

جداسازی و شناسایی ژن *FEHI* در گیاه کنگر فرنگی خاردار (*Cynara cardunculus*) و بررسی بیان نسبی آن تحت تاثیر تنش های غیر زیستی

Separation and identification of *FEHI* 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 دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، 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 می باشد. 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. هدف از تحقیق حاضر جدا سازی، شناسایی و ارزیابی بیان نسبی ژن فروکتان ۱-گروهیدرولاز (*FEHI*) در گیاه کنگر فرنگی بود. در راستای شناسایی و ارزیابی روند تکامل مولکولی ژن *FEHI* از نمونه های برگ گیاه کنگر فرنگی خاردار DNA استخراج و پس از تکثیر توسط تکنیک PCR توالی یابی شد. همچنین جهت بررسی اثرات شوری، نانو ذرات نقره سنتز سبز و سالیسیک اسید بر تغییر بیان نسبی ژن *FEHI*، 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 توالی های نوکلئوتیدی ژن *FEHI* نشان داد که بیشترین فراوانی متعلق به باز گوانین (۳۱/۵۶) و کمترین فراوانی مربوط به باز تیمین (۱۲/۴) می باشد. همچنین نتایج تست Neutrality انتخاب جهت دار بر روی این ژن را در طول تکامل نشان داد. بررسی فیلوژنتیکی توالی ژن *FEHI* و مقایسه آن با سایر توالی های مشابه در گیاهان مختلف، ثابت کرد که میزان شباهت در میان توالی های مورد مطالعه بالاست (بالای نود درصد) و گیاهان از نظر فاصله ژنتیکی با همدیگر اختلاف ناچیزی دارند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت های اسید سالیسیک و شوری نشان داد که کاربرد تیمار ۱۲ دسی زیمنس بر متر شوری به تنهایی باعث افزایش معنی دار بیان ژن *FEHI* در سطح احتمال یک درصد شده است. کاربرد اسید سالیسیک تواما با شوری باعث تعدیل اثرات شوری و همچنین کاهش بیان ژن *FEHI* شد. همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت های اسید سالیسیک و نانو نقره نشان داد که در تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار اسید سالیسیک با ۴۰ میلی مولار نانو نقره در سطح احتمال ۱ درصد بیان ژن *FEHI* در گیاه کنگر فرنگی افزایش معنی داری داشته است. مشخصاً در این گیاه معلوم شد که هم از نظر میزان بیان و هم از نظر شدت بیان ژن *FEHI* استعداد بالایی جهت تمرکز روی آن جهت افزایش قندهای محلول و نهایتاً افزایش تحمل گیاه به تنش شوری وجود دارد.

واژه های کلیدی

کنگر فرنگی خاردار

اسید سالیسیک

نانو نقره

تکامل

روابط فیلوژنی

توالی یابی

رو به گسترش است. اینولین یک آنتی‌اکسیدان قوی است که در مهار رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اثرات مضر آن نقش دارد. ترکیب پری‌بیوتیک اینولین فیزیولوژی روده بزرگ را بهبود بخشیده و فعالیت اکوسیستم میکروبی آن را افزایش می‌دهد. همچنین باعث افزایش جذب کلسیم و آهن شده و به‌عنوان یک ضد سرطان و ضد دیابت هم مطرح است (van Arkel et al. 2013). یکی از اقداماتی که می‌تواند در تغییر بیان ژن و تولید متابولیت‌های ثانویه مؤثر باشد افزودن ایستورهای غیرزنده و زنده می‌باشد. تحت این شرایط، طیفی از پاسخ‌ها در کل گیاه و در سطوح سلولی و مولکولی مشاهده می‌شود و الگوی بیان بسیاری از ژن‌ها از جمله ژن‌های مربوط به پروتئین‌های درگیر در مسیرهای سیگنالی و پروتئین‌های عملکردی در پاسخ به تنش تغییر می‌کند (Salekdeh et al. 2002; Hasegawa 2000; Zhao et al. 2016).

به‌دلیل تنش اسمزی و یونی ناشی از شوری، گیاه از سازوکارهای مختلفی نظیر تنظیم اسمزی و کده‌بندی سدیم و کلر در واکنش برای تداوم جذب آب و حفظ کارایی فتوسنتز استفاده می‌کند (Jenks 2007). تنظیم اسمزی تحت تاثیر عوامل محیطی بوده و باعث افزایش انواع اسمولیت‌ها مانند کربوهیدرات‌های محلول شامل فروکتان‌ها، ساکارز، گلوکز و فروکتوز طی شوری می‌شود. تجمع هر یک از اسمولیت‌ها مستلزم افزایش بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های درگیر در مسیرهای متابولیکی این ترکیبات می‌باشد. تولید فروکتان با هدف افزایش تحمل تنش‌های غیر زیستی طی دو دهه اخیر مورد توجه محققین بوده است. ژن‌هایی 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) مربوط به آنزیم 3-فروکتوزیل ترانسفراز و ژن *FFT-1* (fructan:fructan-1-fructosyltransferase 1-FFT; fructan synthesis and degradation) مربوط به آنزیم ۱ و ۲-بتافروکتان ۱-فروکتوزیل ترانسفراز افزایش می‌باشند فروکتان نوع اینولین خود به دو دسته تقسیم می‌شود: نوع اینولین منظم یا GFn که دارای گلوکز انتهایی به‌همراه n فروکتوز است و نوع اینولونوز یا Fn که فاقد

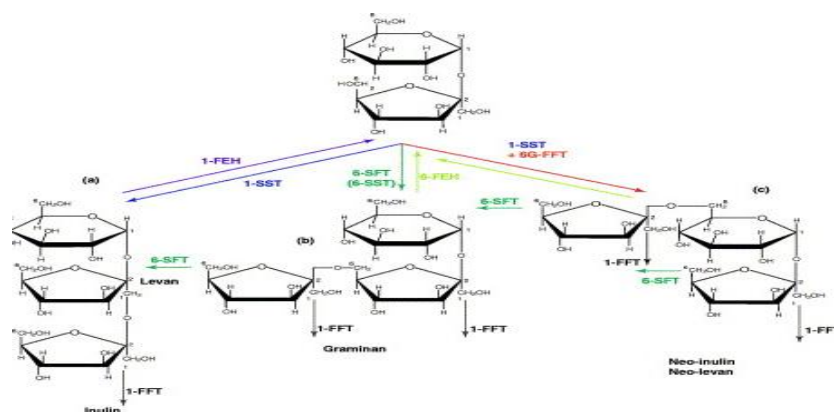
گیاه کنگر فرنگی خاردار (*Cynara cardunculus* L) یک گیاه دیپلوئید ($2N=2X=34$) و با نام انگلیسی Cardoon متعلق به خانواده کاسنی (Composite) می‌باشد و در زبان فارسی به آرتشیو خاردار معروف است. کنگر فرنگی، گیاه علفی چند ساله می‌باشد که به‌صورت وسیع در نواحی مدیترانه‌ای کشت می‌شود (Cravero et al. 2010). برگ‌های کنگر فرنگی محتوی ترکیبات فنولی، اسیدی و فلاونوئیدی می‌باشند. اسید کافئیک، کلروژنیک، سینارین، سیناروپکتین، اینولین، قندها، استرهای اسید کینیک و نئوکلروژنیک اسید ترکیبات عمده این گیاه محسوب می‌شوند. از مهم‌ترین اثرات درمانی این گیاه می‌توان 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 ناراحتی‌های کبدی است به طوری که مردم اروپا این گیاه را به‌عنوان محافظت کننده کبد، کاهشدهنده کلسترول و ادرارآور می‌شناختند. همچنین مصرف آرتشیو موجب افزایش فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز شده و باعث کاهش قند خون بالا می‌شود. قند کنگر فرنگی فروکتان می‌باشد که کمترین اثر بر قند خون را دارد و از این نظر برای دیابتی‌ها بسیار مفید می‌باشد (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). فروکتان‌ها علاوه بر گیاهان دولپه‌ای متعلق به خانواده آستراسه (Asteraceae) در خانواده‌های گیاهی چون پوآسه (Poaceae) و لیلیاسه (Liliaceae) نیز وجود دارند، ولی منبع اصلی استخراج آن‌ها همان خانواده آستراسه است. پنج گروه عمده از فروکتان‌ها در طبیعت وجود دارند که شامل اینولین، لوان، گرامینان، اینولین نئوسری و لوان نئو سری هستند. اینولین به‌عنوان پلی ساکارید ذخیره‌ای در ریشه و غده گیاهانی چون کاسنی، سیب‌زمینی‌ترشی، قاصدک و قاعده نهنج کاپیتول‌های کنگر فرنگی ذخیره می‌شود 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 به‌دلیل خصوصیات طبیعی و عملکردی آن در بسیاری از فرآورده‌های صنایع غذایی و دارویی

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 FEH-1 و FFT-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 FEH-1 و FFT-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 نانو ذرات، می‌توان با تحقیقات بیشتر به افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی با راهکارهای مقرون به صرفه نظیر استفاده از نانو ذرات امیدوار بود. از طرفی نانو ذرات 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 مخصوصاً 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 1-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 (رادیکال فروکتوز) به 1-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 دخالت دارد. تجزیه پذیری بالای قند فروکتان به ساکاروز و فروکتوز طی هیدرولیز توسط آنزیم هیدرولیز کننده فروکتان اگزو هیدرولاز 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 می‌کند. 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 میکرومول $dNTP$ 1x، ۰/۲ میکرومول از هر آغازگر رفت و برگشت، یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز (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 داگ 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

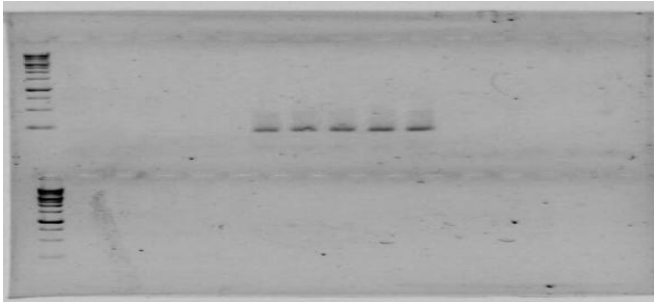
بدین منظور برای اولین بار نانو نقره سنتز شده با استفاده از بستر گیاهی رزماری که یک روش نو ظهور و طبق اصول شیمی سبز است، در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب دیگری که باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش‌ها می‌شود، اسیدسالیسیلیک است. گیاهان در پاسخ به شوری، پروتئین‌هایی تولید می‌کنند که سنتز بسیاری از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

بنابراین با توجه با اهمیت گیاه کنگر فرنگی و همچنین نقش ژن *FEHI* 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 *FEHI* 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.



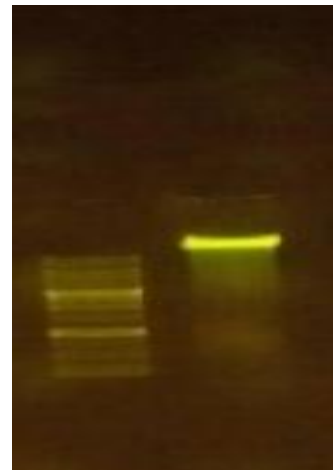
شکل ۳-۱ الکتروفورز محصول واکنش PCR مربوط به پنج تکرار ژن *FEH-1* به طول 200bp در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد

در نهایت آنالیز تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین صفات مختلف و نتایج به دست 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 به خوبی تکثیر شده است. این مطلب نشان‌دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به خصوص 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 کیفیت توالی‌های به دست آمده مورد بازنگری قرار گرفت (Lopez and Bonasora 2017). سپس جهت آنالیزهای بیوانفورماتیکی از نتایج حاصل از توالی نمونه‌ها استفاده شد. شاخص‌های ژنتیکی توسط نرم‌افزارهای BLAST، MEGA، 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 به کارگیری نرم‌افزار Blast در بانک ژنی، اختصاصی بودن قطعه مورد نظر 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 (RQ1 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 به عنوان 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 Real time-(Eva Green Master) 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 چندشکلی‌ها است. نتایج این مطالعه اثر انتخاب جهت‌دار بر روی این ژن در طول تکامل را نشان می‌دهد.

جدول ۳- بررسی تست Neutrality

M	S	Ps	Θ	Π	D
۱۳	۰۰۵	۰/۴۷۸۶۷۳	۰/۱۵۴۲۵۱	۰/۱۸۹۱۹۷	۰/۰۴۵۴۶۶

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

هم‌ردیف سازی چند توالی، به روش مرتب کردن توالی‌های بیولوژیکی، موقعیت دقیق نوکلئوتیدها را در مکان‌های مشابه مشخص می‌کند. این مکان‌های مشابه بین دو یا چند توالی می‌تواند نشانگر ارتباط ساختاری، عملکردی یا تکاملی بین توالی‌ها باشد. در بسیاری از حالات، فرض شده است که مجموعه ورودی از توالی‌های درخواستی یک رابطه تکاملی با هم دارند به طوری که همه آن‌ها دارای یک جد مشترک هستند.

در این پژوهش شناسایی و تعیین موقعیت دامین‌های ژن FEHI از گیاه کنگر فرنگی با گیاهان مشابه توسط نرم‌افزار Meme و ترسیم درخت فیلوژنتیکی توسط MEGA5 و به روش Neighbour joining صورت گرفت. شکل ۴ نمایی از هم‌ردیفی دامین‌های ژن FEHI همراه با سایر ژن‌های خانواده کاسنی را نشان می‌دهد که نقاط مشابه با رنگ‌های یکسان در هر ستون مشخص شده است.

شناسایی ژن و همولوگ‌های آن در گونه‌های گیاهی مختلف، ثابت می‌کند که این ژن‌ها از اجداد مشترکی منشعب گشته‌اند. این امر می‌تواند در درک بهتر سیر تحول گونه‌ها کمک کند و به منظور مطالعه بهتر ژن‌ها در آینده، سیستم‌های نوین و پیشرفته تری ایجاد شود. به نظر 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

FEHI نشان داد که بیشترین فراوانی متعلق به باز گوانین (۳۱/۵۶) و کمترین فراوانی مربوط به باز تیمین (۱۲/۴) می‌باشد (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 دست‌آمده 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 کرده‌اند، مطابقت دارد. علت این تغییرات احتمالاً می‌تواند به متیله شدن سیتوزین نسبت داد (Picoult et al. 1999).

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

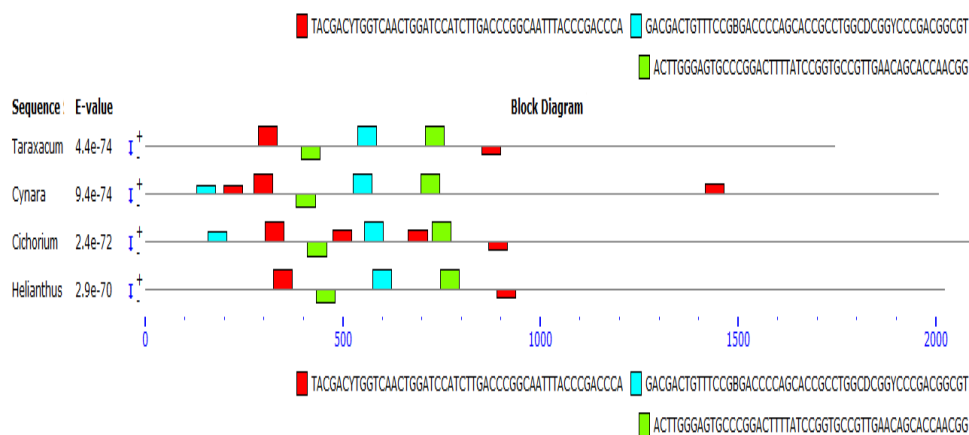
From/To	A	T	C	G
A	-	۵/۹۲	۵/۴۲	۱۱/۶۲
T	۶/۳۳	-	۱۳/۷۵	۶/۰۹
C	۶/۳۳	۱۵/۰۴	-	۶/۰۹
G	۱۲/۰۸	۵/۹۲	۵/۴۲	-

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک‌پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصد جهش‌های 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 شده‌اند. 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). جمعیت‌هایی که دچار افزایش معنی‌دار در اندازه جمعیت شده باشند و یا انتخاب جهت‌دار بر روی آن‌ها عمل کرده باشد، مقادیر D معنی‌دار و منفی تولید می‌کنند در حالی که مقادیر مثبت و معنی‌دار D، نشان‌دهنده

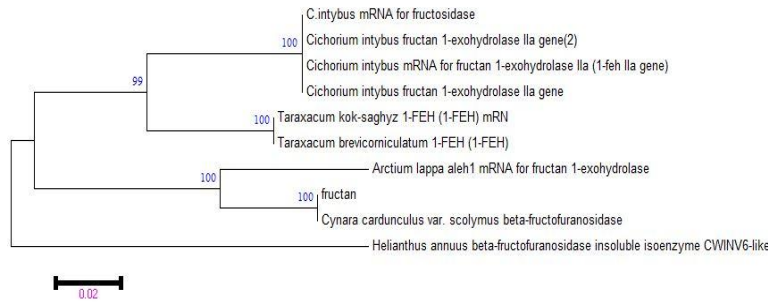
دو گروه اصلی قرار داد که توالی ژن *FEH1* در گروه اول و در شاخه‌ای منشعب از سایر توالی‌ها و همراه با گیاه کنگر فرنگی واریته *Scolymus* مشاهده شد (شکل ۵). طی مطالعات ثابت شده است که آنالیز فیلوژنتیکی ابزار قدرتمندی برای نشانی‌یابی بسیاری از ابهامات و مسائل مختلف مرحله تکامل است (Elliott et al. 2006). نتایج 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 آراقیون (*Arctium lappa*) و بیشترین فاصله ژنتیکی با گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) دارد. بعد از آراقیون، 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	
		۴/۴۲
(CV%) ضریب تغییرات		

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

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 الیسیتور 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

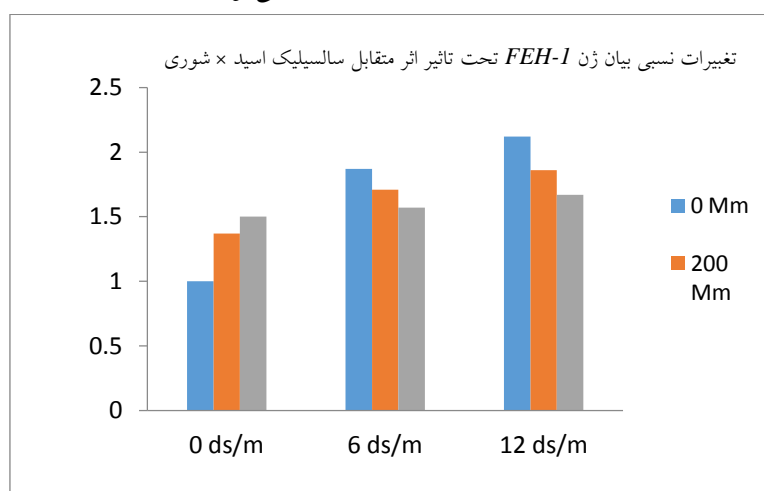
نتایج بررسی بیان ژن *FEH1* در مطالعه حاضر، تیمار تنش شوری و محلول پاشی سالیسیلیک اسید و نانو نقره سبب تغییر در میزان بیان ژن *FEH1* شد. بررسی داده‌های حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین سطوح مختلف تیمارها و اثر متقابل سالیسیلیک اسید با شوری و نانو نقره سبز در سطح یک درصد از نظر آماری تفاوت معنی‌دار 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

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

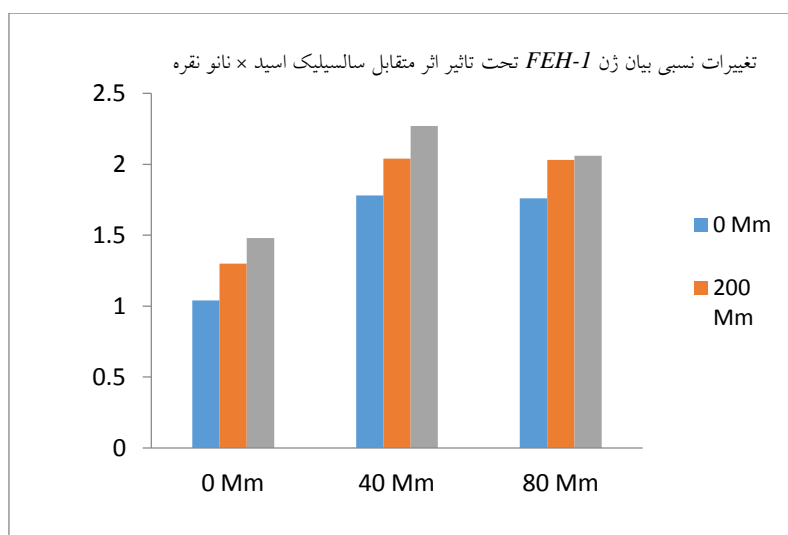
از نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های اسید سالیسیک و نانو نقره چنین بر می‌آید که در تیمار ۴۰۰ میلی‌مولار اسید سالیسیک با ۴۰ میلی‌مولار نانو نقره در سطح احتمال یک درصد بیان ژن *FEH1* در گیاه کنگر فرنگی افزایش معنی‌داری داشته است (شکل ۷). همچنین نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن تفاوت چندانی در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

همچنین، نواحی حفاظت‌شده بخش زیادی از توالی ژن FEHI 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 FEHI هم از نظر میزان بیان و هم از نظر شدت بیان استعداد بالایی جهت تمرکز روی آن جهت افزایش فندهای 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 FEHI 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 الیسیتورها 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.

یکی از رایج‌ترین فرم‌های ذخیره‌ای فندهای 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 فندهای 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 فندهای ساختاری پایه یعنی گلوکز، فروکتوز و ساکارز در تشکیل دیگر فندها 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 فندهای محلول و کاهش مقادیر نشاسته در گیاه می‌شود (Silva and Arrabaka 2004). کاهش غلظت فروکتان‌های در مرحله تنش شدید همراه با افزایش فعالیت آنزیم‌های فروکتان‌آگزوهیدرولاز است. در تحقیق جاری نیز تنش شدید شوری باعث افزایش بیان ژن FEHI شد و اثر برهمکنش دو فاکتور سالیسیلیک اسید و محلول پاشی نانوذرات بر افزایش بیان ژن FEHI 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 FEHI در طی تکامل مثبت نشان داده شد.

منابع

- Cravero V, Martin E, Lopez Anido F, Cointry 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 minipreparation: 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 fructan 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.
- Wittemer 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.