

بررسی اثر فلز روی بر بیان ژن لیمون سینتاز در زیره سبز با PCR در زمان واقعی

محمد طغرلی^۱، جعفر وطن دوست^{۲*} و ملک حسین اسدی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار

پست الکترونیک: j.vatan@hsu.ac.ir

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی و فناوری پیشرفته، کرمان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۲۸

چکیده

روی به‌عنوان یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان، نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای متابولیکی گیاهان از جمله بیان ژن لیمون سینتاز برعهده دارد. لیمون سینتاز به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز روغن‌های فرار می‌باشد که در واکنش‌های دفاعی گیاهان نقش دارد. از این‌رو در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف روی بر بیان ژن لیمون سینتاز در زیره سبز و در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن با روش Real time PCR بررسی شد. نتایج مقایسه میانگین میزان بیان ژن با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در غلظت‌های مختلف نشان داد که در گیاهان تیمار شده، افزایش غلظت روی تا ۱۰۰ میکرومولار با افزایش بیان ژن لیمون سینتاز رابطه مستقیم دارد. با توجه به نقش آنزیم لیمون سینتاز، افزایش بیان آن می‌تواند از طریق افزایش تولید مونوترین‌ها در گیاه باعث تولید بیشتر روغن‌های فرار و در نتیجه محافظت گیاه در مقابل علف‌خوارها شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، روی، زیره سبز، لیمون سینتاز، Real time PCR

مقدمه

خاصیت آنتی‌اکسیدانی، خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی است (Takayuki *et al.*, 2007). عصاره زیره سبز میزان قند خون و کلسترول مضر LDL اکسید شده را کاهش و فعالیت آریل استرازی آنزیم پاراکسوناز را افزایش می‌دهد که این ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد (Willer *et al.*, Thippeswamy *et al.*, 2005) 2008 فلاونوئیدهای موجود در زیره سبز احتمالاً با کاهش رادیکال‌های آزاد، پیشگیری از سرطان و یا مهار آن را انجام می‌دهند و باعث مهار تجمع پلاکت‌ها نیز می‌شوند (Srivastava, 1989 Ghorbanli *et al.*, 2012).

زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) یکی از مهمترین گیاهان دارویی است که نه تنها در فهرست قدیمی‌ترین گیاهان دارویی جهان ثبت شده است، بلکه در فهرست جدیدترین منابع ارائه شده نیز جایگاه خود را حفظ کرده است. زیره سبز گیاهی یکساله، دگرگشن و دارای عدد کروموزومی $2n = 14$ است. این گیاه یکی از محصولات مهم صادراتی است که با توجه به شرایط خاص اکولوژیکی مورد نیاز برای کشت آن، در مناطق محدودی از جهان تولید می‌شود. زیره سبز دارای خواص دارویی فراوانی از جمله

آنها شده و در نتیجه سبب محافظت آنها شود (Lücker *et al.*, 2004). همچنین مونوترین‌هایی مانند لیمون به مقدار زیادی در روغن‌ها و رزین‌ها وجود دارند و ذخیره‌سازی آنها اغلب با ساختارهای ترش‌ی پیچیده مانند کرک‌های غده‌ای، حفره‌های ترش‌ی یا مجاری رزینی ارتباط دارد. سنتز زیاد مونوترین‌ها با فعالیت بالای سلول‌های این ساختارها که محل بیوسنتز و ذخیره آنها هستند ارتباط دارد و عمدتاً در بافت‌های جوان مولد، بیشترین فعالیت را دارد (Gershenzon *et al.*, 2000).

ژن لیمون سینتاز در زیره سبز وجود دارد (Ghannadnia *et al.*, 2011) و بیان آن می‌تواند تحت تأثیر عناصر ریزمغذی از جمله روی قرار گیرد. فلز روی یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان بوده و در بسیاری از فرایندهای متابولیکی گیاه نقش دارد. این فلز به‌عنوان فعال‌کننده و کوفاکتور برخی آنزیم‌های حیاتی گیاه از جمله کریونیک انیدرازها، دهیدرونازها، آلکالین فسفاتازها، فسفولیپازها و RNA پلیمرازها در متابولیسم پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها، فتوسنتز گیاه و بیوسنتز اکسین به‌عنوان یک هورمون رشد ایفای نقش می‌کند (Rion *et al.*, 2004). همچنین این عنصر در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی گیاه نقش کاتالیزور فعال‌کننده یا ساختمانی دارد. عنصر روی سنتز پروتئین را افزایش داده و با انتقال اسید آمینه و کاهش جذب و تخریب RNA از تجمع اسیدهای آمینه در گیاه می‌کاهد (Brown *et al.*, 1993). در پژوهش‌های گذشته Ghannadnia و همکاران (۲۰۱۱)، تأثیر منگنز بر بیان ژن لیمون سینتاز و Yousefi و همکاران (۲۰۱۱) اثر غلظت‌های مختلف الیسیاتور نقره بر بیان ژن فلاون سینتاز ۱ را در زیره سبز بررسی کردند. همینطور Zarei و همکاران (۲۰۱۴) نیز به بررسی اثر غلظت‌های مختلف مس بر روی بیان ژن لیمون سینتاز در زیره سبز پرداختند. با توجه به بیان ژن لیمون سینتاز در زیره سبز و همچنین نقش روی به‌عنوان یک عنصر ریزمغذی مهم، تأثیر تیمارهای متفاوت روی بر بیان ژن لیمون سینتاز در گیاه زیره سبز مطالعه شد.

ویژگی‌های دارویی مهم زیره سبز مربوط به قسمت مهم و مورد استفاده این گیاه یعنی میوه آن است که دارای حدود ۲-۵ درصد روغن فرار است (Kan Behera *et al.*, 2004, *et al.*, 2007). ترکیبات ثانویه زیادی از جمله فلاونوئیدها و ترپنوئیدها عمده اجزای تشکیل‌دهنده روغن‌های فرار این گیاه هستند (Thippeswamy *et al.*, 2005). ترپنوئیدها بزرگترین گروه از متابولیت‌های ثانویه گیاهی و متنوع‌ترین ترکیبات به‌لحاظ ساختاری و عملکردی هستند که برخی از انواع فرار آنها در واکنش‌های دفاعی گیاهان نقش دارند (Zwenger *et al.*, 2008, Dudareva *et al.*, 2006). از رایج‌ترین و ساده‌ترین مونوترین‌ها، لیمون است که در ابتدای مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها، یک عامل محدودکننده در تولید این ترکیبات شیمیایی است (Gershenzon *et al.*, 1999, 2000, Mahmoud *et al.*, 2004). در واقع لیمون از پیش‌ماده ژرانیل دی فسفات (GPP) به‌وسیله لیمون سینتاز بوجود می‌آید. لیمون سینتاز به‌عنوان یک آنزیم سیکلاز عامل مهمی در مسیر بیوسنتزی روغن‌های فرار به‌شمار می‌رود. بنابراین هرگونه دست‌ورزی در بیان ژن‌های آنها می‌تواند موجب تغییر ترکیب‌های موجود در روغن‌های فرار گیاهی (مانند عطر و اسانس)، تولید مونوترین‌ها در اندام‌هایی از گیاه که آنها را تولید نمی‌کنند و یا حتی گونه‌هایی که فاقد آنها هستند، شود (Muñoz-Bertomeu *et al.*, Kjonaas *et al.*, 1983, 2008). بیان ژن لیمون سینتاز در جوانترین مراحل نمو گل‌ها زیاد بوده و به تدریج کاهش می‌یابد، همچنین این ژن در مراحل مختلف رشد و نمو گیاهان کامل، از گیاهچه‌های دو برگی تا مرحله گلدهی بیان می‌شود. حداکثر بیان ژن لیمون سینتاز در ساقه بوده و بیان بالای ژن لیمون سینتاز در اندام‌های جوان زایشی مولد ثابت شده است، در حالی‌که بیان زیاد آن در بافت رویشی ساقه و کل دوره زندگی گیاه قابل توجه است (Zarinkamar *et al.*, 2012). همچنین زیاد بودن پیش‌ماده سنتز مونوترین‌ها (GPP) در بافت‌های جوان می‌تواند سبب تولید سریع مونوترین‌ها در این بافت‌ها برای دفع علف‌خوارها و یا جذب شکارگرهای

مواد و روش‌ها

تهیه بذر و کشت در گلخانه: بذر گیاه زیره سبز از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرهای به مدت ۲۴-۳۶ ساعت در آب جاری قرار گرفتند. سپس به وسیله هیپوکلریت سدیم ۲٪ (محلول وایتکس) به مدت ۳ دقیقه و محلول قارچکش گوگردی (۸۰٪ sulfur) به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. بذرهای طی دو مرحله فوق و نیز در پایان ۳ مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. با توجه به رویش بهتر زیره سبز در خاک‌های با بافت سبک و ماسه‌ای، بذرهای استریل شده در گلدان‌های حاوی خاک رس و پیت ماس و ماسه (به نسبت ۱:۱:۱) کشت شدند و در شرایط یکنواخت گلخانه‌ای (۱۶ ساعت روشنایی با استفاده از نور مصنوعی، ۸ ساعت تاریکی و دمای $3 \pm 23^{\circ}\text{C}$) قرار داده شدند. طرح آزمایشی این پژوهش از نوع آزمایشگاهی و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۴ تیمار اجرا شد. تجزیه واریانس داده‌ها در سطح ۱ درصد و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

آماده‌سازی الیسیتورها و تیمار نمونه‌ها: برای آماده‌سازی الیسیتورها، غلظت‌های مختلفی از سولفات روی ($0, 25, 50, 100 \mu\text{M}$) تهیه شد. این غلظت‌ها براساس گزارش‌های قبلی تأثیر سایر الیسیتورها انتخاب شد. برای تیمار نمونه‌ها، گیاهان در مرحله دو برگگی با ریشه و به صورت کامل از خاک جدا شده و تحت تیمار با غلظت‌های مختلف روی که از قبل تهیه شده بودند، قرار گرفتند. با توجه به اینکه هر غلظت دارای ۳ تکرار بود، بدین ترتیب ۱۲ نمونه جدا شده و درون ۱۲ شیشه جداگانه، که هر یک حاوی غلظت‌های مختلف روی بودند، در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت چهار ساعت تحت تیمار با سولفات روی قرار گرفتند. پس از تیمار با سولفات روی، در شرایط استریل از اندام‌های هوایی (ساقه، برگ) گیاه نمونه برداری انجام شد و نمونه‌ها پس از تثبیت در ازت مایع به مدت ۵ دقیقه، در فریزر -80°C نگهداری شدند (Ghannadnia et al., 2011).

استخراج RNA: استخراج RNA کل سلول توسط کیت

استخراج RNX-Plus (شرکت سیناژن) انجام گردید، بدین صورت که مقدار ۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاه داخل یک هاون چینی استریل همراه با نیتروژن مایع به خوبی کوبیده شد. سپس به بافت کوبیده شده ۱ میلی‌لیتر محلول RNX-Plus و بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد. به دنبال سانتریفیوژ مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، فاز بالایی که حاوی RNA بود به آرامی برداشته شد و هم حجم آن، ایزوپروپانول خنک اضافه شد. پس از سانتریفیوژ دوباره با شرایط قبل و خارج کردن مایع رویی، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ به آن افزوده شد و نمونه به مدت ۸ دقیقه در دمای 4°C با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب تشکیل شده، ۳۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC، diethyl pyrocarbonate) اضافه شد و در نهایت RNA استخراج شده، به فریزر با دمای -80°C منتقل شد. کمیت و کیفیت RNA با روش UV اسپکتروفتومتری (مدل Varian - CARY 50) (خواندن جذب در طول موج ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر، محاسبه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰) و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

سنتز cDNA: برای سنتز cDNA از آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (M-MuLV) با استفاده از ۲ میکروگرم RNA کل و الیگومر تیمیدین (Oligo dT18) به عنوان آغازگر استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا ۲ میکروگرم RNA کل با ۹ μl آب تیمار شده با DEPC و ۱ μl الیگو dT و ۰/۵ μl ممانعت کننده RNase و ۱ μl مخلوط 10 Mm dNTP ترکیب شد. این مواد به مدت ۵ دقیقه در دمای 65°C در دستگاه ترموسایکلر و پس از آن به مدت ۳ تا ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. در مرحله بعد ۴ μl بافر Reaction ۱۰X و ۰/۵ ممانعت کننده RNase و ۱ μl آنزیم رونوشت‌بردار معکوس M-MuLV به ترکیب اضافه شد. در نهایت مخلوط تهیه شده در دمای 42°C به مدت ۱ ساعت و برای غیرفعال شدن آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه

کنترل داخلی با استفاده از توالی ژن از سایت NCBI به ترتیب با شماره دسترسی JN388566.1 و XM_006472309.1 و توسط نرم افزار Gene Runner طراحی شد.

در ترموسایکلر قرار داده شد. سپس cDNA حاصل در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

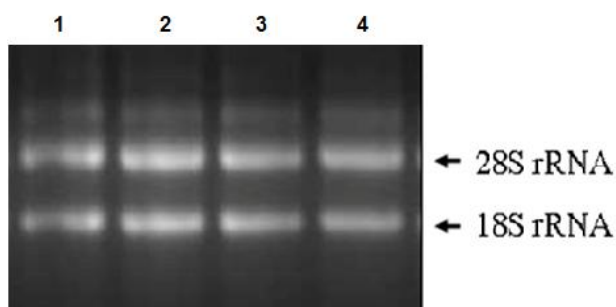
جفت پرایمرهای LS و AT به ترتیب برای تکثیر ژن لیمونن سینتاز به عنوان ژن اصلی و آلفا توبولین به عنوان

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	میزان GC (%)	دمای اتصال (°C)
LSF	5'-CCCTTAACAATTCGCCAG-3'	۴۷/۴	۵۵
LSR	5'-CCACTGTAATACCACCGAGC-3'	۵۵	۵۴/۴
ATF	5'-TTCAGTTCACATCGGTCAGG-3'	۵۰	۵۴/۷
ATR	5'-CTTCCAGCACCAGTTTCAC-3'	۵۰	۵۴/۲

LS: لیمونن سینتاز، AT: توبولین سینتاز

باید ژنی از جمله ژنهای خانه زاد باشد که بیان آن هنگام انجام آزمایش تغییر نکند.



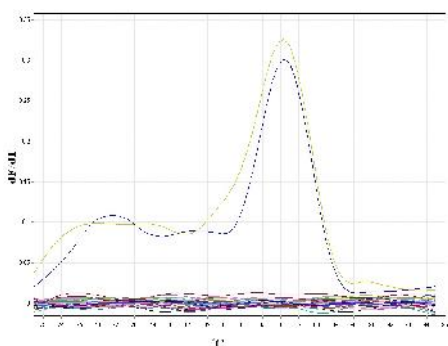
شکل ۱- کیفیت RNAهای استخراج شده از نمونه های تیمار شده با غلظت های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار سولفات روی

نتایج

استخراج RNA: کمی و کیفیت RNAهای استخراج شده به کمک دستگاه های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی مورد بررسی قرار گرفت. وجود دو باند 28S و 18S در rRNA نشان دهنده سالم بودن RNA و عدم وجود باند اضافی نشان دهنده خلوص آن می باشد (شکل ۱). همچنین

بررسی بیان ژن: برای بررسی بیان ژن لیمونن سینتاز از روش سنجش کمی Real Time PCR استفاده شد. مرحله بعد، کنترل اتصال اختصاصی پرایمرها به توالی هدف و تعیین یک دمای اتصال مناسب بود که برای پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش، با چندین بار تغییر دما در PCR، بهترین دما برای اتصال پرایمرها انتخاب شد. بهترین شرایط برای تکثیر ژن لیمونن سینتاز، دمای اتصال ۶۰°C با تعداد ۴۰ دوره و برای ژن آلفا توبولین دمای اتصال ۵۸°C با تعداد ۴۰ دوره انتخاب شد. مراحل Real Time PCR شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، سپس ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰°C برای ژن لیمونن سینتاز و ۵۸°C برای ژن آلفا توبولین به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه دنبال شد. در این پژوهش برای سنجش بیان ژن از دستگاه Rotor Gene 3000 و برای تجزیه و تحلیل داده های حاصل از Real time PCR از روش پی فافل و نرم افزار 9.1.3 portable و SAS برای آنالیز داده ها استفاده شد. در روش پی فافل، بیان ژن مورد نظر به طور نسبی در مقایسه با بیان یک ژن مرجع سنجیده می شود. در این روش، بازدهی تکثیر و سطح آستانه نمونه نامعلوم در مقابل نمونه کنترل به دست می آید. ژن مرجع نیز

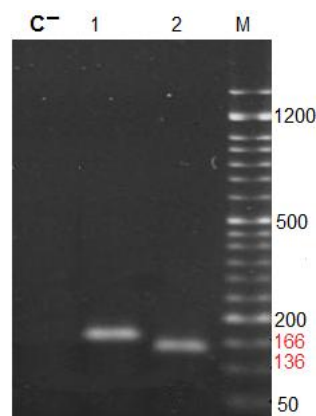
شده بین دو رشته DNA بیشتر و در نتیجه میزان نور فلورسنت ساطع شده نیز بیشتر خواهد شد. برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد و یک دوره آستانه (Ct) به دست آمد که نشان‌دهنده دوره‌ای می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است. از این رو منحنی لگاریتمی تکثیر براساس شدت نور فلورسنت ترسیم و دوره آغاز تکثیر مشخص شد. نمودار منحنی ذوب نیز نشان داد که دمای ذوب (Tm) محصول ژن لیمونین سینتاز و آلفا توبولین به ترتیب حدود ۸۶ و ۸۷/۵ درجه است (شکل ۳). همچنین منحنی ذوب ژن لیمونین سینتاز و آلفا توبولین، اختصاصی بودن واکنش Real Time PCR این دو ژن را نشان داد. وجود تنها یک قله در منحنی ذوب ژن‌ها نشان‌دهنده این مطلب است که محصول PCR این دو به صورت اختصاصی تکثیر شده است. برای مشخص شدن بازدهی آزمایش، بازدهی PCR به دست آمد. برای به دست آوردن بازدهی PCR برای ژن لیمونین سینتاز و آلفا توبولین (به عنوان کنترل)، ۳ رقت ۱، ۱۰، ۱۰۰ از یک cdNA مرجع تهیه شد و بدین ترتیب با کم شدن ۱۰ برابری رقت‌های cdNA میزان تکثیر ژن‌ها توسط دستگاه سنجیده و به صورت درصد مشخص می‌شود. بعد از انجام واکنش، بازدهی ژن لیمونین سینتاز و کنترل به ترتیب برابر با ۱۰۰ و ۹۹ درصد به دست آمد (شکل ۴).



شکل ۳- نمودار شدت نور فلورسنت بر حسب دمای ذوب برای تعیین منحنی ذوب محصول ژن لیمونین سینتاز

نسبت جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260 به A280 بین ۱/۹ - ۱/۸ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده می‌باشد.

سنتز cdNA: پس از استخراج RNA، cdNA مربوط به هر نمونه با استفاده از پرایمرهای الیگوتیمیدین و آنزیم رونوشت بردار معکوس (M-MuLV) ساخته شد. برای یافتن دمای اتصال مناسب پرایمرهای ژن هدف (لیمونین سینتاز) و کنترل (آلفا توبولین)، واکنش گرادیان PCR انجام شد و مناسب‌ترین دما برای پرایمرهای اختصاصی انتخاب شد که بهترین دما برای پرایمرهای ژن هدف ۶۰ درجه و برای کنترل داخلی ۵۸ درجه سانتی‌گراد مشخص شد. تک باند در محدوده ۱۳۶ bp برای ژن هدف و در محدوده ۱۶۶bp برای آلفا توبولین در مورد همه نمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۲).



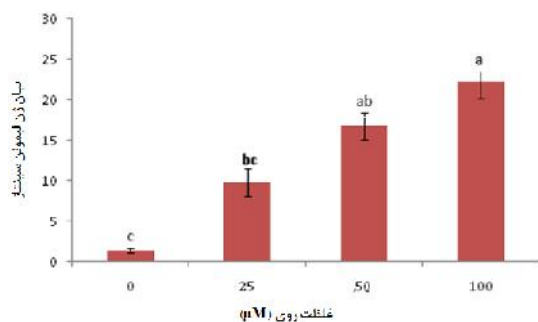
شکل ۲- تصویر حاصل از تکثیر ژن آلفا توبولین (۱) و لیمونین سینتاز (۲). C: کنترل منفی و M مارکر 50 bp (BioLab)

واکنش Real Time PCR: تکثیر ژن لیمونین سینتاز و ژن آلفا توبولین با روش Real Time PCR براساس DNA ساخته شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. در طی انجام واکنش، دستگاه Real Time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر دوره را به صورت منحنی تکثیر نشان داد، به طوری که هر چه میزان محصول تولید شده بیشتر شود، میزان رنگ‌های متصل

تا ۱۰۰ میکرومولار در محیط کشت زیره سبز باعث افزایش بیان ژن نسبت به نمونه شاهد می‌شود و در غلظت ۱۰۰ μM بیشترین میزان بیان ژن را نسبت به نمونه شاهد نشان می‌دهد. البته بین تیمار شاهد (۰) با تیمار (۲۵) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما تیمار شاهد از نظر آماری با تیمارهای (۵۰) و (۱۰۰) اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن

تیمار	میزان بیان ژن لیمون سینتاز (LS)
۰	۱/۳۸۸ ^c
۲۵	۹/۷۸۷ ^{bc}
۵۰	۱۶/۷۵۵ ^{ab}
۱۰۰	۲۲/۲۲۵ ^a

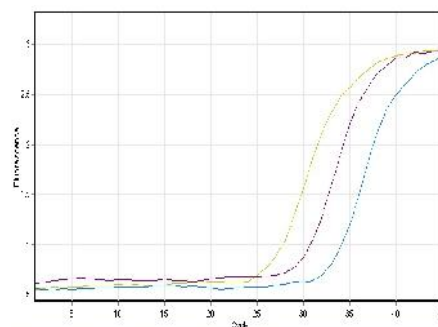


شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف روی بیان ژن لیمون سینتاز

وجود حروف مشترک بین تیمارها، نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار بین آنها و نبود حروف مشترک بین تیمارها و نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین آنهاست.

بحث

زیره سبز یکی از مهمترین گیاهان دارویی با ارزش می‌باشد که مطالعات کمی تاکنون در رابطه با عملکرد ژن‌های این گیاه انجام شده است. ژن لیمون سینتاز در زیره سبز به‌عنوان یک عامل مهم در مسیر بیوسنتز روغن‌های فرار می‌باشد و افزایش بیان آن منجر به افزایش تولید



شکل ۴- نمودار شدت نور فلورسنت برحسب دوره‌های PCR

منحنی‌ها از چپ به راست مربوط به رقت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰

تأثیر روی بیان ژن لیمون سینتاز: پس از انجام واکنش Real Time PCR و پردازش اطلاعات حاصل از منحنی‌های استاندارد و به‌دست آوردن Ct برای هر دو ژن لیمون سینتاز و آلفاتوبولین برای تمام نمونه‌ها، از روش پی‌فافل و نرم‌افزار SAS 9.1.3 portable برای آنالیز داده‌ها استفاده شد.

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش، اثر غلظت‌های سولفات روی بر بیان ژن لیمون سینتاز در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر

غلظت‌های مختلف سولفات روی بر بیان ژن لیمون سینتاز

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۲۴۳/۵۰.**
خطای آزمایش	۸	۲۱/۷۸

** اختلاف بین تیمارها از نظر آماری در سطح ۱ درصد را نشان می‌دهد.

نتایج مقایسه میانگین میزان بیان ژن با آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که الیسیتور روی در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن لیمون سینتاز نسبت به نمونه شاهد (۰) می‌شود، اما غلظت ۲۵ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد (۰) اختلاف معنی‌داری نداشت. با توجه به نتایج این پژوهش، وجود الیسیتور روی

می‌تواند دلیلی بر فعال شدن مسیر ترپنوئیدها در پاسخ به تنش حاصل از این فلزات باشد (Zarei, 2014). مطالعات Ibrahim و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که احتمالاً تولید مونوترپن‌ها مانند لیمونین گیاهان را در طی مراحل رشد و نمو از عوامل بیماری‌زا و علف‌خواری محافظت می‌کند. همچنین Muñoz و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که گیاه نعنای تراریخت با ژن لیمونین سینتاز می‌تواند پیش‌ماده ژرانیل دی فسفات (GPP) را به لیمونین، پینن و میرسن تبدیل کند که خاصیت دفاعی گیاه را افزایش می‌دهند. بررسی‌های Lücker و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان داد که زیاد بودن پیش‌ماده سنتز مونوترپن‌ها و ژرانیل دی فسفات (GPP)، در بافت‌های جوان می‌تواند سبب تولید سریع مونوترپن‌ها در این بافت‌ها برای دفع علف‌خوارها و یا جذب شکارگرهای آنها شده و در نتیجه سبب محافظت آنها شود. با توجه به پژوهش‌های ذکرشده، ژن لیمونین سینتاز می‌تواند به‌عنوان یک عامل مهم در مسیر بیوسنتز روغن‌های فرار باشد. همچنین از آنجایی که مونوترپن‌ها در روغن‌های فرار گیاهی وجود دارند، در نتیجه افزایش بیان این ژن، با افزایش تولید مونوترپن‌ها در گیاه، می‌تواند تولید روغن‌های فرار را بیشتر کرده و در نتیجه باعث دفع علف‌خوارها و محافظت گیاه در مقابل آنها شود.

منابع مورد استفاده

- Behera, S., Nagarajan, S. and Jagan Mohan Rao, L., 2004. Microwave heating and conventional roasting of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) and effect on chemical composition of volatiles. *Food chemistry*, 87: 25-29.
- Brown, P.H., Cakmak, I. and Zhang, Q., 1993. Form and function of zinc plants. Springer, 93-106.
- Dorling, J., Leung, S., Anderson, C., Albert, W. and McManus, M., 2011. Changes in 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase expression and enzyme activity in response to excess manganese in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1013-1019.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. and Orlova, I., 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25: 417-440.

مونوترپن‌ها در گیاه می‌شود. از جمله عواملی که می‌تواند بر کیفیت و میزان تولید مونوترپن‌ها تأثیر بگذارد جذب عناصر غذایی میکرو می‌باشد که در مسیرهای بیوسنتزی روغن‌های فرار نقش کلیدی دارند (Dorling *et al.*, 2011). از آنجایی که روی به‌عنوان یک ریزمغذی مهم و کوفاکتور آنزیم RNA پلیمرز در سنتز پروتئین‌ها و افزایش متابولیسم پروتئین‌ها نقش اساسی دارد (Rion *et al.*, 2004)، از این‌رو در این پژوهش، تأثیر غلظت‌های مختلف روی بر بیان ژن لیمونین سینتاز در زیره سبز بررسی شد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزایش غلظت روی تا ۱۰۰ میکرو مولار در محیط کشت زیره سبز باعث افزایش بیان ژن لیمونین سینتاز می‌شود، به‌طوری‌که از نظر آماری غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد (۰) داشتند. در نتیجه غلظت عنصر روی تا ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش بیان ژن لیمونین سینتاز در زیره سبز می‌شود.

البته بیان ژن لیمونین سینتاز در حضور عناصر میکرو توسط سایر محققان نیز تأیید شده است. قنادینیا و همکاران در مطالعه خود با تأثیر چهار غلظت (۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰) از منگنز بر بیان ژن لیمونین سینتاز نشان دادند که بیشترین مقدار منگنز جذب شده و بیشترین بیان ژن لیمونین سینتاز در گیاهان تیمار شده در غلظت ۸۰ ppm بود (Ghannadnia *et al.*, 2011). همچنین نتایج حاصل از تحقیق اثر غلظت‌های مختلف الیسیاتور نقره ($0, 25, 50, 100 \mu\text{M}$) بر بیان ژن فلاون سینتاز ۱ در زیره سبز، نشان داد که این الیسیاتور در دو غلظت ۵۰ و ۲۵ باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن و همچنین محتوای فلاونوئید کل نسبت به نمونه کنترل (۰) می‌شود (Yousefi *et al.*, 2011). زارعی و همکاران نیز با بررسی اثر غلظت‌های مختلف مس بر روی بیان ژن لیمونین سینتاز در زیره سبز، به این نتیجه رسیدند که وجود الیسیاتور مس تا غلظت $60 \mu\text{M}$ در محیط کشت زیره سبز باعث افزایش بیان ژن لیمونین سینتاز می‌شود و افزایش بیان ژن لیمونین سینتاز در مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها

- Rion, B. and Alloway, J., 2004. Fundamental aspects of zinc in soils and plants, International Zinc Association, 1-128.
- Srivastava, K., 1989. Extracts from two frequently consumed spices cumin (*Cuminum cyminum*) and turmeric (*Curcuma longa*) inhibit platelet aggregation and alter eicosanoid biosynthesis in human blood platelets. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 37: 57-64.
- Takayuki, S., Sugano, M., Majid, A. and Fujii, Y., 2007. Antifungal effects of volatile compounds from black zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs. Journal of Chemical Ecology, 33: 2123-2132.
- Thippeswamy, N. and Naidu, K.A., 2005. Antioxidant potency of cumin varieties cumin, black cumin and bitter cumin on antioxidant systems. Journal of European Food Research and Technology, 220: 472-476.
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E., Froehlich, J. and Croteau, R., 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. Plant Physiology, 120: 879-886.
- Willer, C., Sanna, S., Jackson, A., Scuteri, A., Bonnycastle, L. and Stringham, H., 2008. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. Nature Genetics, 40: 161-169.
- Yousefi, K., Riahi, A. and Nasiri, M., 2011. Study of flavone synthase 1 (FNS1) gene expression in of cumin (*Cuminum cyminum*) in the presence of different concentrations of silver elicitors 12th Iranian Genetics Congress, Tehran.
- Zarei, M. 2014. Study of limonene synthase gene expression in the presence of different copper concentrations in *Cuminum cyminum* L. M.Sc. Thesis, Azad University of Sabzevar, Sabzevar .
- Zarinkamar, F., Ghannadnia, M. and Haddad, R., 2012. Limonene synthase gene expression under different concentrations of manganese in *Cuminum cyminum* L. African Journal of Plant Science, 6: 203-212.
- Zwenger, S. and Basu, C., 2008. Plant terpenoids: applications and future potentials. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 3: 1-7.
- Gershenzon, J., McConkey, M. and Croteau, R., 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. Plant Physiology, 122: 205-214.
- Ghannadnia, M., Haddad, R., Zarinkamar, F. and Sharifi, M., 2011. Different expression of limonene synthase gene in organs and developmental stages of cumin (*Cuminum cyminum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27: 495-501.
- Ghorbanli, M., Ahmadi, F., Monfared, A. and Bakhshi Khaniki, Gh., 2012. Effect of salt stress and its interaction with ascorbate on catalase, ascorbate peroxidase activity, proline and malondialdehyde in *Cuminum cyminum* L. four weeks after germination. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28: 14-21.
- Ibrahim, M., Kainulainen, P. and Aflatuni, A., 2008. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. Agricultural and Food Science, 10: 243-259.
- Kan, Y., Kartal, M., Ozek, T., Aslan, S. and Baser, K., 2007. Composition of essential oil of *Cuminum cyminum* L. according to harvesting times. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 1: 25-29.
- Kjonaas, R. and Croteau, R., 1983. Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other *Mentha* species. Archives of Biochemistry and Biophysics, 220: 79-89.
- Lücker, J., Schwab, W., van Hautum, B., Blaas, J., van der Plas, L.H.W., Bouwmeester, H.J. and Verhoeven, H.A., 2004. Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. Plant Physiology, 134: 510-519.
- Mahmoud, S., Williams, M. and Croteau, R., 2004. Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. Phytochemistry, 65: 547-554.
- Muñoz-Bertomeu, J., Ros, R., Arrillaga, I. and Segura, J., 2008. Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. Metabolic Engineering, 10: 166-177.

Study of zinc effect on limonene synthase gene expression in cumin by Real Time PCR

M. Toghrol¹, J. Vatandoost^{2*} and M.H. Asadi³

1. M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Sabzevar, I.R. Iran.

2*. Corresponding author Assis. Prof., Department of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. Iran,
E-mail: j.vatan@hsu.ac.ir

3. Assis. Prof., Department of Biotechnology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. Iran.

Received: 19.11.2015

Accepted: 21.05.2016

Abstract

Zinc as an essential element for plant growth, plays an important role in many metabolic processes of plants, such as limonene synthase gene expression pathway. Limonene synthase is considered as an important enzyme in volatile oil biosynthesis that plays significant role in plant defensive reactions. In the present study, limonene synthase gene expression in Cumin was evaluated in presence of different concentration of Zinc elicitors based on a completely randomized design. Total RNA was extracted and cDNA synthesis was performed and Real Time PCR quantity assay method was used for limonene synthase gene expression. Results of the comparison of gene expression with Duncan's multiple range tests in different concentrations showed that in treated plants, there was a direct correlation between increasing of Zinc concentration up to 100 μ M and limonene synthase gene expression. Limonene synthase gene expression by increasing production of monoterpenes may produce more volatile oils in plant species and thus protects the plant against herbivores.

Keywords: *Cuminum cyminum*, gene expression, limonene synthase, real time PCR, zinc.