ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۳،پاییز ۱۳۹۷
صفحه ۳۴۱ - ۳۳۳

اثر هورمون متیل جاسمونات بر بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز بابا آدم

The Effect of Metyl Jasmonate Hormone on Gene Expression of Phenylalanine Ammonia Lyase in *Arctium lappa* L.

فریناز غلامیان[۱]، مجید طالبی*[۲]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[۲]، بهروز شیران[۱]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- دانشیار، استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

Gholamian F[1], Talebi M*[2], Sayed-Tabatabaei BE[2], Shiran B[1]

1- MSc, Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
2- Associate Professor, Professor, Department of Agriculture Biotechnology, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtalebi@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

گیاه دارویی بابا آدم (*Arctium lappa* L.) منبع غنی از آنتی اکسیدان‌های پلی فنول برای کنترل و درمان آلرژی، ایدز، سرطان و دیابت نوع دو می‌باشد. آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)، آنزیم کلیدی بیوسنتز ترکیبات پلی فنول در مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد. به‌منظور شناسایی ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز، به‌کمک توالی‌های شناخته شده از ژن مزبور در بانک اطلاعاتی NCBI و از روی مناطق حفاظت شده، جفت آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی ژن *PAL* طراحی شد. ردیابی با انجام واکنش PCR بر روی DNA ژنومی انجام گرفت و هم‌ردیف‌سازی توالی خوانش شده قطعه ۶۰۹ جفت‌بازی ژن *PAL* در پایگاه داده NCBI، صحت ردیابی ژن مزبور را تأیید کرد. متیل جاسمونات، ترکیب سیکلوپنتانی از مشتقات اسید لینولنیک می‌باشد که از طریق مسیر اکتادکانوئید ساخته می‌شود. شواهدی وجود دارد که متیل جاسمونات به‌عنوان یک مولکول سیگنال در برخی از مسیرهای انتقال پیام که القاکننده آنزیم‌های خاص کاتالیز کننده واکنش‌های بیوسنتزی برای تشکیل ترکیبات دفاعی هستند، دخالت می‌کنند و منجر به القای واکنش‌های دفاعی می‌شوند. در این تحقیق، بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز تحت تیمار هورمون متیل جاسمونات با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با هورمون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده افزایش میزان بیان ژن پس از ۲۴ ساعت بود، به‌طوری که بیشترین میزان بیان ژن پس از ۲۴ ساعت تحت تیمار متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که متیل جاسمونات به‌عنوان الیسیتور غیر زیستی کارآمد با تاثیر بر بیان ژن *PAL* احتمالا موجب افزایش ترکیبات پلی فنول در گیاه بابا آدم می‌شود.

واژه‌های کلیدی

الیسیتور
بابا آدم
فنیل آلانین آمونیا لیاز
متیل جاسمونات

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.3.4]

مقدمه

بابا آدم با نام علمی *Arctium lappa* گیاه دارویی دو ساله و علفی از خانواده کاسنی[1] است. جنس *Arctium* بین ۱۵ تا ۳۰ گونه علفی و بوته‌ای داشته و به‌طور طبیعی در اروپا و شمال آسیا می‌روید. در ایران گونه *Arctium lappa* در مناطق مرطوب و نیمه خشک مانند البرز، چالوس، رودبار، همدان، اراک و مناطق بختیاری می‌روید. این گیاه که در سراسر جهان یافت می‌شود، به‌عنوان یک گیاه دارویی برای دوره‌های طولانی کشت شده‌است. در چین و برخی کشورهای غربی بیش از ۳۰۰۰ سال است که از این گیاه به‌عنوان دارو در طب سنتی استفاده می‌کنند (Maruta et al. 1995). بافت‌های مختلف گیاه دارویی بابا آدم دربرگیرنده دامنه گسترده‌ای از ترکیبات مانند تانن[2]، آرکتی ژنین[3]، آرکتین[4]، کافئیک اسید[5]، کلروژنیک اسید[6]، اینولین[7]، لاپائول[8]، آلدهیدها و آلکالوئیدها می‌باشد که به روش‌های مختلف استخراج شده‌است (Park et al. 2007). عصاره بخش‌های مختلف بابا آدم برای سلامتی انسان در یک دوره طولانی، موثر می‌باشد. عصاره‌ی این گیاه سیستم ایمنی بدن را تقویت می‌کند و موجب بهبود عملکردهای متابولیکی می‌شود (Lin et al. 2002). در ایران گیاه بابا آدم برای درمان عفونت تنفسی و ذات الریه استفاده می‌شود. همچنین این گیاه دارای خاصیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می‌باشد و به‌دلیل وجود ترکیبات لیگنینی طبیعی دارای فعالیت ضد ویروسی نیز می‌باشد (Kardosova and Machova 2006). گوبو[9] ریشه‌ی خوراکی گیاه بابا آدم است به‌عنوان غذا در آسیا استفاده می‌شود و نسبت به سایر سبزیجات آمینواسید، پلی ساکارید و فیبر بیش‌تری دارد. اگرچه بخش‌های مختلف گیاه بابا آدم از جمله برگ، میوه و بذر آن برای درمان برخی بیماری‌ها استفاده می‌شود اما ریشه‌ی یک ساله بابا آدم به‌عنوان منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها برای مقاصد دارویی و تجاری بیش‌تری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ferracane et al. 2010). در ریشه‌ی این گیاه ترکیبات فعال برای تصفیه خون، درمان بیماری‌های پوستی، بیماری‌های مزمن مانند سرطان و ایدز یافت شده‌است (Chan et al. 2010; Cole et al. 2016). هم‌چنین آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضد دیابت در ریشه این گیاه وجود دارند (Cao et al. 2012). کلروژنیک اسید، کورستین، اینولین، آرکتین، آرکتی ژنین و لوتئولین متابولیت‌های ثانویه اصلی ریشه بابا آدم هستند (Predes et al. 2011). متابولیت‌های ثانویه از طریق مسیر فنیل پروپانوئیدی سنتز می‌شوند که در این مسیر سه واکنش اصلی وجود دارد: ۱) آنزیم PAL[10] برای تولید ترانس سینامیک اسید، آمین‌زدایی فنیل آلانین را کاتالیز می‌کند، ۲) آنزیم C4H[11] با اضافه کردن هیدروکسیل ترانس سینامیک اسید را به p–کوماریک اسید تبدیل می‌کند و ۳) آنزیم 4CL[12] که p–کوماریک اسید را برای ساختن p–کومارویل CoA مصرف می‌کند (Tuan et al. 2011). واکنش‌های کاتالیز شده توسط این سه آنزیم مسیر عمومی فنیل پروپانوئیدها را تشکیل می‌دهند (Yamamura et al. 2001). آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز آنزیم حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه می‌باشد، که برای اولین بار توسط Koul and Conn شرح داده شده‌است (Weitzel and Petersen 2010). به‌دلیل نقش تعیین کننده در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مختلف در گیاهان مانند کومارین‌ها، فلاونوئیدها، لیگنین، تانن‌ها و کافئویل کوئینیک اسیدها این آنزیم به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است (Song and Wang 2009). این آنزیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را در واکنش به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نظیر حملات پاتوژن، تابش UV، زخم زنی مکانیکی و نور القاء می‌کند (Xu et al. 2010).

روش‌های متعدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی و غیر زیستی موجود می‌باشند که از طریق القای سیستم دفاعی منجر به بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao et al. 2005). جاسمونات‌ها و متیل استر آن (متیل جاسمونات)، ترکیب‌های

[1] Asteraceae
[2] Tanin
[3] Arctigenin
[4] Arctin
[5] Caffeic acid
[6] Chlorogenic acid
[7] Inulin
[8] Lappaol
[9] Gobo
[10] Phenylalanine ammonia lyase
[11] 4-Hydroxylase Cinnamate
[12] 4-coumarate-CoA ligase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.3.4]

سیکلوپنتان[1] از مشتقات لینولینیک اسید[2] هستند که از طریق مسیر مسیر اکتادکانوئید[3] سنتز و در گیاهان عالی توزیع وسیعی دارند (Biondi et al. 2001). در دهه ۱۹۶۰، جاسمونات‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در اسانس گل یاس[4] یافت شدند (Martin et al. 2002). دو دهه پس از شناسایی اولیه جاسمونات‌ها، نخستین تاثیرهای فیزیولوژیکی آن‌ها شناسایی شد. این ترکیب‌ها فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی نظیر رسیدن میوه، رشد ریشه، پیری، واکنش‌های دفاعی در برابر پاتوژن‌ها و حمله حشرات، واکنش گیاه به زخم و تنش‌های غیر زیستی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Maciejew ska et al. 2004; Choi et al. 2005). اثرات فیزیولوژیکی جاسمونات‌ها در گیاهان بسته به گونه گیاهی، مرحله نموی، نوع جاسمونات و غلظت به کار رفته متفاوت است (Martin et al. 2002). شواهدی وجود دارد که جاسمونات‌ها به عنوان مولکول‌های سیگنال فعالیت می‌کنند و به‌عنوان یک گروه از انتقال دهنده‌های مهم پیام در دفاع گیاه در برابر زخم، حشره، حمله پاتوژن و غیره نقش دارند (Memelink 2009). این مولکول‌های سیگنال در برخی از مسیرهای انتقال پیام که القاء کننده آنزیم‌های خاص کاتالیز کننده واکنش‌های بیوسنتزی برای تشکیل ترکیب‌های دفاعی مانند پلی‌فنول‌ها، آلکالوئیدها یا پروتئین‌های مربوط به پاتوژن هستند، دخالت می‌کنند و منجر به القای واکنش‌های دفاعی می‌شوند. مشخص شده‌است که وقتی این مولکول‌های سیگنال به صورت خارجی به‌کار برده می‌شوند به صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده و منجر به بیان یک سری از ژن‌های دفاعی می‌شوند (Yao and Tian 2005). جاسمونات‌ها به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القاء که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می شود معرفی شده‌اند. از آن جا که آنزیم PAL تنظیم کننده ابتدای مسیر بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی می‌باشد (Cass et al. 2015)، بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارزیابی میزان بیان ژن *PAL* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون متیل جاسمونات در گیاه بابا آدم می‌باشد.

[1] Cyclopentanone compounds
[2] Linolenic acid
[3] Octadecanoid pathway
[4] Jusmin Sp

مواد و روش‌ها

به‌منظور طراحی آغازگر برای ژن *PAL* دخیل در مسیر سنتز کلروژنیک اسید، ابتدا گیاهانی که ژن مورد نظر در آن‌ها شناسایی شده بود مشخص شد و هشت گیاه که نزدیکی تاکسونومی بیش‌تری در خانواده کاسنی با گیاه بابا آدم داشتند انتخاب شدند. توالی ژن مورد نظر مربوط به این هشت گیاه، از پایگاه داده NCBI استخراج و با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 همردیف‌سازی شدند. نواحی که بالاترین میزان حفاظت شدگی را داشتند برای طراحی آغازگر مد نظر قرار گرفتند. آغازگرهای رفت و برگشت به‌کمک نرم‌افزار Oligo7 طراحی شدند و به‌دلیل عدم حفاظت شدگی کامل، به ناچار در هر آغازگر چند نوکلئوتید هرز قرار داده شد (جدول ۱). آغازگرها جهت سنتز به شرکت Bioneer کره ارسال شد. هم‌زمان با طراحی آغازگر، DNA بافت برگ گیاه بابا آدم به روش موری و تامسون استخراج شد (Murry and Thompson 1980). واکنش PCR با آغازگرهای سنتز شده و با استفاده از دستگاه Biorad-USA انجام گرفت. هر واکنش شامل Mastermix شرکت Amplicon، آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکو مول و DNA با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میکرولیتر انجام شد. محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز و با کیت استخراج از ژل Thermo scientific خالص‌سازی شد. در ادامه واکنش اتصال قطعه در وکتور pTZ57R/T توسط آنزیم T4 DNA Ligase به مدت ٤ ساعت در ۲۲ درجه سانتی گراد انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب به سلول‌های مستعد *E.coli* سویه MC1061 به روش شوک حرارتی منتقل شدند. باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به‌صورت تک کلون رشد کردند. باکتری‌های واجد قطعه مورد نظر، توسط فرآیند Colony PCR از میان کلون‌های رشد یافته شناسایی شدند. رشد مجدد کلونی‌های انتخاب شده روی محیط LB حاوی آمپی سیلین ۱۰۰ میکرومولار نشان داد که باکتری‌های مورد نظر حاوی پلاسمید نوترکیب هستند. کلونی‌های نوترکیب برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

این مطالعه در پاییز سال ۱۳۹٤ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.3.4]

جدول ۱- جفت آغازگرهای طراحی شده برای ردیابی ژن *PAL*

نام آغازگر	توالی	GC (٪)	طول تکثیر (bp)
Forward PAL	5'-ACGCRCCTMGAGSGAYMTCGTTCCACTC-3'	50	609
Reverse PAL	5'-GTTCSTTGGAAGTTGCCDCCGTGT-3'	50	609

جدول ۲- اطلاعات مربوط به آغازگرهای *PAL*، *Rps9* و M13

نام آغازگر	توالی '3- '5	دمای اتصال (oC)	GC (٪)	طول تکثیر (bp)
PAL-F	AGTCTTGTCCGCCATTTTCG	٦٠	٥٠	١٥٢
PAL-R	GAGCTGCCTTAACGTAATCACTTCC	٦٠/٨	٤٨	١٥٢
Rps9-F	GCGTTTGGATGCTGAGTTGAAG	٦٤	٥٠	٢٥٧
Rps9-R	GGCGCTCAAGGAAGTTCTCTAC	٦٢/١	٥٤/٥	٢٥٧
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT	٤٧/٦	٥٢/٩	١٥٦
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	٣٨/٧	٤٧	١٥٦

برای انجام این پژوهش نهال‌های بابا آدم از مرکز تحقیقات باریج اسانس کاشان تهیه و در گلدان‌ها در خاک تقریبا سبک (لومی- رسی) کشت شدند و هر شش روز یک بار آبیاری شدند. پس از کشت، گلدان‌ها به اتاقک رشد منتقل شدند و در شرایط یکسان در دمای روزانه ۲۲ تا ۲۷ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۳۵ تا ٤٠ هزار لوکس تا مرحله‌ی سه برگی رشد کردند.

برای تهیه محلول متیل جاسمونات، متیل جاسمونات از شرکت مرک آلمان خریداری شد. تیمارها شامل متیل جاسمونات با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار و کنترل منفی (آب دیونایزه) در مرحله سه برگی به‌صورت محلول پاشی روی سطح برگ به طوری که برگ‌ها کاملا خیس شوند در طی یک مرحله انجام شد. پس از آن ریشه گیاهان در زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از تیمار به‌منظور مطالعات بعدی برداشت شدند. به این منظور ریشه‌ها با آب DEPC[1] شست و شو داده شدند و جهت استفاده در آزمایش‌های مولکولی با نیتروژن مایع تثبیت و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای استخراج RNA کل[2] از ریشه‌های بابا آدم، از روش دستی مبتنی بر CTAB همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵٪ و آب DEPC استفاده شد. پس از استخراج RNA کل، کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتر بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA synthesis محصول شرکت Thermo Scientific انجام شد. به‌منظور بررسی بیان ژن *PAL*، با توجه به تحقیق Paolacci et al. (2009) از ژن *Rps9*[3] (Ribosomal Protein S9) به‌عنوان ژن کنترل داخلی برای تکثیر cDNA در RT-PCR استفاده شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های *PAL* و *Rps9* با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 انجام شد. ساخت آغازگرها با میانجی‌گری شرکت تکاپو زیست، از شرکت Bioneer کره صورت گرفت (جدول ۲).

تکثیر ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز (*PAL*) و *Rps9*

تکثیر ژن‌های *PAL* و *Rps9* در نمونه‌های تیمار شده با هورمون متیل جاسمونات با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار و کنترل منفی (آب دیونایزه) در زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت برای اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real-time PCR براساس روش استاندارد و به‌صورت نسبی صورت گرفت. کمیت نسبی در Real-time PCR به‌وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنت در نتیجه اتصال رنگ فلورسنت با استفاده از دستگاه (Applied Bio system) انجام گرفت. اجزای واکنش Real-time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر SYBR Green با غلظت 2X، ۰/۲ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت ۱۰ میکرومولار)،

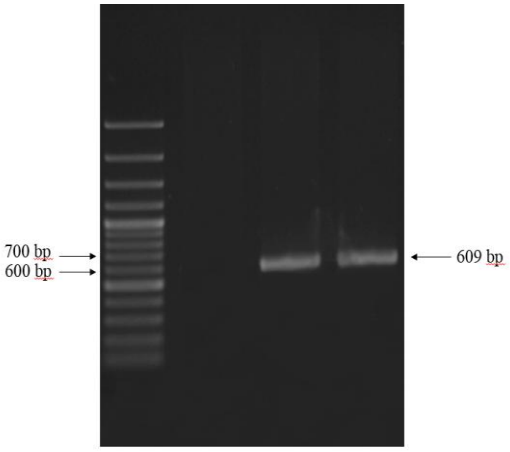
[1] Diethylpyrocarbonate
[2] Total RNA
[3] Ribosomal Protein S9

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.3.4]

۰/۲ میکرولیتر ROX با هم مخلوط شدند. هم‌چنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر
دو ژن شامل فعال‌سازی ابتدایی آنزیم (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه)، ٤٠ چرخه شامل واسرشت شدن (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه)، اتصال آغازگرها (٦٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، بسط ترکیبی (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و منحنی ذوب (افزایش دما از ۵۰ درجه تا ۹۹ درجه هر ۵ ثانیه یک درجه) بود. پس از انجام واکنش تکثیر به‌وسیله Real-time PCR داده‌های خام به‌صورت Ct[1] از دستگاه استخراج شد. از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد (Livak and Schmittgen 2001).

نتایج

تکثیر ژن *PAL* با آغازگرهای طراحی شده روی مولکول *DNA*، وجود توالی ٦٠۹ جفت‌باز مربوط به ژن مورد نظر را در ژنوم گیاه بابا آدم نشان داد (شکل ۱). محصول PCR پس از خالص‌سازی از روی ژل توسط واکنش اتصال، در پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی شدند، سپس پلاسمیدهای نوترکیب به سلول های مستعد باکتری *E. coli* سویه MC1061 به روش شوک حرارتی منتقل شدند. باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به‌صورت تک کلون رشد کردند. به‌منظور شناسایی کلون‌هایی که پلاسمیدهای نوترکیب را دریافت کرده و حاوی قطعات مورد نظر هستند از تکنیک Colony PCR استفاده شد. واکنش Colony PCR با استفاده از جفت آغازگرهای رفت و برگشت M13 (جدول ۲) که جایگاه اتصالشان بر روی پلاسمید و در دو طرف محل اتصال قطعه مورد نظر قرار دارد انجام گرفت. با توجه به این که جایگاه اتصال آغازگر رفت M13 تا محل قرارگیری قطعه ٥٤ جفت باز و فاصله آغازگر برگشت M13 تا محل قرار گیری قطعه 102 جفت‌باز می‌باشد که در مجموع ۱٥٦ جفت‌باز می‌شود، انتظار می‌رفت که طول قطعه تکثیری درحدود ۱۵۰ جفت‌باز افزایش یابد. پس از انجام واکنش و الکتروفورز محصولات آن بر روی ژل آگارز، قطعه‌ای به‌طول تقریبی ۷٦٥ جفت‌باز از کلون‌های واجد پلاسمید نوترکیب به‌دست آمد که با طول قطعه مورد انتظار مطابقت داشت (شکل ۲). پس از پس از توالی‌یابی، توالی مربوط به این ژن با توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI توسط blastn و blastx همردیف‌سازی شد. نتایج همردیف‌سازی نشان داد که ژن *PAL* در بابا آدم با همولوژی ۹۷٪-۹۲٪ در blastn و همولوژی ۹۷٪-۸۹٪ در blastx، با ژن‌های متناظر در ترخون، کوکب کوهی، کاهو، کنگر وحشی، کاسنی و گلرنگ مشابهت دارد. نتایج بررسی میزان بیان ژن *PAL* در ریشه بابا آدم پس از تیمار هورمون متیل جاسمونات در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نشان داد که بیان این ژن به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۳). بیش‌ترین میزان بیان ژن *PAL* ٢٤ ساعت پس از اعمال هورمون مشاهده شد و این افزایش در سطح پنج درصد معنی‌دار بود ($P\leq$۰/۰۵) و ٤٨ ساعت پس از اعمال هورمون میزان بیان ژن کاهش یافت.



شکل۱- تکثیر قطعه ژنی ٦۰۹ جفت‌بازی ژن *PAL*، از سمت چپ چاهک‌ها به‌ترتیب Ladder 100bp نمونه شاهد (آب دیونایزه) و دو نمونه از قطعه تکثیر یافته.

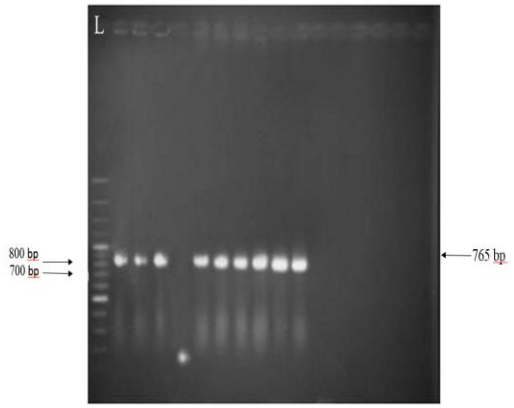
بحث

مسیر فنیل پروپانوئید، یکی از اصلی‌ترین مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان محسوب می‌شود که در نهایت منجر به تولید انواع مختلفی از ترکیبات از قبیل آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، فورانوکومارین‌های ضدمیکروبی، ایزوفلاونوئید، فیتوالکسین‌ها[2]، لیگنین‌ها و استرهای فنولی می‌شود.

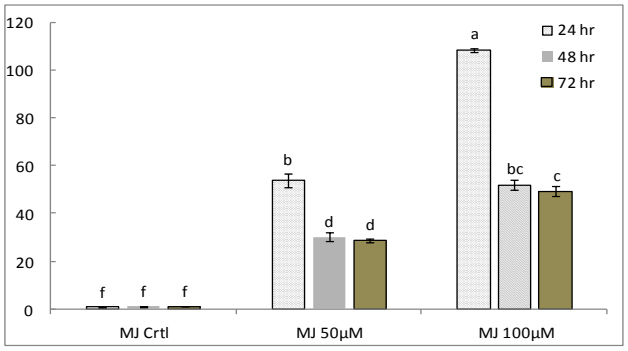
[1] Threshold cycle

[2] phytoalexins

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.3.4]



شکل ۲- نتایج حاصل از Colony PCR ژن *PAL*، چاهک اول Ladder 100bp.



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن *PAL* تحت تیمار متیل جاسمونات در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار هورمون. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح پنج درصد ($P\leq ۰/۰۵$) می‌باشد.

سنتز تولیدات ثانویه توسط یک گروه آنزیمی هدایت می‌شوند که این آنزیم‌ها یا به‌صورت آزاد و یا در ارتباط با غشاهای سلولی می‌باشند. تمام ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و فنولی از سینامیک اسید مشتق می‌شوند که این ترکیب از عمل آمین‌زدایی توسط آنزیم PAL روی ال- فنیل آلانین حاصل می‌شود. آنزیم PAL یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است و اولین آنزیم در مسیر تولید ترکیبات فنولی گیاه و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد که یک آنزیم کلیدی تنظیم کننده در مسیر بیوسنتزی این ترکیبات به شمار می‌رود، زیرا به گونه‌ای مؤثر مسیر کربن را از متابولیسم اولیه، مانند سنتز پروتئین، به تولید ترکیبات ثانویه منحرف می‌کند. عوامل مؤثر در بیان ژن *PAL* شامل سن گیاه، غلظت تنظیم کننده‌های رشد، انواع تنش‌ها مانند علف‌کش‌ها، زخمی شدن بافت‌ها، مدت زمان تابش نور، اشعه UV و دما می‌باشند. متیل جاسمونات‌ها از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی هستند که به‌عنوان الیسیتور نقش مهمی در چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. متیل جاسمونات‌ها از طریق القاء تنش کاذب سیگنال‌هایی را تولید می‌کنند که برهم کنش این مولکول‌ها با گیرنده‌های سطح سلول، ژن‌هایی که در پاسخ دفاعی نقش دارند را القاء می‌کنند. ژن‌هایی که توسط متیل جاسمونات تنظیم می‌شوند عبارتند از: ژن‌های کد کننده پروتئینازهای مهارکننده[1]، پروتئین‌های مهارکننده قارچ‌ها[2]، آنزیم‌های مسیر بیوسنتز فیتو الکسین‌ها، آنزیم‌های تولید کننده پروتئین‌های ذخیره رویشی[3]، ژن زیر واحد بزرگ ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز[4]، اسموتین[5] (پروتئین ضد قارچ)، تیونین[6] (پروتئین ضد قارچ)، چالکون سینتاز[7]، هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم آ ردوکتاز[8]، لیپوکسیژناز[9]، آنزیم سنتز کننده اتیلن[10] و فنیل آلانین آمونیا لیاز. مقادیر متعددی از جاسمونات‌ها منجر به واکنش در برابر عوامل خارجی و تنظیم برخی از ژن‌ها در گیاه می‌شود به گونه‌ای که متیل جاسمونات به‌همراه عوامل دیگر باعث افزایش بیان این ژن‌ها می‌شوند.

در طبیعت گیاهان در مقابله با الیسیتورها متابولیت‌های ثانویه را برای دفاع در مقابل عوامل بیماری‌زا تولید می‌کنند. الیسیتورها ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلف را راه‌اندازی می‌کنند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از علامت رسانی را القاء می‌کند که با تشخیص مولکول‌های الیسیتور توسط گیرنده‌های خاص گیاهی شروع می‌شود. تا به امروز مشخص شده‌است از مهم‌ترین ترکیباتی که باعث القاء تعداد زیادی از ژن‌های وابسته به دفاع می‌شود تنظیم کننده‌های جاسمونات، اتیلن و سالیسیلیک اسید می‌باشد (Zhao et al. 2005).

[1] Proteinase inhibitors (*PinII*)
[2] Fungal inhibiting proteins
[3] Phytoalexins
[4] Vegetative storage proteins (*Vsp*)
[5] Ribulose biosphosphate carboxylase (*rbcl*)
[6] Osmotin
[7] Tionin
[8] Chalcone synthase (*chs*)
[9] Hydroxymethyl glutaryl CoA reductase
[10] Lipoxygenase
[11] Ethylene forming enzyme (*EFE*)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.3.4]

یکی از جنبه‌های افزایش ترکیبات مؤثره گیاهان دارویی را می‌توان کاربرد الیسیتورها دانست. استفاده از الیسیتورها (محرک‌های تولید متابولیت‌های ثانویه) یکی از راهکارهای مهم جهت افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند در گیاهان دارویی می‌باشد و نقش مهمی در چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه ایفاء می‌کنند. برهم‌کنش الیسیتورها با گیرنده‌ی غشای سلولی منجر به ایجاد سیگنال‌هایی می‌شود که این سیگنال‌ها ژن‌های خاصی را القاء می‌کنند و سیستم‌های آنزیمی دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه را تحریک می‌کنند (Omidi and Farzin 2012; Ahmadi Moghadam et al. 2013). به‌همین دلیل می‌توان از الیسیتورها به‌عنوان یک تکنیک ساده و مفید برای افزایش میزان ترکیبات فنولی در گیاهان به عنوان ترکیبات مفید دارویی استفاده نمود (Ruiz and Gomez 2013). از طرف دیگر با توجه به اهمیت آنزیم‌های موجود در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه، افزایش بیان ژن‌های مسئول به خصوص در گیاهان دارویی می‌تواند منجر به بهبود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهان شود و خواص درمانی این گیاهان را بهبود بخشد. مطالعه در زمینه شناخت این ژن‌ها و توالی‌های آن‌ها در گیاهان دارویی و سایر گیاهان می‌تواند سرآغازی برای طی این مسیر باشد.

با توجه به این که در سال‌های اخیر بیشتر تحقیقات پیرامون اثر هورمون متیل جاسمونات بر میزان بیان ژن *PAL* در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام شده‌است، بیان ژن *PAL* تحت تاثیر هورمون متیل جاسمونات در شرایط گلدانی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز نسبت به شاهد با افزایش غلظت هورمون به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P\leq$۰/۰۵). در این تحقیق اثر متیل جاسمونات بر بیان ژن *PAL* در مرحله سه برگی در زمان‌های مختلف برداشت بیانگر این مطلب بود که ژن در زمان‌های مختلف برداشت سیر کاهشی داشت به طوری که بیش‌ترین بیان ژن ۲٤ ساعت پس از اعمال تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات حاصل گشت و در هر دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در زمان‌های ٤۸ و ۷۲ ساعت کاهش یافت. با فعال کردن ژن‌های مسیر فتوسنتز توسط غلظت‌های بالای متیل جاسمونات، احیاء کربن صورت گرفته و کربن در سلول تثبیت و یا به فرم ذخیره در آمده و یا به قسمت‌های دیگر منتقل می‌شود. بنابراین متیل جاسمونات با افزایش ظرفیت فتوسنتزی، میزان قندهای احیاء کننده، سایر هیدرات‌های کربن و اسیدهای آلی را در گیاهان تیمار شده افزایش می‌دهد (Raman and Ravi 2011). در شرایط تنش، بیان ژن مربوط به آنزیم PAL افزایش یافته و به دنبال افزایش ساخت این آنزیم، متابولیت‌های ثانویه مسیر فنیل‌پروپانوئیدی نظیر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی جهت مقابله با تنش افزایش می‌یابند. ترکیبات فنولی می‌توانند به‌عنوان خاموش کننده و یا جاروب کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا سایر گونه‌های فعال اکسیژن عمل نماید (Cass et al. 2015). با توجه به نقش ترکیبات فنولی در کاهش و یا مهار اتواکسیداسیون لیپیدها یا تجزیه پراکسیدها، این ترکیبات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیشروی زنجیره اکسیداتیو و دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نمایند (Ksouri et al. 2007). متیل جاسمونات تولید ROS را در گیاهان القاء می‌کند، بنابراین یک سیستم آنتی‌اکسیداتیوی مؤثر برای گیاهان برای حفظ عملکردهای متابولیکی تحت شرایط القاء ضروری می‌باشد. در این شرایط دفاع آنتی‌اکسیدانی جهت محافظت از سلول‌ها در برابر تأثیرات خطرناک گونه‌های اکسیژن فعال وارد عمل می‌شود. گیاهان سیستم‌های سلولی خود را از تأثیرات گونه‌های اکسیژن فعال به‌وسیله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دفاعی مانند فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی محافظت می‌کنند (Agarwal and Pandy 2004). نشان داده شده‌است که برخی از غلظت‌های متیل جاسمونات ممکن است NADPH اکسیداز که احتمالاً مسیر تولید سریع H_2O_2 در زمان تنش می‌باشد، را القاء کند (Conrath et al. 2002). با این حال هنوز مشخص نیست که متیل جاسمونات چگونه برای تغییر سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند. ممکن است متیل جاسمونات فعالیت آنزیم‌ها را از طریق تغییر در رونویسی ژن، تغییر در ترجمه یا پس از ترجمه تحت تأثیر قرار دهد.

در مطالعه‌ای محققان نشان دادند که در جعفری غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در کشت هیدروپونیک باعث افزایش رونوشت *PAL* شد. هم‌چنین آن‌ها نشان دادند که با افزایش رونوشت *PAL* تجمع ترکیبات فنولی افزایش یافت

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.3.4]

(Ellard-Ivey and Douglas 1996). در کشت سوسپانسیون مریم گلی مشاهده شد که الیسیتور متیل جاسمونات منجر به افزایش بیان ژن *PAL* و تجمع تانشینون نسبت به نمونه شاهد شده‌است (Zhao et al. 2005). با توجه به مشاهدات صورت گرفته، هورمون ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات الیسیتور مناسبی برای افزایش بیان ژن *PAL* و افزایش متابولیت ثانویه دی‌ترپنوئید تاکسول در گونه سرخدار است (Wang et al. 2001). افزایش بیان ژن *PAL* و افزایش میزان کلروژنیک اسید تحت تأثیر الیسیتور متیل جاسمونات در بسیاری از میوه‌ها مانند هلو، سیب، انگور و توت‌فرنگی مشاهده شده‌است (Heredia and Cisneros-Zevallos 2009) در میوه‌های مختلف مانند تمشک قرمز افزایش بیان ژن *PAL* تحت تأثیر متیل جاسمونات سبب افزایش میزان کوئرستین و کامفرول شد (Jin et al. 2009; Yang et al. 2011).

تیمار متیل جاسمونات منجر به افزایش رونوشت *PAL* و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم در کشت سلولی سویا شد (Mandel 2010) در این مطالعه نتایج حاصل از اثر هورمون متیل جاسمونات بر بیان ژن *PAL* نشان داد که با بهینه‌سازی غلظت محرک می‌توان بدون دستورزی در ساختار ژنتیکی گیاه از متیل جاسمونات به عنوان الیسیتور کارآمد که از طریق القای بیان ژن *PAL* باعث بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود در بسیاری از گونه‌های دارویی استفاده کرد و به‌نظر می‌رسد این گامی با ارزش در جهت مهندسی متابولیت و تولید داروهای گیاهی باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از شرکت دارویی باریج اسانس کاشان به‌خاطر حمایت صمیمانه از پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Agarwal S, Pandy V (2004) Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia.* Journal of Biologycal Plant 48:555-560.

Ahmadi moghadam Y, Piri KH, Bahramnejad B, Habibi P (2013) Methyl jasmonate and salisylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (Purslan). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 26:89-94.

Biondi S, Scaramagli S, Capitani F, Altamura MM, Torrigiani P (2001) Methyl jasmonate up regulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in *tobacco thin*. Journal of Experimental Botany 52:231-242.

Cao JC, Zhang P, Cao X, Huang T, Bai Y, Chen K (2012) Antidiabetic effect of burdock (*Arctium lappa* L.) root ethanolic extract on streptozotocin-induced diabetic rats. African Journal of Biotechnology 11:9079-9085.

Cass C, Peraldi A, Dowd P (2015) Effects of phenylalanine ammonia lyase (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility and biotic stress responses in branchy podium. Experimental Botany 19:1-26.

Chan Y, Cheng L, Wu J (2010) A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). Agriculture Food Chemistry 40:378-386.

Choi DW, Jung JD, Ha YI, Park HW, Chung HJ, Liu JR (2005) Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginseno sides and other second metabolites. Plant Cell Reports 23:557-566.

Cole T, Su Sh, Hilger H (2016) *Arctium lappa* – burdock pappus bristles can cause skin irritation and burdock ophthalmia. Biological Chemistry 17:28-37.

Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. Trends in Plant Science 7:210-216.

Creasy LL (1987) The role of enzyme in activation in the regulation of 19 synthetic pathways: A case history. Plant Physiology 71: 389-392.

Ellard-Ivey M, Douglas CJ (1996) Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. Plant Physiology 112:183-192.

Ferracane R, Graziani G, Gallo M (2010) Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium Lappa*) seeds, roots and leaves. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51:399-404.

Heredia JB, Cisneros-Zevallos L (2009) The effects of exogenous ethylene and methyl jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wonded fresh produce. Food Chemistry 115: 1500-1508.

Howles PA, Sawalt VJH, Pavia NL, Elkind Y, Bate NJ, Lamb C, Dixon RA (1996) Overexpression of phenylalanine ammonia lyase points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. Plant Physiology 112:1617-1624.

Iijima Y, Rikanati RD, Fridman E, Gang DR, Bar E, Lewinsohn E, Pichersky E (2004) The biochemical and molecular basis for the divergent in the biosynthesis of terpens and phenylpropenes in the peltate gland of three cultivars of basil. Plant Physiology 136:3724-3736.

Jin P, Zheng YH, Tang SS, Rui HJ, Wang CY (2009) Enhancing disease resistance in peach fruit with methyl jasmonate. Journal of the Science of Food and Agriculture 89:802-808.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.3.4]

Kardosova A, Machova E (2006) Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. Fitoterapia 77: 367-73.
Ksouri R, Megdiche W, Debz A, Falleh M, Grignon C, Abdelly C (2007) Salinity effect on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. Journal of Plant Physiology and Biochemistry 45:244-248.
Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods 25: 402-408.
Lin CH, Lin SC, Lin CC (2002) Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. Biomedical Science 9: 401-409.
Macieijewska BD, Kesy J, Zielinska M, Kopcewicz J (2004) Jasmonates inhibit flowering in short-day plant pharbitis nil. Plant Growth Regulation 43:1-8.
Mandel S (2010) Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. Africa Journal of Biotechnology 9:8038-8047.
Martin D, Tholl D, Gershenzon J, Bohlman 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.
Maruta Y, Kawabata J, Niki R (1995) Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L). Agriculture Food Chemistry 43: 2592-2595.
Meek CR, Bidlack JE (2005) Arthropod population, phenylalanine ammonia-lyase activity and fresh weight of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L). as affected by plant age and Bacillus thuringiensis treatment. Plant Science 85:9-17.
Memelink J (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. Phytochemistry 70:1560-1570.
Murry M, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325.
Omidi M, Farzin N (2012) Biotechnology solutions for increasing the efficiency of medicinal plants. Journal of Modern Genetics 3:209-220. (In Farsi).
Paolacci A, Tanzarella O, Porceddu E, Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Molecular Biology 10:11-14.
Park SY, Hong SS, Han XH (2007) Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 55: 150-152.
Predes FS, Ruiz AL, Carvalho JE, Foglio MA, Dolder H (2011) Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. BMC Complementary and Alternative Medicine 11: 25-29.
Ritter H, Schulz GE (2004) Structural basis for the entrance into the phentlpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. Plant Cell 16:3426-3436.
Ruiz-García Y, Gómez-Plaza E (2013) Elicitors: A Tool for Improving Fruit Phenolic Content. Agriculture 3:33-52.
Song J, Wang Z (2009) Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza*. Molecular Biology Reports 36:939-952.
Raman V, Ravi S (2011) Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of heamatococcus pluvialis. Acta Physiologiae Plantarum 33:1043-1049.
Robert A, Creelman J, Mullet E (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. National Academy of Sciences 92:4114-4119.
Tuan PA, Li X, Park NI, Lee SY, Kim HH, Park SU (2011) Molecular cloning of 4-coumarate:CoA ligase and total phenolic content in garlic *(Allium sativum*). Plant Molecular Biology and Omics 4:25-28.
Wang C, Wu J, Mei X (2001) Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Applied Microbiology and Biotechnology 55:404-410.
Weitzel C, Petersen M (2010) Enzymes of phenylpropanoid metabolism in the important medical plant *Melisa officinalis* L. Planta 232:731-742.
Xu H, Park NI, Li X, Kim YK, Lee SY, Park SU (2010) Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in Scutellaria baicalensis. Bioresource Technology 101:9715-9722.
Yamamura Y, Ogihara Y, Mizukami H (2007) Cinnamic acid 4-hydroxylase from Lithospermum erythorhizom:cDNA cloning and gene expression. Plant Cell Repeats 56:456-465.
Yang SY, Chen YL, Feng LY, Yang E, Su XG, Jiang YM (2011) Effect of methyl jasmonate on pericarp browning of postharvest lychees. Journal of Food Processing and Preservation 35: 417-422.
Yao H, Tian S (2005) effects of pre-and post-harvest application of inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. Post harvest. Biology and Technology 35:253-262.
Zarei AK, Zamani Z, Mousavi A, Fatahi A, Alavije M, Dehsara B, Salami S (2012) An effective protocol for isolation of high-quality RNA from Pomegranate seeds. Plant Biotechnology 6:32-37.
Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitors signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23:283-333.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.3.3.4]