

بررسی بیان برخی ژنهای دخیل در مسیر بیوسنتزی ترپنویدها و فیل‌پروپانویدها در بافتها، مراحل نموی و تحت تیمار متیل‌جاسمونات در بومادران (*Achillea millefolium* subsp.)



(millefolium)

احسان فتحی^۱، محمد مجدی^{۱*}، اسعد معروفی^۱ و دارا داستان^۲

^۱ ایران، سنج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

^۲ ایران، همدان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی دارویی

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۹

چکیده

بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* subsp. *millefolium*) گیاهی خودگشن از خانواده گل‌ستاره‌ایها است که انواع متعددی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی از جمله ترپنویدها و فیل‌پروپانویدها را تولید می‌کند. در این مطالعه الگوی بیان ژنهای مهم دخیل در بیوسنتز ترپنها و فیل‌پروپانویدها بررسی شد تا درک صحیحی از مکانیسم بیوسنتز آنها به دست بیاید. ژنهای کدکننده ۱-دی‌اکسی دی‌زیلوز-۵-فسفات ردوکتوایزومراز (*DXR*) و ژرانیل دای فسفات سنتاز (*GPPS*) از ژنهای مهم در بیوسنتز مونوترپنها در مسیر ۲-C-متیل‌اریتریتول-۴-فسفات (*MEP*) و ژنهای فیل‌آلانین آمونیا لیاز (*PAL*) و چالکون سنتاز (*CHS*) از ژنهای مهم در بیوسنتز فیل‌پروپانویدها می‌باشند. در این تحقیق میزان بیان این ژنها در مراحل مختلف نموی و تحت تیمار متیل‌جاسمونات در بافت‌های برگ و گل بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان دهنده بیان بیشتر این ژنها در بافت گل و در گیاهان تیمار شده با متیل‌جاسمونات می‌باشد. همچنین میزان بیان این ژنها با شدتهای متفاوت تحت تأثیر مرحله نموی برگ قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، ایستور، متابولیت‌های ثانویه، گیاه دارویی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۷۳۳۶۶۴۶۰۰، پست الکترونیکی: m.majdi@uok.ac.ir

مقدمه

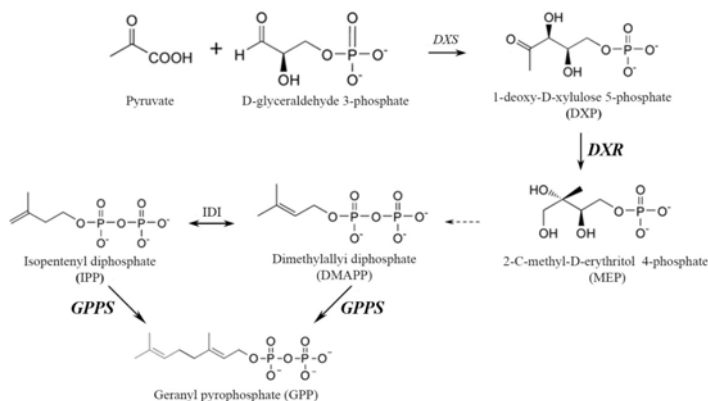
در ایران دارای ۱۹ گونه می‌باشد، که ۷ گونه آن بومی ایران می‌باشد (۱۰ و ۱). این گیاه در ایران دارای دو زیرگونه شامل بومادران البرزی (*Achillea millefolium* sub sp.) و بومادران هزار برگ (*Achillea elbursensis*) و بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* sub sp. *millefolium*) می‌باشد که از لحاظ خصوصیات ظاهری بسیار شبیه به هم هستند. بومادران هزار برگ گیاهی پایا، ایستا به ارتفاع ۵۰-۳۰ سانتیمتر، دارای ساقه‌هایی ساده و در بخش فوقانی منشعب و برگهایی پوشیده از کرکهای روی هم خوابیده با پیرامون پهن و دراز، گلدار و با گل‌های سفید است (۱۶ و ۳۱).

امروزه استفاده از گیاهان دارویی بسیار رایج می‌باشد. گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که توسط انسان به عنوان ترکیب دارویی مصرف می‌شوند (۲۸). گیاهان دارویی خانواده گل‌ستاره‌ایها (*Asteraceae*) به دلیل انعطاف‌پذیری اکولوژیک زیاد در اقلیم‌های متنوع، ذخایر ژنتیکی مهمی محسوب می‌گردند بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* sub sp. *millefolium*) گیاهی دیپلوئید ($2n=2x=18$) و خودگشن از خانواده گل‌ستاره‌ایها به فراوانی در مناطق اروپا، آسیا و شمال آمریکا رشد می‌کند و

تحت شرایط متنوع اکولوژیکی و اقلیمی (۲۹)، در مراحل مختلف رشدی (۵) و در اندام‌های مختلف (۱۹) متفاوت می‌باشد. گروهی از متابولیت‌های ثانویه ترپنی از مسیر ۲-سی متیل اریتریتول ۴-فسفات (MEP) سنتز می‌شوند (شکل ۱). در طی این مسیر که در پلاستید رخ می‌دهد ابتدا پیرووات (Pyruvate) و دی گلیسرآلدئید ۳-فسفات (G3P) با یکدیگر ترکیب شده و پس از انجام واکنش‌های بیوشیمیایی لازم دی اکسی زایللو ۵-فسفات (DXP) به وجود می‌آید که این ماده نیز تحت تأثیر آنزیم ۱-دی‌اکسی دی‌زایلوز-۵-فسفات ردوکتوایزومراز (DXR) باعث تبدیل دی اکسی زایللو ۵-فسفات (DXP) به ۲-سی متیل اریتریتول ۴-فسفات (MEP) می‌شود (۳۲). ژن *DXR* به عنوان یک نقطه کنترلی مهم عمل می‌کند، زیرا این اولین مرحله اصلی و متمایزکننده مسیر MEP می‌باشد. پس از انجام واکنش‌های دیگر ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) و دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) به وجود می‌آیند که این دو ماده قابلیت تبدیل به یکدیگر را دارند. در ادامه با ترکیب شدن این دو ماده و تحت تأثیر ژرانیل دی فسفات سنتاز (GPPS)، ژرانیل دی فسفات (GPP) که پیش‌ماده مونوترپنهاست به وجود می‌آید. ژرانیل دی فسفات نیز تحت تأثیر آنزیم‌های مونوترپن سنتازی مختلف به مونوترپن‌های مختلف تبدیل می‌شود (۶).

بخش‌های مورد استفاده این گیاه، سرشاخه‌های گلدار آن است که طعم تلخ و بوی قوی دارد و به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی گوناگون، از جمله گیاهان دارویی است که در طب سنتی و طب مدرن استفاده‌های گوناگونی برای آن ذکر شده است (۱۱ و ۱۸). از جمله موارد استفاده کلینیکی این گیاه می‌توان به مواردی مانند توقف رشد و تخریب سلول‌های سرطانی (۱۸)، اثر ضد درد و ضد التهابی (۱۲ و ۱۴) و اثر ضد دیابت (۲۰) اشاره نمود. همچنین نتایج بررسی‌ها نشان داده که ترکیبات ترپنی موجود در این گیاه دارای خاصیت ضد توموری و ضد سرطانی است (۱۶) و از اسانس این گیاه در صنایع بهداشتی، آرایشی و عطرسازی استفاده می‌شود (۴۰). از مهم‌ترین ترکیبات فلاونویدی موجود در این گیاه می‌توان به کوئرستین (Quercetin)، اپیژنین (Apigenin)، لوتئولین (Luteolin) و وینسین (Vincin) اشاره کرد (۳۶) که در انسان دارای اثر-های آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و محافظت‌کننده از قلب می‌باشد کوئرستین باعث کند شدن رشد برخی از سلول‌های سرطانی شده و از سرطان روده جلوگیری می‌کند (۲۲) و (۲۴).

متابولیت‌های ثانویه بومادران بیشتر در کرکها، برگ، ساقه و به ویژه گل‌های گیاه تولید می‌شود، سرشاخه‌های گلدار این گیاه سرشار از ترکیبات فلاونویدی و ترپنی می‌باشد (۲۹). کمیت و کیفیت ترپنها و فلاونویدهای موجود در بومادران

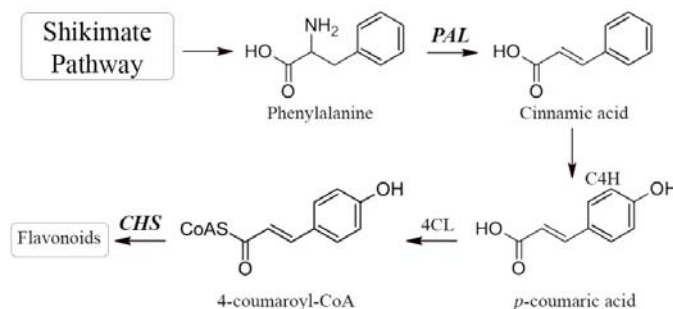


شکل ۱- مسیر بیوسنتزی ترپن‌یویدها در گیاهان (۴۱).

DXS; Deoxyxylulose-5-phosphate synthase, DXR; 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, GPPS; Geranyl diphosphate synthase.

متابولیسم اولیه و ثانویه گیاه و اولین آنزیم کلیدی و تعیین کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل پروپانویدها است (۴) و (۱۷). آنزیم چالکون سنتاز (Chalcon synthase) نیز به عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوشیمیایی ترکیبات فلاونویدی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (۹) که تولید فلاونوئیدها را هدایت می‌کند و در بحث مهندسی ژنتیک و زیست تبدیلی ترکیبات فنیل پروپانوییدی مهم می‌باشد (۲ و ۳۰). آنزیم چالکون سنتاز در اکثر گیاهان، مانند بسیاری از دیگر آنزیمهای دخیل در مسیر متابولیسمهای ثانویه توسط خانواده‌های کوچک ژنی رمزگشایی می‌شود (۲۱). هدف از این مطالعه بررسی الگوی بیان برخی ژنهای دخیل در بیوسنتز ترپنها و فنیل پروپانویدها در بافتهای مختلف واجد مقادیر متفاوت از ترپنها و فنیل پروپانویدها می‌باشد. همچنین بیان این ژنها در پاسخ به الیستور متیل جاسمونات به عنوان یکی از الیستورهای القا کننده واکنش دفاعی در گیاه بومادران بررسی شد.

گروهی دیگر از متابولیت‌های ثانویه فنیل پروپانویدها می‌باشند که مولکولهای کوچک فنلی هستند که دارای یک حلقه فنیلی و یک زنجیره سه کربنی هستند. این ترکیبات از مسیر بزرگ فنیل پروپانوییدی سنتز می‌شوند (شکل ۱) و مسئول فراهم کردن پیش ماده‌های لازم برای سنتز لیگنین، لیگنانها، فلاونوئیدها و برخی ترکیبات دیگر می‌باشند (۳۷). بسیاری از آنها در دفاع علیه گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زا نقش دارند و یا در حفاظت مکانیکی، در جذب عوامل گرده افشان و پراکنده کردن میوه یا در کاهش رشد گیاهان رقیب دخالت دارند (۳۹). مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانویدها مسئول فراهم کردن پیش ماده‌های لازم برای فلاونوئیدها و برخی ترکیبات دیگر است (شکل ۲). مسیر اصلی بیوسنتز فنیل پروپانویدها از مسیر شیکیمیک اسید (Shikimic acid pathway) و مالونیک اسید (Malonic acid) شروع می‌شود (۳۴). فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) (Phenylalanine ammonia lyase) آنزیم حدواسط بین



شکل ۲- مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانویدها در گیاهان (۱۳).

PAL; Phenylalanine ammonia lyase, C4H; Cinnamate 4-hydroxylase, 4CL; 4-Comarat coa ligase, CHS; Chalcon synthase.

کامل استفاده شد و ۲۴ ساعت بعد از محلول پاشی نمونه گیری انجام شد و برای تیمار برگها در مرحله نموی برگ کاملاً توسعه یافته محلول پاشی انجام شد. محلول پاشی فقط یک بار و تا خیس شدن کامل سطح گل یا برگ انجام شد. همچنین از برگها در مراحل مختلف نموی شامل برگ کوچک و توسعه نیافته، برگ جوان و برگ کاملاً توسعه یافته نمونه برداری انجام شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی، شرایط رشد و تیمار نمونه‌ها: ریزومهای گیاه دارویی بومادران هزاربرگ (*Achillea millefolium* subsp. *millefolium*). تهیه شده از باغ گیاهان دارویی همدان در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان در گلدانهای حاوی پرلیت پیت و خاک برگ رشد داده شدند. جهت تیمار نمونه‌ها، محلول پاشی با متیل جاسمونات ۱ میلی مولار (حل شده در آب مقطر) در مرحله گلدهی

دیس (DEPC) حل شدند. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ تعیین شد به طوری که میانگین غلظت RNA استخراج شده ۷۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ برای تمامی نمونه‌ها بین ۱/۶ تا ۱/۹ بود. برای ساخت cDNA از کیت RT-PCR شرکت ویوانتیس مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد (Vivantis, Malaysia). به منظور بررسی صحت سنتز شدن cDNA، تمامی نمونه‌ها با آغازگر ژن مرجع با استفاده از واکنش زنجیره پلی‌مرز تکثیر شدند.

طراحی آغازگر و واکنش زنجیره پلی‌مرز با رونوشت معکوس: طراحی آغازگرها به وسیله نرم افزار آنلاین (v. 0.4.0) Primer3 و با استفاده از توالیهای موجود برای ژنهای مورد نظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI انجام شد (جدول ۱). به منظور تکثیر ژنهای مورد نظر، واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن مورد نظر در دستگاه ترمال سیکلر (Biorad Thermal cycler BioRad; USA) انجام شد. لیست آغازگرهای استفاده شده برای واکنش زنجیره پلی‌مرز در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد در جدول (۱) ارایه شده است.

جدول ۱- مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده

ژن	شماره دسترسی	آغازگر مستقیم	آغازگر معکوس
<i>GAPDH</i>	KF286432	AAGGTTATCAACGACAGGTTTG	ATACCCTTAAGCTTGCCTTCTG
<i>DXR</i>	KU664603	TTGGTTGCTGAGCTAAAAGAAG	CTTGTTGAAAAGTGTGGCAGAG
<i>GPPS</i>	KU664604	GCTCGCCTTGATCTTTGAAC	GGGATCGGCTCTCTTAACC
<i>PAL</i>	KU664606	GCAAGGAAAGCCCGAGTTTAC	GGACCTTTTTTGCTACTTGGC
<i>CHS</i>	KU664607	CCCATTACTATTTTCGGATCAC	CGAGTGAATCAAGGTGAGTGTC

آنالیزهای آماری: به منظور مقایسه بیان ژنها در مراحل مختلف نمو برگ و همچنین در بافتهای مختلف تجزیه واریانس براساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگینها با آزمون دانکن به وسیله نرم افزار SPSS ver. 19 صورت پذیرفت.

نتایج

سنتز cDNA و انجام PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده منجر به تکثیر قسمتی از ژنهای

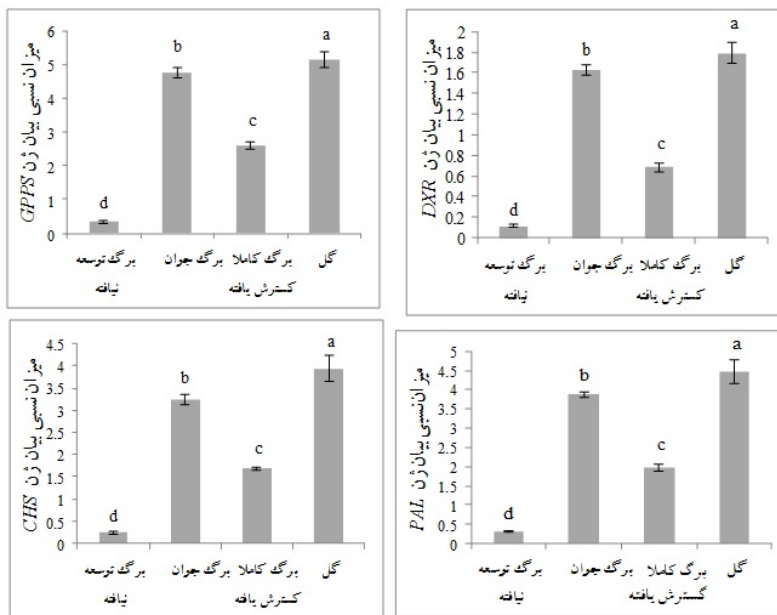
استخراج RNA: استخراج RNA به کمک روش Mazzara (۲۷) با اندکی تغییر انجام شد. ۰/۱ گرم بافت گیاهی گل یا برگ داخل هاون به کمک ازت مایع پودر گردید سپس به میکروتیوب ۲ میلی لیتری انتقال داده شد. ۱ میلی لیتر بافر استخراج (50 mM Tris-HCl (Ph 8), 5 mM EDTA, 150 mM LiCl, 5% SDS) به میکروتیوب اضافه شده و ۳۰ ثانیه ورتکس شد. ۱ میلی لیتر محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) به میکروتیوب اضافه شده و ۲ دقیقه ورتکس شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۶۰۰۰g سانتریفیوژ شد. فاز بالایی برداشته شد و به میکروتیوب جدید منتقل شد سپس مرحله قبل دوباره تکرار شد. مجدداً فاز بالایی برداشته شده و به میکروتیوب جدید منتقل شده و هم حجم آن محلول کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه شده و ۲ دقیقه ورتکس شد سپس با شرایط بالا سانتریفیوژ شد. فاز بالایی برداشته شده و به میکروتیوب حاوی ۵۰ میلی لیتر لیتیم کلرید (۸ مولار) منتقل شد و ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌ها از دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برداشته شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰g سانتریفیوژ شدند. در نهایت نمونه‌ها با الکل ۷۵ درصد شستشو داده شده و در آب

محاسبه میزان نسبی بیان ژن: جهت کمی سازی عکسهای ژل، از نرم افزار GelQuantNET استفاده شد. برای نرمال سازی از ژن کنترل داخلی (*GAPDH* (3-Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) استفاده شد. میزان نسبی بیان ژنها با توجه به نسبت بیان ژن هدف به بیان ژن مرجع با استفاده از ۳ تکرار زیستی و ۲ تکرار تکنیکی محاسبه شد.

غده‌ای بیان می‌شوند، بیشتر است (داده‌های منتشر نشده). طی مراحل مختلف نمو برگ، برگ جوان دارای تراکم بالاتری از کرک‌های غده‌ای نسبت به برگ توسعه نیافته و برگ کاملاً گسترش یافته در سطح خود بوده بنابراین به علت بیان بالا تر این ژنها در کرک‌های غده‌ای، بیان بیشتری را در این مرحله از خود نشان دادند (۲۶). در بافت گل نیز نتایج مقایسه میانگینها با استفاده از روش دانکن نشان داد که بیشترین میزان بیان ژنهای *DXR*، *GPPS*، *PAL* و *CHS* در گل و بعد از آن در مرحله رشدی برگ جوان می‌باشد ($P < 0.05$). بیان بیشتر این ژنها در گل نسبت به برگ می‌تواند ناشی از تراکم بیشتر کرک‌های غده‌ای در واحد سطح باشد، زیرا تراکم کرک‌های غده‌ای در گل نسبت به برگ بیشتر می‌باشد.

DXR (KU664603.1)، *GPPS* (KU664604.1)، *PAL* (KU664606.1) و *CHS* (KU664607.1) با طولهای به ترتیب (۴۷۴bp، ۶۵۳bp، ۷۶۱bp و ۵۲۰bp) شد. این توالیها بعد از شناسایی جداسازی شده و در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید.

بیان ژنها در مراحل مختلف نمو برگ و گل: نتایج تجزیه واریانس به منظور بررسی بیان ژنهای *DXR*، *GPPS*، *PAL* و *CHS* در مراحل مختلف نمو شامل برگ توسعه نیافته، برگ جوان، برگ کاملاً گسترش یافته نشان داد که میزان بیان ژنها در مراحل مختلف نمو و بافتهای مختلف متفاوت است ($P < 0.05$). میزان بیان این ژنها با توجه به شکل ۳ در برگ جوان بیشتر از برگ کاملاً گسترش یافته و برگ توسعه نیافته می‌باشد احتمالاً در برگ جوان به دلیل تراکم بالای کرک‌های غده‌ای بیان ژنهایی که در کرک‌های

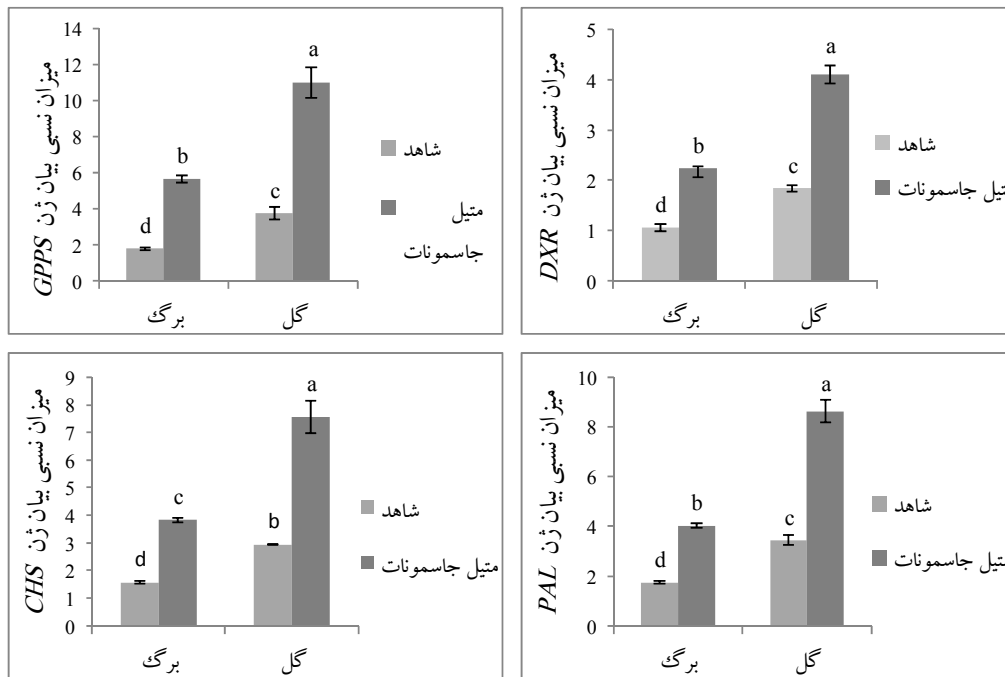


شکل ۳- میزان بیان ژنهای مسیر ترپنویید و فنیل پروپانویید در مراحل مختلف نمو برگ و گل.

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار به وسیله آزمون دانکن است ($P < 0.05$) ±S.E

($P < 0.05$). به طوری که میزان افزایش بیان ژنهای *DXR*، *GPPS*، *PAL* و *CHS* به ترتیب در برگ حدود ۲/۱۲، ۳/۱۹، ۲/۳۱ و ۱/۸۷ برابر و در گل حدود ۲/۲۳، ۲/۹۴، ۲/۵ و ۱/۹۷ برابر بود (شکل ۴).

میزان بیان ژنها تحت تیمار متیل جاسمونات در برگ و گل: نتایج تجزیه واریانس به منظور بررسی بیان ژنهای *DXR*، *GPPS*، *PAL* و *CHS* تحت تیمار متیل جاسمونات در برگ و گل مطابق شکل ۴ نشان می‌دهد که این ژنها تحت تیمار متیل جاسمونات افزایش بیان معنی داری داشتند



شکل ۴- میزان بیان ژنهای مسیر ترپنوییدها و فیلپروپانوییدها تحت تیمار متیل جاسمونات در بافت برگ کاملاً توسعه یافته و گل. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار به وسیله آزمون دانکن است ($P < 0.05$) \pm S.E.

بحث

تراکم بیشتر کرکهای غدهای در واحد سطح باشد. زیرا تراکم کرکهای غدهای در گل نسبت به برگ بیشتر می باشد، همچنین در مراحل مختلف نموی، برگ جوان دارای تراکم بالاتری از کرکهای غدهای نسبت به برگ توسعه نیافته و برگ کاملاً گسترش یافته در سطح خود بوده (شکل ۳) بنابراین به علت بیان بالاتر این ژنها در کرکهای غدهای، بیان بیشتری را در این مرحله از خود نشان دادند (۲۵ و ۴۳). مطالعات نشان داده که میزان ترپنها با تراکم کرکهای غدهای یک رابطه مستقیم دارد و بافتهایی با تعداد کرکهای غدهای بیشتر، مشتقات بیشتری از ترپنها موجود می باشند (۸ و ۲۶). مطالعات انجام شده روی گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*) از خانواده گل ستاره ایها نشان می دهد که بیان ژن *TpGAS* از ژنهای دخیل در بیوسنتز پارتنولید، بیان بیشتری را در برگهای جوان با تراکم بالاتر کرکهای غدهای نسبت به برگ کاملاً گسترش یافته که تراکم کمتری از کرکهای غده ای را دارند نشان می دهد و احتمالاً یک رابطه مثبت بین بیان ژن *TpGAS* با تراکم کرکهای غدهای وجود دارد (۲۵). در مطالعه ای که در گیاه

نتایج حاصل از بررسی بیان ژنها در مراحل مختلف رشدی نشان می دهد که بیشترین میزان بیان ژنهای ۱-دی اکسی دی زایلوز-۵-فسفات ردوکتوازیومراز (*DXR*)، ژرانیل دی فسفات سنتاز (*GPPS*)، فیل آلانین آمونیا لیاز (*PAL*) و چالکون سنتاز (*CHS*) در بافت گل و بعد از آن در برگهای جوان وجود دارد (شکل ۳). همچنین مطابق شکل ۳ نتایج بررسیها نشان داد که الگوی بیان ژن *GPPS* بیشتر از سه ژن دیگر است. بیان ژن *GPPS* در هر چهار بافت گیاهی (گل، برگ کاملاً گسترش یافته، برگ جوان و برگ توسعه نیافته) نسبت به ژن *DXR* در مسیر MEP و نسبت به ژنهای *PAL* و *CHS* در مسیر بیوسنتزی فیلپروپانوییدی بیشتر است همچنین بیان ژن *PAL* در مسیر فیلپروپانوییدی نسبت به *CHS* بیشتر است. احتمالاً در بافت گل به دلیل تراکم بالای کرکهای غدهای بیان ژنهایی که در کرکهای غدهای بیان می شوند، بیشتر است. بیان بیشتر این ژنها در گل نسبت به برگ می تواند ناشی از

در تطابق با نتایج به دست آمده در این تحقیق، مطالعات نشان داده‌اند هورمون متیل جاسمونات باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌گردد. در مطالعات انجام شده روی گیاه بارهنگ چینی (*Salvia miltiorrhiza*) روی متابولیت تانیشون که آنزیم‌های مسیر MEP در بیوستتوز آن نقش دارند با استفاده از تیمار متیل جاسمونات افزایش ۱۴ برابری برای ژن *DXR* گزارش شده است که در این مطالعه نیز افزایش بیان این ژن تحت تأثیر متیل جاسمونات مشاهده شده است (۴۲). در مطالعه‌ای که با استفاده از تیمار متیل جاسمونات بر گیاه جینسنگ هندی (*Withania somnifera*) انجام شد میزان بیان ژن *DXR* در بافت برگ پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات افزایش یافت (۱۵). در پژوهشی که روی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) انجام شده استفاده از تیمار متیل جاسمونات باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه با تأثیر بر ژن‌های ابتدای مسیر MEP از طریق فرآیند‌های سیگنالی شده و باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه این مسیر می‌گردد (۳۳). همچنین در تحقیقات انجام شده روی گیاه صنوبر نروژی (*Piceaabies*) نشان داده شده که استفاده از تیمار متیل جاسمونات باعث افزایش مونوترپن‌یوئیدها برای مقابله با آفات و حشرات می‌گردد (۲۸). بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که ژن *DXR* در مسیر بیوستتوزی ترپنها در بومادران نقش کلیدی را ایفاء می‌کند و به الیستور متیل جاسمونات پاسخ می‌دهد که می‌تواند ناشی از نقش دفاعی برخی ترکیبات تولید شده در این مسیر باشد.

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که میزان بیان ژن *GPPS* نیز تحت تأثیر متیل جاسمونات قرار می‌گیرد. مطابق با این نتایج، تحقیقات نشان داده است که بیان نسبی ژن *GPPS* در سطح رونوشت در پاسخ به تیمار متیل جاسمونات در گیاه یونجه ۵ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش می‌یابد (۴۱). در تحقیقی که روی گیاه ریحان شیرین (*Ocimum basilicum*) انجام شد از متیل

گل میمون (*Antirrhinum majus*) روی میزان بیان ژن‌های مسیر MEP مرتبط با بیوستتوز ترپنها انجام شده بیشترین میزان بیان این ژنها در گلبرگها و برگهای بالایی مشاهده شده است (۴۳). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که میزان بیان ژن‌های مسیر بیوستتوزی فنیل پروپانوییدها به خصوص فعالیت آنزیم *PAL* در طی مراحل رشد رویشی و با افزایش رشد گیاه، افزایش می‌یابد (۳۸ و ۴۵).

جاسمونیک اسید از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی محسوب می‌شود که نقش مهمی در سازوکار دفاعی گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی به خصوص القای ژن‌های دفاعی در مواجهه با عوامل بیماری‌زا دارد. بررسی بیان این ژنها در اثر تیمار با متیل جاسمونات نشان داد که بیان نسبی ژن‌های *DXR*، *GPPS*، *PAL* و *CHS* در اثر تیمار نسبت به گیاه شاهد به ترتیب در برگ حدود ۲/۱۲، ۳/۱۹، ۲/۳۱ و ۱/۸۷ برابر و در گل حدود ۲/۲۳، ۲/۹۴، ۲/۵ و ۱/۹۷ برابر افزایش یافته است (شکل ۴). میزان بیان برای ژن *GPPS* پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات نسبت به سه ژن دیگر بیشتر بود به طوری که میزان بیان ژن *GPPS* در بافت برگ کاملاً توسعه یافته و گل نسبت به ژن *DXR* در مسیر MEP و نسبت به ژن‌های *PAL* و *CHS* در مسیر فنیل پروپانوییدی بیشتر و در این مسیر نیز بیان ژن *PAL* نسبت به *CHS* بیشتر است. نتایج حاصل از اعمال تیمار متیل جاسمونات نشان می‌دهد که ژن‌های مورد مطالعه در مسیر بیوستتوزی ترپنها و فنیل پروپانوییدها در این تحقیق در اثر تیمار متیل جاسمونات القاء می‌شوند که می‌تواند به دلیل نقش آنها در مسیرانتقال پیام و مسیر دفاعی باشد. با توجه به این نتایج می‌توان تیمار متیل جاسمونات را برای افزایش بیان ژنها و آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوستتوزی ترپنها و فنیل پروپانوییدها و القای تغییر در ترکیبات این مسیرهای بیوستتوزی پیشنهاد کرد زیرا بر اساس مطالعات مختلف میزان تولید ترکیبات ترپنی و فنیل پروپانوییدی با میزان رونوشت ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوستتوزی آنها ارتباط مستقیم دارد (۲۶ و ۴۴).

Glycyrrhiza glabra L.) متیل جاسمونات باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL شده است (۳، ۳۵ و ۴۱). با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، بیان ژنهای دخیل در بیوسنتز ترپنها و فنیل پروپانویدها در گیاه بومادران در بافتهای گل و برگ متفاوت بوده و این می‌تواند دلیلی بر وجود مقادیر متفاوت از ترکیبات ترپنی و فنیل پروپانوییدی در بافتهای مختلف باشد. همچنین تیمار متیل جاسمونات باعث افزایش بیان این ژنها شد که نشان دهنده نقش برخی ترکیبات مرتبط با این دو مسیر بیوسنتزی در واکنشهای دفاعی می‌باشد. همچنین با توجه به این نتایج استفاده از الیستورهای غیر زیستی مانند متیل جاسمونات می‌تواند راهکاری برای افزایش تولید این متابولیتها باشد.

جاسمونات به صورت محلول پاشی روی گیاهان استفاده شد و نتایج نشان داد که کل محتوای فنلی بیوسنتز شده از مسیر فنیل پروپانویدها از جمله ترپنویدها به صورت قابل توجهی بعد از تیمار با متیل جاسمونات در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت. از آنجایی که ساخت سزکویی ترپن لاکتونها از واحدهای کوچک سازنده مونوترپن ساخته می‌شوند پس افزایش مونوترپنها تحت این تیمار می‌تواند باعث افزایش سزکویی ترپن لاکتونها نیز گردد (۲۳). در تحقیقات انجام شده روی گیاه مارچوبه (*Asparagus officinalis*) کاربرد متیل جاسمونات باعث افزایش مقدار ترکیبات فنولی شده است (۷). همچنین در مطالعات انجام شده تحت تیمار متیل جاسمونات در کشت سوسپانسیون ریشه جین سینگ (*Panax ginseng*) و شیرین بیان

منابع

- ۱- ضابط، م، افشاری، ف، ۱۳۹۴. تجزیه و تحلیل کاربوتینی ژنوتیپ های بومادران با استفاده از روش های آماری چند متغیر. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران). ۲۸ (۳): ۳۷۱-۳۸۳.
- ۲- آشنگرف، م، نحوی، ا، ۱۳۹۳. تولید زیستی وانیلین طبیعی از سویسترهای فنیل پروپانوییدی بوسیله زیست تبدیلی با استفاده از سلول های میکروبی. ۲۷ (۳): ۳۳۴-۳۱۶.
- 3- Ali M.B., Hahn E.J. and Paek K.Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 12: 607-621.
- 4- Anterola A.M., Jeon J.H., Davin L.B. (2002). Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21): 18272- 18280.
- 5- Azizi M., Chizzola R., Ghani A. and Oroojalian F. (2010). Composition at different development stages of the essential oil of four *Achillea* species grown in Iran. *Natural Product Communications, an International Journal for Communications and Reviews Covering all Aspects of Natural Products Research*. 5(2): 175-350.
- 6- Banerjee A. and Sharkey T. D. (2014). Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Natural Product Reports*, 31(8), 1043-1055.
- 7- Basilio Heredia J. and Cisneros- Zevallos, L. (2009). The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wounded fresh produce. *Food Chemistry*. 115: 1500- 1508.
- 8- Bosabalidis A.M. and Kokkini, S. (1997). Intraspecific variation of leaf anatomy in *Origanum vulgare* grown wild in Greece. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 123(4):353-362.
- 9- Bourgard F., Gravot A., Milesi S. and Gonteur, E. (2011). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
- 10- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*. (*Asteraceae*). *Journal of Ethnopharmacology*. 87 (2-3):215-220.
- 11- Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G. and Forgo, P. (2009). Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines. *Phytotherapy Research* 2009;23(5):672-6.

- 12- Dalsenter P.R., Cavalcanti A.M., Andrade A.J., Araújo S.L. and Marques M.C. (2004). Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (*Asteraceae*) in Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, 18(6):819-23.
- 13- Flamini R., Mattivi F., Rosso M. D., Arapitsas P., & Bavaresco L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19651-19669.
- 14- Graf J. (2000). Herbal anti-inflammatory agents for skin disease. *Skin Therapy Lett*, 5(4): 3-5.
- 15- Gupta P., Agarwal A.V., Akhtar N., Sangwan R.S., Singh S.P. and Trivedi P.K. (2013). Cloning and characterization of 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway genes for isoprenoid biosynthesis from Indian ginseng, *Withania somnifera*. *Protoplasma*, 250: 285-295.
- 16- Haidara K., Zamir L., Shi Q.W. and Batist G. (2006). The flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. *Cancer Letters*, 242: 180-190.
- 17- Humphreys J.M. and Chapple C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 224-229.
- 18- Innocenti G., Vegeto E., Dall'Acqua S., Ciana P., Giorgetti M. and Agradi E. (2007). *In vitro* estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. *Phytomedicine*, 14(2-3):147-52.
- 19- Jaimand K., Rezaee M.B. and Mozaffarian V. (2006). Chemical constituents of the leaf and flower oils from *Achillea millefolium* subsp. *elbursensis*. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 293-295.
- 20- Jerald E., Joshi S.B. and Jain D.C. (2008). Diabetes and Herbal Medicines. *Iran Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 7(1):97-106.
- 21- Ji Y., Jinxia H., Hongya G., Yang Zh. and Ziheng Y. (2002). Duplication and adaptive evolution of *Chalcone synthase* genes of *dendranthema* (*Asteraceae*). *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1752-1759.
- 22- Katan M.B. and Hollman P.C.H. (1998). Dietary flavonoids and cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 8: 1-4.
- 23- Kim H.J., Chen F., Wang X. and Rajapakse N.C. (2006). Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(6):2327-2332.
- 24- Lale A., Herbert J.M., Augereau J.M., Billon M., Leconte M. and Gleye J. (1996). Ability of different flavonoids to inhibit the procoagulant activity of adherent human monocytes. *Journal Natural Products*, 59(3): 273-276.
- 25- Majdi M., Karimzadeh G. and Malboobi M. (2014). Spatial and developmental expression of key genes of terpene biosynthesis in *Tanacetum parthenium*. *Biologia Plantarum*, 58(2):379-384.
- 26- Majdi M., Liu Q., Karimzadeh G., Malboobi M.A., Beekwilder J., Cankar K., de Vos R., Todorovic S., Simonovic A. and Bouwmeester H. (2011). Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry*, 72: 1739-1750.
- 27- Mazzara M. and James D. J. (2000). The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) tissue. *Molecular Biotechnology*, 15(3), 237-241.
- 28- Martin D., Tholl D., Gershenzon J. and Bohlmann J. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiology*. 129: 1003-1018.
- 29- Mockute D. and Judzentiene A. (2002). Chemical composition of the essential oils of *Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium* (yarrow) growing wild in Vilnius. *Institute of Chemistry. Journal of Chemija (Vilnius)*. 13(2): 97-102.
- 30- Oksman-Caldentey K.M., Inzé D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9): 433-440.
- 31- Rechinger K.H. (1986). *Flora Iranica*, Issue 158. Akademische Druck-U. Verna gsanstalt, Graz Austria.
- 32- Rohmer M. (1999). The discovery of a mevalonate –independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports*, 16: 565-574.
- 33- Ruiz-May E., Galaz-Avalos R.M. and Loyola-Vargas V.M. (2009). Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate. *Molecular Biotechnology* 41(3):278-285.

- 34- Saufi A. (2007). Lignans in *Phaleria macrocarpa* and in *Linum flavum* var. *compactum* L. Doctoral Thesis. Heinrich-Heine-Dusseldorf University, Germany, 300-316.
- 35- Shabani L. and Ehsanpour A.A. (2009). Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in *in vitro* culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. Iranian Journal of Plant Biology, 21(3):421-432.
- 36- Sharma H., Parihar L. and Parihar P. (2011). Review on cancer and anticancerous properties of some medicinal plants. Journal of Medicinal Plan Research, 5(10):1818-1835.
- 37- Sumner L.W., Mendes P. and Dixon R. A. (2003). Plant metabolomics large-scale phytochemistry in the functional genomics era. Phytochemistry, 62(6), 817-836.
- 38- Tahsili J., Sharifi M., Behmanesh B., Pourbozorgi R.N. and Ziaei M. (2010). Gene expression of eugenol O – methyl transferase and components of essential oils in (*Ocimum basilicum* L.) at different stages of growth. Journal of Biology, 23 (1): 25-18.
- 39- Taiz L., and Zeiger E. (2006). Stress physiology. Plant Physiology, 4.
- 40- Upton R., Graff A., Jolliffe G., Länger R. and Williamson E. (2011). American Herbal Pharmacopoeia: botanical pharmacognosy-microscopic characterization of botanical medicines. CRC Press, 800p.
- 41- Yan S., Ruicai L., Qingchuan Y., Tiejun Z. and Junmei K. (2013). Molecular cloning and characterization of three isopentenyl diphosphate synthase genes from alfalfa. Molecular Biology Reports, 28: 572-582
- 42- Yang D., Ma P., Liang X., Wei Z., Liang Z., Liu Y. and Liu F. (2012). PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Physiologia Plantarum, 146(2), 173-183.
- 43- Zhang Y., Teoh K.H. Reed D.W., Maes L., Goossens A., Olson D.J., Ross A.R. and Covello P.S. (2008). The molecular cloning of artemisinic aldehyde $\Delta 11$ (13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. Journal of Biological Chemistry, 283: 21501-21508.
- 44- Zheng X., Xu H., Ma X., Zhan, R., & Chen W. (2014). Triterpenoid saponin biosynthetic pathway profiling and candidate gene mining of the *Ilex asprella* root using RNA-seq. International Journal of Molecular Sciences, 15(4), 5970-5987.
- 45- Ziaei M., Sharifi M., Behmanesh M. and Razavi K. (2012). Gene expression and activity of phenyl alanine ammonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stage. Journal of Biotechnology, 10: 32-39.

Expression pattern analysis of some genes involved in the biosynthetic pathway of terpenoids and phenylpropanoids in tissues, developmental stages and under methyl jasmonate treatment in yarrow (*Achillea millefolium* subsp. *millefolium*)

Fathi I.,¹ Majdi M.,² Maroufi A.² and Dastan D.³

¹ Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran

² Dept. of Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I. R. of Iran

³Dept. of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I. R. of Iran.

Abstract

Medicinal plants of the Asteraceae family are important genetic resources due to their high ecological flexibility in diverse climates. Yarrow (*Achillea millefolium* subsp. *millefolium*) is a self-pollinated plant belongs to the Asteraceae which produce a wide varieties of plant secondary metabolites such as terpenoids and phenylpropanoids. In the present work, gene expression patterns of genes involved in the biosynthetic pathways of terpenes and phenylpropanoids were studied to understand the regulatory mechanism behind them. 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate reductoisomerase (*DXR*) and geranyl diphosphate synthase (*GPPS*) are important genes in the biosynthesis of monoterpenes in the 2-C-methylerythritol-4-phosphate (MEP) pathway. Phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) and chalcone synthase (*CHS*) genes are important in the biosynthesis of phenylpropanoids. In the present study, semi quantitative RT-PCR of these genes was carried out in different developmental stages, also in response to methyl jasmonate treatment in leaves and flowers. Results showed that expression of these genes were higher in flowers and methyl jasmonate treated plants, also the expression of these genes affected by developmental stages of leaves but with different intensity.

Key words: Gene expression, Elicitors, Secondary metabolites, Medicinal plant