

اثر تنش خشکی و کیتوزان بر بیان ژن سینئول سنتاز و ماده ۸-اوسینئول در گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis* L.)

The effect of drought stress and chitosan on cineole synthase gene expression and 1,8-cineole content in sage (*Salvia officinalis* L.)

نجمه وثوقی^۱، مسعود گماریان^{۲*}، عبدالله قاسمی پیربلوطی^۳، شهاب خاقانی^۴، فاطمه ملک پور^۵

۱- دانش آموخته دکتری، گروه گیاهان دارویی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، مرکز تحقیقات علوم گیاهی کاربردی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۳- استاد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۵- استادیار، گروه گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

Vosoughi N¹, Gomarian M^{2*}, Ghasemi Pirbalouti A³, Khaghani Sh⁴, Malekpoor F⁵

1. PhD Graduated, Department of Medicinal Plants, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

2. Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Research Center for Applied Plant Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

3. Professor, Research Center for Medicinal Plants, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4. Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

5. Assistant Professor, Department of Medicinal Plants, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, P O Box: 166, Shahrekord, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: M-gomarian@iau-arak.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۷)

چکیده

مریم گلی یکی از مهم ترین گیاهان دارویی و معطر و دارای اثرات ضدسرطانی، آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می باشد. یکی از اجزای اصلی اسانس این گیاه، مونوترپن ۸-اوسینئول است که مسئول برخی از این اثرات می باشد. در این تحقیق، اثر تنش خشکی در سه سطح ۶۰ (ملایم)، ۷۵ (جزئی) و ۱۰۰ (کنترل) درصد ظرفیت زراعی مزرعه و محلول پاشی برگی کیتوزان در چهار سطح آب مقطر (کنترل)، اسید استیک (کنترل)، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان بر بیان ژن سینئول سنتاز در ریشه و محصول نهایی این ژن، ۸-اوسینئول، در شاخساره های گیاه مریم گلی در یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن نسبی سینئول سنتاز و مقدار ۸-اوسینئول به ترتیب با استفاده از روش Real-Time PCR و دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی بیان ژن مورد مطالعه و ماده ۸-اوسینئول را به شدت افزایش می دهد. همچنین محلول پاشی کیتوزان، به ویژه در مقدار ۰/۵ گرم در لیتر موجب افزایش بیان ژن سینئول سنتاز در ریشه و ماده ۸-اوسینئول در شاخساره های این گیاه شد. در کل، تنش خشکی مؤثرتر از کیتوزان در افزایش میزان بیان ژن سینئول سنتاز و مقدار ۸-اوسینئول بود. بیشترین میزان بیان ژن سینئول سنتاز و مقدار ۸-اوسینئول در حضور همزمان تنش خشکی (ملایم) و کیتوزان (۰/۵ گرم در لیتر) به دست آمد. در شرایط تنش خشکی جزئی، بیان ژن مورد مطالعه افزایشی نداشت اما افزایش محصول نهایی آن در شاخساره ها مشاهده شد. این نتایج برای اولین بار نشان داد که تنش خشکی و کیتوزان می توانند باعث افزایش بیان ژن سینئول سنتاز در سطح رونوشت برداری در ریشه های گیاه مریم گلی شوند. بنابراین، با اعمال تنش رطوبتی همراه با کیتوزان، متابولیت ۸-اوسینئول می تواند در گیاه مریم گلی افزایش یابد.

واژه های کلیدی

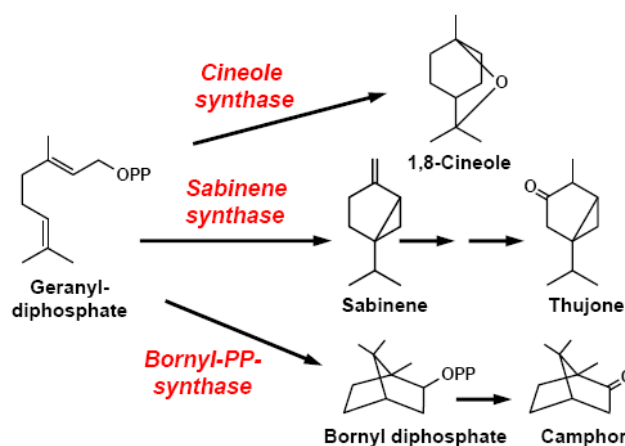
اسانس

مونوترپن

real time- PCR
GC-MS

مقدمه

مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان معطر و دارویی، متعلق به خانواده Lamiaceae می‌باشد (Boszormenyi et al. 2009). این گیاه بوته‌ای کوچک و چندساله و بومی منطقه مدیترانه می‌باشد اما در حال حاضر در سراسر جهان کشت می‌شود (Grdisa et al. 2015). مریم گلی دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های دارویی شامل اثرات ضد سرطان، ضد التهابی، ضد انعقادی، آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد درد، هیپوگلیسمی و هیپولیپیدی می‌باشد (Ghorbani and Esmaeilzadeh 2017). برگ‌های این گیاه غنی از اسانس می‌باشند و کشت آن نیز عمدتاً به منظور برداشت برگ‌های آن انجام می‌شود (Nowak et al. 2010). از مهم‌ترین اجزای اسانس گیاه مریم گلی می‌توان به مونوترپن‌ها اشاره کرد. در این بین، مونوترپن‌های حلقوی مانند α - و β -توژان، اکثر اسانس برگ گیاه α -سینئول، کامفور و α - و β -توژان، اکثر اسانس برگ گیاه مریم گلی را تشکیل می‌دهند (Bakkali et al. 2008). ژن سینئول سنتاز، آنزیم سینئول سنتاز را رمز می‌کند و این آنزیم به طور مستقیم از پیش ماده ژرانیل دی فسفات، محصول نهایی α - و β -سینئول را سنتز می‌کند (Shaw et al. 2015) (شکل ۱).



شکل ۱- ماده α -سینئول به طور مستقیم از ژرانیل دی فسفات توسط آنزیم سینئول سنتاز تولید می‌شود (برگرفته از منبع (Radwan et al. 2017)

این ماده به سبب داشتن اثرات دارویی به خوبی شناخته شده است (Lima et al. 2013; Selmar and Kleinwächter 2013b). از این ماده در درمان سرفه، روماتیسم، آسیب‌شناسی مرتبط با سبتیک و

آسم برونشیت استفاده می‌شود (Lahlou et al. 2002). تحقیقات نشان داده‌اند که ماده α -سینئول اثر ضد سرطانی علیه سرطان کولورکتال دارد (Yamazaki et al. 2013) و در بسیاری از گیاهان مانند ریحان، رزماری، هل، نارنج، زنجبیل و نعناع نیز یافت می‌شود (Vincenzi et al. 2002).

گزارش شده‌است که عوامل محیطی متعددی می‌توانند سبب افزایش غلظت متابولیت‌های ثانویه و افزایش بیان ژن‌های دخیل در سنتز این متابولیت‌ها در گیاهان دارویی شوند (Leite et al. 2017; Radwan et al. 2016; Sampaio et al. 2016). از میان این عوامل، تنش رطوبتی یکی از مهم‌ترین عوامل است (Kleinwächter and Selmar, 2014). تا کنون سه فرضیه در ارتباط با افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان در شرایط تنش خشکی بیان شده است. در یک فرضیه میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تحت تنش و تنش ندیده یکسان می‌باشد اما به دلیل اینکه در گیاهان تنش دیده میزان بیوماس تولیدی کم می‌باشد در نتیجه غلظت این مواد در این گیاهان بیشتر می‌شود (Paulsen and Selmar 2016). در فرضیه ی دیگر تنش، فعالیت آنزیم‌های تولید کننده متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (Radwan et al. 2017). در فرضیه ی سوم تنش خشکی سبب بسته شدن روزنه‌های گیاه می‌شود در نتیجه جذب CO_2 کاهش می‌یابد. در این شرایط با همان سرعتی که در سمت احیاء کننده فتوسیستم I تولید می‌شود در سیکل کالوین برای تثبیت CO_2 مصرف نمی‌شود و در نتیجه شروع به تجمع می‌کند. تجمع NADPH موجب انتقال الکترون‌های مازاد به اکسیژن می‌شود و در نتیجه گونه‌های آزاد اکسیژن تولید می‌شوند. در این شرایط فرایندهای متابولیکی به سمت سنتز ترکیبات بسیار احیاء شده‌ای مانند مونوترپن‌ها سوق پیدا می‌کند تا از تجمع NADPH کاسته شود. تولید ترکیبات بسیار احیاء شده ممکن است به صورت غیر فعال در سطوحی غیر از رونویسی یا به صورت فعال در اثر افزایش بیان یکسری از ژن‌ها که در مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه قرار گرفته‌اند صورت بگیرد (Selmar and Kleinwächter 2013a).

السیستورها ترکیباتی با منشا زیستی و غیر زیستی هستند که از طریق تحریک سیستم دفاعی باعث بیوستز و انباشت

سنتاز در ریشه با تجمع و افزایش محصول نهایی این ژن در شاخساره‌های گیاه مریم‌گلی تحت تنش رطوبتی همراه با کاربرد محلول‌پاشی برگی کیتوزان بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی شهرکرد در سال ۹۶-۱۳۹۵ اجرا شد. نشاءهای گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران دریافت شد. نشاءها در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۵ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و وزن خالی ۲۵۰ گرم کشت شدند. جهت زهکشی مناسب کف گلدان‌ها به ارتفاع ۴ سانتی‌متر شن ریخته شد. گلدان‌ها با ۷ کیلوگرم از خاک مناسب (خاک مورد نظر و شن به نسبت ۲ به ۱) پر شدند. خاک مورد استفاده از نظر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مورد آنالیز قرار گرفت.

نشاءهای ۱۰ سانتی‌متری که داری دو گره به همراه چهار برگ متقابل بودند در داخل ۳۶ گلدان کشت شدند (در هر گلدان ۳ نشاء کاشته شد). تا یک ماه بعد از کاشت گلدان‌ها به‌طور مساوی آبیاری شدند تا نشاءها استقرار یابند. سپس گلدان‌ها به سه تکرار ۱۲ تایی تقسیم شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا شد. تیمارها شامل تنش خشکی (در ۳ سطح ۶۰ (ملایم)، ۷۵ (جزئی) و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه) و محلول‌پاشی برگی کیتوزان (در ۴ سطح ۰ (آب مقطر)، ۰ (اسید استیک)، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر) بود (Najmeh et al. 2017). انتخاب تیمار اسید استیک به‌عنوان کنترل به دلیل انحلال کیتوزان در آن بود. به‌منظور اعمال تنش خشکی ابتدا ۱۰ گلدان مشابه با گلدان‌های آزمایشی تا حد اشباع، آبیاری و پس از گذشت ۴۸ ساعت گلدان‌ها هر دو ساعت یکبار توزین شدند. در زمان ثابت شدن وزن گلدان‌ها از هر گلدان یک نمونه خاک تهیه شد و پس از توزین، جهت تعیین وزن خشک به آون به مدت ۴۸ ساعت منتقل شدند. درصد آب خاک در حالت ظرفیت زراعی به صورت زیر اندازه‌گیری شد.

$$100 \times (\text{وزن خشک خاک} / \text{وزن خشک خاک} - \text{وزن تر خاک}) = \text{درصد آب خاک}$$

متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (Malekpoor et al. 2017). از جمله الیسیتورهای با منشا زیستی می‌توان به کیتوزان اشاره نمود که در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است (Naderi et al. 2014; Malekpoor et al. 2016; Vosoughi et al. 2017). کیتوزان یک پلی ساکارید دریایی مشتق شده از کیتین می‌باشد (Malerba and Cerana 2016). کاربرد اولیه این ماده بر روی گیاهان عمدتاً به‌منظور تحریک یا افزایش بیان ژن‌های مختلف درگیر در پاسخ‌های دفاعی گیاه بوده است و در برخی موارد افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان نیز گزارش شده است (Deschamps and Simon 2006; Wiktorowska et al., 2010; Marchev et al. 2014). همچنین گزارش شده است که کیتوزان تا حدودی می‌تواند اثرات منفی تنش خشکی بر گیاهان را تعدیل کند (Emami Bistgani et al. 2017).

تا کنون تحقیقات معدودی، بیان ژن‌های مونوترپن سنتاز در گیاه مریم‌گلی را مورد مطالعه قرار داده‌اند. (Schmiderer et al. 2010) گزارش کردند که کاربرد خارجی اسید جیبرلیک در گیاه مریم‌گلی باعث تقویت بیان ژن مونوترپن سنتازها می‌شود و در نتیجه محتوای ۸۰-سینتول و کامفور نیز در گیاه افزایش می‌یابد. (Grausgruber-Gröger et al. 2012) تاثیر تغییرات فصلی را در برگ‌های دو رقم مریم‌گلی بر روی بیان سه ژن ۸۰-سینتول، کامفور و α و β -توزان بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیان دو ژن سینتول و کامفور سنتاز هماهنگی بالایی با میزان محصول نهایی آن‌ها دارد. در پژوهشی (Radwan et al. 2017) گزارش کردند که تنها دو روز پس از اعمال تنش خشکی بر گیاه مریم‌گلی میزان بیان ژن‌های مونوترپن سنتاز به شدت افزایش می‌یابد و مقدار مونوترپن‌ها دو برابر می‌شود.

تحقیقاتی که تا کنون بر بیان ژن سینتول سنتاز در گیاه مریم‌گلی صورت گرفته‌اند تاثیر تنش خشکی بر بیان این ژن در برگ‌های این گیاه را مورد بررسی قرار داده‌اند و گزارشی از بررسی بیان این ژن در ریشه‌های این گیاه در دست نمی‌باشد. همچنین، تاثیر کیتوزان بر بیان این ژن و مقدار نهایی محصول این ژن یعنی ماده ۸۰-سینتول در گیاه مریم‌گلی تا کنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی بیان ژن سینتول

استفاده از نرم افزار 7 Oligo طراحی شدند. آغازگرها در برابر توالی های نوکلئوتیدی در NCBI به منظور اطمینان از صحت آن ها مورد جستجوی BLAST قرار گرفتند. از ژن خانه دار *GAPDH* به عنوان ژن مرجع جهت نرمال سازی استفاده شد. میزان بیان ژن ها با استفاده از دستگاه real time PCR (Corbot 6000, Qiagen, Germany) بررسی شد. واکنش های real time PCR با در نظر گرفتن دو تکرار بیولوژیک برای هر نمونه در حجم ۱۵ میکرولیتر با استفاده از کیت Maxima SYBER Green/Flourescein qPCR Master Mix (فرمنتاز، آلمان) با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده انجام شد.

ترکیب محلول واکنش real time PCR برای هر نمونه شامل ۷/۵ میکرولیتر از SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (شرکت تاکارا-ژاپن)، آغازگرهای رفت و برگشتی (سنتز شده در شرکت GENEray) به مقدار هر کدام ۱ میکرولیتر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، آب عاری از نوکلئاز (شرکت Fermentas) به میزان ۴/۵ میکرولیتر و ۱ میکرولیتر از cDNA مورد نظر (با غلظت ۱۰۰۰ ng/μl) بود. دوره های زمانی جهت تکثیر ژن مورد نظر با توجه به توالی آغازگر و محصول حاصل از تکثیر ژن شامل فعال سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه در یک سیکل و بعد ۴۰ سیکل شامل مراحل واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ ثانیه، اتصال آغازگر به الگو در دماهای اتصال مربوط به هر ژن به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه بود. به منظور بررسی صحت تکثیر از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. شناسایی ترکیبات اسانس به کمک دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی شهرکرد انجام گرفت. تجزیه اسانس با دستگاه GC مدل Agilent 7890 A و نوع ستون 5% HP-5 MS (طول ستون ۳۰m، قطر داخلی ستون ۰/۲۵ μm، قطر بیرونی ستون ۰/۲۵ mm) انجام شد. گاز هلیوم با سرعت ۱/۸ ml/min جریان داشت. دمای اولیه ستون ۶۰ °C و دمای نهایی ستون ۲۸۰ °C بود. برنامه ریزی دمایی به صورت ۴ °C/min انجام شد. نسبت جداسازی ۱۰۰:۱ تنظیم شد. دمای تزریق کننده ۳۰۰ °C بود. خلوص گاز هلیوم ۹۹/۹۹۹٪ بود.

اعمال تیمارها یک ماه بعد از استقرار نشاءهای کاشته شده در گلدان آغاز شد. محلول پاشی برگي کیتوزان ۵ بار در مرحله رویشی گیاه با استفاده از یک اسپری دستی (در حدود ۱۰۰ میلی لیتر در هر بوته) با فواصل ۱۵ روز یکبار انجام شد. پس از دو هفته از آخرین اسپری کیتوزان، ریشه گیاهان نمونه برداری شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد برای تجزیه و تحلیل real-PCR time منجمد شدند. نمونه برداری از ریشه ها در ساعت ۵ الی ۶ بعد از ظهر انجام شد. ابتدا ریشه ها با آب مقطر شسته شدند و سپس حدود ۳ سانتی متر از قسمت وسط ریشه ها با استفاده از چاقوی تیز بریده شد و در داخل فویل آلومینیومی پیچیده شدند و در داخل ازت مایع به فریزر ۸۰- انتقال داده شدند. برگ ها و قسمت های هوایی نرم گیاهان نیز در همین زمان برای تجزیه و تحلیل اسانس برداشت شدند.

جهت استخراج اسانس از برگ ها و قسمت های هوایی هر گیاه (به مقدار ۵۰ گرم) از روش تقطیر با آب و دستگاه اسانس گیر کلونجر استفاده شد. به این ترتیب که عمل اسانس گیری در مورد همه تیمارها به مدت سه ساعت ادامه یافت. حجم اسانس بدست آمده به دقت یادداشت شد و در ظرف های مخصوص تا زمان تجزیه در یخچال نگهداری شد (British Pharmacopoeia, 1993).

کل از ریشه های گیاهان مریم گلی با استفاده از کیت استخراج RNAX-plus[™] (سیناژن، ایران) و دستورالعمل سازنده انجام شد. جهت حذف آلودگی های احتمالی DNA از آنزیم DNase I استفاده شد. پس از انجام مراحل استخراج در نهایت ۳۰ میکرولیتر آب دیس (DEPC) به رسوب به دست آمده اضافه و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. کیفیت RNA با استفاده از ژل آگارز ۱/۲ درصد تعیین و کمیت آن با دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000, Thermo, USA) در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. نمونه های RNA قبل از انجام RT-PCR با رقت یکسان (۵۰ ng/μL) تهیه و آماده شدند. جهت ساخت cDNA از آغازگرهای تصادفی هگزامری و کیت Prime Script RT (تاکارا، ژاپن) با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد. توالی های رمز کننده ژن سینتول سنتاز از پایگاه GenBank در سایت NCBI تهیه شد و آغازگرهای اختصاصی با

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش real-time PCR

نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)	دمای اتصال
<i>CIN (Cineole Synthase)</i>	AF051899.1	F: ATCCAAACTGGACGACGAAC R: GCCCTCATCAAGTGCTTCTC	۱۰۶	۶۰
<i>GAPDH</i>	Q210H4	F: ATGGCATTCCGTGTTCTCTAC R: CCTTCAACTTGCCCTCTGAC	۱۱۲	۶۱

جدول ۲- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن سینتول سنتاز و مقدار او۸-سینتول تحت تنش خشکی و کاربرد برگی کیتوزان در مریم گلی

منابع تغییر	درجه آزادی	بیان نسبی ژن سینتول سنتاز	میانگین مربعات	محتوای او۸-سینتول
تنش خشکی	۲	۱۳/۸۴**	۳۷/۸۰**	
کیتوزان	۳	۰/۴۴**	۵/۸۴**	
تنش خشکی × کیتوزان	۶	۰/۰۵ ^{n.s.}	۰/۲۳ ^{n.s.}	
خطا	۲۴	۰/۰۲۱	۰/۱۳۲	
ضریب تغییرات (%)		۶/۶۶	۳/۹۲	

^{n.s.}، * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

نتایج و بحث

بیان ژن سینتول سنتاز در ریشه‌ها و مقدار او۸-سینتول در شاخساره‌های گیاه مریم گلی تحت تاثیر تنش خشکی ($P \leq 0.01$) و کیتوزان ($P \leq 0.01$) قرار گرفت (جدول ۲).

تیمار تنش خشکی به طور معنی داری سطح بیان ژن سینتول سنتاز را افزایش داد و بالاترین سطح بیان این ژن در شرایط تنش خشکی ملایم به دست آمد (شکل ۲). اثرات مثبت تنش خشکی بر افزایش بیان ژن به همراه کاربرد برگی کیتوزان برای محصولات دیگر نیز گزارش شده است (Malerba and Cerena 2016). همچنین همبستگی مثبت و معنی داری ($P \leq 0.01$, $r = 0.99$) بین بیان این ژن در ریشه‌ها (شکل ۲) و مقدار او۸-سینتول در شاخساره‌های گیاه مریم گلی مشاهده شد (شکل ۳).

این در حالی است که، در مطالعه‌ای (Radwan et al. 2017) گزارش کردند که بیان ژن مونوترپن سنتازها در سطح رونویسی به طور متفاوت و معنی داری تحت تاثیر تنش خشکی در برگ‌های مریم گلی قرار می‌گیرند. این محققین دریافتند که تنش خشکی سطح mRNA ژن سینتول سنتاز را کاهش می‌دهد، اما در این شرایط مقدار او۸-سینتول در برگ‌ها افزایش می‌یابد.

جهت تزریق نمونه‌ها از میزان ۰/۱ میکرولیتر اسانس با استفاده از سرنگ همپلتون استفاده شد. تجزیه MS توسط دستگاه Agilent 5975 C انجام شد. انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی ۷۰ الکترون ولت انتخاب شد. طیف جرمی از ۵۰-۵۵۰ m/z بود. شاخص‌های بازداری (IR) برای تمام اجزا با استفاده از یکسری هومولوگ از ان - الکانها ($C_5 - C_{25}$) که در شرایط مشابه نمونه‌ها تزریق شدند، محاسبه شد. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع (Adams 2007) و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری (Wiley and NIST) صورت گرفت.

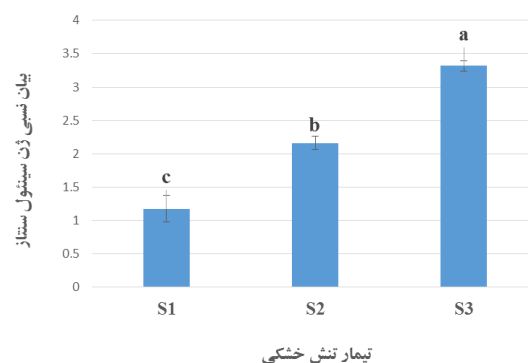
بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ اندازه‌گیری شد (Livak et al. 2001; Rao et al. 2013). تجزیه واریانس داده‌های حاصل و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. همبستگی بین سطوح بیان ژن سینتول سنتاز در ریشه و تجمع ماده او۸-سینتول در شاخساره با استفاده از نرم‌افزار MINITAB 14 اندازه‌گیری شد.

(2010) هر چند تنظیم مقدار برخی از آن‌ها ممکن است در سطوح دیگری مانند سطوح پس از رونویسی و یا پس از ترجمه انجام شود (Schmiderer et al. 2010; Xie et al. 2008).

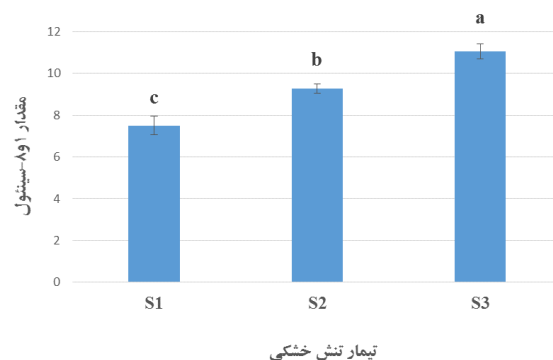
از طرف دیگر، نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده آن بود که افزایش مقدار ۸۰۱-سینتول در برگ و قسمت‌های هوایی گیاه مریم‌گلی می‌تواند حداقل قسمتی مربوط به افزایش رونویسی ژن مربوطه در ریشه‌های این گیاه باشد. گزارش شده است که ترپنئید سنتازها توسط خانواده‌های چند ژنی که آنزیم‌های عملکردی مشابه یا بسیار مشابه را رمز می‌کنند تولید می‌شوند (Bohlmann et al. 1998). تحقیقات نشان داده است که ژنوم *Arabidopsis* به عنوان یک سیستم مدل برای مطالعه تکامل متابولیسم ثانویه ترپن‌های گیاهی حاوی بیش از ۳۰ ژن است که پروتئین‌هایی با توالی مشابه با خانواده ترپن‌سنتازها را رمز می‌کنند (Aubourg et al. 2002). Chen et al. 2004 گزارش کردند که رونوشت برخی از ژن‌های *Arabidopsis* مونوترپن سنتاز، تقریباً منحصراً در ریشه‌های گیاه بیان می‌شوند. همچنین گزارش شده است که مونوترپن‌ها و سزکویی ترپن‌های فرار، در ریشه‌ها و ریزوم‌های مختلف گیاهان سنتز و انباشته می‌شوند (Bos et al. 2002; Kovacevic et al. 2002). بنابراین، به نظر می‌رسد جهت داشتن تصویر روشن‌تری از تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند ماده ۸۰۱-سینتول بهتر است رونویسی ژن‌های مربوطه هم‌زمان در بافت‌های مختلف مورد مطالعه قرار گیرد.

تحقیقات متعددی، اثر کیتوزان بر بیان ژن‌ها در گیاهان را مورد بررسی قرار داده‌اند (Emami Limpanavech et al. 2008; Xoca-Orozco et al. 2017; Bistgani et al. 2017). مطالعات نشان می‌دهند که مهم‌ترین نقش کیتوزان، تحریک پاسخ دفاعی گیاهان به طیف گسترده‌ای از فیتوپاتوژن‌ها احتمالاً از طریق بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند ترپنئیدها می‌باشد (Voggeli and Chappell, 1998; Terry and Joyce 2004; Xoca-Orozco et al. 2017).

علاوه بر این تحقیقات نشان داده‌اند که مونوترپن‌هایی مانند ۸۰۱-سینتول در پاسخ دفاعی گیاهان دخیل هستند (Deschamps and Simon 2006). اما تاکنون مطالعه‌ای جهت ارزیابی اثر کیتوزان بر بیان ژن سینتول سنتاز و مقدار محصول نهایی آن، ۸۰۱-سینتول،



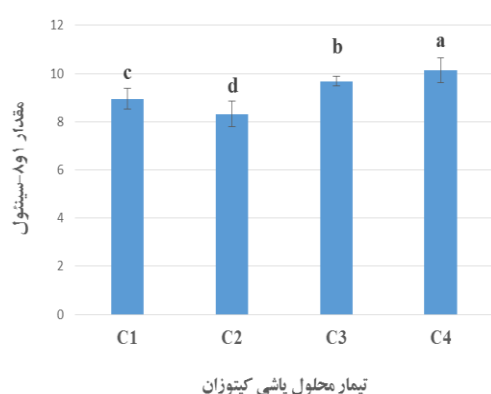
شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین بیان نسبی ژن سینتول سنتاز در تیمارهای مختلف تنش خشکی. تیمارهای خشکی شامل S1: ۱۰۰ (کنترل)، S2: ۷۵ (تنش جزئی) و S3: ۶۰ (تنش ملایم) درصد ظرفیت زراعی مزرعه می‌باشد. محور عمودی نمودار میزان نسبی بیان ژن را نشان می‌دهد. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین مقدار ۸۰۱-سینتول در تیمارهای مختلف تنش خشکی. تیمارهای خشکی شامل S1: ۱۰۰ (کنترل)، S2: ۷۵ (تنش جزئی) و S3: ۶۰ (تنش ملایم) درصد ظرفیت زراعی مزرعه می‌باشد. محور عمودی نمودار میزان نسبی بیان ژن را نشان می‌دهد. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

بنابراین این محققان نتیجه گرفتند که افزایش محتوای ۸۰۱-سینتول در شرایط تنش خشکی ممکن است در سطوح دیگری به غیر از رونویسی انجام شود. تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که مقدار مونوترپن‌ها به‌طور عمده در سطح رونویسی کنترل و تنظیم می‌شوند (Mahmoud and Croteau 2003; Mahmoud et al. 2004; Xie et al. 2008; Lane et al. 2010; Schmiderer et al.

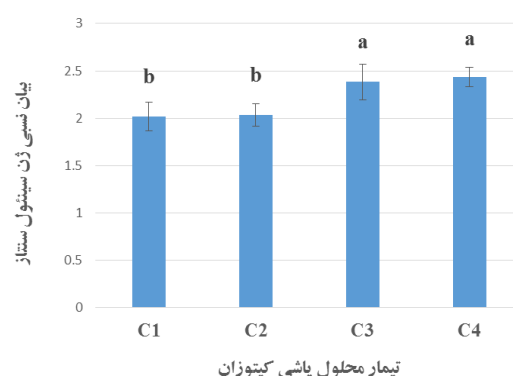
ژن را بیشتر تحت تاثیر قرار داده و آن را افزایش داده است. برای مقدار ماده ۸۰۱-سینتول نیز همین نتایج مشاهده شد (شکل ۷). اعمال تنش خشکی جزئی به همراه اعمال کیتوزان بر افزایش بیان ژن سینتول سنتاز اثر معنی داری نداشت (شکل ۶) اما محصول نهایی این ژن در همین شرایط در شاخساره های گیاه مریم گلی افزایش یافت (شکل ۷). بنابراین به نظر می رسد که مقدار ماده ۸۰۱-سینتول در سطوح دیگری غیر از سطوح رونوشت برداری ژن تولید کننده آنزیم این متابولیت ممکن است تنظیم شود.



شکل ۵- نمودار مقایسه میانگین مقدار ۸۰۱-سینتول در تیمارهای مختلف محلول پاشی برگ کیتوزان. تیمارهای کیتوزان شامل چهار سطح C1: آب مقطر (کنترل)، C2: اسید استیک (کنترل)، C3: ۰/۲۵ و C4: ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان می باشد. محور عمودی نمودار مقدار ۸۰۱-سینتول را نشان می دهد. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار بر اساس آزمون چند دامنه های دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می باشد.

Xia et al. (2008) در مسیرهای شیکیمات/فنیل پروپانویید و ترپنویید در گیاه ریحان، بیان برخی ژن ها، آنزیم های مربوط به آن ژن ها و متابولیت های مربوط به این آنزیم ها را به ترتیب در سطوح مختلف به روش ترانس کریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس بررسی کردند. نتایج آن ها نشان داد که افزایش مقدار برخی از آنزیم ها و متابولیت های حاصل از این آنزیم ها ارتباطی به افزایش بیان ژن مربوط به آن ها در سطح رونویسی ندارد و تنظیم بیان آن ها احتمالا در سطوح دیگری مانند سطوح بعد از رونوشت برداری و یا سطوح پس از ترجمه انجام می شود. چنین نتایجی در مطالعه Schmiderer et al. (2010) نیز مورد تاکید قرار گرفته است.

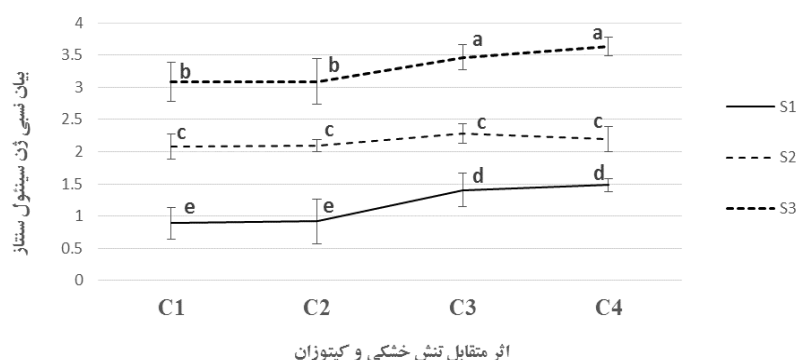
در گیاه مریم گلی انجام نشده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کیتوزان به ویژه در غلظت ۰/۵ گرم در لیتر می تواند موجب افزایش رونویسی ژن سینتول سنتاز در ریشه گیاه مریم گلی (شکل ۴) و تجمع ماده ۸۰۱-سینتول در شاخساره های این گیاه شود. گزارش شده است که کاربرد کیتوزان در قسمت های هوایی گیاه ممکن است از طریق بیوسنتز ABA موجب تحریک بسته شدن روزنه ها شود (Katiyar et al. 2015). بنابراین، اثر کیتوزان بر بیان ژن ها نیز ممکن است به طور غیر مستقیم از طریق پیام رسان ثانویه ای مانند ABA باشد که احتیاج به تحقیقات بیشتر در این زمینه می باشد.



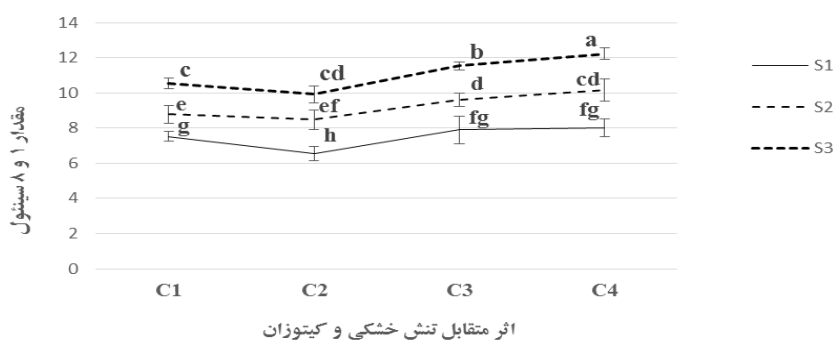
شکل ۴- نمودار مقایسه میانگین بیان نسبی ژن سینتول سنتاز در تیمارهای مختلف محلول پاشی برگ کیتوزان. تیمارهای کیتوزان شامل چهار سطح C1: آب مقطر (کنترل)، C2: اسید استیک (کنترل)، C3: ۰/۲۵ و C4: ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان می باشد. محور عمودی نمودار مقدار ۸۰۱-سینتول را نشان می دهد. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد می باشد.

در این مطالعه هر چند اثر متقابل تنش خشکی و کیتوزان بر بیان ژن سینتول سنتاز و مقدار ماده ۸۰۱-سینتول معنی دار نبود (جدول ۳) اما نمودار مقایسه میانگین اثرات متقابل آن ها (شکل ۶) برای ژن سینتول سنتاز و مقدار ماده ۸۰۱-سینتول سنتاز حاوی نکات ارزشمندی بود.

همان طور که در شکل ۶ مشاهده می شود میزان بیان ژن سینتول سنتاز در شرایط بدون تنش در مقایسه با شرایط تنش جزئی و ملایم در سطوح مختلف تیمار کیتوزان کمتر می باشد. بنابراین به نظر می رسد که تنش خشکی نسبت به کیتوزان میزان بیان این



شکل ۶- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل کیتوزان و تنش خشکی بر بیان نسبی ژن سینتول سنتاز. تیمارهای کیتوزان شامل چهار سطح C1: آب مقطر (کنترل)، C2: اسید استیک (کنترل)، C3: ۰/۲۵ و C4: ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و تیمارهای تنش خشکی شامل S1: ۱۰۰ (کنترل)، S2: ۷۵ (تنش جزئی) و S3: ۶۰ (تنش ملایم) درصد ظرفیت زراعی مزرعه می‌باشد. محور عمودی نمودار بیان نسبی ژن سینتول سنتاز را نشان می‌دهد. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۷- نمودار مقایسه میانگین مقدار ۸۰- سینتول در تیمارهای مختلف محلول پاشی برگ کیتوزان و تنش خشکی. تیمارهای کیتوزان شامل چهار سطح C1: آب مقطر (کنترل)، C2: اسید استیک (کنترل)، C3: ۰/۲۵ و C4: ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و تیمارهای تنش خشکی شامل S1: ۱۰۰ (کنترل)، S2: ۷۵ (تنش جزئی) و S3: ۶۰ (تنش ملایم) درصد ظرفیت زراعی مزرعه می‌باشد. محور عمودی نمودار بیان نسبی ژن سینتول سنتاز را نشان می‌دهد. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

دسترسی به آب دارد. اثر تحریک کنندگی تنش خشکی بر افزایش بیان ژن سینتول سنتاز ممکن است با کاربرد برگ کیتوزان تشدید شود. با تغییر میزان آب در دسترس گیاه همراه با کاربرد کیتوزان می‌توان مقدار متابولیت ثانویه‌ای مانند ۸۰- سینتول را از طریق بیوسنتز آن در سطح رونویسی در ریشه‌های گیاه مریم‌گلی افزایش داد.

نتایج این تحقیق به همراه نتایج تحقیقات دیگر نشان می‌دهد در مطالعه تاثیر محرک‌های محیطی بر افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، بیان ژن‌های مربوطه در بافت‌های مختلف ممکن است به‌طور متفاوتی تحت تاثیر قرار گیرند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اثر کیتوزان بر ژن سینتول سنتاز بستگی به قابلیت

منابع

- Adams RP (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectrometry. 4th edn. Allured Publishing Corporation.
- Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J (2002) Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. Molecular Genetics and Genomics 267:730-745.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils—A review. Food and Chemical Toxicology 46:446-475.
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R (1998) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95:4126-4133.
- Bos R, Koulman A, Woerdenbag HJ, Quax WJ, Pras N (2002) Volatile components of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. Journal of Chromatography A 966:233-238.
- Boszormenyi A, Hethelyi E, Farkas A, Horvath G, Papp N, Lemberkovics E, Szoke E (2009) Chemical and Genetic Relationships among Sage (*Salvia officinalis* L.) Cultivars and Judean Sage (*Salvia judaica* Boiss.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 57:4663-4667.
- British Pharmacopoeia (1993) HMSO Publication, International edition, London.
- Chen F, Ro DK, Petri J, Gershenzon J, Bohlmann J, Pichersky E, Tholl D (2004) Characterization of a root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. Plant Physiology 135:1956-1966.
- Deschamps C, Simon JE (2006) Terpenoid Essential Oil Metabolism in Basil (*Ocimum basilicum* L.) Following Elicitation. Journal of Essential Oil Research 18:618-621.
- Emami-Bistgani Z, Siadat SA, Bakhshandeh A, Ghasemi-Pirbalouti A, Hashemi M (2017) Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. Crop Journal 5:407-415.
- Ghorbani A, Esmaeilzadeh M (2017) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. Journal of Traditional Complementary Medicine 7:433-440.
- Grausgruber-Groger S, Schmiderer C, Steinborn R, Novak J (2012) Seasonal influence on gene expression of monoterpene synthases in *Salvia officinalis* (Lamiaceae). Journal of Plant Physiology 169:353-359.
- Grdisa M, Jug-dujakovic M, Loncaric M, Carovic-Stanko K, Nincevic T, Liber Z, Radosavljevic I, Satovic Z (2015) Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity. Agriculturae Conspectus Scientificus, 80:69-78.
- Katiyar D, Hemantaranjan A, Singh B (2015) Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. Indian Journal of Plant Physiology 20:1-9.
- Kleinwachter M, Selmar D (2014) New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. Agronomy for Sustainable Development 35:121-131.
- Kovacevic N, Pavlovic M, Menkovic N, Tzakou O, Couladis M (2012) Composition of the essential oil from roots and rhizomes of *Valeriana panceicii* Halácsy & Bald. Flavour Fragrance Journal 17:355-357.
- Lahlou S, Figueiredo AF, Magalhães PJ, Leal-Cardoso JH (2002) Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. the Canadian Journal of Physiology Pharmacology 80:1125-1131.
- Leite-Sampaio B, Edrada-Ebel R, Batista-Da-Costa F (2016) Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. Scientific Reports 6:1-11.
- Lima PR, Sousa de Melo T, Bezerra Carvalho KMM, Bonfim de Oliveira L, Arruda BR, Anne de Castro Brito G, Rao VS, Santos FA (2013) 1,8-cineole (eucalyptol) ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF-κB activity in mice. Life Sciences 92:1195-1201.
- Limpanavech P, Chaayasuta S, Vongpromek R, Pichyangkura R, Khunwasi C, Chadchawan S, Lotrakul P, Bunjongrat R, Chaidee A, Bangyeekhun T (2008) Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the Dendrobium orchid. Scientia Horticulturae 116:65-72.
- Loschke DC, Hadwiger LA, Wagoner W (1983) Comparison of mRNA populations coding for phenylalanine ammonia lyase and other peptides from pea tissue treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers. Physiological Plant Pathology 23:163-173.
- Mahmoud S, Croteau B (2003) Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 100:14481-14486.
- Mahmoud S, Williams M, Croteau R (2004) Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. Phytochemistry 65:547-554.
- Malekpoor F, Ghasemi Pirbalouti A, Salimi A, Momtaz H (2017) Effects of chitosan on gene expression of chavicol-O-methyl transferase and phenylpropanoid components of *Ocimum basilicum* (purple cultivar) under water deficit. Journal of Cellular and Molecular Researches 30:391-401. (In Farsi).
- Malekpoor F, Salimi A, Ghasemi Pirbalouti A (2016) Effect of bioelicitor of chitosan on physiological and morphological properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.) under water deficit. Journal of Plant Ecophysiology 27:56-71. (In Farsi).
- Malerba M, Cerana R (2016) Chitosan Effects on Plant Systems. International Journal of Molecular Sciences 17:1-15.
- Marchev A, Haas C, Schulz S, Georgiev V, Steingroewer J, Bley T, Pavlov A (2014) Sage in vitro cultures: a promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances. Biotechnology Letters 36:211-221.

- Naderi S, Fakheri BA, Esmaeilzadeh Bahabadi S, Kamaladini H (2014) Increasing of phenyl alanine ammonia lyase (PAL) gene expression and phenylpropanoid compounds of basil (*Ocimum basilicum*) by chitosan. *Modern Genetics Journal* 9:259-266. (In Farsi).
- Najmeh V, Gomarian M, Ghasemi Pirbalouti A, Khaghani S, Malekpoor F (2017) Essential oil composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies. *Industrial Crops & Products* 117:366-374.
- Nowak M, Manderscheid R, Weigel HJ, Kleinwächter M, Selmar D (2010) Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83:133-136.
- Paulsen J, Selmar D (2016) The difficulty of correct reference values when evaluating the effects of drought stress: a case study with *Thymus vulgaris*. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 89:287-289.
- Radwan A, Kleinwächter M, Selmar D (2017) Impact of drought stress on specialised metabolism: Biosynthesis and the expression of monoterpene synthases in sage (*Salvia officinalis*). *Phytochemistry* 141:20-26.
- Schmiderer C, Grausgruber-Groger S, Grassi P, Steinborn R, Novak J (2010) Influence of gibberellins and daminozide on the expression of terpene synthases in common sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Plant Physiology* 167:779-786.
- Selmar D, Kleinwächter M (2013a) Stress Enhances the Synthesis of Secondary Plant Products: The Impact of Stress-Related Over-Reduction on the Accumulation of Natural Products. *Plant and Cell Physiology* 54:817-826.
- Selmar D, Kleinwächter M (2013b) Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products* 42:558-566.
- Shaw JJ, Berbasova T, Sasaki T, Jefferson-George K, Spakowicz DJ, Dunican BF, Portero CE, Narváez-Trujillo A, Strobel SA (2015) Identification of a Fungal 1,8-Cineole Synthase from *Hypoxyylon* sp. with Specificity Determinants in Common with the Plant Synthases. *Journal of Biological Chemistry* 290:8511-8526.
- Terry LA, Joyce DC (2004) Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology* 32:1-13.
- Vincenzi MD, Silano M, Vincenzi MD, Maialetti F, Scazzocchio B (2002) Constituents of aromatic plants: eucalyptol. *Fitoterapia* 73:269-275.
- Vögeli U, Chappell J (1998) Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiology* 88:1291-1296.
- Wiktorowska E, Długosz M, Janiszowska W (2010) Significant enhancement of oleanolic acid accumulate ion by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technology* 46:14-20.
- Xie Z, Kapteyn J, Gang DR (2008) A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. *Plant Journal* 54:349-361.
- Xoca-Orozco LA, Cuellar-Torres, EA, González-Morales S, Gutiérrez-Martínez P, López-García U, Herrera-Estrella L, Vega-Arreguín J, Chacón-López A (2017) Transcriptomic Analysis of Avocado Hass (*Persea americana* Mill) in the Interaction System Fruit-Chitosan-Colletotrichum. *Frontiers in Plant Sciences* 8:1-13.
- Yamazaki M, Hirano A, Yoshimura Y, Suzuki M, Shuto K, Ohkohchi N, Koda K (2013) Antitumor effect of 1,8-cineole against colon cancer. *Oncology Reports* 30:2647-2652.