ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷
صفحه ۱۸ - ۱۱

تاثیر آبسیزیک اسید بر محتوای کروسین و سافرانال و بیان ژن‌های کنترل‌کننده در کشت سوسپانسیونی زعفران (*Crocus sativus* L.)

Effect of Abscisic Acid (ABA) on Crocin and Safranal Contents and Expression of Controlling Genes in Saffron (*Crocus sativus* L.)

توفیق طاهرخانی[۱]، رسول اصغری زکریا*[۱]، منصور امیدی[۲]، ناصر زارع[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Taherkhani T[1], Asghari Zakaria R[*1], Omidi M[2], Zare N[1]

1- PhD Student, Professor, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r-asghari@uma.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.) با طعم، عطر و رنگ خاص علاوه بر مصارف غذایی دارای خواص دارویی فراوانی است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر آبسیزیک اسید بر محتوای کروسین و سافرانال و بیان ژن‌های کنترل‌کننده‌ی آن‌ها در کشت سوسپانسیونی زعفران بود. برای این منظور ریزنمونه‌های استریل تهیه شده از کورم‌های زعفران در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2/4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP کشت شدند. بعد از ۱۴ روز کالوس‌ها روی ریزنمونه‌ها تشکیل شدند. کالوس‌ها پس از واکشت به تعداد حداقل چهار بار به محیط کشت مایع منتقل و در شرایط رشدی بهینه در کشت سوسپانسیونی با ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید تیمار شدند. پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار نسبت به جمع‌آوری نمونه در سه تکرار اقدام شد. اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه سافرانال و کروسین با استفاده از HPLC و بررسی بیان ژن‌های *CsLYC*، *CsGT-2* و *CsBCH* از طریق Real-Time PCR انجام شد. نتایج نشان داد که پس از تیمار با ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید و پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت دو ژن *CsLYC* و *CsGT-2* به‌طور چشمگیری افزایش بیان نشان دادند ولی تغییر معنی‌داری در بیان ژن *CsBCH* مشاهده نشد. هم‌چنین مقادیر سافرانال و کروسین تحت تأثیر تیمار با آبسیزیک اسید در هر دو زمان نمونه‌برداری افزایش نشان داد به طوری‌که مقدار سافرانال و کروسین ۷۲ ساعت پس از تیمار با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید دارای بالاترین مقدار بود.

واژه‌های کلیدی

آبسیزیک اسید
سافرانال
کروسین
زعفران
HPLC
Real-Time PCR

مقدمه

زعفران (2n=3x=24) با نام علمی (*Crocus sativus* L.) از تیره‌ی زنبقیان و سرده‌ی زعفران است. قسمت مورد استفاده این گیاه، انتهای خامه و کلاله‌ی سه شاخه‌ی آن است که به‌نام زعفران مشهور است و دارای بوی معطر با طعم کمی تلخ می‌باشد. این تیره شامل ٦٠ جنس و ١٥٠٠ گونه است (Ebrahimzadeh et al. 2006). اگر چه منشاء زعفران ناشناخته است، ولی به‌نظر می‌رسد از برخی نواحی ایران، ترکیه و یونان منشاء گرفته است. اما اکنون زعفران در چندین کشور اروپایی هم‌چون اسپانیا، ایتالیا، فرانسه و سوئیس، هم‌چنین در مراکش، مصر، فلسطین، آذربایجان، پاکستان، هند، نیوزیلند، استرالیا و ژاپن با موفقیت کشت می‌شود. زعفران از گیاهان مهم صنعتی و دارویی در جهان می‌باشد که مطالعات وسیعی در مورد اثرات مختلف آن صورت گرفته است. این تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره زعفران علیه طیف وسیعی از تومورها در موش و سلول‌های انسانی و دیگر مدل‌های سرطانی مؤثر بوده است (Abdullaev 2002; Nair et al. 1995; Tarantilis et al. 1994). ترکیبات با اثرات دارویی مطلوب در زعفران، مواد تلخی هستند که از سافرانال و پیگمان‌های مربوط به کاروتنوئید کروستین مشتق می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها پیکروکروسین است. تجزیه پیکروکروسین به روش هیدرولیز اسیدی، موجب تولید گلوکز، آگلیکون فرار و سافرانال (دهیدرو– بتا– سیکلوسیترال) می‌شود. از ترکیبات رنگی، مهم‌ترین آن‌ها شامل انواع کارتنوییدهای کروستین و فرم‌های گلیکوزیدی دی جنتیوبیوزید (کروسین)، جنتیوبیوزید، گلوکوزید، جنتیوگلوکوزید و دیگلوکوزید بتا-کروستین (مونو متیل استر)، گاماکروستین (دی متیل استر)، آلفا-کاروتن، بتا -کاروتن، لیکوپن و زئازانتین هستند (Rios et al. 1996).

به‌دلیل اینکه ساخت ترکیبات ثانویه با ارزش با استفاده از روش‌های شیمیایی مقرون به‌صرفه نیست، تولید آن‌ها از طریق روش‌های زیست فناوری و کشت سلولی گیاهی مورد توجه قرار گرفته است که نقش مهمی در ایجاد روش‌های جایگزین برای تولید ترکیبات دارویی گیاهی دارند (Rao and Ravishankar 2002). تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه به روش کشت سلولی گیاهی مزایایی نسبت به تولید آن در درون گیاه دارد. تولید این ترکیبات قابل پیش‌بینی، مطمئن و ساده است. جداسازی ترکیب بیوشیمیایی از کشت سلولی نسبت به استخراج از کل گیاه سریع‌تر و با کارایی بالاتری انجام می‌شود و در همه فصول سال و با هر شرایط آب و هوایی و بدون محدودیت جغرافیایی قابل تولید هستند. عوامل مداخله‌گر که در شرایط کشت در مزرعه مشکل آفرین‌اند در کشت درون شیشه قابل اجتناب هستند. کشت سلولی و کشت اندام‌ها می‌تواند ترکیبات بیوشیمیایی را در حجم بالا و با عملکرد بالا تولید کند و از آنجایی که امکان نشان‌دار کردن آن‌ها با مواد رادیواکتیو وجود دارد می‌توان مسیرهای متابولیسمی را ردیابی کرد (Karuppusamy 2009). از طرفی مهندسی ژنتیک گیاهی نقش چشمگیری در زمینه شناسایی و دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارد (Rao and Ravishankar 2002).

از جمله مواد متشکله مهم در زعفران کروسین و سافرانال است که کروسین موجب رنگ و سافرانال موجب بو در زعفران می‌شود که این مواد موثره در زعفران از دو روش غیرموالونیک اسید (MEP) در پلاستیدها که مواد اولیه تشکیل کارتنوئیدها را به‌وجود می‌آورد و موالونیک اسید (MVA) در سیتوپلاسم (Wang et al. 2009) بیوسنتز می‌شوند. مسیر موالونیک اسید، با سنتز موالونات از طریق سه مولکول استیل کوآنزیم A، آغاز می‌شود و با تولید مولکول‌های ایزو پنتنیل دی فسفات (IPP)، ژرانیل ژرانیل پیروفسفات (GGPP)، فیتوئن بی‌رنگ، لیکوپن رنگی و بتا-کاروتن که از واکنش حلقوی شدن لیکوپن توسط آنزیم لیکوپن بتا سیکلاز ساخته می‌شود (Britton 1998). هیدروکسیله شدن بتا-کاروتن در مسیر موالونیک اسید توسط آنزیم بتاکارتنوئید هیدروکسیلاز کاتالیز می‌شود که منجر به تولید زئازانتین می‌شود (Castillo et al. 2005) عوامل رنگ (کروسین آلدهید) و بو (سافرانال) در زعفران توسط شکست اکسایشی زئازانتین به‌وسیله آنزیم ٧ و٨ زئازانتین کلیواژ داکسیژناز به‌وجود می‌آید (Pfander and Schurtenberger 1982). در زعفران محصولات حاصل از شکست اکسایشی زئازانتین توسط آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز ٢ در کروموپلاست کلاله، گلوکزیله می‌شوند و سپس در داخل واکوئل مرکزی کلاله ذخیره می‌شوند (Bouvier et al. 2003; Dufresne et al. 1997). واکنش حلقوی

شدن لیکوپن توسط ژن لیکوپن بتا سیکلاز *CsLYC* کد می‌شود (Britton 1998) هیدروکسیل‌دار شدن بتا کاروتن نیز توسط ژن *CsBCH* کد می‌شود که منجر به تولید زئازانتین می‌شود (Castillo et al. 2005). آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز ۲ به‌وسیله ژن *CsUGT2* در کروموپلاست کلاله کد می‌شود (Moraga et al. 2004). مطالعه تغییرات کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه در زعفران نشان داده است که ژن‌های *CsUGT2*، *CsLYC* و *CsBCH* در تنظیم تغییرات رونویسی درگیر هستند (Castillo et al. 2005; Mir et al. 2012; Ahrazem et al. 2010).

استفاده از تکنیک Real-Time PCR برای بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های گیاهی کاربرد زیادی در مهندسی متابولیک گیاهی دارد. به‌طور کلی این تکنیک روشی برای مشاهده بی‌وقفه‌ی پیشرفت واکنش PCR در طی زمان می‌باشد. که با این روش می‌توان مقادیر تولید DNA و cDNA یا RNA را اندازه‌گیری کرد. این تکنیک می‌تواند با حداقل اسید نوکلئیک آغاز شود و مقدار تولید نهایی را با دقت زیادی تعیین نماید. به راحتی قابل اجرا است و دقت و حساسیت بالاتر از PCR معمولی را دارد (Bustin et al. 2005). به‌نظر می‌رسد تنظیم رونویسی بیان ژن‌های کاروتنوئید سازوکار مهمی است که با استفاده از آن، بیوسنتز و انباشت کاروتنوئیدهای خاص و یا مشتقات آن‌ها در طی رشد گل و رسیدگی زعفران تنظیم می‌شود. بیوسنتز مشتقات کاروتنوئیدی اصلی زعفران شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال، به‌وسیله تجزیه اکسیداتیو زئازانتین و بتا کاروتن رخ می‌دهد. تجمع این کاروتنوئیدها در *C. sativus* با سطح رونویسی ژن‌های *PSY*، *BCH* و *β-LYC2* کنترل می‌شود (Castillo et al. 2005).

آبسیزیک اسید یک هورمون گیاهی است که به‌عنوان یک مولکول انتقال دهنده‌ی پیام نقش مهمی در بیان ژن‌ها و تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان به‌عهده دارد (Guan et al. 2000). مطالعات مختلف نشان داده است که این هورمون اثرات متفاوتی روی تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول‌های گیاهی و بیان ژن‌ها دارد (Luo et al. 2001، Wang and Ding 2001). یکی از محدودیت‌های تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های درون شیشه‌ای مقادیر پایین تولید در این نوع سیستم‌ها است اما، تلاش می‌شود از طریق روش‌های مختلف مهندسی متابولیک مانند تغییر در توالی‌های پروموتری، استفاده از فاکتورهای فعال‌کننده رونویسی و تغییر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مورد نظر میزان تولید آن‌ها در سیستم‌های درون آزمایشگاهی افزایش پیدا کند. ترکیب محیط کشت، ریزنمونه، شرایط فیزیکی، افزودن پیش‌سازها، استفاده از الیسیتورهای زنده و غیرزنده، افزایش نفوذپذیری سلول، دور کردن محصول از محل تولید، تعلیق سلول‌های گیاهی و انتخاب سلول‌هایی با کارآیی بالا از مهم‌ترین عوامل موثر در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی هستند.

با توجه به اهمیت آبسیزیک اسید به‌عنوان یک مولکول انتقال علامت در پاسخ به تنش‌های محیطی و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی، بررسی تاثیر استفاده از مقادیر مختلف این هورمون بر محتوای سافرانال و کروسین و تغییر در بیان ژن‌های کنترل‌کننده آن‌ها در کشت سوسپانسیونی زعفران از اهداف اصلی این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌های تهیه شده از کورم‌های زعفران به‌طور دقیق با آب‌مقطر شسته شده و سپس در زیر هود در الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه قرار داده شد و بعد به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میلی‌لیتر $HgCl_2$ ۰/۱ درصد ضدعفونی شدند. پس از شستشو با آب‌مقطر، در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2/4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. بعد از ۱٤ روز کالوس‌ها روی ریزنمونه‌ها تشکیل شدند. بعد از تشکیل کالوس به تعداد حداقل چهار بار کالوس‌ها واکشت شد تا کالوس لاین ایجاد شود. کالوس‌ها پس از انتقال به محیط مایع، در محیط سوسپانسیون در شرایط رشدی بهینه (یازده روز پس از شروع کشت سوسپانسیون)، با استفاده از مقادیر ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید به‌عنوان الیسیتور تیمار شدند. کالوس‌ها در دو مرحله ٢٤ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمارها برداشت شدند. کالوس‌های حاصل پس از جمع‌آوری به دو قسمت تقسیم شدند. یک بخش در دستگاه فریز درایر خشک شده و وزن خشک آن‌ها ثبت شد. کالوس‌های

خشک شده در اتانول ۵۰ درصد (حجمی- حجمی) سوسپانسیون شدند و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ شد و مایع‌رویی آن جداسازی و نگهداری شد. عصاره باقیمانده مجدداً به‌وسیله اتانول ۵۰ درصد (حجمی- حجمی) عصاره‌گیری و سانتریفیوژ شد و مجددا مایع رویی به مایع جدا شده قبلی اضافه شد. بعد از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد تا برای آنالیز توسط HPLC آماده شود. نمونه‌ها با حلال استونیتریل و آب به نسبت ۸۰ به ۲۰ درصد حجمی-حجمی به مدت ۲۰ دقیقه و ۸۰ به ۲۰ (آب به استونیتریل) به مدت یک دقیقه و مجددا به نسبت ۸۰ به ۲۰ درصد آب به استونیتریل و با جریان ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه در ستون HPLC قرار گرفتند. طول موج‌های شناسایی برای سافرانال طول موج ۳۳۰ نانومتر و برای کروسین ۲۷٤ نانومتر بود. در ضمن حجم تزریق شده به ستون ۲۰ میکرولیتر بود.

RNA طبق پروتکل شرکت پارس توس (A101231) از کالوس لاین‌ها استخراج شد. سپس یک میکرولیتر آنزیم DNase و یک میکرولیتر $MgCl_2$ به ۱۰۰۰ میکروگرم از RNA استخراج شده اضافه شد و پس از اسپین کردن به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه بر روی هات پلیت قرار داده شد. بعد یک میکرولیتر از EDTA به ویال‌ها اضافه و در دمای ٦۵ درجه به مدت ده دقیقه قرار داده شد. جهت سنتز cDNA ابتدا طبق پروتکل شرکت Geneall به مقدار دو میکروگرم از RNAی خالص را برداشته، به‌همراه یک میکرولیتر اولیگوdT ۵۰ میکرومولار با هم مخلوط شدند و حجم کل ویال با آب DEPC به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس روی هات پلیت در دمای ٦۵ درجه به مدت ده دقیقه قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس شامل Reverse transcriptas، dNTP، Stabilizer، RNAes inhibitor و بافر واکنش، به محیط اضافه شده و تمام مواد اسپین شدند. بعد ویال‌ها همان‌گونه که شرکت سازنده توصیه کرده بود، در دستگاه PCR در دو مرحله: الف) ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ دقیقه. ب) ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، قرار گرفتند. cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مطالعات بیان ژن نگهداری شد. آغازگرها با استفاده از منابع موجود (Mir et al. 2013) طبق جدول ۱ جهت سنتز به شرکت روبین طب گستر سفارش داده شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد نیاز برای تکثیر ژن‌های مسیر بیوسنتز آپوکارتنوئیدها در زعفران با طول مورد انتظار

آغازگر*	آغازگرهای مستقیم و معکوس	اندازه آغازگر (جفت‌باز)
CsLYC - F	AGATGGTCTTCATGGATTGGAG	۲٤۷
CsBCH - F	TCGAGCT TCGGCATCACATC	٤۹۵
CsGT2 - F	GATCTGCCGTGCGTTCGTAAC	٤۰۰
CsTUB - F	TGATTTCCAACTCGACCAGTGTC	۲۲۵
CsLYC - R	ATCACACACCTCTCATCCTCTTC	۲٤۷
CsBCH - R	GCAATACCAAACAGCGTGATC	۲۹۵
CsGT2 - R	GATGACAGAGTTCGGGGCCTTG	٤۰۰
CsTUB - R	ATACTCATCACCCTCGTCACCATC	۲۲۵

* Cs: *Crocus sativus*; *LYC*: lycopene-ß-cyclase, *BCH*: β-carotene hydroxylase, *GT2*: glucosyltransferase 2

جدول۲ - تاثیر استفاده از آبسیزیکاسید بر بیان ژن‌های مهم مسیر بیوسنتز زعفران

تیمار آبسیزیک اسید	زمان برداشت	*CsGT-2*	*CsLYC*	*CsBCH*
(T1) mg/l ۰/۵	۲٤ ساعت(E1)	۲۳/۳۱** ± ۰/۳۱	٤/٤۰** ± ۰/۱۱	۰/۱۰ ± ۰/۰۰۳
	۷۲ ساعت(E2)	۷۰/۲۹** ± ۱/۷٤	۸/٤۷** ±۰/۷۸	۰/٦۲ ± ۰/۸۰
(T2) mg/l ۱/۵	۲٤ ساعت(E1)	٤۳/۸٤** ± ۲	٦/٦۸** ±۰/۵۱	۰/۱۱ ± ۰/۰۲
	۷۲ ساعت(E2)	۵۱/۱۵** ± ۲/۳۳	۳۰/۰۳** ± ۳/۰۰	۱/۸۷ ±۰/۱۸

**معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱

سپس یک میکرولیتر از cDNA رقیق شده (۱۰۰نانوگرم) را به‌همراه نیم میکرولیتر پرایمر مستقیم و معکوس، پنج میکرولیتر مستر Real-Time و سه میکرولیتر آب در داخل هر ویال قرار داده شد. لازم به ذکر است که حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود. هر یک از ویال‌های آماده شده در داخل دستگاه Real-Time PCR با شرایط زیر قرار گرفت: ابتدا برای دناتوره شدن اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، سپس مرحلهٔ اصلی به شرح زیر اعمال شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه که این مرحله به مدت ٤۵ سیکل تکرار شدند. نرم‌افزار لایت سایکلر٤۸۰ (Thermo real time, Yekta Tajhiz Azma) برای ثبت داده‌های فلورسانس مورد استفاده قرار گرفت. برای بیان نسبی ژن‌ها ابتدا از نرم‌افزار linReg PCR نسخه ۲۰۱۵ مقادیر ضریب تاثیر PCR را به‌دست آورده و همراه با CT به‌دست آمده از دستگاه Real-Time PCR با نرم‌افزار Rest 2009 نسبت به محاسبه بیان نسبی ژن در هریک از تیمارها نسبت به شاهد (عدم تیمار) نرمال شده با ژن خانه‌دار *CsTUB* اقدام نموده و سپس تجزیه واریانس داده‌های حاصل بر اساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و مقایسه میانگین از طریق آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵، با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.17 صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج بررسی بیان ژن‌ها در سوسپانسیون سلولی زعفران تیمار شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید نشان داد که این هورمون بر تغییر بیان ژن‌های *CsBCH*، *CsLYC* و *CsGT-2* در هر دو زمان ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار تاثیرگذار بود. به‌طوری که در ۲٤ ساعت پس از اعمال تیمار، بیان ژن *CsLYC* به‌میزان٤/٤۰ و بیان ژن *CsGT-2* به‌میزان ۲۳/۳۰ برابر افزایش نشان داد. هم‌چنین اعمال همین سطح از این هورمون پس از ۷۲ ساعت موجب شد که بیان ژن‌های *CsLYC* به‌میزان ۸/٤۷ برابر و *CsGT-2* به‌میزان ۷۰/۲۸ برابر نسبت به شرایط شاهد افزایش نشان دهد. برای ژن *CsBCH* کاهش غیرمعنی‌داری در بیان ژن مشاهده شد (جدول ۲). هم‌چنین تیمار سوسپانسیون سلولی زعفران با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید نشان که این هورمون بر بیان ژن‌های مهم در بیوسنتز سافرانال و کروسین در هر دو زمان برداشت ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار مؤثر است که در ۲٤ ساعت پس از اعمال تیمار، بیان ژن *CsLYC* به‌میزان ٦/٦۷ و بیان ژن *CsGT-2* به‌میزان ٤۳/۸۳ برابر افزایش نسبت به شرایط شاهد نشان داد. هم‌چنین اعمال این سطح از این هورمون پس از ۷۲ ساعت موجب شد که بیان ژن‌های *CsLYC* به‌میزان ۳۰/۰۳ برابر و *CsGT-2* به‌میزان ۵۱/۱٤ برابر افزایش بیان نسبت به شرایط شاهد نشان داد ولی بیان ژن *CsBCH* افزایش معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲).

تجزیه واریانس مقادیر سافرنال و کروسین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین استفاده از ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید، هم‌چنین بین دو زمان نمونه‌برداری ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار از لحاظ مقادیر سافرانال و کروسین وجود دارد. اثرات متقابل نوع تیمار در زمان نمونه‌برداری فقط برای مقدار سافرانال معنی‌دار بود (جدول ۳). به‌طوری که مقایسات میانگین نشان داد که مقدار سافرانال در ۷۲ ساعت پس از تیمار با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید دارای بالاترین مقدار با میانگین ٦٦/۵۵ میکروگرم در یک گرم کالوس بوده و این مقدار، اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای آبسیزیک اسید داشت (جدول ٤).

جدول ۳ – تجزیه واریانس مقادیر سافرانال و کروسین بر اثر تیمار سوسپانسیون سلولی با سطوح مختلف آبسیزیک اسید

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		سافرانال	کروسین
تیمار	۲	۳۹۱٦/٦۲**	۲۱۲۱۵۵۲/٦۳**
زمان برداشت	۱	۹٤۷/۰۰**	۵٦۹۹۹٤/۵۱**
زمان برداشت* تیمار	۲	٤۹۷/٤۷**	۸۵۹۳/۲۹ ns
اشتباه آزمایشی	۱۲	۱۱/۰۱	۲۱۲۱۵۵۲/٦۳**

** معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱، ns غیرمعنی‌دار

جدول ٤- مقایسه میانگین مقادیر سافرانال و کروسین بر اثرتیمار سوسپانسیون سلولی با سطوح مختلف آبسیزیک اسید

تیمار آبسیزیک اسید	زمان برداشت	کروسین (میکروگرم در یک گرم کالوس)	سافرانال (میکروگرم در یک گرم کالوس)
(T0) تیمار شاهد	٢٤ ساعت	٢٢٩/٥٤ ± ٥٣/٤٢ e	٢/٢٣ ± ٠/٦٣ d
	٧٢ ساعت	٥٧٣/٧٥ ± ٩٥/٥١ d	٣/٢٣ ± ٠/٤٢ d
٠/٥ mg/l (T1)	٢٤ ساعت	٧١٤/٨٦ ± ٢٤/٩٦ d	٣/٣١ ± ٠/٣٧ d
	٧٢ ساعت	١٤٥٢/٤٢ ± ٢٤/٨٠ b	٣١/١٥ ± ٠/٣٢ b
١/٥ mg/l (T2)	٢٤ ساعت	١٢٢١/٥٥ ± ١٣/٠٥ c	١٦/٦٤ ± ١/٠٧ c
	٧٢ ساعت	١٧٣٢/١٣ ± ٢٩/٥٩ a	٦٦/٥٥ ± ١/٤٩ a

میانگین‌هایی با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد هستند.

هم‌چنین مقایسات میانگین از لحاظ مقادیر کروسین نشان داد که مقدار کروسین در ٧٢ ساعت پس از تیمار ١/٥میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید دارای بالاترین مقدار با میانگین ١٧٣٢/١٣ میکروگرم در یک گرم کالوس بوده و این مقدار، اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای استفاده شده با آبسیزیک اسید داشت (جدول ٤). تیمار با ١/٥ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید و نمونه‌برداری پس از ٢٤ ساعت هم در مورد سافرانال و هم در مورد کروسین در رتبه بعدی قرار داشت (جدول ٤).

هورمون ABA در تنظیم نمو گیاه به‌ویژه خواب بذر و پیری نقش مؤثری دارد. هم‌چنین در پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری بسیار مؤثر است (Cao et al. 2011; Qin et al. 2011). گیرنده‌های ABA و مسیر علامت‌رسانی آن در گیاهان تا حدودی شناسایی شده‌است (Raghavendra et al. 2010). این مسیر سیگنالی با تغییر بیان تعداد زیادی از ژن‌ها در ارتباط است. به‌طور مثال، تیمار گیاهچه‌های برنج با ١٠٠ میکرومولار ABA باعث تغییر در سطح رونویسی در بیش از ٣٦٠٠ ژن هسته‌ای شد (Garg et al. 2012). هم‌چنین تأثیر ABA در سرکوب ژن‌های کلروپلاستی در گیاه جو گزارش شده‌است (Yamburenko et al. 2013). با این حال، پاسخ بیان ژن‌های کلروپلاستی به ABA و مقدار کاهش بیان آن‌ها متفاوت بود. به‌طوری که پس از تیمار با ABA بیان برخی از ژن‌ها کاهش بیشتر و بیان برخی دیگر به میزان کمتری کاهش نشان داد. بر این اساس می‌توان گفت که تأثیر ABA به‌طور کلی ممانعت از فعالیت RNA مراز نیست، بلکه با تاثیر بر فاکتورهای رونویسی یا پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA بر سطح رونویسی و یا پایداری مولکول RNA تأثیر می‌گذارد (Yamburenko et al. 2013). از سوی دیگر تأثیر تیمار با ABA بسته به نوع نمونه گیاهی متفاوت گزارش شده‌است (Yamburenko et al. 2013). هم‌چنین نقش اندک و غیرمعنی‌دار ABA (در غلظت ١٠٠ میکرومولار) در بیان ژن *CsULT1* به عنوان یک ژن جدید در بیوسنتز آپوکاروتنوئیدها در زعفران توسط Ashraf et al. (2015) گزارش شده‌است. کاهش بیان ژن در اثر تیمار با ABA در ژن‌های هسته‌ای کدکننده‌ی پروتئین‌های فعال در فتوسنتز گزارش شده‌است (Cutler et al. 2010; Fujita et al. 2011). در آزمایش حاضر پس از اعمال تیمار کشت سوسپانسیونی زعفران با ٠/٥ و ١/٥ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید و پس از ٢٤ و ٧٢ ساعت دو ژن *CsLYC* و *CsGT-2* به‌طور چشمگیری افزایش بیان نشان دادند به‌طوری که در بین سطوح مختلف این تیمار بیش‌ترین شدت بیان دو ژن *CsLYC* و *CsGT-2* متعلق به تیمار ١/٥ میلی‌گرم در لیتر آبسیزیک اسید و نمونه‌برداری پس از ٧٢ ساعت بعد از اعمال تیمار بود ولی ژن *CsBCH* کاهش بیان از خود نشان داد. این امر نشان می‌دهد که تأثیر ABA بر بیان ژن‌ها متفاوت است و این با نتایج Yamburenko et al. (2013) مطابقت دارد. افزایش بیان برخی از ژن‌ها در تحقیق حاضر در تضاد با نتایج کارهای قبلی است که امکان دارد به‌دلیل نوع ژن و نوع بافت مورد استفاده باشد. آبسیزیک اسید به‌عنوان یک هورمون تنشی شناخته شده‌است که شبکه‌های پیچیده‌ای از پاسخ‌های به تنش را در گیاهان هماهنگ می‌کند. در شرایط تنش خشکی یا شوری، میزان ABA در گیاه تا حدود ٤٠ برابر بیش‌تر می‌شود که از طریق بسته شدن روزنه‌ها و انباشت دهیدرین‌ها و پروتئین‌های دیگر باعث تنظیم اسمزی در گیاهان می‌شود (Verslues et al. 2006). تنش سرما و گرما نیز البته به مقدار کمتر باعث افزایش سطوح ABA درون گیاه در گیاهان

می‌شود (Du et al. 2013). گزارش‌های زیادی وجود دارد که نشان می‌دهند ABA با استفاده از مسیر انتقال علامتی خاصی بیان تعداد زیادی از ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش را فعال می‌کند (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006، Liao et al. 2004). چندین خانواده ژنی مانند MYC، MYB و WRKY گزارش شده‌اند که در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط به واکنش به ABA مهم هستند (Zou et al. 2004). به‌عنوان مثال، MYB96 به‌وسیله ABA تحت تنش ایجاد می‌شود که موجب تقویت تحمل به خشکی و انجماد می‌شود (Guo et al. 2013; Seo et al. 2009).

هم‌چنین نتایج نشان داد که مقادیر سافرانال و کروسین به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمار آبسیزیک اسید در هر دو زمان نمونه‌برداری قرار می‌گیرد به‌طوری که تیمار با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ABA و نمونه‌برداری پس از ۷۲ ساعت از اعمال دارای بیش‌ترین مقدار کروسین و سافرانال است. آبسیزیک اسید اثرات متفاوتی روی متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول‌های گیاهی دارد. به‌طوری که ABA باعث افزایش تولید پاکلی‌تاکسل در کشت سوسپانسیون سلول *Taxus chinensis* می‌شود (Luo et al. 2001)، در حالی‌که مقدار ساپونین در ریشه‌های موئین *Panax quinquefolium* را کمی کاهش می‌دهد (Wang and Ding 2001). هم‌چنین Sun et al. (2007) گزارش کردند که تیمار با آبسیزیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز شیکونین در گیاه *Onosma paniculatum* در یک الگوی وابسته به زمان می‌شود به‌طوری این کاهش در فعالیت آنزیم، چهار ٤ روز پس از اعمال تیمار مشاهده شد ولی در نمونه‌برداری‌های بعدی ۸، ۱۲ و ۱٦ روز پس از اعمال تیمار تأثیر معنی‌داری نداشت. این در حالی است که طبق همین گزارش، ABA به‌رغم کاهش در فعالیت آنزیمی تأثیری روی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز شیکونین در این گیاه نداشت. در کل، تیمار با آبسیزیک اسید برای افزایش بیان ژن و سنتز بیشتر کروسین و سافرانال در کشت سوسپانسیونی زعفران می‌تواند مؤثر باشد.

منابع

Abdullaev FI (2002) Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). Experimental Biology and Medicine 227:20-25.

Ahrazem O, Rubio Moraga A, Lopez RC, Gomez L (2010) The expression of chromoplast specific beta lycopene cyclase gene is involved in the high production of saffron precursors. Journal of Experimental Botany 61:105-119.

Ashraf N, Jain D, Vishwakarma RA (2015) Identification, cloning and characterization of an ultrapetala transcription factor *CsULT1* from *Crocus*: a novel regulator of apocarotenoid biosynthesis. BMC Plant Biology 15:25

Bouvier F, Suire C, Mutterer J, Camara B (2003) Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in Crocus secondary metabolite biogenesis. Plant Cell 15:47-62.

Britton G (1998) Overview of carotenoid biosynthesis, in: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (Eds.), Carotenoids, Biosynthesis and Metabolism, Birkhäuser Verlag, Basel 3:13-147.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005) Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. Journal of Molecular Endocrionlogy 34:597-601.

Cao FY, Yoshioka K, Desveaux D (2011) The roles of ABA in plant-pathogen interactions. Journal of Plant Research 124:489-499.

Castillo R, Fernandez JA, Gomez-Gomez L (2005) Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives. Plant Physiology 139:674-689.

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. Annual Review of Plant Biology 61:651-679.

Du H, Wu N, Chang Y, Li X, Xiao J, Xiong L (2013) Carotenoid deficiency impairs ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. Plant Molecular Biology 83:475-88.

Dufresne C, Cormier F, Dorion S (1997) In vitro formation of crocetin glucosyl esters by *Crocus sativus* callus extract. Planta Medica 63:150-153.

Ebrahimzadeh H, Rajabian T, Abrishamchi P, Karamian R, Saboora O (2006) Saffron of Iran with a research perspective; Information Publishing House.

Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. Journal of Plant Research 124:509-525.

Garg R, Tyagi AS, Jain M (2012) Microarray analysis reveals overlapping and specific transcriptional response to different plant hormones in rice. Plant Signaling and Behavior 7:951-956.

Guan, L, Zhao J, Scandalios JG (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Catl antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress:

H_2O_2 is the likely intermediary signaling molecule for the response. Plant Journal 22:87-95.
Guo L, Yang H, Zhang X, Yang S. (2013) Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany 64:1755-67.
Karuppusamy S (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research 3:1222-1239.
Liao Y, Zhang JS, Chen SY, Zhang WK. (2008) Role of soybean GmbZIP132 under abscisic acid and salt stresses. Journal of Integrated Plant Biology 50:221-30.
Luo J, Liu L, Wu CD (2001) Enhancement of paclitaxel production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Biotechnology Letters 23:1345-1348.
Mir JI, Ahmed N, Mokhdomi TA, Wafai AH, Wani SH, Bukhari S (2013) Relative Expression of Apocarotenoid Biosynthetic Genes in Developing Stigmas of *Crocus sativus* L.Journal of Crop Science and Biotechnology 16:183-188.
Mir JI, Ahmed N, Wafai AH, Qadri RA (2012) Relative expression of CsZCD gene and apocarotenoid biosynthesis during stigma development in *Crocus sativus* L. Physiology and Molecular Biology of Plants 18:371-375.
Moraga AR, Nohales PF, Pérez JAF, Gómez-Gómez L (2004) Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas. Planta 219:955-966
Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH (1995) Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. Cancer Biotherapy 10:257-264.
Pfander H, Schurtenberger H (1982) Biosynthesis of C20-carotenoids in *Crocus sativus*. Phytochemistry 21:1039-1042.
Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. Plant Cell Physiology 52:1569-1582.
Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. Trends in Plant Science 15:395-401.
Rao RS, Ravishankar GA (2002) Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20:101-153.
Rios JL, Recio MC, Giner RM, Máñez S (1996) An update review of saffron and its active constituents. Phytotherapy Research 10:189-193.
Seo PJ, Xiang F, Qiao M, Park JY, Lee YN, Kim SG, Lee YH, Park WJ, Park CM (2009) The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. Plant Physiology 151:275-89.
Sun D-Y, Yin Z-J, Wu S-J, Su J, Shi S, Wu H, Xiao F-H, Qi J-L, Liu Z, Pang Y-J et al. (2007) Effects of abscisic acid on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. Russian Journal of Plant Physiology 54:530-535.
Tarantilis PA, Morjani H, Polissiou M, Manfait M (1994) Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. Anticancer Research 14:1913-1918.
Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant Journal 45:523-39.
Wang CZ, Ding JY (2001) Effects of different media and phytohormones on the growth and ginsenoside content of *Panax quinquefolium* L. Hairy Root. Journal of Plant Resources and Environment 10:1-4.
Wang X, Wang Z, Dong J, Wang M, Gao H (2009) Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene and the responses of *Caragana korshinskii* to a variety of abiotic stresses. Genes and Genetic Systems 84:397-405.
Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell 6:251-64.
Yamburenko MV, Zubo YO, Vanková R, Kusnetsov VV, Kulaeva ON, Börner T (2013) Abscisic acid represses the transcription of chloroplast genes. Journal of Experimental Botany 64:4491-4502.
Zou X, Seemann JR, Neuman D, Shen QJ. (2004) A WRKY gene from creosote bush encodes an activator of the abscisic acid signaling pathway. Journal of Biology and Chemistry 279:55770-9.