

اثر برخی نانوذرات بر بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) در گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* L.) تحت تنش کم‌آبی

حدیث موسوی^۱، نفیسه مهدی‌نژاد^{۲*}، براتعلی فاخری^۳، محمد مجدی^۴ و فروزان حیدری^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

پست الکترونیک: nmahdinezhad@uoz.ac.ir

۳- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۴- استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۵- مربی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۴

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

چکیده

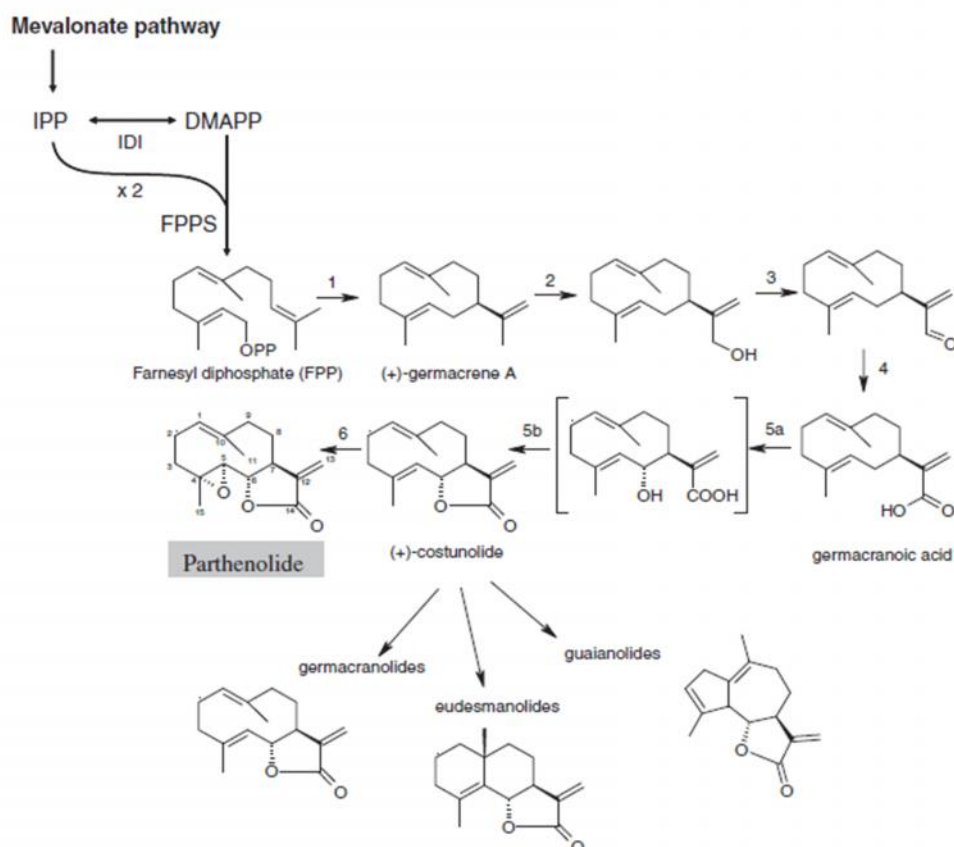
به منظور بررسی تأثیر اسپری نانو کلات آهن و نانوذرات نقره سنتز شیمیایی و سنتز سبز بر میزان بیان دو ژن جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) دخیل در مسیر بیوسنتزی پارتنولید در گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* L.)، آزمایشی به صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل اجرا شد. RNA کل از نمونه‌های برگ‌گی استخراج و به دنبال آن cDNA سنتز و برای بررسی الگوی بیان ژن از واکنش Real Time PCR استفاده شد. میزان پارتنولید موجود در عصاره گیاهان به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) سنجش شد. داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. افزایش معنی‌داری ($P < 0.01$) در بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) در گیاهان تیمار شده با نانو ذره نقره سنتز سبز نسبت به گیاهان شاهد، گیاهان تیمار شده با نانو ذره نقره سنتز شیمیایی و نانو کلات آهن مشاهده شد و بیشترین بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) در گیاهانی که تحت تنش خشکی و تیمار با نانوذرات نقره سنتز سبز قرار گرفته بودند، ثبت شد. همبستگی مثبتی بین بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) با میزان پارتنولید مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد نانوذرات نقره سنتز سبز و تنش کم آبی می‌توانند به عنوان القاءکننده سبب افزایش بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) و به دنبال آن افزایش تولید پارتنولید در گیاه بابونه کبیر شوند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پارتنولید، تنش خشکی، سنتز سبز، نانوذرات.

مقدمه

گیاه بابونه کبیر در فرهنگ نام‌های گیاهان ایران به نام بابونه گاوی و نام محلی مخلصه با اسم علمی *Tanacetum parthenium* نامگذاری شده است. بابونه کبیر گیاهیست که دو یا چندساله، دارای ساقه‌ای مستقیم با شیارهای طولی به ارتفاع ۳۰ تا ۸۰ سانتی‌متر که برگ‌هایی نرم به رنگ سبز روشن، دمبرگ طویل، پهنک تخم‌مرغی و منقسم شانه‌ای است. منشأ اصلی آن در آسیای صغیر بوده است ولی امروزه در منطقه وسیعی از آسیا پراکندگی دارد (Blumenthal, 1998). ابوعلی سینا، رازی و سایر حکمای ایران از عصاره این گیاه در کنترل و درمان انواع ناراحتی‌ها مثل سردرد، افزایش ترشح عرق و ادرار استفاده می‌کردند (Jaimand & Rezaee, 2005). تحقیقات فراوان فارماکولوژی در اغلب کشورهای آسیایی و اروپایی نشان از مصرف فراوان این گیاه در درمان سردرد، میگرن، صدای زنگ در گوش، سرگیجه، آرتروز، تب و مسکن دردهای ناشی از آن، کاهش درد شکم، دندان درد و گزش حشرات دارد (Tiuman et al., 2005; Susrurluk et al., 2007). تحقیقات اخیر مخصوصاً پس از شناسایی ترکیب‌های مؤثره اسانس گیاه باعث شده که نتایج قابل توجهی از نحوه مصرف و اثربخشی آن بدست آید. ازجمله اینکه تمام اعضای گیاه مخصوصاً برگ و گل دارای اسانس قوی بوده و شامل نوعی الکل بورنئول، کامفور و انواع ترپین‌ها می‌باشد (Der marderosian, 2001). ترپنوییدها بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه هستند که شامل ۲۰ هزار ترکیب شناخته شده می‌باشند (Davis & Croteau, 2000). سزکویی‌ترین لاکتون‌ها (Sesquiterpene lactone) دسته اصلی ترپنوییدها می‌باشند که از یک ساختار ۱۵ کربنی بیسابالون (Bisabalone)، هیومولان (Humulane)، کوپاران (Cuparane) و ژرماکرانولیدها (Germacrane) تشکیل شده‌اند که گروه‌های عاملی دیگر به این ساختارها اضافه می‌شوند. این گونه ترکیب‌ها به‌ویژه در خانواده گل ستاره‌ای‌ها به فراوانی دیده می‌شوند و از لحاظ زیستی

دارای نقش‌های کلیدی در تعامل با محیط، ازجمله به‌عنوان ترکیب‌های دفاعی علیه پاتوژن‌ها و حشرات می‌باشند (Chappell & Coates, 2010). گیاه بابونه کبیر غنی از سزکویی‌ترین‌ها می‌باشد. سزکویی‌ترین لاکتون‌ها از فراوان‌ترین ترکیب‌های گیاه بوده و میان آنها پارتنولید که جزو گروه ژرماکرانولیدها است، تا ۸۵٪ محتوای سزکویی‌ترین گیاه را تشکیل داده و مسؤل فعالیت‌های بیولوژیکی گیاه است. سزکویی‌ترین لاکتون‌ها عمدتاً از مسیر موالانات مشتق می‌شوند. کاستونولید (Costunolide) پیش‌ماده مشترک تمام سزکویی‌ترین لاکتون‌های مشتق شده از ژرماکرانولید است (Kraker et al., 2002). مرحله اول در بیوسنتز کاستونولید حلقوی شدن فارسنیل دی فسفات به جرماکران A می‌باشد که به‌وسیله یک جرماکران A سنتاز می‌شود که یک مرحله محدودکننده سرعت می‌باشد (Bouwmeester, 2006). نشان داده شده است که یک جرماکران A اکسیداز که متعلق به آنزیم‌های خانواده Cytochrome P450 است، مسؤل تبدیل جرماکران A به ژرماکرانوبیک اسید می‌باشد (Cankar et al., 2011). احتمالاً کاستونولید به‌وسیله آنزیم پارتنولید سنتاز به پارتنولید تبدیل می‌شود. پارتنولید مانع تجمع پلاکت‌ها و ترشح سروتین و سایر ترکیب‌های التهاب‌زا از پلاکت‌ها می‌گردد. این ترکیب همچنین اثر ضد اسپاسم داشته و حساسیت و واکنش عضلات صاف دیواره رگ‌های خونی مغز را نسبت به بعضی ترکیب‌ها ازجمله سروتین و پروستاگلندین‌ها از بین می‌برد، در نتیجه همه این اثرات باعث بروز اثر پیشگیری‌کننده از میگرن می‌شوند (Der marderosian, 2001). یکی دیگر از اهداف پارتنولید نیتریک اکساید سنتتاز در سیستم عصبی مرکزی است و مانع آزادسازی NO می‌گردد. اثر ضد‌میگرن آن نیز تا حدی به این اثرش برمی‌گردد (Fiebich et al., 2002). البته شناسایی مسیر بیوسنتزی کاستونولید، پارتنولید و ژن‌های دخیل در این مسیر تا حدود زیادی انجام شده است (Majdi et al., 2011) (شکل ۱).



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی پیش‌بینی شده پارتنولید

کاتالیز مرحله اول به‌وسیله جرماکرن A سنتاز، مرحله ۲، ۳ و ۴ به‌وسیله یک جرماکرن اکسیداز، مرحله ۵ به‌وسیله کاستونولید سنتاز و مرحله ۶ به‌وسیله کاستونولید اپوکسیداز (پارتنولید سنتاز) انجام می‌شود.

البته فعال شدن رونویسی از ژن‌های دخیل در ایجاد پاسخ‌های دفاعی در فرایند القای الیسیاتور نیز گزارش شده است (Park *et al.*, 2003). لازم به ذکر است که این محرک‌ها در شرایط طبیعی نیز بر گیاه تأثیر گذاشته و باعث تولید یک متابولیت خاص می‌شوند. تنش‌های محیطی از قبیل شوری (خاک و آب) و تنش کم‌آبی که از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی و باغی در بسیاری از نقاط دنیا به‌ویژه مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران هستند، از محرک‌های غیرزنده محسوب می‌شوند (Scheerer & Scheerer, 2005).

یکی از انواع دیگر این محرک‌های غیر زنده که به تازگی مورد استفاده قرار گرفته است، نانوذرات می‌باشد. این ذرات از مهمترین ابزارهای نانوتکنولوژی هستند که کاربردهای

مطالعه نحوه تنظیم این مسیر و شناسایی مراحل تأثیرگذار بر سرعت تولید این متابولیت‌های ارزشمند جزء اولین و مهمترین گام‌ها در جهت مهندسی متابولیت به‌منظور افزایش تولید می‌باشد. تحریک آنزیمی به کمک محرک‌ها یکی از این روش‌هاست. محرک‌ها ترکیب‌هایی با منشأ زیستی و یا غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao *et al.*, 2007). بنابراین می‌توان گفت که الیسیاتورها با تأثیر بر بیان ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های اولیه که در انتقالات واکوئلی نقش دارند، می‌توانند موجب تنظیم سطح متابولیت‌های ثانویه شوند. به عبارتی، نقل و انتقالات و ذخیره متابولیت‌های اولیه، نقش مهمی در تولید ترکیب‌های ارزشمند ایفاء می‌کنند (Larkin *et al.*, 2005).

استفاده از بستر گیاهی رزماری که یک روش نوظهور و متکی بر اصول شیمی سبز است، مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر نانو کلات آهن، نانوذرات نقره سنتز شیمیایی و سنتز سبز بر بیان دو ژن درگیر در مسیر بیوسنتزی ترکیب ترپنی پارتولید، در گیاه دارویی بابونه کبیر تحت دو شرایط نرمال و تنش کم‌آبی در سال ۱۳۹۳ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل آزمایشی پایه‌ریزی شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. فاکتور اول شامل تنش خشکی در دو سطح (عدم تنش و تنش ملایم یعنی ۵۰٪ ظرفیت زراعی) و فاکتور دوم نانوذرات در چهار سطح آب مقطر (شاهد)، نانوکلات آهن، نانوذرات نقره سنتز شیمیایی و سنتز سبز با غلظت ۳۰ ppm بود. در این تحقیق از نانوذرات نقره سنتز سبز در ابعاد ۱۳ نانومتر، نانوذرات نقره سنتز شیمیایی در ابعاد ۲۰ نانومتر و نانو کلات آهن در ابعاد ۱۰۰ نانومتر استفاده شد. اندازه این ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تعیین شده بود. نشاء بابونه کبیر از شرکت زرین ارومیه تهیه شد و بعد گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی با بستر کشت، شامل ۱۰٪ ماسه، ۳۵٪ کوکوپیت، ۳۵٪ پرلیت و ۱۰٪ خاک مزرعه منتقل شدند. اعمال تنش کم‌آبی و اسپری نانوذرات سه مرتبه قبل از گلدهی انجام گردید و در بار آخر ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش، نمونه برداری انجام شد و نمونه‌های برگ‌ها فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای شناسایی و تعیین درصد پارتولید عصاره گیاه، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مدل Unicom-Crystal 200 ساخت انگلستان استفاده شد. بدین منظور ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر خشک گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر استونیتریل فوق خالص و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه در شیکر قرار داده شد. سپس در 2000xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول از فیلتر ۰/۴ میکرون

فراوانی در علوم زیستی دارند. در مقایسه این ذرات با اجزای زیستی طبیعی، باید به قطر معمول ۱۰ میکرومتری سلول اشاره کرد و اجزای آن که عمدتاً در محدوده زیر میکرون قرار دارند (Salata, 2004). این در حالیست که اندازه نانوذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر بوده و حاوی ۱۵۰۰۰-۳۰ اتم هستند که در ناحیه بین مقیاس کوانتوم و نیوتن قرار دارند و به شکلهای کره‌ای، میله‌ای، سیمی و لوله‌ای می‌باشند. این ذرات در زمینه‌های مختلفی از جمله ساخت مواد پیشرفته، الکترونیک، پزشکی، محیط‌زیست، علوم دارویی و کشاورزی بکار رفته‌اند. نانوذرات طلا، نقره، اکسیدتیتانیوم و روی از جمله آنها هستند (Liu, 2006). همچنین این نانوذرات در گیاهان از طریق افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز بر متابولیسم نیتروژن اثر گذاشته و باعث افزایش رشد و میزان فتوسنتز می‌شوند. این ذرات نانویی به دلیل اندازه کوچکشان، به سرعت به درون سلول نفوذ کرده و منجر به افزایش میزان پروتئین و تحریک بیان ژن در سلول‌های گیاهی می‌شوند (Yang et al., 2008). استفاده از نانوذرات نقره و تیتانیوم به‌عنوان الیسیاتور نیز گزارش شده است. پژوهشگران توانستند با استفاده از نانوذرات نقره و دی‌اکسید تیتانیوم موجب افزایش میزان آلئوین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) شوند (Raei, 2012).

در این پژوهش اثر تنش خشکی و نانوذرات نقره سنتز شده به روش شیمیایی و سبز و همچنین نانو کلات آهن بر میزان پارتولید و بیان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز این ترپن‌ها در گیاه بابونه کبیر مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات نقره حاصل از روش‌های شیمیایی که امروزه بکار برده می‌شوند، به دلیل استفاده از مواد شیمیایی خطرناک و سمی بودن و آسیب‌های زیست‌محیطی حاصل از آنها، نگرانی‌های زیادی را ایجاد کرده‌اند. از این رو اخیراً تولید نانوذرات نقره با استفاده از اصول شیمی سبز جایگاه ویژه‌ای را در پژوهش‌ها پیدا کرده‌اند. لازم به ذکر است در این پژوهش برای اولین بار از نانو ذره نقره سنتز شده با

هیچ تکثیری که نشان‌دهنده آلوده بودن نمونه‌ها به DNA ژنومی باشد، را نشان ندادند.

سنتز cDNA

cDNA با استفاده از کیت Scripttm First strand Synthesis Kit سنتز شد. در ابتدا برای اطمینان از سنتز cDNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد که مشاهده اسمیر نشان‌دهنده سنتز cDNA بود. سپس در مرحله بعد با استفاده از پرایمرهای ژن رفرنس و استفاده از cDNA به‌عنوان الگو در واکنش PCR از سنتز cDNA اطمینان حاصل شد. علاوه بر این از کنترل منفی هم برای تشخیص آلودگی ژنومی استفاده شد که در واکنش PCR به جای استفاده از cDNA از RNA به‌عنوان الگو استفاده شد و عدم تکثیر باند در این حالت نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی ژنومی بود و در نهایت cDNAها برای آزمون پرایمرها و RealTime PCR مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور بررسی الگوی بیان رونوشت‌های مختلف با روش RealTime PCR طراحی آغازگرها به گونه‌ای انجام شد که با استفاده از هر جفت آغازگر تنها رونوشت مورد نظر به طور اختصاصی تکثیر شود. به این منظور، دو جفت آغازگر طراحی و توسط شرکت پیشگام سنتز گردید. در مرحله بعد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای آزمون آغازگرها انجام شد.

طراحی آغازگرها

نظر به اینکه توالی ژن‌های مربوط به بابونه کبیر در پایگاه اطلاعاتی NCBI وجود دارد، بنابراین طراحی آغازگرهای ویژه بابونه کبیر به‌صورت آشیانه‌ای با استفاده از نرم‌افزار CLC و Primer3 انجام شد. جفت آغازگرها برای دو ژن GAS (GenBank accession no. JF819848.1)، و همچنین PTS (GenBank accession no. JF41671.2) برای ژن GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی (GenBank accession no. NG007073.2) در جدول ۱ آورده شده‌است. به‌منظور بدست آوردن دمای مطلوب اتصال

عبور داده شد. سپس حجم محلول با استفاده از مبرد تحت خلأ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد حرارت به ۱۰ میلی‌لیتر کاهش یافت و از آن برای ارزیابی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع استفاده شد. بدین‌منظور ۱۰ میکرولیتر عصاره استخراجی به ستون دستگاه از نوع phenomenex luna-C18 به طول ۲۵ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر با ذرات دارای قطر ۵ میکرومتر تزریق شد. فاز متحرک مخلوط استونیتریل (۵۵٪) و آب دیونیزه (۴۵٪) بود که با سرعت ۱/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه از ستون عبور کرد و دستگاه در طول موج ۲۱۰ نانومتر تنظیم شده بود. ماده پارتولید براساس بیک استاندارد و مقایسه سطح زیر منحنی نمونه با نمونه استاندارد تعیین هویت و مقدار گردید. محلول استاندارد این ماده به غلظت ۱۰ میکروگرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل شده بود (Fonseca et al., 2005). سپس داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۲ مورد تجزیه واریانس قرار گرفت و میانگین‌ها توسط آزمون توکی مقایسه شدند.

استخراج ریبونوکلیتیک اسید (RNA)

استخراج ریبونوکلیتیک اسید کل با استفاده از کیت Gene all انجام شد. به‌منظور بررسی کمیّت و کیفیت RNA استخراج شده، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه بیوفتومتر خوانده شد. RNAهای استخراجی در نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر عدد ۱/۹ تا ۲ را نشان داد. پس از آن به‌منظور اطمینان از کیفیت مطلوب RNA استخراج شده، RNA کل توسط الکتروفورز ژلی بررسی شد. مشاهده باندهای RNA ریبوزومی 18S و 28S به‌طور مشخص نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج شده بود. در نهایت با توجه به غلظت‌های خوانده شده، RNAها با کمک آب تیمار شده با آب عاری از RNase، رقیق شده و به‌غلظت ۰/۵ میکرولیتر رسیدند. RNAهای رقیق شده با آنزیم DNase تیمار شدند و بعد با غلظت‌های مورد استفاده در RealTime PCR، به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز قرار گرفتند و

قطعه پیش‌بینی شده بود، از تکثیر قطعه مورد نظر توسط آغازگرها اطمینان حاصل شد.

آغازگرها به توالی مورد نظر، انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با شیب دمایی از ۵۳ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. از این‌رو با توجه به سایز قطعه تکثیر شده که متناسب با

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده (Tm=55°C)

آغازگر معکوس	آغازگر مستقیم	ژن
Reverse 5 -3	Forward 5 -3	Gene
CCTTGAGGTTGCCTTCGGATTC	GTTGACTTGACTGTGAGACTTGAG	<i>GAPDH</i>
TTCTCTCTTATTCTCAACTGTGC	TGCTATCTCGGGTACTTTCAAGG	<i>GAS</i>
TGTGTCAATTGCACCAAGAA	AGGTTGGAGAAGTGCTTTGG	<i>PTS</i>

۲۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. یک مرحله اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و یک مرحله پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه نیز در ابتدا و انتها برای PCR چرخه‌ها انجام شد. پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی یک درجه سانتی‌گراد در هر چرخه و بین دمای ۵۵-۹۹ درجه سانتی‌گراد به منظور بررسی اختصاصی واکنش PCR گردید. میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش دلتا-دلتا (delta-delta) محاسبه شد (Pfaffl et al., 2002). بر این اساس، ابتدا برای هر نمونه میانگین دوره آستانه (C_T) حاصل از سه تکرار محاسبه، سپس همین عمل برای ژن *GAPDH* مربوط به هر نمونه نیز انجام شد و در نهایت میزان بیان ژن مورد نظر با استفاده از فرمول زیر بدست آمد:

$$\text{Gene expression} = 2^{-((C_T (\text{House-keeping gene}) - C_T (\text{target gene}))}$$

سبز نسبت به گیاهان شاهد، گیاهان تیمار شده با نانوذرات نقره سنتز شیمیایی و نانوکلات آهن در سطح ۰/۰۱٪ بود و بیان ژن‌های جرم‌اگر A سنتاز (*TpGAS*) و پارتولید سنتاز (*TpPTS*) وقتی که گیاه تحت تیمار با نانوذرات نقره سنتز سبز قرار گرفته بود، بیشترین مقدار را داشت (جدول ۳). همچنین ارتباط مثبتی بین بیان ژن‌های جرم‌اگر A سنتاز (*TpGAS*) و

مطالعه الگوی بیان ژن

پس از اطمینان از کارکرد صحیح آغازگرها، الگوی بیان ژن‌های مورد نظر، واکنش RealTime PCR در سه تکرار با استفاده از کیت بیونر و دستگاه RealTime PCR واقع در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل انجام شد. محلول واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر در تیوب‌های مخصوص تهیه گردید. این محلول شامل ۲ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) cDNA، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومولار)، ۱۰ میکرولیتر Hot Tag EvaGreen qPCR premix [with Rox dye (ساخت شرکت سینا ژن) و حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر عاری از آنزیم RNase به ۲۰ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام واکنش‌های Real-time PCR از دستگاه Rotor-Gene، مدل ۳۰۰۰ استفاده شد. واکنش PCR در ۴۰ چرخه، شامل ۲۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد،

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که بین انواع مختلف نانوذرات در سطح ۱٪ از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد. نتایج این آزمایش حکایت از افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های جرم‌اگر A سنتاز (*TpGAS*) و پارتولید سنتاز (*TpPTS*) در گیاهان تیمار شده با نانوذرات نقره سنتز

ذره نقره سنتز سبز در حالت نرمال نیز باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن جرماکرن A سنتاز شده است، اما میزان پارتنولید در این شرایط کمتر از حالت تنش کم‌آبی ملایم می‌باشد (جدول ۳). در گام بعدی ترکیب تیماری نانو ذره نقره سنتز شیمیایی و تنش کم‌آبی بیشترین بیان ژن جرماکرن A سنتاز (GAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) را نشان داد (جدول ۳، شکل ۱). از نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نانو کلات آهن تحت دو شرایط نرمال و تنش کم‌آبی چنین برمی‌آید که میزان بیان این دو ژن و افزایش تولید پارتنولید تفاوت چندانی در ترکیب نانو کلات آهن و آبیاری کامل با ترکیب نانو کلات آهن و تنش کم‌آبی ندارند (جدول ۳ و شکل ۲).

بحث

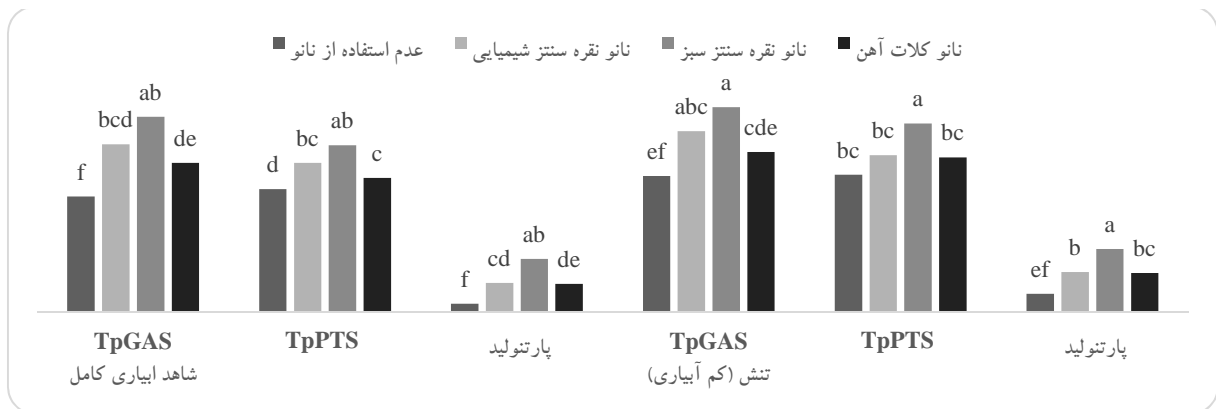
اخیراً اثر ذرات نانوالیسیستور در محیط‌های کشت به‌عنوان محرک و نیز بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز برخی متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار گرفته است (Raei, Bondarian et al., Khodayari et al., 2013; 2012). کوچک بودن ذرات نانوالیسیستور نسبت به اندازه سلول، نفوذپذیری آنها را به درون سلول آسانتر کرده و در نهایت توانسته است در حداقل زمان، سلول را وادار به افزایش بیان ژن در سلول‌های گیاهی و تولید حداکثر متابولیت کند (Tran & Le, 2013).

پارتنولید سنتاز (TpPTS) با میزان پارتنولید مشاهده شد. به‌طوری که روند تغییرات میزان بیان ژن با روند تغییرات میزان پارتنولید با اعمال نانوذرات مختلف مطابقت داشت. بیشترین مقدار پارتنولید به‌ترتیب از کاربرد نانو ذره نقره سنتز سبز و کمترین مقدار از تیمار شاهد یا محلول پاشی با آب مقطر بدست آمد (جدول ۳). در این تحقیق رژیم آبیاری نیز اثر معنی‌داری (P < 0/01) بر افزایش بیان ژن جرماکرن A سنتاز، پارتنولید سنتاز و افزایش میزان پارتنولید در گیاه بابونه کبیر داشت. به‌طوری که بیشترین بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) از تیمار تنش کم‌آبی و کمترین مقدار آن از تیمار آبیاری کامل بدست آمد. میزان افزایش بیان ژن جرماکرن A سنتاز، پارتنولید سنتاز و افزایش میزان پارتنولید در تیمار محلول‌پاشی نانو نقره سنتز سبز و شیمیایی بیشتر از تیمار تنش کم‌آبی بود. اما کاربرد نانو کلات آهن تقریباً به همان میزان تیمار تنش کم‌آبی بر بیان ژن جرماکرن A سنتاز، پارتنولید سنتاز و افزایش میزان پارتنولید تأثیر گذاشت (جدول ۳). نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار تنش خشکی و نانوذرات (جدول ۳) برای ژن‌های جرماکرن A سنتاز (GAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) نشان داد که بیشترین بیان ژن جرماکرن A سنتاز (GAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) وقتی که گیاه تحت تنش کم‌آبی ملایم و نانو ذره نقره سنتز سبز قرار گرفته بود، دیده شده‌است. بررسی نتایج نشان داد که نانو

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نانو بر بیان ژن‌های GAS و PTS و میزان پارتنولید تحت تنش کم‌آبی

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییرات
پارتنولید (میلی‌گرم در وزن تازه)	ژن TpPTS	ژن TpGAS		
۰/۱۷۱۳ **	۰/۴۱۵۹ **	۰/۴۹۸۸ **	۳	نانو
۰/۰۵۲۲ **	۰/۳۷۳۰ **	۰/۰۹۵۰ **	۱	تنش
۰/۰۰۰۶۶ *	۰/۰۵۸۶ **	۰/۰۰۳۱ *	۳	تنش × نانو
۰/۰۱۷۶	۰/۰۱۰۷	۰/۰۰۸۶	۱۶	خطا
۱۰/۴۲	۷/۷۰۸	۶/۱۹۴	---	ضریب تغییرات

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار و بسیار معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪



شکل ۲- اثر متقابل تنش و نانوذرات بر میزان نسبی بیان ژن‌های *TpPTS* و *TpGAS* و میزان پارتنولید

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش و نانو ذرات بر میزان نسبی بیان ژن‌های *TpPTS* و *TpGAS* و میزان پارتنولید

تنش (کم آبیاری)		شاهد (آبیاری کامل)		آبیاری		
پارتنولید میلی گرم در وزن تازه	<i>TpPTS</i>	<i>TpGAS</i>	پارتنولید میلی گرم در وزن تازه	<i>TpPTS</i>	<i>TpGAS</i>	نانو
۰/۱۷ef	۱/۲۶ bc	۱/۲۵ ef	۰/۰۸f	۱/۱۳ d	۱/۰۶ f	عدم استفاده از نانو
۰/۳۷b	۱/۴۴ bc	۱/۶۶ abc	۰/۲۷cd	۱/۳۷bc	۱/۵۴bcd	نانو نقره سنتز شیمیایی
۰/۵۸ a	۱/۷۳a	۱/۸۸a	۰/۴۹ ab	۱/۵۳ab	۱/۷۹ ab	نانو نقره سنتز سبز
۰/۳۶ bc	۱/۴۲ bc	۱/۴۷cde	۰/۲۶ de	۱/۲۳c	۱/۳۷ de	نانو کلات آهن

افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی با راهکارهای مقرون به صرفه مانند استفاده از نانوذرات امیدوار بود. از طرفی نانوذرات نقره سبز تولید شده توسط گیاهان دارویی با خطر کمتری می‌تواند در موارد متعددی از جمله محلول‌پاشی بر روی گیاهان کاربرد داشته باشد، همچنین به دلیل ارزان و سهل الوصول بودن روش‌های زیستی مخصوصاً گیاهی نسبت به سایر روشها از منظر اقتصادی نیز می‌تواند حائز اهمیت باشد (Mohanpuria *et al.*, 2008).

یکی از پاسخ‌های عمومی و رایج گیاهان به تغییرات پتانسیل اسمزی که در اثر تنش‌های خشکی، شوری، گرما و سرما ایجاد می‌شود، تجمع ترکیب‌های متابولیتی با وزن مولکولی و قابلیت حل‌الیت بالاست. در این رابطه Dastmalchi و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای بر روی گیاه بادرشبو عنوان کردند که تنش کم‌آبی ملائم باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی می‌شود اما با افزایش شدت تنش، میزان مواد مؤثره به شدت کاهش می‌یابد. در پژوهش دیگری تعدادی

Kamalizadeh و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی نشان دادند که استفاده از نانوذره تیتانیوم تا غلظت ۳۰ ppm، باعث افزایش میزان رزمارینیک اسید و نیز افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی این ترکیب به ویژه رزمارینیک اسید سنتتاز در گیاه بادرشبو شده‌است. در پژوهشی دیگر بر روی زیره سبز نشان داده شد که میزان بیان ژن FNS I در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار الیسیاتور نقره به‌طور معنی‌دار نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است (Yousefi *et al.*, 2015). در این تحقیق نیز مشاهده شد که نانوذرات با تحریک مکانیسم دفاعی سلول باعث افزایش بیان ژن GAS و PTS شدند و نانوذرات نقره سنتز سبز به دلیل اندازه کوچکتر نسبت به سایر نانوذرات بکار رفته در این تحقیق بیشترین تأثیر را بر بیان ژن‌های جرم‌مکن A سنتتاز (GAS) و پارتنولید سنتتاز (TpPTS) و افزایش تولید پارتنولید داشته است. بنابراین با توجه به مزایای نانوذرات از یک طرف و پیچیدگی‌ها و دشواری‌های اعمال تنش خشکی از طرف دیگر، می‌توان با تحقیقات بیشتر به

از آنجایی که در این تحقیق نتایج حاصل از میزان بیان ژن با نتایج حاصل از میزان پارتنولید مطابقت داشت، بنابراین به نظر می‌رسد نانو ذره نقره سنتز سبز و تنش کم‌آبی ملائم چنانچه امکان سنجش فعالیت آنزیم‌ها برای اطمینان بیشتر هم وجود داشته باشد بتوان به‌عنوان القاء‌کننده کارآمد که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود، را در بسیاری از گیاهان دارویی معرفی کرد و به نظر می‌رسد گامی با ارزش در جهت مهندسی متابولیت و تولید داروهای گیاهی باشد.

منابع مورد استفاده

- Blumenthal, M., 1998. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. American Botanical Council/Integrative Medicine Communications, 684p.
- Bondarian, F., Torabi, S., Omid, M. and Bahreini, M., 2013. Study of callus induction and regeneration of *Papaver somniferum* L. Current Opinion in Biotechnology, 24S: S28-S47.
- Bouwmeester, H.J., 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. Phytochemistry Reviews, 5(1): 49-58.
- Cankar, K., Van Houwehingen, A., Boseh, D., Sonke, T., Bonwmeester, H. and Beekwilder, J., 2011. A chicory cytochrome P450 monooxygenase CYPZ1AV8 for the oxidation of (+) valencene. Federation of European Biochemical Societies Letters, 585: 178-182.
- Chappell, J. and Coates, R.M., 2010. Sesquiterpenes: 609-641. Lew, M., Hung-Wen, L., Townsend, C.A. and Ebizuka, Y., (Eds.). Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology (Vol. 1). Oxford, 7388p.
- Dastmalchi, K., Damien Dorman, H., Ko ar, M. and Hiltunen, R., 2007. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. Food Science and Technology, 40(2): 239-248.
- Davis, E.M. and Croteau, R., 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. Topics in Current Chemistry, 209: 53-95.
- Der marderosian, A., 2001. Guide to Popular Natural Products: Facts and Comparisons. A Wolters Kluwer Company, 319p.

از محققان بیان کردند که سطح بیان ژن‌های bch و pds در گیاه زعفران تحت تأثیر تیمار تنش خشکی افزایش می‌یابد. این محققان بیان کردند که تنش غیر زنده و خشکسالی بر بیان ژن bch و بیان آن به‌طور مستقیم بر تولید کاروتنوئید تأثیر می‌گذارد (Moshtaghi et al., 2010). همچنین تنش کم‌آبی باعث افزایش تولید رزمارینیک اسید و نیز افزایش بیان ژن RAS در گیاه بادرشبو شد (Kamalizadeh et al., 2013). نتایج این تحقیق نیز حکایت از این دارد که تنش کم‌آبی باعث افزایش تولید پارتنولید (۰/۱۷ میلی‌گرم در وزن تازه) نسبت به حالت آبیاری کامل (۰/۰۸ میلی‌گرم در وزن تازه) شده است و تنش کم‌آبی به‌دلیل افزایش رادیکال‌های آزاد در سلول افزایش بیان ژن‌ها جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) و بیان آنها به‌طور مستقیم افزایش تولید پارتنولید را به‌دنبال داشته است.

در این تحقیق اثر برهم‌کنش دو فاکتور رژیم آبیاری و محلول‌پاشی نانوذرات بر افزایش بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) معنی‌دار بود. معنی‌دار بودن اثر متقابل بدین معناست که استفاده یا عدم استفاده از نانوذرات به سطح فاکتور رژیم آبیاری (آبیاری کامل یا تنش کم‌آبی) بستگی داشته است. نتایج مقایسه میانگین ترکیب‌های تیماری نشان داد که بیشترین افزایش بیان ژن‌ها و میزان تولید پارتنولید به‌ترتیب از ترکیب تیماری تنش کم‌آبی با نانو نقره سنتز سبز و شیمیایی (۰/۵۸ و ۰/۳۸ میلی‌گرم در وزن تازه) بدست آمده است. به عبارتی، اگر نانو ذره نقره خصوصاً سنتز سبز در شرایط تنش کم‌آبی مصرف شود، نسبت به شرایط عدم استفاده از نانوذرات نقره افزایش پارتنولید را در پی خواهد داشت. ترکیب تیماری نانو کلات آهن در دو سطح آبیاری کامل و تنش کم‌آبی در افزایش بیان ژن‌ها و میزان تولید پارتنولید اختلاف چندانی نشان نداد. محققان معتقدند که ترکیب‌های نانو آهن به علت کوچک بودن و حلالیت بالا سریع‌تر توسط گیاهان جذب می‌شوند و کمبودهای مواد غذایی و نیازهای گیاهان را برطرف می‌کنند، بنابراین با کاربرد این مواد شرایط بهینه برای رشد گیاه ایجاد می‌شود و از ایجاد هرگونه شرایط تنشی در گیاه جلوگیری می‌شود (Mohamadipoor et al.,)

- Mohanpuria, P., Rana, N.K. and Yadav, S.K., 2008. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(3): 507-517.
- Moshtaghi, N., Ghahremanzadeh, R. and Marashi, H., 2010. Irrigation effects on *pds* and *bch* genes expression of the Iranian Saffron. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2(2): 61-66.
- Park, S.U., Yu, M. and Facchini, P., 2003. Modulation of berberine bridge enzyme levels in transgenic root cultures of California poppy alters the accumulation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Molecular Biology*, 51(2): 153-164.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9): e36-e40.
- Raei, M., 2012. Effect of abiotic elicitor on *Aleo vera*. Dissertation Islamic Azad University, Science and Research, Iran.
- Salata, O., 2004. Applications of nanoparticle in biology of medicine. *Journal Nanobiotechnology*, 2: 3.
- Schearer, W. and Schearer, R., 2005. Components of oil of tansy (*Tanacetum vulgare*) that repel Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*). *Journal of Natural Products*, 47(6): 964-969.
- Susurluk, H., Caliskan, Z., Gurkan, O. and Goren, N.B., 2007. Antifeedant activity of some *Tanacetum* species and bioassay guided isolation secondary metabolites. *Industrial Crops and Product*, 26(2): 220-228.
- Tiunan, T.S., Nakamura, T.U. and Nakamura, C.V., 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *T. parthenium*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 49(1): 176-182.
- Tran, Q.H. and Le, A.T., 2013. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3): 033001.
- Yang, H., Sun, C.H. and Zhang Qiao, S.h., 2008. Anatase TiO₂ single crystals with a large percentage of reactive facets. *Nature*, 453: 638-641.
- Yousefi, K., Riahi-Madvar, A. and Baghizadeh, A., 2015. Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavones synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* L. endemic to Iran. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 28(1): 210-223.
- Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2007. Elicitor signal transduction leading to transgenic *Papaver somniferum*, *Plant Biotechnology Journal*, 5(1): 26-37.
- Fiebich, B.L., Lieb, K., Engels, S. and Heinrich, M., 2002. Inhibition of LPS-induced P42/44 MAPkinase activation and NOS/NO synthesis by parthenolide in rat primary microglial cells. *Journal of Neuroimmunology*, 132(1): 18-24.
- Fonseca, J.M., Rushing, J.W., Rajapakse, N.C., Thomas, R.L. and Riley, M.B., 2005. Parthenolide and abscisic acid synthesis in feverfew are associated but environmental factors affect them dissimilarly. *Journal of Plant Physiology*, 162(5): 485-494.
- Jaimand, K. and Rezaee, M.B., 2005. Chemical constituents of essential oils from *Tanacetum balsamita* L. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5): 565-566.
- Kamalizadeh, M., Bihamta, M., Peyghambari, S.A. and Hadian, J., 2013. Expression of genes involved in rosmarinic acid biosynthesis pathway in dragonhead affected by nanoparticles. *Genetics in the Third Millennium*, 12(1): 3428-3436.
- Khodayari, M., Omid, M., Shahnejat boushahri, A., Yazdani, D. and Naghavi, M., 2013. Effect of elicitors on some alkaloids gene expression in *Papaver somniferum* L. 2nd National Congress on Medicinal Plants, Tehran, Iran, 15-16 May: 511.
- Kraker, J.W., Franssen, M.C., Joerink, M., de Groot, A. and Bouwmeester, H.J., 2002. Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiology*, 129(1): 257-268.
- Larkin, P., Miller, J., Allen, R., Chitty, J., Gerlach, W., Frick, S. and Kutchan, T., 2005. Effect of elicitors on levels in transgenic root cultures of California poppy alters the accumulation of production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advance*, 23: 283-333.
- Liu, T.W., 2006. Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(1): 1-7.
- Majdi, M., Liu, Q., Karimzadeh, G.h., Malboobi, M.A., Beekwilder, J., Cankar, K., de Vos, R., Todorovi, S., Simonovi, A. and Bouwmeester, H., 2011. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Journal of Phytochemistry*, 72(14): 1739-1750.
- Mohamadipoor, R., Sedaghatoor, S. and Mahboub-Khomami, A., 2013. Effect of application of iron fertilizers in two methods 'foliar and soil application' on growth characteristics of *Spathyphyllum illusion*. *European Journal of Experimental Biology*, 3: 232-240.

Effects of some nanoparticles on expression of germacrene A synthase (TpGAS) and parthenolide synthase (TpPTS) genes in *Tanacetum parthenium* L. under water deficit stress

H. Mousavi¹, N. Mahdi Nezhad^{2*}, B. Fakheri³, M. Majdi⁴ and F. Heidari³

1- MSc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Collage of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

2*- Corresponding author, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Collage of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran, E-mail: nmahdinezhad@uoz.ac.ir

3- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Collage of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

4- Department of Plant Breeding, Kurdistan University, Sanandaj, Iran

Received: February 2016

Revised: November 2016

Accepted: November 2016

Abstract

To investigate the effects of nano-chelate spraying of Iron, chemical -synthesis and green-synthesis silver nanoparticles on the expression of two genes, germacrene A synthase (TpGAS) and parthenolide synthase (TpPTS) genes which are involved in the parthenolide biosynthesis pathway of *Tanacetum parthenium* L., a factorial experiment based on randomized complete block design was conducted with three replications. The experiment took place in the greenhouse of Zabol University in Iran. At first, the total RNA from samples of leaves, and then the synthesis of cDNA were extracted. Afterward, Real Time PCR analysis was used to determine gene expression patterns. Parthenolide concentration was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). The analysis of the data was conducted by SAS software, and there was a significant increase in the expressions of both germacrene A synthase (TpGAS) and parthenolide synthase (TpPTS) genes of treated plants with green-synthesis silver nanoparticles in compare with the control plants, and some plants which were treated by chemical- synthesis silver nanoparticles and nano-chelate of Iron. Furthermore, the maximum expressions of both germacrene A synthase (TpGAS) and parthenolide synthase (TpPTS) genes were identified in groups of plants which were under the influence of drought stress, or were treated by green-synthesis silver nanoparticles. A positive relation was seen between the expressions of germacrene A synthase genes (TpGAS) and parthenolide synthase (TpPTS) genes with the amount of parthenolide itself. It can be concluded that green-synthesis silver nanoparticles and water deficit stress can cause an increase on the expressions of parthenolide and germacrene A synthase genes, and as result of that, cause an increase on parthenolide production of *Tanacetum parthenium*.

Keywords: gene expression, Parthenolide, water stress, green synthesis, nanoparticles.