

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

علی عمارلو^{۱*}، کمال کاظمی تبار^۲، حمید نجفی زرینی^۳، اسماعیل ابراهیمی^۴ و
ریحانه ابراهیمی خاک سفیدی^۵

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۷

چکیده

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 به عنوان 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، ۳۶، ۴۲، ۴۸، ۵۴، ۶۰ 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 تغییرات جزئی در غلظتهای ۱۸، ۲۴، ۳۰ و ۳۶ گرم 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 miR395، miR398 و miR399 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 غیر زیستی در سیر به کار گرفته شود.

واژگان کلیدی: ترکیبات گوگردی سیر، RT-Real time PCR، SOD، شبکه ژنی، miRNA.

^{۱*} عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی پژوهشکده فناوریهای نوین زیستی دانشگاه زنجان

^۲ دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۳ دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۴ پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شیراز

^۵ دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

مقدمه

سیستئین تبدیل می‌شود. آمینواسید سیستئین اولین ترکیب ارگانیک است که در تولید متابولیت‌های اولیه (پروتئین‌ها، گلوکاتینونها، ...) نقش کلیدی دارد. گلوکاتینون‌ها برای فعالیت مکانیسم‌های دفاعی سلول و مقابله با استرس‌های زنده و غیر زنده بسیار ضروری می‌باشند. این ترکیبات با بیان ژن سوپراکساید دیسموتاز (SOD) در گیاه مرتبط می‌باشند. عوامل تنش‌زای محیطی مانند فلزات سنگین، علف‌کش‌ها، شوری، خشکی و پاتوژن‌ها فاکتورهای مهمی در متابولیسم گیاه و تولید می‌باشند (Mittler and Blumwald, 2010; Filiz and Tombuloglu, 2015; Kebeish et al., 2015) گونه‌هایی از اکسیژن واکنشگر (Reactive oxygen species (ROS) مانند سوپراکساید (O_2^-), رادیکال پرهیدروکسیل (HO_2^-), هیدروژن پروکساید (H_2O_2), رادیکال هیدروکسیل (OH), رادیکال آلکوکسی (RO), رادیکال پروکسی (ROO), ملکول اکسیژن (O_2) و ارگانیک هیدروپروکساید ($ROOH$), برخی از پاسخ‌های عمومی در تنش‌های زنده و غیر زنده می‌باشند (Filiz and Tombuloglu, 2015). این عاملها در کلروپلاست، میتوکندری، غشا پلاسمایی، آپوپلاست، شبکه آندوپلاسمی، پروکسیزوم و دیواره سلولی تولید می‌شوند (Sharma et al., 2012). آنزیم‌های SOD، آسکوربیک پروکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتینون پروکسیداز (GPX) و پروکسی ردوکسین (PrxR) از بزرگترین آنزیم‌های شکننده این عوامل مخرب در گیاه می‌باشند. آنزیم SOD (EC 1.15.1.1) سوپراکسید (O_2^-) را به ملکول اکسیژن (O_2) و H_2O_2 کاتالیز می‌نماید ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) (Qu et al., 2010). خسارت اکسیداتیو به رشته‌های 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 حوزه‌های پزشکی و در پیشگیری از انواع التهاب‌ها و سرطان‌ها گزارش گردیده

گیاه سیر (*Allium sativum* L.) یکی از قدیمی‌ترین محصولات باغبانی با قدمتی بیش از ۵۰۰۰ سال می‌باشد. این گیاه بعد از پیاز (*Allium cepa* L.) پرمصرف‌ترین 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 داده‌اند (FAOSTAT, 2014). مرکز تنوع اولیه آن آسیای مرکزی بوده و در حال حاضر نواحی مدیترانه‌ای به عنوان دومین مرکز تنوع و پراکنش سیر شناخته می‌شوند (Quave, 2013). بخشی از اثرات دارویی و خواص سلامت بخش سیر به ترکیبات گوگردی آن منتسب می‌گردد (Fleischauer et al., 2000; Komarnisky et al., 2003; Chen et al., 2013) که شناسایی و فهم عملکرد ژنهای مرتبط با مسیر متابولیسم گوگرد در گیاه سیر می‌تواند راه مداخلات اصلاحی را در تشدید یا تقلیل فعالیت این ژنها هموار نماید (Ammarellou et al., 2014). سولفات خاک (Extracellular sulfate) که به شکل SO_4^{2-} حضور دارد توسط ناقله‌های سولفات (Sultr.) وارد فضای داخل سلولی (Intracellular sulfate) شده و در اثر آدنیله شدن توسط ATP به آدنوزین فسفوسولفات (APS) تبدیل می‌گردد. این ترکیب توسط آدنوزین فسفوردوکتاز (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 سرین تیول لیز (OASTL) به

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.

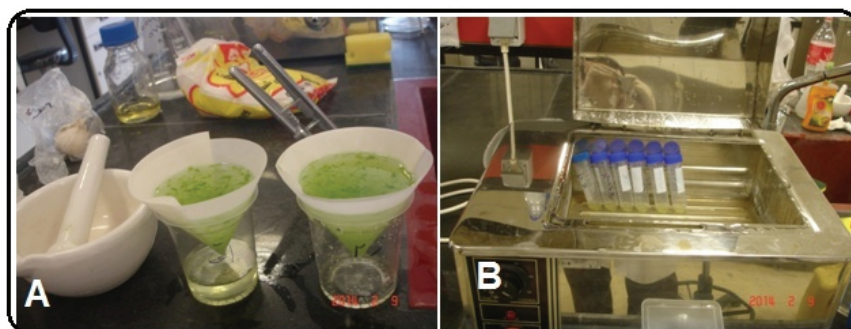
اندازه‌گیری تندی

بوته‌های 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 واتمن شماره ۴ صاف گردید (شکل A). 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 B). سپس ۷ میلی لیتر از هیدروکسید سدیم بدان افزوده و مقدار ۲ میلی لیتر از محلول حاصل را در کووت شیشه‌ای 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

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، گلیکولیزوم، پراکسیزوم، آپوپلاست و سیتوسل رخ دهد (Kruse et al., 2007) در نتیجه نباید از وجود سوپراکساید دیسموتاز در تمام این اندامکها شگفت زده شد (Aydın et al., 2014). بر اساس نتایج مطالعات آسادا و تاکاهاشی (۱۹۸۷) غشاهای فسفولیپیدی توانایی تراوش مولکولهای O₂ را ندارند، بنابراین وجود سوپراکساید دیسموتاز در محلی که مولکولهای O₂ تولید می‌شوند بسیار حیاتی است. افزایش بیشتر مقادیر آنزیم سوپراکساید دیسموتاز در وارپته‌های متحمل نخود، پنبه، گوجه فرنگی و... در مقایسه با وارپته‌های 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 (Aydın et al., 2014). با همه‌ی معلومات و دانسته‌های ما از مکانیسمهای تنظیمی گیاه که مسئول واکنش و پاسخ گیاه جهت دسترسی به گوگرد می‌باشند و نیز وجود پیشرفتهای قابل توجه در این حوزه به خاطر کاربرد روش‌های نوین مطالعه متابولیسمها و همچنین روش‌های مطالعه سیستم‌های بیولوژیکی، فهم کامل پروسه‌ها و فرایندهای دقیق تنظیمی این عنصر، نیازمند کشف و ارائه پاسخهای کلیدی به سوالات متعدد زیادی است که در این حوزه وجود دارد (Wawrzyńska and Sirko, 2014). در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف گوگرد بر بیان ژن دفاعی SOD مطالعه گردیده و شبکه بیان ژنی مرتبط با آن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

واکنش آنزیمی آلیناز، معادل ۵/۰ مول تیوسولفینات است (Lin et al., 1995). بدین ترتیب مقادیر تیوسولفینات نمونه‌ها 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.

میلی لیتر تا ۱/۱ میکرومول بر میلی لیتر رقیق شده و جذب آنها در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری 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

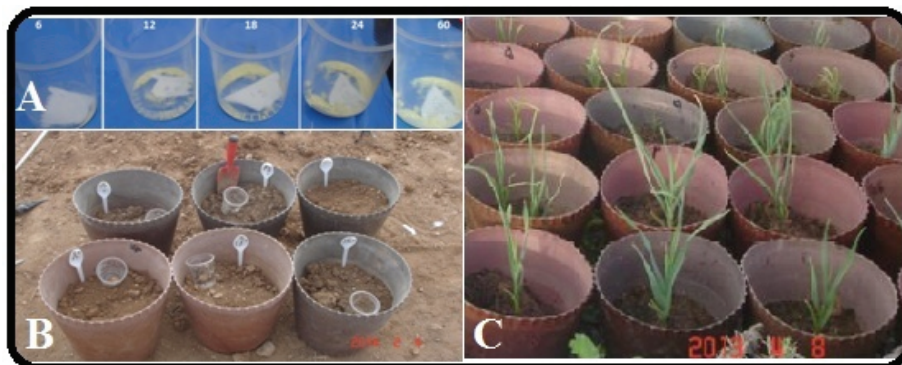


شکل ۱- مراحل عصاره گیری (A) و انکوباسیون جهت سنجش میزان تندی (B)

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 ۳ 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 ۵ سانتیمتری در ۳ تکرار در ۵۴ گلدان کشت گردید (شکل ۲C).

تیمار گوگرد در غلظت‌های مختلف

با توجه به عدم حلالیت گوگرد عنصری در آب و خاک، مقادیر ۰، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۶۰ گرم از گوگرد عنصری توزین (شکل ۲A) و همراه با باکتری تیوباسیلوس به گلدان‌هایی که حاوی ۱۰ کیلو خاک (خاک زراعی: ماسه و کود دامی به ترتیب به نسبت ۲:۱:۱) بود اضافه شده و کاملاً مخلوط گردید (شکل ۲B). یک ماه اجازه داده شد تا فرایند اکسیداسیون میکروبی خاک کامل گردد. در طول یک



شکل ۲- تیمارهای مختلف گوگرد عنصری (A)، گلدانهای تحت تیمار گوگرد (B) و رشد گیاهان تحت تیمار گوگرد (C)

طراحی پرایمر

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 ۲ پرایمر سفارش داده شد تا در صورت ناکارایی هر کدام، جایگزین دومی هم در دسترس باشد. همچنین جهت نرمال کردن داده های بیان ژن از ژن آکتین با توالی مندرج در جدول ۱ استفاده شد.

برای طراحی پرایمر ابتدا از سایت NCBI توالی ژن مورد مورد نظر (سوپراکساید دیسموتاز) 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 می گردد. در گام بعدی با استفاده از نرم افزار Mfold، ساختار فضایی پرایمر بررسی شده و همچنین میزان ΔG پرایمرها که نباید از قدر مطلق ۲ بیشتر باشد مقایسه گردید. در مرحله بعدی با استفاده از نرم افزار Fast PCR کیفیت پرایمرها

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای مطالعه بیان ژن SOD

نام پرایمر	توالی پرایمر رفت		توالی پرایمر برگشت	
	5' — 3'		5' — 3'	
SOD1	GTGAAGGCTGTTGCTGTT		CCTTGGAGACCAATGATACC	
SOD2	GGCGACCTAGGAAATGTGAC		ATACCGCATGCAATTCTTCC	
Actin	TCCTAACCGAGCGAGGCTTCAT		GGAAAAGCACTTCTGGGCACC	

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

۱- نمونه های RNA که استخراج گردیده و فریز شده بود بر روی یخ ذوب شدند.

۲- $2 \mu\text{l}$ از RNA کل با غلظت 0.1 تا 5 نانوگرم با $1 \mu\text{l}$ از Oligo (dt) primer مخلوط شده و توسط آب فاقد نوکلئاز به حجم $12 \mu\text{l}$ رسید. جهت اتصال Oligo (dt) به الگو، نمونه ها به مدت 5 دقیقه در دمای 65°C در دستگاه PCR قرار داده شدند.

۳- به میزان $4 \mu\text{l}$ از بافر Reaction، $1 \mu\text{l}$ از dntp mix از Ribolock RNase Inhibitor، $2 \mu\text{l}$

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، فاکتورهای رونویسی، مکانیسم های سلولی و تنش ها را مشاهده کرد.

(Hosseinpour et al., 2012 ; Nikitin, 2003).

مقایسات آماری و رسم شکل 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 داده‌های 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 غلظت‌های ۱۸، ۲۴ و ۶۰ ادامه دارد. با توجه به اینکه با افزایش گوگرد نمی‌توان 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 تفاوت‌های موجود ناشی از عدم دسترسی کامل همه گوگرد اضافه شده به خاک می باشد. آنچه که از شکل یاد شده بر می آید بیانگر افزایش بیان ژن SOD به میزان حدود دو برابر شاهد در تیمارهای دارای گوگرد بالا می باشد.

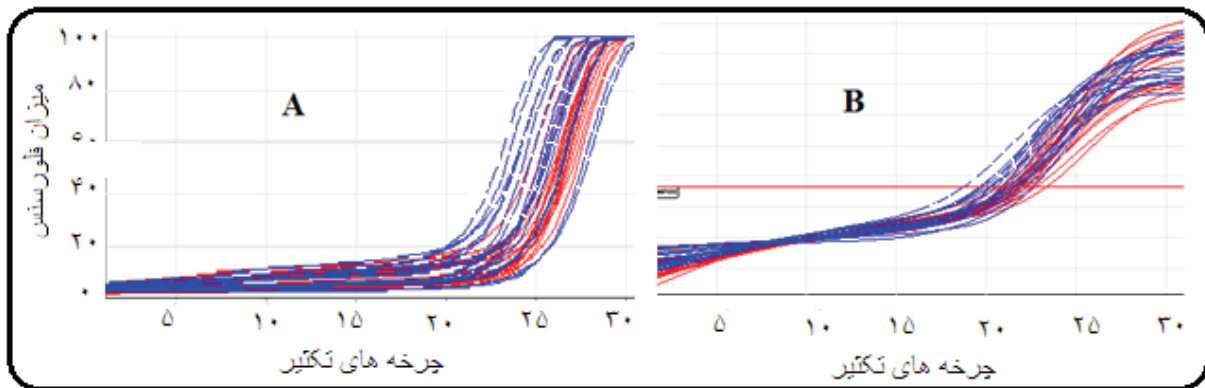
، و $1 \mu\text{l}$ از آنزیم Revert Aidm-RT به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها میکس و میکروپیوژ شدند. ۴- نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای 42°C در دستگاه PCR انکوبه شدند. به منظور غیر فعال سازی آنزیم RT به مدت ۵ دقیقه در دمای 70°C این عمل انجام گردید.

انجام Real-time PCR

واکنش های PCR مطابق دستورالعمل کیت به این شرح انجام شد: مرحله واسرشته سازی اولیه شامل 95°C برای ۵ دقیقه و بدنبال آن 40°C چرخه واسرشته سازی در 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، 55°C برای اتصال پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۳۰ ثانیه برای بسط و در پایان 72°C 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

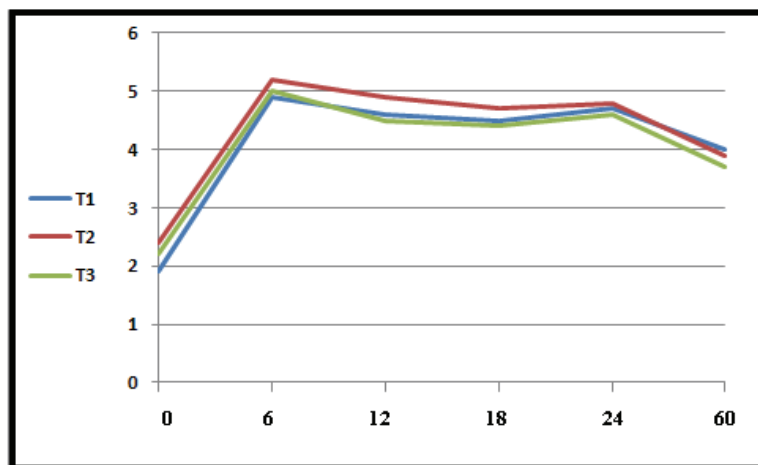
پس از اتمام آزمایش Real time PCR، بعد از رسم خط تری شولد، مقادیر C_t (Cycle threshold) حاصل از شکل‌های تکثیر از نرم افزار Rotor gene به محیط Excel انتقال داده شد و پس از مرتب سازی در محیط Gen Ex، داده‌ها بر اساس تغییرات بیان ژن خانه دار (کنترل داخلی) آکتین مطابق فرمول $(\Delta\text{CT Target} - \Delta\text{CT Actin}) - 2$ نرمال شده و سپس با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد



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

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.

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 می گردد. این یافته ها با نتایج کمیت سنجی آنزیمی ترکیبات اکسیداتیو در پیاز (*A. cepa*, Chandra and Pandey, 2014) که به تازگی منتشر گردیده



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

عده دارند. در دهه های گذشته معلوم شده است که دسترسی به گوگرد برای بخشهای 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

باندهای دی سولفیدی که در پروتئین ها، بین گروه های تیول دنباله های سیستئین تشکیل می شوند، نقش مهمی را در تشکیل و حفظ ساختار سوم پروتئین ها بازی می کنند. برخی از متابولیت های محتوی سیستئین، شامل گلوتاتیون (GSH)، فیتوکلاتینها (Phytochelatin)، و تیونینها، وظیفه مقابله با واکنش های ناشی از استرس های محیطی را بر

تحقیق غلظت‌های 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 CSD1 (Copper/zinc Superoxide Dismutase) و گوگرد رسم گردید. این ژن توسط چند miRNA و فاکتور رونویسی کنترل می‌گردد (شکل ۵). فاکتور رونویسی LSD1 بیان ژن CSD1 را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این فاکتور رونویسی با ساختار Zinc finger (روی-حلقه) با تنظیم شبکه‌های مختلف سیگنالینگ نظیر اتیلن، در بسیاری از فرآیندهای مقاومتی نقش دارد. miR398 و miR399 به طور مستقیم ژن CSD1 را کنترل می‌کنند؛ بنابراین می‌توان 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 ژن‌های سوپراکساید دیسموتاز، سیستم آنتی‌اکسیدان گیاهی را فعال و اثرات سمی ROS را خنثی می‌کنند (Zhu et al., 2011). نکته قابل تامل، تاثیر ژن‌های AGO1 و DCL1 بر بیان ژن CSD1 است. این ارتباط مشاهده شده ممکن است به دلیل کنترل مستقیم و غیرمستقیم این ژن توسط چندین miRNA و فاکتور رونویسی باشد که این امر نیازمند تحقیقات بعدی است.

تاثیر متقابل miRNA و فاکتور رونویسی

نکته بسیار جالب توجه در این شبکه اثر متقابل (Interaction) مابین miR395 و فاکتور رونویسی EIL3 (Sulfur limitation1) است. این فاکتور رونویسی یک عامل کلیدی در متابولیسم سولفور است (Kawashima et al., 2005 & 2009) که بیان miR395 را کنترل می‌کند و این miRNA با هدف قرار دادن ژن‌های هدف خود در بافت برگ و ریشه متابولیسم سولفور در گیاه را تنظیم می‌کند (Mica et al., 2009). این miRNA بیان ژن CSD1 را به

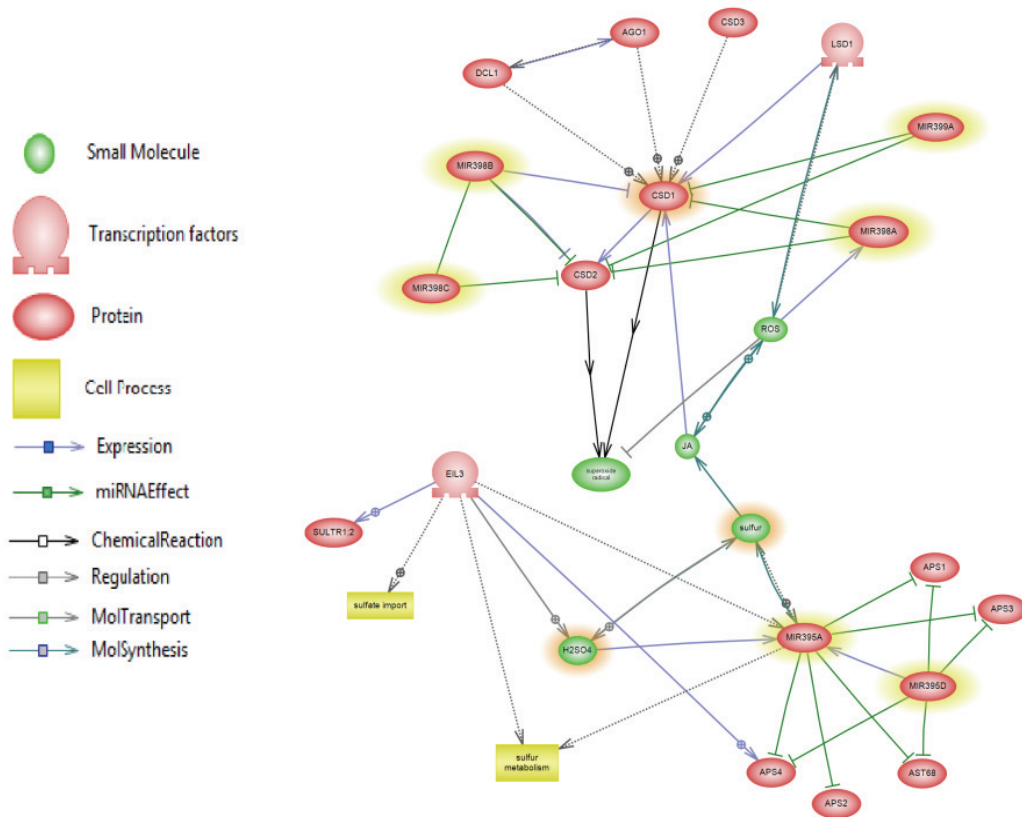
زنده می‌گردد (Scherer, 2001; Knop et al., 2007). کمبود گوگرد نه تنها عملکرد بلکه کیفیت محصولات غذایی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. همانگونه که گفته شد، فقر گوگرد با کاهش در میزان ترکیبات دفاعی محتوی گوگرد موجب کاهش مقاومت گیاه می‌گردد، در حالیکه کودهای دارای گوگرد باعث افزایش مقاومت گیاه به پاتوژنها و استرس‌ها می‌گردند. به این فرایند مقاومت القایی گوگرد اطلاق می‌گردد.

تنش‌های محیطی موجب تولید مقادیر بالایی از گونه‌هایی از اکسیژن واکنشگر Reactive Oxygen Species (ROS) در موجودات زنده گردیده که این پدیده می‌تواند 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 سیستم‌های پیچیده آنتی اکسیداتیو را توسعه داده‌اند (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 می‌کند که بعدا توسط کاتالازها تجزیه می‌شود و تولید آب و اکسیژن مولکولی می‌نماید و بدین ترتیب سلولها را از خطرات و آسیب‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند (Hadji Sfaxi et al., 2012).

خسارت اکسیداتیو در رشته‌های DNA بصورت جهش و تغییر در بیان ژنها بروز و ظهور می‌کند. سوپراکساید دیسموتاز بعنوان آنزیم مهمی در تقلیل سمیت واسطه‌های رادیکال‌های اکسیژن شناخته و معرفی شده است. چهار نوع از SOD ها بر اساس طبیعت کوفاکتور فلزی موجود در مکان کاتالیتیک شناسایی شده‌اند. این ۴ نوع شامل Fe-SOD، Cu&Zn-SOD، Mn-SOD و Ni-SOD می‌باشند (Pagani et al., 1995). براساس نتایج این

واسطه JA (جاسمونیک اسید) به صورت غیرمستقیم تحت تاثیر قرار می‌دهد (شکل ۵) این امر حاکی از پیچیدگی عوامل تنظیم کننده این ژن است.



شکل ۵- شبکه ترسیمی ژن CSD1 و گوگرد

که بخشی از اثرات دارویی سیر بدلیل ترکیبات گوگردی آن است، بررسی این عوامل کلیدی در آینده بسیار حائز اهمیت است. یافته‌های این تحقیق می‌تواند برای مطالعات جامع مهندسی متابولیک مواد موثره سیر و نیز تحقیقات بعدی در خصوص فعالیت ژن‌های مرتبط با تنش‌های غیر زیستی در سیر به کار گرفته شود.

بررسی شبکه ژن CSD1 نشان داد که miRNA ها و فاکتورهای رونویسی مهم و کلیدی، بیان این ژن مهم درگیر در مسیر متابولیکی گوگرد را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بیان متفاوت مشاهده شده این ژن در غلظت‌های متفاوت گوگرد، می‌تواند بدلیل تغییرات بیانی سریع عوامل تنظیم کننده آن باشد که با تنظیم بیان ژن‌های هدف خود، شبکه‌های سیگنالینگ را در بافت‌های مختلف کنترل می‌کنند. با توجه به این امر

منابع

- 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. and Tanaka T. (2010). The cyclic organosulfur compound zwibelane 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*, 214: 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 NE* 8(11): 79730.
- Chen S., Chen W., Shen X., Yang Y., Qi F., Liu Yan. and 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 agromorphological traits. *Analytical Biochemistry*, 260 - 267.
- FAOSTAT, data. <http://apps.fao.org/default.htm> (Access June 12th, 2014).
- Filiz E. and Tombuloğlu H. (2015). "Genome-wide distribution of superoxide dismutase (SOD) gene families in *Sorghum bicolor* ", *Turkish Journal of Biology*. 39, pp. 49- 59.
- Fleischauer A.T., Poole C. and Arab L. (2000). Garlic consumption and cancer prevention: meta analyses of colorectal and stomach cancers. *American Journal of Clinical Nutrition* ,72:1047–1052.
- Foyer C.H. and 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. and 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. and 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. and 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 Journal*, 57:313-321.
- Kebeish R., Hanan E. and 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. and Schulz M. (2007). *Zea mays* : benzoxazolinone detoxification under sulfur deficiency conditions — a complex allelopathic alliance including endophytic *Fusarium verticillioides* *Journal of Chemical Ecology* 33: 225–237.
- Komarnisky L.A., Christopherson R.J. and Basu T.K. (2003). Sulfur: its clinical and toxicologic aspects. *Nutrition* 19 : 54–61.
- Kruse C., Jost R., Lipschis M., Kopp B., Hartmann M. and 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. (2010). Changes in external pH rapidly alter plant gene expression 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. and Baggett J.R. (1995). Inheritance of soluble solids and pyruvic acid content of bulb onions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120:119–122.
- 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 Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annu. Rev. Plant Biology*, 61: 443-462.
- Nikitin A., Egorov S., Daraselia N. and 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 total Garlic thiosulfinates 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. and 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 C.P., Xu Z.R., Liu G.J., Liu C., Li Y., Wei Z.G. and Liu G.F. (2010). Differential expression of copper-zinc superoxide dismutase gene of *Polygonum sibiricum* leaves, stems, and underground stems, subjected to high-salt stress. *International Journal of Molecular Science*, 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. Sulphur in crop production. *European Journal of Agronomy*, 14 : 81– 111.
- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessaraki M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 217037.
- Wawrzyńska A. and 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. and 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.