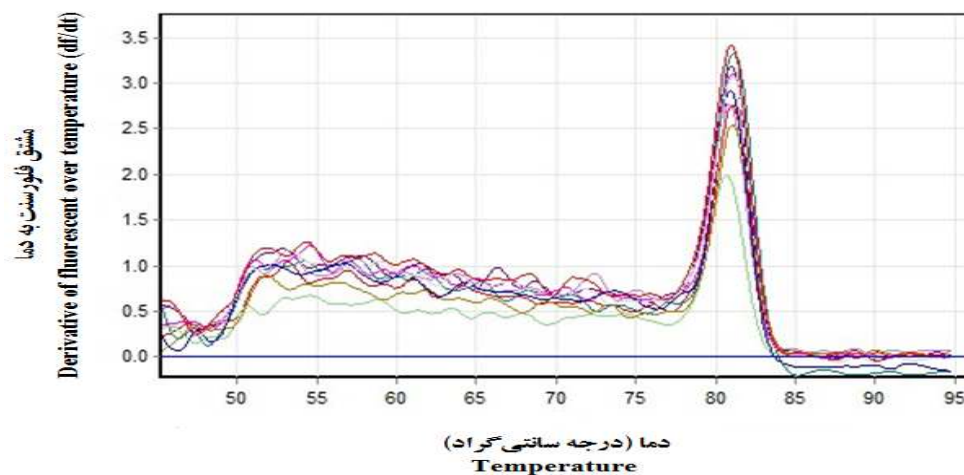
اندازه محصول (جفت باز) Amplicon size (bp)	دمای اتصال Annealing temperature	نام ژن Gene name	شماره دسترسی Accession number	آغازگر Primer
65	58.8	18srRNA	AK059783	رفت Forward: 5'- CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA-3' برگشت Reverse: 5'- ACACTTCACCGGACCATTCAA-3'
298	59.8	چاویکول 0-متیل ترانسفراز Chavicol o-methyl transferase	AB530137.1	رفت Forward: 5'-GACCACCCAATGACACTTTCC-3' برگشت Reverse: 5'-GGTGGCGTGGTTCTCATGTTTA-3'
119	58	سینامات ۴-هیدروکسیلاز Cinnamate 4-hydroxylase	HM990150	رفت Forward: 5'-GCCAACAAACCCCGCTCAATG-3' برگشت Reverse: 5'-CCAACGCCGAAGGGGAGGTATC-3'



شکل ۱- منحنی ذوب ژن چاویکول O-متیل ترانسفراز
 Fig. 1. Melt curve of chavicol o-methyl transferase gene



شکل ۲- منحنی ذوب ژن سینامات ۴-هیدروکسیلاز
 Fig. 2. Melt curve of cinnamate 4-hydroxylase gene



شکل ۳- منحنی ذوب ژن 18s-rRNA
 Fig. 3. Melt curve of 18s-rRNA gene

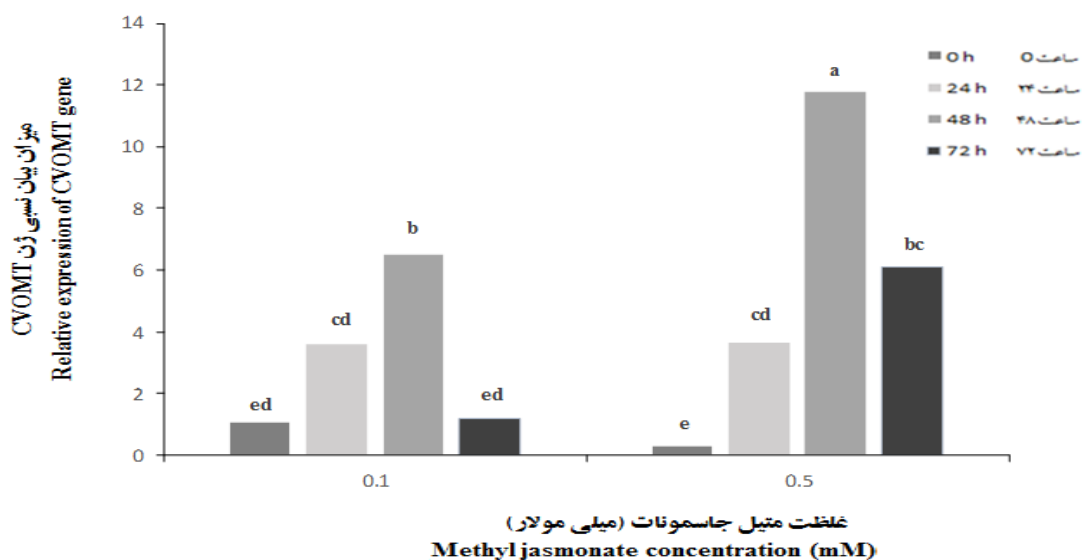
جدول ۲- میانگین مربعات تاثیر متیل جاسمونات بر میزان بیان نسبی ژنهای چاویکول O-متیل ترانسفراز و سینامات ۴-هیدروکسیلاز نسبت به تیمار شاهد در رقم کشکنی لولو گیاه ریحان

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

سینامات ۴-هیدروکسیلاز Cinnamate-4-hydroxylase	چاویکول O-متیل ترانسفراز Chavicol-o-methyl transferase	درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of variations	
345.30*	22.11**	1	Concentration	غلظت
3.34	1.49	4	Main error	اشتباه اصلی
226.47*	50.11**	3	Time	زمان
8.36 ^{ns}	9.99**	3	Concentration × time	زمان × غلظت
2.98	1.10	12	Minor error	اشتباه فرعی
12.75	24.67		Coefficient of variation (%)	ضریب تغییرات (درصد)

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

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



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان در غلظت بر بیان نسبی ژن چاویکول O-متیل ترانسفراز (CVOMT) نسبت به تیمار شاهد در رقم کشکنی لولو گیاه ریحان (حروف غیر یکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد)

Fig. 4. Mean comparison for interaction of time*methyl jasmonate concentration on relative expression of chavicol O-methyltransferase (CVOMT) gene compared to control in basil C.V. Keshkeni luvellou (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 ژن ها و در نتیجه سنتز میزان متابولیت های ثانویه از جمله فنیل پروپانویدها تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله محرک ها، تنش های زیستی و غیرزیستی تغییر می کند (Werker et al., 1993). هم چنین مطالعات

ژن CVOMT یکی از ژن های درگیر در این مسیر می باشد. در غلظت ۰/۵ میلی مولار متیل جاسمونات میزان این مولکول پیام دهنده بیشتر می شود بنابراین میزان گلوکز بیشتری وارد مسیر شیکمیک اسید می شود و بیان ژن های درگیر در این مسیر از جمله ژن CVOMT که در انتهای مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی قرار

گلدهی با محلول سالیسیلیک اسید ۲ میلی مولار تیمار کردند و یک، دو، سه و پنج روز پس از اعمال تیمار نمونه برداری انجام گرفت. نتایج به دست آمده با روش Real time PCR نشان داد میزان بیان ژن CVOMT در روز سوم بعد از تیمار افزایش یافته ولی در روز پنجم میزان بیان آن کاهش یافت (Zarei *et al.*, 2015) که با یافته‌های حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. در گزارشی دیگر تأثیر متیل جاسمونات یک و ۰/۱ میلی مولار بر میزان متیل چاویکول در گیاه مریم‌گلی مورد بررسی قرار گرفت. در بین زمان‌های مورد بررسی میزان تولید متیل چاویکول در زمان ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی به اوج خود می‌رسد. احتمالاً متیل جاسمونات از طریق افزایش بیان ژن کدکننده آنزیم CVOMT منجر به تولید متیل چاویکول شده است (Rauf fard *et al.*, 2011). در تحقیق حاضر نیز میزان بیان ژن CVOMT در ۴۸ ساعت به اوج خود رسیده است. بنابراین این نتایج به نحوی می‌تواند تأییدکننده‌ی نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر باشد.

تأثیر متیل جاسمونات بر بیان ژن C₄H

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

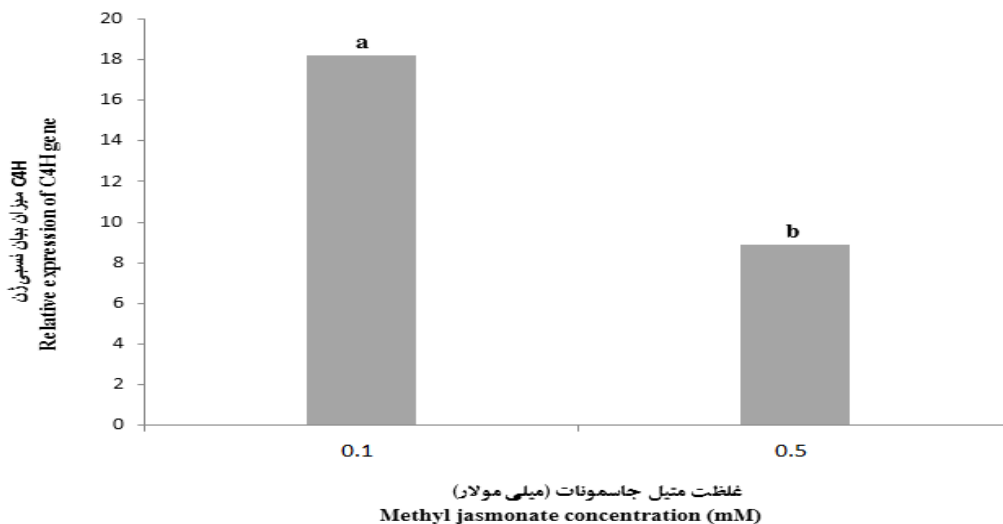
میزان بیان این ژن پس از اعمال تیمار ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات افزایش یافته به طوری که ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی به بیشترین میزان نسبت به تیمار شاهد رسید و پس از آن کاهش یافت (شکل ۶). غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میلی مولار متیل جاسمونات میزان بیان نسبی ژن C₄H را به ترتیب ۱۸/۱۹ و ۸/۹ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داده است. هم‌چنین میزان بیان نسبی این ژن در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی به ترتیب ۱۷/۷، ۲۲/۰۲ و ۶/۸۷ برابر افزایش یافت. محصول ژن C₄H به عنوان یک آنزیم واسطه برای تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی عمل می‌کند. این ژن نقش

قبل با استفاده از روش RT-PCR نشان می‌دهد که بیان این ژن‌ها در طی دوره‌ی نمو افزایش می‌یابد که این افزایش با افزایش اسانس ریحان در دوره‌ی زایشی همراه می‌باشد (Gang *et al.*, 2001). در آزمایشی دیگر تیمار گیاه ریحان با سالیسیلیک اسید ۲ میلی مولار باعث افزایش میزان بیان ژن CVOMT در روز سوم بعد از تیمار شد ولی در روز پنجم میزان بیان این ژن کاهش 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 این 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 معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) و ۴-کومارات لیگاز (4CL)^۱ نسبت به تیمار ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات و تیمار شاهد در همین زمان گردید 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). القای فعالیت این دو آنزیم نشانه فعال شدن مسیر فنیل پروپانوییدی 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. پروتئین‌هایی که در غشای پلاسمایی گیاهان به عنوان رسپتور فعالیت می‌کنند در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار فعال شده و شروع به سیگنال‌دهی می‌کنند. تفاوت در گیاه مورد تیمار نیز ممکن است یکی از دلایل این تفاوت باشد زیرا هر گیاه خصوصیات فیزیولوژیکی خاص خود را دارا می‌باشد. در گزارشی دیگر گیاه ریحان را در مرحله پیش

1- 4-Coumarate Ligase

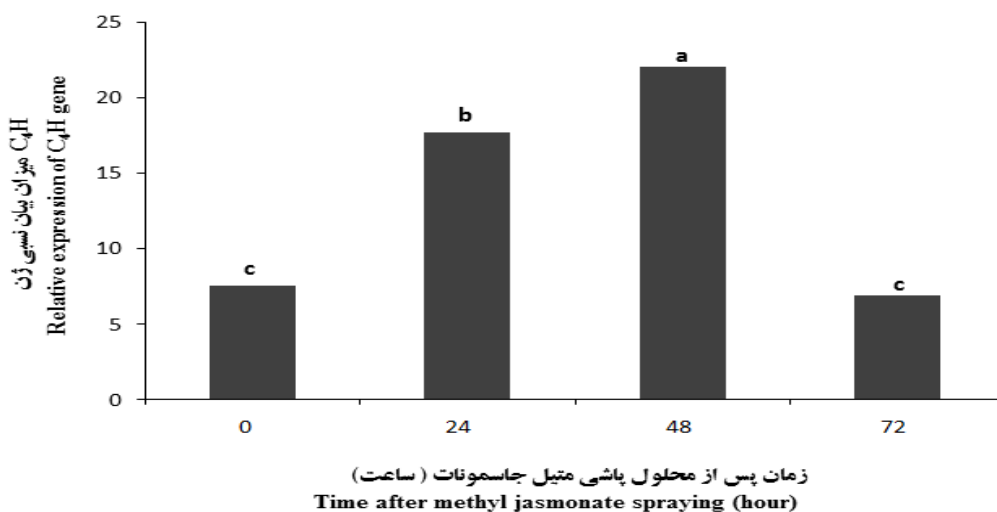
افزایش دهند و باعث افزایش بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها شوند. در گیاه نخود محرک قارچی، mRNA مربوط به ژن C_4H را تا ۳/۷۶ برابر افزایش داده است (Frank *et al.*, 1996).

اساسی در بیوسنتز لیگنین و سیستم دفاعی از طریق بیوسنتز فلاونوئیدها دارد (Liu *et al.*, 2009). توسعه تنظیم بیان ژن C_4H با لیگنین شدن و محل‌های فعال دیگر متابولیسم فنیل پروپانوئیدها در ارتباط است. گزارش شده است که محرک‌ها می‌توانند بیان این ژن را



شکل ۵- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر بیان نسبی ژن سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C_4H) نسبت به تیمار شاهد در رقم کشکنی لولو گیاه ریحان (حروف غیر یکسان نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد)

Fig. 5. Mean comparison for the effect of different concentrations of methyl jasmonate on relative expression of cinnamate 4-hydroxylase (C_4H) gene compared to control in basil c.v. Keshkeni luvellou (non-identical characters show significant differences)



شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر زمان‌های مختلف پس از محلول پاشی بر بیان نسبی ژن سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C_4H) نسبت به تیمار شاهد در رقم کشکنی لولو گیاه ریحان (حروف غیر یکسان نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد)

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 luvellou (non-identical characters show significant differences)

دفاعی راه اندازی می شوند (Hahlbrock *et al.*, 1995). در نتیجه میزان بیان ژن C_4H را افزایش داده و در ۴۸ ساعت میزان بیان این ژن را به حداکثر می رساند. که متناسب با افزایش میزان بیان ژن C_4H توسط متیل جاسمونات در تحقیق حاضر می باشد.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که متیل جاسمونات به عنوان یک محرک بیان ژنهای CVOMT و C_4H 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 ژنهای درگیر در این مسیر شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز این ترکیبات و نیز مکانیسم تنظیمی آنها فراهم خواهد ساخت و امکان دستکاری ژنتیکی ژنهای دخیل در مسیر بیوسنتز این ترکیبات جهت افزایش آنها را فراهم می سازد. پیشنهاد می شود اثر محرکهای دیگر نیز بر بیان ژنهای دخیل در این مسیر در گیاهان 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 مساعدت ها و فراهم سازی امکانات این تحقیق قدردانی می نماید.

آنالیز Real time PCR در گیاه گون نشان داد میزان بیان ژن C_4H 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-استیل کیتوالیگوساکارید مقدار بیان ژن C_4H در ۶ و ۱۲ ساعت بعد از تیمار افزایش یافته و در ۴۸ ساعت به حداکثر می رسد و بعد از آن کاهش می یابد (Ishihara *et al.*, 1999) که نتایج این تحقیق با تحقیق حاضر مطابقت دارد. در گیاه برنج تیمار برگ با متیل جاسمونات و متیل سالیلات در مرحله ۴ برگی، فعالیت آنزیم PAL را ۸۰٪ در C_4H و ۶۷٪ در C_4H افزایش داد. هم چنین متیل جاسمونات ۰/۰۵ میلی مولار در گیاه برنج میزان ترنسکریپت های مربوط به ژن C_4H را افزایش داد (Bi *et al.*, 2007). در زمینه تأثیر غلظت ها و زمان های مختلف الیستورها به خصوص جاسمونات ها بر میزان بیان ژن C_4H اطلاعات اندکی موجود می باشد. در اندک بررسی های صورت گرفته الیستورها میزان بیان ژن C_4H را افزایش داده اند. N-استیل کیتوالیگوساکارید همانند متیل جاسمونات مسیر انتقال سیگنال و فعالیت گیرنده های هورمونی را راه اندازی می کند و در نتیجه ی افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی میزان هیدروژن بیشتری وارد سیتوپلاسم سلول می شود. بنابراین میزان فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون افزایش می یابد و در نهایت واکنش های

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.
 6. 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 biosynthesis 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.
 10. 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 agroecology. Iranian journal of Applied Ecology, 2(4): 1-11. [In Farsi]
 13. Lewinsohn, E., ZivRaz, I., Dudai, N., Tadmor, Y., Lastochkin, E., Larkov, O., Chaimovitch, 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

- 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.
 20. 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.
 22. 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 bio-organic 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.
 27. 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.