

## بررسی تأثیر الیستورهای نقره و مس بر بیان ژن فلاون سیتتاز ۱ و برخی پارامترهای بیوشیمیایی در گیاهچه‌های زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) بومی ایران

کبری یوسفی<sup>۱</sup>، علی ریاحی مدوار<sup>۲\*</sup> و امین باقی‌زاده<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی

<sup>۲</sup> کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۲۴

### چکیده

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف الیستور نقره (بعد از ۴ ساعت از اعمال تیمار) و الیستور مس (بعد از ۱۶ ساعت از اعمال تیمار) بر بیان ژن فلاون سیتتاز ۱ (FNS I) و سیستم آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های ۲۱ روزه زیره سبز مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نیمه کمی بیان ژن فلاون سیتتاز ۱ بیانگر افزایش معنی‌دار آن در حضور غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار نقره نسبت به نمونه شاهد می‌باشد که با افزایش غلظت تا ۱۰۰ میکرومولار بیان آن کاهش می‌یابد. از طرف دیگر با افزایش غلظت این الیستور در محیط، محتوی فلاونوئید کل و آنتوسیانین و فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین محتوی پروتئین کل نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. در گیاهچه‌های تیمار شده با الیستور مس، بیان این ژن در غلظت‌های ۴ و ۸ میکرومولار بطور معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد افزایش و در غلظت ۱۶ میکرومولار بیان آن کاملاً مهار شد. در این شرایط محتوی فلاونوئید کل و آنتوسیانین نیز روند مشابهی را نشان دادند، به طوری که محتوی آنها در تیمار ۱۶ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. در مقابل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به ویژه کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز با افزایش غلظت این الیستور در محیط بطور قابل توجهی نسبت به شاهد افزایش یافته بود، درحالی‌که محتوی پروتئین کل بطور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. از مجموع نتایج چنین استنباط می‌شود که افزایش بیان ژن FNS I و محتوی فلاونوئید کل و آنتوسیانین، نتیجه اعمال تنش اکسیداتیو حاصل از جذب این عناصر و فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فلاونوئید.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۲۶۲۳۳۲۰۴، پست الکترونیکی: ariahi@icst.ac.ir

### مقدمه

تشکیل دهنده اسانس آلدئید کومینیک (*Al. cuminique*) یا کومینول (*Cuminol*) می‌باشد (۱). متابولیت‌های ثانوی گروه متنوعی از مولکولهای هستند که به سازگار شدن گیاه بخصوص در شرایط تنش‌های محیطی کمک می‌کنند (۳۸). از جمله این ترکیبات فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشند که علاوه بر نقش‌های ساختاری در بافت‌های محافظ، نقش آنها در جذب حشرات گرده افشان، عمل به عنوان سیگنال-

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* L. از خانواده چتریان (*Apiaceae*) سرشار از متابولیت‌های ثانوی است. عصاره زیره سبز دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی (۴۷)، ضد-باکتریایی (۴۴) و ضدسرطانی (۹ و ۴۰) می‌باشد. اسانس این گیاه شامل ترکیباتی نظیر تانن (*Tannin*)، رزین (*Resin*)، آلورن (*Aluron*)، سیمن (*Semin*)، فلاندرین (*Phellandrene*) و کارون (*Caron*) است. ماده اصلی

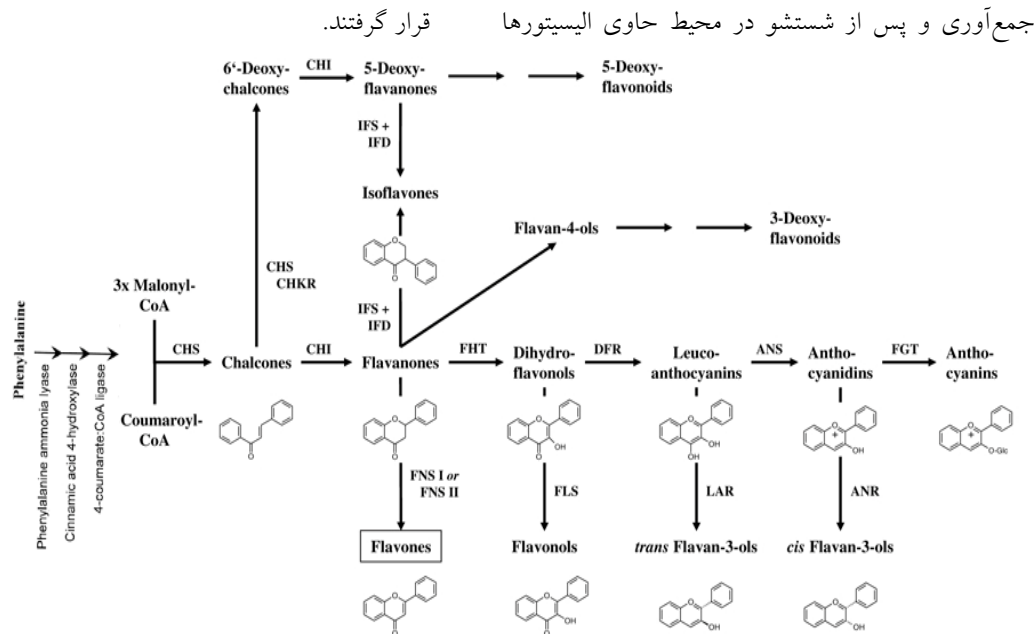
در تنش اکسیداتیو تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) باعث آسیب به DNA، پروتئین‌های ساختاری و لیپیدها می‌شوند و همچنین می‌توانند واکنش‌های زنجیره‌ای از کنترل خارج شده مثل واکنش‌های اکسیداسیون و پراکسیداسیون را برانگیزند (۶ و ۴۳). از مهمترین عواملی که تنش اکسیداتیو در گیاهان را القا می‌نمایند فلزات سنگین از قبیل کبالت، مس، آلومینیوم، نیکل و نقره می‌باشند (۲۱). گیاهان از طریق دو مسیر سیستم آنتی‌اکسیدان؛ آنزیمی (۴۶) و غیرآنزیمی (۲۱ و ۴۶) سمیت این رادیکال‌ها را کاهش می‌دهند. در شرایط کنترل شده از این فلزات می‌توان به‌عنوان محرک برای تولید متابولیت‌های ثانوی که ارزش دارویی بسیاری دارند مورد استفاده قرار داد. در برخی گونه‌های گیاهی ثابت شده است، که استرس‌های مختلف از قبیل فلزات سنگین بیان برخی ژن‌های درگیر در مسیر بیوستنز فلاونوئیدها را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۴، ۳۳). اما تاکنون، گزارشی مبنی بر بررسی بیان ژن فلاون سینتاز ۱ و ۲ تحت تأثیر استرس‌ها و یا ایستورها منتشر نشده است. در این مطالعه تأثیر یون نقره و مس به‌عنوان دو ایستور (Elicitor) غیر زنده بر سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی (سوپر-اکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز) و غیرآنزیمی (فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها) و محتوای پروتئین کل بررسی گردید. علاوه بر آن میزان بیان ژن فلاون سینتاز ۱ که در تولید فلاون‌ها نقش دارد در حضور غلظت‌های مختلف این ایستورها مورد آنالیز قرار گرفت.

### مواد و روشها

بذرهای زیره سبز (شرکت پاکان بذر اصفهان) در گلدان-های پلاستیکی (۱۵ × ۲۰ cm) محتوی مخلوطی از خاک رس، پرلیت و پیت ماس (۱:۱:۱) کشت و به گلخانه با دمای °C ۲۲±۲ و رطوبت نسبی ۷۰٪ منتقل و هر دو روز یکبار آبیاری شدند. پس از گذشت ۲۱ روز گیاهچه‌ها

های مولکولی در برهمکنش گیاهان با محیط و به‌عنوان مارکرهای بیولوژیکی در مطالعات کموتاکسی به اثبات رسیده است. بیشتر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های درگیر در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانوی شناسایی و تعیین توالی شده‌اند (۲۰). همزمان با بیوستنز فلاونوئیدها، ترکیبات متنوع دیگری از قبیل فلاون‌ها، ایزوفلاون‌ها و آنتوسیانین‌ها بواسطه فعالیت آنزیم‌های مسیر سنتز می‌شوند (۲۱). فلاون‌ها از مهمترین مشتقات فلاونوئیدها می‌باشند که نقش‌های ویژه‌ای در گیاهان و اهمیت‌های زیادی در درمان و سلامتی انسان دارند (۸ و ۲۹ و ۳۲). این ترکیبات در گیاهان برای حفاظت در مقابل نور ماورای بنفش، رنگ‌آمیزی گل‌ها، برهمکنش درون گونه‌ای و دفاع و استحکام گیاه لازم و ضروری هستند (۳۶). فلاون‌ها زیرگروهی از فلاونوئیدها هستند که دارای تنوع وسیعی می‌باشند (۳۱) و در حفاظت گیاهان در مقابل نور ماورای بنفش (۲۰) و در برهمکنش گیاهان با سایر میکروارگانیسم‌ها (۱۳ و ۲۴) و همچنین در درمان بیماری‌های انسانی اهمیت دارند. از مهمترین خواص درمانی آنها می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدقارچی، ضدالتهابی و ضدگرفتگی رگ‌ها اشاره نمود (۳۲). فلاون‌ها در مسیر بیوستنزی فلاونوئیدها از پیش ماده فلاونون‌ها سنتز می‌شوند.

در گیاهان مختلف مسیر بیوستنز فلاون‌ها تحت تأثیر دو سیستم آنزیمی مستقل؛ فلاون سینتاز ۱ (Flavone synthase I) و فلاون سینتاز ۲ (Flavone synthase II) کاتالیز می‌شود (شکل ۱) 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 گردید (۳۶) و برای اولین بار این آنزیم در خارج از خانواده چتریان در برنج (۲۸) از خانواده گرامینه گزارش شد. درحالی‌که در بیشتر گیاهان FNS از نوع ۲ بوده که یک باند غشایی سیتوکروم P<sub>450</sub> می‌باشد (۲۱).



شکل ۱- شمای کلی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها که در آن محصول آنزیم FNS (فلاون‌ها) در یک کادر مشخص شده است.

**آنالیز مولکولی:** به منظور بررسی بیان ژن فلاون سیتتاز، استخراج RNA کل از گیاهچه‌های فریز شده با استفاده از کیت RNX - Plus (شرکت سیناژن، شماره کاتالوگ: RN7713C) انجام شد. مراحل استخراج مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. لازم به ذکر است که کلیه مراحل کار در شرایط RNase free و بر روی یخ انجام گردید. برای این منظور، حدود ۵۰۰mg از بافت فریز شده، در حضور نیتروژن مایع ساییده و به میکروتیوب منتقل شد. سپس ۵۰۰µL از محلول RNX - Plus به آن افزوده و مخلوط کاملاً همگن گردید. مخلوط مذکور به مدت یک ساعت بر روی یخ انکوبه شد، سپس ۲۰۰µL کلروفورم به آن افزوده و بشدت تکان داده شد و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردید. سپس محلول روشن‌تر بی‌رنگ به میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید و به آرامی تکان داده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه انکوباسیون روی یخ، مطابق برنامه قبلی سانتریفیوژ انجام شد. در ادامه، فاز رویی حذف گردید و به رسوب سفید رنگ مقدار ۱ mL

**تهیه الیستورها:** برای آماده‌سازی الیستورهای نقره و مس، غلظت‌های ۰ (به‌عنوان شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیترات نقره (AgNO<sub>3</sub>) و غلظت‌های ۰ (به‌عنوان شاهد)، ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار سولفات مس (CuSO<sub>4</sub>) جداگانه در آب مقطر استریل تهیه شدند. گیاهچه‌های ۲۱ روزه زیره از گلدان خارج و پس از شستشو برای حذف خاک اضافی ریشه‌ها، کل گیاه در معرض غلظت‌های مختلف الیستورهای نقره و مس به ترتیب به مدت ۴ و ۱۶ ساعت در دمای آزمایشگاه و بر روی شیکر با دور ۱۳۰ rpm قرار گرفتند. پس از گذشت زمان مورد نظر، گیاهان تحت تیمار چندین مرتبه با آب مقطر استریل به منظور حذف الیستورهای سطحی شستشو و پس از آگیری تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۸۰ °C - نگهداری شدند. لازم به ذکر است که انتخاب زمان‌های اعمال تیمار بر اساس نتایج به‌دست آمده قبلی در آزمایشگاه بوده است. اعمال این الیستورها در زمان‌های مذکور بر مقدار مواد مؤثره گیاهان مختلف و همچنین بر بیان ژن‌های آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی آنها تأثیر مثبت داشتند (۲ و ۴).

آب دیونیزه استریل (RNase free) تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به تیوب‌ها اضافه شد. واکنش ساخت cDNA به مدت ۸۰ دقیقه در دمای ۴۲ °C انجام شد. در انتهای واکنش به منظور حذف اثر RT، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ °C قرار گرفتند. همچنین به منظور حذف آلودگی‌های اضافی RNA از آنزیم RNase A (۱) میکرولیتر، ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C استفاده شد. تکثیر ژن فلاون سینتاز ۱ و توبولین (به‌عنوان کنترل داخلی) با استفاده از کتابخانه cDNA و آنزیم Taq پلیمرز در حضور پرایمرهای اختصاصی که توالی آن در جدول ۱ آمده است، انجام شد. واکنش تکثیر این ژن‌ها شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه و ۳۰ سیکل تکثیر شامل (واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ °C بمدت یک دقیقه، اتصال پرایمرها برای تکثیر ژن فلاون سینتاز ۱ و توبولین بترتیب در دماهای ۵۱ °C و ۵۷ °C بمدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ °C بمدت یک دقیقه) و یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

اتانول ۷۵٪ افزوده و این‌بار بمدت ۸ دقیقه با دور rpm ۷۵۰۰ در دمای ۴ °C سانتریفیوژ انجام شد. فاز رویی دور ریخته شد و رسوب در دمای اتاق انکوبه گردید تا خشک شود. در نهایت به رسوب، ۳۰ μL آب تیمار شده با DEPC ۰/۱٪ اضافه گردید و تا زمان استفاده به فریزر ۸۰- انتقال یافت. در نهایت کیفیت RNA تخلص شده بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. در ادامه، از RNA استخراج شده کتابخانه cDNA ساخته شد.

به‌منظور ساخت cDNA ابتدا هفت میکرولیتر (حدود ۲ میکروگرم) از RNA کل به تیوب‌های ۰/۲ اضافه شد (کلیه مراحل ساخت cDNA روی یخ انجام شد). در ادامه پس از اضافه نمودن ۲ میکرولیتر پرایمر عمومی الیگو dT به تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C قرار گرفتند. پس از انتقال تیوب‌ها به روی یخ یک میکرولیتر آنزیم DNA پلی‌مراز وابسته به RNA (RNA Dependent DNA Polymerase, RT) (MMuLV) از شرکت فرمنتاز، مقدار ۲/۵ میکرولیتر بافر رونوشت RT (10X)، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۷۵ میکرولیتر RNase inhibitor، و در نهایت

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ژن فلاون سینتاز ۱ و توبولین و Tm و درصد GC هر کدام

نام پرایمر	توالی*	Tm (°C)	محتوای GC (%)
F- FNS I	5'-ATGGCTCCAACAACAATTACTG-3'	۶۴/۱	۴۰/۹
R- FNS I	5'-CTAAGCTAAAAATCCATCTGC-3'	۵۹/۲	۳۸/۱
F-Tubulin	5'-GCTTTCAACACCTTCTTCAGTG-3'	۶۳/۷	۴۵/۵
R-Tubulin	5'-CTTTCTCAGCTGAGATCACTGG-3'	۶۳/۳	۵۰

\* توالی مربوط به ژن فلاون سینتاز ۱ بر اساس توالی این ژن از گیاه زیره سبز با شماره دسترسی DQ683349.1 ثبت شده در Gene Bank و توالی پرایمرهای مربوط به توبولین بر اساس توالی این ژن از گیاه گندم با شماره دسترسی DQ435671.1 ثبت شده در Gene Bank طراحی و توسط شرکت MWG ساخته شدند.

کردن با ژن توبولین تکثیر شده مربوطه، توسط نرم‌افزار Gene tools انجام شد (۷).

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئیدی: برای اندازه‌گیری محتوای فلاونوئیدی از روش Krizek (۱۹۹۸) استفاده شد، به این منظور مقدار ۰/۱ گرم از برگ گیاهچه‌های تیمار شده با الیستورهای مختلف را در اتانول اسیدی (شامل اتانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۹۹ به ۱) خوب سائیده و

به‌منظور بررسی میزان بیان ژن فلاون سینتاز ۱ در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد، مقدار مساوی از محصول PCR هر کدام از ژن‌ها (فلاون سینتاز ۱ و توبولین) بر روی ژل آگارز ۱٪ بصورت جداگانه بارگذاری شدند. مقایسه بیان این ژن در غلظت‌های مختلف، از روش نیمه کمی RT-PCR و از روی شدت باند تکثیر شده که بر روی ژل آگارز یک درصد تفکیک شدند پس از نرمالیز

**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):** سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب  $H_2O_2$  در  $240\text{ nm}$  انجام شد. میزان  $H_2O_2$  موجود در مخلوط واکنش با استفاده از ضریب خاموشی  $\epsilon = 0.28\text{ cm}^{-1}\text{ mM}^{-1}$  محاسبه شد. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در  $100$  میکرولیتر عصاره در مدت زمان یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مول آب اکسیژنه را در یک دقیقه تجزیه می‌کند (۱۵).

**سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD):** سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب تراگایاکل تشکیل شده از گایاکل در مدت زمان  $3$  دقیقه در طول موج  $470\text{ nm}$  انجام شد (۳۵). ضریب خاموشی تراگایاکل  $\epsilon = 25.5\text{ cm}^{-1}\text{ mM}^{-1}$  می‌باشد.

**سنجش مقدار پروتئین:** برای اندازه‌گیری مقدار کمی پروتئین‌های محلول در گیاهچه‌های تیمار شده از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه با استفاده از رسم منحنی استاندارد محاسبه گردید (۱۲).

**آنالیز آماری:** تمامی آزمایش‌ها با  $3$  تکرار مستقل و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS توسط آزمون دانکن (Duncan test) و با در نظر گرفتن سطح اطمینان  $P \leq 0.05$  مورد تجزیه واریانس یک عاملی (One way ANOVA) قرار گرفتند. نتایج بصورت میانگین داده‌ها  $\pm$  انحراف معیار (SD) گزارش شدند.

## نتایج

**بررسی بیان ژن فلاون سینتاز ۱ در حضور الیستورهای مختلف:** کیفیت RNA استخراج شده با تفکیک باندهای rRNA بر روی ژل آگارز  $1\%$  انجام شد. طبق شکل ۲، دو

عصاره حاصل به مدت ده دقیقه با دور  $3600\text{ rpm}$  سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جدا و به مدت  $10$  دقیقه در آب گرم  $80^\circ\text{C}$  قرار گرفت. سپس میزان جذب عصاره توسط اسپکتروفتومتر (Varian Cary 50, Australia) در سه طول موج  $270$ ،  $300$  و  $330$  نانومتر اندازه‌گیری شد و ضریب خاموشی  $\epsilon = 3300\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  برای محاسبه محتوی فلاونوئید کل مورد استفاده قرار گرفت و بر حسب  $\mu\text{M/gfw}$  گزارش گردید (۲۶).

**اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین:** اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین با استفاده از روش Krizek (۱۹۹۳) انجام شد. به این منظور مقدار  $0.2$  گرم برگ در متانول اسیدی (شامل متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت  $99$  به  $1$ ) سائیده شد و پس از سانتریفیوژ (به مدت ده دقیقه با دور  $3600\text{ rpm}$ ) محلول رویی به مدت یک شب در تاریکی قرار گرفت. میزان جذب نمونه‌ها در  $550$  نانومتر اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی  $\epsilon = 3300\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  بوده و محتوای آنتوسیانین بر حسب  $\mu\text{M/gfw}$  گزارش گردید (۲۵).

**عصاره‌گیری و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان:** برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مقدار نیم گرم از بافت تر در بافر پتاسیم فسفات  $50$  میلی‌مولار (pH برابر  $7/5$ ) حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVP)  $1\%$ ، EDTA  $1$  میلی‌مولار و PMSF  $1$  مولار سائیده شد. محلول همگن حاصل به مدت  $15$  دقیقه با دور  $18000\text{ rpm}$  در دمای  $4^\circ\text{C}$  سانتریفیوژ (مدل: NAPCO 2028R) شد (۱۸).

**سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD):** برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) استفاده گردید. یک واحد فعالیت سوپراکسیددیسموتاز به‌عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار  $100\%$  احیای نوری نیتروبلوترازولیوم می‌گردد (۱۷).

بیان این ژن متوقف گردیده و باندی در حضور این تیمار بر روی ژل مشاهده نشد (شکل ۴، B).

**اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل، آنتوسیانین و پروتئین کل:** همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، محتوای فلاونوئید کل گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۲۵ میکرومولار نقره مشابه نمونه شاهد می‌باشد ولی با افزایش غلظت الیستور در محیط، محتوای فلاونوئید کل افزایش می‌یابد. به طوری که این افزایش در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار است. درحالی‌که تیمار گیاهچه‌ها با الیستور مس نشان‌دهنده افزایش محتوای فلاونوئید کل در غلظت‌های ۴ و ۸ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد است. با افزایش غلظت الیستور در محیط، محتوای فلاونوئید کل کاهش می‌یابد، به طوری که با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد (جدول ۳). محتوای آنتوسیانین گیاهچه‌های تیمار شده با الیستور نقره (بجز غلظت ۲۵ میکرومولار که به صورت معنی‌داری در مقایسه با گیاه شاهد کاهش یافته است) با افزایش غلظت در محیط به صورت معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت (جدول ۲). تولید آنتوسیانین در گیاهچه‌های تیمار شده با تمامی غلظت‌های مورد استفاده الیستور مس به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش پیدا کرد و بیشترین مقدار این متابولیت در غلظت ۸ میکرومولار مشاهده شد (جدول ۳).

باند مربوط به rRNA ۲۸S و ۱۸S نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA تخلیص شده و دست نخورده بودن آن است.

از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای oligo dT و آنزیم RT کتابخانه cDNA مربوط به هر نمونه ساخته شد. از cDNA ساخته شده در حضور پرایمرهای اختصاصی عمل تکثیر انجام و ژن FNS1 و توبولین تکثیر شدند. لازم به ذکر است که دمای مناسب اتصال پرایمرها با استفاده از گرادیان دمایی برای ژن FNS I، ۵۱ °C و برای ژن توبولین ۵۷ °C تعیین شد و تعداد سیکل PCR برای هر دو ژن برابر ۳۰ بود. مطابق شکل ۳ (A و C) قطعه تکثیر شده FNS I باندی معادل ۱۰۹۱ bp و برای ژن توبولین (شکل B و D) باندی تقریباً معادل ۷۰۰ bp بر روی ژل مشاهده شد.

**آنالیز نیمه کمی بیان ژن FNS I:** همانطور که در شکل ۴، A قابل مشاهده است میزان بیان ژن FNS I در حضور غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار الیستور نقره به طور معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است و با افزایش غلظت تا ۱۰۰ میکرومولار میزان بیان این ژن نسبت به گیاه شاهد کاهش پیدا کرده است که در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. از طرف دیگر، میزان افزایش بیان این ژن در گیاهچه‌های تیمار شده با الیستور مس در حضور دو غلظت ۴ و ۸ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار است. درحالی‌که در تیمار با غلظت ۱۶ میکرومولار

جدول ۲- محتوای فلاونوئید کل، آنتوسیانین و پروتئین کل در گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف الیستور نقره بعد از ۴ ساعت از

اعمال تیمار

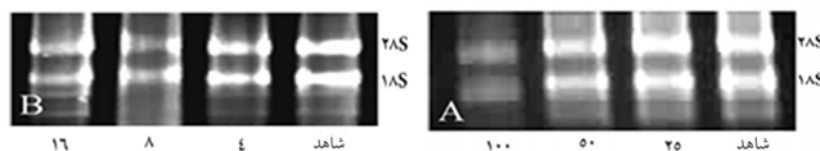
غلظت نقره ( $\mu\text{M}$ )	محتوای فلاونوئید کل ( $\mu\text{M/g}$ ) (fw)	محتوای آنتوسیانین ( $\mu\text{M/g}$ ) (fw)	محتوای پروتئین کل (mg/g fw)
۰	۱۳۳۷/۰۹±۱۴/۲۵ <sup>b</sup>	۰/۲۰۴±۰ <sup>c</sup>	۱/۸۸±۰/۰۱ <sup>d</sup>
۲۵	۱۲۸۹/۰۶±۱۵/۳۲ <sup>b</sup>	۰/۱۷۸±۰ <sup>d</sup>	۲/۰±۰/۰۳ <sup>c</sup>
۵۰	۱۳۶۳/۲۶±۱۸/۱۱ <sup>ab</sup>	۰/۲۲۱±۰ <sup>b</sup>	۲/۲۳±۰/۰۲ <sup>a</sup>
۱۰۰	۱۴۴۴/۴۰±۱۲/۲۷ <sup>a</sup>	۰/۲۶۹±۰ <sup>a</sup>	۲/۱۸±۰ <sup>b</sup>

تمامی آزمایشات با ۳ تکرار مستقل انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان  $P \leq 0.05$  مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفتند. در هر ستون حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵ درصد است.

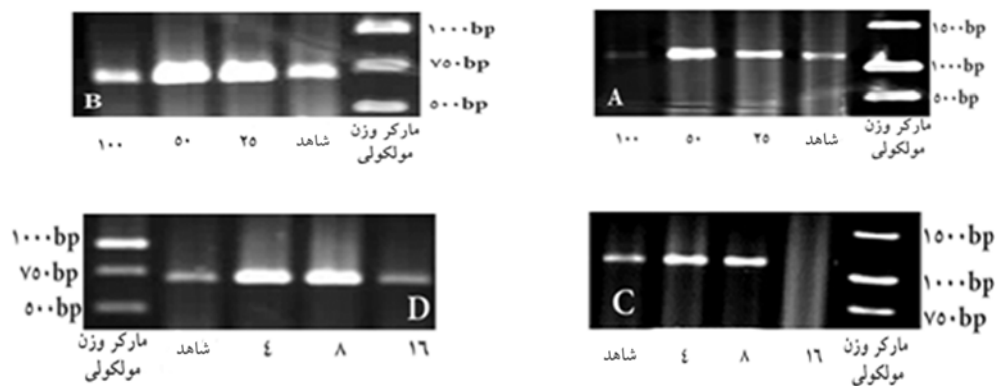
جدول ۳- محتوای فلاونوئید کل، آنتوسیانین و پروتئین کل در گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف الیستور مس بعد از ۱۶ ساعت از اعمال تیمار

غلظت مس ( $\mu\text{M}$ )	محتوای فلاونوئید کل ( $\mu\text{M/g fw}$ )	محتوای آنتوسیانین ( $\mu\text{M/g fw}$ )	محتوای پروتئین کل ( $\text{mg/g fw}$ )
۰	$1014/30 \pm 6/2^b$	$0/149 \pm 0^d$	$1/91 \pm 0^a$
۴	$1239/20 \pm 27/05^a$	$0/268 \pm 0^b$	$0/81 \pm 0/01^b$
۸	$1211/60 \pm 20/29^a$	$0/278 \pm 0^a$	$0/71 \pm 0/01^c$
۱۶	$1012/30 \pm 22/61^b$	$0/170 \pm 0^c$	$0/61 \pm 0^d$

تمامی آزمایشات با ۳ تکرار مستقل انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان  $P \leq 0.05$  مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفتند. در هر ستون حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵ درصد است.



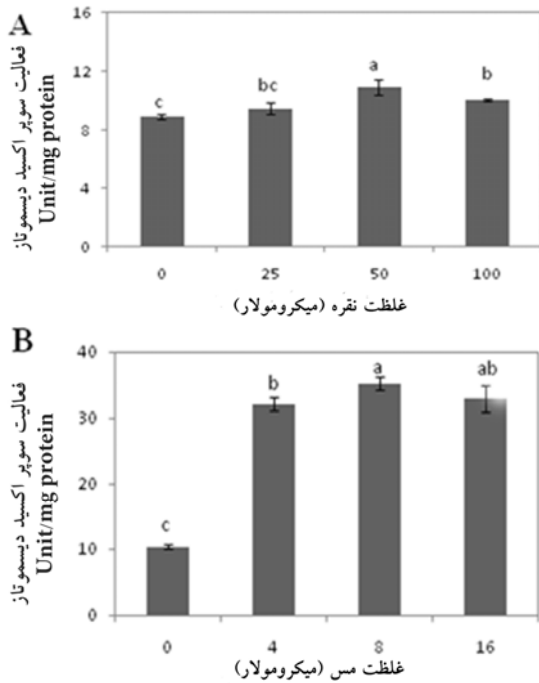
شکل ۲- RNA کل استخراج شده از نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف الیستور نقره (A) و مس (B) در ژل‌ها، دو باند مربوط به ۲۸S و ۱۸S rRNA، به وضوح قابل مشاهده می‌باشند.



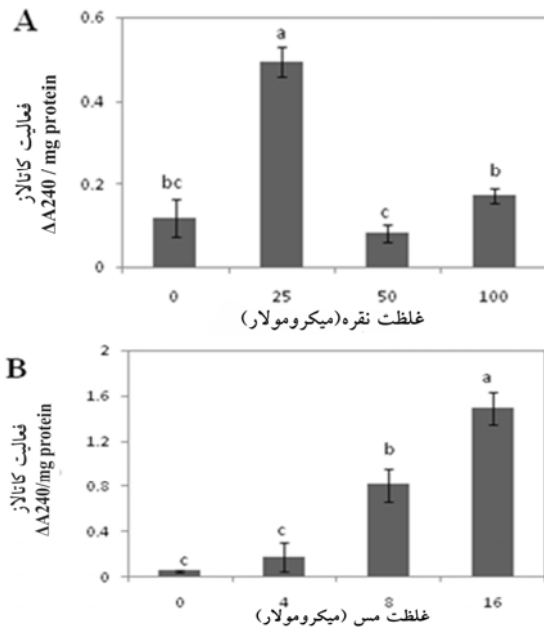
شکل ۳- نمونه‌ای از ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن FNS I (A) و ژن توبولین (B) در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف (میکرومولار) الیستور نقره و تکثیر ژن FNS I (C) و ژن توبولین (D) در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف (میکرومولار) الیستور مس. قطعه تکثیر شده از ژن FNS I، باندی معادل ۱۰۹۱ bp و برای ژن توبولین باندی تقریباً معادل ۷۰۰bp روی ژل در کنار باند مربوط به مارکر وزن مولکولی ظاهر گردید.

میکرومولار مشاهده گردید (جدول ۲). درحالی‌که در حضور الیستور مس این روند کاهشی بود و با افزایش غلظت این الیستور در محیط، غلظت پروتئین کل بطور قابل توجهی کاهش یافت (جدول ۳).

از طرف دیگر، مقدار پروتئین کل گیاهچه‌ها در تیمار با تمامی غلظت‌های مورد استفاده الیستور نقره، نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌داد. به‌طوری‌که بیشترین افزایش در مقدار پروتئین در تیمار با غلظت ۵۰



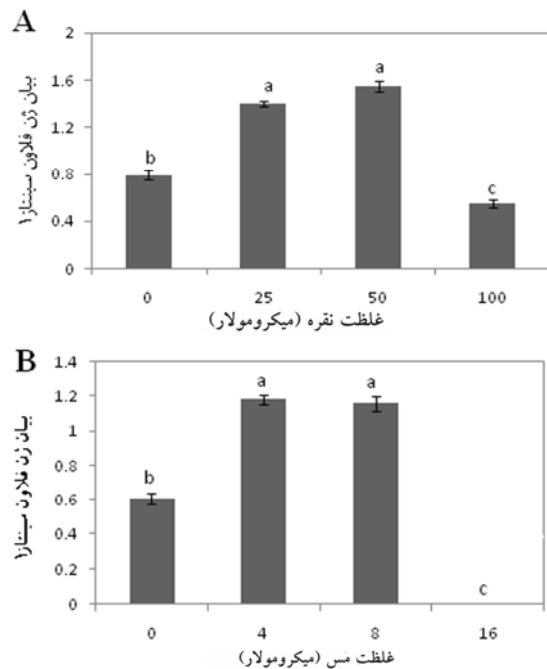
شکل ۵- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف الیستورهای نقره (A) و مس (B) بر میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز گیاهچه‌های تیمار شده. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد است.



شکل ۶- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف الیستورهای نقره (A) و مس (B) بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

اثر الیستورهای مختلف بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز: با توجه به شکل ۵، A فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با افزایش غلظت الیستور نقره در محیط نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. درحالی‌که در غلظت ۲۵ میکرومولار تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم در مقایسه با گیاه شاهد مشاهده نشد، در تیمار گیاهچه‌ها با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار افزایش فعالیت این آنزیم در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود و بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار با غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده گردید.

فعالیت آنزیم SOD، در گیاهچه‌های تیمار شده با تمامی غلظت‌های مورد استفاده از الیستور مس نیز نسبت به نمونه شاهد بصورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۵، B) و بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در غلظت ۸ میکرومولار مشاهده گردید.



شکل ۷- بررسی نیمه کمی بیان ژن FNS I در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف الیستورهای نقره (A) و مس (B). حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد است.



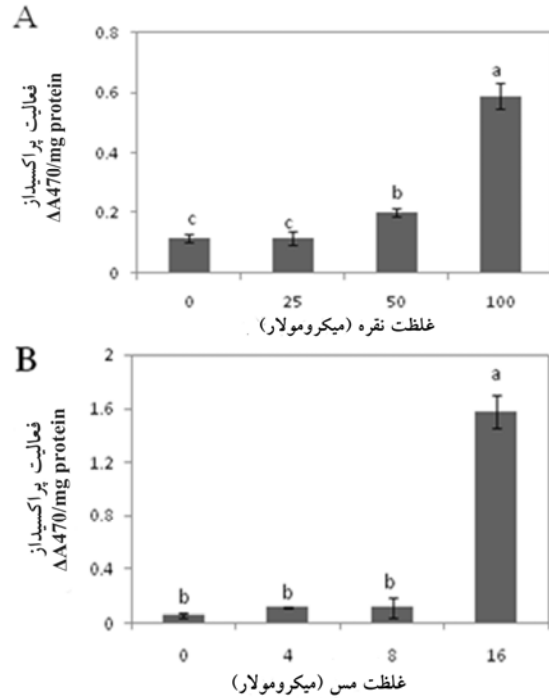
تیمار ۴ میکرومولار) و نیز نسبت به هم داشتند (شکل ۶، B).

اثر الیستورهای مختلف بر فعالیت آنزیم پراکسیداز: همانطور که در شکل ۷، A قابل مشاهده است غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار الیستور نقره باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با نمونه شاهد و تیمار شده با غلظت ۲۵ میکرومولار گردید. بیشترین افزایش فعالیت این آنزیم در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری در مقایسه با سایر غلظت‌ها داشت. از طرف دیگر فعالیت این آنزیم تنها در غلظت ۱۶ میکرومولار الیستور مس افزایش معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد اما سایر غلظت‌های مورد استفاده تفاوت معنی‌داری باهم و با گروه شاهد نداشتند.

### بحث و نتیجه‌گیری

زیره سبز از خانواده چتریان و سرشار از متابولیت‌های ثانوی فلاونوئیدی از قبیل فلاون‌ها می‌باشد (۳). یکی از عوامل ایجاد تنش محیطی در گیاهان، حضور فلزات سنگین در محیط رویش آنهاست (۲۳ و ۴۶) که سبب تحریک سیستم دفاعی گیاهان می‌شوند. اغلب فلزات سنگین با القای تولید ROS ها باعث آسیب به گیاه و در نتیجه سبب کند شدن و یا مهار رشد آنها می‌شوند (۳۹). گیاهان با دو مکانیسم دفاعی آنزیمی شامل: سوپراکسید-دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز (۴۶) و غیر آنزیمی شامل: آسکوربیک اسید، کارتنوئیدها، ویتامین E، پلی‌آمین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها (۲۳ و ۴۶) ROSها را جاروب نموده و مانع آسیب رساندن آنها به پروتئین‌ها، غشاء و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (۴۸).

مطالعات انجام شده، نشان داد که در حضور فلزات سنگین نه تنها ترکیبات خاص (آنتی‌اکسیدان‌ها) بلکه ژن‌های درگیر



شکل ۷- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف الیستورهای نقره (A) و مس (B) بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

اثر الیستورهای نقره و مس بر فعالیت آنزیم کاتالاز: همان‌طور که در شکل ۶، A مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار با غلظت ۲۵ میکرومولار الیستور نقره بصورت معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان می‌دهد ولی با افزایش غلظت الیستور در محیط (در تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) فعالیت آنزیم کاهش یافته است که در سطح ۵ درصد نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار است. کمترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده گردید اما کاهش فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار و افزایش جزئی آن در غلظت ۱۰۰ میکرومولار اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت.

در مقابل، الیستور مس باعث افزایش منظم فعالیت این آنزیم در هر سه غلظت مورد استفاده گردید. به‌طوری‌که با افزایش غلظت الیستور در محیط، فعالیت کاتالاز در کلیه تیمارها افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد (به غیر از

محتوای فلاونوئیدهای کل و آنتوسیانین همزمان با افزایش بیان ژن فلاون سینتاز ۱، پاسخی برای کاهش اثرات تنش ناشی از جذب این فلز می‌باشد. نکته قابل توجه، کاهش بیان ژن FNS 1 در حضور بالاترین غلظت مورد استفاده (۱۰۰ میکرومولار) می‌باشد، درحالی‌که محتوای فلاونوئیدها و آنتوسیانین در حضور این تیمار افزایش یافته است، این نتیجه احتمالاً بیانگر بیان بیشتر ژن‌ها و یا فعال‌تر شدن آنزیم‌های دیگر درگیر در این مسیر بیوسنتزی می‌باشد.

برای تأیید اعمال تنش اکسیداتیو در این شرایط، فعالیت برخی از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز نیز مورد سنجش قرار گرفت. افزایش فعالیت آنزیم SOD (که نقش کلیدی در کاتالیز واکنش تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن دارد (۲۲)) و همچنین آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز (که نقش مکمل در جاروب کردن و پاکسازی  $H_2O_2$  دارند (۱۴)) در گیاهچه‌های تیمار شده با الیستور نقره نسبت به گیاه شاهد بیانگر اعمال تنش توسط این عنصر در گیاه می‌باشد. از طرف دیگر افزایش محتوای پروتئین‌های محلول در گیاهچه‌های تیمار شده نسبت به گروه شاهد می‌تواند به دلیل افزایش مقدار آنزیم‌های تعدیل‌کننده شرایط تنش از قبیل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود، افزایش محتوای 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 FNS I در گیاهچه‌های تحت تیمار این الیستور اشاره نمود. البته تاکنون افزایش بیان برخی از ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها از قبیل تیروزین آمینو ترانسفراز (۴) در گیاه بادرنجبویه تحت تیمار با این الیستور گزارش شده است. نقره در محیط کشت گیاهی به‌عنوان یک بازدارنده قوی اتیلن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). اثرات مهاری اتیلن در غلظت-

در بیان آنزیم‌های کاتالیز کننده آنها نیز فعال می‌شوند (۴۱) و (۴۲). از این رو در این مطالعه با توجه به اهمیت آنتی-اکسیدانی فلاون‌ها، بیان ژن فلاون سینتاز ۱ در مسیر بیوسنتز این ترکیبات در گیاهچه‌های تیمار شده با الیستورهای مس و نقره به روش نیمه کمی بررسی شد. از آنجایی‌که پروتئین‌ها فراوان‌ترین و تخصصی‌ترین ماکرومولکول‌های زیستی محسوب می‌شوند، اثر الیستورهای مذکور بر میزان بیان پروتئین کل نیز مورد سنجش قرار گرفت.

نقره با چگالی  $10490 \text{ kg/m}^3$  از گروه فلزات سنگین است (۱۱) و اعمال تنش اکسیداتیو توسط این عناصر پس از جذب توسط گیاهان، ثابت شده است (۲۳ و ۴۶). اهمیت فلاونوئیدها در مقاومت به تنش‌های گوناگونی از قبیل گرما، سرما، خشکی، اشعه ماورا بنفش و فلزات سنگین به اثبات رسیده است (۴۵). همچنین، آنتوسیانین‌ها که در انتهای مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها ساخته می‌شوند در گیاهان نقش حفاظتی در برابر اشعه ماورای بنفش، خشکی، سرما و فلزات سنگین بر عهده دارند (۲۳ و ۴۶). کاهش اثرات تنش توسط فلاونوئیدها را به اتصال ترکیبات فنولیک با یون‌های فلزات سنگین مرتبط می‌دانند (۱۰). همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت الیستور نقره در محیط، محتوای فلاونوئید کل در گیاهچه‌های تیمار شده بطور معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافته است. علاوه بر آن، محتوای آنتوسیانین نیز (بجز کاهش معنی‌دار آن در غلظت ۲۵ میکرومولار) روندی مشابه فلاونوئید کل را نشان می‌دهد. فلاونوئیدها، فلاون‌ها و آنتوسیانین‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند و ثابت شده است که میزان تولید آنها و همچنین بیان ژن مرتبط با سنتز آنها در شرایط اعمال تنش افزایش می‌یابد (۲۳ و ۴۶). همانطور که در شکل ۴، A مشاهده می‌شود بیان ژن FNS I در حضور غلظت‌های مختلف این الیستور تا ۵۰ میکرومولار بطور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است. از این رو پیشنهاد می‌شود، افزایش

محتوای فلاونوئید کل در تیمار با این غلظت با کاهش بیان برخی ژن‌ها از قبیل FNS I مرتبط است. علاوه بر آن، محتوای پروتئین کل گیاهچه‌ها در تیمار با غلظت‌های مختلف این الیستور به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش می‌یابد و با افزایش غلظت، این کاهش بارزتر می‌شود. این مشاهدات احتمالاً نتیجه تأثیر منفی ROS‌های تولید شده بر ماکرومولکول‌های زیستی است (۴۸). از طرف دیگر بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بیانگر فعالیت شدید آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد که در تمامی غلظت‌های مورد استفاده به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. افزایش تولید  $H_2O_2$  در نتیجه افزایش فعالیت این آنزیم، با افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز به‌ویژه در تیمار با غلظت ۱۶ میکرومولار همراه است، در حالیکه محتوای فلاونوئید کل و آنتوسیانین کاهش معنی‌داری را نسبت به غلظت‌های کمتر الیستور نشان می‌دهند. این نتایج همچنین می‌تواند بیانگر نقش مکملی سیستم دفاع آنزیمی و غیر آنزیمی باشد.

#### نتیجه‌گیری نهایی

از مجموع نتایج چنین استنباط می‌شود که حضور یون مس و نقره در محیط باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده، به‌طوری‌که گیاه با افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوستنز فلاونوئیدها و افزایش محتوای فلاونوئیدها و آنتوسیانین سعی در کاهش تنش‌های حاصل دارد. از طرف دیگر، الیستور مس بر خلاف الیستور نقره در غلظت‌های اعمال شده در زمان تیمار اثرات منفی بر گیاه داشته است که این تئوری با کاهش معنی‌دار محتوای پروتئین کل و عدم بیان ژن FNS I (۱۶ میکرومولار) و همچنین فعالیت بالای SOD به وضوح قابل مشاهده است. با توجه به نتایج بدست آمده، این الیستورها (به‌ویژه در غلظت‌های پایین) می‌توانند برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش دارویی بالا از قبیل فلاون‌ها مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به بیان پایین ژن‌های درگیر در بیوستنز متابولیت‌های

های بالا، بر مهار سنتز متابولیت‌های ثانوی و از طرف دیگر اثرات تحریکی آن بر افزایش متابولیت‌های ثانوی در غلظت‌های کم به اثبات رسیده است (۳۶). بنابراین می‌توان اثرات مثبت نقره بر افزایش محتوای فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها را به اثر بازدارندگی آن بر فعالیت اتیلن نسبت داد (۴۹).

مس یک عنصر کم‌مصرف ضروری برای رشد گیاهان است و کمترین فراوانی را به‌عنوان ریزمغذی پس از نیکل و مولیبدن دارد (۳۱). این عنصر به‌عنوان کوفاکتور برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها از قبیل مس/ روی سوپراکسید دیسموتازها، سیتوکروم c اکسیداز، گیرنده اتیلین، آسکوربات اکسیداز و دی‌آمین اکسیداز می‌باشد. مس در سوخت و ساز قند و ازت و همچنین در بیوستنز اتیلن به‌عنوان یک هورمون رشد نقش مهمی دارد (۳۰). با وجود اهمیت مس در رشد و نمو گیاهی، زمانیکه مس به مقدار اضافی در اختیار گیاه قرار گیرد باعث ایجاد علائم سمیت در گیاه می‌شود (۵). رشد گیاهان در حضور غلظت‌های بالای مس به طور معمول با کاهش بیومس، کاهش میزان کلروفیل، تغییر و تبدیل ساختار کلروپلاست در برگ‌ها همراه می‌باشد (۳۷ و ۴۸). از طرف دیگر، در این شرایط پراکسیداسیون لیپیدها، کاهش محتوای لیپیدها و تغییر در ترکیب اسیدهای چرب غشای تیلاکوئید مشاهده می‌شود که منجر به تغییر سیالیت غشای تیلاکوئید می‌گردد (۴۸). از آنجایی که مس از گروه فلزات سنگین است جذب بیش از نیاز آن به گیاه نوعی تنش قلمداد می‌شود (۴۱). از این رو افزایش محتوای فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و همچنین افزایش بیان آنزیم FNS I در مسیر بیوستنزی فلاون‌ها تا غلظت ۸ میکرومولار می‌تواند دلیل دیگری بر فعال شدن مسیر بیوستنزی فلاونوئیدها در پاسخ به تنش حاصل از این فلز باشد. در حالیکه، با افزایش غلظت الیستور تا ۱۶ میکرومولار، بیان این ژن بشدت کاهش یافته و غیرقابل سنجش می‌شود و همچنین محتوای فلاونوئید کل و آنتوسیانین کاهش می‌یابد. بنظر می‌رسد کاهش

### سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان با قرارداد شماره ۱/۴۰۳۶ انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از مسئولان محترم آن دانشگاه اعلام می‌دارند.

ثانوی می‌توان از این الیسیتورها برای افزایش بیان ژن‌های درگیر در سنتز آنها استفاده نمود تا پس از تکثیر و کلون نمودن 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 نمود. بر اساس نتایج، پیشنهاد می‌شود که غلظت ۲۵ و ۵۰ میکرومولار الیسیتور نقره و غلظت‌های ۴ و ۸ میکرومولار الیسیتور مس برای رسیدن به این اهداف مناسب می‌باشند.

### منابع

۱. زرگری، ع. ۱۳۷۶. گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران. جلد دوم، ص: ۷۶۶-۷۶۵.
۲. شهبازی، ع و ریاحی مدوار، ع. ۱۳۹۰. بررسی اثر الیسیتورهای روی و مس بر مقدار فورسکولین و بیان ژن DXR در کشت بافت گیاه حسن یوسف، پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته.
۳. کافی م. راشد محصل، م. ح. کوچکی، ع. و ملافیلابی، ع. ۱۳۸۱. زیره سبز فناوری تولید و فرآوری. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
۴. نصیری بزنجان، م، ریاحی مدوار، ع و باقی‌زاده، ا. ۱۳۹۰. القای تولید ماده موثره (رزمارینیک اسید) در گیاه بادرنجبویه در مرحله گیاهیچه و بررسی بیان آنزیم تیروزین آمینو ترانسفراز، پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته.
5. Adriano, D.C. 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments; Biochemistry, Bioavailability and Risk of Metals. Springer-Verlag. New York.
6. Ajith, TA. and Janardhanan, K.K. 2007. Indian medicinal mushroom as a source of antioxidant and antitumor agents. J. Clin. Biochem. Nutr. 40(3), 157-62.
7. Al-Bader, M.D. 2006. Estrogen receptors alpha and beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real time PCR and western blotting. Reprod. Biol. Endocrinol. 28, 4-13.
8. Arts, I.C.W. and Hollman, P.C.H. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. Am. J. Clin. Nutr. 81, 317-325.
9. Aruna, K. and Sivaramakrishnan, V.M. 1992. Anticarcinogenic effects of some Indian plant products. Food Chem. Toxicol. 30(11), 6-953.
10. Babu, T.S., Akhtar, T.A., Lampi, M.A., Tripuranthakam, S., Dixon, D.G. and Greenberg, B.M. (2003). Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: Implication of reactive oxygen species as common signals. Plant Cell Physiol. 44, 1320-1329.
11. Bais, H.P., Sudha, G. and Ravishankar G.A. 2000. Effect of Putrescine and silver nitrate on shoot multiplication and *in vitro* flowering in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. J. Plant Growth Regul. 19, 238-248.
12. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-day binding. Anal, Biochem. 72, 248-254.
13. Brundrett, M.C. 2002. Convolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytol. 154, 275-304.
14. Costa, H., Gallego, S.M. and Tomar, M.L. 2002. Effects of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons, Plant sci. 162, 939-945.
15. Dhindsa, R.S. and Motowe, W. 1981. Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. J. Exp. Bot. 32, 79-91.
16. Forkmann, G. 1980. Genetics of flavonoids, in the flavonoids, advances in research since,

- Harborne, J.B., Ed., Chapman & Hall, London, 1988: 399.
17. Giannopolitis, C. and Ries, S. 1977. Superoxid desmutase. I. Occurrence in higher plant. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
  18. Gong, Y., Toivonen, P.M., Lau, O.L. and Wiersma, A.P. 2001. Antioxidant system level in "Braeburn" apple is related in its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sinica.* 42, 259-264.
  19. Hansch, R. and Mendel, R.R. 2009. physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Cr, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. plant boil.* 12, 259-266.
  20. Harborne, J.B. and Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 55, 481-504.
  21. Heller, W. and Forkmann, G. 1986. Biosynthesis of flavonoids, in *The Flavonoids: Advances in Research*, Harborne, J.B., Ed., Chapman & Hall, London, 1994, 499.
  22. Hollosy, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells, *Micron*, 33(2), 179-197,
  23. Hsieh, T.H., Lee, J.T., Charng, Y.Y. and Chan, M.T. 2002. How to define resistance to water deficit stress? *Plant physiol.* 130, 618-626.
  24. Kistner, C. and Parniske, M. 2002. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis, *Trends Plant Sci.* 7, 511-518.
  25. Krizek, D.T., Kramer, G.F. and Upadyaya, A. 1993. Mirecki, R. M. UV-B response of cucumber seedling grown- under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Physiol. Plant.* 88, 350-358.
  26. Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv, New Red Fire Lettuce. *Physiol. Plant.* 103, 1-7.
  27. Kupper, H., Götz, B., Mijovilovich, A., Frithjof, C. and Wolfram Meyer-Klaucke, 2009. Complication and Toxicity of Copper in Higher Plants. *Plant Physiol.* 151, 702-714.
  28. Lee, Y.J. Kim, J.H. Kim, B.G. Lim, Y. & Ahn, J.H. 2007. Characterization of flavone synthase I from rice, *BMB reports.* 143-701.
  29. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C. and Jimenez, L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-747.
  30. Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, Academic Press, London.
  31. Martens, S., Forkmann G., Matern, U. and Lukac, R. 2001. Cloning of parsley flavone synthase I. *Phytochemistry.* 58, 43-46.
  32. Middleton, E., Kandaswami, J.C. and Theoharides, T.C. 2000. flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.* 6, 73-75.
  33. Morales L.O. Tegelberg R., Brosché M., Keinänen M., Lindfors A., Aphalo P.J., 2010. Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. *Tree Physiol.* 30, 923-934.
  34. Pan, Z., Wang, H. and Zhong, J. 2000. Scale up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene, *Enzyme Microb. Technol.* 27, 714-723.
  35. Plewa, M.J., Smith, S.R. and Wanger, E.D. 1991. Diethyl dithio carbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutat. Res.* 247, 57-64.
  36. Prabhat, K. 2007. Metabolic engineering of yeast for the production of plant secondary metabolites, *Research Exercise Summary.*
  37. Quartacci, M.F., Pinzino, C., Sgherri, C.L.M., Dalla, Vecchia, F. and Navari-Izzo, F. 2000. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluid-ity of PSII-enriched membranes in Wheat. *Physiol. Plant.* 108, 87-93.
  38. Ramawat K.G. and Merillon, J.M. 1999. *Biotechnology; Secondary Metabolites.* Science Publisher, NH, USA.
  39. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152.
  40. Sachin, B.S., Sharma, S.C., Sethi, S., Tasduq, S.A. and Tikoo, M.K. 2007. Herbal modulation of drug bioavailability: enhancement of rifampicin levels in plasma by herbal products and a flavonoid glycoside derived from cyminum. *Phytother. Res.* 21(2), 157-63.
  41. Sakihama, Y. and Yamasaki, H. 2002. Lipid peroxidation induced by phenolics in conjunction with aluminum ions. *Biol. Plant.* 45, 249.
  42. Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. and Ravishankar, G.A. 2006. Different biotic

- and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochem.* 41, 50 – 60.
43. Shun, Y.M., Wen, Y.H., Yong, C.Y. and Jian, G.S. 2003. Two benzyl dihydroflavones from *phellinus igniarius*. *Chinese Chem. Lett.* 14(8), 810-13.
44. Srivastava, K.C. 1989. Extracts from two frequently consumed spices-cumin
45. Stapleton, A.E. 1999. Ultraviolet radiation and plants: burning questions, *Plant Cell*, 4, 1353.
46. Tang, L., Kwon, S.Y., Kim, S.H., Kim, J.S., Choi, J.S., Cho, K.Y., Sung, C.K., Kwak, S.S. and Lee, H.S. 2006. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature, *Plant Cell Rep.* 25(12), 1380-1386.
47. Thippeswamy, N.B. and Akhilender N.K. 2005. Antioxidant potency of cumin varieties (cuminblack cumin and bitter cumin) on antioxidant systems. *Eur. Food Res. Technol.* 220(5-6), 472-476.
48. Walker, C.D., Webl, Robson A.D. and Graham R.D. (Eds.) 1981. Copper in soils and plants. Academic Press. 189-212.
49. Zhang, Y. 2004. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action, *Mutat. Res.* 555(1-2), 173-190.

## Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavone synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* L. endemic to Iran

Yousefi K., Riahi-Madvar A. and Baghizadeh A.

<sup>1</sup> Biotechnology Dept., Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Biotechnology Dept., Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

### Abstract

In this study, effect of different concentrations of AgNO<sub>3</sub> (4 hours after treatment) and CuSO<sub>4</sub> (16 hours after treatment) elicitors were investigated on gene expression of FNS I and antioxidant system in 21-day *Cuminum cyminum* seedlings. Semi-quantitative study of FNS I gene expression showed a significant increase at 25 and 50 μM Ag<sup>+</sup> concentrations rather than the control which had a decrease by the addition of the elicitor to the concentration of up to 100 μM. On the other hand, by the increase in this elicitor concentration, total flavonoid and anthocyanin contents and activity of some antioxidant enzymes as well as total protein content significantly increased compared with the control group. The gene expression was significantly elevated in the treated seedlings by Cu elicitor at 4 and 8 μM treatments while its expression was completely inhibited at 16 μM concentration. In this condition, total flavonoid and anthocyanin contents showed a similar trend and their contents were significantly reduced at 16 μM compared with the control. On the contrary, by increase in the elicitor concentration, the activity of antioxidant enzymes specially catalase and superoxide dismutase, remarkably increased compared with the control, while total protein content drastically decreased. Based on the results, it is deduced that the increase in FNS I gene expression and total flavonoid and anthocyanin contents, were the results of oxidative stress following absorption of these elicitors and activation of plant antioxidant system.

**Key words:** anthocyanin, antioxidant enzymes, flavonoid.