DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2012.6567

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۱۰-۹۷ (۱۳۹۱)

اثر سالیسیلیک اسید بر متیلاسیون ماده وراثتی در گیاه آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) مبتلا به سندرم هایپرهیدریسیتی

محبوبه زراوشان[۱]، فرانسواز برنارد [۲*] و زهره حیدریان[۳]

۱- کارشناس‌ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی، تهران
۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، هیئت علمی دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی، تهران
پست الکترونیک:F_bernard@sbu.ac.ir
۳- استادیار، هیئت علمی دانشگاه شیراز، پژوهشکده بیوتکنولوژی،دانشکده کشاورزی ، شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۰۷

چکیده

گیاه آویشن دنایی (*Thymus daenensis* celak subsp. daenensis) یکی از گونه‌های اندمیک جنس آویشن در ایران است که از تکنیک کشت درون- شیشه برای تکثیر آن استفاده می‌شود. هایپرهیدریسیتی یکی از مشکلاتی است که در رشد درون- شیشه دیده شده و با ایجاد بدشکلی مانع تکثیر گیاه می‌شود. در این تحقیق، اثر بنزیل آدنین و سالیسیلیک اسید بر متیلاسیون ماده ژنتیکی در بافت هایپرهیدریک مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور جوانه‌ها در محیط دارای بنزیل آدنین و سالیسیلیک اسید رشد یافتند. بدنبال آن اثر تیمارهای مذکور بر میزان تولید اکسیژن فعال و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی گردید. نتایج نشان داد که در محیط بدون هورمون و در محیط دارای بنزیل آدنین، میزان پرولین و پراکسید هیدروژن و آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در نمونه‌ها بالا می باشد، اما در تیمار سالیسیلیک اسید که موجب بازگشت هایپرهیدریسیتی در نمونه‌ها شده، کاهش مقدار پرولین و پراکسید هیدروژن و آنزیمهای آنتی اکسیدان دیده شد. بررسی‌های اپی ژنتیکی نشان داد که سالیسیلیک اسید اثری بر متیلاسیون DNAی اندامکی نداشت، ولی متیلاسیون DNAی ژنومی را به شدت کاهش داد. احتمالاً سالیسیلیک اسید با بیان یک سری از ژنهای فعال در شرایط تنشی سبب افزایش میزان پروتئین‌های دخیل در تنش‌زدایی گردیده و به گیاه در حفظ حالت طبیعی خود کمک می‌کند. احتمالاً کاهش متیلاسیون در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید می‌تواند در دهایپرهیدریسیتی‌شدن دخیل باشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن دنایی، ریزازدیادی، هایپرهیدریسیتی، سالیسیلیک اسید، متیلاسیون DNA.

مقدمه

گیاه آویشن دنایی(*Thymus daenensis* Celak.) از خانواده‌ی نعنایان (Lamiaceae) می‌باشد. این گیاه بومی ایران بوده و در مناطق بختیاری، فارس، کوه دلو، کوه پرسی، کوه دنا، مرکزی و تهران می‌روید (Ghahreman, 2000). در چند سال اخیر، به دلیل دارا بودن مقدار بالای اسانس و ترکیبات مؤثره ضد میکروبی مانند تیمول و کارواکرول برای مصارف دارویی مورد توجه قرار گرفته است (Alnagar, 2009). یکی از مشکلات پیش‌روی محققان در تولید انبوه گیاه به روش کشت درون- شیشه

ایجاد سندرم هایپر هیدریسیتی است که بافت گیاهچه‌ها پر آب شده و حالت شیشه‌ای به خود می‌گیرد و سبب از بین رفتن ریزنمونه و عدم موفقیت در باززایی گیاه می‌گردد (Chakrabarty *et al.*,2005) در این سندرم تغییرات آناتومیکی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی پس از سپری شدن یک دوره زمانی معین بروز کرده که این تغییرات و زمان بروز آن با توجه به بافت و گیاه مورد استفاده به‌عنوان ریز نمونه متغیراست (Kevers *et al.*, 2004).

در گیاهچه‌های مبتلا به این سندرم جوانه‌ها شفاف و دارای میانگره کوتاه با برگ شفاف، گوشتی، تغییر شکل یافته، شکننده و پرآب با رنگ سبز روشن می‌باشد (Fauguel *et al.*, 2008). پارانشیم پوستی در ساقه ها به میزان زیادی افزایش یافته و فضای بین سلولی بیش از میزان طبیعی مشاهده می‌شود (Debergh *et al.*, 1992) . آب درون بافت افزایش یافته، سازمان یافتگی در استروما و گرانا کلروپلاستی وجود ندارد و محتوای رنگدانه‌ها کاهش می‌یابد (Chakrabarty *et al.*, 2005). در ایجاد هایپرهیدریسیتی در گیاهان مختلف عواملی مانند هورمونها و تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزنمونه، محیط کشت، ظرف کشت و شرایط محیطی مؤثرند. (Ochatt *et al.*, 2001 ,Benson *et al.*, 2000, Debergh *et al.*, 1992, Abdoli *et al.*,,2007, Dantas de Oliveira *et al.*, 1997, Winarto *et al.*, 2004) .

بنزیل آدنین (Benzyladenine) اولین ماده سنتزی می‌باشد که از لحاظ ساختمان و عملکرد مشابه سیتوکینین‌هاست. افزودن این ماده به محیط کشت *Lavandula dentate* سبب بهبود جوانه‌زنی و افزایش شاخه‌زایی (Echeverrigaray *et al.*, 2005) ، تنظیم گلدهی و میوه دهی شده و تقسیم سلولی را کنترل می‌نماید. اما استفاده از آن در محیط کشت موجب ایجاد سندرم هایپرهیدریسیتی در گیاه *Lathyrus sativus* (Ochatt *et al.*, 2001) و گیاه سیب کشت شده به روش درون- شیشه گردید (Chakabarty *et al.*, 2005). تیمار با بنزیل آدنین افزایش شاخه زایی را در ریز نمونه‌های آویشن دنایی سبب شده، اما ایجاد پدیده هایپر هیدریسیتی را نیز القا می‌نماید (Alnagar, 2009). در تحقیقی در گیاه آویشن دنایی، تیمار سالیسیلیک اسید با کاهش میزان آب داخلی گیاه، سبب بهبود گیاه و کاهش هایپرهیدریسیتی در ریزنمونه‌ها شد (Zarafshan, 2010).

در گیاهان مختلف مبتلا به سندرم هایپرهیدریسیتی، پروتئین‌های شاخص تنش ازجمله پرولین و آنزیم‌های دخیل در تبدیل اکسیژن فعال تولید شده در تنش اکسیداتیو، افزایش نشان دادند. بنابراین می‌توان این پدیده را به‌عنوان نوعی شرایط تنش برای گیاه به‌حساب آورد (Umebese *et al.*,2009; Gaspar *et al.*, 2002; Verma & Mishra, 2005; Montoliu *et al.*,2009; Mishra *et al.*, 2006). سلولهای تحت این تنش تولید یک سری ترکیبات اکسیداتیو نموده و سیستم دفاعی **راس (**ROS**)** را فعال می‌کنند. در نتیجه مقدار ترکیبات پراکسید هیدروژن و آنیون سوپراکسید در بافتها بالا رفته که این افزایش باعث آسیب به ساختار سلولی و تخریب اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و دیواره سلولی می‌شود. گیاه برای دفاع سیستم آنتی‌اکسیدانی خود را فعال می‌کند. گروهی از این ترکیبات منجر به فعال شدن آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز می‌گردد که درنهایت سبب خنثی کردن اثر ترکیبات تولید شده در ROS با تبدیل اکسیژن فعال آنها به مواد بی‌خطری چون آب می‌شود. اندازه‌گیری میزان افزایش این آنزیم‌ها در بافت‌های هایپرهیدریسیته می‌تواند به‌عنوان مشخصه‌ای از ابتلا استفاده شود (Montoliu *et al.*, 2009, Mishra *et al.*,2006).

هر تغییر مورفولوژیک و فیزیولوژیک در گیاه نشانه‌ای از تغییر در بیان ژنهای آن است. یکی از طرق تنظیم بیان ژنها در یوکاریوتها پدیده متیلاسیون می‌باشد. متیلاسیون انزیماتیکی بازها در DNAی تمامی موجودات دیده شده و توسط آنزیم DNA–متیل ترانسفراز انجام می‌شود. این آنزیم قادر به متیله کردن بازهای آدنین در محل نیتروژن شماره ٦، باز سیتوزین در محل نیتروژن ٤ و یا در محل کربن شماره ۵ می‌باشد. امّا اغلب متیلاسیون بیشتر از نوع گروه سوم است و برروی سیتوزین انجام می‌گیرد (Zilberman *et al.*, 2007, Teixeira *et al.*, 2009).

در طی دوره رشدی گیاه الگوی متیلاسیون DNA تغییر می‌کند. متیلاسیون نوکلئوتیدها یک فرایند تنظیم شده است. اتصال عوامل فعال‌کننده، پیش از اتصال متیل ترانسفراز به پروموترDNA سبب ممانعت از متیله شدن DNA در محل اتصالشان شده و حتی ممکن است توالی بتدریج د- متیله گردد (Xiao *et al.*, 2006). علاوه‌براین، متیلاسیون سبب تنظیم فازهای رویشی و زایشی در گیاه شده به‌طوری‌که درگیاه سیب درختی برای خروج از فاز رویشی به زایشی متیلاسیون با غیرفعال کردن برخی از ژنهای دخیل در این فرایند تغییر مرحله را در گیاه جلو می‌برد (Hafiz *et al.*, 2001). متیلاسیون علاوه بر نقش تکاملی، در تنظیم بیان ژنها نیز مؤثر است. فاکتورهای رونویسی به حضور سیتوزین متیله شده در DNA حساس بوده و فعالیت رونوشت برداری و حتی مضاعف شدگی با توجه به درجه متیلاسیون سیتوزین در ناحیه پروموتور تغییر می‌کند (Hafiz *et al.*, 2001). متیلاسیون علاوه بر ژنوم هسته‌ای در ماده ژنتیکی کلروپلاست و میتوکندری گیاهان نیز گزارش شده است (Ngernprasirtsiri *et* al., 1988, Umen *et al.*, 2001, Kobayashi *et al.*, 1990)

ولی مطالعاتی که توسط Mazin در سال ۱۹۸۸ انجام شد نشان داد که متیلاسیون در DNAی کلروپلاستی و میتوکندریایی نسبت به DNAی هسته‌ای بسیار پایینتر است. در گیاه آرابیدوپسیس متیل ترانسفراز I آنزیم دخیل در متیلاسیون بوده و چنانچه موتاسیونی در این ژن رخ دهد گیاه تکامل غیر عادی درمرحله بعد از جنینی، کاهش زیستایی و الگوی ناصحیح از تقسیم سلولی، قطبیت و شیب اکسین را نشان می‌دهد (Hafiz *et al.*, 2001)

در تحقیقی که توسط Hardling (1994) انجام شد اثر مانیتول بر میتلاسیون DNA مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که افزودن مانیتول به محیط کشت سیب زمینی باعث افزایش متیلاسیون در ماده وراثتی آن می گردد. در تحقیقات دیگری که توسط Lopez-Delgado (1998) بر روی گیاه سیب زمینی و در تکمیل آزمایش Hardling انجام شد افزودن استیل سالیسیلیک اسید به محیط کشت باعث برگشت شکل نرمال در گیاه و کاهش متیلاسیون در ماده وراثتی شد (Stokes *et al.*, 2001, Lopez-Delgado *et al.*, 1998, Hardling 1994). از سویی استیل سالیسیلیک اسید (50µM) در محیط نیمه‌جامد باعث کم شدن آب داخلی بافت و کاهش هایپرهیدریسیته در گیاه *Origanum vulgare* می‌شود (Andarwulan *et al.*, 1999).

آزمایشهای اولیه نشان داد که سالیسیلیک اسید تأثیر مثبت بر جلوگیری از پدیده هایپرهیدریسیتی در گیاه آویشن دنایی دارد. در این تحقیق اثر سالیسیلیک اسید بر پروتئین‌های پرولین، میزان پراکسید هیدروژن و آنزیم‌های آنتی اکسیدان مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی دلایل مولکولی و تأثیرات این هورمون بر میزان متیله‌شدن ژنوم هسته‌ای و اندامکی، ماده وراثتی از

اندامکها (میتوکندری و کلروپلاست)و هسته‌ی سلول استخراج‌شده و مقدار متیلاسیون در آنها، در تیمار ریزنمونه‌ها با سالیسیلیک اسید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

کشت بافت و آنالیز رشد

بذر گیاه *Thymus daenesis* Celak. از منطقه آباده در استان فارس جمع‌آوری شد. یک نمونه از گیاه کامل جمع‌آوری شده از این منطقه با شماره هرباریومی MPH-660 در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران نگهداری شد. بذرها به مدت ۲ دقیقه در ۳۰ میلی‌لیتر محلول آب مقطر سترون‌سازی‌شده، حاوی ۳ قطره توین ۲۰ و ۲ دقیقه در محلول الکل ۷۰٪ (v/v) قرار داده شد. سپس بذرها دوبار با آب مقطر سترون‌سازی‌شده به مدت ۵ دقیقه شستشو شده و بعد از آن ۵ دقیقه در هیپوکلریت ۱٪ غوطه‌ور شد. نهایتاً ۳ بار در آب مقطر به ترتیب ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو شد. محیط کشت موراشیگ-اسکوگ (Murashige & Skoog, 1962) همراه با ساکارز ۳۰ گرم در لیتر و آگار به غلظت ۷ گرم در لیتر به همراه بنزیل آدنین(۰و۱ میلی‌گرم در لیتر) آماده گردید. شیشه‌های حاوی نمونه در اتاق رشد با دمای ۳±۲۵ درجه سانتیگراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تحت نور فلوئورسنس ۲۲۰۰ لوکس نگهداری شد.

بعد از چهار هفته ساقه‌های رشدیافته از بذر در محیط همسان با قبلی (بنزیل آدنین۱ و ۰ میلی‌گرم در لیتر) واکشت گردید. تنها تفاوت این مرحله با مرحله قبل کاهش مقدار ساکارز محیط به نصف مقدار اولیه (۱۵ گرم در لیتر) است که این کاهش به منظور تحریک سیستم فتوسنتزی و بهبود کیفیت نمونه‌ها صورت گرفت. پس از چهار هفته، نمونه کشت شده در محیط بدون هورمون واکشت شد و نمونه‌های کشت شده در محیط دارای بنزیل آدنین در محیط‌هایی تحت چهار نوع تیمار مختلف با تیمار بدون بنزیل آدنین، محیط با تیمار بنزیل آدنین ۱ میلی‌گرم در لیتر، محیط با تیمار بنزیل آدنین ۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه سالیسیلیک اسید5 میکرومولار و محیط بدون بنزیل آدنین دارای سالیسیلیک اسید5 میکرومولار واکشت شد، البتّه شرایط اتاق کشت مشابه مراحل قبل است. در پایان چهار هفته بررسی‌های مولکولی و فیزیولوژیکی بر روی ریزنمونه‌ها انجام شد.

مقدار پرولین

استخراج پرولین با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انجام شد. جذب محلول در ۵۲۰ نانومتر خوانده شده و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت آن محاسبه شد.

بررسی فعالیت کمی ترکیبات آنتی اکسیدان

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوایکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با روش Ruley و همکاران (۲۰۰٤) انجام شد. برای سنجش فعالیت گوایکول پراکسیداز جذب در ۳ دقیقه در طول موج ۵۱۰ نانومتر و برای آسکوربات پراکسیداز در ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر گرم وزن تر بافت محاسبه شد. اندازه‌گیری فعالیت کمی پراکسید هیدروژن طبق روش Velikovaو همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. جذب در ۳۹۰ نانومتر خوانده شده و با استفاده از منحنی استاندارد مقدار فعالیت آن محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل‌های مولکولی

DNAی اندامکی از تلفیق دو روش (Scotti *et al.*, 2001; Triboush *et al.*, 1998) بدست آمد. گیاه ٤ هفته‌ای آویشن دنایی به مدت ٤٨ ساعت قبل از استخراج در تاریکی قرار گرفته تا میزان نشاسته در بافت گیاه کاهش یابد. یک تا پنج گرم از بافت تازه برداشته شد، بعد در هاون سرد با کمک ازت مایع کوبیده شد تا بافت هموژنی بدست آید. مخلوط از میان فیلتر نایلونی (۳۰۰میکرو) فیلتر و سپس سانتریفیوژ شد. برای رسوب پلاستید ماده فوقانی دوبار سانتریفوژ شد. برای رسوب میتوکندری، سوپرناتانت در g١٤٥٠٠ سانتریفوژ شد (Scotti *et al.*, 2001). به هر تیوپ به میزان۱۰ میکرولیتر DNaseاضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید (Triboush *et al.*, 1998). سپس پروتئیناز k اضافه گردید تا حجم نهایی به ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برسد، درضمن ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و پس از سانتریفیوژ DNA با حجم برابر اتانول خالص رسوب داده شد (Scotti *et al.*, 2001).

همینطور DNAی ژنومی با استفاده از روش CTAB استخراج شد (Weising *et al.*, 2005). با استفاده از دستگاه نانو دراپ مقدار DNA در 1µL از محلول اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری متیلاسیون DNA با استفاده از دستورالعمل موجود در کیت-SIGMA ALDRICH,Imprint methylated DNA Quantification Kit, Catalog Number MDQ1 انجام شد. طی این روش ۳۰ میکرولیتر از هر محلول در میکروپلیت ریخته شد و محلولها طبق دستور پروتکل افزوده شد. روی میکروپلیتها با پارافیلم پوشانده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. پس از تغییر رنگ مشاهده شده، جذب در ٤٥٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Eliza خوانده شد. از میانگین اعداد بدست آمده، با استفاده از فرمول موجود در پروتکل، درصد متیلاسیون هر نمونه بدست آمد (Shen *et a*l., 2007, Leone *et al.*, 2002).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

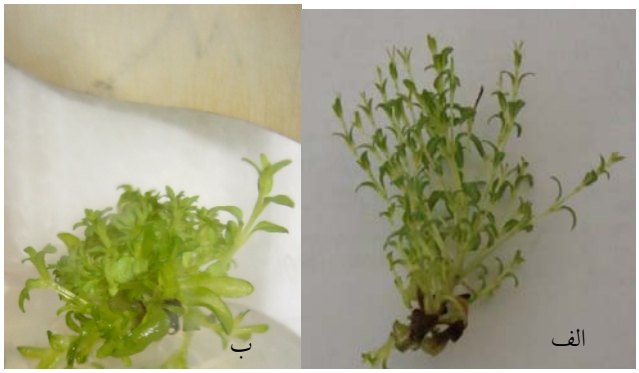
در پایان مراحل آزمایش در هر تیمار ۵ تکرار از ۲۰ نمونه سنجش شد و آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و ANOVA (مقایسه میانگین‌ها با برنامه LSD و Tukey) به کمک نرم‌افزار SPSS16 مورد تحلیل قرار گرفت.

نتایج

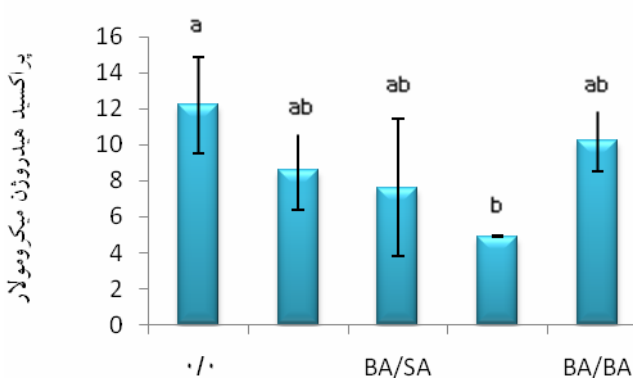
پدیده‌ی شیشه‌ای شدن در تیمار با بنزیل آدنین کاملاً مشهود است. ساقه‌هایی که در محیط دارای بنزیل آدنین رشد کرده بودند دارای برگ‌های لوله‌ای و پر آب، کم رنگ و شفاف و دارای ساقه‌ای کوتاه بودند که برگ‌ها بر روی آن بسیار نزدیک به هم و فشرده دیده می‌شدند. در مقابل، ساقه‌هایی که در محیط بدون بنزیل آدنین و یا دارای سالیسیلیک اسید رشد کرده بودند حالتی نرمال و غیر هایپرهیدریک داشتند(شکل ۱ الف و ب).

شاخص‌های آنتی اکسیدانی

نمونه‌ی هایپرهیدریک که در محیط دارای بنزیل آدنین (بدون سالیسیلیک اسید) رشد یافته و نمونه‌هایی که در محیط بدون هورمون رشد یافتند، مقدار پراکسید هیدروژن بالاست، ولی نمونه‌هایی که در محیط دارای سالیسیلیک اسید (چه به صورت مجزا و چه به صورت ترکیب با بنزیل آدنین) رشد یافتند، مقدار این ماده پایین است و سالیسیلیک اسید به همراه بنزیل آدنین اثر قوی‌تری در کاهش پراکسید هیدروژن دارد (شکل ۲).



شکل ۱- الف) گیاه هایپرهیدریک با تیمار بنزیل آدنین ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، ب) گیاه غیرهایپرهیدریک با تیمار بنزیل آدنین ۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه سالیسیلیک اسید ۵ میکرومولار که به حالت نرمال بازگشته



شکل ۲- مقدار پراکسیدهیدروژن در ساقه‌های رشد یافته در محیط‌های مختلف

(نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط بدون هورمون منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط دارای بنزیل آدنین به محیط‌های فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به‌همراه بنزیل آدنین؛ (BA/BA+SA) بنزیل آدنین (BA/BA) منتقل شد).

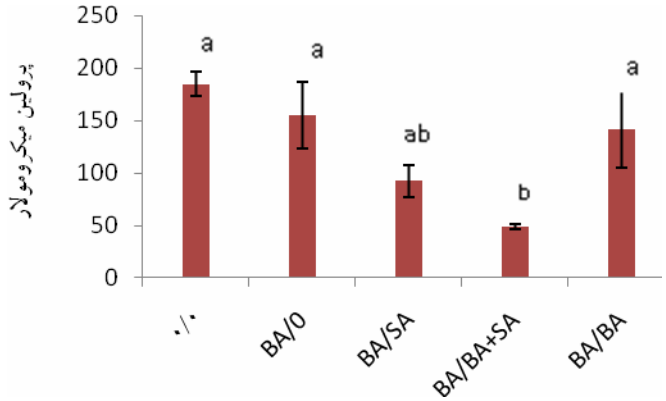
بارها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.

در نمونه هایپرهیدریک و نمونه‌هایی که در محیط بدون هورمون رشد یافتند، مقدار پرولین بالاست ولی سالیسیلیک اسید باعث پایین آمدن مقدار پرولین گردید (شکل ۳).

پراکسیداز در نمونه‌های رشد یافته در محیط بدون بنزیل آدنین بالا بود. البته میزان گوایکول پراکسیداز در محیط دارای بنزیل آدنین نیز بالا بود و سالیسیلیک اسید سبب کاهش هر دو آنزیم گردید (شکل ٤ الف و ب).

بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

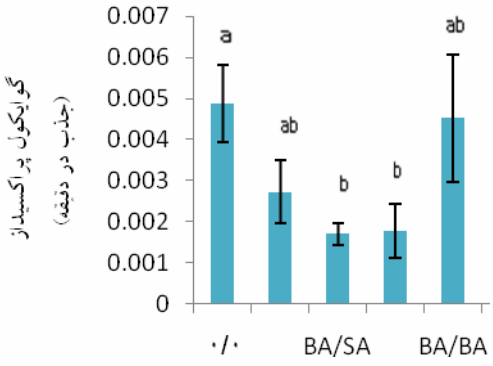
میزان آنزیم‌های گوایکول پراکسیداز و آسکوربات



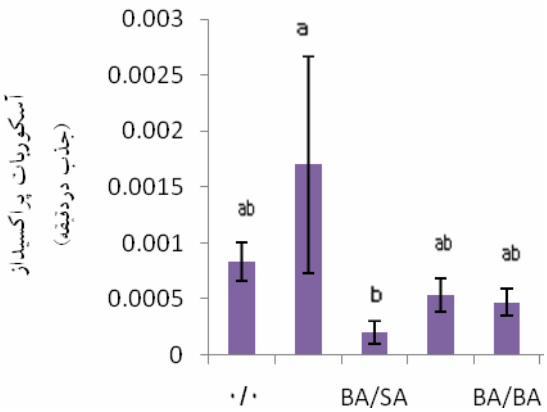
شکل ۳- نمودار تعیین مقدار پرولین در ساقه‌های رشد یافته در محیط‌های مختلف

(نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط بدون هورمون منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط دارای بنزیل آدنین به محیط‌های فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به‌همراه بنزیل آدنین؛ (BA/BA+SA) بنزیل آدنین (BA/BA) منتقل شد).

بارها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.



الف

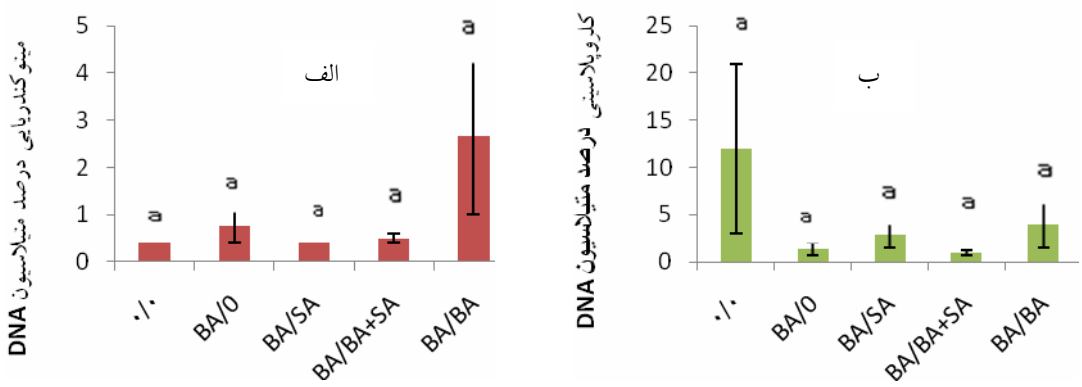


شکل ٤- نمودار تعیین مقدار آنزیم‌های آنتی اکسیدان در ساقه‌های رشد یافته در محیط‌های مختلف رشد

نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط بدون هورمون منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط (الف)گوایکول پراکسیداز ب) آسکوربات پراکسیداز دارای بنزیل آدنین به محیط‌های فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک بهمراه بنزیل آدنین؛ (BA/BA+SA) و بنزیل آدنین(BA/BA) منتقل شد). بارها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.

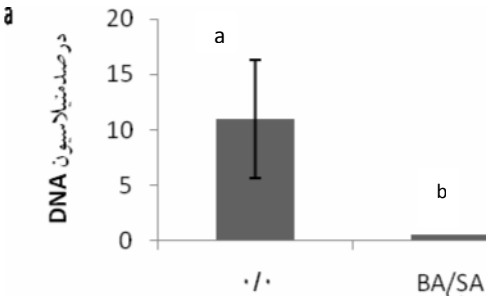
بررسی اثر تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان متیلاسیون ژنوم هسته‌ای و اندامکی

میزان متیلاسیون DNA در کلروپلاست و میتوکندری با وجود تفاوتهای عددی که بین نمونه‌ها دیده شد، پس از بررسی‌های آماری وتجزیه و تحلیل واریانس آن، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد (شکل ۵ الف و ب).



شکل ۵- نمودار اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر متیلاسیون DNA اندامکی. (الف) DNA کلروپلاستی، (ب) DNA میتوکندریایی.

نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط بدون هورمون منتقل شده و بقیه نمونه‌ها از محیط دارای بنزیل آدنین به محیط‌های فاقد هورمون (BA/0)، واجد سالیسیلیک (BA/SA)، واجد سالیسیلیک به‌همراه بنزیل آدنین؛ (BA/BA+SA) بنزیل آدنین (BA/BA) منتقل شد). بارها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.



شکل ٦- نمودار مقایسه متیلاسیون DNA ژنومی دو نمونه رشدیافته در محیط بدون هورمون و محیط دارای سالیسیلیک اسید.

(نمونه (0/0) از محیط بدون هورمون به محیط بدون هورمون و نمونه دیگر از محیط دارای بنزیل آدنین به محیط دارای سالیسیلیک اسید 5µM منتقل شد).

DNA ژنومی از نمونه نرمال و نمونه بازگشته به حالت نرمال با تیمار سالیسیلیک اسید، استخراج شد. گروهی که در محیط بدون هورمون رشد یافته بودند هرگز هایپرهیدریسیتی را نشان ندادند ولی نمونه‌های رشدیافته

در محیط دارای سالیسیلیک اسید، پیش از انتقال به این محیط هایپرهیدریک بودند. درصد متیلاسیون در گیاهچه‌های رشدیافته در محیط دارای سالیسیلیک اسید کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه بدون هورمون نشان داد (شکل ٦).

به نظر می‌رسد که سالیسیلیک اسید اثری بر متیلاسیون کلروپلاست و میتوکندری نداشته، امّا در سطح هسته‌ای، کاهش شدید متیلاسیون DNA دیده می‌شود. کاهش متیلاسیون با افزایش میزان نسخه‌برداری همراه بوده و به نظر می‌رسد در این تیمار ژن‌های زیادی نسبت به شرایط بدون هورمون فعال می‌گردد.

بحث و نتیجه‌گیری

سالیسیلیک اسید یکی از هورمونهای مهم گیاهی است که نقش بسزایی در مسیر پاسخ دفاعی گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارد و سبب القاء ژن‌های دخیل در مسیرهای بیوشیمیایی و مولکولی منجربه واکنش‌های دفاعی گیاه می‌گردد (Wildermuth *et al.*, 2001, Hayat *et al.*, 2008). این هورمون از گروه ترکیبات فنلی طبیعی بوده که در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه نقش دارد (Barkosky *et al* ;Raskin,1992; Gunes *et al.*, 2007; Senaranta *et al.*, 2002 ;1993). این سیگنال مولکولی شامل بعضی از سیستم‌های انتقالی است که از یک‌سو منجر به بیان آنزیم‌های ویژه‌ای در مسیر متابولیکی پرولین و دیگر اسمولیت‌ها در شرایط استرس‌زا گردیده (Misra *et al.*,2009) و از سوی دیگر مقاومت گیاه را در برابر عوامل بیماریزای گیاهی و دامنه وسیعی از استرس‌های اکسیداتیو بالا می‌برد (Shirasu *et al.*, 1997, Lee and Park 2010). همچنین سبب پایداری غشاء شده (Glass *et al.*, 1974)، با برهم‌کنش با سایرهورمون‌های تنظیم‌کننده رشد ازجمله اکسین، سیتوکنین و اتیلن باعث کاهش تنش‌های محیطی می‌شود (Xie *et al.*, 2007) . غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سالسیلیک اسید در گیاه عدس در شرایط تنش شوری سبب بهبود رشد، افزایش اسمولیت‌های آزاد (پرولین و گلیسین بتائین) و آنزیم‌های فعال‌کننده متابولیسم به نام کربوکسی ردوکتاز و پرولین اکسیداز و آنزیم‌های فعال‌کننده گلوتامین کیناز در بافت‌های ریشه و ساقه گردید (Misra *et al.*, 2009). هرچند در گیاه آویشن دنایی، بنزیل آدنین سبب افزایش پدیده هایپرهیدریسیتی و افزایش میزان آب درونی ساقه شد. انتظار می‌رفت، میزان پرولین نیز در این نمونه‌ها افزایش یابد (Kevers *et al.*, 2004) اما تغییر معنی‌داری در میزان پرولین بین تیمار بنزیل آدنین و نمونه‌های رشدیافته در محیط بدون بنزیل آدنین و نرمال دیده نشد. تحقیقات روی تیمار سالیسیلیک اسید در گوجه فرنگی و لپه افزایش پرولین تحت تأثیر سالیسیلیک اسید را نشان داد (Misra & Saxena 2009;Umebese *et al.*,2009) اما در این تحقیق تیمار سالیسیلیک اسید به همراه بنزیل آدنین به طور معنی‌داری میزان این اسیدآمینه را در ریز نمونه‌های آویشن کاهش داد که این کاهش پرولین تحت تأثیر سالیسیلیک اسید در ریز نمونه‌های هایپر هیدریسیتی ممکن است به‌دلیل کاهش میزان تنش پر آبی در گیاه (سالیسیلیک اسید در محیط کشت ساقه آویشن از میزان هایپرهیدریسیته می‌کاهد) و اثر برهم‌کنش سالیسیلیک اسید با هورمون بنزیل آدنین باشد (Xie *et al.*, 2007). سالیسیلیک اسید سبب کاهش معنی‌داری در میزان تولید پراکسید هیدروژن گردید. با توجه به عدم تفاوت معنی‌دار میزان پراکسید هیدروژن در تیمارهای رشدیافته در محیط بدون هورمون و محیط حاوی بنزیل آدنین و کاهش این میزان در تیمار سالیسیلیک اسید و در ترکیب تیمار هر دو

هورمون، می‌توان دو فرضیه را پیشنهاد کرد. اول اینکه سالیسیلیک اسید باعث پایین آوردن سطح نرمال میزان پراکسید هیدرژن و پرولین گیاه می‌گردد. با توجه به اینکه این هورمون خود یکی از عوامل افزایش میزان مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زنده با مکانیسم افزایش تولید پراکسید هیدروژن است Shirasu *et al.*, 1997, Straus *et al.*, (2010)، این فرضیه خیلی صحیح به‌نظر نمی‌رسد. دوم اینکه محیط کشت به خودی خود محیطی تنش‌زا محسوب می‌گردد و سبب افزایش سطح پراکسیدهیدروژن و به دنبال آن پرولین در گیاهان رشدیافته در محیط بدون هورمون گردیده و هورمون بنزیل آدنین تأثیری در افزایش میزان سطح پایه این مواد نداشته ولی سالیسیلیک اسید این سطح را کاهش داده و از تنش وارده به گیاه کم می‌کند (Sakhabutdinova *et al.*, 2003). با توجه به شواهد موجود فرضیه دوم درست‌تر به‌نظر می‌رسد. برای آزمایش این فرضیه، میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نمونه‌ها بررسی شد. آنزیم‌های گوایکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز دو آنزیم مؤثر در دفاع گیاه و از بین برنده‌ی رادیکال‌های آزاد هستند (Montoliu *et al.*, 2009). مقدار فعالیت این آنزیم‌ها در هنگام استرس و تنش گیاه بالا می‌رود و افزایش آن نشانه وجود اکسیژن آزاد در گیاه است. در گیاه آویشن دنایی نیز این افزایش دیده شد. با توجه به میزان پراکسید هیدروژن و پرولین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که به دلیل بالا بودن تنش و افزایش اکسیژن آزاد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز در این نمونه‌ها بالاتر می باشد. اما در تیمار با بنزیل آدنین به‌رغم بالا بودن میزان پراکسید هیدروژن و پرولین میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز پایین است که می‌تواند یا به دلیل میان کنش بنزیل آدنین با آسکوربات پراکسیداز باشد و یا به دلیل کاهش آنتی اکسیدانها در این تیمار و افزایش میزان تنش و بروز فنوتیپ آبدار شدن بافت‌ها و دفرمه شدن و تخریب بافت ایجاد شده باشد. اما در تیمار سالیسیلیک اسید هم میزان اکسیژن فعال و هم میزان آنتی اکسیدان کاهش یافته که نشانه کاهش تنش در گیاه می‌باشد. این اثر در سم‌زدایی ریشه‌های برنج آلوده به کادمیوم توسط سالیسیلیک اسید نیز گزارش گردید (Choudhury & Panda 2004).

در تحقیقی که توسط Hardling (1994) انجام شد افزودن مانیتول به محیط کشت سیب زمینی باعث افزایش متیلاسیون در مادهٔ وراثتی آن گردید. از آنجا که مانیتول ایجادکننده تنش اسموتیک و خشکی در گیاه است، به نظر می‌رسد عامل افزایش متیلاسیون در گیاه سیب زمینی استرس اسموتیک باشد. در تحقیقات دیگری که توسط Lopez-Delgado (1998) بر روی گیاه سیب‌زمینی و در تکمیل آزمایش Hardling انجام گردید اضافه‌کردن استیل سالیسیلیک اسید به محیط باعث برگشت شکل دفرمه گیاه به حالت طبیعی شد. در واقع استیل سالیسیلیک اسید حالت استرس اسموتیک را در محیط کشت گیاه برطرف نمود. بررسی‌های مولکولی توسط این محقق نشان داد که سالیسیلیک اسید با کاهش در متیلاسیون DNA ژنومی گیاه سبب بروز تغییرات مورفولوژیکی در گیاه می‌گردد. البتّه اثر مشابهی بر متیلاسیون DNA در تیمار سالیسیلیک اسید در گیاه *Taraxacum officinale* (Koen *et al.*, 2009) و استیل سالیسیلیک اسید در آرابیدوپسیس دیده شد (Stokes *et al.*, 2001). در گیاه آویشن دنایی، مقدار متیلاسیون DNAی اندامکی تفاوت معنی‌داری را در ساقه نرمال و هایپرهیدریک نشان نداد. احتمالاً در آویشن ماده وراثتی اندامکی پایدار است وتحت تأثیر هورمون و شرایط محیطی قرار نمی‌گیرد. طبق مطالعاتی که توسط Mazin در سال ۱۹۸۸ انجام شد، به طور کلی، در اعضای

یک گونه، میزان متیلاسیون در DNAی کلروپلاستی و میتوکندریایی نسبت به DNAی هسته‌ای بسیار پایین است. اما متیلاسیون DNAی هسته‌ای در نمونه‌ی رشدیافته در محیط دارای سالیسیلیک اسید نسبت به نمونه‌ی رشدیافته در محیط بدون هورمون کاهش معنی‌داری را نشان داد. از آنجایی که متیلاسیون سبب غیر فعال شدن و عدم رونویسی ژنها می‌گردد. از این نتایج می‌توان چنین استنباط کرد که تیمار سالیسیلیک اسید احتمالاً با بیان یک سری از ژنهای دخیل در شرایط تنش سبب افزایش میزان پروتئین‌های دخیل در تنش‌زدایی گردیده و به گیاه در حفظ حالت طبیعی خود کمک می‌کند (Straus *et al.*, *2010*, Ohtake *et al.*, 2000 . *al.*, Gallego-Giraldo *e*t 2011,). بررسی پروتئوم آرابیدوپسیس در دانه‌های تحت تنش نشان داد که میزان بسیاری از پروتئین‌های دخیل در جوانه‌زنی، که سبب به تأخیر افتادن جوانه‌زنی به‌منظور تشکیل مکانیسم‌های مقاومت دربرابر استرس می‌گردد، در اثر تیمار سالیسیلیک اسید افزایش می‌یابد (Rajjou *et al.*, 2006). همچنین سالیسیلیک اسید سبب کاهش بیان ژن‌هایی نظیر آلفا آمیلاز و افزایش بیان ژن‌های وارکی (warky) در جو در زمان جوانه‌زنی می‌گردد (Xie *et al.*, 2007). اثر محافظتی تیمار سالیسیلیک اسید در برابر استرس‌های محیطی و افزایش تحمل و رشد گیاه در شرایط استرس در گیاهچه‌های گندم نیز گزارش گردیده، که افزایش مقاومت با تغییر بیان ژن‌های دخیل در فرایندهایی ازجمله پروتئین‌های شوک گرمایی (Heat shock proteins) و پروتئین دخیل در سنتز لکتین گزارش گردیده است (Sakhabutdinova *et al.*, 2003). احتمالاً کاهش متیلاسیون در اثر تیمار با سالیسیلیک اسید می‌تواند در دهیپرهیدریسیتی دخیل باشد. بنابراین با توجه به نقش سالیسیلیک اسید در دفاع به نظر می‌رسد که این هورمون گیاه را در یک لاک دفاعی فرو برده و با افزایش ژن‌های دخیل در فرایندهای دفاعی مواد ضد تنش و افزایش استحکام دیواره و با برهم‌کنشی که با بنزیل آدنین و سایر هورمون‌های گیاهی ازجمله آبسیسیک اسید سبب برگشت ضایعات ناشی از پدیده هایپر هیدریسیتی می‌گردد (Glass *et al.*, 1974, Sakhabutdinova *et al.*, 2003, Gunes *et al.*, 2007, Shakirova *et al.*, 2003). در ادامه، به منظور یافتن ژنهای دخیل در فرایند آزمایش‌های تکمیلی مورد نیاز می‌باشد.

سپاسگزاری

از کارکنان بخش تحقیقات و آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه شهید بهشتی که امکانات و آزمایشگاه مورد نیاز برای انجام این آزمایش را در اختیار ما قرار دادند، تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Abdoli, M., Moieni, A. and Dehghani, H., 2007. Effects of cultivar and agar concentration on *in vitro* shoot organogenesis and hyperhydricity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Pakistan Journal Botany, 39: 31-35.
- Alnajar, N., 2009. Micropropagation and effect of salinity stress on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak, Thesis. Shahid Beheshti University, Tehran 192 p.
- Andarwulan, N. and Shetty, K., 1999. Influence of acetyl salicylic acid in combination with fish protein hydrolysates on hyperhydricity reduction and phenolic synthesis in oregano (*Origanum vulgare*) tissue cultures. Journal of Food Biochemistry, 23:619-635.
- Barkosky, R.R. and Einhellig, F.A., 1993. Effects of salicylic acid on plant–water relationships. Journal of Chemical Ecology, 19: 237–247.

– Bates, L., Waldren, S. and Teare, P. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207
– Benson, E., Danaher, J.E., Pimbley, I.M., Anderson, C.T., Wake, J.E., Daley, S. and Adams, L.K., 2000. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*:a rare Scottish plant. Biodiversity and Conservation, 9: 711–726
– Chakrabarty, D., Park, S.Y., Ali, M.B., Shin, K.S. and Paek, K.Y., 2005. Hyperhydricity in apple: ultrastuctural and physiological aspects. Tree Physiology, 26: 377–388.
– Choudhury, S. and Panda ,S.K., 2004. Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in *Orysa sativa* roots. Bolgarian Journal of Plant Physiology, 30: 95-110.
– Dantas de Oliveira, A.K., Canal, M.J., Centeno, M.L., Feito, I., Fern and Ez,B., 1997. Endogenous plant growth regulators in carnation tissue cultures under different conditions of ventilation. Plant Growth Regulation, 22: 169–174.
– Debergh, P., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B. and von Arnold, S., 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30: 135-140.
– Echeverrigaray, S., Basso, R. and Andrade, L.B., 2005. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. Biologia Plantarum, 49: 439-442.
– Fauguel, C.M., Vega, T.A., Nestares, G., Zorzoli, R. and. Picardi, L.A., 2008. Anatomy of normal and hyperhydric sunflower shoots regenerated *in vitro*. HELIA, 31: 17-26.
– Ghahreman, A,. 2000. Flora of Iran, Tehran University No:22.
– Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F. and Dommes, J., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regulation, 37: 263–285.
– Glass, A.D.M. and Dunlop, J., 1974. Influence of phenolic acids on ion uptake. IV Depolarization of membrane potentials. Plant Physiology, 54:855–858.
– Gunes, A., Inal ,A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E.G. and Cicek, N., 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. Journal of Plant Physiology, 164: 728-736.
– Hafiz, I., Anjum, M. and Grewal, C., 2001. DNA methylation - an essential mechanism in plant molecular biology .Acta Physiologiae Plantarum, 23:491-499.
– Hardling , K., 1994. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. Plant Cell Tissue Organ Culture, 37: 31–38.
– Hayat, S., Hasan, S.A., Fariduddin, Q. and Ahmad, A., 2008. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. Journal of Plant Interaction , 3: 297–304.
– Kevers, C., Franck. T., Strasser. R.T., Dommes. J. and Gaspar. T., 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell Tissue Organ Culture, 77:181-191.
– Kobayashi, H., Ngernprasirtsiri, J. and Akazawa, T., 1990. Transcriptional regulation and DNA methylation in plastids during transitional conversion of chloroplasts to chromoplasts. EMBO Journal, 9: 307–313
– Koen, J., Verhoeven, F., Jansen, J., van Dijk, P. and Biere, A., 2009 Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. New Phytologist, 185: 1108–1118.
– Lee, S. and Park, C.M., 2010. Modulation of reactive oxygen species by salicylic acid in *Arabidopsis* seed germination under high salinity. Plant Signal Behavior, 5(12): 1534–1536.
– Leone, G., Voso, M.T. and Lubbert, M., 2002. DNA Methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondaryleukemias. Haematologica, 87: 1324-1341.
– Lopez-Delgado, H., Jimenez-Casas, M. and Scott, I.M., 1998. Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetylsalicylic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 54: 145–152.
– Mazin, A.L., Boiko, L.M., Ogarkova, O.A. and Vaniushin, B.F., 1988. Loss of CpG dinucleotides from DNA. VI. Methylation of mitochondrial and chloroplast genes. Molekuliarnaia Biologiia (Mosk), 22: 1688-96.
– Mishra, S,. Tyagi, A., Singh, I.V and Sangwan,R.S., 2006. Changes in lipid profile during growth and senescence of *Catharanthus roseus* leaf. Brazil Journal Plant Physiology, 18: 447-454.
– Misra ,N and Saxena, P., 2009. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress .Plant Science, 177: 181–189.
– Montoliu, A., Climent, L., Clemente, A.V. and Cadenas, G., 2009. A novel *in vitro* tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. Plant Growth Regulation, 59:179–187
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 3: 473-179.
– Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T., 1988. DNA methylation as a mechanism of transcriptional regulation in nonphotosynthetic plastids in plant cells. Proc. National Academic Science. USA .Cell Biology, 85: 4750-4754.

– Ochatt, S., Durieu, P., Jacas, L. and Pontecaille, C., 2001. Protoplast, cell and tissue culturesfor the biotechnological breeding of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) Lathyrus Lathyrism Newsletter, 2:35-38.

– Ohtake,Y., Takahashi, T. and Komeda, Y., 2000. Salicylic Acid Induces the Expression of a Number of Receptor-Like Kinase Genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology, 41: 1038–1044.

– Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C. and Job, D., 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. Plant Physiology, 141: 910-923.

– Raskin, I., 1992. Role of salicylic acid in plants. Annu. Rev. Plant Physiology Molecular Biology, 43: 439-463.

– Ruley, A. T., Sharma, N.C. and Sahi, S.V., 2004. Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*. Plant Physiology and Biochemistry, 42: 899–906.

– Sakhabutdinova, A. R., Fatkhutdinova, D.R., Bezrukova, M.V and Shakirova, F.M., 2003. Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. Bulgarian Journal of Plant Physiology, special issue: 314–319.

– Scotti, N., Cardi, T. and Marechaldrouard, L., 2001. Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 67 –67.

– Senaranta, T., Touchell, D., Bumm, E. and Dixon, K., 2002. Acetylaslicylic (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. Plant Growth Regulation, 30: 157-161.

– Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. S., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. and Fatkhutdinova, D. R., 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Science, 164: 317-322.

– Shen, L., Guo, Y.I., Chen, X., Ahmed, S., Issa, J.J. and Anderson, M.D., 2007. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfate PCR methylation analysis. Biotechniques, 42: 48-58.

– Shirasu, K., Nakajima, A., Rajshekar, K., Dixon, R.A. and Lamb, C., 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signal in the activation of defence mechanism. Plant Cell, 9: 261–270.

– Stokes, T.L., Barbara, N.K. and Richards, E.J., 2002. Epigenetic variation in *Arabidopsis* disease resistance. Genes and Development, 16:171–182

– Straus, M.R., Rietz, S., Ver Loren van Themaat E., Bartsch, M. and Parker, J.E., 2010. Salicylic acid antagonism of EDS1-driven cell death is important for immune and oxidative stress responses in *Arabidopsis*. Plant Journal , 62: 628-40.

– Teixeira, F.K. and Colot,V., 2009. Gene body DNA methylation in plants: a means to an end or an end to a means? The EMBO Journal, 28: 997–998.

– Triboush, S.O., Danilenko, N.G. and Davydenko, O.G., 1998. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. Plant Molecular Biology Reporter, 16:183–189.

– Umebese, C. E., Olatimilehin, T. O. and Ogunsusi, T. A., 2009. Salicylic acid protects nitrate reductase activity, growth and proline in amaranth and tomato plants during water deficit. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 4: 224-229.

– Umen, J. G. and Goodenough, U. W., 2001. Chloroplast DNA methylation and inheritance in Chlamydomonas. Genes and Development, 15:2585-2597.

– Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Science, 151:59-66.

– Verma, S. and Mishra, S., 2005. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. Journal of Plant Physiology, 162: 669-677.

– Weising, K., Nybom, H., Wolf, K. and Kahl, G., 2005. DNA Finger Printing in Plants, Principles, Methods and Applications, Second ed. Boca Raton: CRC Press., 472 p.

– Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel , F. M., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. Nature, 414: 562-565.

– Winarto, B., Aziz, M. A., Rashid, A. A. and Ismail, M. R., 2004. Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity in *in vitro* culture of carnation. Indonesian Journal of Agricultural Science, 5:11-19

– Xiao, W., Custard, K. A., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Harada, J. J., Goldberg, R. B. and Fischera, R. L., 2006. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. The Plant Cell, 18: 805–814.

– Xie, Z. and Zhang, Z. L., 2007. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. Plant Molecular Biology 64: 293-303.

– Zarafshan, M,. 2010. Hyper hydricity syndrome: Effect of Salicylic Acid on DNA methylation in *Thymus daenensis* Celak. Thesis. Shahid Beheshti University, Tehran 131 p.

– Zilberman, D. and Henikoff, S., 2007. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. Development, 134: 3959-396.

Effect of salicylic acid on DNA methylation in *Thymus daenensis* Celak. under hyperhydricity syndrome

M. Zarooshan[1], F. Bernard[2*] and Z. Heydariyan[3]

1- M.Sc., Plant physiology student , Shahid Beheshti University G.C., Faculty of Biological Sciences, Department of Plant Biology, Tehran, I.R.Iran.
2*- Corresponding author, Assoc. Prof., Shahid Beheshti University G.C., Faculty of Biological Sciences, Department of Plant Biology, Tehran, I.R.Iran., Email: F_Bernard@sbu.ac.ir
3-Assist., Prof., Shiraz University, Institute of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shiraz, I.R.Iran

Received: 10.09.2011 Accepted: 25.02.2012

Abstract

Thymus daenensis Celak. is an endemic plant in Iran and *In vitro* culture is useful for its propagation. Hyperhydricity syndrome is a common problem in *In vitro* culture causing abnormalities in growth and development of *in vitro* plants. In this investigation we studied the effect of benzyladenine and salicylic acid on DNA methylation of hyperhydric shoots. For this purpose, seeds were cultured into glass jar having benzyladenine and salicylic acid. Active oxygen and antioxidant enzymes analyses were done. Proline and H_2O_2 levels were high in BA treated-plantlets and also in plantlets growing without hormone but SA that reversed hyperhydric shoots to normal status, reduced the content of prolin, H_2O_2 and antioxidant enzymes. No statistical differences were observed in organelles DNA methylation, but 5 µM SA decreased the nuclear DNA methylation. Defense activator SA may have triggered genes engaged in stress response with an increase of proteins. Probably the decrease of methylation under SA treatment may be related with the reversion of hyperhydricity.

Key words: DNA methylation, Hyperhydricity syndrome, Micropropagation, Salicylic acid, *Thymus daenensis* Celak.