

## 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<sup>۱</sup>، مجید طالبی<sup>۲\*</sup>، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی<sup>۲</sup>، بهروز شیران<sup>۱</sup>

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

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

Gholamian F<sup>1</sup>, Talebi M<sup>\*2</sup>, Sayed-Tabatabaei BE<sup>2</sup>, Shiran B<sup>1</sup>

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 پروپانویید می‌باشد. به منظور شناسایی ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز، به کمک 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، به طوری 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 الیستور غیر زیستی کارآمد با تأثیر بر بیان ژن PAL احتمالاً موجب افزایش ترکیبات پلی فنول در گیاه بابا آدم می‌شود.

### واژه‌های کلیدی

الیستور

بابا آدم

فنیل آلانین آمونیا لیاز

متیل جاسمونات

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. 2016; Cole et al. 2010). هم‌چنین آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضد دیابت در ریشه این گیاه وجود دارند (Cao et al. 2012). کلروژنیک اسید، کورستین، اینولین، آرکتین، آرکتی ژنین و لوتولین 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<sup>۱</sup> برای تولید ترانس سینامیک اسید، آمین‌زدایی فنیل آلانین را کاتالیز می‌کند، (۲) آنزیم C<sup>۴</sup>H با اضافه کردن هیدروکسیل ترانس سینامیک اسید را به p-کوماریک اسید تبدیل می‌کند و (۳) آنزیم C<sup>۴</sup>CL 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). به دلیل 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 متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. الیستورها 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

بابا آدم با نام علمی *Arctium lappa* گیاه دارویی دو ساله و علفی از خانواده کاسنی<sup>۱</sup> 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<sup>۲</sup>، آرکتی ژنین<sup>۳</sup>، آرکتین<sup>۴</sup>، کافئیک اسید<sup>۵</sup>، کلروژنیک اسید<sup>۶</sup>، اینولین<sup>۷</sup>، لاپائول<sup>۸</sup>، آلدئیدها 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 آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و به دلیل وجود ترکیبات لیگنینی طبیعی دارای فعالیت ضد ویروسی نیز می‌باشد (Kardosova and Machova 2006). گوبو<sup>۹</sup> 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

<sup>1</sup> Asteraceae

<sup>2</sup> Tanin

<sup>3</sup> Arctigenin

<sup>4</sup> Arctin

<sup>5</sup> Caffeic acid

<sup>6</sup> Chlorogenic acid

<sup>7</sup> Inulin

<sup>8</sup> Lappaol

<sup>9</sup> Gobo

<sup>10</sup> Phenylalanine ammonia lyase

<sup>11</sup> 4-Hydroxylase Cinnamate

<sup>12</sup> 4-coumarate-CoA ligase

## مواد و روش‌ها

به منظور 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 همدریف‌سازی شدند. نواحی که بالاترین میزان حفاظت شدگی را داشتند برای طراحی آغازگر مد نظر قرار گرفتند. آغازگرهای رفت و برگشت به کمک نرم‌افزار Oligo7 طراحی شدند و به دلیل 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 ۴ ساعت در ۲۲ درجه سانتی‌گراد 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 به صورت 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 آمپی‌سیلین 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 ۱۳۹۴ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد.

سیکلوپنتان<sup>۱</sup> از مشتقات لینولینیک اسید<sup>۲</sup> هستند که از طریق مسیر اسپیر اکتادکانوئید<sup>۳</sup> سنتز و در گیاهان عالی توزیع وسیعی دارند (Biondi et al. 2001). در دهه ۱۹۶۰، جاسمونات‌ها به عنوان متابولیت‌های ثانویه در اسانس گل یاس<sup>۴</sup> 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 به عنوان 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 شده است که وقتی این مولکول‌های سیگنال به صورت خارجی به کار برده می‌شوند به صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده و منجر به بیان یک سری از ژن‌های دفاعی می‌شوند (Yao and Tian 2005). جاسمونات‌ها به عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القاء که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود 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.

<sup>1</sup> Cyclopentanone compounds

<sup>2</sup> Linolenic acid

<sup>3</sup> Octadecanoid pathway

<sup>4</sup> Jusmin Sp

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'-GTTCTTGGAAAGTTGCCDCCGTGT-3'	50	609

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

نام آغازگر	توالی 5'-3'	دمای اتصال (°C)	GC (%)	طول تکثیر (bp)
PAL-F	AGTCTTGTCCGCCATTTTCG	۶۰	۵۰	۱۵۲
PAL-R	GAGCTGCCTTAACGTAATCACTTCC	۶۰/۸	۴۸	۱۵۲
Rps9-F	GCGTTTGGATGCTGAGTTGAAG	۶۴	۵۰	۲۵۷
Rps9-R	GGCGCTCAAGGAAGTTCTCTAC	۶۲/۱	۵۴/۵	۲۵۷
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT	۴۷/۶	۵۲/۹	۱۵۶
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	۳۸/۷	۴۷	۱۵۶

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. به منظور بررسی بیان ژن *PAL*، با توجه به تحقیق (Paolacci et al. (2009) از ژن *Rps9* (Ribosomal Protein S9) به عنوان ژن کنترل داخلی برای تکثیر cDNA در RT-PCR استفاده شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژنهای *PAL* و *Rps9* با استفاده از نرم افزار Oligo7 انجام شد. ساخت آغازگرها با میانجی گری 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 نمونه های تیمار شده با هورمون متیل جاسمونات با غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار و کنترل منفی (آب دیونایزه) در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای اندازه گیری بیان ژن توسط واکنش Real-time PCR براساس روش استاندارد و به صورت نسبی صورت گرفت. کمیت نسبی در Real-time PCR به وسیله اندازه گیری 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 ۲X، ۰/۲ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت ۱۰ میکرومولار)،

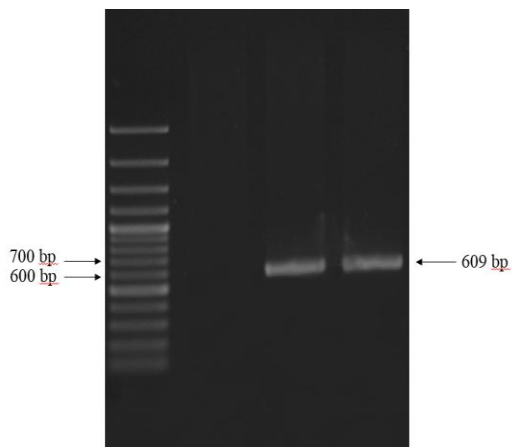
برای انجام این پژوهش نهال های بابا آدم از مرکز تحقیقات باریج اسانس کاشان تهیه و در گلدان ها در خاک تقریباً سبک (لومی-رسی) کشت شدند و هر شش روز یک بار آبیاری شدند. پس از کشت، گلدان ها به اتاقک رشد منتقل شدند و در شرایط یکسان در دمای روزانه ۲۲ تا ۲۷ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی گراد با شدت نور ۳۵ تا ۴۰ هزار لوکس تا مرحله ی 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 به صورت محلول پاشی روی سطح برگ به طوری که برگ ها کاملاً خیس شوند در طی یک مرحله انجام شد. پس از آن ریشه گیاهان در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار به منظور مطالعات بعدی برداشت شدند. به این منظور ریشه ها با آب DEPC<sup>۱</sup> شست و شو داده شدند و جهت استفاده در آزمایش های مولکولی با نیتروژن مایع تثبیت و در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

برای استخراج RNA کل<sup>۲</sup> از ریشه های 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

<sup>۱</sup> Diethylpyrocarbonate<sup>۲</sup> Total RNA<sup>۳</sup> Ribosomal Protein S9

روی ژل آگارز، قطعه‌ای به طول تقریبی ۷۶۵ 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 ۲۴ ساعت پس از اعمال هورمون مشاهده شد و این افزایش در سطح پنج درصد معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ) و ۴۸ ساعت پس از اعمال هورمون میزان بیان ژن کاهش یافت.



شکل ۱- تکثیر قطعه ژنی ۶۰۹ جفت‌بازی ژن PAL، از سمت چپ چاهک‌ها به‌ترتیب Ladder 100bp نمونه شاهد (آب دیونایزه) و دو نمونه از قطعه تکثیر یافته.

### بحث

مسیر فنیل پروپانویید، 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 ضد میکروبی، ایزوفلاونوئید، فیتوالکسین‌ها<sup>۲</sup>، لیگنین‌ها و استرهای فنولی می‌شود.

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)، ۴۰ چرخه شامل واسرشت شدن (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه)، اتصال آغازگرها (۶۰ 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<sup>۱</sup> 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 ۶۰۹ 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 سلول‌های 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 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 ۵۴ جفت‌باز و فاصله آغازگر برگشت M13 تا محل قرارگیری قطعه ۱۰۲ جفت‌باز می‌باشد که در مجموع ۱۵۶ جفت‌باز می‌شود، انتظار می‌رفت که طول قطعه تکثیری در حدود ۱۵۰ جفت‌باز افزایش یابد. پس از انجام واکنش و الکتروفورز محصولات آن بر

<sup>1</sup> Threshold cycle

<sup>2</sup> phytoalexins

گیاهی هستند که به‌عنوان الیستور 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<sup>۱</sup>، پروتئین‌های مهارکننده قارچ‌ها<sup>۲</sup>، آنزیم‌های مسیر بیوستنز فیتو الکسین‌ها، آنزیم‌های تولید کننده پروتئین‌های ذخیره رویشی<sup>۳</sup>، ژن زیر واحد بزرگ ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز<sup>۴</sup>، اسموتین<sup>۵</sup> (پروتئین ضد قارچ)، تیونین<sup>۶</sup> (پروتئین ضد قارچ)، چالکون سینتاز<sup>۷</sup>، هیدروکسی متیل گلوکاریل کوآنزیم آ ردوکتاز<sup>۸</sup>، لیپوکسیژناز<sup>۹</sup>، آنزیم سنتز کننده اتیلن<sup>۱۰</sup> 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 الیستورها متابولیت‌های ثانویه را برای دفاع در مقابل عوامل بیماری‌زا تولید می‌کنند. الیستورها ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوستنزی مختلف را راه‌اندازی می‌کنند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از علامت‌رسانی را القاء می‌کند که با تشخیص مولکول‌های الیستور 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).

<sup>1</sup> Proteinase inhibitors (*PinII*)

<sup>2</sup> Fungal inhibiting proteins

<sup>3</sup> Phytoalexins

<sup>4</sup> Vegetative storage proteins (*Vsp*)

<sup>5</sup> Ribulose biosphosphate carboxylase (*rbcl*)

<sup>6</sup> Osmotin

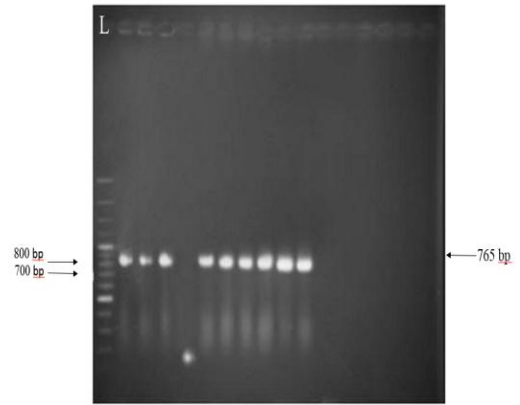
<sup>7</sup> Tionin

<sup>8</sup> Chalcone synthase (*chs*)

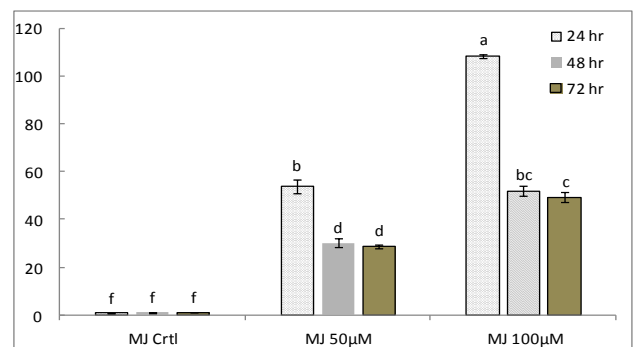
<sup>9</sup> Hydroxymethyl glutaryl CoA reductase

<sup>10</sup> Lipoxigenase

<sup>11</sup> Ethylene forming enzyme (*EFE*)



شکل ۲- نتایج حاصل از Colony PCR ژن *PAL*، چاهک اول Ladder ۱۰۰bp.



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 ( $P \leq 0.05$ ) 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 بیوستنزی 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

می‌شود. بنابراین متیل جاسمونات با افزایش ظرفیت فتوسنتزی، میزان فندهای 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 فنیل پروپانوئیدی 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 نمایند (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 آنتی‌اکسیداتیو 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 فنیل آلانین آمونیا لیاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی 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

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 (Omid 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 به‌عنوان 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 تأثیر 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 ( $P \leq 0/05$ ). 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 ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات حاصل گشت و در هر دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در زمان‌های ۴۸ 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

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 الیستور 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 باريج اسانس کاشان به‌خاطر حمایت صمیمانه از پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### منابع

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

Ahmadi moghadam Y, Piri KH, Bahramnejad B, Habibi P (2013) Methyl jasmonate and salicylic 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 ginsenosides 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.

(Ellard-Ivey and Douglas 1996). در کشت سوسپانسیون مریم گلی مشاهده شد که الیستور متیل جاسمونات منجر به افزایش بیان ژن PAL و تجمع تانن‌ها نسبت به نمونه شاهد شده‌است (Zhao et al. 2005). با توجه به مشاهدات صورت گرفته، هورمون ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات الیستور 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 الیستور 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).

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 wounded 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 terpenes 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.

- 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.
- Maciejewska BD, Keszy 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 phenylpropanoid 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 erythrorhizom*: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.