



تأثیر منگنز بر بیان ژن فلاوون سنتاز و میزان ترکیبات فلاوونوئیدی زیره سبز

نجیبه محمودی^۱، لیلا فهمیده^۲ و صدیقه اسمعیل زاده بهابادی^۳

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه زابل
۲- استادیار، دانشگاه زابل، (نویسنده مسوول: l.fahmideh@uoz.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۳۰

چکیده

فلاوون‌ها زیرگروهی از فلاوونوئیدها هستند که دارای تنوع وسیعی می‌باشند و در حفاظت گیاهان در مقابل نور ماورای بنفش و همچنین در درمان بیماری‌های انسانی نقش دارند. به منظور مشخص کردن بیان ژن فلاوون سنتاز (FNS1) و ترکیبات فلاوونوئیدی گیاه زیره سبز تحت تنش عنصر سنگین منگنز، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردید. گیاهچه‌های ۱۸ روزه زیره سبز توسط عنصر منگنز با غلظت ۸۰ ppm تیمار شدند و در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴ روز پس از اعمال تنش منگنز برداشت شدند. بیان ژن FNS1 به روش RT-PCR و میزان ترکیبات فلاوونوئیدی و آنتوسیانین توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد. نتایج این بررسی نشان داد که بیشترین مقدار بیان ژن و میزان ترکیبات فلاوونوئیدی و آنتوسیانین ۲ روز بعد از اعمال تنش منگنز بود. از مجموع نتایج چنین استنباط می‌شود که افزایش بیان FNS1 و محتوای فلاوونوئیدی و آنتوسیانین ۲ روز بعد از اعمال تنش، نتیجه اعمال تنش اکسیداتیو حاصل از جذب این عنصر و فعال شدن سیستم آنتی اکسیدانی گیاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، ترکیبات فلاوونوئیدی، تنش، منگنز، زیره سبز

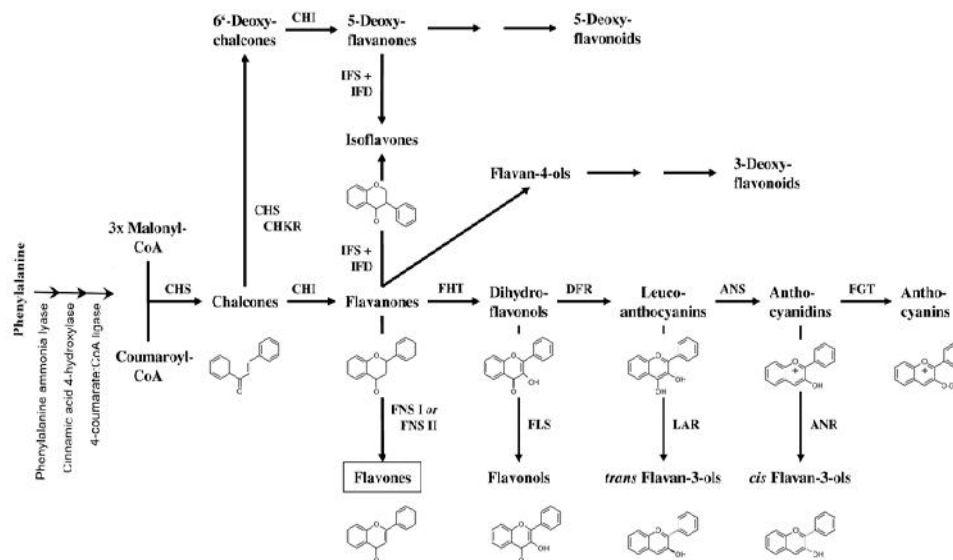
مقدمه

زیره سبز با نام علمی (*Cuminum cyminum*) از خانواده چتریان (*Apiaceae*) و سرشار از متابولیت‌های ثانویه است. اهمیت اقتصادی زیره سبز به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی از قبیل فصل رشد کوتاه، نیاز آبی کم، عدم تداخل فصل رشد آن با سایر محصولات کشاورزی، توجه اقتصادی آن نسبت به دیگر محصولات کشاورزی و زراعی و صادراتی بودن آن می‌باشد (۱۶). اسانس این گیاه شامل ترکیباتی نظیر تانن، رزین، آلورن، سیمن، فلاندون و کارون است. ماده اصلی تشکیل دهنده اسانس آلدئید کومینیک یا کومینول می‌باشد (۲۳). فلزات سنگین از آلاینده‌های مهم محیط زیست به شمار می‌روند که عمدتاً از فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی بشر منشأ می‌گیرند. حضور آنها در اتمسفر، آب و خاک حتی در غلظت‌های بسیار پایین و انباشته شدن این آلاینده‌ها در زنجیره غذایی می‌تواند زندگی بشر را به مخاطره بیندازد (۱۱). تنش‌ها به هر عامل یا ترکیبی از عوامل محیطی اطلاق می‌شود که باعث شود گیاه نتواند به اندازه توان بالقوه ژنتیکی خود رشد کند. یکی از این تنش‌ها آلودگی محیط رویش گیاهان به فلزات سنگین است. سیستم‌های دفاعی متعددی در فائق آمدن گیاهان به شرایط تنش‌زا با یکدیگر همکاری می‌کنند. یکی از علت‌های مهم آسیب بافتی در گیاهانی که در معرض فلزات سنگین قرار می‌گیرند ایجاد تنش اکسیداتیو است. فلزات سنگین در تنش اکسیداتیو با تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن باعث آسیب به DNA، پروتئین‌های ساختاری و لیپیدها می‌شوند (۱). رادیکال‌های اکسیژن عمدتاً در کلروپلاست و میتوکندری تولید می‌شوند و با ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو بر چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای

نوکلئیک سبب اختلال در متابولیسم طبیعی سلول، اختلال در فرایندهای مهم تنفس و فتوسنتز و کاهش رشد می‌شوند (۱۳). منگنز از جمله عناصر سنگین است که با فعال ساختن ایندول استیک اسید اکسیدازها سبب اکسایش ایندول استیک می‌شود. وجود منگنز در فتوسیستم ۲ که در واکنش‌های تجزیه آب شرکت می‌کند، نیز ضروری می‌باشد (۱۲). با این حال غلظت‌های بالای منگنز برای گیاه سمی بوده و در برخی از خاک‌ها، از جمله خاک‌های اسیدی و آتشفشانی، احیای بیش از حد این عنصر به سمیت منگنز در بسیاری از خاک‌های مرتعی و کشاورزی منجر می‌شود (۱۷). بسیاری از ژن‌های مربوط به آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوستز متابولیت‌های ثانویه، شناسایی و تعیین توالی شده‌اند (۵). تنش فلزات سنگین باعث تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند اسید آسکوربیک، کارتنوئیدها، ویتامین E، پلی‌آمین‌ها، آلکالوئیدها، فلاوونوئیدها و آنتوسیانین‌ها (۷) شده که ROS را جاروب نموده و مانع آسیب رساندن آن‌ها به پروتئین‌های غشاء و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (۲۲). همزمان با بیوستز فلاوونوئیدها ترکیبات متنوع دیگری از قبیل فلاوون‌ها و آنتوسیانین‌ها بواسطه فعالیت آنزیم‌های مسیر سنتز می‌شوند (۶). فلاوون‌ها از مهمترین مشتقات فلاوونوئیدها می‌باشند که نقش ویژه‌ای در گیاهان برای حفاظت در مقابل نور ماورای بنفش، رنگ آمیزی گل‌ها، برهم کنش درون گونه‌ای دفاع و استحکام گیاه دارند (۱۵). این ترکیبات همچنین در درمان و سلامتی انسان اهمیت دارند و در برهم کنش گیاهان با سایر ریزسازواره‌ها اثر می‌گذارند (۱۴، ۳). مسیر بیوستزی فلاوون‌ها تحت اثر دو سیستم آنزیمی مستقل فلاوون سنتاز ۱ و فلاوون سنتاز ۲ در گیاهان مختلف صورت می‌گیرد که به طور همزمان

خانواده چتریان در برنج (۸) از خانواده گرامینه گزارش شد. در این تحقیق بیان ژن فلاوون سنتاز و متابولیت‌های ثانویه گیاه زیره سبز تحت تأثیر منگنز مورد بررسی قرار گرفت.

در یک گیاه یافت نمی‌شوند (شکل ۱). فلاوون سنتاز ۱ یک دی‌اکسیژن از محلول است که اولین بار در سال ۱۹۸۱ در گیاه جعفری از خانواده چتریان گزارش گردید (۱۸) و خارج از



شکل ۱- شمای کلی مسیر بیوسنتزی فلاوونوئیدها که در آن محصول آنزیم FNS (فلاوون) مشخص شده است (۴)
Figure 1. Flavonoids biosynthetic pathway in which the enzyme product FNS (flavones) specified (4)

استخراج شده به تیوب‌های ۰/۲ اضافه شد، در ادامه پس از اضافه نمودن ۱ میکرولیتر پرایمر عمومی Oligo dT به تیوب‌ها، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از انتقال تیوب‌ها به روی یخ، مقدار ۴ میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT)، مقدار MMuLV، ۰/۵ میکرولیتر بافر رونوشت (10X)، ۱ میکرولیتر dNTP، ۰/۷۵ میکرولیتر RNase inhibitor، و در نهایت آب دیونیزه استریل عاری از نوکلئاز به تیوب‌ها اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش ساخت cDNA به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در انتهای واکنش به منظور حذف اثر RT، تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تکثیر ژن فلاوون سنتاز و تیوبولین (به عنوان شاهد داخلی) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها انجام شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن فلاوون سنتاز با شاهد داخلی (تیوبولین)، مقدار مساوی از محصول PCR ژن تیوبولین و ژن فلاوون سنتاز (تمام نمونه‌های شاهد و تیمار منگنز از روز اول، روز دوم، روز سوم و روز چهارم)، بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و از روی شدت باند تکثیر شده و با روش نیمه کمی RT-PCR و با استفاده از Gene Analysis مورد مقایسه قرار گرفتند.

۳- مشخصات توالی ژن فلاوون سنتاز

توالی مربوط به ژن فلاوون سنتاز ۱ براساس توالی این ژن از گیاه زیره سبز با شماره دسترسی DQ683349 ثبت شده

مواد و روش‌ها

این تحقیق در بهار سال ۱۳۹۳ در مرکز زیست پژوهشی دانشگاه زابل انجام شد.

۱- کشت بذر و تولید گیاهچه

بذرهای ژنوتیپ زراعی زیره سبز از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری و به منظور جوانه‌زنی و تولید گیاهچه، در گلدان‌های حاوی خاک نسبتاً سبک (مخلوط خاک متشکل از نسبت مساوی ماسه الک شده، رس، گیاه خاک و کود) به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار و ۲ شرایط کشت (همراه با تیمار منگنز و بدون تیمار منگنز) کشت شدند. پس از رسیدن گیاه به مرحله ۲ برگی محلولپاشی منگنز با غلظت ۸۰ ppm انجام شد. یک روز بعد از اعمال تیمار منگنز نمونه برداری شروع و تا روز چهارم بطور متوالی اندام هوایی گیاه (برگ‌ها و ساقه‌ها) جمع‌آوری و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲- بررسی بیان ژن و انجام روش مولکولی

برای بررسی بیان ژن فلاوون سنتاز ۱، استخراج RNA کل از نمونه‌های فریز شده با استفاده از کیت RNA XPlus شرکت سیناژن انجام شد. سپس کیفیت RNA بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. از RNA استخراج شده با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس (MMuLV) و پرایمرهای عمومی Oligo dT، cDNA ساخته شد. این واکنش با استفاده از کیت-2 stepRT-PCR ساخت شرکت Vivantis انجام شد. بدین ترتیب که به منظور ساخت cDNA، ابتدا ۵ میکرولیتر از RNA

طراحی آغازگر به شرکت کیفیت طب سفارش داده شد (جدول ۱).

در Bank Gene و توالی پرایمرهای مربوط به ژن تیوبولین براساس توالی ژن تیوبولین گیاه گندم با شماره دسترسی DQ435671.1 ثبت شده در Gene Bank طراحی شد و جهت

جدول ۱- توالی آغازگر های اختصاصی ژن های FNS و TUB

TM	GC	توالی آغازگر	آغازگر
58/4	40/91	5-ATG GCT CCA ACA ATT ACTG-3	FNS1-F
55/5	38/1	5-CAT AGCTAA AAT TCC ATC TGC-3	FNS1-R
63/16	61/7	5-GGGCGTAG GAG GAA AGC A-3	TUB-F
40/0	54/3	5-GGT TTC AAC AAC TTC TTC AG-3	TUB-R

اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۵۰ نانومتر و با ضریب خاموشی $x=3300\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ انجام شد و بر حسب $\mu\text{M/gfw}$ گزارش شد. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار مستقل انجام شده و پس از اندازه گیری غلظت های مختلف، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

نتایج و بحث

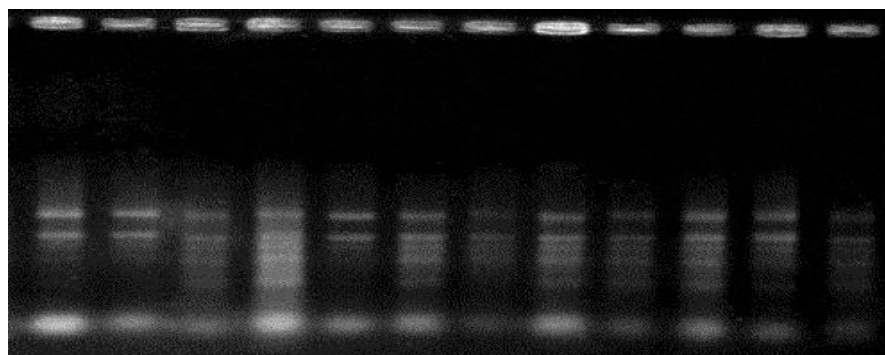
نتایج استخراج RNA کل

RNA گیاهی با کیفیت عالی و دارای باندهای srRNA ۲۸ و ۱۸ srRNA بر روی ژل مشاهده شد (شکل ۲).

۴- تعیین میزان ترکیبات فلاوونوئیدی و آنتوسیانین

میزان ترکیبات فلاوونوئیدی و آنتوسیانین برای نمونه های شاهد، روز اول، دوم، سوم و چهارم بعد از اعمال تیمار منگنز بررسی شد. جهت اندازه گیری ترکیبات فلاوونوئیدی از روش کریزک و همکاران (۱۰) استفاده شد، میزان جذب عصاره توسط اسپکتروفتومتر (Varian, Carry50) در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر و با ضریب خاموشی $x=3300\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ انجام و بر حسب $\mu\text{M/gfw}$ گزارش گردید.

اندازه گیری محتوی آنتوسیانین با استفاده از روش کریزک و همکاران (۹) انجام شد. میزان جذب نمونه ها توسط



شکل ۲- RNA استخراج شده دارای دو باند ۲۸ s و ۱۸ s
Figure 2. RNA extracted with dual-band 28s and 18s

مارکر در وسط ژل و قراردادن ژن اصلی با ۵ تیمار (شاهد، روز اول، دوم، سوم و چهارم بعد از اعمال تیمار منگنز) در سمت چپ ژل و ژن مرجع با همین تیمارها و در سمت راست ژل، و با در نظر گرفتن سه تکرار برای بررسی بیان ژن اصلی و ژن مرجع انجام شد.

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن اصلی و مرجع

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن FNS1 و Tubulin در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که اثر بلوک برای هر دو ژن مورد بررسی معنی دار نبود. بین تیمارهای مورد بررسی (شاهد: بدون تیمار منگنز، روز اول، دوم، سوم و چهارم بعد از اعمال تیمار منگنز) برای ژن مرجع تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ولی برای ژن اصلی (FNS1) تفاوت معنی دار در سطح یک درصد مشاهده شد.

نتایج مربوط به PCR شیب دمایی

جهت تعیین دمای بهینه برای اتصال آغازگرهای ژن FNS₁ و ژن مرجع Tubulin، گرادیان دمایی به طور جداگانه برای ژن اصلی و ژن مرجع (گرادیان دمایی مختص خود) در نظر گرفته شد و سپس نتایج حاصله روی ژل آغاز ۱ درصد مشاهده شد. بر اساس نتایج، دمای مناسب اتصال پرایمرها برای ژن FNS₁، ۵۱ درجه سانتی گراد و برای ژن Tubulin، ۵۵ درجه سانتی گراد انتخاب شد.

برای تمامی نمونه ها PCR توسط آغازگرهای هردو ژن (ژن FNS₁ و Tubulin) انجام شد و در هر دو مورد وجود باند اختصاصی با اندازه مورد نظر و فاقد باندهای اضافی تأیید کننده موفقیت آمیز بودن سنتز cDNA بود. بیان ژن FNS₁ و تیوبولین با تشکیل باندهای اختصاصی و با قراردادن سایز

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس بیان ژن اصلی و مرجع

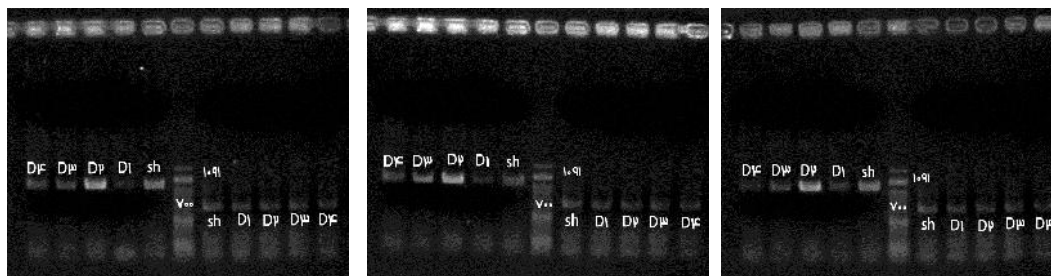
Table 2. The results of analysis of variance for FNS1 and reference gene expression

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
بیان ژن Tubulin	بیان ژن FNS1		
۱/۶۶ ^{ns}	۱۰/۳ ^{ns}	۲	بلوک
۳/۳۳ ^{**}	۱۵۶۲/۸ ^{**}	۴	تیمار
۳/۰۲	۶۸/۷	۸	خطا
۱/۵	۸/۴۵	-	CV
۶۸/۳	۹۸	-	میانگین

ns, * و ** به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد تیمارها شامل: شاهد، روز اول، دوم، سوم و چهارم بعد از اعمال تیمار منگنز

افزایش چشمگیری نسبت به شاهد و روز زمان اول نشان داد. در روزهای سوم و چهارم نیز بیان ژن اصلی FNS1 کاهش یافت، به طوری که در روز چهارم کاهش بیان ژن اصلی شدیدتر بوده است. در سمت راست Ladder بیان ژن Tubolin با طول قطعه ۷۰۰bp در تمامی تیمارها یکسان بود، که صحت کار را بیان می‌کند.

نتایج بیان ژن اصلی و مرجع در تکرار اول
طول قطعه ژن اصلی و ژن مرجع معادل باند اختصاصی Ladder به ترتیب ۱۰۹۱ bp و ۷۰۰bp (شکل ۳) اولین باند مربوط به تیمار شاهد بود که ژن اصلی در آن بیان شده است. دومین باند مربوط به روز اول بوده که بیان ژن FNS1 نسبت به شاهد کاهش زیادی داشته است. اما در روز دوم بیان ژن،



شکل ۳- نمونه‌ای از ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن FNS1 و تیوبولین، از چپ به راست به ترتیب برای تکرار اول، دوم و سوم Sh, D1, D2, D3, D4 به ترتیب مربوط به نمونه شاهد، روز اول، روز دوم، روز سوم و روز چهارم است

Figure 3. The example of agarose gel for FNS1 and reference gene amplification. From left to right in order to repeat of the first, second and third. Sh, D1, D2, D3, D4, respectively the control, first day, second day, third day and fourth day

چشمگیری از تیمار شاهد بیشتر بود. در روزهای سوم و چهارم نیز همانند تکرار اول و دوم کاهش بیان ژن مشاهده شد. در این تکرار هم ژن مرجع Tubulin هم در شاهد و زمان‌های مختلف یکسان بیان شد.

نتایج تجزیه مقایسه میانگین بیان ژن اصلی

براساس نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴) برای سه تکرار مورد مطالعه، میزان بیان ژن در روز دوم بعد از اعمال تیمار منگنز با بیشترین مقدار در گروه نخست قرار گرفت و روز اول و چهارم بعد از اعمال تیمار منگنز کمترین مقدار را نشان داد.

نتایج بررسی میزان ترکیبات فلاونوئیدی و محتوی آنتوسیانین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۳ نشان داده شده است. براساس نتایج حاصله اثر تیمار برای فاکتورهای مورد بررسی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. تأثیر منگنز بر فعالیت آنتوسیانین در زمان‌های مختلف متفاوت بود (شکل ۵)، بطوریکه میزان آنتوسیانین در نمونه شاهد کمتر از روز اول بود، در روز دوم نسبت به روز اول باز هم میزان آنتوسیانین افزایش داشت و به بیشترین مقدار رسید. اما در روزهای سوم و چهارم میزان فعالیت آن سیر نزولی داشت و کاهش یافت،

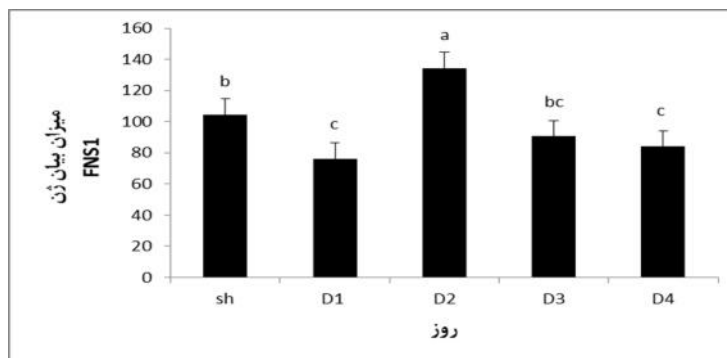
نتایج بیان ژن اصلی و مرجع در تکرار دوم

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود طول قطعه باندهای ژن اصلی و ژن مرجع معادل با طول قطعه باند Ladder است. در سمت چپ Ladder ژن اصلی FNS1 قرار داشت که باند تشکیل شده در تیمار شاهد، بیان ژن FNS1 به میزان کم را مشخص کرد. در روز اول میزان شدت بیان ژن FNS1 کاهش یافت و در روز دوم میزان بیان ژن اصلی به شدت افزایش نشان داد، همچنین در روزهای سوم و چهارم مجدداً کاهش بیان ژن FNS1 مشاهده شد. اما در این تکرار نسبت به تکرار اول، در روز چهارم بیان ژن اصلی به میزان کمتری کاهش نشان داد. بیان ژن Tubulin در سمت راست Ladder با طول قطعه ۷۰۰bp همانند تکرار اول در تمامی تیمارها یکسان بود.

نتایج بیان ژن اصلی و مرجع در تکرار سوم

در شکل ۳ باندهای اختصاصی ژن اصلی و ژن مرجع معادل باند ژن مینا یا Ladder با طول قطعات مشخص می‌باشد. در تیمار شاهد، ژن FNS1 بیان شد و در روز اول به شدت بیان ژن کاهش یافت ولی در روز دوم مجدداً افزایش بیان ژن دیده شد که این افزایش بیان ژن به مقدار

به طوری که در روز چهارم میزان فعالیت آنتوسیانین به کمترین مقدار رسید. در نتیجه بیشترین میزان فعالیت آنتوسیانین در روز دوم و کمترین میزان آن، در روز چهارم بعد از اعمال تیمار منگنز مشاهده شد.



شکل ۴- تأثیر منگنز بر میزان بیان ژن FNS1 در نمونه شاهد و روزهای مختلف. Sh, D1, D2, D3 و D4 به ترتیب مربوط به نمونه شاهد، روز اول، روز دوم، روز سوم و روز چهارم است.

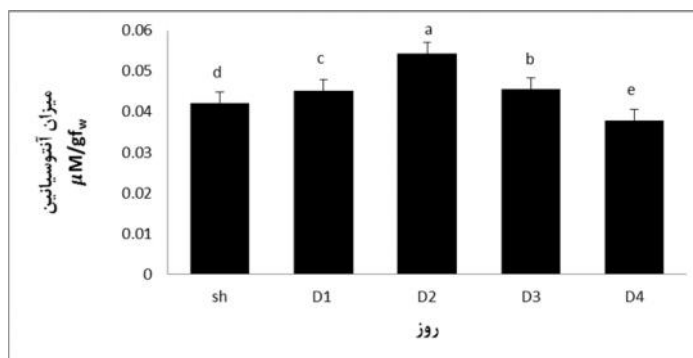
Figure 4. Manganese effects on FNS1 gene expression in control samples and different days. Sh, D1, D2, D3, D4, respectively the control, first day, second day, third day and fourth day

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس آنزیم های مورد مطالعه

Table 3. The results of analysis of variance for studied enzymes

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
محتوی فلاوونوئید	۲	بلوک
۰/۰۰۵ ^{ns}	۴	تیمار
۰/۰۱ ^{ns}	۸	خطا
۰/۰۰۰۵	-	CV
۰/۱۰۵	-	میانگین
۰/۷۳۵	-	

ns و **: به ترتیب عدم اختلاف معنی دار، اختلاف معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد تیمارها شامل: شاهد، روز اول، دوم، سوم و چهارم بعد از اعمال تیمار منگنز

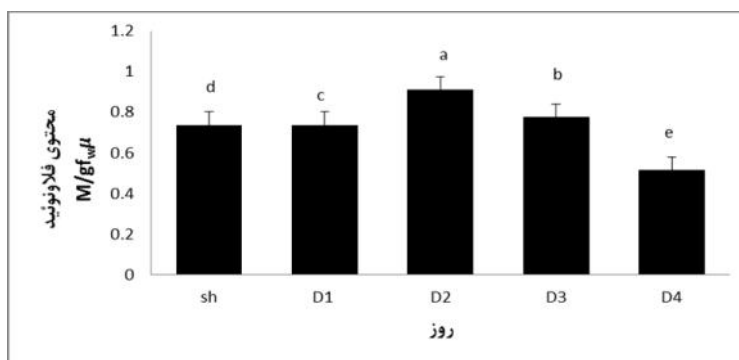


شکل ۵- تأثیر منگنز بر میزان فعالیت آنتوسیانین در نمونه شاهد و روزهای مختلف. Sh, D1, D2, D3 و D4 به ترتیب مربوط به نمونه شاهد، روز اول، روز دوم، روز سوم و روز چهارم است.

Figure 5. Manganese effects on activity of anthocyanin in control samples and different days. Sh, D1, D2, D3, D4, respectively the control, first day, second day, third day and fourth day

روزهای سوم و چهارم میزان این ترکیبات مجدداً کاهش یافت. لذا بیشترین مقدار ترکیبات فلاوونوئیدی پس از اعمال تنش منگنز در روز دوم و کمترین میزان این ترکیبات در روز چهارم بعد از اعمال تیمار منگنز مشاهده شد.

میزان ترکیبات فلاوونوئیدی در نمونه شاهد و تیمارها متفاوت بود (شکل ۶). در روز اول فقط مقداری بسیار کم به میزان ترکیبات فلاوونوئیدی افزوده شد. در روز دوم میزان ترکیبات فلاوونوئیدی به طور چشمگیری افزایش یافت و در



شکل ۶- تأثیر منگنز بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی در نمونه شاهد و روزهای مختلف. D1، D2، D3 و D4 به ترتیب مربوط به نمونه شاهد، روز اول، روز دوم، روز سوم و روز چهارم است.

Figure 6. Manganese effects on flavonoid compounds in control samples and different days. Sh, D1, D2, D3, D4, respectively the control, first day, second day, third day and fourth day

گلدهی بر روی بیان ژن لیمون سنتاز در گیاه زیره سبز بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که غلظت ۸۰ppm منگنز در مرحله گلدهی بیشترین میزان بیان ژن لیمون سنتاز را سبب شد. نتایج آنها با نتایج این تحقیق که مشابه بود. کاهش اثرات تنش، توسط فلاونوئیدها به دلیل اتصال ترکیبات فنولیک با یونهای فلزات سنگین مرتبط می باشد (۲). همانند فلاونوئیدها با اعمال تنش منگنز، محتوی آنتوسیانین نیز در روز دوم افزایش یافت. آنتوسیانینها که در انتهای مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها ساخته می شوند، در گیاهان نقش حفاظتی در برابر اشعه ماورای بنفش، خشکی، سرما و فلزات سنگین بر عهده دارند (۷). از مجموع نتایج چنین استنباط می شود که حضور فلز منگنز در محیط باعث تولید گونه های فعال اکسیژن شده، به طوری که گیاه با افزایش بیوسنتز فلاونوئیدها و آنتوسیانین سعی در کاهش تنش های حاصله دارد و نتیجه بدست آمده با گزارشات تانگ و همکاران (۲۱) و ساویتا و همکاران (۱۹) مشابه است. لذا استفاده از این فلز برای مطالعات آتی و مشابه این تحقیق جهت تولید متابولیت های ثانویه با ارزش دارویی بالا از قبیل فلاون ها پیشنهاد می شود.

مطالعات قبلی نشان داده است که در حضور فلزات سنگین نه تنها ترکیبات خاص (آنتی اکسیدان)، بلکه ژن های درگیر در بیان آنزیم های کاتالیزکننده آن ها نیز فعال می شوند (۱۹). از آنجا که یکی از خصوصیات مهم فلاونوئیدها مقاومت به تنش های گوناگون از قبیل سرما، گرما، خشکی، اشعه ماورای بنفش و فلزات سنگین می باشد (۲۰). لذا در این مطالعه با توجه به اهمیت آنتی اکسیدانی فلاون ها، بیان ژن فلاون سنتاز ۱ در مسیر بیوسنتز این ترکیبات در گیاهچه های تیمار شده زیره سبز با عنصر منگنز مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج حاصله از بررسی بیان ژن فلاون سنتاز ۱ در ۳ تکرار متوالی، مشاهده شد که بیان این ژن در روز دوم به شدت افزایش یافت و به تدریج با افزایش زمان اعمال تیمار از زمان دوم به سمت زمان های سوم و چهارم، بیان ژن کاهش نشان داد. لذا بیشترین میزان بیان ژن فلاون سنتاز در گیاه زیره سبز، در این مطالعه دو روز بعد از اعمال تنش منگنز بود. بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی نیز در روز دوم مشاهده شد که در واقع نتیجه مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده بود. زرین کمر و همکاران (۲۴) در مطالعه ای غلظت های مختلف منگنز (۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ ppm) را در دو مرحله گیاهچه ای و

منابع

1. Ajith, T.A. and K.K. Janardhanan. 2007. Indian medicinal mushroom as a source of antioxidant and antitumor agents. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40: 157-162.
2. Babu, T.S. 2003. Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *lemna gibba*: implication of reactive oxygen as common signals. *Plant Cell Physiol*, 44: 13-20
3. Brundrett, M.C. 2002. coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154: 275-304.
4. Hahlbrock, K. and H. Griseback. 1979. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 30: 105-130.
5. Harborne, T.B. and C.A. Williams. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
6. Heller, W. and G. Forkmann. 1986. Biosynthesis of flavonoids, in *The Flavonoids: Advances in Research*, Harborne, J.B., Ed., Chapman and Hall, London, 1944, 499.
7. Hsieh, T.H. T.T. Lee, Y.Y. Charge and M.T. Chan. 2002. How to define resistance to water deficit stress? *Plant physiology*, 130: 618-626.
8. Jung, Y., L. Jeong, H. Kim, B. Gyu Kim, Y. Lim and T.H. Ahn. 2007. Characterization of Flavone synthase I from rice, *BMB reports*, Seoul Korea, 143-701.
9. Krizek, D.T., G.F. Kramer and A. Upadyaya. 1993. UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps *Physiol Plant*, 88: 350-358.
10. Krizek, D.T., S.J. Britz and R.M. Mirecki. 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.
11. Mathe-Gaspar, G. and A. Anton. 2002. Heavy metal uptake by two radish varieties. *Acta Biologica Szegediensis*, 46: 113-114.
12. Mengel, K. and A. Kirkby. 1997. *Plant nutrition principles*. Translated by Salardini. Tehran Markaze Nashre Daneshgahi Press Tehran. 315 pp (In Persian).
13. Meshra S., S. Srivastava and P.D. Tripathi. 2006. Phytochelatin Synthesis and response of antioxidant during cadmium stress in *Bacopa monnieri*. *Plant Physiol. Biochem*, 44: 25-37.
14. Middleton, E., T.C. Kandaswami and T.C. Theoharides. 2000. Flavonoids on mammalian cells: implication, heart disease, and cancer, *Pharmacological Reviews*, 6: 73-75.
15. Prabhat, K. 2007. *metabolic engineering of yeast for the Production of Plant secondary metabolites*, Research Exercise Summary, 4: 27-39.
16. Rahimian Mashhadi, H. 1991. The effects of cultivation date and irrigation system on green cumin growth and yield. *Journal of agricultural science*, 3: 46-61 (In Persian).
17. Rezaie, K. and T. Farbodnia. 2008. The response of pea plant to manganese toxicity in solution culture. *Journal of Agricultural Science*, 3: 248-257.
18. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller and G. Paganga. 1997. Antioxidant Properties of Phenolic compound. *Trends Plants Science*, 2: 152-155.
19. Savitha, B.C., R. Thimmaraju, N. Bhagyakshmi and G.A. Ravishankar. 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.
20. Stapleton, A.E. 1999. Ultra Violet radiation and plants: burning question, *Plant Cell*, 4: 1353.
21. Tang, L., S.Y. Kwon, S.H. Kim, I.S. Kim, I.S. Choi, K.Y. Cho, C.K. Sung, S. Kwak and H.S. Lee. 2006. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both Superoxide dismutase and catalase against oxidative stress and high temperature, *Plant Cell Report*, 25: 1380-1386.
22. Walker, C., D. Webi, A.D. Robson and R.D. Graham (Eds). 1981. *Copper in soils and plants*. Academic Press, 189-212.
23. Zargari, A. 1997. *Medicinal plants*. Tehran university press. Second volume, 985 pp (In Persian).
24. Zarinkamar, F., M. Ghannadnia and R. Haddad. 2012. Limonene synthase gene expression under different concentrations of manganese in *cuminum cyminum* L. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6: 1437-1446.

Manganese Effect on Gene Expression of Flavones Synthetize and Flavonoids Amounts in *Cuminum Cuminum*

Najibeh Mahmodi¹, Leila Fahmideh² and Sedigheh Esmailzadeh Bahabadi³

1 and 3- M.Sc. Student and Assistant Professor, University of Zabol
2- Assistant Professor, University of Zabol (Corresponding author: l.fahmideh@uoz.ac.ir)
Received: January 19, 2015 Accepted: April 19, 2015

Abstract

The flavones are sub-group of flavonoids with wide varieties. Also they protect plants against UV, also have a role in treating human diseases. The test has been performed in a randomized complete block design with 3 replications for expression of flavone synthetize gene (FNS1) and flavonoids compounds in cumin. 18-day-old cumin seedlings were treated. They were harvested in times of 1, 2, 3 and 4 days after the stress treatment of manganese. FNS1 gene expression and composition of flavonoids and anthocyanin were measured by RT-PCR and spectrophotometer respectively. The results showed that the highest amount of gene expression, flavonoids amounts and anthocyanin were observed at 2nd day after manganese stress. The results suggests that the content of FNS1 expression, flavonoids and anthocyanin, especially during the 2 days of stress, after oxidative stress which resulting from the absorption of the active element of the system of antioxidant plant.

Keywords: Cumin, Flavonoid compounds, Gene expression, Manganese, Stress