

تأثیر آبسازیک اسید بر محتوای کروسین و سافرانال و بیان ژن‌های کنترل‌کننده در کشت سوسپانسیون زعفران (*Crocus sativus* L.)

Effect of Absciscic Acid (ABA) on Crocin and Safranal Contents and Expression of Controlling Genes in Saffron (*Crocus sativus* L.)

توفیق طاهرخانی^۱، رسول اصغری زکریا^{۱*}، منصور امید^۲، ناصر زارع^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی،

دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Taherkhani T¹, Asghari Zakaria R^{*1}, Omidi M², Zare N¹

1- PhD Student, Professor, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r-asghari@uma.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.) با طعم، عطر و رنگ خاص علاوه بر مصارف غذایی دارای خواص دارویی فراوانی است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر آبسازیک اسید بر محتوای کروسین و سافرانال و بیان ژن‌های کنترل‌کننده آن‌ها در کشت سوسپانسیون زعفران بود. برای این منظور ریزنمونه‌های استریل تهیه شده از کورم‌های زعفران در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر هورمون 2/4-D و ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون BAP کشت شدند. بعد از ۱۴ روز کالوس‌ها روی ریزنمونه‌ها تشکیل شدند. کالوس‌ها پس از واکشت به تعداد حداقل چهار بار به محیط کشت مایع منتقل و در شرایط رشدی بهینه در کشت سوسپانسیونی با ۰/۵ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر آبسازیک اسید تیمار شدند. پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار نسبت به جمع‌آوری نمونه در سه تکرار اقدام شد. اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه سافرانال و کروسین با استفاده از HPLC و بررسی بیان ژن‌های *CsLYC*، *CsGT-2* و *CsBCH* از طریق Real-Time PCR انجام شد. نتایج نشان داد که پس از تیمار با ۰/۵ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر آبسازیک اسید و پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت دو ژن *CsLYC* و *CsGT-2* به‌طور چشمگیری افزایش بیان نشان دادند ولی تغییر معنی‌داری در بیان ژن *CsBCH* مشاهده نشد. همچنین مقادیر سافرانال و کروسین تحت تأثیر تیمار با آبسازیک اسید در هر دو زمان نمونه‌برداری افزایش نشان داد به طوری که مقدار سافرانال و کروسین ۷۲ ساعت پس از تیمار با ۱/۵ میلی گرم در لیتر آبسازیک اسید دارای بالاترین مقدار بود.

واژه‌های کلیدی

آبسازیک اسید

سافرانال

کروسین

زعفران

HPLC

Real-Time PCR

زعفران ($2n=3x=24$) با نام علمی (*Crocus sativus* L.) از تیره ی زنبقیان و سرده ی زعفران است. قسمت مورد استفاده این گیاه، انتهای خامه و کلاله ی سه شاخه ی آن است که به نام زعفران مشهور است و دارای بوی معطر با طعم کمی تلخ می باشد. این تیره شامل ۶۰ جنس و ۱۵۰۰ گونه است (Ebrahimzadeh et al. 2006). اگر چه منشاء زعفران ناشناخته است، ولی به نظر می رسد از برخی نواحی ایران، ترکیه و یونان منشاء گرفته است. اما اکنون زعفران در چندین کشور اروپایی هم چون اسپانیا، ایتالیا، فرانسه و سوئیس، هم چنین در مراکش، مصر، فلسطین، آذربایجان، پاکستان، هند، نیوزیلند، استرالیا و ژاپن با موفقیت کشت می شود. زعفران از گیاهان مهم صنعتی و دارویی در جهان می باشد که مطالعات وسیعی در مورد اثرات مختلف آن صورت گرفته است. این تحقیقات نشان می دهد که عصاره زعفران علیه طیف وسیعی از تومورها در موش و سلول های انسانی و دیگر مدل های سرطانی مؤثر بوده است (Abdullaev 2002; Nair et al. 1995; Tarantilis et al. 1994). ترکیبات با اثرات دارویی مطلوب در زعفران، مواد تلخی هستند که از سافرانال و پیگمان های مربوط به کاروتنوئید کروسستین مشتق می شوند که مهم ترین آن ها پیکروکروسین است. تجزیه پیکروکروسین به روش هیدرولیز اسیدی، موجب تولید گلوکز، آگلیکون فرار و سافرانال (دهیدرو-بتا-سیکلوسیترال) می شود. از ترکیبات رنگی، مهم ترین آن ها شامل انواع کارتنوئیدهای کروسستین و فرم های گلیکوزیدی دی جنتیوبیوزید (کروسین)، جنتیوبیوزید، گلوکوزید، جنتیوگلوکوزید و دیگلوکوزید بتا-کروسستین (مونو متیل استر)، گاما کروسستین (دی متیل استر)، آلفا-کاروتن، بتا-کاروتن، لیکوپن و زنازانتین هستند (Rios et al. 1996).

به دلیل اینکه ساخت ترکیبات ثانویه با ارزش با استفاده از روش های شیمیایی مقرون به صرفه نیست، تولید آن ها از طریق روش های زیست فناوری و کشت سلولی گیاهی مورد توجه قرار گرفته است که نقش مهمی در ایجاد روش های جایگزین برای تولید ترکیبات دارویی گیاهی دارند (Rao and Ravishankar 2002). تولید درون شیشه ای متابولیت های ثانویه به روش کشت سلولی گیاهی مزایایی نسبت به تولید آن در درون گیاه دارد. تولید

این ترکیبات قابل پیش بینی، مطمئن و ساده است. جداسازی ترکیب بیوشیمیایی از کشت سلولی نسبت به استخراج از کل گیاه سریع تر و با کارایی بالاتری انجام می شود و در همه فصول سال و با هر شرایط آب و هوایی و بدون محدودیت جغرافیایی قابل تولید هستند. عوامل مداخله گر که در شرایط کشت در مزرعه مشکل آفرین اند در کشت درون شیشه قابل اجتناب هستند. کشت سلولی و کشت اندام ها می تواند ترکیبات بیوشیمیایی را در حجم بالا و با عملکرد بالا تولید کند و از آنجایی که امکان نشان دار کردن آن ها با مواد رادیواکتیو وجود دارد می توان مسیرهای متابولسمی را ردیابی کرد (Karuppusamy 2009). از طرفی مهندسی ژنتیک گیاهی نقش چشمگیری در زمینه شناسایی و دستکاری ژنتیکی آنزیم های دخیل در مسیر بیوستز متابولیت های ثانویه دارد (Rao and Ravishankar 2002).

از جمله مواد متشکله مهم در زعفران کروسین و سافرانال است که کروسین موجب رنگ و سافرانال موجب بو در زعفران می شود که این مواد مؤثره در زعفران از دو روش غیرمولونیک اسید (MEP) در پلاستیدها که مواد اولیه تشکیل کارتنوئیدها را به وجود می آورد و مولونیک اسید (MVA) در سیتوپلاسم (Wang et al. 2009) بیوستز می شوند. مسیر مولونیک اسید، با سنتز مولونات از طریق سه مولکول استیل کوآنزیم A، آغاز می شود و با تولید مولکول های ایزو پنتیل دی فسفات (IPP)، ژرانیل ژرانیل پیروفسفات (GGPP)، فیتوئن بی رنگ، لیکوپن رنگی و بتا-کاروتن که از واکنش حلقوی شدن لیکوپن توسط آنزیم لیکوپن بتا سیکلاز ساخته می شود (Britton 1998). هیدروکسیله شدن بتا-کاروتن در مسیر مولونیک اسید توسط آنزیم بتاکارتنوئید هیدروکسیلاز کاتالیز می شود که منجر به تولید زنازانتین می شود (Castillo et al. 2005) عوامل رنگ (کروسین آلدهید) و بو (سافرانال) در زعفران توسط شکست اکسایشی زنازانتین به وسیله آنزیم ۷ و ۸ زنازانتین کلیواژ داکسیژناز به وجود می آید (Pfander and Schurtenberger 1982). در زعفران محصولات حاصل از شکست اکسایشی زنازانتین توسط آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز ۲ در کروموپلاست کلاله، گلوکز به می شوند و سپس در داخل واکوئل مرکزی کلاله ذخیره می شوند (Bouvier et al. 2003; Dufresne et al. 1997). واکنش حلقوی

می‌شود از طریق روش‌های مختلف مهندسی متابولیک مانند تغییر در توالی‌های پروموتری، استفاده از فاکتورهای فعال‌کننده رونویسی و تغییر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مورد نظر میزان تولید آن‌ها در سیستم‌های درون آزمایشگاهی افزایش پیدا کند. ترکیب محیط کشت، ریزنمونه، شرایط فیزیکی، افزودن پیش‌سازها، استفاده از الیستورهای زنده و غیرزنده، افزایش نفوذپذیری سلول، دور کردن محصول از محل تولید، تعلیق سلول‌های گیاهی و انتخاب سلول‌هایی با کارایی بالا از مهم‌ترین عوامل موثر در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی هستند.

با توجه به اهمیت آبسزیک اسید به‌عنوان یک مولکول انتقال علامت در پاسخ به تنش‌های محیطی و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی، بررسی تأثیر استفاده از مقادیر مختلف این هورمون بر محتوای سافرانال و کروسین و تغییر در بیان ژن‌های کنترل‌کننده آن‌ها در کشت سوسپانسیون زعفران از اهداف اصلی این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌های تهیه شده از کورم‌های زعفران به‌طور دقیق با آب مقطر شسته شده و سپس در زیر هود در الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه قرار داده شد و بعد به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میلی‌لیتر ۰/۱ HgCl₂ درصد ضدعفونی شدند. پس از شستشو با آب مقطر، در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2/4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. بعد از ۱۴ روز کالوس‌ها روی ریزنمونه‌ها تشکیل شدند. بعد از تشکیل کالوس به تعداد حداقل چهار بار کالوس‌ها واکشت شد تا کالوس لاین ایجاد شود. کالوس‌ها پس از انتقال به محیط مایع، در محیط سوسپانسیون در شرایط رشدی بهینه (پازده روز پس از شروع کشت سوسپانسیون)، با استفاده از مقادیر ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید به‌عنوان الیستور تیمار شدند. کالوس‌ها در دو مرحله ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمارها برداشت شدند. کالوس‌های حاصل پس از جمع‌آوری به دو قسمت تقسیم شدند. یک بخش در دستگاه فریز درایر خشک شده و وزن خشک آن‌ها ثبت شد. کالوس‌های

شدن لیکوپن توسط ژن لیکوپن بتا سیکلاز *CsLYC* کد می‌شود (Britton 1998) هیدروکسیل‌دار شدن بتا کاروتن نیز توسط ژن *CsBCH* کد می‌شود که منجر به تولید زنازانتین می‌شود (Castillo et al. 2005). آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز ۲ به‌وسیله ژن *CsUGT2* در کروموپلاست کالاه کد می‌شود (Moraga et al. 2004). مطالعه تغییرات کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه در زعفران نشان داده است که ژن‌های *CsUGT2*، *CsLYC* و *CsBCH* در تنظیم تغییرات رونویسی درگیر هستند (Castillo et al. 2005; Mir et al. 2012; Ahrazem et al. 2010).

استفاده از تکنیک Real-Time PCR برای بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های گیاهی کاربرد زیادی در مهندسی متابولیک گیاهی دارد. به‌طور کلی این تکنیک روشی برای مشاهده بی‌وقفه‌ی پیشرفت واکنش PCR در طی زمان می‌باشد. که با این روش می‌توان مقادیر تولید DNA و cDNA یا RNA را اندازه‌گیری کرد. این تکنیک می‌تواند با حداقل اسید نوکلئیک آغاز شود و مقدار تولید نهایی را با دقت زیادی تعیین نماید. به راحتی قابل اجرا است و دقت و حساسیت بالاتر از PCR معمولی را دارد (Bustin et al. 2005). به‌نظر می‌رسد تنظیم رونویسی بیان ژن‌های کاروتنوئید سازوکار مهمی است که با استفاده از آن، بیوسنتز و انباشت کاروتنوئیدهای خاص و یا مشتقات آن‌ها در طی رشد گل و رسیدگی زعفران تنظیم می‌شود. بیوسنتز مشتقات کاروتنوئیدی اصلی زعفران شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال، به‌وسیله تجزیه اکسیداتیو زنازانتین و بتا کاروتن رخ می‌دهد. تجمع این کاروتنوئیدها در *C. sativus* با سطح رونویسی ژن‌های *PSY*، *BCH* و *β-LYC2* کنترل می‌شود (Castillo et al. 2005).

آبسزیک اسید یک هورمون گیاهی است که به‌عنوان یک مولکول انتقال دهنده‌ی پیام نقش مهمی در بیان ژن‌ها و تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان به‌عهده دارد (Guan et al. 2000). مطالعات مختلف نشان داده است که این هورمون اثرات متفاوتی روی تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول‌های گیاهی و بیان ژن‌ها دارد (Wang and Ding 2001, Luo et al. 2001). یکی از محدودیت‌های تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های درون شیشه‌ای مقادیر پایین تولید در این نوع سیستم‌ها است اما، تلاش

خشک شده در اتانول ۵۰ درصد (حجمی - حجمی) سوسپانسیون شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ شد و مایع رویی آن جداسازی و نگهداری شد. عصاره باقیمانده مجدداً به وسیله اتانول ۵۰ درصد (حجمی - حجمی) عصاره‌گیری و سانتریفیوژ شد و مجدداً مایع رویی به مایع جدا شده قبلی اضافه شد. بعد از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد تا برای آنالیز توسط HPLC آماده شود. نمونه‌ها با حلال استونیتریل و آب به نسبت ۸۰ به ۲۰ درصد حجمی - حجمی به مدت ۲۰ دقیقه و ۸۰ به ۲۰ (آب به استونیتریل) به مدت یک دقیقه و مجدداً به نسبت ۸۰ به ۲۰ درصد آب به استونیتریل و با جریان ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه در ستون HPLC قرار گرفتند. طول موج‌های شناسایی برای سافرانال طول موج ۳۳۰ نانومتر و برای کروسین ۲۷۴ نانومتر بود. در ضمن حجم تزریق شده به ستون ۲۰ میکرولیتر بود. RNA طبق پروتکل شرکت پارس توس (A101231) از کالوس لاین‌ها استخراج شد. سپس یک میکرولیتر آنزیم DNase و یک میکرولیتر $MgCl_2$ به ۱۰۰۰ میکروگرم از RNA استخراج شده اضافه شد و پس از اسپین کردن به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷

درجه بر روی هات پلیت قرار داده شد. بعد یک میکرولیتر از EDTA به ویال‌ها اضافه و در دمای ۶۵ درجه به مدت ده دقیقه قرار داده شد. جهت سنتز cDNA ابتدا طبق پروتکل شرکت Geneall به مقدار دو میکروگرم از RNA خالص را برداشته، به همراه یک میکرولیتر اولیگو dT ۵۰ میکرومولار با هم مخلوط شدند و حجم کل ویال با آب DEPC به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس روی هات پلیت در دمای ۶۵ درجه به مدت ده دقیقه قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس شامل Reverse transcriptas, dNTP, Stabilizer, RNAes inhibitor و بافر واکنش، به محیط اضافه شده و تمام مواد اسپین شدند. بعد ویال‌ها همان‌گونه که شرکت سازنده توصیه کرده بود، در دستگاه PCR در دو مرحله: الف) ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه. ب) ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، قرار گرفتند. cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مطالعات بیان ژن نگهداری شد. آغازگرها با استفاده از منابع موجود (Mir et al. 2013) طبق جدول ۱ جهت سنتز به شرکت روبین طب گستر سفارش داده شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد نیاز برای تکثیر ژن‌های مسیر بیوسنتز آپوکارتونوئیدها در زعفران با طول مورد انتظار

اندازه آغازگر (جفت‌باز)	آغازگرهای مستقیم و معکوس	آغازگر*
۲۴۷	AGATGGTCTTCATGGATTGGAG	<i>CsLYC - F</i>
۴۹۵	TCGAGCT TCGGCATCACATC	<i>CsBCH - F</i>
۴۰۰	GATCTGCCGTGCGTTCGTAAC	<i>CsGT2 - F</i>
۲۲۵	TGATTTCCAACCTCGACCAGTGTC	<i>CsTUB - F</i>
۲۴۷	ATCACACACCTCTCATCTCTTC	<i>CsLYC - R</i>
۲۹۵	GCAATACCAAACAGCGTGATC	<i>CsBCH - R</i>
۴۰۰	GATGACAGAGTTCCGGGGCCTTG	<i>CsGT2 - R</i>
۲۲۵	ATACTCATCACCTCGTCACCATC	<i>CsTUB - R</i>

* *Cs*: *Crocus sativus*; *LYC*: lycopene- β -cyclase, *BCH*: β -carotene hydroxylase, *GT2*: glucosyltransferase 2

جدول ۲- تأثیر استفاده از آبسیزیک‌اسید بر بیان ژن‌های مهم مسیر بیوسنتز زعفران

تیمار آبسیزیک اسید	زمان برداشت	<i>CsGT-2</i>	<i>CsLYC</i>	<i>CsBCH</i>
(T1) mg/1 ۰/۵	۲۴ ساعت (E1)	۲۳/۳۱** $\pm$ ۰/۳۱	۴/۴۰** $\pm$ ۰/۱۱	۰/۱۰ $\pm$ ۰/۰۰۳
	۷۲ ساعت (E2)	۷۰/۲۹** $\pm$ ۱/۷۴	۸/۴۷** $\pm$ ۰/۷۸	۰/۶۲ $\pm$ ۰/۰۸۰
(T2) mg/1 ۱/۵	۲۴ ساعت (E1)	۴۳/۸۴** $\pm$ ۲	۶/۶۸** $\pm$ ۰/۵۱	۰/۱۱ $\pm$ ۰/۰۲
	۷۲ ساعت (E2)	۵۱/۱۵** $\pm$ ۲/۳۳	۳۰/۰۳** $\pm$ ۳/۰۰	۱/۸۷ $\pm$ ۰/۱۸

**معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱

بیان ژن *CsGT-2* به میزان $23/30$ برابر افزایش نشان داد. همچنین اعمال همین سطح از این هورمون پس از 72 ساعت موجب شد که بیان ژنهای *CsLYC* به میزان $8/47$ برابر و *CsGT-2* به میزان $70/28$ برابر نسبت به شرایط شاهد افزایش نشان دهد. برای ژن *CsBCH* کاهش غیرمعنی داری در بیان ژن مشاهده شد (جدول ۲). همچنین تیمار سوسپانسیون سلولی زعفران با $1/5$ میلی گرم در لیتر آبسزیک اسید نشان که این هورمون بر بیان ژنهای مهم در بیوسنتز سافرانال و کروسین در هر دو زمان برداشت 24 و 72 ساعت پس از اعمال تیمار مؤثر است که در 24 ساعت پس از اعمال تیمار، بیان ژن *CsLYC* به میزان $6/67$ و بیان ژن *CsGT-2* به میزان $43/83$ برابر افزایش نسبت به شرایط شاهد نشان داد. همچنین اعمال این سطح از این هورمون پس از 72 ساعت موجب شد که بیان ژنهای *CsLYC* به میزان $30/03$ برابر و *CsGT-2* به میزان $51/14$ برابر افزایش بیان نسبت به شرایط شاهد نشان داد ولی بیان ژن *CsBCH* افزایش معنی داری نشان نداد (جدول ۲).

تجزیه واریانس مقادیر سافرانال و کروسین نشان داد که اختلاف معنی داری بین استفاده از $0/5$ و $1/5$ میلی گرم در لیتر آبسزیک اسید، همچنین بین دو زمان نمونه برداری 24 و 72 ساعت پس از اعمال تیمار از لحاظ مقادیر سافرانال و کروسین وجود دارد. اثرات متقابل نوع تیمار در زمان نمونه برداری فقط برای مقدار سافرانال معنی دار بود (جدول ۳). به طوری که مقایسات میانگین نشان داد که مقدار سافرانال در 72 ساعت پس از تیمار با $1/5$ میلی گرم در لیتر آبسزیک اسید دارای بالاترین مقدار با میانگین $66/55$ میکروگرم در یک گرم کالوس بوده و این مقدار، اختلاف معنی داری با سایر تیمارهای آبسزیک اسید داشت (جدول ۴).

سپس یک میکرولیتر از cDNA رقیق شده (100 نانوگرم) را به همراه نیم میکرولیتر پرایمر مستقیم و معکوس، پنج میکرولیتر Master Real-Time و سه میکرولیتر آب در داخل هر ویال قرار داده شد. لازم به ذکر است که حجم نهایی 10 میکرولیتر بود. هر یک از ویالهای آماده شده در داخل دستگاه Real-Time PCR با شرایط زیر قرار گرفت: ابتدا برای دناتوره شدن اولیه 95 درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه، سپس مرحله اصلی به شرح زیر اعمال شد: 95 درجه سانتیگراد به مدت 5 ثانیه، 60 درجه سانتیگراد به مدت 40 ثانیه که این مرحله به مدت 45 سیکل تکرار شدند. نرم افزار لایت سایکلر 480 (Thermo real time, Yekta Tajhiz Azma linReg) برای ثبت داده های فلورسانس مورد استفاده قرار گرفت. برای بیان نسبی ژنها ابتدا از نرم افزار PCR نسخه 2015 مقادیر ضریب تاثیر PCR را به دست آورده و همراه با CT به دست آمده از دستگاه Real-Time PCR با نرم افزار Rest 2009 نسبت به محاسبه بیان نسبی ژن در هریک از تیمارها نسبت به شاهد (عدم تیمار) نرمال شده با ژن خانه دار *CsTUB* اقدام نموده و سپس تجزیه واریانس داده های حاصل بر اساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و مقایسه میانگین از طریق آزمون دانکن در سطح احتمال $0/05$ ، با استفاده از نرم افزار SPSS ver.17 صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج بررسی بیان ژنها در سوسپانسیون سلولی زعفران تیمار شده با $0/5$ میلی گرم در لیتر آبسزیک اسید نشان داد که این هورمون بر تغییر بیان ژنهای *CsLYC*، *CsBCH* و *CsGT-2* در هر دو زمان 24 و 72 ساعت پس از اعمال تیمار تأثیرگذار بود. به طوری که در 24 ساعت پس از اعمال تیمار، بیان ژن *CsLYC* به میزان $4/40$ و

جدول ۳ - تجزیه واریانس مقادیر سافرانال و کروسین بر اثر تیمار سوسپانسیون سلولی با سطوح مختلف آبسزیک اسید

منابع تغییرات	درجه آزادی	سافرانال	کروسین
تیمار	۲	$3916/62^{**}$	$2121552/63^{**}$
زمان برداشت	۱	$947/00^{**}$	$569994/51^{**}$
زمان برداشت * تیمار	۲	$497/47^{**}$	$8593/29^{ns}$
اشتباه آزمایشی	۱۲	$11/01$	$2121552/63^{**}$

** معنی دار در سطح احتمال $0/01$ ، ns غیرمعنی دار

جدول ۴- مقایسه میانگین مقادیر سافرانال و کروسین بر اثر تیمار سوسپانسیون سلولی با سطوح مختلف آبسزیک اسید

تیمار آبسزیک اسید	زمان برداشت	کروسین (میکروگرم در یک گرم کالوس)	سافرانال (میکروگرم در یک گرم کالوس)
(T0) تیمار شاهد	۲۴ ساعت	۲۲۹/۵۴ ± ۵۳/۴۲ e	۲/۲۳ ± ۰/۶۳ d
	۷۲ ساعت	۵۷۳/۷۵ ± ۹۵/۵۱ d	۳/۲۳ ± ۰/۴۲ d
	۲۴ ساعت	۷۱۴/۸۶ ± ۲۴/۹۶ d	۳/۳۱ ± ۰/۳۷ d
۰/۵ mg/l (T1)	۷۲ ساعت	۱۴۵۲/۴۲ ± ۲۴/۸۰ b	۳/۱۵ ± ۰/۳۲ b
	۲۴ ساعت	۱۲۲۱/۵۵ ± ۱۳/۰۵ c	۱۶/۶۴ ± ۱/۰۷ c
۱/۵ mg/l (T2)	۷۲ ساعت	۱۷۳۲/۱۳ ± ۲۹/۵۹ a	۶۶/۵۵ ± ۱/۴۹ a

میانگین‌هایی با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد هستند.

هم‌چنین مقایسات میانگین از لحاظ مقادیر کروسین نشان داد که مقدار کروسین در ۷۲ ساعت پس از تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید دارای بالاترین مقدار با میانگین ۱۷۳۲/۱۳ میکروگرم در یک گرم کالوس بوده و این مقدار، اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای استفاده شده با آبسزیک اسید داشت (جدول ۴). تیمار با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید و نمونه‌برداری پس از ۲۴ ساعت هم در مورد سافرانال و هم در مورد کروسین در رتبه بعدی قرار داشت (جدول ۴).

هورمون ABA در تنظیم نمو گیاه به‌ویژه خواب بذر و پیری نقش مؤثری دارد. هم‌چنین در پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری بسیار مؤثر است (Cao et al. 2011; Qin et al. 2011). گیرنده‌های ABA و مسیر علامت‌رسانی آن در گیاهان تا حدودی شناسایی شده‌است (Raghavendra et al. 2010). این مسیر سیگنالی با تغییر بیان تعداد زیادی از ژن‌ها در ارتباط است. به‌طور مثال، تیمار گیاهچه‌های برنج با ۱۰۰ میکرومولار ABA باعث تغییر در سطح رونویسی در بیش از ۳۶۰۰ ژن هسته‌ای شد (Garg et al. 2012). هم‌چنین تأثیر ABA در سرکوب ژن‌های کلروپلاستی در گیاه جو گزارش شده‌است (Yamburenko et al. 2013). با این حال، پاسخ بیان ژن‌های کلروپلاستی به ABA و مقدار کاهش بیان آن‌ها متفاوت بود. به‌طوری‌که پس از تیمار با ABA بیان برخی از ژن‌ها کاهش بیشتر و بیان برخی دیگر به میزان کمتری کاهش نشان داد. بر این اساس می‌توان گفت که تأثیر ABA به‌طور کلی ممانعت از فعالیت RNA مرز نیست، بلکه با تأثیر بر فاکتورهای رونویسی یا پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA بر سطح رونویسی و یا پایداری مولکول RNA تأثیر می‌گذارد (Yamburenko et al. 2013). از سوی دیگر تأثیر تیمار

با ABA بسته به نوع نمونه گیاهی متفاوت گزارش شده‌است (Yamburenko et al. 2013). هم‌چنین نقش اندک و غیرمعنی‌دار ABA (در غلظت ۱۰۰ میکرومولار) در بیان ژن *CsULT1* به عنوان یک ژن جدید در بیوسنتز آپوکاروتنوئیدها در زعفران توسط Ashraf et al. (2015) گزارش شده‌است. کاهش بیان ژن در اثر تیمار با ABA در ژن‌های هسته‌ای کدکننده‌ی پروتئین‌های فعال در فتوسنتز گزارش شده‌است (Cutler et al. 2010; Fujita et al. 2011). در آزمایش حاضر پس از اعمال تیمار کشت سوسپانسیونی زعفران با ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید و پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت دو ژن *CsLYC* و *CsGT-2* به‌طور چشمگیری افزایش بیان نشان دادند به‌طوری‌که در بین سطوح مختلف این تیمار بیش‌ترین شدت بیان دو ژن *CsLYC* و *CsGT-2* متعلق به تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید و نمونه‌برداری پس از ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار بود ولی ژن *CsBCH* کاهش بیان از خود نشان داد. این امر نشان می‌دهد که تأثیر ABA بر بیان ژن‌ها متفاوت است و این با نتایج (2013) Yamburenko et al. مطابقت دارد. افزایش بیان برخی از ژن‌ها در تحقیق حاضر در تضاد با نتایج کارهای قبلی است که امکان دارد به‌دلیل نوع ژن و نوع بافت مورد استفاده باشد. آبسزیک اسید به‌عنوان یک هورمون تنشی شناخته شده‌است که شبکه‌های پیچیده‌ای از پاسخ‌های به تنش را در گیاهان هماهنگ می‌کند. در شرایط تنش خشکی یا شوری، میزان ABA در گیاه تا حدود ۴۰ برابر بیش‌تر می‌شود که از طریق بسته شدن روزنه‌ها و انباشت دهیدرین‌ها و پروتئین‌های دیگر باعث تنظیم اسمزی در گیاهان می‌شود (Verslues et al. 2006). تنش سرما و گرما نیز البته به مقدار کمتر باعث افزایش سطوح ABA درون گیاه در گیاهان

دارد. به طوری که ABA باعث افزایش تولید پاکلی تاکسل در کشت سوسپانسیون سلول *Taxus chinensis* می شود (Luo et al. 2001)، در حالی که مقدار ساپونین در ریشه های موئین *Panax quinquefolium* را کمی کاهش می دهد (Wang and Ding 2001). هم چنین (Sun et al. 2007) گزارش کردند که تیمار با آبسزیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر باعث کاهش فعالیت آنزیم های درگیر در بیوسنتز شیکونین در گیاه *Onosma paniculatum* در یک الگوی وابسته به زمان می شود به طوری این کاهش در فعالیت آنزیم، چهار ۴ روز پس از اعمال تیمار مشاهده شد ولی در نمونه برداری های بعدی ۸، ۱۲ و ۱۶ روز پس از اعمال تیمار تأثیر معنی داری نداشت. این در حالی است که طبق همین گزارش، ABA به رغم کاهش در فعالیت آنزیمی تأثیری روی بیان ژن های مسیر بیوسنتز شیکونین در این گیاه نداشت. در کل، تیمار با آبسزیک اسید برای افزایش بیان ژن و سنتز بیشتر کروسین و سافرانال در کشت سوسپانسیونی زعفران می تواند مؤثر باشد.

می شود (Du et al. 2013). گزارش های زیادی وجود دارد که نشان می دهند ABA با استفاده از مسیر انتقال علامتی خاصی بیان تعداد زیادی از ژن های مرتبط با پاسخ به تنش را فعال می کند (Liao et al. 2006, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2004). چندین خانواده ژنی مانند MYC، MYB و WRKY گزارش شده اند که در تنظیم بیان ژن های مرتبط به واکنش به ABA مهم هستند (Zou et al. 2004). به عنوان مثال، MYB96 به وسیله ABA تحت تنش ایجاد می شود که موجب تقویت تحمل به خشکی و انجماد می شود (Guo et al. 2013; Seo et al. 2009).

هم چنین نتایج نشان داد که مقادیر سافرانال و کروسین به طور معنی داری تحت تأثیر تیمار آبسزیک اسید در هر دو زمان نمونه برداری قرار می گیرد به طوری که تیمار با ۱/۵ میلی گرم در لیتر ABA و نمونه برداری پس از ۷۲ ساعت از اعمال دارای بیش ترین مقدار کروسین و سافرانال است. آبسزیک اسید اثرات متفاوتی روی متابولیت های ثانویه در کشت سلول های گیاهی

منابع

Abdullaev FI (2002) Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Experimental Biology and Medicine* 227:20-25.
 Ahrazem O, Rubio Moraga A, Lopez RC, Gomez L (2010) The expression of chromoplast specific beta lycopene cyclase gene is involved in the high production of saffron precursors. *Journal of Experimental Botany* 61:105-119.
 Ashraf N, Jain D, Vishwakarma RA (2015) Identification, cloning and characterization of an ultrapetala transcription factor *CsULT1* from *Crocus*: a novel regulator of apocarotenoid biosynthesis. *BMC Plant Biology* 15:25
 Bouvier F, Suire C, Mutterer J, Camara B (2003) Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15:47-62.
 Britton G (1998) Overview of carotenoid biosynthesis, in: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (Eds.), *Carotenoids, Biosynthesis and Metabolism*, Birkhäuser Verlag, Basel 3:13-147.
 Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005) Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34:597-601.
 Cao FY, Yoshioka K, Desveaux D (2011) The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research* 124:489-499.
 Castillo R, Fernandez JA, Gomez-Gomez L (2005) Implications of carotenoid biosynthetic genes in

apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives. *Plant Physiology* 139:674-689.
 Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Absciscic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* 61:651-679.
 Du H, Wu N, Chang Y, Li X, Xiao J, Xiong L (2013) Carotenoid deficiency impairs ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 83:475-88.
 Dufresne C, Cormier F, Dorion S (1997) In vitro formation of crocetin glucosyl esters by *Crocus sativus* callus extract. *Planta Medica* 63:150-153.
 Ebrahimzadeh H, Rajabian T, Abrishamchi P, Karamian R, Saboori O (2006) Saffron of Iran with a research perspective; Information Publishing House.
 Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research* 124:509-525.
 Garg R, Tyagi AS, Jain M (2012) Microarray analysis reveals overlapping and specific transcriptional response to different plant hormones in rice. *Plant Signaling and Behavior* 7:951-956.
 Guan, L, Zhao J, Scandalios JG (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress:

H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal* 22:87-95.

Guo L, Yang H, Zhang X, Yang S. (2013) Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 64:1755-67.

Karuppusamy S (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1222-1239.

Liao Y, Zhang JS, Chen SY, Zhang WK. (2008) Role of soybean GmbZIP132 under abscisic acid and salt stresses. *Journal of Integrated Plant Biology* 50:221-30.

Luo J, Liu L, Wu CD (2001) Enhancement of paclitaxel production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters* 23:1345-1348.

Mir JI, Ahmed N, Mokhdomi TA, Wafai AH, Wani SH, Bukhari S (2013) Relative Expression of Apocarotenoid Biosynthetic Genes in Developing Stigmas of *Crocus sativus* L. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 16:183-188.

Mir JI, Ahmed N, Wafai AH, Qadri RA (2012) Relative expression of CsZCD gene and apocarotenoid biosynthesis during stigma development in *Crocus sativus* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18:371-375.

Moraga AR, Nohales PF, Pérez JAF, Gómez-Gómez L (2004) Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas. *Planta* 219:955-966

Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH (1995) Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. *Cancer Biotherapy* 10:257-264.

Pfander H, Schurtenberger H (1982) Biosynthesis of C20-carotenoids in *Crocus sativus*. *Phytochemistry* 21:1039-1042.

Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant Cell Physiology* 52:1569-1582.

Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* 15:395-401.

Rao RS, Ravishankar GA (2002) Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20:101-153.

Rios JL, Recio MC, Giner RM, Máñez S (1996) An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research* 10:189-193.

Seo PJ, Xiang F, Qiao M, Park JY, Lee YN, Kim SG, Lee YH, Park WJ, Park CM (2009) The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151:275-89.

Sun D-Y, Yin Z-J, Wu S-J, Su J, Shi S, Wu H, Xiao F-H, Qi J-L, Liu Z, Pang Y-J et al. (2007) Effects of abscisic acid on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. *Russian Journal of Plant Physiology* 54:530-535.

Tarantilis PA, Morjani H, Polissiou M, Manfait M (1994) Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer Research* 14:1913-1918.

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal* 45:523-39.

Wang CZ, Ding JY (2001) Effects of different media and phytohormones on the growth and ginsenoside content of *Panax quinquefolium* L. *Hairy Root*. *Journal of Plant Resources and Environment* 10:1-4.

Wang X, Wang Z, Dong J, Wang M, Gao H (2009) Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene and the responses of *Caragana korshinskii* to a variety of abiotic stresses. *Genes and Genetic Systems* 84:397-405.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6:251-64.

Yamburenko MV, Zubo YO, Vanková R, Kusnetsov VV, Kulaeva ON, Börner T (2013) Absciscic acid represses the transcription of chloroplast genes. *Journal of Experimental Botany* 64:4491-4502.

Zou X, Seemann JR, Neuman D, Shen QJ. (2004) A WRKY gene from creosote bush encodes an activator of the abscisic acid signaling pathway. *Journal of Biology and Chemistry* 279:55770-9.