

مطالعه تغییرات بیان ژن سوپراکساید دیسموتاز (SOD) در غلظت های مختلف گوگرد در سیر *Allium sativum* L. به روش RT-Real time PCR و آنالیز شبکه ژنی مرتبط

چکیده

سیر (*Allium sativum* L.) از گیاهان دارویی و ادویه ای بسیار مهم می باشد. اطلاعات کاملی از بیان ژنهای مرتبط با تیمار گوگرد در سیر وجود ندارد. گوگرد در مسیر بیوسنتزی اسیدآمینو سیستئین نقش کلیدی داشته و در تولید ترکیباتی که نقش دفاعی در گیاه دارند بسیار حائز اهمیت می باشد. سوپراکساید دیسموتاز بعنوان آنزیم مهمی در تقلیل سمیت واسطه های رادیکالهای اکسیژن که در شرایط تنش ایجاد میگردد، شناخته و معرفی شده است. در این تحقیق ۲۰ توده سیر از استانهای مهم سیرکاری شامل زنجان، همدان، گیلان، مازندران و مشهد جمع آوری و در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با ۳ تکرار در شرایط گلدانی در غلظت های مختلف گوگرد عنصری شامل ۰، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۰ گرم به ازای هر واحد آزمایشی کشت گردید. بر اساس سنجش اسپکتروفتومتری تندی در سیرهای برداشت شده، سه کلون تند بو، ملایم و کم بو غربال گردیده و بیان ژن کد کننده آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (SOD) به روش پی. سی. آر کمی (RT-Real time PCR) در این ۳ کلون بررسی گردید. تغییرات بیان ژن SOD نشانگر بیان اندک آن در شرایط طبیعی (شاهد) بود که ناشی از نقش این ژن در متابولیسم ثانویه می باشد. با افزایش غلظت گوگرد به میزان ۶ گرم، بیشترین شوک محیطی به گیاه وارد شده و بیشترین بیان ژن SOD را به همراه داشته است. همین آهنگ با فراز و فرودی جزئی در غلظتهای ۱۸، ۲۴ و ۳۰ ادامه دارد. نتایج تحقیق بیانگر افزایش بیان ژن کد کننده SOD به میزان حدود دو برابر شاهد در تیمارهای دارای گوگرد بالا می باشد. آنالیز شبکه نشان داد که ژن SOD با miR۳۹۵، miR۳۹۸، miR۳۹۹ دارای ارتباط متقابل (crosstalk) می باشد. در نتیجه این ژن با شبکه های سیگنالینگ، بواسطه این miRNA ها به عنوان هسته مرکزی شبکه های پاسخ دهنده به تنش، دارای همپوشانی است. یافته های این تحقیق می تواند برای مطالعات جامع مهندسی متابولیک مواد موثره سیر و نیز تحقیقات بعدی در خصوص فعالیت ژن های مرتبط با تنش های غیرزیستی در سیر به کار گرفته شود.

کلید واژه: ترکیبات گوگردی سیر؛ SOD RT-Real time PCR؛ شبکه ژنی؛ miRNA؛

مقدمه

(al., 2014). سولفات خاک (Extracellular sulfate) که به شکل SO_4^{2-} حضور دارد توسط ناقله های سولفات (Sultr). وارد فضای داخل سلولی (Intracellular sulfate) شده و در اثر آدنیله شدن توسط ATP به آدنوزین فسفوسولفات (APS) تبدیل می گردد. این ترکیب توسط آدنوزین فسفوردکتاز (APR) به سولفیت احیاء میگردد. (Borjihan et al., 2010) این ماده متعاقباً توسط سولفیت ردوکتاز (SiR) مجدداً به سولفید احیا گردیده که در ادامه توسط آنزیم استیل سیرین تیول لیز (OASTL) (به سیستئین تبدیل می شود. آمینواسید سیستئین اولین ترکیب ارگانیک است که در تولید متابولیت های اولیه (پروتئین ها، گلوکوتیون ها، ...) نقش کلیدی دارد. گلوکوتیون ها برای فعالیت مکانیسم های دفاعی سلول و مقابله با استرس های زنده و غیر زنده بسیار ضروری می باشند. این ترکیبات با بیان ژن سوپراکساید دیسموتاز (SOD) در گیاه مرتبط می باشند. عوامل تنش زای محیطی مانند فلزات سنگین، علف کش ها، شوری، خشکی و پاتوژن ها فاکتورهای مهمی در متابولیسم گیاه و تولید دارند (Mittler and Blumwald, 2010; Filiz and Tombuloglu, 2015; Kebeish et al., 2015).

گونه هایی از اکسیژن واکنشگر (Reactive oxygen species: ROS) مانند سوپراکساید (O_2^-)، رادیکال پرهیدروکسیل (HO_2)، هیدروژن پروکساید (H_2O_2)،

گیاه سیر (*Allium sativum* L.) یکی از قدیمی ترین محصولات باغبانی با قدمتی بیش از ۵۰۰۰ سال می باشد. این گیاه بعد از پیاز (*Allium cepa* L.) پرمصرف ترین گیاه از جنس *Allium* با تولید جهانی بیش از ۲۲ میلیون تن در سال بوده که میزان تولید و مصرف آن از روندی افزایشی برخوردار است (Chen et al., 2014). اگرچه بیشترین میزان تولید سیر دنیا به کشورهای چین، هند، کره جنوبی، مصر و روسیه تعلق دارد (Robledo-Paz and Tovar-Soto, 2012). اما کشت و تولید آن در تمام دنیا از آسیا تا آمریکای جنوبی گسترش دارد. ایران رتبه پانزدهم تولید سیر دنیا را داشته و استانهای زنجان و همدان به طور مشترک رتبه اول تولید سیر ایران را به خود اختصاص داده اند (FAOSTAT, 2014). مرکز تنوع اولیه آن آسیای مرکزی بوده و در حال حاضر نواحی مدیترانه ای به عنوان دومین مرکز تنوع و پراکنش سیر شناخته می شوند (Quave, ۲۰۱۳). بخشی از اثرات دارویی و خواص سلامت بخش سیر به ترکیبات گوگردی آن منتسب می گردد (Fleischauer et al., 2000; Komarnisky et al., 2003; Chen et al., 2013) که شناسایی و فهم عملکرد ژنهای مرتبط با مسیر متابولیکی گوگرد در گیاه سیر می تواند راه مداخلات اصلاحی را در تشدید یا تقلیل فعالیت این ژنها هموار نماید (Ammarellou et

مواد و روشها

مواد گیاهی

تعداد ۲۰ توده از سیرهای کشور از ۵ استان (زنجان، همدان، گیلان، مازندران و مشهد) جمع آوری و پس از ورنالیزاسیون در دمای ۴°C و رطوبت ۸۰٪ به مدت ۳۰ روز، در شرایط گلدانی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار کشت گردید. خاک گلدان حاوی خاک مزرعه، ماسه و کود دامی پوسیده به ترتیب به نسبت ۱:۱:۲ بوده و تمامی عملیات زراعی مطابق با نیازهای اکولوژیکی سیر بطور یکسان برای همه گلدانها اجرا گردید.

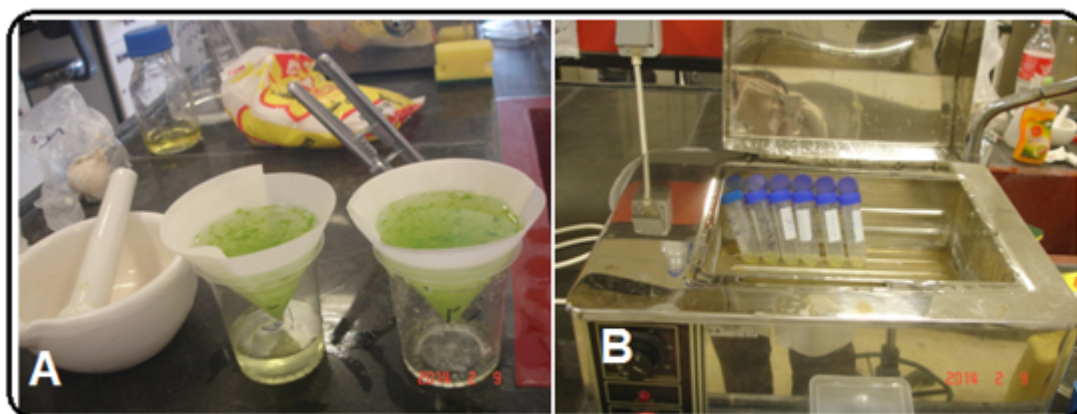
اندازه گیری تندی

بوته های برداشت شده در اواخر فصل، سرزنی شده و جهت بررسی میزان تندی به آزمایشگاه منتقل گردید. تعداد ۳ عدد سیرچه (هر کدام به وزن ۲ تا ۳ گرم) به تصادف از هر پیاز سیر انتخاب کرده و بعد از حذف پوسته، توسط وسیله مناسب کاملاً خرد گردید. ۱ گرم از توده له شده توزین و بعد از اضافه کردن ۲۰ میلی لیتر آب مقطر، در طی مدت ۲ دقیقه، کاملاً یکنواخت و همگن گردید. سپس با آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی لیتر رسانده و به مخلوط حاصل اجازه داده شد تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق بماند. پس از این مدت با کاغذ صافی و اتمن شماره ۴ صاف گردید (شکل ۱A). ۲ میلی لیتر از محلول صاف شده با ۱ میلی لیتر از معرف دی نیتروفنیل هیدرازین مخلوط و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت (شکل ۱B). سپس ۷ میلی لیتر از هیدروکسید سدیم بدان افزوده و مقدار ۲ میلی لیتر از محلول حاصل را در کووت شیشه ای دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت گردید. سری محلولهای استاندارد با استفاده از سدیم پیروات و با حل کردن ۱،۱ گرم از سدیم پیروات در یک لیتر آب مقطر بدست آمد. محلول حاصل سپس در محدوده ۱۰ میکرومول بر میلی لیتر تا ۰،۱ میکرومول بر میلی لیتر رقیق شده و جذب آنها در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری شده و منحنی استاندارد مربوطه ترسیم گردید. با لحاظ میزان جذب نمونه مجهول در محور طولی، میزان غلظت آن بر اساس میکرومول پیروات در هر میلی لیتر عصاره بدست آمد. عدد حاصله با توجه به رقیق سازی عصاره اولیه در ۲۰۰ میلی لیتر آب، در ۲۰۰ ضرب گردید. با توجه به اینکه هر مول پیروات تولیدی در واکنش آنزیمی آلیناز، معادل ۰،۵ مول تیوسولفینات است (Lin et al., 1995). بدین ترتیب مقادیر تیوسولفینات نمونه ها محاسبه گردید (Olech and Zaborska, 2012). با استفاده از روش اسپکتروفتومتری سنجش تندی، ۲۰ توده مورد مطالعه مورد آنالیز تندی قرار گرفتند. حاصل این غربال، دسته بندی ۲۰ توده در ۳ دسته خیلی تند، متوسط و ملایم (کم بو) بود.

رادیکال هیدروکسیل (OH)، رادیکال آلوکسی (RO)، رادیکال پروکسی (ROO)، ملکول اکسیژن (O_2) و ارگانیک هیدروپروکساید (ROOH) برخی از پاسخ های عمومی در تنش های زنده و غیر زنده می باشند (Filiz and Tombuloglu, 2015). این عوامل در کلروپلاست، میتوکندری، غشا پلاسمایی، آپوپلاست، شبکه آندوپلاسمی، پروکسیزوم و دیواره سلولی تولید می شوند (Sharma et al., 2012). آنزیم های SOD، آسکوربیک پروکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتیون پروکسیداز (GPX) و پروکسی ردوکسین (PrxR) از بزرگترین آنزیمهای شکننده این عوامل مخرب در گیاه می باشند. آنزیم SOD (EC 1,1,1,1) سوپراکسید (O_2^-) را به ملکول اکسیژن (O_2) و H_2O_2 کاتالیز می نماید (Qu et al., 2010).
 $2O_2 + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O$

خسارت اکسیداتیو به رشته های DNA منجر به جهش و تغییر بیان ژنها میگردد و به عبارتی سلول در مسیر سرطانی شدن قرار میگیرد. در این خصوص نقش حفاظتی SOD در حوزه های پزشکی و در پیشگیری از انواع التهابها و سرطانها گزارش گردیده است (Abreu et al., 2001) سوپراکساید در هر جایی که چرخه انتقال الکترون وجود داشته باشد تولید میشود، بنابراین برانگیختگی اکسیژن میتواند در هر بخشی از سلول از جمله میتوکندری، کلروپلاست، میکروزوم، گلیاکسیزوم، پراکسیزوم، آپوپلاست و سیتوسل رخ دهد (Kruse et al., 2007)، در نتیجه نباید از وجود سوپراکساید دیسموتاز در تمام این اندامکها شگفت زده شد (Aydin et al., 2014). براساس نتایج مطالعات آسادا و تاکاهاشی

(1987) غشاهای فسفولیپیدی توانایی تراوش مولکولهای O_2 را ندارند، بنابراین وجود سوپراکساید دیسموتاز در محلی که مولکولهای O_2 تولید میشوند بسیار حیاتی است. افزایش بیشتر مقادیر آنزیم سوپراکساید دیسموتاز در وارپته های متحمل نخود، پنبه، گوجه فرنگی و ... در مقایسه با وارپته های حساس، میتواند دلیلی برای نقش مهم این آنزیم برای مقابله با تنش شوری باشد (Li and Huilan, 2012). برای توجیه این مسئله، به نظر میرسد که بالاتر بودن فعالیت SOD در ارقام متحمل موجب کاهش صدمات رادیکالهای آزاد اکسیژن، کاهش پراکسیداسیون چربی و در نتیجه افزایش شاخص پایداری غشاء در این ارقام میگردد (Aydin et al., 2014). با همه معلومات و دانسته های ما از مکانیسمهای تنظیمی گیاه که مسئول واکنش و پاسخ گیاه جهت دسترسی به گوگرد می باشند و نیز وجود پیشرفتهای قابل توجه در این حوزه به خاطر کاربرد روشهای نوین مطالعه متابولیسمها و همچنین روشهای مطالعه سیستمهای بیولوژیکی، فهم کامل پروسه ها و فرایندهای دقیق تنظیمی این عنصر، نیازمند کشف و ارائه پاسخی کلیدی به سوالات متعدد زیادی است که در این حوزه وجود دارد (Wawrzynska and Sirko, 2014). در این تحقیق اثر غلظت های مختلف گوگرد بر بیان ژن دفاعی SOD مطالعه گردیده و شبکه بیان ژنی مرتبط با آن مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد.



شکل ۱) مراحل عصاره گیری (A) و آنکوایسیون جهت سنجش میزان تندی (B)

تیمار گوگرد در غلظتهای مختلف

با توجه به عدم حلالیت گوگرد عنصری در آب و خاک، مقادیر 0، 6، 12، 18، 24 و 60 گرم از گوگرد عنصری توزین (شکل 2) و همراه با باکتری تیوباسیلوس به گلدانهایی که حاوی 10 کیلو خاک (خاک زراعی: ماسه و کود دامی به ترتیب به نسبت 1:1:2) بود اضافه شده و کاملا مخلوط گردید (شکل 3). یک ماه اجازه داده شد تا فرایند اکسیداسیون میکروبی خاک کامل گردد. در طول یک ماه هر هفته ضمن آبیاری، خاک گلدانها در رطوبت مناسب زیر و رو شده تا حداکثر شرایط بهینه برای اکسیداسیون گوگرد توسط باکتریهای تیوباسیلوس فراهم گردد. سپس سیرچه های 3 کلون تند بو، متوسط و کم بو (T1, T2, T3) که بر اساس سنجش اسپکتروفتومتری تندی، انتخاب شده بود، در گلدانهای حاوی تیمارهای مختلف گوگرد عنصری در عمق 5 سانتیمتری در 3 تکرار در 54 گلدان کشت گردید (شکل 4)

طراحی پرایمر

برای طراحی پرایمر ابتدا از سایت NCBI توالی ژن مورد مورد نظر (سوپراکساید دیسموتاز) را جستجو گردیده و سپس با استفاده از نرم افزار (CLC Main Workbench) میزان الاین توالی ها بررسی و منطقه ای که بیشترین تطابق را داشت انتخاب گردید. در مرحله بعد با استفاده از نرم افزار Primer3، توالی های پیشنهادی برای فوروارد و ریورس پرایمر بدست آمد. در خروجی این نرم افزار، چندین پرایمر پیشنهادی به ترتیب مطلوبیت ارائه میگردد. در گام بعدی با استفاده از نرم افزار mfold، ساختار فضایی پرایمر بررسی شده و همچنین میزان GA پرایمرها که نباید از قدر مطلق 2 بیشتر باشد مقایسه گردید. در مرحله بعدی با استفاده از نرم افزار Fast PCR کیفیت پرایمرها بررسی گردید. در گام آخر با ورود به سایت NCBI نسبت به بلاست کردن توالی پیشنهادی و مشخص کردن گونه های مرتبط اقدام گردید. بعد از بررسی های دقیق فوق، توالی پرایمرها از طریق شرکت سیناکلون برای ساخت سفارش گردید. در جدول زیر مشخصات پرایمرهای

طراحی شده برای سوپراکساید دیسموتاز آورده شده است. لازم به ذکر است که برای افزایش اطمینان از هر ژن 2 پرایمر سفارش داده شد تا در صورت ناکارایی هرکدام، جایگزین دومی هم در دسترس باشد. همچنین جهت نرمال کردن داده های بیان ژن از ژن آکتین با توالی مندرج در جدول 1 استفاده شد.

مطالعه شبکه ژنی

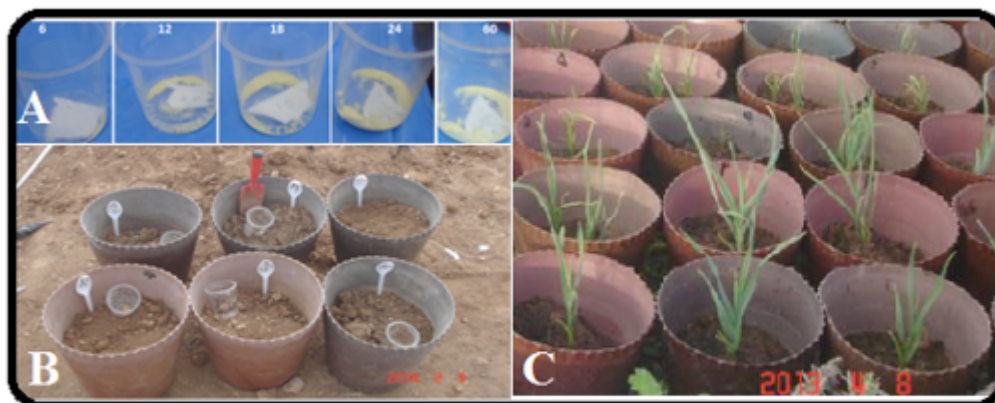
به منظور درک نحوه ارتباطات ژن انتخابی با سایر ژن-ها در مسیر بیولوژیکی پاسخ به گوگرد، از دیتابیس (Database) گیاهی RESNET نرم-افزار PathwayStudio نسخه شماره 11 استفاده شد. این دیتابیس شامل ژن-های گیاهان مدل و گیاهان دیگر نظیر جو، ذرت، گوجه-فرنگی و سیب-زمینی است. این نرم-افزار با کمک یک نرم-افزار داده-کاوی متن به نام MedScan اطلاعات مربوط به عملکرد ژن-ها را به فرم قابل درک تبدیل می-کند. با استفاده از این نرم-افزار می-توان ارتباطات عملکردی مابین ژن-ها، miRNA، ها، فاکتور-های رونویسی، مکانیسم-های سلولی و تنش-ها را مشاهده کرد (Nikitin, 2003 ; et al., 2012 Hosseinpour).

استخراج mRNA

مراحل استخراج mRNA با استفاده از کیت Ribo Spin Plant که به واسطه شرکت سیناکلون از ماکروژن کره جنوبی تهیه گردید انجام شد.

تولید cDNA

- 1- نمونه های RNA که استخراج گردیده و فریز شده بود بر روی یخ ذوب شدند.
- 2- 2 μl از RNA کل با غلظت 0.1 تا 0.5 نانوگرم با 1 μl از Oligo (dt) primer مخلوط شده و توسط آب فاقد نوکلئاز به حجم 12 μl رسید. جهت اتصال Oligo (dt) به الگو، نمونه ها به مدت 5 دقیقه در دمای 65 °C در دستگاه PCR قرار داده شدند.
- 3- به میزان 4 μl از بافر Reaction، 1 μl Inhibitor Ribolock RNase،



شکل 2) تیمارهای مختلف گوگرد عنصری (A)، گلدانهای تحت تیمار گوگرد (B) و رشد گیاهان تحت تیمار گوگرد (C)

جدول 1- مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای مطالعه بیان ژن SOD

نام پرایمر	توالی پرایمر رفت	توالی پرایمر برگشت
	5'—3'	5'—3'
SOD ¹	GTGAAGGCTGTTGCTGTT	CCTTGGAGACCAATGATACC
SOD ²	GGCGACCTAGGAAATGTGAC	ATACCGCATGCAATTCCTCC
Actin	TCCTAACCGAGCGAGGCTTCAT	GGAAAAGCACTTCTGGGCACC

سوم پروتئینها بازی می کنند. برخی از متابولیت های محتوی سیستمین، شامل گلوپتاتینون (GSH)، فیتوکلاتینها (Phytochelatin)، و تیونینها، وظیفه مقابله با واکنش های ناشی از استرس های محیطی را بر عهده دارند. در دهه های گذشته معلوم شده است که دسترسی به گوگرد برای بخش های مختلف کشاورزی دنیا محدود شده است. در تعارض با این، به عنوان نتیجه یک پدیده مثبت، کاهش شدیدی در آلودگی اتمسفر در کشورهای توسعه یافته مشاهده می گردد. تغذیه ناکافی از جهت گوگرد، باعث کاهش رشد و قدرت گیاه و تقلیل مقاومت به استرس های زنده و غیر زنده میگردد (Scherer, 2001; Knop et al., 2007). کمبود گوگرد نه تنها عملکرد بلکه کیفیت محصولات غذایی را نیز تحت تاثیر قرار میدهد. همانگونه که گفته شد، فقر گوگرد با کاهش در میزان ترکیبات دفاعی محتوی گوگرد موجب کاهش مقاومت گیاه میگردد، در حالیکه کودهای دارای گوگرد باعث افزایش مقاومت گیاه به پاتوژنها و استرسها می گردند. به این فرایند مقاومت القایی گوگردی اطلاق میگردد. تنش های محیطی موجب تولید مقادیر بالایی از گونه هایی از اکسیژن واکنشگر Reactive Oxygen Species (ROS) در موجودات زنده گردیده که این پدیده می تواند منجر به اختلال در جریان عادی زندگی موجود زنده شده و حتی منجر به برخی از موارد پاتولوژیک در گیاه گردد (Hadji Sfaxi et al., 2012). برای مقابله و ترمیم این عارضه، سلولها سیستم های پیچیده آنتی اکسیداتیو را توسعه داده اند (Foyer and Noctor, 2003). در میان آنتی اکسیدانها، سوپراکساید دیسموتاز (SOD, EC_{1.15.1.1}) که از خانواده متالوآنزیمهاست، رادیکالهای آنیون سوپراکساید را به هیدروژن پراکساید تبدیل می کند که بعداً توسط کاتالازها تجزیه می شود و تولید آب و اکسیژن مولکولی می نماید و بدین ترتیب سلولها را از خطرات و آسیب های اکسیداتیو حفاظت می کند (Hadji Sfaxi et al., 2012).

خسارت اکسیداتیو در رشته های DNA بصورت جهش و تغییر در بیان ژنها بروز و ظهور می کند. سوپراکساید دیسموتاز بعنوان آنزیم مهمی در تقلیل سمیت واسطه های رادیکالهای اکسیژن شناخته و معرفی شده است. چهار نوع از SOD ها بر اساس طبیعت کوفاکتور فلزی موجود در مکان کاتالیتیک شناسایی شده اند. این ۴ نوع شامل SOD Mn، Cu&Zn-SOD، Fe-SOD و SOD Ni می باشند (Pagani et al., 1995). براساس نتایج این تحقیق غلظت های مختلف گوگرد بر بیان ژن دفاعی و مرتبط با شرایط تنش SOD تاثیر قابل توجهی داشته و روند تغییرات در هر سه کلون تندبو، ملایم و کم بو مشابه بوده و با هم مطابقت دارد.

جهت مطالعه روابط ژنی، شبکه ژنی برای ژن Copper/zinc CSD₁ (Superoxide Dismutase₁) و گوگرد رسم گردید. این ژن توسط چند miRNA و فاکتور رونویسی کنترل می-گردد (شکل ۵). اطلاعات این ارتباطات در جدول تکمیلی شماره ۱ قرار دارد. فاکتور رونویسی LSD₁ بیان ژن CSD₁ را تحت تاثیر قرار می-دهد؛ این فاکتور رونویسی با ساختار zinc finger (روی-حلقه) با تنظیم شبکه های مختلف سیگنالینگ نظیر اتیلن، در بسیاری از فرآیندهای مقاومتی نقش دارد. miR₃₉₈ و miR₃₉₉ به طور مستقیم ژن CSD₁ را کنترل می-کنند؛ بنابراین می-توان اظهار داشت که این miRNA ها جز miRNA های پاسخ دهنده به تنش گوگرد هستند و به منظور کاهش اثرات تنش اکسیداتیو، با کنترل بیان ژن های سوپراکساید دیسموتاز، سیستم آنتی-اکسیدان گیاهی را فعال و اثرات سمی ROS خنثی می-کنند (Zhu et al., 2011). نکته قابل تامل، تاثیر ژن های AGO₁ و DCL₁ بر بیان ژن CSD₁ است. این ارتباط مشاهده شده ممکن است به دلیل کنترل مستقیم و غیر-مستقیم این ژن توسط چندین miRNA و فاکتور رونویسی باشد که این امر نیازمند تحقیقات بعدی است.

۲ از dntp mix و ۱ μm از آنزیم Revert Aidm-RT به هر یک از نمونه ها اضافه شد. نمونه ها میکس و میکروفیوژ شدند.
۴- نمونه ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲۰ c در دستگاه PCR انکوبه شدند. به منظور غیر فعال سازی آنزیم RT به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ c این عمل انجام گردید.

انجام Real-time PCR

واکنش های PCR مطابق دستورالعمل کیت به این شرح انجام شد: مرحله واسرشته سازی اولیه شامل ۹۵ C^۰ برای ۵ دقیقه و بدنبال آن ۴۰ چرخه واسرشته سازی در ۹۵ C^۰ به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ C^۰ برای اتصال پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ C^۰ به مدت ۳۰ ثانیه برای بسط و در پایان ۷۲ C^۰ برای ۱۰ دقیقه انجام گردید. به منظور بررسی صحت تکثیر از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. تکثیر با استفاده از کیت سایبرگرین شرکت Thermo و دستگاه Biorad صورت گرفت.

آنالیز آماری بیان ژن

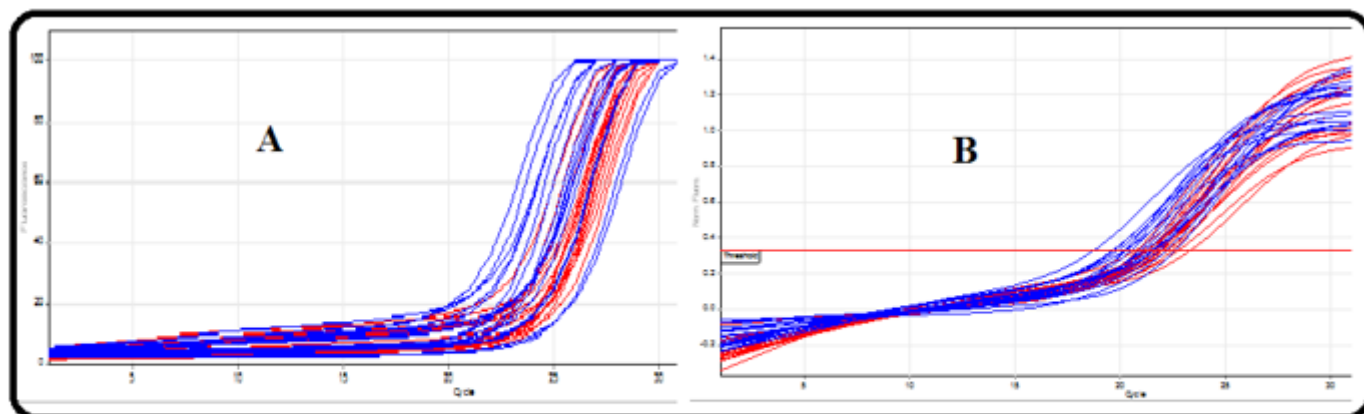
پس از اتمام آزمایش Real time PCR، بعد از رسم خط تری شولد، مقادیر (Ct Cycle threshold) حاصل از نمودارهای تکثیر از نرم افزار Rotor gene به محیط Excel انتقال داده شد و پس از مرتب سازی در محیط Gen Ex، داده ها بر اساس تغییرات بیان ژن خانه دار (کنترل داخلی) آکتین مطابق فرمول $(\Delta\text{CT Target} - \Delta\text{CT Actin})$ نرمال شده و سپس با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد مقایسات آماری و رسم نمودار قرار گرفت (Pfaffl et al., 2002).

نتایج و بحث

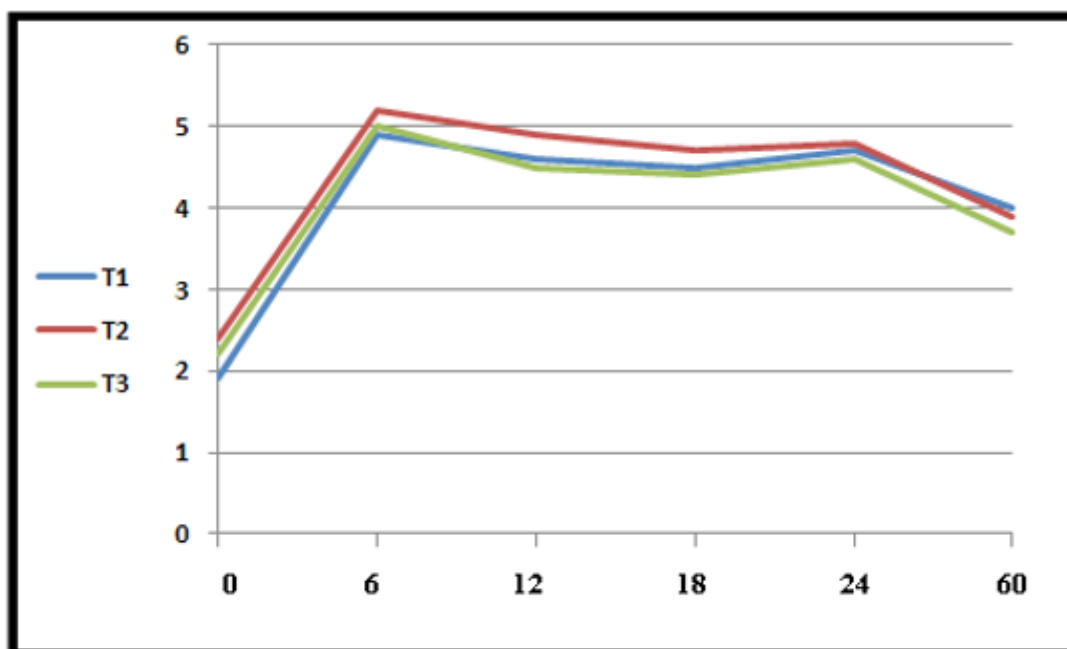
منحنی تکثیر ژن SOD و نیز منحنی سیکل آستانه ژن در شکل ۳ همراه با ژن کنترل داخلی آکتین نشان داده شده است. تغییرات بیان ژن بر اساس داده های نرمال شده در شکل ۴ ارائه شده است. بیان اندک مشاهده شده برای تیمار SOD در شرایط طبیعی (تیمار شاهد)، بیانگر نقش این ژن در متابولیسم ثانویه می باشد. زیرا در شرایط طبیعی و عدم وجود استرس، نیازی به مقادیر بالای بیان ژنهای دفاعی نمی باشد (Nims et al., 2006). با افزایش غلظت گوگرد به میزان ۶ بیشترین شوک محیطی به گیاه وارد شده و بیشترین بیان ژن SOD را به همراه داشته است. همین روند با تغییرات جزئی در غلظت های ۱۸، ۲۴، و ۶۰ ادامه دارد. با توجه به اینکه با افزایش گوگرد نمی توان انتظار داشت که همه گوگرد عنصری اضافه شده توسط باکتریهای تیوباسیلوس خاک، اکسید شده و به فرم محلول در آب و قابل جذب برای گیاه در آید، لذا این تفاوت های موجود ناشی از عدم دسترسی کامل همه گوگرد اضافه شده به خاک می باشد. آنچه که از نمودار یاد شده بر می آید بیانگر افزایش بیان ژن SOD به میزان حدود دو برابر شاهد در تیمارهای دارای گوگرد بالا می باشد.

با توجه به اینکه گزارشاتی از مطالعات مرتبط با بیان ژن SOD در سیر با روش RT Real-time PCR تاکنون منتشر نگردیده است لذا این نتایج بر اساس اطلاعات موجود برای نخستین بار گزارش میگردد. این یافته ها با نتایج کمیت سنجی آنزیمی ترکیبات اکسیداتیو در پیاز A. cepa (Chandra and Pandey, 2014)، که به تازگی منتشر گردیده مطابقت دارد. همچنین تاثیر تغییرات اسیدیته خاک بر بیان مجموعه ای از ژن ها که اخیراً مورد توجه محققین قرار گرفته است (Lager et al., 2010) حاکی از اثرات مهم این عامل بر بیان ژن های مربوطه بسیاری است. بدیهی است که گوگرد از عوامل مهم کاهش اسیدیته خاک می باشد.

باند های دی سولفیدی که در پروتئینها، بین گروه های تیول دنباله های سیستمین تشکیل می شوند، نقش مهمی را در تشکیل و حفظ ساختار



شکل ۳) منحنی تکثیر ژن SOD (A): (رنگ آبی کنترل داخلی: آکتین) و رنگ قرمز ژن SOD و منحنی سیکل آستانه (Threshold) برای تکثیر ژن SOD همراه با آکتین (B).



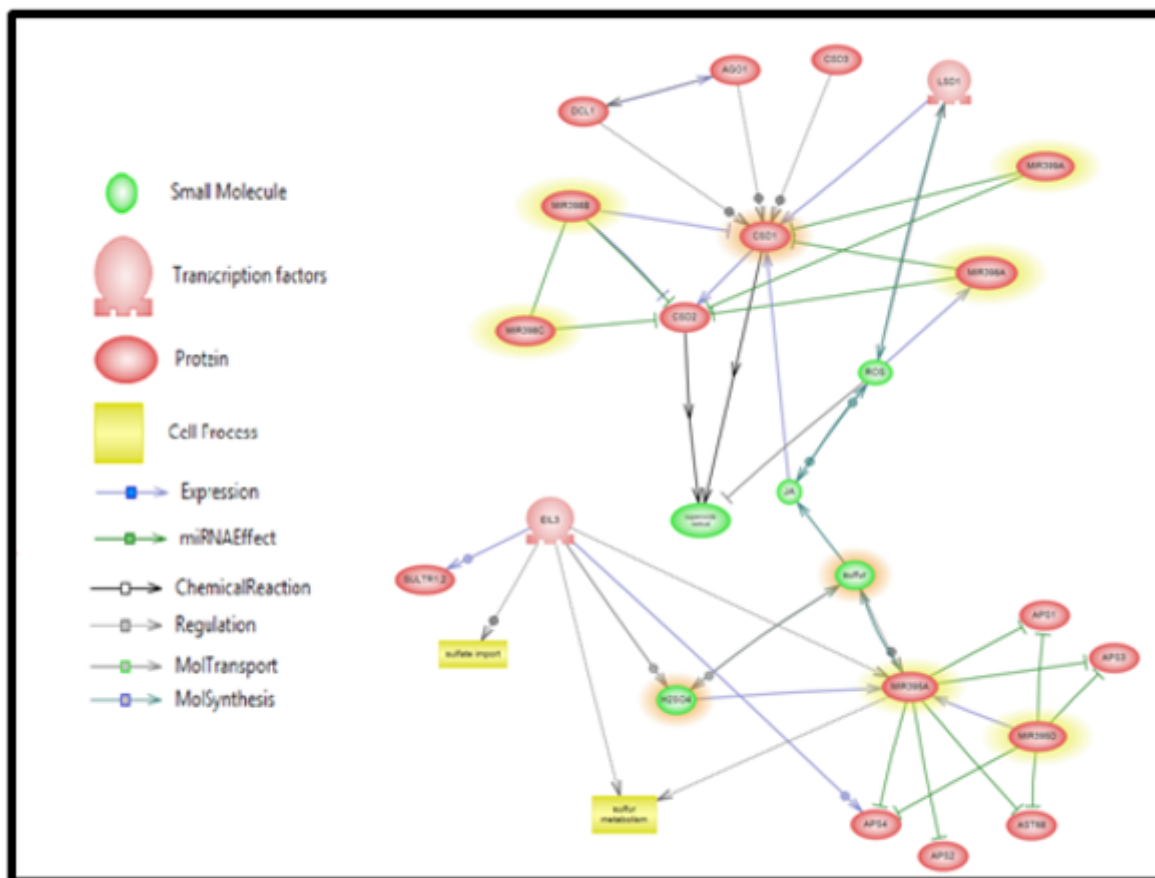
شکل ۴) تغییرات بیان ژن SOD در غلظتهای مختلف گوگرد در رقم T₁, T₂, T₃

قرار می دهند؛ بیان متفاوت مشاهده شده این ژن در غلظت های متفاوت گوگرد، می تواند بدلیل تغییرات بیانی سریع عوامل تنظیم کننده آن باشد که با تنظیم بیان ژن های هدف خود، شبکه های سیگنالینگ را در بافت های مختلف کنترل می کنند. با توجه به این امر که بخشی از اثرات دارویی سیر بدلیل ترکیبات گوگردی آن است، بررسی این عوامل کلیدی در آینده بسیار حائز اهمیت است.

یافته های این تحقیق می تواند برای مطالعات جامع مهندسی متابولیک مواد موثره سیر و نیز تحقیقات بعدی در خصوص فعالیت ژن های مرتبط با تنش های غیرزیستی در سیر به کار گرفته شود.

تأثیر متقابل miRNA و فاکتور رونویسی

نکته بسیار جالب توجه در این شبکه اثر متقابل (Interaction) مابین miR395 و فاکتور رونویسی EIL3 (Sulfur limitation) است. این فاکتور رونویسی یک عامل کلیدی در متابولیسم سولفور است (Kawashima et al., 2005 & 2009) که بیان miR395 را کنترل می کند و این miRNA با هدف قرار دادن ژن های هدف خود در بافت برگ و ریشه متابولیسم سولفور در گیاه را تنظیم می کند (Mica et al., 2009). این miRNA بیان ژن CSD1 را بواسطه JA (جاسمونیک اسید) به صورت غیر مستقیم تحت تاثیر قرار می دهد (شکل ۵) این امر حاکی از پیچیدگی عوامل تنظیم کننده این ژن است. بررسی شبکه ژن CSD1 نشان داد که miRNAها و فاکتور های رونویسی مهم و کلیدی، بیان این ژن مهم درگیر در مسیر متابولیسم گوگرد را تحت تاثیر



شکل ۵) شبکه ترسیمی ژن CSD^۱ و گوگرد

- Fleischauer A.T., Poole C., Arab L. (2000) Garlic consumption and cancer prevention: meta analyses of colorectal and stomach cancers. *American Journal of Clinical Nutrition* 1052-72:1047,
- Foyer C.H., Noctor G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119, 355-364
- Hadji Sfaxi I., Ezzine A., Coquet L., Cosette P., Jouenne T. (2012) Combined proteomic and molecular approaches for cloning and characterization of copper-zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD2) from Garlic *Allium sativum*. *Molecular Biotechnology* 52: 49-58
- Hosseinpour B., HajiHoseini V., Kashfi R., Ebrahimie E., Hemmatzadeh F. (2012) Protein interaction network of *Arabidopsis thaliana* female gametophyte development identifies novel proteins and relations. *PLoS One* 7: 49931
- Kawashima C. G., Berkowitz O., Hell R., Noji M., Saito K. (2005) Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137: 220-230
- Kawashima C.G., Yoshimoto N., Maruyama-Nakashita A., Tsuchiya Y.N., Saito K
- Takahashi H. and Dalmay T. (2009) Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant J.* 57:313-321
- Kebeish R., Hanan E., El-Bialy N. (2015) Effects of Gamma Radiation, on Growth Oxidative Stress, Antioxidant System, and Alliin Producing Gene Transcripts in *Allium Sativum*. *International Journal of Research Studies in Bioscience*.3:161-174
- Ketter C.A.T. and Randle W.M. (1998) Pungency assessment in onions. (S.J. Karcher, (ed) Proceeding of the 19 workshop / Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), pp: 177-196
- Knop M., Pacyna S., Voloshchuk N., Kant S., Mullenborn C., Steiner U., Kirchmair M
- Scherer H.W., Schulz M. (2007) *Zea mays*: benzoxazolinone detoxification under sulfur deficiency conditions — a complex allelopathic alliance including
- Abreu I.A., Saraiva L.M., Soares C.M., Teixeira M. and Cabelli D.E. (2001) The mechanism of superoxide scavenging by *Archaeoglobus fulgidus* neelaredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 276 :38995-39001
- Ammarellou A., Kazemitabar k. and Najafei Zarreini H. (2014) Effects of genetic and environmental conditions on bulbing quality of 38 Iranian garlic (*Allium sativum* L cultivars. Proceedings of the 3th National Congress on Medicinal Plants. Mashhad, Iran 331:
- Asada K. and Takahashi M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, *Photoinhibition*. Elsevier Amsterdam 227-287
- Aydın S., Büyük İ. And Aras E.S . (2014) Expression of SOD gene and evaluating its role in stress tolerance in NaCl and PEG stressed *Lycopersicum esculentum*. *Turkish Journal of Botany* 38: 89-98
- Borjihan B., Ogita A., Fujita K., Doe M., Tanaka T. (2010) The cyclic organosulfur compound zwiebelane A from onion (*Allium cepa*) functions as an enhancer of polymyxin B in fungal vacuole disruption. *Planta Medica*.76: 1864-1866
- Chandra N. and Pandey N. (2014). Influence of Sulfur Induced Stress on Oxidative Status and Antioxidative Machinery in Leaves of *Allium cepa* L. Hindawi Publishing Corporation International Scholarly Research Notices. Volum 2014: .1-9
- Chen S., Shen X., Cheng S., Li P., Du J., Chang Y. and Meng H. (2013) Evaluation of Garlic cultivars for polyphenolic content and antioxidant properties . *PLoS ONE* 8(11): 79730
- Chen S., Chen W., Shen X., Yang Y., Qi F., Liu Yan., Meng H.C.-V. G. (2014) Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) by simple sequence repeat and inter simple sequence repeat analysis and agro-morphological traits Analytical Biochemistry 267 - 260 (FAOSTAT data. <http://apps.fao.org/default.htm> (Access June 12th, 2014
- Filiz E. and Tombuloglu H. (2015). "Genome-wide distribution of superoxide dismutase (SOD) gene families in *Sorghum bicolor* ", *Turkish Journal of Biology*, Vol. 39, pp. 49-

- Total Garlic
Thiosulfates Content. Kinetic Aspects of Reaction with Chromogenic Thiols
Research Report, 62: 23 – 29)
- Pagani S., Colnaghi R., Palagi A. and Negri A. (1995) Purification and characterization of an iron superoxide dismutase from the nitrogen-fixing *Azotobacter vinelandii*. FEBS Letter. 357(1):79-82
- Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L (2002) Relative Expression Software Tool for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30: 36
- Quave C.L. (2013) Medicinal plant monographs contributions from Emory University course. HLTH. 385: 661
- Qu CP, Xu ZR, Liu GJ, Liu C, Li Y, Wei ZG, Liu GF (2010). Differential expression of copper-zinc superoxide dismutase gene of *Polygonum sibiricum* leaves, stems, and underground stems, subjected to high-salt stress. *Int J Mol Sci* 11: 5234–5245
- Robledo-Paz, A. and Tovar-Soto, H.M. (2012). Biotechnological Tools for Garlic Propagation and Improvement. book edited by Eddy C. Agbo, ISBN 978-953-51-0096-6
- Scherer H.W. (2001) Sulphur in crop production. *European Journal of Agronomy* 14 : 81 111
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions
Journal of Botany 2012: 217037
- Wawrzynska A., Sirko A. (2014) To control and to be controlled – understanding the Arabidopsis SLIM1 function in sulfur deficiency through comprehensive investigation of The EIL protein family. *Frontiers in Plant Science*. 5:575-582
- Xu P, Liu H., Gao Z., Srinivas P., Yang C.Y. (2001) Genetic identification of garlic cultivars and lines by using RAPD assay. *Acta Horticulturae*, 555: 213–220
- Zhu C., Ding Y., and Liu H. (2011) MiR398 and plant stress responses. *Physiologia Plantarum* 143:1-9
- endophytic *Fusarium verticillioides* *Journal of Chemical Ecology* 33: 225–237
- Komarnisky L.A., Christopherson R.J., Basu T.K. (2003) Sulfur: its clinical and toxicologic aspects. *Nutrition* 19 : 54–61
- Kruse C., Jost R., Lipschis M., Kopp B., Hartmann M., Hell R. (2007) Sulfur-enhanced defence: effects of sulfur metabolism, nitrogen supply, and pathogen lifestyle. *Plant Biology* 9 : 608–619
- Lager I., Andreasson O., Dunbar T., Andreasson E. Escobar M.A. and Rasmusson A.G
Changes in external pH rapidly alter plant gene expression (2010) and modulate Auxin and elicitor responses. *Plant cell environ.* 33(9): 1513-1528
- Li L. and Huilan Y. (2012) Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant enzyme activity in Arabidopsis plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58:46-53
- Lin M., Watson J.F., Baggett J.R. (1995) Inheritance of soluble solids and pyruvic acid content of bulb onions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122–120:119
- Mica E., Piccolo V., Delledone M., Ferrarini A., Pezzotti M., Casati C., Del Fabbro C., Valle G., Policriti A., Morgante M., Pesole G., Pe M.E. and Horner D.S. (2009) High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics* 10:558
- Mittler, R. and E. Blumwald, (2010). Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61: 443-462
- Nikitin A., Egorov S., Daraselia N., Mazo I. (2003) Pathway studio—the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics* 19:2155-2157
- Nims E., Dubois C.P., Roberts S.C., and Walker E.L. (2006) Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 8: 385-394
- Olech, Z. and Zaborska, W. (2012) A Spectrophotometric Assay for

Study on SOD gene expression under sulfur treatments and related genes network analysis

Abstract

Garlic (*Allium sativum* L.) is one of the important medicinal plants. Also much beneficial health related activities of garlic are attributed to its organosulfur compounds. However, a little information is available about effects of sulfur treatments on stress related genes expression. Thus study of sulfur related genes expression are very important for improvement of garlic cultivars and metabolic engineering. In this research 20 Iranian garlic ecotypes were collected from main cultivated areas including Zanjan, Hamedan, Gilan, Mazenderan and Mashhad, then cultured on pot conditions as randomized complete block design in 3 replications. Based on spectrophotometry assay three clones of garlic were selected as high, mild and low pungency. The study of SOD gene expression changes indicated of its low expression in normal conditions (control), resulting expression of this gene is necessary to the secondary metabolism. Network analysis revealed cross-talk among miR395, miR398, miR399 and SOD. As a result, this gene is overlapped with signaling pathways by these miRNAs as a core of stress response networks

The findings of this research can be used in further research on the garlic metabolic engineering, garlic stress related genes, and also reducing or enhancing the activity of the responsible genes for garlic pungency and health beneficial

Keywords: Garlic organosulfur; SOD gene; RT-Real time PCR; Gene network; miRNA;