



بررسی اثر الیسیتور جاسمونات بر سطح بیان ژن COMT در گیاه دارویی *Ocimum ciliatum* در شرایط تنش خشکی

فاطمه ملک پور^{۱*}، عبدالله قاسمی پیربلوطی^۲، کبری توفیقی^۳

۱ گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲ گروه گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه دانش البرز، قزوین، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۰۱

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۲

چاپ: تابستان ۱۴۰۴

DOI:

doi.org/10.82415/nacms.1404.1222128

کلمات کلیدی:

بیان ژن، ریحان، فنیل پروپانویدها، جاسمونات

* نویسنده مسئول: Email

Fmalekpoor87@yahoo.com

جنس ریحان متعلق به تیره نعنائیان یکی از مهمترین و اقتصادی ترین گیاهان دارویی دنیا است که گونه‌های آن برای تولید چای دارویی، اسانس، ادویه، سبزی و به صورت گیاه تزئینی گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسانس ریحان سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوییدی می‌باشد. متیل چاویکول از ترکیبات اصلی فنیل پروپانویدها در اسانس ریحان است. آنزیم چاویکول-O-متیل-ترانسفراز یک آنزیم کلیدی در مسیر ساخته شدن فنیل پروپانویدها می‌باشد. در این پژوهش اثر الیسیتور جاسمونات بر میزان اسانس، ترکیبات فنیل پروپانوییدی و بیان ژن آنزیم چاویکول-O-متیل ترانسفراز در گیاه ریحان تحت شرایط تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور گیاه ریحان تحت تیمارهای مختلف تنش خشکی (۱۰۰، ۶۰ و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی)، با اسید جاسمونیک (۲۰۰ میکرولیتر و ۴۰۰ میکرولیتر) در سه مرحله تیمار شد. میزان متیل چاویکول به وسیله کروماتوگرافی گازی تعیین و سطح بیان ژن چاویکول-O-متیل ترانسفراز نیز با روش Semi-quantitative RT-PCR بررسی شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد میزان اسانس، میزان بیان ژن چاویکول-O-متیل ترانسفراز و ترکیب متیل چاویکول تحت تأثیر تنش خشکی و الیسیتور جاسمونات در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری یافت، به طوری که بیشترین میزان آن با به کارگیری غلظت ۴۰۰ میکرولیتر اسید جاسمونیک در تنش ۶۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد. بنابراین جاسمونات به عنوان یک الیسیتور زیستی می‌تواند از طریق افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم چاویکول-O-متیل ترانسفراز

سبب افزایش ترکیبات فنیل پروپانوییدی گیاه ریحان در شرایط تنش خشکی شود.

مقدمه

ریحان (*Ocimum ciliatum*) سبزی خوراکی است و برگ‌های تازه و خشک شده آن به مصرف تغذیه می‌رسد، هم‌چنین به عنوان دمنوش دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این، به‌عنوان طعم‌دهنده و خوشبوکننده به بسیاری از غذاها افزوده می‌شود (۱). این گیاه دارویی منبع ترکیبات حلقوی و اسانس است که دافع حشرات بوده و عملکرد ضدانگلی، ضدباکتری، ضدقارچی، ضدویروسی و آنتی-اکسیدانی دارد (۱،۲،۳). هم‌چنین هم‌چنین در صنایع آرایشی و بهداشتی نیز استفاده می‌شود (۴). اسانس ریحان شامل دو گروه ترپن‌ها (لیمونن، کامفور، لینالول، ژرانیول و غیره) و فنیل پروپانوئیدها (اوژنول، چاویکول، متیل‌چاویکول، سینامات و غیره) می‌باشد که مخصوصاً ترکیبات فنیل پروپانوئید آن نماینده صفات دارویی در این گیاه می‌باشد (۵،۶). فنیل پروپانوئیدها، مولکول‌های کوچک فنلی هستند که دارای یک حلقه فنیلی و یک زنجیره سه کربنی هستند. این ترکیبات که از مسیر بزرگ فنیل پروپانوییدی سنتز می‌شوند، عامل طعم، بو و مزه در اسانس هستند و نقش مهمی در سازگاری گیاهان و افزایش رقابت آن‌ها در منابع محدود مانند نور و آب با سایر گونه‌های گیاهی دارند (۷).

یکی از مهم‌ترین ترکیبات فنیل پروپانوییدی اسانس ریحان، متیل‌چاویکول است که یک مشتق آلیل فنل غیرترپنوئیدی است. متیل‌چاویکول یک مایع بی‌رنگ است که نقطه جوش آن ۲۱۵ تا ۲۱۶ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. این ترکیب در صنعت داروسازی و عطرسازی کاربرد دارد و دارای خواص درمانی نظیر خاصیت ضدویروسی، ضدباکتریایی و ضداسپاسم می‌باشد و نیز به عنوان حشره‌کش کاربرد دارد (۸،۹).

مقدار اسانس ریحان با توجه به شرایط اقلیمی و محل رویش متفاوت است و بین ۰/۴ تا ۱/۵ درصد می‌باشد (۱۰). علی‌رغم استفاده وسیع و اهمیت ریحان و اسانس آن در مصرف روزانه اطلاعات کمی از مسیر بیوسنتزی و اثر تنظیمی ترکیبات مؤثر بر کیفیت محصول و تولید اسانس وجود دارد. تولید متابولیت‌های گیاهی با ارزش در ابتدا از طریق کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی و هم‌چنین کشت ریشه‌های مؤین از نظر تجاری موفقیت‌آمیز نبوده و با محدودیت‌هایی مواجه می‌شود. یکی از این موانع مقادیر کم متابولیت‌های ثانویه تولید شده است، اما محققین با به‌کارگیری روش‌هایی که به نوعی تحریک‌کننده مسیرهای بیوسنتزی این ترکیبات می‌باشند، به موفقیت‌های قابل توجهی دست یافته‌اند. یکی از این روش‌ها که به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از

جمله ترپنوئیدها و غیره به کار می رود، استفاده از الیسیتورها می باشد (۱۱،۱۲).

الیسیتورها شامل قارچ ها، باکتری ها، ویروس ها، پلی ساکاریدها، پروتئین ها، گلیکوپروتئین ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ ها، گیاهان (سلولز، پکین)، میکروارگانیسم ها (کیتین، گلوکان)، برخی عوامل تنشی مانند اشعه ماوراءبنفش، تنش فیزیکی، اسمزی، فشار، نمک فلزات سنگین و بعضی از ترکیبات شیمیایی می باشند (۱۳). یکی از الیسیتورها، اسیدجاسمونیک می باشد. القای تجمع متابولیت های ثانویه گیاهی توسط مسیر پیام رسانی جاسمونات به انواع خاصی از متابولیت ها محدود نمی شود، بلکه شامل طیف گسترده ای از محصولات ثانویه گیاهی از قبیل: فنیل پروپانوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها می باشد و به عنوان یک پیام جامع برای بیوسنتز بسیاری از فرآورده های گیاهی ثانویه شناخته می شود (۱۴،۱۵).

از طرفی به دنبال درک الیسیتور تعدادی پاسخ سریع در سلول های گیاهی قابل تشخیص است، نظیر فروپاشی سلول، تغییرات ساختاری در دیواره سلولی (دپلاریزه شدن غشای پلاسمایی)، افزایش جریان های یونی از عرض غشای پلاسمایی، تولید انواع اکسیژن فعال ROS و غیره، که این رخدادها و مسیرهای انتقال پیام در گیاهان مختلف متفاوت است (۱۶). بنابراین افزایش متابولیت های ثانویه توسط القاء محرک، یک رهیافت تجربی با اثرات غیرقابل پیش بینی روی تولید متابولیت ها و فرآورده های کلی گیاه و همچنین سایر

خصوصیات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و غیره گیاه می باشد که در مطالعات ما باید مورد بررسی قرار گیرد.

به طور کلی هدف از تولید تجاری گیاهان دارویی، به دست آوردن مقدار بیشتری بیوماس در واحد سطح است که محتوی مقادیر بالاتری از مواد مؤثره نیز باشد، بنابراین آگاهی از عوامل مدیریتی مناسب جهت به دست آوردن پتانسیل عملکرد گیاه دارویی ریحان بسیار حایز اهمیت است. لذا معرفی مناسب ترین غلظت از الیسیتور جاسمونات و تعیین بهترین آستانه ی مقاومت به خشکی در جهت بالا بردن عملکرد و میزان ماده ی مؤثره در گیاه دارویی ریحان امری ضروری می باشد. از آنجا که متیل چاویکول از اهمیت کاربردی قابل توجهی برخوردار است و چاویکول -O- متیل ترانسفراز یکی از آنزیم های نهایی و آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز متیل-چاویکول می باشد، بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارتباط بیان ژن و فعالیت آنزیم CVOMT با تغییرات میزان ترکیبات فنیل پروپانوئیدی از جمله متیل چاویکول تحت تیمار جاسمونات در شرایط تنش خشکی بود.

مواد و روش ها

کشت و آماده سازی ریحان: برای انجام این پژوهش

بذرهای ریحان بنفش از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و در اردیبهشت ماه در گلدان هایی حاوی خاک مزرعه با کود حیوانی پوسیده با نسبت ۳/۱ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد کشت شدند. در داخل هر گلدان بذرهای به تعداد زیاد کاشته و پس از رشد گیاهچه ها، تنک کردن آنها

در طی چند مرحله انجام گرفت. تا یک ماه پس از کاشت بذور (مرحله ۶ تا ۸ برگی شدن بوته‌ها)، گلدان‌ها به طور مساوی آبیاری می‌شدند و از این مرحله به بعد، تیمارهای آبیاری اعمال شد که شامل ۱۰۰، ۶۰ و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی بودند.

برای استفاده از الیستور زیستی جاسمونات، ابتدا در اتانول ۷۰ درصد حل شد و سپس با استفاده از آب مقطر غلظت‌های مختلفی (۲۰۰ میکرولیتر، ۴۰۰ میکرولیتر) از آن تهیه شد و به صورت محلول‌پاشی طی سه مرحله، رویشی (قبل از گل‌دهی، ۵۰ درصد گل‌دهی و پایان گل‌دهی) اعمال شد. سپس اندام‌های هوایی گیاه یک هفته پس از اعمال آخرین تیمار جاسمونات به منظور مطالعات، برداشت شد. به این منظور بخش هوایی گیاهان از سطح خاک قطع شدند. بخشی از گیاهان برای آزمایش‌های مولکولی در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بخشی دیگر به منظور استخراج اسانس در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲ هفته دور از نور مستقیم خشک شدند.

اسانس‌گیری: جهت استخراج اسانس گیاه ریحان از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استفاده شد. بدین ترتیب که عمل اسانس‌گیری در مورد همه تیمارها به مدت سه ساعت ادامه یافت. حجم اسانس به دست آمده به دقت یادداشت شد و در ظرف‌های مخصوص تا زمان تجزیه در یخچال نگهداری شد.

تجزیه اسانس با GC-MS: برای تجزیه اسانس‌ها، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی استفاده شد. دستگاه Agilent 7890 A و نوع ستون HP-5 5% MS (طول ستون ۳۰m، قطر داخلی ستون ۰/۲۵ μ m، قطر بیرونی ستون ۰/۲۵mm). گاز هلیوم با سرعت ۰/۸ ml/min جریان داشت. دمای اولیه ستون ۶۰ درجه سانتی‌گراد و دمای نهایی ستون ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. افزایش دما تا ۴°C/min برنامه‌ریزی شد. نسبت جداسازی ۱:۱۰۰ تنظیم شد. دمای تزریق کننده ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. خلوص گاز هلیوم ۹۹/۹۹۹ درصد بود. جهت تزریق نمونه‌ها از میزان ۰/۱ میکرولیتر اسانس با استفاده از سرنگ همپلتون استفاده شد. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری (RI)، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد (۱۷) و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS صورت گرفت. درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با توجه به سطح نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام GC بدست آمد.

مطالعه بیان ژن CVOMT: برای استخراج Total RNA از برگ ریحان، از محلول ریمازول همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵ درصد و آب DEPC (دی اتیل پیرو کربنات) استفاده شد. پس از استخراج RNA کل، کیفیت آن به وسیله الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. مرحله بعد از

استخراج RNA، سنتز DNA معکوس بود. ساختن cDNA با استفاده از کیت (Cinnagen) و طبق دستور شرکت سازنده آن انجام شد. به منظور بررسی بیان ژن CVOMT از دو دسته آغازگرهای اختصاصی پیشرو و برگشتی استفاده شد و به عنوان کنترل داخلی نیز از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و

برگشتی برای تکثیر cDNA ژن توبولین استفاده شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن CVOMT و Tubulin از طریق Blast search و با استفاده از سایت NCBI صورت گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگر طراحی شده برای ژن چاویکول - O- متیل ترانسفراز (CVOMT) و Tubulin

Gene name	Primer sequence	MW (g/mole)	T _m (°C)	GC (%)
F:CVOMT	5'CCAATTTCTTCATAGAAGAAAACCTC3'	7592.9	51.8	32
R:CVOMT	5'GATAAGCCTCTATGAGAGACCTC 3'	7032.5	49.8	47.8
F:Tubulin	5'GGGGCGTAGGAGGAAAGCA3'	5662	50.6	63.1
R:Tubulin	5'GCTTTCAACAACTTCTTCAG3'	5413.5	55.2	40

برای بررسی بیان ژن به صورت نیمه کمی در مقایسه با کنترل داخلی، بیان ژن در چرخه‌های متفاوت بررسی شد و پس از ارزیابی نتایج روی ژل بهترین شرایط تعداد ۳۶ چرخه برای بررسی ژن مورد نظر و کنترل داخلی آن انتخاب شد. برای پیدا کردن بهترین دمای اتصال پرایمرها از گرادیان دمایی برای هر کدام از ژن‌ها استفاده شد. چرخه‌های مورد

استفاده PCR به ترتیب شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه بود که سپس ۳۶ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه برای واسرشت شدن، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه برای اتصال، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه تکثیر و تکثیر نهایی در ۸ دقیقه دنبال شد (جدول ۲).

جدول ۲- شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR

مرحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال‌سازی ابتدایی آنزیم	۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه
واسرشت شدن	۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه
اتصال آغازگرها	۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه
تکثیر	۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه
تکثیر نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه
۳۶ چرخه	

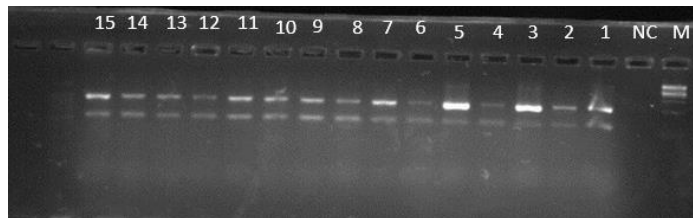
در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز (۱ درصد) الکتروفورز مشاهده و عکس برداری شد. برای ارزیابی کمی بیان ژن ها از مقایسه شدت چگالی باندهای ژن نسبت به کنترل داخلی (توبولین) و از نرم افزار Photo capMw استفاده شد.

تجزیه آماری: کلیه داده های حاصل از سنجش اسانس، ترکیب متیل چاویکول و میزان بیان ژن توسط نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین داده ها به روش GLM صورت گرفت. رسم نمودارها نیز در Excle 2013 انجام گرفت.

نتایج: نتایج تجزیه واریانس داده های حاصل از آزمایش نشان داد که سطوح مختلف تنش خشکی و الیسیاتور جاسمونات اثر معنی داری بر بازده اسانس، میزان بیان ژن CVOMT و میزان ترکیب متیل چاویکول دارند ($p < 0.01$). نتایج تجزیه واریانس هم چنین نشان داد اثر متقابل خشکی و جاسمونات نیز تأثیر معنی داری بر بازده اسانس، میزان بیان ژن CVOMT و میزان ترکیب متیل چاویکول دارند (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس				
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (M.S)		
(S.O.V)	(d.f)	بازده اسانس	متیل چاویکول	بیان ژن
سطوح آبیاری	۲	۰/۰۹۷۹**	۱۴۲/۹**	۰/۱۹۲**
(I)				
جاسمونات	۳	۰/۰۸۳۲**	۱۳۷/۷*	۰/۲۵۸**
(J)				
I×J	۶	۰/۰۱۴۹**	۲۱۷/۰**	۰/۰۳۶۲**
خطا	-	۰/۰۶۹۴**	۷/۳۶	۰/۰۱۰۱
کل	۱۱	-	-	-

ضریب	۱/۶۷	۱۵/۴۸	۲۰/۱۶	۵/۹۱
تغییرات (CV%)				
** : اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد ($p < 0.01$)				

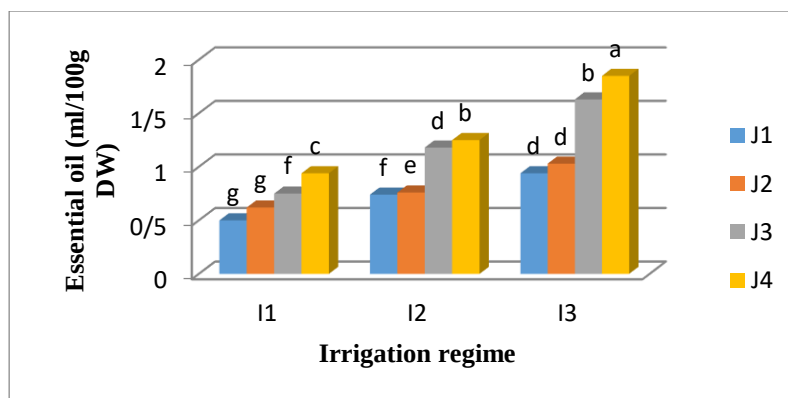


شکل ۱- باندهای مربوط به ژن CVOMT و توبولین تحت تأثیر جاسمونات در شرایط مختلف تنش خشکی

تأثیر جاسمونات و خشکی بر عملکرد اسانس

مقدار کل اسانس، بر اساس مقدار اسانس موجود در ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تغییرات میزان اسانس در تیمارهای مختلف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.01$). نمودار مقایسه

میانگین داده‌ها نشان داد در همه تیمارهای آبیاری میزان اسانس با به کار بردن غلظت‌های مختلف جاسمونات نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش نشان داد و بیشترین میزان اسانس با به کار بردن غلظت ۴۰۰ میکرولیتر جاسمونات بدست آمد (نمودار ۱).



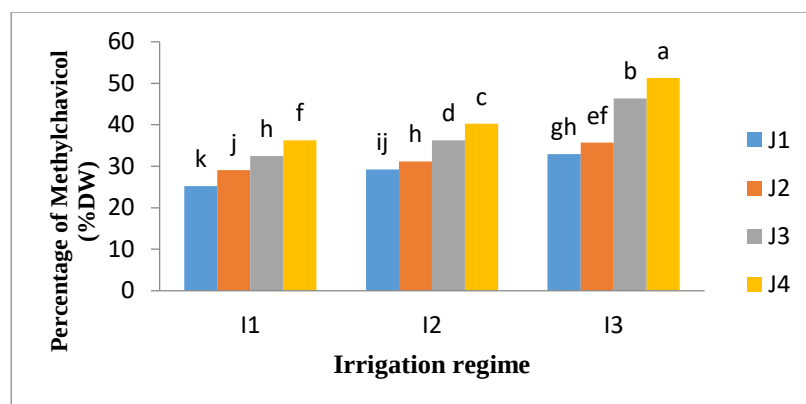
نمودار ۱- میزان بازده اسانس ریحان تحت تأثیر جاسمونات در شرایط مختلف تنش خشکی بر اساس میلی‌لیتر اسانس بر صد گرم وزن خشک گیاه (V/W). J1: آب مقطر، J2: اسید استیک، J3: جاسمونات ۲۰۰ میکرولیتر و J4: جاسمونات ۴۰۰ میکرولیتر، I1: آبیاری

۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی، I2: آبیاری در حد ۶۰ درصد ظرفیت زراعی و I3: آبیاری در حد ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد $P < 0.01$).

تشکیل دهنده اسانس در تمام تیمارها بود. نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد مقدار ترکیب متیل چاویکول تحت تأثیر تیمار جاسمونات نسبت به نمونه های شاهد افزایش یافت. از طرف دیگر اعمال تنش خشکی نیز باعث افزایش معنی دار میزان ترکیب متیل چاویکول گردید و در تیمار جاسمونات ۴۰۰ میکرولیتر و آبیاری ۳۰ درصد ظرفیت زراعی به بیشترین میزان خود رسید (نمودار ۲).

تأثیر جاسمونات و خشکی بر مقدار متیل چاویکول

آنالیز اسانس به کمک دستگاه GC/MS نشان داد، بیش از ۴۰ ترکیب مختلف در اسانس *O. ciliatum* وجود دارد که فراوان ترین آن ها عبارت اند از: متیل چاویکول، E-سیترال، Z-سیترال و آلفا کادینول که بیش از ۵۰ درصد اسانس ریحان را به خود اختصاص داده اند. متیل چاویکول به عنوان یکی از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی، مهم ترین ماده



نمودار ۲ - تغییرات مقدار متیل چاویکول تحت تأثیر جاسمونات در شرایط مختلف تنش خشکی بر اساس وزن خشک گیاه (V/W). J1: آب مقطر، J2: اتانول، J3: جاسمونات ۲۰۰ میکرولیتر و J4: جاسمونات ۴۰۰ میکرولیتر، I1: آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی، I2: آبیاری در حد ۶۰ درصد ظرفیت زراعی و I3: آبیاری در حد ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد $P < 0.01$).

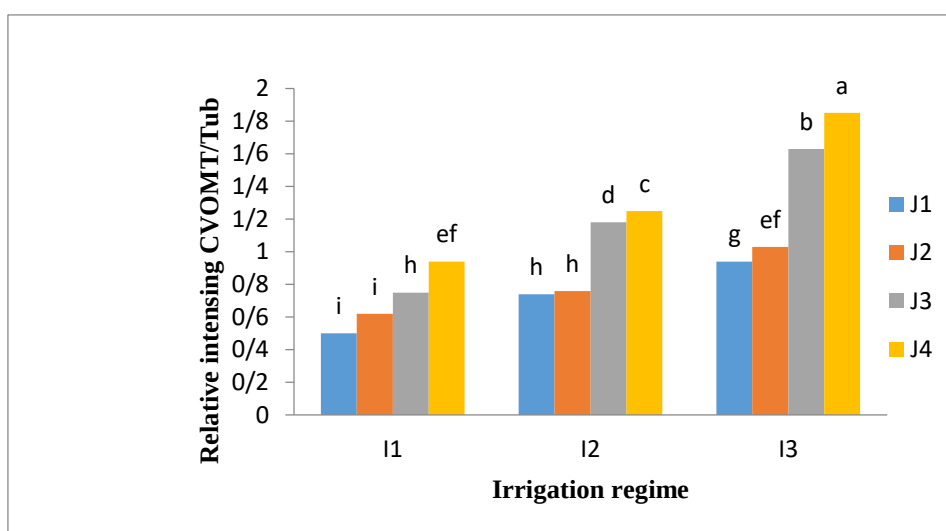
Photo capMw و هم چنین تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری بیان ژن CVOMT نشان داد که میزان نسبی بیان ژن مذکور در تیمارهای مختلف به طور معنی داری تغییر نموده است ($P < 0.01$). همان طور که نمودار مقایسه میانگین داده ها نشان می دهد، کمبود آبیاری باعث افزایش معنی دار

تأثیر جاسمونات و خشکی بر بیان ژن CVOMT

آنزیم چاویکول-O-متیل ترانسفراز (CVOMT) که عمل متیلاسیون چاویکول را برعهده دارد، یکی از اعضای خانواده آنزیمی O-متیل ترانسفرازها می باشد. ژن آن در کرک های غده ای سپر مانند سطح برگ از بیان بالایی برخوردار است. در این تحقیق آنالیزهای نیمه کمی با نرم افزار

افزایش نشان داد، که بیشترین میزان بیان آن با به کار بردن غلظت ۴۰۰ میکرولیتر جاسمونات حاصل شد (نمودار ۳).

میزان بیان ژن CVOMT می شود. همچنین در همه تیمارهای آبی میزان بیان ژن CVOMT با به کار بردن غلظت های مختلف جاسمونات نسبت به نمونه های شاهد



نمودار ۳- میزان بیان ژن CVOMT تحت تأثیر جاسمونات در شرایط مختلف تنش خشکی. (J1: آب مقطر، J2: اتانول، J3: جاسمونات ۲۰۰ میکرولیتر و J4: جاسمونات ۴۰۰ میکرولیتر، I1: آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی، I2: آبیاری در حد ۶۰ درصد ظرفیت زراعی و I3: آبیاری در حد ۳۰ درصد ظرفیت زراعی) (حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد $P < 0.01$).

معنی داری بر عملکرد اسانس ریحان داشتند ($p \leq 0.01$). به-

بحث

طور کلی، نتایج نشان داد که با افزایش تنش خشکی میزان اسانس افزایش یافت و در سطح ۳۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش چشم گیری داشت. به طور کلی، بیشترین عملکرد اسانس از تنش خشکی شدید به دست آمد و کمترین میزان اسانس نیز در ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد که نتایج

در این پژوهش، همه اسانس های حاصل از بخش های هوایی ریحان، تحت تیمارهای مختلف، مایع شفاف و زرد رنگ بودند. مقدار کل اسانس، بر اساس مقدار اسانس موجود در ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد. تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که تیمارهای مختلف آبیاری اثر

به دست آمده مطابق با تحقیقات بسیاری از محققین می باشد (۱۸،۱۹،۲۰). مطالعات نشان داده اند که تحت شرایط خشکی نوعی رابطه معکوس بین سطح برگ و تعداد غدد ترشحاتی اسانس برقرار است، به طوری که با کاهش سطح برگ تعداد غدد ترشحاتی افزایش یافته و در پی آن ترکیب و محتوای اسانس افزایش می یابد (۲۰).

نتایج تجزیه واریانس برای سطوح مختلف اسیدجاسمونیک نیز حاکی از آن بود که اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد از نظر عملکرد اسانس وجود دارد. بیشترین میزان عملکرد اسانس مربوط به محلول پاشی اسیدجاسمونیک با غلظت ۴۰۰ میکرولیتر بود (جدول ۳). چنین می توان نتیجه گرفت که اسیدجاسمونیک بر روی بیوسنتز اسانس در برگ و اندام هوایی ریحان تأثیر زیادی داشته است. سایر محققین (۲۱،۲۲) نیز بیان کردند که اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک سبب افزایش عملکرد اسانس می شود. در این پژوهش اثر محلول پاشی اسیدجاسمونیک بر عملکرد ریحان تحت تنش خشکی بررسی شد. نتایج نشان می دهد که عملکرد اسانس ریحان با استفاده از الیسیاتور اسیدجاسمونیک تحت شرایط تنش خشکی افزایش یافته است که از نقطه نظر صنعتی و داروسازی قابل توجه است. نه تنها عملکرد اسانس، بلکه درصد ترکیبات شیمیایی اسانس نیز تحت تأثیر الیسیاتور قرار گرفت و برخی از ترکیبات افزایش یافته و برخی ترکیبات کاهش یافته است. ماده مؤثره متیل-چاویکول نیز تحت شرایط خشکی و به کار بردن الیسیاتور

جاسمونات افزایش یافت. بالاترین میزان اسانس و ترکیب متیل چاویکول در تیمار ۳۰ درصد ظرفیت زراعی و به کارگیری ۴۰۰ میکرولیتر اسیدجاسمونیک مشاهده شد. میزان بیان ژن چاویکول-O-متیل ترانسفراز نیز تحت تأثیر الیسیاتور جاسمونات و تنش خشکی قرار گرفت و با به کار بردن الیسیاتور جاسمونات در غلظت ۴۰۰ میکرولیتر افزایش یافت. به طور کلی روند تغییرات میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم CVOMT با روند تغییرات ترکیبات فنیل پروپانوئیدی از جمله متیل-چاویکول، در تیمارهای مختلف مطابقت داشت، به طوری که با افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم CVOMT مقدار متیل-چاویکول گیاه ریحان افزایش یافت.

ریحان مانند دیگر گیاهان خانواده نعناع، به علت اسانسی که دارا می باشد، دارای اهمیت دارویی زیادی است و به طور وسیعی کشت می شود. تشکیل اسانس در ریحان و ترکیبات آن تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل فتوسنتز، شدت نور، نوع فصلی، شرایط اقلیمی، تنظیم کننده های رشد گیاهی و تنش های محیطی قرار می گیرد و میزان سنتز آن تحت تأثیر تنش های زیستی و غیرزیستی تغییر می کند (۲۳،۲۴). روند دقیق ساخت متابولیت های ثانویه در گیاهان هنوز به خوبی مشخص نشده است، ولی متابولیت های ثانویه به طور کلی بازمانده های ناشی از فرآیندهای اصلی متابولیسم گیاهان، به ویژه در پاسخ به تنش وارد شده به گیاه محسوب می شوند (۲۵). محققان در تحقیقات خود نشان دادند که تنش های محیطی باعث افزایش سطوح متابولیت های ثانویه

در گیاهان دارویی می‌شود. اگرچه آب یک فاکتور محدود کننده برای تولید گیاهان می‌باشد، اما تنش خشکی می‌تواند باعث افزایش متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی شود. در حقیقت تولید این متابولیت‌ها به عنوان یک راهکار بقاء در برابر تنش‌های محیطی مطرح می‌باشد. کمبود رطوبت، گیاه را وادار به واکنش‌های مختلف متابولیکی و فعالیت ژن‌های خاص و غیره می‌کند.

به‌طور کلی همان‌طور که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد تنش خشکی باعث افزایش میزان اسانس در گیاه ریحان می‌شود که این نتایج با سایر گزارشات در مورد اثر تنش خشکی بر میزان اسانس، مطابقت دارد. ریزوپولوس^۱ و دیامانتوگلون^۲ (۲۰) با آزمایش بر روی گیاه *Origamum majorana* L. بیان کردند که تنش خشکی موجب افزایش میزان اسانس این گیاه شده است.

از جمله عوامل دیگری نیز که می‌تواند تشکیل اسانس و ترکیبات را تحت تأثیر قرار دهد، الیسیستورها می‌باشند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تغییرات مقدار اسانس در تیمارهای مختلف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.01$). بررسی‌ها نشان داد که بیشترین میزان اسانس تحت شرایط تنش خشکی و با به‌کار بردن غلظت ۴۰۰ میکرولیتر جاسمونات حاصل شد.

همان‌طور که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد غلظت‌های مختلف الیسیستور نیز باعث افزایش میزان اسانس

گیاه ریحان می‌شوند. غلظت الیسیستور نقش مهمی در فرآیند تحریک دارد و عامل مؤثری بر شدت پاسخ است. غلظت مؤثر الیسیستور نیز بر حسب گونه گیاهی فرق می‌کند، به طوری که غلظتی از الیسیستور که در یک گیاه اثر تحریکی دارد، ممکن است در گیاه دیگر اثر نداشته باشد. در این مطالعه میزان اسانس با افزایش غلظت جاسمونات به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. به نظر می‌رسد ترکیبات فعال الیسیستورها نقش مؤثری در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. مکانیسم اثر الیسیستورهای زیستی بر تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاه به خوبی شناخته نشده است. به طور کلی الیسیستورها با تحریک سیگنال‌های سلولی و برهمکنش مولکولی میان گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلولی یا سیتوپلاسمی موجب شناسایی آن‌ها می‌شوند. در نتیجه سیگنال دریافتی توسط سلول‌های گیاهی، بیان ژن‌های مرتبط در مسیر را تحریک می‌کنند و موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (۲۶). ساز و کارهای متعددی چون پیام-رسان‌های Ca^{2+} ، فاکتورهای مؤثر بر نفوذپذیری دیواره‌ی سلولی، بازدارندگی و فعال‌سازی مسیرهای درون سلولی، تغییرات سریع در پروتئین‌ها از طریق فسفریلاسیون و فعال-سازی پروتئین‌کینازها و تغییرات در استرس‌های اسمزی و ... در این مسیر فرض می‌شوند. البته تمام الیسیستورها چنین مسیرهای پیوسته‌ای را طی نمی‌کنند و موارد مختلفی از جمله منبع الیسیستور، اختصاصی بودن آن، غلظت الیسیستور،

² Diamantoglon

¹ Rizopoulous

مرحله رشدی گیاه، زمان افزودن الیسیستور و مدت زمانی که گیاه در معرض الیستور قرار می‌گیرد، بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (۲۷،۲۸). نتایج حاصل از بررسی میزان ترکیبات اسانس با دستگاه GC/MS نشان داد ترکیب غالب اسانس گیاه ریحان متیل‌چاویکول می‌باشد، گرچه میزان نسبی آن در تیمارهای مختلف متفاوت بود. غلظت‌های مختلف جاسمونات باعث افزایش میزان ترکیب متیل‌چاویکول در گیاه ریحان می‌شود. در یک مطالعه رجب بیگی و همکاران (۲۹) با استفاده از الیسیستورهای فیزیکی مانند میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس 1 kHz باعث افزایش میزان متیل‌چاویکول در گیاه ریحان شدند.

تغییرات کمی بیان ژن CVOMT تحت اثر تیمار جاسمونات در شرایط تنش و غیرتنش در نمودار ۳ نشان داده شده است. نتایج بررسی بیان ژن چاویکول -O- متیل ترانسفراز (CVOMT) در این مطالعه، بیانگر این است که بیان ژن CVOMT تحت تنش خشکی افزایش معنی‌داری داشت. از طرف دیگر غلظت‌های مختلف الیسیستور جاسمونات نیز باعث افزایش بیان این ژن نسبت به نمونه‌های شاهد گردید و بیان ژن مورد بررسی را نسبت به شاهد چه در شرایط تنش و چه در شرایط غیرتنش افزایش داد. CVOMT که عمل متیلاسیون چاویکول را برعهده دارد، یکی از اعضای خانواده آنزیمی O- متیل ترانسفرازها می‌باشد و در کرک‌های غده‌ای سپرمانند سطح برگ ریحان، از بیان بالایی برخوردار می‌باشد. مطالعات بر روی ژن آنزیم‌های خانواده O- متیل ترانسفراز در

گیاهان مختلف تا حدی صورت گرفته و تأثیر تیمارهای مختلف بررسی شده است. نادری و همکاران (۳۰) نیز افزایش بیان ژن CVOMT را در غلظت‌های مختلف الیسیستور کیتوزان گزارش کردند که نتایج آن با مطالعات ما هماهنگی دارد. مطالعات اندکی در مورد اثر تنش‌های محیطی و الیسیستورها بر میزان بیان ژن‌های مسیر فنیل‌پروپانوئیدی از جمله CVOMT صورت گرفته است. تحقیق حاضر نخستین گزارش در رابطه با تأثیر تنش خشکی و جاسمونات بر بیان ژن CVOMT در گیاه ریحان می‌باشد که مشخص کرد تنش خشکی باعث افزایش بیان این ژن در ریحان می‌شود و هم- چنین اثر توأم خشکی و جاسمونات نیز موجب افزایش معنی- دار بیان این ژن می‌شود.

از طرفی در این مطالعه مشخص گردید، روند تغییرات ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی، همچون متیل‌چاویکول، با روند تغییرات میزان بیان ژن CVOMT در تیمارهای مختلف مطابقت دارد، به‌طوری که با افزایش بیان ژن CVOMT مقدار متیل‌چاویکول، گیاه نیز افزایش می‌یابد. بنابراین بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان از جاسمونات به عنوان الیسیستور کارآمد، که از طریق القای بیان ژن خاص، باعث بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه خاص می‌شود، در بسیاری از گیاهان دارویی استفاده کرد و به‌نظر می‌رسد این گامی بالارزش در جهت مهندسی متابولیت و تولید داروهای گیاهی بالارزش باشد.

نتیجه‌گیری

جست و میزان متیل چاویکول را در گیاه افزایش داد. این مطالعه، پایه‌ای برای تحقیقات بیشتر در مورد بهبود کیفیت و ارزش دارویی ریحان را با استفاده از الیسیتورها فراهم می‌کند..

تحت شرایط تنش خشکی، محلول‌پاشی اسیدجاسمونیک به عنوان یک روش می‌تواند برای کاهش اثرات تنش و به دنبال آن افزایش عملکرد اسانس و افزایش ترکیبات فنیل-پروپانوئیدی ریحان مورد استفاده قرار گیرد. از آنجایی که متیل چاویکول در صنعت داروسازی و عطرسازی کاربرد دارد و دارای خواص درمانی نظیر خاصیت ضدویروسی، ضدباکتریایی و ضداسپاسم می‌باشد، می‌توان از الیسیتور اسیدجاسمونیک برای افزایش خصوصیات درمانی ریحان بهره

مراجع

1. Labra M, Miele M, Ledda B, Grassi F, Mazzei M, Sala F. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivares. Plant Sci. 2004; 167: 725-731.

2. Trevisan MTS, Silva MGV, Pfundstein B, Spiegelhalder B, Owen RW. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. J Agric Food Chem. 2006; 54:4378-4382.

3. Faria TJ, Ferreira RS, Yassumoto L, Souza JRP, Ishikawa NK, Barbosa AM. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. Braz Arch Biol Technol. 2006; 49(6):867-871.

۴. امیدبگی ر. رهیافتهای تولید و فرآوری

گیاهان دارویی، جلد سوم، انتشارات فکر روز. (۱۳۷۹). ۴۰۰ صفحه.

5. Iijima Y, Rikanati RD, Fridman E, Gang DR, Bar E, Lewinsohn E, Pichersky E. The biochemical and molecular basis for the divergent in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate gland of three cultivars of basil. Plant Physiol. 2004; 136: 3724-3736.

6. Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA. Colocalization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-Hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell. 2004; 16: 3098-3109.

۷. قاسمی ع. گیاهان دارویی و معطر (شناخت و بررسی اثرات آنها)، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد. (۱۳۸۹). ۵۰۰ صفحه.
8. Okundada AL, Olaifa JA. Estragole: an acute toxic principle from the volatile oil of the leaves of *Clausena anisate*. J Nat Prod. 1987; 50: 990-991.
9. Leung AY. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. John Wiley and Sons, New York 1980; 241-245.
10. Telci I, Bayram E, Yilmaz G, Avci B. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). Biochem Syst Ecol. 2006; 34: 489-497.
11. Zhu LW, Zhung JJ, Tang YJ. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Process Biochem. 2008; 43:1359-1370.
12. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv. 2005; 23: 283-333.
13. Namdeo AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharmacogn. 2007; 1:69-79.
14. Shimizu Y, Maeda K, Kato M, Shimomura K. Methyl jasmonate induces anthocyanin accumulation in *Gynura bicolor* cultured roots. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2010; 46(5):460-465.
15. Rui-May E, Galaz-Valos RM, Loyola-Vargas VM. Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate. Mol Biotechnol. 2009; 41: 278-285.
16. Ebel J, Scheel D. Signals in host-parasite interactions. In: Carrol GC, Tudzynski P. (eds.) Plant relationships. (Part A). Springer Berlin Heidelberg. 1997; 85-105.
17. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 2007.
18. Dunford NT, Vazquez RS. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. J Appl Hortic. 2005; 7(1):20-22.
19. Hamrouni I, Salah H, Marzouk B. Effects of water-deficit on oil of coriander aerial parts. INRST, Laboratoire d'Adaptation et

d'Amelioration des Plants, BP 95 2050, Hammam-Lif, Tunisia, 2001; 95: 21-52.

20. Simon JE, Deshamps C. Regulation of essential oil biosynthesis in basil (*Ocimum basilicum* L.). Prude University, Ph.D Thesis. 2002.

21. Gharib FAL. Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content basil and majram. Int J Agric Biol. 2006; 4:485-492.

22. Ghasemi Pirbalouti A, Mahdad E, Craker L. Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. Food chem. 2013; 141:2440-2449.

23. Sajjadi SE. Analysis of the essential oils of two cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. DARU J Pharm Sci. 2006; 14 (3): 128-130.

24. Chalchat JC, Ozen M. Comparative essential oil composition of flower, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. Food Chem. 2008; 110: 501-503.

۲۵. حسنی ع، امیدبگی ر. اثرات تنش خشکی بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیکی گیاه ریحان، مجله دانش کشاورزی. (۱۳۸۱). (۳): ۱۲-۴۷.

26. Zhang Y, Mian MR, Bouton JH. Recent Molecular and Genomic Studies

on Stress Tolerance of Forage and Turf Grasses. Crop Sci. 2006; 46: 497-511.

27. Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Sci. 2007; 172: 861-875.

28. Angelova Z, Georgiev S, Roos W. Elicitation of plants. Biotechnol. 2006; 20(2):72-83.

۲۹. رجب بیگی ا، قناتی ف، عبدالملکی پ. *Ocimum basilicum* L.) بررسی تغییرات اسانس گیاه ریحان تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی، تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. (۱۳۸۵). (۴): ۳۴۱-۳۵۰.

۳۰. نادری ص، فاخری ب، اسمعیل زاده - متیل-O-بهابادی ص. افزایش بیان ژن چاویکول آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات ترانسفراز و فعالیت تحت *Ocimum basilicum* L. پراکسیداز گیاه تأثیر کیتوزان، مجله علمی پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی. (۱۳۹۳).

Investigating the effect of Jasmonate elicitor on the expression level of COMT gene in *Ocimum ciliatum* under drought stress

Fatemeh Malekpour^{1*}, Abdollah Ghasemi Pirbaluti², Kobra Tofighi³

¹Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

²Department of Medicinal Plants, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³Department of Biology, Faculty of Life Sciences, Danesh Alborz University, Qazvin, Iran.

Email: Fmalekpour87@yahoo.com

Abstract

The genus *Ocimum*, belonging to the Lamiaceae family (mint family), is one of the most important and economically significant medicinal plants worldwide. Its species are utilized for producing medicinal tea, essential oils, spices, as a vegetable, and as ornamental potted plants. Basil essential oil is rich in phenylpropanoid compounds. Methyl chavicol is one of the main phenylpropanoid compounds in basil essential oil. Chavicol-O-methyltransferase (COMT) is a key enzyme in the biosynthesis pathway of phenylpropanoids. In this study, the effect of jasmonate elicitor on the essential oil content, phenylpropanoid compounds, and gene expression of the COMT enzyme in basil plants under drought stress conditions was investigated. For this purpose, basil plants were treated with different levels of drought stress (100%, 60%, and 30% field capacity) and jasmonic acid (200 μ L and 400 μ L) in three stages. The content of methyl chavicol was determined using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS), and the expression level of the COMT gene was analyzed using Semi-quantitative RT-PCR. The results of the analysis of variance showed that the essential oil content, COMT gene expression level, and methyl chavicol content significantly increased under the influence of drought stress and jasmonate elicitor compared to the control samples. The highest levels were obtained by applying 400 μ L of jasmonic acid under 60% field capacity drought stress. Therefore, jasmonate, as a biogenic elicitor, can increase phenylpropanoid compounds in basil plants under drought stress conditions by upregulating the gene expression and activity of the COMT enzyme.

Keywords: Gene expression, Basil (*Ocimum ciliatum*), Phenylpropanoid compound, Jasmonates.