نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۶، شماره ۲، صفحه ۲۲۶-۲۰۹ (۱۳۹۹)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2020.128207.2658
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1399.36.209.100.2.1575.41

اثر تنش خشکی بر محتوای فیتواسترول‌ها و ژن‌های کلیدی درگیر در مسیر سنتز بتاسیتوسترول در گیاه دارویی کدوی تخم‌کاغذی (*Cucurbita pepo* L.)

محمد زینالی[1*]، بهرام ملکی زنجانی[2]، پرویز مرادی[3]، فرید شکاری[2] و سیدمحسن نیازخانی[4]

۱*- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته دکترا، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

پست الکترونیک: Mzeynali.kh@gmail.com

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران

۴- دانش‌آموخته دکترا، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۸ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

چکیده

تنش‌های زیستی ازجمله خشکی بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه استرول‌های گیاهی (فیتواسترول‌ها) اثر می‌گذارد. در بین فیتواسترول‌های موجود در کدوی تخم‌کاغذی، بتاسیتوسترول از مهمترین مواد مؤثره در آن است که خواص دارویی زیادی نیز دارد. در این مطالعه، اثر پنج سطح تنش خشکی بر روی میزان تولید روغن بذر و فیتواسترول‌های موجود در آن در سه ژنوتیپ و رقم استریاکای کدوی تخم‌کاغذی (*Cucurbita pepo* L.) مطالعه شد. تجزیه فیتواسترول‌ها با استفاده از GC/MS نشان داد که افزایش میزان تنش خشکی اثر منفی بر میزان تولید روغن حاصل از بذر رسیده کدوی تخم‌کاغذی داشت ولی فیتواسترول‌های تشکیل‌دهنده روغن به‌ویژه بتاسیتوسترول افزایش یافتند و این افزایش در رقم استریاکا (Styriaca) از بقیه ژنوتیپ‌ها بیشتر بود. برای تأیید این نتایج، ۳۰-۱۵ روز بعد از گلدهی دانه‌های آن برداشت و میزان بیان ژن‌های SQS، PP2A، SMT2، ERG26 و Cycloartenol synthase درگیر در مسیر سنتز فیتواسترول‌ها بررسی شد. نتایج مشخص کرد که در بین سطوح مختلف تنش خشکی و ژن‌های مورد مطالعه، در سطح دیم‌کاری ژن‌ها بالاترین میزان بیان را داشته و در آن بازه زمانی، عمده فعالیت مسیر سنتز استروئیدها در کدوی تخم‌کاغذی مسیر سنتز بتاسیتوسترول و استیگماسترول است.

واژه‌های کلیدی: بتاسیتوسترول، کدوی تخم‌کاغذی (*Cucurbita pepo* L.)، تنش خشکی، بیان ژن، فیتواسترول، رقم استریاکا.

مقدمه

گیاهان در محیط رشد اغلب تحت تأثیر طیف وسیعی از شرایط نامطلوب از قبیل خشکی، شوری و غیره قرار می‌گیرند. مجموع این شرایط نامطلوب که تنش‌های غیرزیستی نامیده می‌شود، بیان واکنش‌های متفاوتی را در گیاه به دنبال دارد (Chen & Murata, 2002). این

واکنش‌ها می‌تواند در گستره تغییر در بیان ژن‌ها، تغییر در وقوع واکنش‌ها در مسیرهای متابولیکی سلول، بیان تعدادی از ژن‌ها، رفتارهای فیزیولوژیکی گیاه و در نهایت رشد و عملکرد آن نمایان شود (Kasuga *et al.*, 1999). یکی از شایع‌ترین پاسخ‌های گیاهی به اثرهای سوء تنش‌های غیرزیستی، سنتز متابولیت‌های ثانویه مثل استرول‌ها است.

در گیاهان عالی اکثریت چربی‌های تشکیل‌دهنده غشای پلاسمایی استرول‌ها هستند (Haines, 2001). استرول‌ها ترکیب‌های ساختاری ضروری شناخته شده‌ای هستند که بر خصوصیات بیوفیزیکی غشاء از قبیل نفوذپذیری و سیالیّت (Yeagle, 2011) و نیز تحمل به تنش گرما (Beck *et al.*, 2000) تأثیر می‌گذارند. همچنین در چرخه سلولی به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان (Habenicht *et al.*, 1981)، در جنین‌زایی و پاسخ غشاء سلولی نسبت به تنش‌های محیطی (Roche *et al.*, 2016) و نیز تنظیم فعالیت آنزیم‌های متصل به غشاء (Blassberg & Briscoe, 2018) نقش دارند. در گیاهان، بیش از ۲۰۰ نوع مختلف از فیتواسترول‌ها گزارش شده است که در بین همه آنها بتاسیتوسترول (Beta-sitosterol)، استیگماسترول (Stigmasterol) و کمپسترول (Campesterol) ترکیب های اصلی پروفایل استرول گونه‌های گیاهی می‌باشند (Schaller, 2004). بتاسیتوسترول به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت (Yoshida & Niki, 2003)، ضدسرطان (Awad *et al.*, 2008)، ضدالتهاب (Backhouse *et al.*, 2008)، تقویت سیستم ایمنی (Bouic, 2001) و به‌طور خاص برای معالجه تورم خوش‌خیم پروستات، کاهنده کلسترول و کاهش خطرپذیری انواع مختلفی از سرطان‌ها بکار می‌رود (Gossell-Williams *et al.*, 2006). با بررسی منابع، مشخص شد که حداکثر میزان بتاسیتوسترول در دانه‌های گیاهان روغنی ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از گلدهی تجمع می‌یابد (Chen *et al.*, 2015؛ Xu *et al.*, 2015).

کدوی پوست‌کاغذی یا تخم‌کاغذی با نام علمی *Cucurbita pepo* L. و نام انگلیسی Pumpkin یک واریته جدید از کدوئیان می‌باشد که اولین بار در نیمه قرن نوزدهم در ایالت اشتریا کشور اتریش بر اثر یک جهش طبیعی ظاهر شده است. جهش در این گیاه منجر به نازک شدن پوسته دانه شد که این امر استحصال روغن سبزرنگ دانه‌های این گیاه را تسهیل نمود (Fruhwirth & Hermetter, 2008). میزان روغن بذر این گیاه ۳۵ تا ۴۱ درصد می‌باشد (Sajed *et al.*, 1999). روغن حاصل از کدو که به رنگ سبز تیره است، ترکیب با ارزشی از اسیدهای چرب غیراشباع و فیتواسترول‌ها می‌باشد. کدوی تخم‌کاغذی بالاترین میزان بتاسیتوسترول را در بین کدوها دارد (Kim *et al.*, 2012). همچنین محتوی بتاسیتوسترول به‌طور معنی‌داری بین نمونه‌های مورد بررسی در کدوی تخم‌کاغذی متفاوت است و رابطه مثبت قوی بین بتاسیتوسترول و میزان روغن وجود دارد (Barzegar *et al.*, 2013). واکنش گیاه دارویی کدوی تخم‌کاغذی در برابر تنش خشکی در مطالعات پیشین بررسی و مشخص گردید، تنش خشکی اثر منفی بر روی صفات ارتفاع گیاه، تعداد برگ، تعداد میوه، تعداد گل ماده، عملکرد دانه، عملکرد میوه، میزان فتوسنتز، میزان تعرق، CO_2 زیرروزنه‌ای، هدایت روزنه‌ای، محتوای نسبی آب، کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئید، پرولین و میزان کربوهیدرات دارد (Zeynali *et al.*, 2019a؛ Zeynali *et al.*, 2019b). با وجود اینکه اثرهای عمومی تنش‌های غیرزیستی بر جنبه‌های گوناگون رشدی و فیزیولوژیکی گیاهان به تفصیل مورد مطالعه قرار گرفته اما اثرهای اولیه آنها بر سطوح متابولیتی و مولکولی به‌خوبی شناسایی نشده است. با توجه به محدودیت سطح کشت و به‌منظور بهبود و افزایش تولید مواد مؤثره موجود در گیاهان، معرفی ژنوتیپ‌هایی که قادر به تحمل شرایط نامطلوب و تولید حداکثر متابولیت‌های ثانویه باشند، حائز اهمیت است. براساس اطلاعات در دسترس،

تاکنون از چگونگی تغییر در میزان سنتز استرول‌های کدوی تخم‌کاغذی و بیان ژن‌های درگیر در مسیر سنتز بتاسیتوسترول در شرایط مختلف تنش خشکی گزارشی منتشر نشده است. در این مطالعه تلاش شده است تا تأثیر سطوح مختلف آبیاری بر روی میزان روغن تولیدی از چند ژنوتیپ دانه‌های کدوی تخم‌کاغذی و نیز فیتواسترول‌های موجود در آن به‌ویژه بتاسیتوسترول مورد بررسی قرار گیرد و در مرحله بعد با بهره‌گیری از روش آنالیز نسبی بیان ژن‌ها به کمک تکنیک RT-PCR بیان چند ژن درگیر در مسیر سنتز بتاسیتوسترول به نام‌های SQS، PP2A، SMT2، ERG26 و Cycloartenol synthase ارزیابی شود تا در نهایت بتوان رابطه منطقی بین واکنش‌های مولکولی و فیزیولوژیکی برقرار نمود.

مواد و روش‌ها

بخش زراعی این پژوهش در بهار و تابستان سال ۱۳۹۷ در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی استان زنجان انجام شد. در این مطالعه، اثر پنج سطح آبیاری (شاهد یا آبیاری در ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی، آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی، آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی، آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی و دیم‌کاری) بر میزان تولید روغن، میزان سنتز فیتواسترول‌ها و بیان ژن‌های مسیر سنتز بتاسیتوسترول در سه ژنوتیپ و یک رقم کدوی تخم‌کاغذی (ژنوتیپ منطقه خوی، ژنوتیپ منطقه اصفهان، ژنوتیپ منطقه زنجان و رقم استریاکا) به‌صورت آزمایش اسپیلت پلات در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. اقلیم ایستگاه سرد، متوسط بارندگی بلند مدت آن ۲۸۴/۵ میلی‌متر و متوسط تعداد روزهای یخبندان آن ۱۴۲ روز می‌باشد. اعمال تنش‌های رطوبتی از مرحله ۴ تا ۷ برگی کدوی تخم‌کاغذی آغاز گردید. برای بررسی‌های مولکولی، میوه‌های ۳۰-۱۵ روز بعد از گلدهی انتخاب و بعد از ضدعفونی با الکل، با ازت مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. در پایان فصل رشد گیاه، میوه‌های رسیده برداشت و بذر آنها برای اندازه‌گیری میزان روغن و فیتواسترول در شرایط دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت یک هفته خشک شد. بررسی مولکولی و اندازه‌گیری روغن خام بذر به روش سوکسله با استفاده از پترولیوم اتر در پژوهشکده فناوری‌های زیستی دانشگاه زنجان انجام و میزان روغن آن برحسب درصد از وزن بذر بیان گردید. طبق گزارش، به علت ساختار استرول‌ها و شناساگرهای موجود روی دستگاه کروماتوگرافی، بهترین تکنیک برای بررسی و آنالیز استرول‌ها براساس حساسیت به ساختار استرول‌ها و نیز شناساگرهای دستگاه GC می‌باشد (Lagarda *et al.*, 2006). در این مطالعه، برای تعیین میزان و ترکیب استرول‌های موجود در روغن استحصال شده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل Agilent 7890) مجهز به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) (مدل Agilent 5975) استفاده گردید. در این آنالیز از ستون HP-5MS و نیمه قطبی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میکرون، دتکتور MS، گاز حامل هلیوم (He)، سرعت جریان گاز حامل ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، برنامه حرارتی ۲۲۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی گراد بر دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه سانتی گراد برای این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. مشتق‌سازی نمونه‌ها برای GC/MS مطابق با استاندارد ۹۶۷۰ مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد. فیتواسترول‌های موجود در روغن دانه کدوی تخم‌کاغذی به‌صورت میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم روغن بیان شد. بعد از بررسی نتایج حاصل از تجزیه میزان روغن و استرول‌ها، بهترین رقم برای بررسی‌های مولکولی انتخاب گردید.

استخراج RNA کل از میوه نارس و آنالیز Real-time PCR

براساس نتایج بررسی‌های برخی محققان (Chen *et al*., 2015؛ Xu *et al*., 2015) مشخص شده که حداکثر میزان بتاسیتوسترول در دانه‌های گیاهان روغنی ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از گلدهی تجمع می‌یابد. بنابراین در این گیاه نیز در این بازه زمانی اقدام به نمونه‌برداری از میوه‌های نارس چند روزه گردید. RNA کلی از دانه‌های نمونه با استفاده از محلول RiboExTM (شرکت سیناکلون) با کمی تغییرات استخراج شد. کیفیت RNA کلی با استفاده از دستگاه الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ در بافر TAE و کمیّت آن با دستگاه نانودراپ (مدل NANODROP 2000، شرکت Thermo SCIENTIFIC) تعیین گردید. ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت HyperScript™ RT master mix (شرکت پیشگام) با استفاده از پرایمرهای $Oligo\ (dT)_{18}$ انجام شد. ژن های رمزکننده آنزیم های کلیدی دخیل در مسیر سنتز بتاسیتوسترول (به‌نام‌های SQS، PP2A، SMT2، ERG26 و Cycloartenol synthase) از طریق پایگاه اطلاعاتی KEEG (Valitova *et al*., 2016) انتخاب شد (شکل ۱). طراحی آغازگرها توسط نرم‌افزار آلل آیدی ۷ (Allele ID 7) و CLC Main Workbench 5 و با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن‌های انتخاب شده، که از سایت NCBI بدست آمده بود، به‌صورت exon-exon junction انجام شد (جدول ۱). ژن Protein Phosphatase 2A (PP2A) به‌عنوان یک ژن مرجع استفاده گردید (Obrero *et al*., 2011). آنالیز Real-time PCR با استفاده از دستگاه Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) و براساس دستورالعمل کیت EVA Green qPCR MasterMix 5X (شرکت پیشگام) استفاده گردید. برای بررسی و تأیید عدم وجود آلودگی ژنومی در مراحل Real-time PCR از نمونه کنترل منفی استفاده شد. میزان نسبی بیان ژن و فولد چنج (Fold Change)، پس از نرمال‌سازی با استفاده از ژن کنترل داخلی (PP2A)، به روش $\Delta\Delta C_t$ مطابق با فرمول زیر انجام شد (Livak & Schmittgen, 2001).

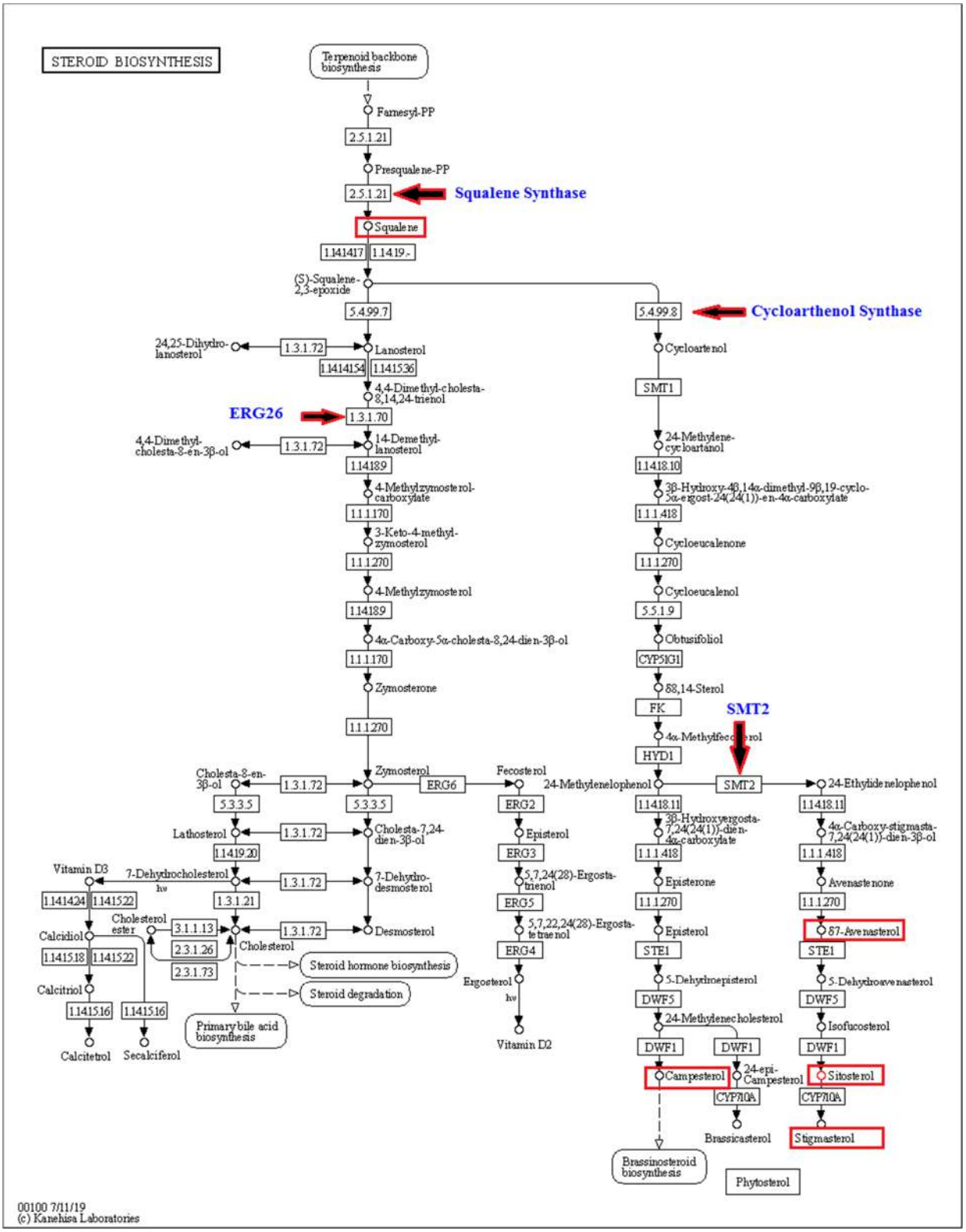
$$\Delta Ct = Ct\ (\text{ژن مورد نظر}) - Ct\ (\text{ژن کنترل داخلی})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ (\text{نمونه ۲}) - \Delta Ct\ (\text{نمونه ۱})$$

$$\text{Fold Change} = -2^{\Delta\Delta Ct}$$

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری

از آنجایی که داده‌های حاصل از میزان روغن و فیتواسترول‌های بدست آمده به‌صورت درصد بودند، با استفاده از تبدیل زاویه‌ای داده‌ها نرمال‌سازی شده و مقایسه میانگین نیز به روش دانکن انجام شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS (9.1) انجام گردید. برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها و نتایج حاصل از Real Time PCR از روش ΔΔCT و نرم‌افزار Rotor Gene Q Series Software و Excel استفاده گردید. بازده برای هر ژن به‌همراه بازده ژن رفرنس (PP2A) برای محاسبات بیان ژن نسبی ضروریست (Livak & Schmittgen, 2001). آزمایش بیان ژن در دو تکرار تکنیک و روش کار و دو تکرار مزرعه‌ای انجام شد.



شکل ۱- موقعیت فیتواسترول‌های قرائت شده توسط دستگاه **GC/MS** و آنزیم‌های انتخاب شده برای بررسی‌های مولکولی مسیر تولید بتاسیتوسترول در کدوی تخم‌کاغذی (**Valitova *et al.*, 2016**)

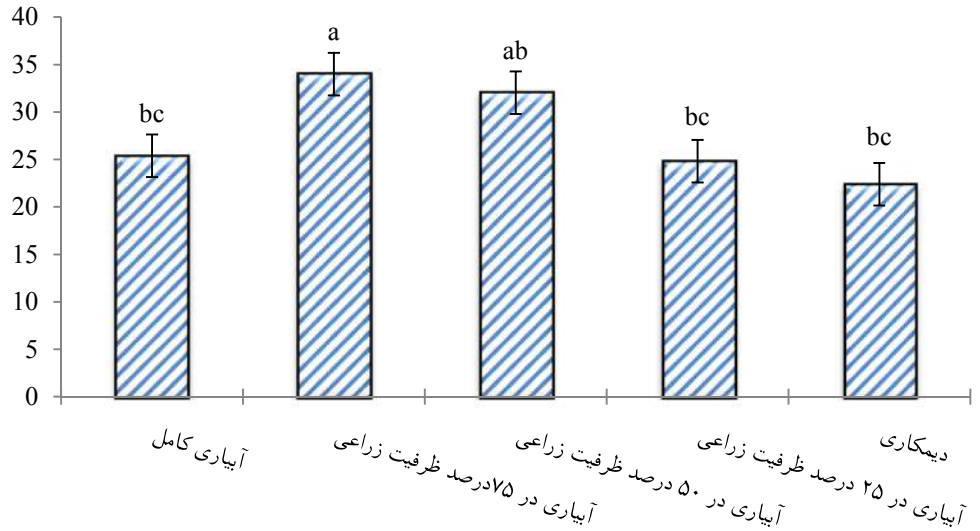
جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای مطالعه ژن‌های دخیل در مسیر سنتز بتاسیتوسترول در کدوی تخم‌کاغذی

توالی پرایمر		پرایمر	نام اختصاری	کد شناسایی NCBI
5’GCATAAGGTCTCAAGAAG3’	مستقیم	اسکوآلن سینتاز	SQS	LOC111776748
5’TATCATCCTCAACAGTGT3’	معکوس			
5’TGGTAGCATCCTTTCCCAATACA3’	مستقیم	پروتئین فسفاتاز ۲ آ	PP2A	ژن رفرنس
5’CATGCCCGTTCAGCTTTAGC3’	معکوس			
5’TCCTGGTTTGGTCATTACTCTT3’	مستقیم	سیکلوآرتنول سینتاز	Cycloartenol synthase	LOC111494351
5’ATCCGAACATTGTGCTTGG3’	معکوس			
5’TCACCATTAACGACTACCA3’	مستقیم	۲۴- متیلن استرول – سی‌متیل ترانسفراز	SMT2	LOC111476770
5’TTTCCACACACCACTTCA3’	معکوس			
5’TCGCAATAAGGATCAGAT3’	مستقیم	استرول – ۴-آلفا-کربوکسیلات ۳- دهیدروژناز	ERG26	LOC101205275
5’TTGGCACCTTGAACTATA3’	معکوس			

نتایج

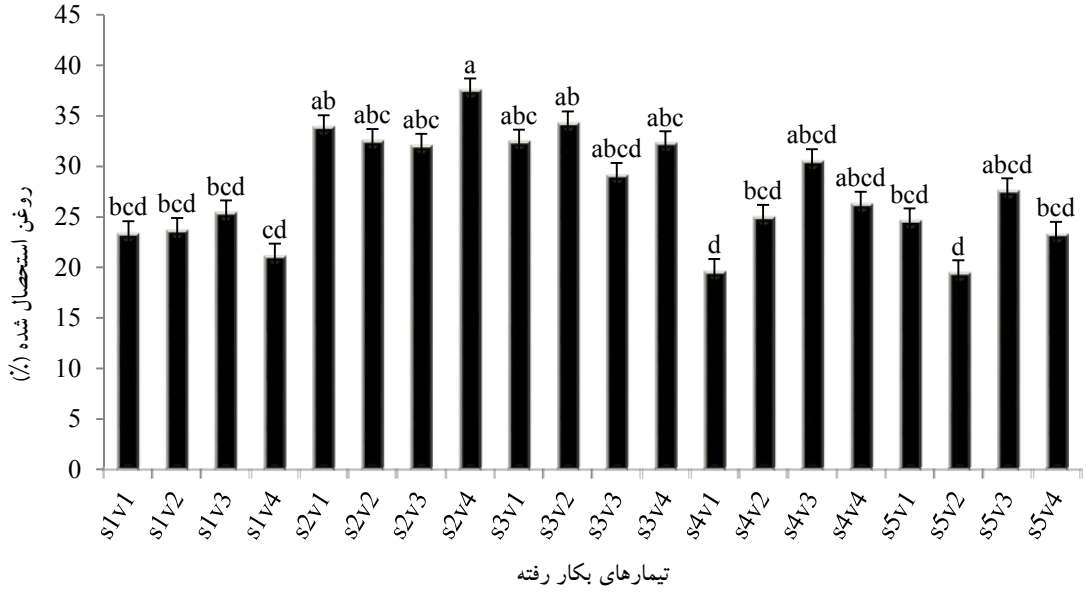
اثر تنش خشکی بر میزان روغن موجود در بذر

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تنش خشکی بر میزان روغن موجود در دانه در سطح احتمال ۰/۰۱ اثر معنی‌دار داشته، ولی روی ژنوتیپ‌های مختلف استفاده شده در این آزمایش اثرهای معنی‌داری نداشت. همچنین اثر متقابل بین ژنوتیپ و تنش از لحاظ آماری در تولید روغن در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرهای ساده تنش خشکی مشخص کرد که ارقام بکار رفته در حالت شاهد میزان روغن کمتری داشتند و با افزایش دور آبیاری به زمانی که میزان آب موجود در خاک مزرعه به ۷۵٪ ظرفیت زراعی رسیده باشد، موجب افزایش میزان تولید روغن در ارقام استفاده شده گردید. با افزایش سطح تنش خشکی، این روند دوباره نزولی شده و از میزان روغن آنها کاسته شده است (شکل ۲). بررسی اثرهای متقابل ژنوتیپ و سطوح مختلف تنش خشکی، مشخص کرد که رقم استریاکا زمانی که میزان رطوبت مزرعه به ۷۵٪ ظرفیت زراعی رسیده باشد، بالاترین میزان روغن (۳۷/۵۳٪ وزن بذر خشک) را تولید می‌کند. در مورد کمترین میزان روغن استحصال شده از بذرهای در تیمارهای مختلف، گرچه هر دو تیمار S4V1 (ژنوتیپ خوی در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی) و S5V2 (ژنوتیپ زنجان در شرایط دیم) از لحاظ میزان روغن تولیدی اختلاف معنی‌داری را از لحاظ آماری نشان ندادند، اما تیمار S5V2 با ۱۹/۵۴٪ وزن بذر خشک در مقابل ۱۹/۶۷ تیمار S4V1 پایین‌ترین میزان تولید روغن را نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی و ژنوتیپ بر میزان عملکرد روغن در بذرهای حاصل از کدوی تخم‌کاغذی

در هر ستون میانگین‌هایی با حروف مشابه در سطح احتمال ۱٪ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی و ژنوتیپ بر میزان عملکرد روغن در بذرهای حاصل از کدوی تخم‌کاغذی

در هر ستون میانگین‌هایی با حروف مشابه در سطح احتمال ۱٪ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. در این آزمایش: S1= آبیاری کامل یا شاهد، S2= آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی، S3= آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی، S4= آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی، S5= دیم‌کاری؛ V1= ژنوتیپ منطقه خوی، V2= ژنوتیپ منطقه اصفهان، V3= ژنوتیپ منطقه زنجان، V4= رقم استریاکا

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف تنش خشکی و ژنوتیپ بر میزان فیتواسترول‌های روغن بذر کدوی تخم‌کاغذی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میزان روغن	استیگماسترول	کمپسترول	اسکوآلن	سیتواسترول	آوناسترول	۲۴-متیل-۷-کلستانول
تکرار	۲	۳۲/۶۶^{ns}	۰/۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۸۲	۰/۲۷	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۱۱
تنش	۴	۳۰۱/۱۰**	۰/۰۰۳**	۰/۰۱۲**	۱۵/۶۲**	۱/۷۲**	۰/۶۲**	۰/۰۰۱۵ ^{ns}
خطای کرت اصلی	۸	۱۴/۷۹	۰/۰۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۷۵**	۰/۰۰۱	۰/۰۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹۸
ژنوتیپ	۳	۱۰/۸۳^{ns}	۰/۰۰۷**	۰/۰۴۵**	۴۸/۹۳**	۴/۱۲**	۱/۷**	۰/۰۰۵۲ ^{ns}
تنش×ژنوتیپ	۱۲	۲۸/۱۲*	۰/۰۰۰۱۱**	۰/۰۰۰۶۷**	۰/۷۳**	۰/۰۷*	۰/۰۲	۰/۰۰۱۶ ^{ns}
خطای کرت فرعی	۳۰	۵۱/۸۰	۰/۰۰۰۰۰۵۲	۰/۰۰۰۰۰۳۴	۰/۰۰۶۰	۰/۰۳	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰۹۶۷
ضریب تغییرات (٪)		۲۵/۹۵	۴/۷۴	۱/۸۴	۲/۱۳	۱۵/۶۵	۱۶/۲۴	۲۲/۴۴

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

جدول ۳- اثر برهم‌کنش ژنوتیپ و سطوح تیمار خشکی بر میزان تولید برخی فیتواسترول‌ها در بذر

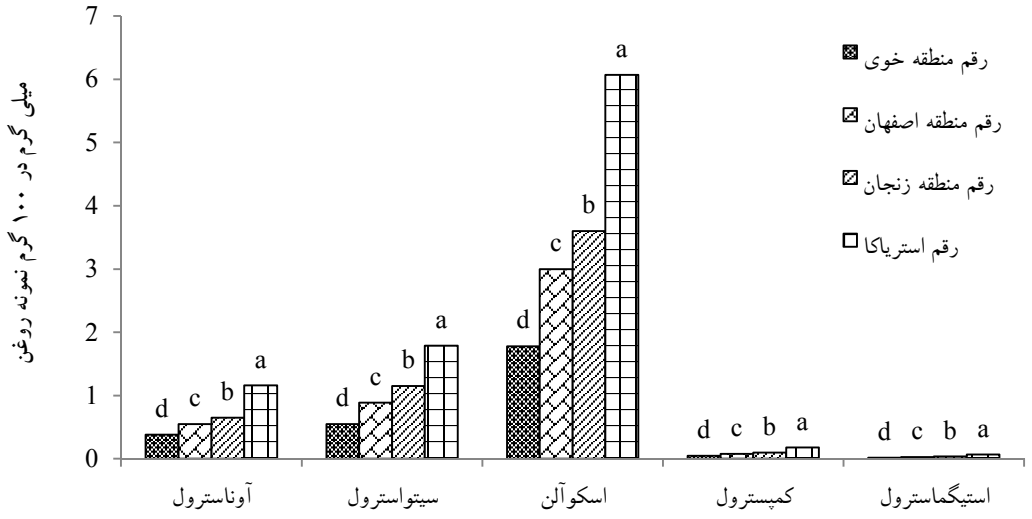
سطح تنش	ژنوتیپ	سیتواسترول	اسکوآلن	کمپسترول	استیگماسترول
شاهد	منطقه خوی	۰/۲۳h	۰/۶۹q	۰/۰۲r	۰/۰۱p
	منطقه زنجان	۰/۵۹fg	۱/۹o	۰/۰۵p	۰/۰۲n
	منطقه اصفهان	۰/۸۲ef	۳/۶۲l	۰/۰۷m	۰/۰۳k
	استریاکا	۱/۲۱cd	۴/۱۴g	۰/۱g	۰/۰۵f
۷۵٪ ظرفیت زراعی	منطقه خوی	۰/۴gh	۱/۴o	۰/۰۴q	۰/۰۱o
	منطقه زنجان	۰/۶۲fg	۲/۰۸n	۰/۰۶o	۰/۰۲lm
	منطقه اصفهان	۰/۷۸ef	۲/۷۹l	۰/۰۸l	۰/۰۳k
	استریاکا	۱/۳۱c	۴/۹e	۰/۱۴e	۰/۰۶d
۵۰٪ ظرفیت زراعی	منطقه خوی	۰/۶۲fg	۲/۰۵no	۰/۰۶o	۰/۰۲m
	منطقه زنجان	۰/۷۸ef	۲/۹۸k	۰/۰۸k	۰/۰۴i
	منطقه اصفهان	۰/۹۹de	۳/۳۴j	۰/۰۹j	۰/۰۴h
	استریاکا	۱/۷b	۵/۸۵c	۰/۱۷c	۰/۰۷c
۲۵٪ ظرفیت زراعی	منطقه خوی	۰/۶۳fg	۲/۳۷m	۰/۰۶n	۰/۰۲l
	منطقه زنجان	۱/۰۸cde	۳/۵۳i	۰/۱i	۰/۰۴g
	منطقه اصفهان	۱/۳۳c	۳/۹۵h	۰/۱۲h	۰/۰۵f
	استریاکا	۲/۲۴a	۷/۲۵b	۰/۲۲b	۰/۰۹b
دیم‌کاری	منطقه خوی	۰/۸۸ef	۲/۳۸m	۰/۰۶n	۰/۰۳j
	منطقه زنجان	۱/۳۸c	۴/۵۱f	۰/۱۳f	۰/۰۵e
	منطقه اصفهان	۱/۸۱b	۵/۶۳d	۰/۱۶d	۰/۰۷c
	استریاکا	۲/۴۱a	۸/۲۲a	۰/۲۴a	۰/۱a

در هر ستون میانگین‌هایی با حروف مشابه طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

اندازه‌گیری میزان استرول‌های موجود در روغن بذر

میزان تولید استرول‌ها اغلب کمتر از ۰/۰۱ وزن خشک گیاه بوده و به‌شدت به مرحله فیزیولوژیکی و رشدی گیاه بستگی دارد (Rao & Ravishankar, 2002). در این مطالعه، نتایج حاصل از آنالیز GC/MS وجود استیگمااسترول، کمپسترول، بتاسیتوسترول، اسکوآلن، آونااسترول، کلستانول و چندین نوع از استرول‌های غیرمهم را در روغن کدوی تخم‌کاغذی مشخص کرد. فیتواسترول‌ها، اسکوآلن و توکوفرول‌ها ترکیب‌های غیرصابونی لیپیدها هستند. بتاسیتوسترول، کمپسترول و استیگماسترول جزء ترکیب‌های طبیعی غشای سلولی گیاهان می‌باشند (Ryan *et al*., 2007). نتایج تجزیه‌وتحلیل‌های آماری نشان داد که اثر سطوح مختلف تنش، ژنوتیپ و اثر متقابل تنش در ژنوتیپ در سطح احتمال ۰/۰۱ بر روی میزان تولید بیشتر متابولیت‌های موجود در روغن دانه کدوی تخم کاغذی معنی‌دار است، اما سطوح مختلف تنش خشکی بر روی

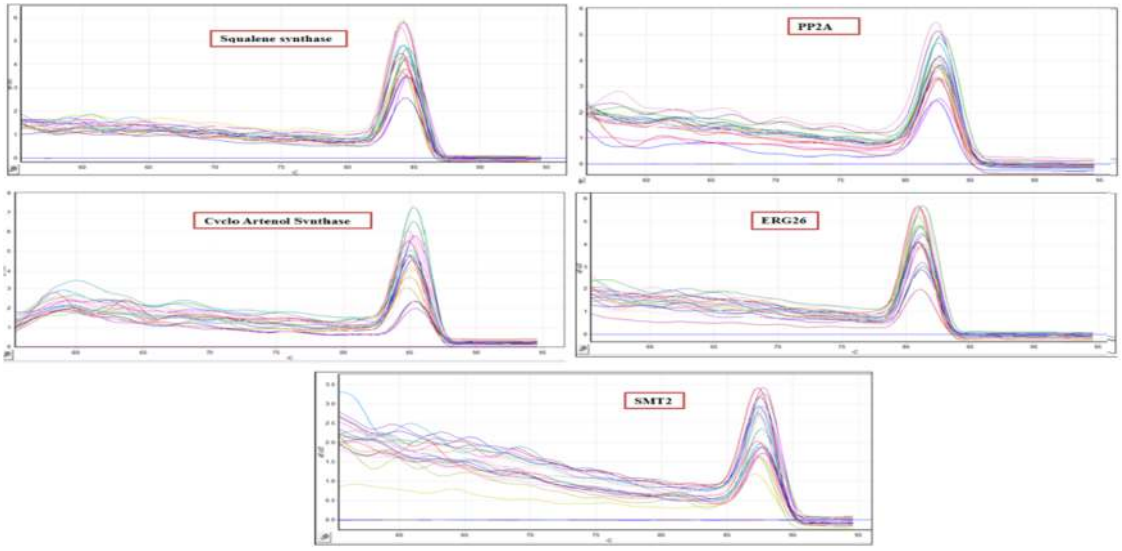
میزان سنتز ۲۴-متیل-۷- کلستانول بی‌تأثیر بود (جدول ۲). با بررسی اثرهای متقابل سطوح مختلف تنش در ژنوتیپ‌های مورد استفاده (جدول ۳)، مشخص گردید که در نمونه شاهد میزان استرول‌های مورد مشاهده در حداقل مقدار ممکن بود، ولی با افزایش سطوح تنش بر مقادیر استرول‌ها نیز افزوده شد. در بین ارقام، رقم استریاکا بالاترین میزان فیتواسترول‌ها را به‌خود اختصاص داده و کمترین میزان نیز مربوط به ژنوتیپ خوی بود. بالاترین میزان سیتواسترول مربوط به رقم استریاکا در سطح تنش دیم‌کاری (۲/۴۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه روغن) و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی (۲/۲۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه روغن) و کمترین آن مربوط به ژنوتیپ منطقه خوی با ۰/۲۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه روغن استحصالی از دانه کدوی تخم‌کاغذی مشاهده گردید. در مورد اسکوآلن، کمپسترول و استیگماسترول نیز وضعیت مشابهی مشاهده شد، به‌طوری که بالاترین میزان آنها در رقم استریاکا به‌ترتیب با ۸/۲۲، ۰/۲۴ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه روغن و پایین‌ترین آنها نیز مربوط به ژنوتیپ خوی به‌ترتیب با ۰/۶۹، ۰/۰۲ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه روغن بدست آمد (شکل ۴).



شکل ۴- تفاوت بین ارقام کدوی تخم کاغذی مورد استفاده از نظر میزان تولید برخی فیتواستروها از بذر

بررسی‌های مولکولی

در رسم منحنی ذوب محصولات Real-time PCR، وجود پیک اضافی کوچکتر قبل و بعد از پیک محصولات نشان‌دهنده وجود پرایمر دایمر است. همچنین تکرارهای یک نمونه باید کاملاً بر روی هم قرار گیرند. با توجه به شکل ۵ و منحنی ذوب برای هر پنج آغازگر مورد استفاده در این تحقیق، می‌توان گفت آغازگرهای مورد استفاده به‌صورت کاملاً اختصاصی عمل کرده و یک نمونه منفرد از ژن‌های PP2A، SQS، ERG26، Cycloartenol Synthase و SMT2 را تکثیر کرده‌اند.



شکل ۵- نمودارهای مربوط به دمای ذوب ژن‌های PP2A، SQS، ERG26، Cycloartenol Synthase و SMT2 در شرایط مختلف تنش خشکی با نرم‌افزار روتور ژن

نتایج حاصل از آنالیز Real-time PCR نشان داد که سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان بیان ژن‌های مورد بررسی اثرهای معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۱$) (جدول ۴). به‌طوری که بالاترین میزان بیان ژن‌های درگیر در مسیر سنتز بتاسیتوسترول در سطح تنش خشکی دیم‌کاری رخ داده است (جدول ۵). با توجه به این نتیجه میزان بیان هر یک از ژن‌ها نسبت به یکدیگر در حالت دیم‌کاری مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۶).

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر روی میزان بیان ژن‌های مختلف مورد آزمایش

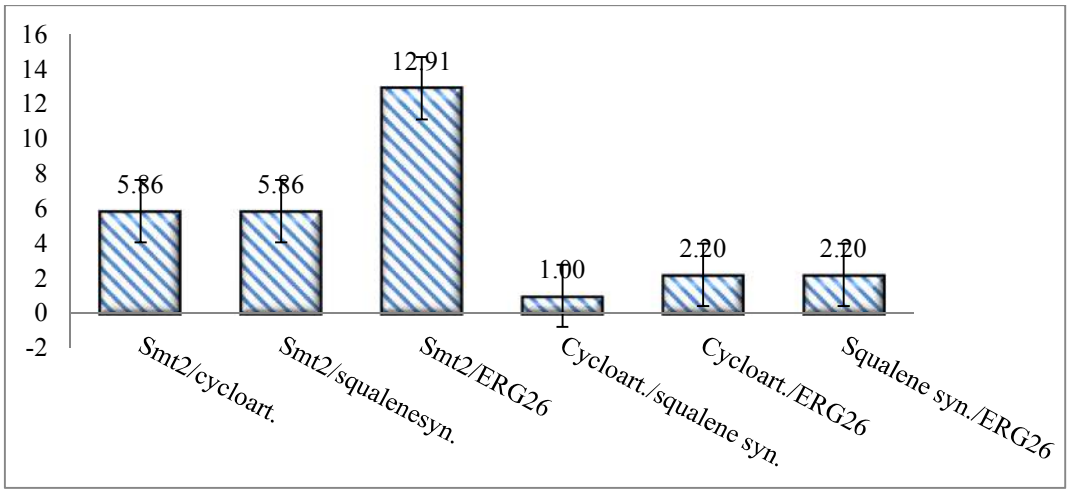
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تکرار	۲	۰/۲۹
تنش خشکی	۴	۲/۹۶**
ژن	۳	۳/۴۹**
ژن × تنش	۱۲	۱/۱۹**
خطا	۱۵	۰/۱۳
ضریب تغییرات (٪)		۲۱/۸۶

**: وجود اختلاف معنی‌دار از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۱

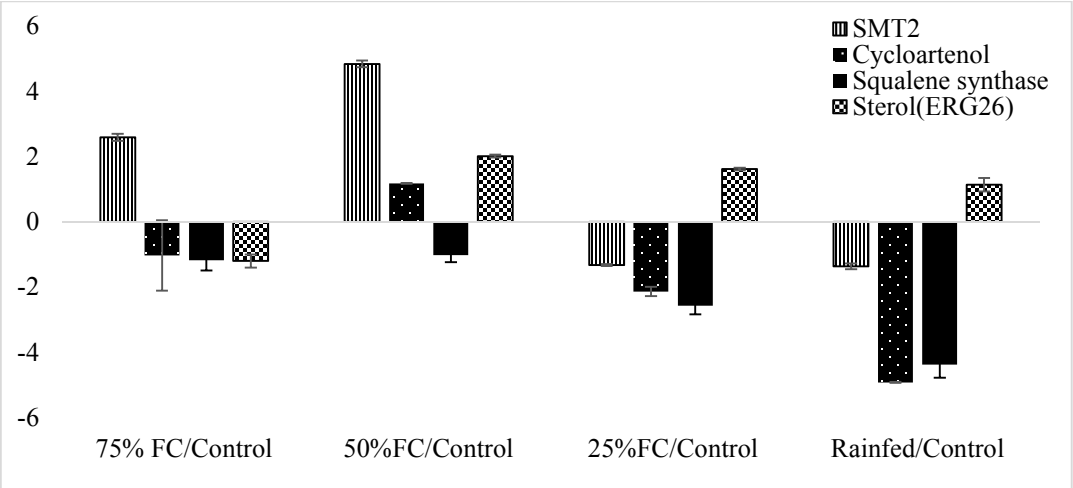
جدول ۵- مقایسه میانگین مربوط به تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان بیان ژن‌های مورد بررسی

سطح تنش خشکی	پنج ژن مورد مطالعه		میانگین Ct		
	Squalene Synthase	Cycloartenol Synthase	SMT2	ERG26	PP2A
شاهد	۳۰/۷۳bc	۳۰/۵۵ b	۲۹/۸۳ab	۳۴/۱۹a	۲۶/۷۹a
۷۵٪ ظرفیت زراعی	۳۱/۰۳b	۳۰/۶۶b	۲۸/۵۲b	۳۴/۵۲a	۲۶/۸۵a
۵۰٪ ظرفیت زراعی	۲۹/۲۱c	۲۸/۷۲c	۲۶/۰۳c	۳۱/۵۹b	۲۶/۲۰ a
۲۵٪ ظرفیت زراعی	۳۲/۷۵a	۳۱/۹۸b	۳۰/۵۵a	۳۳/۷۳a	۲۶/۹۸a
دیم‌کاری	۳۳/۵۲a	۳۳/۵۲a	۳۰/۹۸a	۳۴/۶۷a	۲۷/۴۳a

در هر ستون میانگین‌هایی با حروف مشابه در سطح احتمال ۰/۰۱ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



شکل ۶- میزان افزایش بیان ژن در حالت دیم‌کاری در ژن‌های مسئول سنتز فیتواسترول در میوه کدوی تخم‌کاغذی در ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از گلدهی



شکل ۷- تغییرات بیان هر یک از ژن‌ها در سطوح مختلف تنش خشکی نسبت به حالت کنترل

همچنین تغییرات بیان هر یک از ژن‌ها در سطوح مختلف تنش خشکی نسبت به حالت کنترل نیز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۷). نتایج نشان داد که در ژن SMT2 با افزایش تنش خشکی از ۷۵٪ به ۵۰٪ ظرفیت زراعی، در مقایسه با حالت کنترل، میزان بیان این ژن افزایش ولی با افزایش سطوح خشکی، میزان بیان کاهش می‌یابد. ژن سیکلوآرتنول سینتاز تنها در حالت ۵۰٪ ظرفیت زراعی نسبت به حالت کنترل افزایش بیان را نشان داد و در بقیه سطوح تنش خشکی میزان بیان این ژن کم بود. ژن اسکوآلن سینتاز در تمامی حالات به‌غیر از ۵۰٪ ظرفیت زراعی نسبت به شاهد بیان کمتری را داشت اما ژن ERG26 نتایج عکس را نشان داد. به‌طوری که در ۷۵٪ ظرفیت زراعی نسبت به حالت کنترل بیان ژن کمتری داشت و با افزایش سطوح تنش خشکی نسبت بیان آن به حالت کنترل افزایش یافت.

بحث

تنش خشکی بر میزان روغن موجود در بذر

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی از میزان روغن موجود در دانه کاسته شد (شکل ۳). این نتایج با نتایج مطالعات انجام شده توسط Rabbi Angourani و همکاران (۲۰۱۷) در کدوی تخم‌کاغذی، Stefanoudaki و همکاران (۲۰۰۱) در زیتون، Tohidi Moghadam و همکاران (۲۰۱۱) در کلزا، Bahreininejad و همکاران (۲۰۱۴) در آویشن و Razmjoo و همکاران (۲۰۰۸) در گیاه بابونه نیز مطابقت دارد. ارقام بکار رفته در این پژوهش میزان روغنی را بین ۳۴-۲۲٪ وزن بذر خشک نشان دادند. مقایسه درصد روغن دانه کدو با منابع روغنی دیگر نشان می‌دهد که این دانه در مقایسه با دانه‌ها و میوه‌های روغنی دیگر دارای درصد نسبتاً بالایی روغن می‌باشد (Shafie Mashtany *et al.*, 2009). Hosseini و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی صفات کیفی کدوی تخم‌کاغذی تحت تأثیر کودهای آلی و شیمیایی نشان دادند که بالاترین میزان روغن موجود در دانه این گیاه حدود ۵۰٪ بود که از کاربرد تلفیقی کود دامی و کود شیمیایی بدست آمد. Divsalarmary و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که کمترین میزان درصد روغن در زمان وقوع تنش خشکی در مرحله پرشدن دانه سویا اتفاق می‌افتد. بررسی‌های Stefanoudaki و همکاران (۲۰۰۱) مشخص کرد که با آبیاری میزان روغن موجود در میوه زیتون افزایش می‌یابد. کاهش درصد روغن در اثر تنش خشکی می‌تواند به علت اختلال در فرایندهای متابولیکی بذر و آسیب به انتقال آسیمیلات‌ها به دانه باشد (Bouchereau *et al.*, 1996). کاهش در میزان غلظت روغن می‌تواند به‌علت اکسیداسیون تعدادی از اسیدهای چرب غیراشباع (Singh & Sinha, 2005) و همچنین ناشی از تخریب در فتوسنتز و تولید کربوهیدرات در شرایط تنش باشد (Flexas & Medrano, 2002). مغز دانه محل تجمع روغن است و هر تیماری که باعث کاهش تجمع مواد فتوسنتزی در دانه و کاهش شاخص برداشت گردد، درصد روغن را کاهش می‌دهد (López Pereira *et al.*, 1999). در مطالعات قبلی مشخص شده بود که در دانه کدوی تخم‌کاغذی با افزایش سطوح تنش خشکی، بر میزان پروتئین موجود در دانه افزوده می‌گردد (Zeynali *et al.*, 2019b). با توجه به همبستگی منفی بین میزان روغن و پروتئین، می‌توان دلیل کاهش روغن و افزایش پروتئین در دانه کدوی تخم کاغذی را در این دانست که تجمع لیپید و کربوهیدرات در دانه روغنی در مقایسه با تجمع پروتئین، نسبت به تنش خشکی در مرحله پر شدن دانه حساس‌تر می‌باشد، به‌دلیل اینکه میزان پروتئین بیشتر به انتقال دوباره کربن و نیتروژن از برگ‌ها بستگی دارد، ولی میزان روغن بیشتر به فتوسنتز جاری وابسته است (Purcell *et al.*, 2004).

میزان استرول‌های موجود در روغن بذر

نتایج این تحقیق نشان داد که تنش خشکی اثرهای مثبت بر روی تمامی فیتواسترول‌های موجود در روغن دانه کدوی تخم کاغذی دارد و این تأثیر در رقم استریاکا بیشتر از بقیه ژنوتیپ‌ها است. با توجه به اینکه فیتواسترول‌ها جزئی از مواد

مؤثره موجود در گیاه هستند و با افزایش میزان خشکی این مواد نیز افزایش می‌یابند، Rabbi Angourani و همکاران (۲۰۱۷) اعلام کردند که در بعضی از گیاهان دارویی، تنش خشکی درصد تولید متابولیت‌های ثانویه را به علت کاهش رشد تحت تنش و تثبیت کربن در طی فتوسنتز افزایش می‌دهد. گزارش شده است که بافت‌های گیاهان دانه روغنی به‌طور متوسط ۱ تا ۳ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک نمونه استرول دارند (Schaller, 2004). در مطالعه دیگر گزارش شده است که مقدار استیگماسترول، کمپسترول و آوناسترول موجود در کدوی تخم‌کاغذی نمونه‌های مجارستانی به‌ترتیب ۰/۸۲، ۰/۷۸ و ۰/۸۴ میلی‌گرم در گرم روغن بودند ولی این مقادیر برای نمونه‌های ایرانی تنها برای استیگماسترول و کامپسترول به‌ترتیب به میزان ۰/۳۸ و ۰/۶۷ میلی‌گرم در گرم روغن مشاهده گردید ولی آوناسترول به‌دلیل غلظت پایین در این نمونه دیده نشد (Ahmadi Avval *et al.*, 2006). البته افزایش میزان استرول در روغن با افزایش میزان سطح تنش خشکی در سایر مطالعات نیز اثبات شده است. همچنین مشخص شده است که با افزایش تنش خشکی میزان بتاسیتوسترول در کدوی تخم‌کاغذی افزایش می‌یابد (Rabbi Angourani *et al.*, 2017). یافته‌های این بررسی با مطالعات دیگر انجام شده در برنج (Kumar *et al.*, 2015) و زیتون (Stefanoudaki *et al.*, 2001) همخوانی دارد. در این تحقیق، با بررسی سطوح مختلف تنش خشکی بر روی میزان فیتواسترول‌ها مشخص شد که این ترکیب‌ها در حالت دیم در بالاترین مقدار خود تولید می‌شوند و بیشترین میزان به‌ترتیب مربوط به اسکوآلن (۵/۱۸)، سیتوسترول (۱/۶۲)، آوناسترول (۱/۰۲)، کمپسترول (۰/۱۵) و استیگماسترول (۰/۰۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه روغن) بود. با بررسی دوباره مسیر سنتز بتاسیتوسترول به‌عنوان استرول مورد مطالعه در این بررسی (شکل ۱) و مقایسه این مسیر با جدول اثرهای ساده سطوح مختلف تنش بر روی میزان تغییرات فیتواسترول‌ها مشخص می‌گردد که زیاد بودن اسکوآلن به علت قرار داشتن در ابتدای مسیر سنتز بوده و منطقی به‌نظر می‌رسد. همچنین مشخص می‌گردد که مقدار کمپسترول در مقایسه با سایر استرول‌ها مسیر سنتز استیگماسترول در کمترین حالت است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در دانه کدوی تخم‌کاغذی مسیر سنتز نهایی استیگماسترول بسیار فعال‌تر از مسیر تولید کمپسترول و براسیکاسترول است و مسیر سنتز استیگماسترول، بالاترین استرول مربوط به سیتوسترول است. آوناسترول به‌عنوان پیش‌ساز سیتوسترول مورد تجزیه قرار گرفته و به‌کمک آنزیم‌های STE1 و DWF5 در ابتدا به دهیدروآوناسترول و ایزوفوکسترول و بعد در اثر فعالیت آنزیم DWF1 به محصول سیتوسترول تبدیل می‌شود. با توجه به اینکه مقدار سیتوسترول بیش از مقدار استیگماسترول است، می‌توان نتیجه گرفت که در ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از گلدهی این گیاه، سیتوسترول هنوز مورد تجزیه قرار نگرفته و به استیگماسترول تبدیل نشده است و ممکن است که با افزایش سن گیاه و نزدیکی به مرحله رسیدن میوه بر میزان استیگماسترول افزوده شود. طبق مطالعات انجام شده میزان استیگماسترول در میوه نارس گوجه‌فرنگی کمتر بوده و به‌هنگام رسیدن گیاه به مرحله رسیدگی، به علت افزایش میزان بیان ژن استرول‌سی-۲۲ دساتوراز، میزان استیگماسترول نیز بالا می‌رود (Whitaker & Gapper, 2008). همچنین گزارش شده است که بتاسیتوسترول بیشترین فیتواسترول در بذرهای کدوی تخم‌کاغذی بوده و در حدود ۲۴/۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه مشاهده گردیده است (Ryan *et al.*, 2007). میزان اسکوآلن در بذرهای کدوی تخم‌کاغذی ۸۹/۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه و میزان روغن کل در کدوی تخم‌کاغذی ۴۲/۳٪ واحد وزنی بود. در بین فیتواسترول‌های کلزا، بتاسیتوسترول بالاترین میزان (۱۹۲/۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ وزن خشک بذر) را دارد (Roche *et al.*, 2016). مشخص شده است که بذرهای کدوی تخم‌کاغذی دارای ۱۳/۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بتاسیتوسترول هستند (Philips *et al.*, 2005). البته نسبت کمپسترول به سیتوسترول فاکتور مهمی برای رشد گیاه محسوب می‌شود (Schaeffer *et al.*, 2001). با توجه به مقدار بالای سیتوسترول تولیدی توسط رقم استریاکا، از بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی، برای بررسی‌های مولکولی این رقم انتخاب شد.

بررسی‌های مولکولی

براساس نتایج آنالیز بیان ژن‌های دخیل در سنتز فیتواسترول‌ها، سه آنزیم موجود در مسیر سنتز بتاسیتوسترول یعنی اسکوآلن سینتاز، سیکلوآرتنول سینتاز و SMT2 در سطح تنش خشکی دیم‌کاری بالاترین میزان بیان را به‌طور همزمان نشان دادند. آنزیم ERG26 که در مسیر سنتز کلسترول فعال هست بالاترین میزان بیان را در دیم‌کاری داشت. گیاهان دارای افزایش در سطوح SMT2 دارای نسبت پایین کمپسترول به سیتواسترول هستند و بعکس این وضعیت هم وجود دارد (Schaller, 2004). حضور سیتواسترول در سلول گیاه به‌طور معنی‌داری در رشد و نمو و به علاوه در کاهش براسینواستروئید شرکت می‌کند. گیاهان با کلسترول و کمپسترول بالا (سیتواسترول پایین) و نیز گیاهان با سیتوسترول خیلی بالا دارای مشخصه معمولی ارتفاع و باروری کاهش یافته هستند. جنین‌زایی، موقعیت و الگوی سلولی مثل تمایز وزیکولی تحت تأثیر موقعیت استرول اندامک‌ها یا اندام‌ها قرار دارد (Schaller, 2004). اگر میزان بیان این آنزیم‌ها در مقابل هم در سطح تنش خشکی دیم‌کاری و مسیر سنتز فیتواسترول‌ها مورد بررسی قرار گیرد (شکل ۴)، ملاحظه می‌شود که بعد از فعالیت آنزیم اسکوآلن سینتاز به‌عنوان سرشاخه مسیر سنتز استروئیدها، در ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از گلدهی، مسیر به سمت تولید سیکلوآرتنول سینتاز پیش رفته است. به‌طوری که بیان آنزیم‌های اسکوآلن سینتاز و سیکلوآرتنول سینتاز نسبت به مسیر تشکیل کلسترول (ERG26 به‌عنوان نماینده این مسیر) به میزان ۲/۲۰ برابر افزایش یافته است. این به آن معنی است که مسیر سنتز بتاسیتوسترول، استیگماسترول و براسینواستروئید فعالیت زیادتری دارد. آنزیم مهم در این مسیر، SMT2 است که مسیر سنتز بتاسیتوسترول و در نهایت استیگماسترول را از مسیر سنتز کمپسترول و براسیکاسترول (براسینواستروئید) مجزا می‌نماید. اگرچه در مسیر سنتز براسیکاسترول، بررسی بیان ژنی به‌دلیل فعالیت همزمان در چند مسیر دیگر امکان‌پذیر نشد، اما نتایج نشان داد که میزان بیان آنزیم SMT2 بالاترین میزان بیان ژن (۱۳ برابر افزایش) را در مقابل آنزیم ERG26 داشته است. این مطلب می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که در مرحله ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از گلدهی مسیر سنتز استیگماسترول بسیار فعال‌تر از دیگر مسیر سنتز استروئیدها یعنی تولید کلسترول و هورمون‌های استروئیدی بوده و عمده فعالیت نیز در این مسیر است. همچنین مقایسه بیان آنزیم SMT2 نسبت به سیکلوآرتنول سینتاز، به‌عنوان یکی از آنزیم‌های بالادست‌های مشترک مسیر سنتز استیگماسترول و براسینواستروئید (براسیکاسترول و کمپسترول) نشان می‌دهد که میزان بیان SMT2 نسبت به سیکلوآرتنول سینتاز حدود ۶ برابر افزایش بیان دارد و چون این مقدار با میزان بیان SMT2 نسبت به اسکوآلن سینتاز برابر است، پس شاید بتوان بیان کرد که عمده فعالیت مسیر سنتز استروئیدها در گیاه کدوی تخم‌کاغذی در ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از گلدهی در مسیر سنتز بتاسیتوسترول و استیگماسترول است که با گذشت زمان و نزدیک شدن به زمان بلوغ، ممکن است از میزان بتاسیتوسترول در روغن کاسته شود. Herchi و همکاران (۲۰۰۹) علت این امر را در دانه‌های بالغ این طور بیان کردند که در موقع رسیدگی بذر، گیاه استرول‌های موجود در خود را به هورمون‌های استروئیدی مثل براسینواستروئید و ویتامین‌ها پیش برده و در نهایت رشد و نمو بافت‌های نابالغ را تنظیم می‌کند.

به‌عنوان نتیجه کلی می‌توان بیان کرد، در این مطالعه افزایش میزان تنش خشکی اثر منفی بر میزان تولید روغن حاصل از بذر رسیده کدوی تخم‌کاغذی داشت ولی فیتواسترول‌های تشکیل دهنده روغن به‌ویژه بتاسیتوسترول افزایش یافتند و این افزایش در رقم استریاکا از بقیه ژنوتیپ‌ها بیشتر بود. این امر نشان‌دهنده تولید بیشتر بتاسیتوسترول و در نهایت استیگماسترول در این گیاه در شرایط تنش خشکی می‌باشد. بررسی‌های مولکولی از میوه‌های کوچک حاوی بذرهای نارس این گیاه در ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از گلدهی و تجزیه داده‌های حاصل از آن مشخص کرد که سطح دیم‌کاری بالاترین میزان بیان ژنی را داشته و در این سطح تنش، مسیر سنتز بتاسیتوسترول و در نهایت استیگماسترول بسیار فعال‌تر از دیگر مسیرهای سنتز استروئیدها است.

منابع مورد استفاده

- Ahmadi Avval, P., Mojab, F. and Noujavan, S., 2006. Quantitation of 7-sterols in seeds oil of *Cucurbita pepo*. Journal of Medicinal Plant, 3(23): 72-79.
- Awad, A.B., Barta, S.L., Fink, C.S. and Bradford, P.G., 2008. Beta-Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. Molecular Nutrient and Food Research, 52: 419-426.
- Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goïty, L., Erazo, S., Negrete, R., Theodoluz, C., Rodríguez, J. and Delporte, C., 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. Journal of Ethnopharmacology, 116: 263-269.
- Bahreininejad, B., Razmjoo, J. and Mirza, M., 2014. Effect of water stress on productivity and essential oil content and composition of *Thymus carmanicus*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17(5): 717-725.
- Barzegar, R., Peyvast, Gh., Ahadi, A.M., Rabiei, B., Ebadi, A.A. and Babagolzadeh, A., 2013. Biochemical systematic, population structure and genetic variability studies among Iranian Cucurbita (*Cucurbita pepo* L.) accessions, using genomic SSRs and implications for their breeding potential. Biochemical Systematics and Ecology, 50: 187-198.
- Beck, F.X., Neuhofer, W. and Muller, E., 2000. Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 279: F203-F215.
- Blassberg, R. and Briscoe, J., 2018. Smoothened sensor places sodium and sterols center stage. Developmental Cell, 44(1): 3-4.
- Bouchereau, A., Clossais, B.N., Bensaoud, A., Beport, L. and Renard, M., 1996. Water stress effects on rapeseed quality. European Journal of Agronomy, 5: 19-30.
- Bouic, P.J., 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 4(6): 471-475.
- Chen, T.H.H. and Murata, N., 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Current Opinion in Plant Biology, 5(3): 250-257.
- Chen, M.X., Zhang, B., Li, C.X., Kulaveerasingam, H., Chew, F.T. and Yu, H., 2015. Transparent testa GLABRA1 regulates the accumulation of seed storage reserves in Arabidopsis. Plant Physiology, 169: 391-402.
- Divsalarmary, M., Thamasbisarvestani, Z., Modaressanavi, A.M. and Hamidi, A., 2016. Study the effect of drought stress on oil, protein percent and fatty acids composition of soybean grain. Plant Ecophysiology. 8(27): 44-55.
- Flexas, J. and Medrano, H., 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. Annals of Botany, 89: 183-189.
- Fruhwirth, G.O. and Hermetter, A., 2008. Production technology and characteristics of Styrian pumpkin seed oil. European Journal of Lipid Science Technology, 110: 637-644.
- Gossell-Williams, M., Davis, A. and O'Connor, N., 2006. Inhibition of testosterone-induced hyperplasia of the prostate of Sprague-Dawley rats by pumpkin seed oil. Journal of Medicinal Food, 9: 284-286.
- Habenicht, A.J.R., Glomset, J.A., Krng, W.C., Nist, C., Mitchell, C.D. and Ross, R., 1981. Early changes in phosphatidylinositol and arachidonic acid metabolism in quiescent SWISS 3T3 cells strmulated to divide by platelet-derived growth factor. The Journal of Biological Chemistry, 256: 12329-12335.
- Haines, T.H., 2001. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? Prog Lipid Research. 40: 299-324.
- Herchi, W., Harrabi, S. and Sebei, K., 2009. Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L. Plant Physiology and Biochemistry, 47: 880-885.
- Hosseini, S.H., Yousefzadeh, S., Yeritesayan, S. and Hemmati, K.H., 2016. Growth analysis and qualitative traits pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) affected by application of chemical and organic fertilizer. Journal of Plant Production, 23(1): 131-155.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K., 1999. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotechnology, 17: 287-291.
- Kim, M.Y., Kim, E.J., Kim, Y.N., Choi, C. and Lee, B.H., 2012. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (Cucurbitaceae) species and parts. Research and Practice, 6: 21-27.
- Kumar, M.S., Ali, K., Dahuja, A. and Tyagi, A., 2015. Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. Plant Physiology and Biochemistry, 96: 83-89.
- Lagarda, M.J., Garc´ıa-Llatas, G. and Farre´, R., 2006. Analysis of phytosterols in foods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41: 1486-1496.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2(T) (-Delta Delta C) method. Methods, 25: 402-408.

- López Pereira, M., Sadras, V.O. and Trapani, N., 1999. Genetic improvement of Sunflower in Argentina between 1930 and 1995. I. Yield and its component. Filed Crops Research, 62: 157-166.
- Philips, K.M., Ruggio, D.M. and Ashraf-Khorassani, M., 2005. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 9436-9445.
- Purcell, L.C., Serraj, R., Sinclair, T.R. and De, A., 2004. Soybean N2 fixation estimates, ureide concentration, and yield responses to drought. Journal of Crop Science, 44: 484-492.
- Rabbi Angourani, H., Panahande Yangajeh, J., Boland Nazar, S.A., Saba, J. and Zare Nahandi, F., 2017. The effects of exogenous salicylic acid on some quantitative and qualitative attributes of medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. Styriaca) under drought stress. Advances in Bioresearch, 8(2): 242-249.
- Rao, S.R. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20: 101-153.
- Razmjoo, Kh., Heydarizadeh, P. and Sabzalian, M.R., 2008. Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. International Journal of Agriculture & Biology, 10(4): 451-454.
- Roche, J., Mouloungui, Z., Cerny, M. and Merah, O., 2016. Fatty acid and phytosterol accumulation during seed development in three oilseed species. International Journal of Food Science and Technology, 51(8): 1820-1826.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R. and O'Brien, N.M., 2007. Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. Plant Foods for Human Nutrition, 62: 85-91.
- Sajed, M.A., Moghadem, H.H., Yazdani, D. and Ahmadi Avval, P., 1999. Effects of plastic mulches, spacing and phosphorus and potassium fertilizer levels on the growth and yield of common pumpkin, *Cucurbita pepo* convar pepo var. *styriaca*. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences, 21: 650-653.
- Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P. and Schaller, H., 2001. The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in Arabidopsis is controlled by Sterol Methyl transferase 2; 1. Plant Journal, 25: 605-615.
- Schaller, H., 2004. New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. Plant Physiology, 42: 465-76.
- Shafie Mashtany, S., Harachorloo, M. and Delkhosh, B., 2009. Physicochemical evaluation of oil extracted from different varieties of Iranian pumpkin seeds. Food Technology & Nutrition, 7(4): 57-68.
- Singh, S. and Sinha, S., 2005. Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea* (L.) Czern. (cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste. Ecotoxicology and Environmental Safety, 62(1): 118-127.
- Stefanoudaki, E., Chartzoulakis, K., Koutsaftakis, A. and Kotsifaki, F., 2001. Effect of drought stress on qualitative characteristics of olive oil of cv Koroneiki. Grasas y Aceites, 52(3-4): 202-206.
- Tohidi Moghadam, H.R., Zahedi, H. and Ghooshchi, F., 2011. Oil quality of *canola cultivars* in response to water stress and super absorbent polymer application. Pesquisa Agropecuária Tropical, 41(4): 579-586.
- Valitova, J.N., Sulkarnayeva, A.G. and Minibayeva, F.V., 2016. Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. Biochemistry, 81(8): 1050-1068.
- Whitaker, B.D. and Gapper, N.E., 2008. Ripening-specific stigmasterol increase in tomato fruit is associated with increased sterol C-22 desaturase (CYP710A11) gene expression. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 3828-3835.
- Xu, H.M., Kong, X.D., Chen, F, Huang, J.X., Lou, X.Y. and Zhao, J.Y., 2015. Transcriptome analysis of *Brassica napus* pod using RNA-Seq and identification of lipid-related candidate genes. BMC Genomics, 16(858): 1-10.
- Yeagle, P.L., 2011. The Structure of Biological Membranes. CRC Press, 398p.
- Yoshida, Y. and Niki, E., 2003. Antioxidant effects of phytosterol and its components. Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo), 49(4): 277-280.
- Zeynali, M., Maleki Zanjani, B., Moradi, P. and Shekari, F., 2019a. Effects of field capacity based-irrigation levels on physiological and agronomic characteristics of medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). Applied Research in Field Crops, 31(4): 1-20.
- Zeynali, M., Maleki Zanjani, B., Moradi, P. and Shekari, F., 2019b. Effects of drought stress on some physiological traits, yield and yield component in four varieties of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 32(2): 439-452.

Effects of drought stress on phytosterols content and expression of key genes involved in Beta sitosterol biosysthesis pathway in medicinal plant pumpkin (*Cucurbita pepo* L.)

M. Zeynali[1*], B. Maleki Zanjani[2], P. Moradi[3], F. Shekari[2] and S.M. Niazkhani[4]

1*- Corresponding author, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran E-mail: Mzeynali.kh@gmail.com
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran
3- Natural Resources Research Division, Agricultural and Natural Resources Research Center of Zanjan, Zanjan Iran
4- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: October 2019 Revised: February 2020 Accepted: March 2020

Abstract

Biological stresses such as drought affect the production of secondary metabolites, especially plant sterols (phytosterols). Among the phytoestrols found in pumpkin seeds, betasitosterol is one of the most important components which also have many medicinal properties. In this study, the effect of five levels of drought stress on seed oil production and its phytosterols was studied in three genotypes and Styriaca variety of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). Analysis of phytosterols using GC/MS showed that increasing drought stress had a negative effect on oil production from pumpkin ripe seeds, but oil phytosterols, especially betasitosterol, increased and this increase was higher in Styriaca than other genotypes. To confirm these results, the seeds were harvested 15-30 days after flowering and the expression of SQS, PP2A, SMT2, ERG26 and Cycloartenol synthase genes involved in the phytosterol biosynthesis pathway was investigated. The results indicated that, among the different levels of drought stress and genes studied, highest expression level was observed at the rainfed level and at that time, betasitosterol and stigmasterol pathway had the main activity in steroid biosynthesis pathway in pumpkin.

Keywords: Beta sitosterol, *Cucurbita pepo* L., drought stress, gene expression, phytosterol, styriaca variety.