

جداسازی و شناسایی ژن *FEH1* در گیاه کنگر فرنگی خاردار (*Cynara cardunculus*) و بررسی بیان نسبی آن تحت تأثیر تنش‌های غیر زیستی

Separation and identification of *FEH1* gene in thorny artichoke plant (*Cynara cardunculus*) and its relative expression under the influence of abiotic stresses

هانیه شهرکی^۱، نفیسه مهدی نژاد^{۱*}، براتعلی فاخری^۱، فاطمه حدادی^۲

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، ایران

Shahraki H¹, Mahdinezhad N^{*1}, Fakheri B¹, Haddadi F²

1- MSc Student, Associate Professor, Professor, Departement of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran

2- Assistant Professor, Departement of Biology, University of Zabol. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nmahdinezhad@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۲)

چکیده

گیاه کنگر فرنگی خاردار (*Cynara cardunculus* L) یک گیاه علفی دیپلوئید و چند ساله می‌باشد. قند کنگر فرنگی فروکتان می‌باشد که کمترین اثر بر قند خون را دارد و از این نظر برای دیابتی‌ها بسیار مفید می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر جدا سازی، شناسایی و ارزیابی بیان نسبی ژن فروکتان ۱-گروهیدرولاز (*FEH1*) در گیاه کنگر فرنگی بود. در راستای شناسایی و ارزیابی روند تکامل مولکولی ژن *FEH1* از نمونه‌های برگ گیاه کنگر فرنگی خاردار DNA استخراج و پس از تکثیر توسط تکنیک PCR توالی‌یابی شد. همچنین جهت بررسی اثرات شوری، نانو ذرات نقره سنتز سبز و سالیسیک اسید بر تغییر بیان نسبی ژن *FEH1*، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه اجرا شد. الگوی بیان نسبی این ژن به روش Real Time PCR سنجیده شد. نتایج تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی ژن *FEH1* نشان داد که بیشترین فراوانی متعلق به باز گوانین (۳۱/۵۶) و کمترین فراوانی مربوط به باز تیمین (۱۲/۴) می‌باشد. همچنین نتایج تست Neutrality انتخاب جهت دار بر روی این ژن را در طول تکامل نشان داد. بررسی فیلوژنتیکی توالی ژن *FEH-1* و مقایسه آن با سایر توالی‌های مشابه در گیاهان مختلف، ثابت کرد که میزان شباهت در میان توالی‌های مورد مطالعه بالاست (بالای نود درصد) و گیاهان از نظر فاصله ژنتیکی با همدیگر اختلاف ناچیزی دارند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های اسید سالیسیک و شوری نشان داد که کاربرد تیمار ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر شوری به تنهایی باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *FEH1* در سطح احتمال یک درصد شده است. کاربرد اسید سالیسیک توأماً با شوری باعث تعدیل اثرات شوری و همچنین کاهش بیان ژن *FEH1* شد. همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های اسید سالیسیک و نانو نقره نشان داد که در تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار اسید سالیسیک با ۴۰ میلی‌مولار نانو نقره در سطح احتمال ۱ درصد بیان ژن *FEH1* در گیاه کنگر فرنگی افزایش معنی‌داری داشته است. مشخصاً در این گیاه معلوم شد که هم از نظر میزان بیان و هم از نظر شدت بیان ژن *FEH1* استعداد بالایی جهت تمرکز روی آن جهت افزایش قندهای محلول و نهایتاً افزایش تحمل گیاه به تنش شوری وجود دارد.

واژه‌های کلیدی

کنگر فرنگی خاردار
اسید سالیسیک
نانو نقره
تکامل
روابط فیلوژنی
توالی‌یابی

مقدمه

گیاه کنگر فرنگی خاردار (*Cynara cardunculus* L) یک گیاه دیپلوئید ($2N=2X=34$) و با نام انگلیسی Cardoon متعلق به خانواده کاسنی (Composite) می باشد و در زبان فارسی به آرتشیو خاردار معروف است. کنگر فرنگی، گیاه علفی چند ساله می باشد که به صورت وسیع در نواحی مدیترانه ای کشت می شود (Cravero et al. 2010). برگ های کنگر فرنگی محتوی ترکیبات فنولی، اسیدی و فلاونوئیدی می باشند. اسید کافئیک، کلروژنیک، سینارین، سیناروپکتین، اینولین، قندها، استرهای اسید کینیک و نئوکلروژنیک اسید ترکیبات عمده این گیاه محسوب می شوند. از مهم ترین اثرات درمانی این گیاه می توان به آزاد شدن انرژی ذخیره شده، جلوگیری از افزایش کلسترول، بهبود و گسترش کارایی دستگاه گردش خون، خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی اشاره کرد. از دیگر مصارف آن در درمان ناراحتی های کبدی است به طوری که مردم اروپا این گیاه را به عنوان محافظت کننده کبد، کاهنده کلسترول و ادرار آور می شناختند. همچنین مصرف آرتشیو موجب افزایش فعالیت آنزیم آلfa گلوکوزیداز شده و باعث کاهش قند خون بالا می شود. قند کنگر فرنگی فروکتان می باشد که کمترین اثر بر قند خون را دارد و از این نظر برای دیابتی ها بسیار مفید می باشد (Gatto et al. 2013; Zhu and Zhang 2004; Li et al. 2004; Lupattelli et al. 2004; Koubaa et al. 1999; Wittemer et al. 2005; Schutz et al. 2004). فروکتان ها علاوه بر گیاهان دولپه ای متعلق به خانواده آستراسه (Asteraceae) در خانواده های گیاهی چون پوآسه (Poaceae) و لیلیاسه (Liliaceae) نیز وجود دارند، ولی منبع اصلی استخراج آن ها همان خانواده آستراسه است. پنج گروه عمده از فروکتان ها در طبیعت وجود دارند که شامل اینولین، لوان، گرامینان، اینولین نئوسری و لوان نئو سری هستند. اینولین به عنوان پلی ساکارید ذخیره ای در ریشه و غده گیاهانی چون کاسنی، سیب زمینی ترشی، قاصدک و قاعده نهنج کاپیتول های کنگر فرنگی ذخیره می شود و نقش محافظت از گیاه در مقابل کمبود آب و تحمل به سرما را بر عهده دارد (Pilon-Smits et al. 1995). امروزه کاربرد اینولین و مشتقات آن به دلیل خصوصیات طبیعی و عملکردی آن در بسیاری از فرآورده های صنایع غذایی و دارویی

رو به گسترش است. اینولین یک آنتی اکسیدان قوی است که در مهار رادیکال های آزاد و جلوگیری از اثرات مضر آن نقش دارد. ترکیب پری بیوتیک اینولین فیزیولوژی روده بزرگ را بهبود بخشیده و فعالیت اکوسیستم میکروبی آن را افزایش می دهد. همچنین باعث افزایش جذب کلسیم و آهن شده و به عنوان یک ضد سرطان و ضد دیابت هم مطرح است (van Arkel et al. 2013). یکی از اقداماتی که می تواند در تغییر بیان ژن و تولید متابولیت های ثانویه مؤثر باشد افزودن الیستورهای غیرزنده و زنده می باشد. تحت این شرایط، طیفی از پاسخ ها در کل گیاه و در سطوح سلولی و مولکولی مشاهده می شود و الگوی بیان بسیاری از ژن ها از جمله ژن های مربوط به پروتئین های درگیر در مسیرهای سیگنالی و پروتئین های عملکردی در پاسخ به تنش تغییر می کند (Salekdeh et al. 2002; Hasegawa 2000; Zhao et al. 2016).

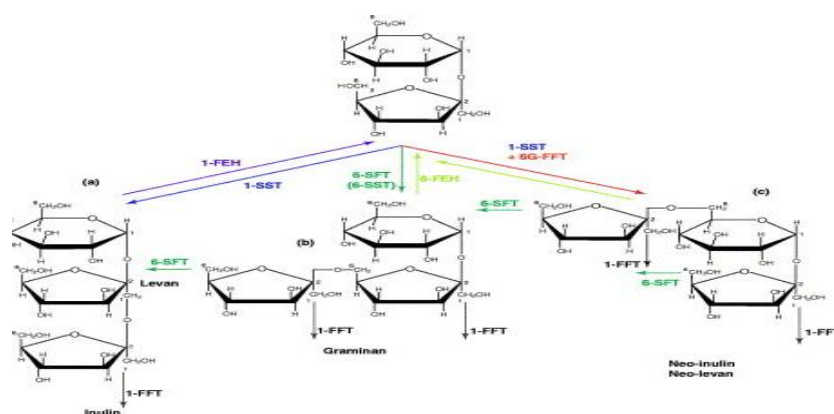
به دلیل تنش اسمزی و یونی ناشی از شوری، گیاه از سازوکارهای مختلفی نظیر تنظیم اسمزی و کده بندی سدیم و کلر در واکوئل برای تداوم جذب آب و حفظ کارایی فتوسنتز استفاده می کند (Jenks 2007). تنظیم اسمزی تحت تاثیر عوامل محیطی بوده و باعث افزایش انواع اسمولیت ها مانند کربوهیدرات های محلول شامل فروکتان ها، ساکارز، گلوکز و فروکتوز طی شوری می شود. تجمع هر یک از اسمولیت ها مستلزم افزایش بیان ژن های مربوط به آنزیم های درگیر در مسیرهای متابولیکی این ترکیبات می باشد. تولید فروکتان با هدف افزایش تحمل تنش های غیر زیستی طی دو دهه اخیر مورد توجه محققین بوده است. ژن هایی که در مسیر بیوسنتز فروکتان دخالت دارند شامل ژن SST-1 (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase 1-SST; fructan synthesis) مربوط به آنزیم ۱- فروکتوزیل ترانسفراز، ژن SFT-6 (sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) آنزیم 3- فروکتوزیل ترانسفراز و ژن FFT-1 (fructan:fructan-1-fructosyltransferase 1-FFT; fructan synthesis and degradation) مربوط به آنزیم ۱ و ۲- بتا فروکتان ۱- فروکتوزیل ترانسفراز افزایش می باشند فروکتان نوع اینولین خود به دو دسته تقسیم می شود: نوع اینولین منظم یا GFn که دارای گلوکز انتهایی به همراه n فروکتوز است و نوع اینولونوز یا Fn که فاقد

فروکتان دهنده به انتهای یک گیرنده منتقل کرده که منجر به طویل شدن پذیرنده‌ها و تخریب دهنده‌ها می‌شود. ویژگی‌های FFT تعیین کننده نوع پیوند گلیکوزیدی و الگوی ساختاری فروکتان است. FEH در گیاهان منجر به تخریب فروکتان‌ها و آزادسازی فروکتوز آزاد از انتهای زنجیره می‌شود. بنابراین تعادل بین FFT-1 و FEH-1 بر تغییرات طول فروکتان یا درجه پلیمریزاسیون (DP) آن‌ها اثرگذار است (Narai-kanayama et al. 2007). در انتهای فصل رشد گیاه به دلیل وقوع سرما کیفیت اینولین افت می‌کند که علت اصلی آن فعالیت زیاد آنزیم‌های FFT-1 و FEH-1 است (van Arkel et al. 2013).

امروزه، استفاده از ترکیباتی که مقاومت گیاهان را به تنش‌های محیطی افزایش داده و موجب بهبود فعالیت‌های متابولیکی گیاه می‌شوند، توصیه می‌شود. یکی از این ترکیبات نانو ذرات نقره است. با توجه به مزایای نانوذرات، می‌توان با تحقیقات بیشتر به افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی با راهکارهای مقرون به صرفه نظیر استفاده از نانوذرات امیدوار بود. از طرفی نانوذرات نقره سبز تولید شده توسط گیاهان دارویی با ریسک کمتری می‌تواند در موارد متعددی از جمله محلول پاشی بر روی گیاهان کاربرد داشته باشد و همچنین به دلیل ارزان و سهل الوصول بودن روش‌های زیستی مخصوصا گیاهی نسبت به سایر روش‌ها از منظر اقتصادی نیز می‌تواند حائز اهمیت باشد (Mousavi et al. 2017).

گلوکز انتهایی است (Xue et Kawakami and Yoshida, 2005; al. 2008). سنتز اینولین نیازمند دو آنزیم متفاوت است که در ابتدا یک تری ساکارید ۱-کتوز و یک گلوکز آزاد از دو مولکول ساکاروز توسط آنزیم ساکاروز یعنی ساکاروز 1-فروکتوترانسفراز 1-SST, EC 2.4.1.99) به وجود می‌آید. سپس آنزیم فروکتان یعنی فروکتان 1-فروکتوسیل ترانسفراز (1-FFT, EC 2.4.1.100) در یک واکنش برگشت پذیر طویل شدن زنجیره را بوسیله انتقال واحدهای فروکتوسیل (رادیكال فروکتوز) به ۱-کتوز (یا یک اینولین بزرگتر) از یک ملکول اینولین دیگر فراهم می‌آورد.

ژن (1-FEH) (fructan 1-exohydrolases 1-FEH1/2a/2b;) در بیوسنتز آنزیم فروکتان اگزوهیدرولاز (fructan degradation) در تجزیه پذیری بالای قند فروکتان به ساکاروز و دخالت دارد. فروکتوز طی هیدرولیز توسط آنزیم هیدرولیز کننده فروکتان اگزوهیدرولاز در شرایط تنش و محدودیت برای داشتن عملکرد بالا صورت می‌گیرد. این هیدرولیز کننده در گیاهان فقط هیدرولیز نوع بیرونی فروکتان (FEH) را انجام می‌دهد که واحدهای فروکتوز را از انتهای زنجیره آزاد می‌کنند. افزایش بیان ژن FEH1 آن طی تنش‌های زیستی و غیر زیستی موجب تجزیه فروکتان و افزایش ذخایر کربوهیدرات‌های ساکاروز و فروکتوز در گیاه می‌شود. شباهت زیادی در سطوح ملکولی و بیوشیمیایی بین آنزیم‌های بیوسنتز کننده فروکتان و آنزیم‌های تخریب کننده فروکتان وجود دارد. آنزیم FFT واحد فروکتوسیل را از یک



شکل ۱- مسیر سنتز و تجزیه یک نوع از انواع قند فروکتان به نام اینولین

میلی‌لیتر محلول هوگلند حاوی تیمار شوری آبیاری شد. همچنین هر ده روز یکبار محیط ریشه گیاهان با آب معمولی به‌طور کامل شستشو داده می‌شد تا تغییرات pH و هدایت الکتریکی ناشی از تجمع نمک‌ها در بستر کاشت در اثر انجام عمل آب‌شویی به حداقل برسد. نانو ذرات نقره کروی با میانگین قطر ۱۳ نانومتر و با غلظت 500 ppm در آزمایشگاه دانشگاه زابل به روش سبز و در بستر گیاهی رزماری سنتز شد. سپس با روش سری رقت (Serial dilution) از محلول‌های مادر، رقت‌های مورد نظر تهیه گشت.

استخراج DNA از نمونه‌های برگ گیاه کنگر فرنگی خاردار به روش دلاپورتا و به‌صورت دستی با کمی تغییر صورت گرفت (Dellaporta et al. 1993). طراحی و سنتز پرایمر مورد نیاز بر اساس توالی‌های شناخته شده از فروکتان ۱-اگزوهیدرولاز در گیاهان مختلف و به‌طور خاص، از گیاهان نزدیک به لحاظ ساختار ژنتیکی و هم‌خانواده به گیاه کنگر فرنگی، با استفاده از اطلاعات بانک‌های ژن و با کمک نرم‌افزار پرایمر ۳ (primer3- ver 0.4.0) طراحی (Forward: 5- TGCCGTATCATACGACCTGG و Reverse: 3- GCATCCTTCATACTCCAAGCAC) شدند. جهت اطمینان از اینکه آیا رشته DNA مرتبط با فروکتان ۱-اگزوهیدرولاز در طی واکنش تکثیر می‌شود یا خیر، تکنیک معادل PCR انجام شد.

واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرو مول 1x dNTP، ۰/۲ میکرومول از هر آغازگر رفت‌وبرگشت، یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز (همه مواد ساخت شرکت سیناژن، ایران) و حجم واکنش با آب استریل دیونیزه به ۲۰ میکرولیتر رسید. پس از انجام واکنش PCR، به‌منظور اطمینان از تکثیر صحیح قطعه مورد نظر و تعیین اندازه باند محصول PCR، ۵ میکرولیتر از هر محصول روی ژل آگارز یک درصد در بافر 0.5x TBE با ولتاژ ۸۰ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. عکس‌برداری از ژل با دستگاه ژل داک انجام شد. در مرحله بعد قطعات به‌دست‌آمده با طول مورد نظر از روی ژل آگارز به‌وسیله کیت خالص‌سازی جداسازی شد و محصولات تکثیری جهت توالی‌یابی به شرکت Bionner کره

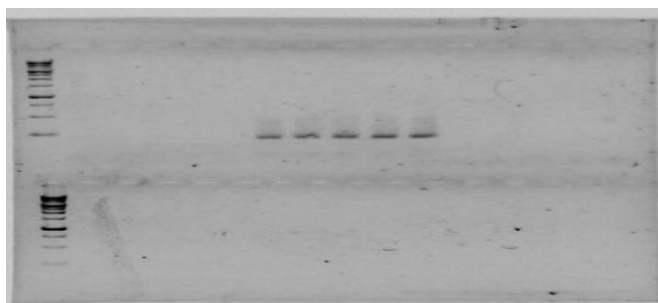
بدین منظور برای اولین بار نانو نقره سنتز شده با استفاده از بستر گیاهی رزماری که یک روش نو ظهور و طبق اصول شیمی سبز است، در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب دیگری که باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش‌ها می‌شود، اسیدسالیسیلیک است. گیاهان در پاسخ به شوری، پروتئین‌هایی تولید می‌کنند که سنتز بسیاری از این پروتئین‌های به‌وسیله‌ی سالیسیلیک اسید تحریک می‌شود. سالیسیلیک اسید همچنین به‌عنوان یک آنتی اکسیدان غیرآنزیمی موجب کاهش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Pirasteh-Anosheh et al. 2012).

بنابراین با توجه با اهمیت گیاه کنگر فرنگی و همچنین نقش ژن *FEH1* به‌عنوان ژن کلیدی در روند تغییرات قند فروکتان، جداسازی، شناسایی این ژن و بررسی روابط فیلوژنتیکی آن و همچنین بررسی میزان تغییر بیان نسبی آن تحت الیستورهای شوری، نانو نقره و اسید سالیسیلیک مهم به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

در راستای بررسی اثرات شوری، نانو ذرات نقره و سالیسیلیک اسید بر تغییر بیان نسبی ژن *FEH1* در کنگر فرنگی، آزمایشی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سال ۱۳۹۷ در گلخانه‌ی پژوهشکده دانشگاه زابل اجرا شد. در این بررسی تنش شوری در سه سطح ۰ (شاهد)، تنش در آستانه تحمل گیاه کنگر فرنگی (۶ دسی زیمنس بر متر) و ۱۲ تنش شدید (۱۲ دسی زیمنس بر متر) و محلول‌پاشی با نانو ذرات نقره سنتز سبز تهیه شده در آزمایشگاه بیوسنتز دانشگاه زابل در سه سطح شاهد، ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار و اسید سالیسیلیک (۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار) به‌عنوان تیمارهای مورد آزمایش در نظر گرفته شد. محلول‌پاشی با نانو ذرات نقره و اسید سالیسیلیک ساخته شده توسط شرکت داروسازی فاران شیمی در مرحله گیاهچه‌ای (مرحله ۸-۶ برگ) روی گیاه کنگر فرنگی انجام شد. برای تیمار صفر یا شاهد از آب مقطر استفاده شد. در مرحله ۶-۴ برگ اعمال تنش شوری شروع شد و تا زمان نمونه‌گیری (به مدت دو ماه) ادامه داشت. منبع شوری نمک NaCl آزمایشگاهی ساخت شرکت مرک (آلمان) بود. گلدان‌ها یک روز در میان با ۱۰۰

$\Delta\Delta CT$ محاسبه شد (Yuan et al. 2006). در این روش، میزان بیان ژن *FEH1* براساس ژن *18S* (ژن خانه‌دار) با بیان ثابت نرمال شده، سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه تیمارها نسبت به شاهد سنجیده شد.



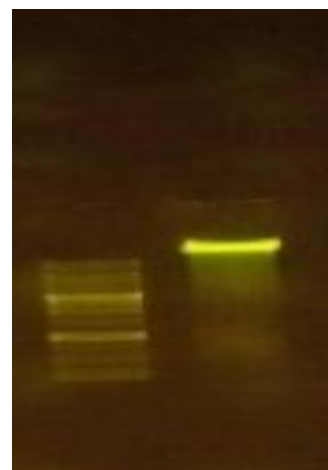
شکل ۳-۱ الکتروفورز محصول واکنش PCR مربوط به پنج تکرار ژن *FEH-1* به طول 200bp در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد

در نهایت آنالیز تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین صفات مختلف و نتایج به‌دست آمده از Real time-PCR با آزمون توکی در سطح خطای ۰/۰۵ و ۰/۰۱ با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

نتایج و بحث

وجود تنها یک بانده در نیم رخ الکتروفورزی، دلیلی بر کیفیت مطلوب DNA استخراج شده است. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که قطعات اختصاصی ژن *FEH1* به طول تقریبی بین ۱۴۴۰ جفت‌باز کنگر فرنگی به‌خوبی تکثیر شده است. این مطلب نشان‌دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به‌خصوص دمای اتصال) می‌باشد. در مرحله بعد نتایج PCR توالی‌یابی شدند. کیفیت گراف‌ها نشان‌دهنده میزان دقت در تعیین توالی می‌باشد. با استفاده از نرم‌افزار Chromas Lopez (2017 and Bonasora). سپس جهت آنالیزهای بیوانفورماتیکی از نتایج حاصل از توالی نمونه‌ها استفاده شد. شاخص‌های ژنتیکی توسط نرم‌افزارهای MEGA, BLAST DNA SP مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی ژن

ارسال شد. توالی‌یابی بر اساس هر دو قطعه تکثیری رفت و برگشت انجام گرفت. استخراج توالی از کروماتوگرام‌های دریافتی از شرکت با استفاده از نرم‌افزار Chromas ver. 2 صورت گرفت. پس از دریافت توالی‌ها، با به‌کارگیری نرم‌افزار Blast در بانک ژنی، اختصاصی بودن قطعه موردنظر به گونه کنگر فرنگی تأیید شد. توالی‌های دریافتی با توالی‌های ژن *FEH1* در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه و با استفاده از برنامه Clustal W هم‌ردیف سازی (Alignment) شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA 5 شاخص‌های ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۲- عکس ژل الکتروفورز مربوط به استخراج DNA

RNA کل برگ‌ها (در تیمارهای مختلف) با استفاده از محلول RNX-PLUS (سیناکلون) استخراج شد. سپس برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم DNase 1 (RNase-free DNase, Promega) تیمار شد. همچنین کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد سنجیده شد و به‌عنوان الگوی واکنش PCR قرار گرفت. پس از همسان‌سازی غلظت RNAهای مختلف، واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت (Geneall) iScript cDNA synthesis kit انجام شد و ارزیابی cDNA روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برای اطمینان از ساخت آن صورت گرفت. الگوی بیان ژن با استفاده از (Eva Green Master) Real time-PCR بررسی شد. میزان بیان ژن با روش Efficiency adjusted

اثرات مربوط به رانش ژنتیکی، تنگناهای ژنتیکی و یا اثر متعادل کننده در طول تاریخ تکاملی جمعیت است. نتایج این مطالعه نشان داد که مقدار مثبت بود که نشان دهنده تفاوت پایین میان فراوانی چندشکلی ها است. نتایج این مطالعه اثر انتخاب جهت دار بر روی این ژن در طول تکامل را نشان می دهد.

جدول ۳- بررسی تست Neutrality

M	S	Ps	Θ	Π	D
۱۳	۵۰۵	۰/۴۷۸۶۷۳	۰/۱۵۴۲۵۱	۰/۱۸۹۱۹۷	۰/۰۴۵۴۶۶

M: تعداد توالی، S: تعداد نواحی جداشده، Ps: S/m، Θ : π تنوع نوکلئوتیدی، D: تست Neutrality با استفاده از روش Tajima.

همردیف سازی چند توالی، به روش مرتب کردن توالی های بیولوژیکی، موقعیت دقیق نوکلئوتیدها را در مکان های مشابه مشخص می کند. این مکان های مشابه بین دو یا چند توالی می تواند نشانگر ارتباط ساختاری، عملکردی یا تکاملی بین توالی ها باشد. در بسیاری از حالات، فرض شده است که مجموعه ورودی از توالی های درخواستی یک رابطه تکاملی با هم دارند به طوریکه همه آن ها دارای یک جد مشترک هستند.

در این پژوهش شناسایی و تعیین موقعیت دامین های ژن *FEH1* از گیاه کنگر فرنگی با گیاهان مشابه توسط نرم افزار MEGA5 و ترسیم درخت فیلوژنتیکی توسط MEGA5 و به روش Neighbour joining صورت گرفت. شکل ۴ نمایی از هم ردیفی دامین های ژن *FEH1* همراه با سایر ژن های خانواده کاسنی را نشان می دهد که نقاط مشابه با رنگ های یکسان در هر ستون مشخص شده است.

شناسایی ژن و همولوگ های آن در گونه های گیاهی مختلف، ثابت می کند که این ژن ها از اجداد مشترکی منشعب گشته اند. این امر می تواند در درک بهتر سیر تحول گونه ها کمک کند و به منظور مطالعه بهتر ژن ها در آینده، سیستم های نوین و پیشرفته تری ایجاد شود. به نظر می رسد وجود شباهت و همولوژی زیاد توالی های مورد مطالعه می تواند در ارتباط با عملکرد و ساختار مشابه پروتئین های تشکیل دهنده ارتباط داشته باشد. نتایج حاصل از بررسی شباهت به دست آمده از نمونه کنگر فرنگی با سایر ژن های

FEH1 نشان داد که بیشترین فراوانی متعلق به باز گوانین (۳۱/۵۶) و کمترین فراوانی مربوط به باز تیمین (۱۲/۴) می باشد (جدول ۱). در برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی در گیاه کنگر فرنگی، مقادیر بالای جایگزینی پیریمیدینی بود به طوری که این مقدار برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۱۳/۷۵ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین ۱۵/۰۴ درصد دست آمده است. این مقادیر برای بازهای پورینی کمتر و به ترتیب برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین ۱۱/۶۳ درصد و ۱۲/۰۸ درصد بود (جدول ۲). نتایج این بررسی با نتایج سایر محققین که بیشتر جانشینی را جانشینی پیریمیدینی گزارش کرده اند، مطابقت دارد. علت این تغییرات احتمالاً می توان به متیله شدن سیتوزین نسبت داد (Picoult et al. 1999).

جدول ۱- فراوانی نوکلئوتیدهای حاصل از توالی نوکلئوتیدی ژن *FEH1* در گیاه کنگر فرنگی

نوکلئوتید	A	T/U	C	G
فراوانی	۲۷/۴	۱۲/۴	۲۸/۶۴	۳۱/۵۶

جدول ۲- ماتریس برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ژن *FEH1* در گیاه کنگر فرنگی

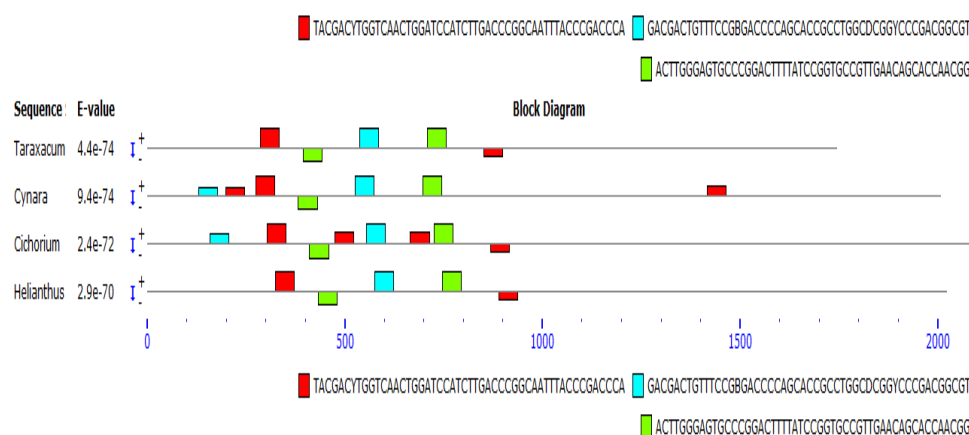
From/To	A	T	C	G
A	-	۵/۹۲	۵/۴۲	۱۱/۶۲
T	۶/۳۳	-	۱۳/۷۵	۶/۰۹
C	۶/۳۳	۱۵/۰۴	-	۶/۰۹
G	۱۲/۰۸	۵/۹۲	۵/۴۲	-

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصد جهش های انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت ضخیم و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت ساده نشان داده شده اند. جهت شناسایی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن تست Neutrality در گیاه مورد مطالعه کنگر فرنگی محاسبه شد (جدول ۳). جمعیت هایی که دچار افزایش معنی دار در اندازه جمعیت شده باشند و یا انتخاب جهت دار بر روی آن ها عمل کرده باشد، مقادیر D معنی دار و منفی تولید می کنند در حالی که مقادیر مثبت و معنی دار D، نشان دهنده

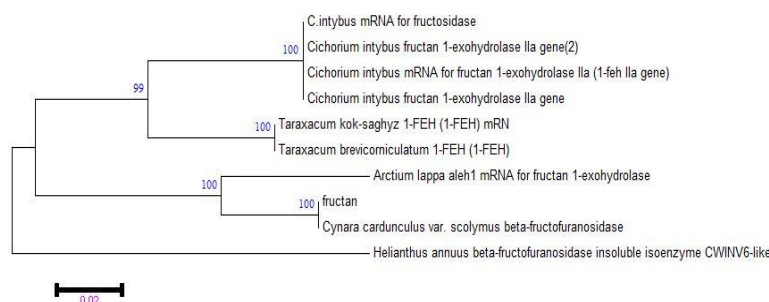
دو گروه اصلی قرار داد که توالی ژن *FEH1* در گروه اول و در شاخه‌ای منشعب از سایر توالی‌ها و همراه با گیاه کنگر فرنگی واریته *Scolymus* مشاهده شد (شکل ۵). طی مطالعات ثابت شده است که آنالیز فیلوژنتیکی ابزار قدرتمندی برای نشانی‌یابی بسیاری از ابهامات و مسائل مختلف مرحله تکامل است (Elliott et al. 2006). نتایج بررسی فیلوژنی نشان داد که گیاه کنگر فرنگی مورد مطالعه بیشترین شباهت یا به عبارتی کمترین فاصله ژنتیکی را با گیاه کنگر فرنگی واریته *Scolymus* (XM0251076.1) و گیاه آراقیطون (*Arctium lappa*) و بیشترین فاصله ژنتیکی با گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) دارد. بعد از آراقیطون، گیاه کنگر فرنگی بیشترین شباهت را با گیاه قاصدک (*taraxacum brevicomiculatum*) داشت. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود از گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus*) به‌عنوان Outgroup استفاده شده است و در یک شاخه مجزا نسبت به بقیه قرار گرفته است و درخت فیلوژنی را ریشه‌دار نموده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از مقایسه توالی ژن *FEH-1* در رقم کنگر فرنگی و وجود درصد شباهت بسیار زیاد آن با سایر توالی‌های مورد مطالعه، انتظار می‌رود جهت دست‌ورزی و انتقال ژنتیکی به‌منظور افزایش تحمل گیاه به تنش‌های اسمزی مانند شوری از ژن مورد مطالعه *FEH-1* در گیاهان تراریخت استفاده کرد.

خانواده کاسنی نشان داد که این توالی از درصد شباهت قابل قبولی برخوردار است. شناسایی ژن و همولوگ‌های آن در گونه‌های گیاهی مختلف، ثابت می‌کند که این ژن‌ها از اجداد مشترکی منشعب شده‌اند. این امر می‌تواند در درک بهتر سیر تحول گونه‌ها کمک کند و به‌منظور مطالعه بهتر ژن‌ها در آینده، سیستم‌های نوین و پیشرفته‌تری ایجاد شود. به‌نظر می‌رسد وجود شباهت و همولوژی زیاد توالی‌های مورد مطالعه می‌تواند در ارتباط با عملکرد و ساختار مشابه پروتئین‌های تشکیل دهنده ارتباط داشته باشد. نتایج حاصل از بررسی شباهت به‌دست آمده از نمونه کنگر فرنگی با سایر ژن‌های خانواده کاسنی نشان داد که این توالی از درصد شباهت قابل قبولی برخوردار است.

به‌منظور بررسی فیلوژنتیکی توالی به‌دست آمده از ژن *FEH1* در گیاه کنگر فرنگی، تعداد ۸ توالی دیگر از گیاهان مختلف انتخاب شد. بررسی فیلوژنتیکی توالی ژن *FEH1* و مقایسه آن با سایر توالی‌های مشابه در گونه‌های مختلف، ثابت کرد که میزان شباهت در میان توالی‌های مورد مطالعه بالاست و گیاهان از نظر فاصله ژنتیکی با همدیگر اختلاف ناچیزی دارند. وجود شاخه‌ها و دسته‌های مختلف در تجزیه خوشه‌ای نشان از وجود شباهت در میان گونه‌هاست. رسم درخت فیلوژنی برای توالی‌ها ثابت کرد ارتباط نزدیکی بین توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی برای ژن *FEH1* وجود دارد. رسم درخت فیلوژنی، توالی‌های مورد مطالعه را در



شکل ۴- هم‌ردیفی مقایسه‌ای دامین‌های حفاظت‌شده ژن *FEH1* گیاه کنگر فرنگی با سایر ژن‌های خانواده کاسنی



شکل ۵- درخت فیلوژنی توالی‌های مربوط به ژن *FEH1* بر اساس روش NJ در کنگر فرنگی با سایر گونه‌های هم‌خانواده در NCBI

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف تنش شوری، سالیسیلیک اسید و نانو نقره بر روی میزان بیان نسبی ژن *FEH1*

میانگین مربعات		
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
سالیسیلیک اسید	۲	۰/۸۴**
نانو نقره سبز	۲	۱۰۴/۰۹**
شوری	۲	۷۳/۵۲۵**
سالیسیلیک اسید × نانو نقره سبز	۴	۲۲/۵۱**
سالیسیلیک اسید × شوری	۴	۸/۷۴**
نانو نقره سبز × شوری	۴	۳/۷۱ ^{ns}
سالیسیلیک اسید × نانو نقره سبز × شوری	۸	۱/۰۸ ^{ns}
اشتباه	۲۷	۰/۰۰۷
کل	۵۳	
(CV%) ضریب تغییرات		۴/۴۲

ns, **, نشان‌دهنده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودن و عدم معنی‌دار بودن می‌باشد.

نتایج بررسی بیان ژن *FEH1*

در مطالعه حاضر، تیمار تنش شوری و محلول پاشی سالیسیلیک اسید و نانو نقره سبب تغییر در میزان بیان ژن *FEH1* شد. بررسی داده‌های حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین سطوح مختلف تیمارها و اثر متقابل سالیسیلیک اسید با شوری و نانو نقره سبز در سطح یک درصد از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۴). نتایج این آزمایش حکایت از افزایش معنی‌دار بیان ژن *FEH1* در گیاهان تیمار شده با شوری، سالیسیلیک اسید و نانو ذره نقره در سطح ۰/۰۱ درصد بود و بیان ژن وقتی تحت تنش شوری بود بیشترین مقدار را داشت. معنی‌دار شدن اثر متقابل دوگانه تنش

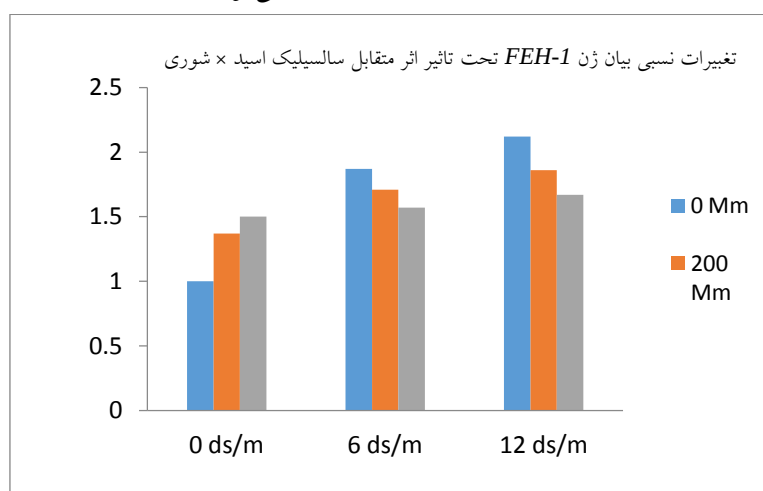
شوری با سالیسیلیک اسید و نانو نقره و نتایج مقایسه میانگین دانکن نشان داد عمل تنش‌های گوناگون در محلول پاشی‌های مختلف یکسان نبوده و بر حسب نوع و یا سطح تنش و الیستور مورد نظر تغییرات متنوعی رخ داده است. در اثر افزایش سطوح شوری بیان ژن *FEH1* نیز افزایش یافت. افزایش بیان ژن *FEH1* طی تنش شوری موجب تجزیه فروکتان و افزایش ذخایر کربوهیدرات‌های ساکاروز و فروکتوز در گیاه و کاهش عملکرد و رشد گیاه می‌شود. کاربرد سالیسیلیک اسید و نانو نقره هم‌زمان با تنش شوری باعث تعدیل اثرات مخرب شوری و کاهش بیان ژن

FEH1 شده است، اما کمتر از زمانی بود تیمار شوری به تنهایی به کار گرفته شد.

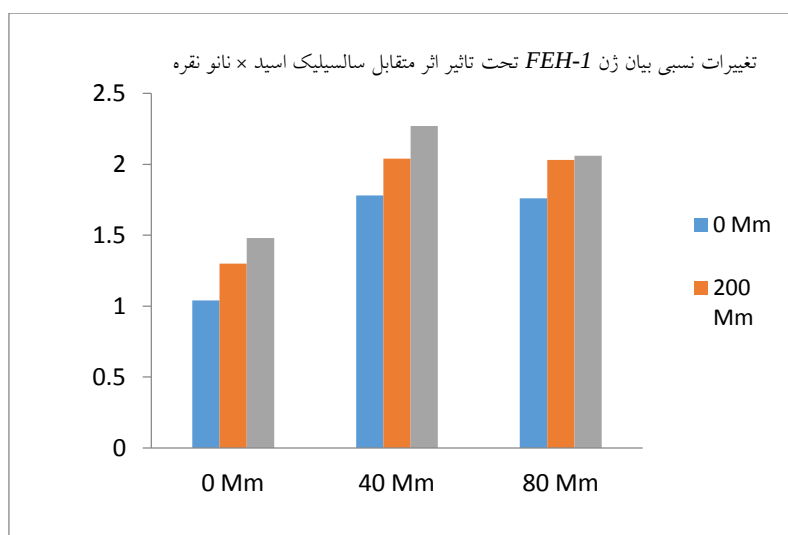
از نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های اسید سالیسیک و نانو نقره چنین بر می‌آید که در تیمار ۴۰۰ میلی‌مولار اسید سالیسیک با ۴۰ میلی‌مولار نانو نقره در سطح احتمال یک درصد بیان ژن *FEH1* در گیاه کنگر فرنگی افزایش معنی‌داری داشته است (شکل ۷). همچنین نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن تفاوت چندانی در ترکیب ۸۰ میلی‌مولار نانو نقره و ۲۰۰ میلی‌مولار سالیسیک اسید با ترکیب ۸۰ میلی‌مولار نانو نقره و ۴۰۰ میلی‌مولار سالیسیک اسید ندارد.

FEH1 شد و علاوه بر ایجاد یک مقاومت نسبی به تنش شوری باعث بهبود رشد گیاه نیز شد.

برهمکنش بین غلظت‌های اسید سالیسیک و شدت تنش بر روی مقدار بیان ژن در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ بسیار معنی‌دار بود. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های اسید سالیسیک و شوری نشان داد که تیمار ۱۲ دسی زیمنس بر متر شوری در سطح صفر سالیسیک اسید باعث بیشترین افزایش بیان ژن *FEH1* شده است (شکل ۶). بررسی نتایج نشان داد که کاربرد اسید سالیسیک در حالت نرمال نیز باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن



شکل ۶- بیان نسبی ژن *FEH-1* تحت تاثیر اثر متقابل سطوح مختلف سالیسیک اسید × شوری



شکل ۷- بیان نسبی ژن *FEH-1* تحت تاثیر اثر متقابل سطوح مختلف سالیسیک اسید × نانو نقره

یکی از رایج‌ترین فرم‌های ذخیره‌ای قندهای محلول فروکتان‌ها می‌باشند. فروکتان‌ها پلیمرهای فروکتوزی هستند که در کنار ایفای نقش کربوهیدرات ذخیره‌ای در گیاه، به ایفای نقش در مراحل متابولیک متاثر از تنش نیز می‌پردازد. افزایش غلظت فروکتان‌ها معمولاً با کاهش غلظت سایر قندهای محلول در آب مانند گلوکز، فروکتوز و ساکارز می‌شود. فروکتوز و ساکارز به‌عنوان سوسترای اصلی برای سنتز فروکتان‌ها عمل می‌کنند. افزایش فروکتان‌ها در شرایط تنش ممکن است به‌واسطه کاهش تقاضای محصولات فتوسنتزی ناشی از رکود گیاه در شرایط تنش باشد. هر چند رابطه بین متابولیسم فروکتان‌ها و تنظیم اسمزی سلول هنوز در هاله‌ای از ابهام قرار دارد اما حضور قندهای ساختاری پایه یعنی گلوکز، فروکتوز و ساکارز در تشکیل دیگر قندها طی فرایند متابولیسم فروکتان ممکن است دال بر نقش محوری این قند در فرایند سازگاری گیاه به شرایط تنش قلمداد شود. تنش بلند مدت منجر به افزایش غلظت قندهای محلول و کاهش مقادیر نشاسته در گیاه می‌شود (Silva and Arrabaka 2004). کاهش غلظت فروکتان‌های در مرحله تنش شدید همراه با افزایش فعالیت آنزیم‌های فروکتان اگزوهیدرولاز است. در تحقیق جاری نیز تنش شدید شوری باعث افزایش بیان ژن *FEH1* شد و اثر برهمکنش دو فاکتور سالیسیلیک اسید و محلول پاشی نانوذرات بر افزایش بیان ژن *FEH1* معنی‌دار بود. معنی‌دار بودن اثر متقابل بدین معناست که استفاده یا عدم استفاده از یک فاکتور به سطوح فاکتور دیگر بستگی داشته است. نتایج مقایسه میانگین ترکیب‌های تیماری نشان داد که بیشترین افزایش بیان ژن به‌ترتیب از ترکیب تیماری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر تنش شوری با ۴۰۰ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (۱/۶۷) به‌دست آمده است. این مقدار افزایش بیان ژن کمتر از زمانی هست که تیمار شوری به تنهایی به‌کار رفته است.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این تحقیق، بررسی روند انتخاب طبیعی در گیاه کنگر فرنگی از ژن *FEH1* در طی تکامل مثبت نشان داده شد.

همچنین، نواحی حفاظت‌شده بخش زیادی از توالی ژن *FEH1* را تشکیل می‌دهد که این امر نشان‌دهنده چندشکلی پایین این ژن و همچنین مستعد نبودن آن به تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش می‌باشد. نتایج نشان داد بیشترین نوکلئوتید مربوط به باز گوانین است و بیشترین میزان جانشینی بازها مربوط به بازهای پیریمیدینی بود که در تمامی قسمت‌های ژن پراکنده‌اند. توالی گیاه کنگر فرنگی با گیاه آراقی‌طون به میزان ۹۳ درصد شباهت، بیشترین درصد شباهت (کمترین فاصله ژنتیکی) را دارد. کمترین میزان شباهت (بیشترین فاصله ژنتیکی) توالی هدف گیاه کنگر فرنگی با گیاه کاسنی مشاهده شد. مشخصاً در این گیاه ژن *FEH1* هم از نظر میزان بیان و هم از نظر شدت بیان استعداد بالایی جهت تمرکز روی آن جهت افزایش قندهای محلول و نهایتاً افزایش تحمل گیاه به تنش شوری دارد. در این پژوهش مشخص شد که غلظت ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر تیمار شوری و بعد از آن غلظت ۸۰ میلی‌مولار نانو نقره سبز و در نهایت غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بیشترین تاثیر در بیان ژن *FEH1* دارند که این میزان بیان با توجه به استعداد ذاتی و تاثیرگذاری آن در گیاه کنگر فرنگی و الگوهای بررسی شده انطباق دارد. لیکن به جهت جلوگیری از مضرات ترکیبات نقره شیمیایی در خاک، که استفاده از آن می‌تواند مشکلاتی را در آینده پدید آورد، استفاده از نانو نقره سنتز سبز با غلظت ۴۰ میلی‌مولار و سالیسیلیک اسید ۲۰۰ میلی‌مولار برای محققین و زارعین محترم کشور در مناطقی که دارای آب و خاک شور هستند به‌صورت محلول‌پاشی توصیه می‌شود. به‌نظر می‌رسد بتوان این الیستورها را به‌عنوان القاء‌کننده کارآمد در بسیاری از گیاهان دارویی معرفی نمود و گامی با ارزش در جهت مهندسی متابولیت و تولید داروهای گیاهی باشد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل برای حمایت مالی آن‌ها در انجام این پروژه با شماره UOZ-GR-۱۵۸-۹۶۱۸ تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Cravero V, Martin E, Lopez Anido F, Cointy E (2010) Stability through years in a non-balanced trial of globe artichoke varietal types. *Scientia Horticulturae* 126: 73-79.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks J.B (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter* 1: 19-21.
- Elliott M B Irwin D M Diamandis E P (2006) In silico identification and Bayesian phylogenetic analysis of multiple new mammalian kallikrein gene families. *Genomics* 88: 591-599.
- Gatto A, De Paola D, Bagnoli F, Vendramin GG, Sonnante G (2013) Population structure of *Cynara cardunculus* complex and the origin of the conspecific crops artichoke and cardoon. *Ann Bot* 112: 855-865. <https://doi.org/10.1093/aob/mct150> PMID: 23877076 9.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Pardo JM (2000) The dawn of plant salt tolerance genetics. *Trends Plant Scientia* 5:317-319.
- Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (2007) *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer. The Netherlands
- Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 310: 926-932.
- Kawakami A, Yoshida M (2005) Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of gramin oligomers in hardened wheat. *Planta* 223:90-104.
- López A, Bonasora M G (2017) Phylogeography, genetic diversity and population structure in a Patagonian endemic plant. *Aob Plants* 9.
- Lupattelli G, Marchesi S, Lombardini R (2004) Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipemia. *Life Sciences* 76: 775-782.
- Mousavi H, Mahdi Nezhad N, Fakheri B A, Majdi M and Heidari F (2017) The Effect of Some Nanoparticles on Expression of A- Synthase Germacron Genes (TpGAS) and Parthenolide Synthase (TpPTS) in *Tanacetum Parthenium* Plant Under Water deficit Stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 33:314-325.(In Farsi).
- Narai-kanayama A, Tokita N, Aso K (2007) Dependence of fructooligosaccharide content on activity of fructooligosaccharide-metabolizing enzymes in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuberous roots during storage. *Journal of Food Science* 72: 381-387. 7
- Picoult-Newberg L, Ideker TE, Pohl MG, Taylor SL, Donaldson M A, Nickerson D A, Boyce-Jacino M (1999) Mining SNPs from EST databases. *Genome research* 9:167-174.
- Pilon-Smits E A H, Ebskamp M J M, Paul, M J, Jeuken M J W, Weisbeek P J, Smeekens S C M (1995) Evaluation of safety on inulin and oligofructose as dietary fiber. *Plant Physiology* 107: 125-130. 9
- Pirasteh-Anosheh H, Emam Y, Ashraf M, Foolad MR (2012) Exogenous application of salicylic acid and chlormequat chloride alleviates negative effects of drought stress in wheat. *Advanced Studies in Biology* 11: 501-520.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade L J, Ghareyazie B, Bennett J (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2: 1131-1145.
- Schütz K, Kammerer D, Carle R, Schieber A (2004) Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52(13): 4090-4096
- Silva M A, Jifon J L, Da Silva J A g, Sharma V (2007) Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19:193-201.
- Van Arkela J, Séveniera R, Hakkerta J C, Bouwmeester H J, Koopsa A J, Vander Meera I M (2013) Tailor-made fructan synthesis in plants: A review. *Carbohydrate Polymers* 93: 48-56.
- Wittermer SM (2005) Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of artichoke leaf extract in humans *Phytomedicine* 12: 28-38.
- Xue GP, McIntyre CL, Jenkins CL, Glassop D, Herwaarden AF, Shorter R (2008) Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat. *Plant Physiology* 146:441-454.
- Zhao P, Zhang Z, Lv X, Zhao X, Suehiro Y, Jiang Y, Wang X, Mitani S, Gong H, Xue D (2016) One-step homozygosity in precise gene editing by an improved CRISPR/Cas9 system. *Cell Research* 26: 633-6.
- Zhu XF, Zhang HX (2004) Flavonoids of *Cynara Scolymus*. *Chemistry of Natural Compound* 40:600-601.