ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤
صفحه ٥٠٦-٤٩٧

افزایش بیان ژن فلاون سنتتاز و ترکیبات فلاونوئیدی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان گیاه زیره سبز تحت تاثیر اسید سالیسیلیک

Increasing of flavone synthase gene expression and flavonoid compounds and antioxidant enzymes activity of *Cuminum cyminum* by salicylic acid

طیبه فیروزی[1]، صدیقه اسمعیل‌زاده‌بهابادی*[1]، براتعلی فاخری[1]، لیلا فهمیده[1]

۱- به ترتیب کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار، استادیار، دانشگاه زابل، ایران

Firoozie T[1], Esmaeilzadeh Bahabadi S[*1], Fakheri BA[1], Fahmideh L[1]

1. Graduated MSc Student, Assistant Professor, Associate Professor, Assistant Professor, University of Zabol, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۲۵- تاریخ پذیرش: ۹٤/۷/۱۹)

چکیده

زیره سبز (*Cuminum Cyminum*) گیاهی دارویی از خانواده چتریان (Apiaceae) سرشار از متابولیت‌های ثانویه از جمله فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشد. اسید سالیسیلیک متعلق به گروهی از ترکیبات فنلی، به عنوان یک جز پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته شده و به عنوان محرک در بهبود بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود. در این پژوهش اثر اسید سالیسیلیک بر بیان ژن آنزیم فلاون سنتتاز و ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین زیره سبز بررسی شد. همچنین میزان مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز مطالعه شد. بدین منظور گیاه زیره سبز در مرحله رشد رویشی (۲۱ روزه) با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک تیمار شد و در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ روز بعد از اعمال تیمار برداشت شد. نتایج نشان داد بیان ژن فلاون سنتتاز، ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت که در روز سوم بیشترین افزایش معنی‌دار مشاهده شد، به طوری‌که حدود دو برابر بیشتر از نمونه-های شاهد بود. در روز چهارم روند کاهشی مشاهده داشت ولی هم‌چنان این روند کاهشی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. رابطه معنی‌داری بین بیان ژن فلاون سنتتاز و ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین مشاهده شد. میزان مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تیمار اسید سالیسیلیک در مراحل برداشت نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. بنابراین اسید سالیسیلیک به عنوان یک القا کننده سبب فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه شده و از طریق افزایش بیان ژن فلاون سنتتاز منجر به افزایش ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین زیره سبز شد.

واژه‌های کلیدی

زیره سبز
فلاون سنتتاز
متابولیت ثانویه
محرک

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]

مقدمه

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* L. از خانواده چتریان (Apiaceae) سرشار از متابولیت‌های ثانویه است. عصاره زیره سبز دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدسرطانی می‌باشد (Sachin et al. 2007). متابولیت‌های ثانویه گروه متنوعی از ملکول‌ها هستند که به سازگار شدن گیاه به خصوص در شرایط تنش‌های محیطی کمک می‌کنند (Ramawat and Merillon 1999). از جمله این ترکیبات فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشند. فلاونوئیدها از ترکیب مسیر شیکیمات و مسیر استات تولید می‌شوند. در طول مسیر شیکیمات، آمینو اسید آروماتیک L– فنیل آلانین آمونیالیاز به مواد سازنده اسیدهای فنیل پروپانوئیک تبدیل می‌شود. آنتوسیانین‌ها نیز مشابه فلاونوئیدها، یک رنگیزه محافظ می‌باشند که گیاه را در شرایط تنش محافظت می‌کنند. در گیاهان تولید آنتوسیانین تحت تاثیر متقابل عوامل داخلی و خارجی مانند نور، دما، کربوهیدرات، هورمون‌های گیاهی و تنش آبی است. این عوامل اکثرا از طریق تاثیر بر عوامل رونویسی بر میزان آنتوسیانین تاثیر می‌گذارند (Kim et al. 2006). بیشتر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های درگیر در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه شناسایی و تعیین توالی شده‌اند (Harborne and Williams 2000). همزمان با بیوسنتز فلاونوئیدها، ترکیبات متنوع دیگری از قبیل فلاون‌ها، ایزوفلاون‌ها، آنتوسیانین‌ها به واسطه فعالیت آنزیم‌های مسیر سنتز می‌شوند. فلاون‌ها از مهمترین مشتقات فلاونوئیدها می‌باشند که نقش‌های ویژه‌ای در گیاهان و اهمیت زیادی در درمان و سلامتی انسان دارند (Arts and Hollman 2005). فلاون‌ها در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها از پیش ماده فلاونون‌ها سنتز می‌شوند. مسیر بیوسنتزی فلاون‌ها تحت اثر دو سیستم آنزیمی مستقل فلاون سینتاز ۱ و فلاون سینتاز ۲ در گیاهان صورت می‌گیرد که به طور همزمان در یک گیاه یافت نمی‌شوند. فلاون سینتاز ۱ یک دی‌اکسیژناز محلول است که اولین بار در سال ۱۹۸۱ در گیاه جعفری از خانواده چتریان گزارش شد (Rice-Evans et al. 1997). روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود (Verpoorte and Alfermann 2002). یکی از روش‌های افزایش تولید متابولیت‌ها استفاده از محرک‌ها می‌باشد. محرک‌ها ترکیباتی با منشا زیستی و غیرزیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao et al. 2005). محرک‌های غیرزیستی مانند اشعه ماورای بنفش، نمک، فلزات سنگین و بعضی از ترکیبات شیمیایی مانند جاسمونیک اسید و اسید سالیسیلیک نیز به منظور افزایش تولید این ترکیبات مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نقش اسید سالیسیلیک بر تحمل گیاه نسبت به بیماری‌زاها و سایر عوامل تنش‌زا به خوبی شناخته شده است. به تازگی نقش آن به عنوان یک ترکیب پیام‌رسان[1] در فعال‌سازی پاسخ‌های گیاهان آشکار شده است (Hayat et al. 2009). به علت نقشی که اسیدسالیسیلیک به عنوان یک محرک دارد و باعث افزایش بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه می‌شود، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است (Pu et al. 2009). مطالعات متعددی نشان داده که اسید سالیسیلیک در تحریک تولید بسیاری از متابولیت‌ها مانند ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها موثر می‌باشد (Kang et al. 2004). در واقع اسید سالیسیلیک به عنوان یک جز پیام‌رسان کلیدی در فعال سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته می‌شود. پاسخ‌های دفاعی گیاه منجر به بیوسنتز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاهی می‌شود. گزارش‌هایی از اثر اسید سالیسیلیک بر افزایش عملکرد برخی گیاهان مانند سویا (Kumar et al. 1999) و نخود فرنگی (Kumar et al. 1997) منتشر شده است. افزایش فلاونوئیدها و آنتوسانین در گیاه دارویی بابونه تحت تیمار اسید سالیسیلیک گزارش شده‌است (Zarinkamar et al. 2013). افزایش بیان ژن منتول دهیدروژناز و میزان منتول تحت تیمار اسید سالیسیلیک در گیاه نعناع فلفلی نیز گزارش شده‌است (Rasouli 2015). افزایش میزان آنتوسیانین توسط اسید سالیسیلیک بیانگر توانایی اسید سالیسیلیک در افزایش تحمل گیاه در برابر خسارت اکسیداتیو و رادیکال آزاد است (Kim et al. 2006). لذا القا به عنوان راهکاری موثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، ترکیبات فنولیک و فیتوالکسین‌ها شناخته شده‌است. از آنجا که آنزیم فلاون سنتتاز تنظیم‌کننده ابتدای مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها می‌باشد، بنابراین هدف از این مطالعه ارتباط بیان ژن فلاون سنتتاز و ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین

[1] Signaling

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]

زیره سبز بود. در ادامه شاخص‌های بیوشیمیایی شامل پراکسیداسیون لیپید، پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی از جمله سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت گلدانی

برای انجام این پژوهش بذور زیره سبز از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و در گلدان‌ها کشت شدند. به این ترتیب ابتدا یک خاک تقریبا سبک از مخلوط مساوی ماسه الک شده، رس، گیاه-خاک و کود حیوانی تهیه شد. بذرها به تعداد زیاد در گلدان‌هایی به ابعاد (۲۵×۲۰) پاشیده شد. کشت بذر زیره سبز در عمق یک سانتی‌متری از خاک صورت گرفت. پس از کشت گلدان‌ها در شرایط یکسان در دمای روزانه ۲۰ درجه سانتی‌گراد و شبانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. گلدان‌ها یک روز در میان آبیاری شدند و هفته‌ای یکبار به آنها مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon 1938) داده شد.

تیمار با اسید سالیسیلیک

اعمال محلول اسید سالیسیلیک با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار در مرحله رشد رویشی (گیاهچه‌های ۲۱ روزه) به صورت محلول‌پاشی برگی در یک مرحله انجام شد. سپس اندام‌های هوایی در زمان‌های مختلف ۱، ۲، ۳ و ٤ روز پس از تیمار اسیدسالیسیلیک به منظور مطالعات بعدی برداشت شدند. به این منظور بخش هوایی گیاهان از سطح خاک قطع شد و بخشی از گیاهان برای آزمایش‌های مولکولی با نیتروژن مایع تثبیت شدند و در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بخشی دیگر برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

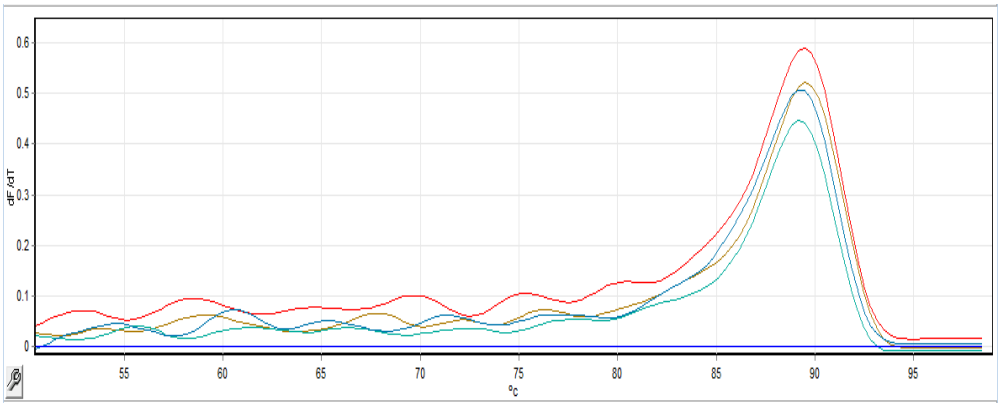
مطالعه بیان ژن فلاون سنتتاز

برای استخراج RNA کل از گیاه زیره سبز، استخراج RNA کل از گیاهچه‌های فریز شده با استفاده از کیت RNA X Plus (شرکت سینا ژن، شماره کاتالوگ RN7713C) انجام شد. پس از استخراج RNA کل، UV اسپکتروفتومتری و از طریق الکتروفوروز روی ژل آگارز بررسی شد. سپس سنتز DNA معکوس با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit ساخت شرکت Vivantis صورت گرفت. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های فلاون سنتتاز با شماره دسترسی *DQ683349.1* و توبولین با شماره دسترسی *DQ435671.1* با استفاده از نرم‌افزار Oligo Therapeutics و سایت Oligonucleotid Properties Calculator انجام شد (جدول۱). توبولین یک ژن خانه‌دار است که در بررسی کمی بیان ژن به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. در این تحقیق از دستگاه RG- 3000 Corbett Reseorch و کیت حاوی رنگ EvaGreen برای ارزیابی کمی استفاده شد. اجزای واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ٤ میکرو-لیتر Master mix، یک میکرولیتر cDNA و یک میکرولیتر از هر آغازگر با هم مخلوط شدند. برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از روش Real time PCR یکسان بود. بدین صورت که فعال‌سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سپس ٤۰ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه و بسط ترکیبی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. منحنی ذوب با استفاده از فلورسنت EvaGreen هیچ ساختار سنجاق سری یا شکل‌گیری لوپ را در واکنش PCR شناسایی نکرد (شکل ۱). محصولات تکثیر Real time PCR روی ژل آگارز بار گذاری شد تا وجود باند صحیح و منفرد تایید شود. سیگنال‌های منفرد در هر مرحله پلیمریزاسیون در دستگاه جمع‌آوری شد. میزان آستانه (Ct) توسط نرم‌افزار داخلی دستگاه مطابق فرمول $2^{-(\Delta CT\ Target-\ \Delta CT\ Tubulin)}$ با مقایسه مقادیر Ct ژن توبولین و فلاون سینتاز حاصل از cDNA مشابه به عنوان الگو محاسبه شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فلاوونوئیدی

جهت اندازه‌گیری محتوی فلاونوئیدی ابتدا ۰/۱ گرم اندام هوایی در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده و به مدت ۷۲-۲٤ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. پس از سانتریفوژ به یک میلی‌لیتر محلول رویی، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آلومینیوم ده درصد، ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه کرده و جذب نمونه‌ها در طول موج ٤۱۵ نانومتر خوانده شد. سنجش فلاونویید کل نیز براساس منحنی استاندارد کوئرسیتین سنجیده شد (Krizek 1998).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]



شکل۱- منحنی ذوب ژن فلاون سنتتاز – هر Peak نمایانگر یک محصول PCR است که اختصاصی بودن محصول را نشان می‌دهد.

جدول۱- آغازگر طراحی شده برای ژن فلاون سنتتاز و توبولین

Gene name	Primer Sequence (5′-3′)	T_m	GC%
F: FNS	ATGGCT CCAACAACAATTACTG	58.4	40.91
R: FNS	CCAGTCTTCAAAGGC CTCAAC	61.3	52.38
F: Tubulin	CTCCTTGAGCTAGTCGTCGC	62.5	60.0
R: Tubulin	ACAAGGCAAAAACATTCCG	54.3	40.0

سنجش آنتوسیانین

برای سنجش آنتوسیانین کل، ۰/۱ گرم از اندام هوایی در سه میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و کلریدریک اسید به نسبت ۹۹: ۱) خوب ساییده شد. سپس عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت $g \times$ ۱۵۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شد. محلول رویی برداشته و به مدت یک شب در تاریکی درون یخچال قرار داده شد. میزان جذب این ماده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی ($E= 33000\ mol\ cm^{-2}$) استفاده شد (Wagner 1979).

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید غشا

برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دی آلدهید به عنوان محصول پراکسیده شدن اسیدهای چرب غشاها به روش Heath and Packer (1969) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، در ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ با نیتروژن مایع آسیاب و به آن پنج میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید یک درصد اضافه شد عصاره به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در $g \times$ ۱۲۰۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس، به یک میلی‌لیتر از محلول رویی، ۵ میلی-لیتر محلول ۲۰ درصد تری کلرو استیک اسید حاوی ۰/۲۵ درصد تیوباربیتوریک اسید اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله در یخ، سرد شد. سپس نمونه‌ها مجددا در $g \times$ ۱۰۰۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. میزان مالون دی آلدئید با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب ثابت (ε =۱۵۵ mM cm) محاسبه شد.

تعیین مقدار هیدروژن پراکسید

بدین منظور ۰/۲گرم بافت گیاهی منجمد شده، روی یخ با ۳ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید تا مرحله همگن شدن ساییده و سپس سانتریفوژ ($g \times$ ۱۲۰۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول روشناور، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۱۰ mM، pH=۷) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم اضافه شد و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پراکسید هیدروژن محاسبه شد (Alexieva et al. 2001).

استخراج عصاره جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها

۰/۵ گرم بافت تازه برگ با کمک نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب شد و پس از آن به بافت آسیاب‌شده، یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۵ مولار و پلی وینیل پلی پیرولیدون دو درصد اضافه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]

مدت ۲۰ دقیقه در $g \times$ ۱٤۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با استفاده از روش Ries and Giannopolitis (1977) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۱ میلی مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و تترازولیوم- نیتروبلو ۷۵ میکرومولار و ۱۵ میکرولیتر ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود. مقدار جذب در طول موج ٥٦۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش In et al. (2007) استفاده شد. ٤۹۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۲۲۵ میلی‌مولار و ٤۹۰ میکرولیتر محلول گایاکول ٤٥ میلی‌مولار با هم مخلوط و به آن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. تغییرات جذب در طول موج ٤۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی گایاکول پراکسیداز معادل $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۲٦/٦ محاسبه شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Luck (1974) با اندکی تغییرات استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۹۸۰ میکرولیتر از بافر فسفات حاوی پراکسید هیدروژن دو میلی‌مولار مخلوط و تغییرات جذب آنها در طول موج ۲٤۰ نانومتر از راه اندازه‌گیری تجزیه پراکسید هیدروژن توسط اسپکتروفتومتر به صورت تغییرات جذب بر زمان (OD/min) ثبت شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی کاتالاز $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۳۹/٤ محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها با سه تکرار انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم‌افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای در سطح احتمال ٥ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج بررسی میزان بیان ژن فلاون سنتتاز تحت تیمار اسید سالیسیلیک نشان داد که بیان ژن فلاون سنتتاز در زمان‌های مختلف برداشت نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت و بیشترین مقدار بیان ژن فلاون سنتتاز سه روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد و روز چهارم روند کاهشی نشان داد اما هم‌چنان این کاهش نسبت به شاهد افزایش داشت (شکل۲).

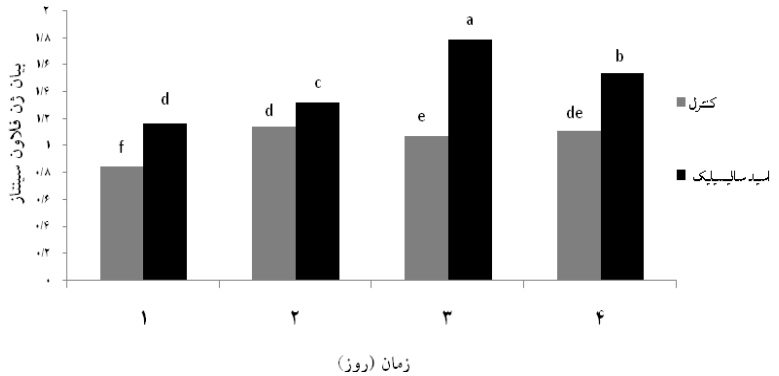
نتایج بررسی میزان ترکیبات فلاونوئیدی تحت تیمار اسید سالیسیلیک نشان داد که در زمان‌های مختلف برداشت میزان ترکیبات فلاونوئیدی نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت و بیشترین میزان این ترکیبات سه روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد و روز چهارم روند کاهشی نشان داد اما هم‌چنان این روند کاهشی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل۳).

نتایج بررسی میزان آنتوسانین نشان داد که در زمان‌های مختلف برداشت، اسید سالیسیلیک باعث افزایش میزان آنتوسیانین نسبت به نمونه‌های شاهد شد و بیشترین میزان این ترکیبات هم سه روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد که در این روز نسبت به شاهد افزایش تقریبا دو برابر مشاهده شد و روز چهارم روند کاهشی نشان داد اما هم‌چنان این روند کاهشی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل٤).

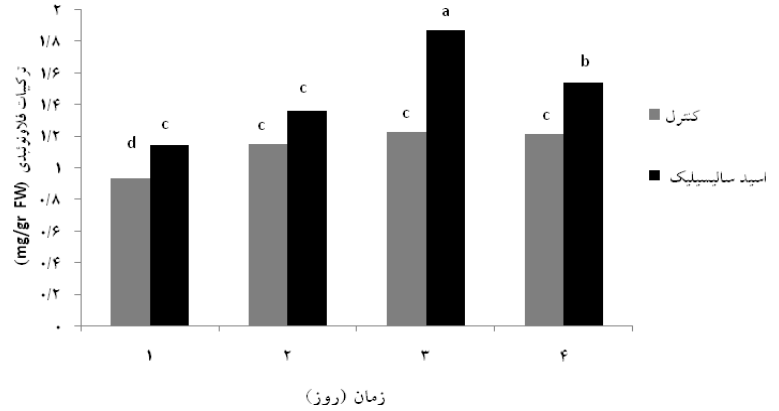
نتایج بدست آمده نشان داد که تیمار اسید سالیسیلیک تاثیر معنی-داری بر میزان مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن داشت (شکل ٥). میزان مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن در روز دوم پس از اعمال اسید سالیسیلیک به طور معنی‌داری افزایش یافت و همچنان در روزهای بعد نیز از نمونه‌های شاهد بیشتر بود به طوری‌که بیشترین میزن در روز سوم بعد از تیمار بود.

نتایج نشان داد اسید سالیسیلیک تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داشت. بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که میزان فعالیت آن یک روز پس از تیمار افزایش یافت و در زمان‌های بعدی پس از برداشت نیز نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (شکل٦- الف). فعالیت آنزیم پراکسیداز یک روز بعد از تیمار به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و بیشترین میزان فعالیت در روزهای دوم و سوم بعد از تیمار مشاهده شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]



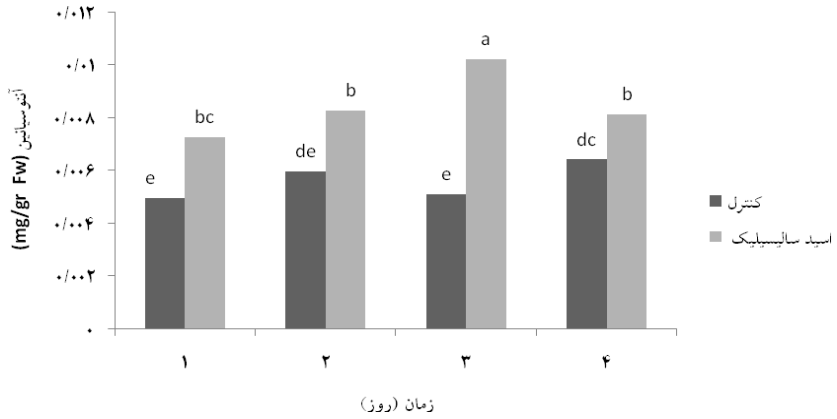
شکل ۲- میزان بیان ژن فلاون سنتتاز گیاهچه‌های زیره سبز تحت‌تاثیر اسید سالیسیلیک. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد.



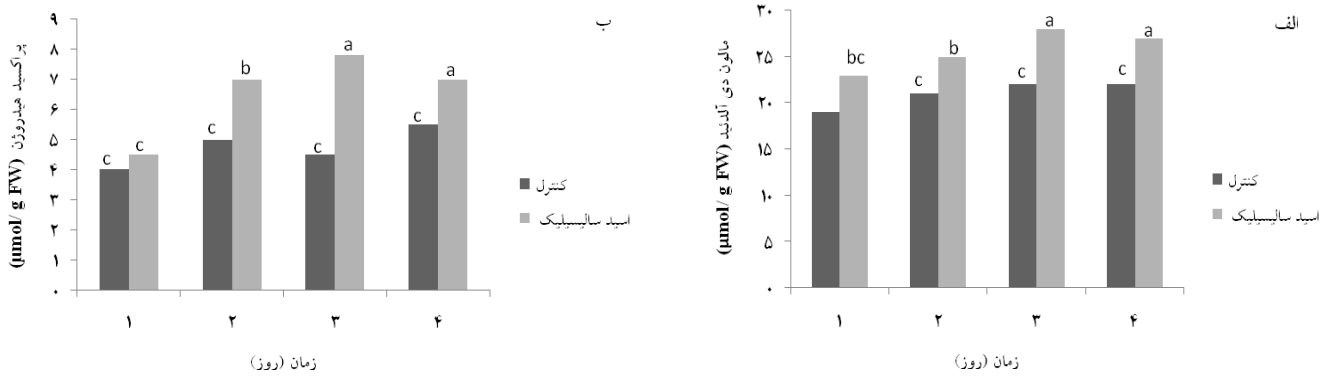
شکل ۳- میزان ترکیبات فلاونوئیدی گیاهچه های زیره سبز تحت تاثیر اسید سالیسیلیک. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد.

در روز چهارم میزان فعالیت کاسته شد ولی همچنان از نمونه‌های شاهد بیشتر بود (شکل ٦- ب). فعالیت آنزیم سوپراکسید - دیسموتاز نیز یک روز بعد از تیمار به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و در روز دوم تغییری نیافت ولی همچنان از نمونه‌های شاهد بیشتر بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در روز سوم بعد تیمار مشاهده شد و در روز چهارم به طور معنی‌داری کاهش یافت ولی همچنان از نمونه‌های شاهد بیشتر بود. زیره سبز گیاه دارویی سرشار از متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. از جمله این ترکیبات فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشند (Sowbhagya et al. 2008). بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها توسط یک گروه آنزیمی هدایت شده که این آنزیم‌ها یا به صورت آزاد و یا در ارتباط با غشاهای سلولی می‌باشد (Srere 1987). مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها مسئول فراهم کردن پیش ماده‌های لازم برای سنتز لیگنین، لیگنان‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات دیگر می‌باشند (Rice-Evans 1997). این ترکیبات در شرایط تنش در گیاه تولید می‌شوند. مطالعات متعددی نشان داده که اسید سالیسیلیک باعث افزایش میزان برخی از متابولیت‌های ثانویه به ویژه آنها که در ساز و کارهای دفاعی گیاه نقش دارند، می‌شود (Kang et al. 2004). در پژوهش حاضر اثر اسید سالیسیلیک در بیان ژن فلاون سنتاز و متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بررسی شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]



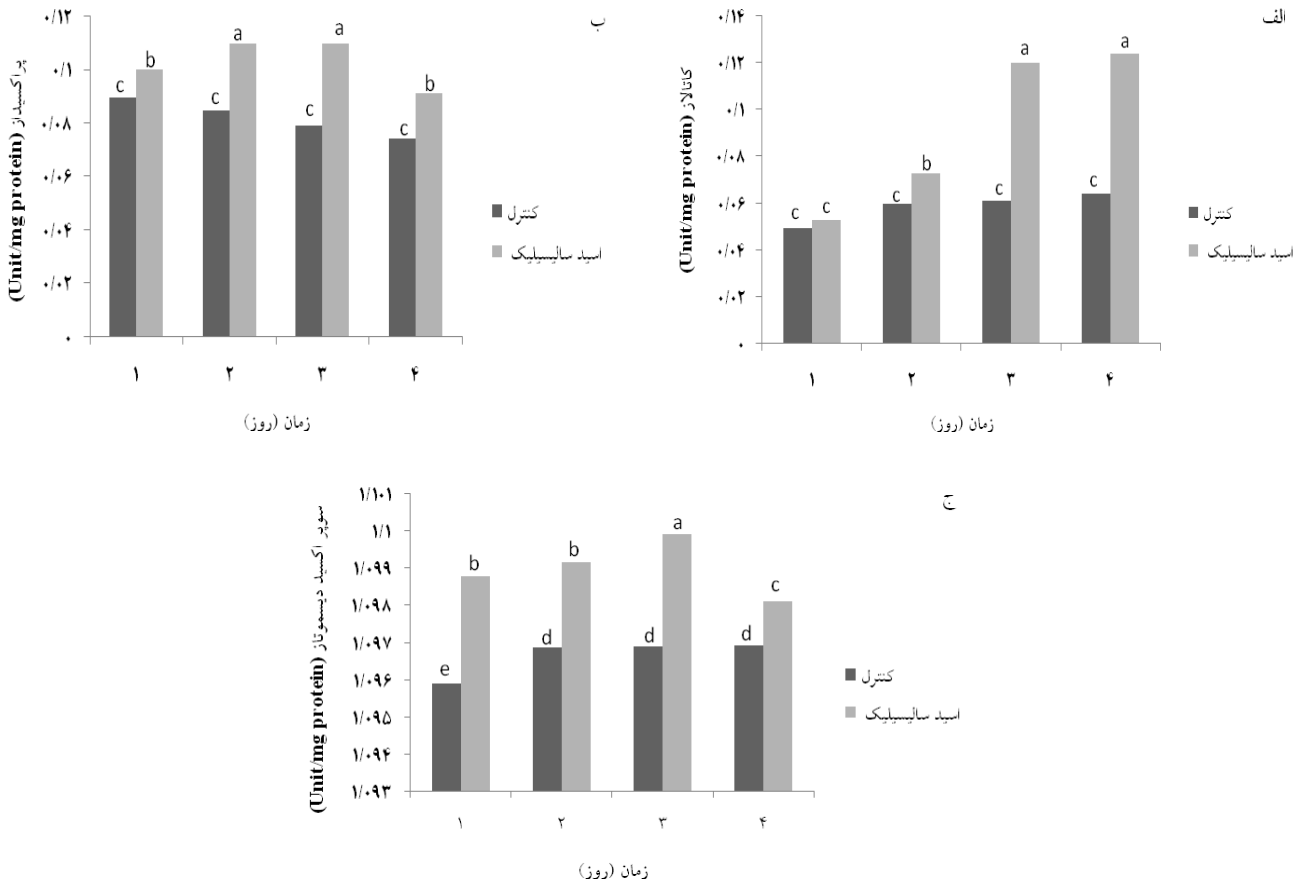
شکل ٤- میزان آنتوسیانین گیاهچه های زیره سبز تحت تاثیر اسید سالیسیلیک. حروف یکسان بیانگرعدم معنی‌داری در سطح پنج درصد



شکل۵- میزان مالون دی آلدئید (الف) و پراکسید هیدروژن (ب) گیاهچه‌های زیره سبز تحت‌تاثیر اسید سالیسیلیک. حروف یکسان بیانگرعدم معنی‌داری در سطح پنج درصد

درترکیبات محرک مانند اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونسک از مولکول‌های تاثیرگذار در مسیر علامت‌رسانی تنش‌ها می‌باشند و به طور گسترده‌ای در این زمینه روی آن‌ها مطالعه شده‌است. نقش اسید سالیسیلیک بر تحمل گیاه نسبت به بیماری‌زاها و سایر عوامل تنش‌زا به خوبی شناخته شده‌است. به تازگی نقش آن به عنوان یک ترکیب پیام‌رسان در فعال کردن پاسخ‌های گیاهان پر رنگ‌تر شده‌است (Hayat et al. 2009). گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن از عوامل مهم در تنش اکسایشی بوده، و به طور قابل توجهی متابولیسم ثانویه را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. گزارش شده که اسید سالیسیلیک باعث تولید پراکسید هیدروژن می‌شود (Antoine et al. 2008). در تحقیق حاضر افزایش تولید پراکسید هیدروژن و پر اکسیداسیون لیپیدهای غشا تحت‌تاثیر اسید سالیسیلیک مشاهده شد. مکانیسم‌های دفاعی آنزیمی در گیاه در برابر محرک‌ها شامل سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و دهیدروآسکوربات‌ردوکتاز (Tang et al. 2006) و غیر آنزیمی شامل آسکوربیک‌اسید، کارتنوئیدها، ویتامین E، پلی‌آمین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها (Hsieh et al. 2002) که رادیکال‌های آزاد اکسیژن را کرده و مانع آسیب رساندن آن‌ها به پروتئین‌های غشا و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله سوپراکسید-دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز تحت تاثیر اسید سالیسیلیک در گیاهچه‌های خیار گزارش شده است. در تحقیق (Liu et al. 2009). حاضر نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان تحت‌تاثیر محرک اسید سالیسیلیک افزایش یافت.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]



شکل ٦- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (الف)، آنزیم پراکسیداز (ب)، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (ج) گیاهچه‌های زیره سبز تحت تاثیر اسید سالیسیلیک. حروف یکسان بیانگرعدم معنی‌داری در سطح پنج درصد.

محرک‌ها ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی راه‌اندازی کنند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه شوند (Marschner 1995). شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از انتقال سیگنال را القا می‌کند که با تشخیص مولکول‌های محرک توسط پذیرنده‌ها شروع می‌شود. از طرف دیگر با توجه به بیان پایین ژن‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌توان از این محرک‌ها جهت افزایش بیان ژن‌های درگیر در سنتز آن‌ها استفاده کرد تا پس از تکثیر و کلون کردن آن‌ها در یک وکتور مناسب تولید متابولیت‌های با ارزش را در گیاهان دیگر (که زمان رشد کوتاهی دارند و یا خوراکی می‌باشند) و حتی در موجودات دیگر تسهیل کرد. فلاونوئیدها و فلاون‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند و ثابت شده که میزان تولید آن‌ها و هم‌چنین بیان ژن مرتبط با سنتز آن‌ها در شرایط اعمال تنش افزایش می‌یابد (Hsieh et al. 2002). بنابراین افزایش محتوی فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها که در یک مسیر آبشاری و توسط تعداد زیادی آنزیم کاتالیز می‌شوند می‌تواند با افزایش تولید آنزیم‌های این مسیر مرتبط باشد. در این رابطه می‌توان به افزایش معنی‌دار بیان ژن فلاون سنتتاز، محتوی فلاونوئیدی و آنتوسیانین گیاهچه‌های زیره سبز تحت تیمار محرک نقره و مس اشاره کرد (Yosefi et al. 2011). القا تعداد زیادی از ژن‌های وابسته به دفاع تحت‌تاثیر جاسمونات و اسید سالیسیلیک گزارش شده است (Tang et al. 2006). تحقیق حاضر نخستین گزارش تاثیر اسید سالیسیلیک بر بیان ژن فلاون سنتتاز وترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین زیره سبز است. نتایج بیان ژن در زمان‌های مختلف برداشت سیر افزایشی نشان داده به طوری که بیشترین افزایش سه روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد و روز چهارم کاهش معنی‌داری داشت اما همچنین این روند نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. همچنین اسید سالیسیلیک باعث افزایش ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین شد که در واقع همبستگی مثبتی بین بیان ژن فلاون سنتتاز و ترکیبات فلاونوئیدی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]

و آنتوسیانین مشاهده شد به‌طوری که روند تغییرات میزان بیان ژن با روند تغییرات ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین در مراحل مختلف برداشت مطابقت داشت. نتیجه این تحقیق با یافته‌های Taguchi et al. (2001) که گزارش کردند اسید سالیسیلیک موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز و تولید گروهی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود مطابقت دارد. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد اسید سالیسیلیک باعث فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه شد و از طریق افزایش بیان ژن فلاون سنتاز باعث افزایش تولید ترکیبات فلاونوئیدی شد.

منابع

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell Environment 24: 1337-1344.

Antoine L, Harfouche E, Rugini E, Mencarelli F (2008) Salicylic acid induces H_2O_2 production and endochitinase gene expression but not ethylene biosynthesis in *Castanea sativa* in vitro model system. Journal of Plant Physiology 165: 65l-734.

Arts ICW, Hollman PCH (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. American Journal of Clinical Nutrition 81: 317-325.

Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real time reverse transcription PCR (RT- PCR) trends and problems. Journal of Moleculare Techiquse 29: 23-39.

Carrillo-Casas EM, Hernandez- Castro R, Suarez- Guemes F, de Iapena- Moctezuma A (2008) Selection of the internal control gene for real time quantitative RT- PCR assays in temperature treated leptospira. Current Microbiology 56: 539- 546.

Giannopolitis C, Ries S (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plant. Plant Physiology 59: 309-314.

Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since. Phytochemistry 55: 481-504.

Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad Q (2009) Effect of exogenous salicylic acid underchanging environment A review. Environmental and Experimental Botany 68: 14-25.

Heath LR, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hoagland DR, Arnon DI (1938) The water-method for growing plants without soil. Berkeley: University of California.

Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002) How to define resistance to water deficit stress. Plant Physiology 130: 618-626.

In BC, Motomura S, Inamoto K, Doi M, Mori G (2007) Multivariente analysis of realation between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors and vase life of cut Asomi Red Roses. Japanese Society for Horticultural Science 76: 66-72.

Kang S, Jung H, Bahk J, Yang J (2004) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science 166: 745-751.

Kang SM, Jung HY, KangYM, Yun DJ (2004) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Sciences 166: 745-751.

Kim JS, Lee BH, Kim SH, Ok KH, Cho KY (2006) Response to environment and chemical signals for anthocyanin biosynthesis in nonchlorophyhous cron leaf. Journal of Plant Biology 49:16-25.

Krizek DT, Britz SJ, Mirecki RM (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv, New Red Fire Lettuce. Plant Physiology 103:1-7.

Kumar P, Dube D, Chauhan VS (1999) Effect of salicylic acid on growth development and some biochemical aspects of soybean (*Glycine max L. Merrill*). Indian Journal of Plant Physiology 4: 327-330.

Kumar P, Dube SP, Mani VP, Chauhan VS (1997) Effect of salicylic acid on flowering pod formation and yield of pea (*Pisum sativum* L.) National Seminar on Plant Physiology for Sustainable Agriculture, India, New Delhi, 19-21.

Liu W, Ai XZ, Liang WJ, Wang HT, Liu SX, Zheng N (2009). Effects of salicylic acid on the leaf photosynthesis and antioxidant enzyme activities of cucumber seedlings under low temperature and light intensity. Journal of Applied Ecology 20:441-445.

Luck H (1974) In: Methods in Enzymatic Analysis (ed. Bergmeyer, H.). Academic Press, New York, 885.

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.

Pu GB, Dong-Ming M, ChenJL, Ma LQ (2009) Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Reports 28:1127-1135.

Ramawat KG, Merillon JM (1999) Biotechnology Secondary Metabolites. Science Publisher, NH, USA.

Rasouli D (2015) The effects of manganese and salicylic acid on gene expression menthol piperita by Real time PCR. University of Zabol, Iran. (In Farsi)

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Science 2: 152.

Sachin BS, Sharma SC, Sethi S, Tasduq SA, Tikoo MK (2007) Herbal modulation of drug bioavailability enhancement of rifampicin levels in plasma by herbal products and a flavonoid glycoside derived from *cyminum*. Phytotherapy Research 21: 157-63.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]

SingletonVL, Rossi JR (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungestic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.
Sowbhagya HB, Sathyendra Rao BV, Krishnamurthy N (2008) Evaluation of size reduction and expansion on yield and quality ofcumin (*Cuminum cyminum*) seed oil. Journal of Food Engineering 84: 595-600.
Srere PA (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. Journal of Biochemistry 56:89-124.
Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M (2001) Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransfrases from tabacco cultured cells that have broad substrate specifieity and are induced by salicylic acid and auxin European. Journal of Biochemistry 268: 4086-4094.
Tang L, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Choi JS, Cho KY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS (2006) Enhanced tolerance of *Chmomilla* L. Iranian Journal of Plant Biology 5: 67-74 (In Farsi).
Zhao J, Davis L, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advance 23: 233-383.
transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. Plant Cell Report 25: 1380-1386.
Verpoorte R, Alfermann A (2002) Metabolic Engineering of Plant Secondary metabolism. Plant Cell Tissue and Organ Culture 68: 211-212.
Wagner GJ (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutralsugras free amino acids and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology 64:88-93.
Yousefi K, Riahi Mdvar A, Nasiri Bznjany MA (2011) Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavone synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* endemic from Iran. 12th Iranian Genetics Congress, Iran (In Farsi)
Zarinkamar F, Abdollazadeh Zaviehjak A, Sharifi M, Behmanesh M (2013) Effect of salicylic acid in flavonoids, apigenin, anthocyanin and carbohydrate in *Mutricaria*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.6.8]