مطالعه الگوی بیان ژن‌های aox_2 و pal_2 مرتبط با تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاونوئیدها در گیاه بومادران تحت تأثیر اسید سالسیلیک

سدابه جهانبخش گده کهریز[۱،*]، فاطمه جلالی شاهکو[۲] و سیده یلدا رئیسی ساداتی[۳]

۱- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۳- دکتری تخصصی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۵)

چکیده

کارکردهای دارویی مختلف بومادران، آن را به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم در پزشکی مطرح ساخته است. همچنین بومادران منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد که گیاهان را از اثرات مضر گونه‌های اکسیژن فعال حفظ می‌کند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تیمار اسید سالسیلیک بر الگوی بیان دو ژن (aox_2 و pal_2) درگیر در مسیر تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاونوئیدها در گیاه بومادران بود. بدین منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل اسید سالسیلیک در دو سطح (صفر و ۵۰ میلی‌مولار) به‌عنوان عامل اول و زمان نمونه‌برداری (۲۴ و ۴۸ ساعت) به‌عنوان عامل دوم با دو سطح در گلخانه دانشکده کشاورزی اجرا شد. ابتدا گیاه بومادران در محیط هیدروپونیک جانسون تحت تیمار هورمونی قرار گرفت و ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار، نمونه‌برداری از بافت برگ انجام شد. نتایج qRT-PCR نشان داد که محرک اسید سالسیلیک به‌طور معنی‌داری موجب کاهش بیان دو ژن موجود در مسیر تولید آنتی‌اکسیدان‌ها در بومادران شد. کم‌ترین بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار با اسید سالسیلیک رخ داد. به‌طور کلی، کاربرد اسید سالسیلیک باعث راه‌اندازی فرآیندهای مولکولی می‌شود که منتج به پاسخ‌دهی گیاه با تغییر در میزان بیان ژن‌های کدکننده آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاونوئیدها می‌شود؛ بنابراین پیشنهاد می‌گردد که از محرک‌های دیگر ازجمله جاسمونیک اسید برای بررسی بیان ژن‌های کدکننده آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاونوئیدها در پژوهش‌های آینده استفاده گردد.

واژگان کلیدی: بیان نسبی ژن، بومادران، محرک هورمونی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **jahanbakhsh@uma.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]

[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]

مقدمه

با تغییر رویکرد جوامع مدرن از مصرف داروهای شیمیایی، صنعت گیاهان دارویی در چند دهه اخیر با سرعت بسیار زیادی رو به رشد است (Izadpanah *et al*., 2017). گیاه بومادران هزاربرگ (*Achillea millefolium*) گیاهی خودگشن از خانواده گل ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) است که انواع متعددی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی ازجمله ترپنوئیدها و فنیل‌پروپانوئیدها را تولید می‌کند و به‌علت تنوع رویشگاه و پراکندگی وسیع در ایران، یکی از شناخته‌ترین و در دسترس‌ترین گونه‌های جنس بومادران می‌باشد که در طب سنتی به‌ویژه درمان التهابات دستگاه گوارش مورد مصرف است (Taheri *et al*., 2016; Fathi *et al*., 2020; Angourani, 2020). در جهان بیش از ۱۱۵ گونه از این جنس وجود دارد و در ایران دارای ۱۹ گونه علفی چندساله می‌باشد که ۷ گونه آن بومی ایران بوده و اغلب معطر هستند و حدود سه تا چهار گونه آن مصرف دارویی دارند (Angourani, 2020). کارکردهای دارویی مختلف بومادران مانند درمان زخم‌ها، درمان اختلالات روده و معده، بیماری‌های کبد و صفرا و فعالیت‌های ضدالتهابی و ضداسپاسم، آن را به‌عنوان یک گیاه مهم دارویی مطرح ساخته است و اسانس این گیاه در صنایع بهداشتی، آرایشی و عطرسازی استفاده می‌شود (Upton *et al*., 2016; Benedek *et al*., 2008).

مواجهه گیاهان با انواع تنش‌های محیطی و القاگرهای مختلف نظیر هورمون‌های گیاهی می‌تواند به‌عنوان یک رهیافت مؤثر جهت تقویت عملکرد متابولیت‌های دارویی به‌کار رود (Javedan-Asl *et al*., 2015). تاکنون از القاگرهای مختلفی از قبیل اسید سالسیلیک، نیترات نقره، کلرید کلسیم ، یون نقره، عصاره مخمر و الیسیتور قارچی برای افزایش مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاهان استفاده شده است (Fengqing *et al*., 2017).

اسید سالسیلیک به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی با ماهیت فنلی، در فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی شرکت می‌کند و از طریق القاء تنش کاذب موجب بیان برخی از ژن‌های تولیدکننده متابولیت‌های ثانوی ازجمله آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید می‌شود و نیز از طریق آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت موجب بهبود مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شود (Mahmoodi Jaraghili *et al*., 2016). آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL: Phenylalanine ammonia lyase) اولین و کلیدی‌ترین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد و نقش کلیدی در تنظیم محصولات حاصل از مسیر فنیل‌پروپانوئیدی ایفا می‌کند. ترکیبات فنلی به ترکیبات ضدمیکروبی و ضدقارچی معروف‌اند که به‌طور طبیعی در گیاه وجود دارند و نقش‌های مهمی چون حفاظت در برابر تنش‌ها به‌عهده دارند (El-Sharkawy *et al*., 2016; Bagal *et al*., 2012).

مطالعات میرزایی و همکاران (Mirzaei *et al*., 2010) نشان داد که گیاه بومادران دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی به‌منظور درک شناخت و افزایش متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی انجام گرفته است (Mora-Pale *et al*., 2014). از طرفی، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به‌عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرآیندهای ژنتیکی هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad, 2017). یکی از اقدامات اساسی در موجودات مختلف مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor *et al*., 2016). ژن aox_2 کدکننده‌ی یکی از ایزوفرم‌های آنزیم آلترناتیواکسیداز (Alternative oxidase: AOX) می‌باشد. این آنزیم یک اکسیدکننده‌ی نهایی در مسیر آلترناتیواکسیداز در زنجیره‌ی انتقال الکترون می‌باشد و با راه‌اندازی این مسیر در میتوکندری گیاهان، باعث کاهش تولید گونه‌های اکسیژنی فعال (Reactive oxygen species: ROS) در شرایط تنش اکسیداتیو می‌شود (Yamchi, 2015). محققان برای اولین بار ژن آلترناتیواکسیداز ۲ زیتون (*OeAOX2*) را کاندید مناسبی جهت غربال‌گری زیتون‌های با توان ریشه‌زایی متفاوت در

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]

جمعیت زیتون ایتالیایی معرفی نمودند (Hedayati *et al.*, 2020). در تحقیقات گوناگون افزایش بیان ژن *PAL2* هم‌سو با افزایش بیان ژن‌های (Pathogenesis-related proteins: PR) و نیز القای سریع مرگ سلولی بوده است (Fitzgerald *et al.*, 2004).

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی و وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در آن‌ها و از طرف دیگر بررسی منابع در ارتباط با ژن‌های مذکور نشان داد که تاکنون در جهت ارزیابی و میزان بیان این ژن‌ها در گیاهان زیرخانواده‌ی آنتی‌میده (*Anthemideae*) اقدامی صورت نگرفته است و هیچ‌گونه مطالعه‌ای در این زمینه گزارش نشده است (Yamchi, 2015)؛ بنابراین این پژوهش به‌منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های aox_2 و pal_2 درگیر در مسیر سنتز آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاونوئیدها در گیاه دارویی بومادران تحت تأثیر اسید سالسیلیک انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای گیاه بومادران (*Achillea millefolium*) که از زیر خانواده‌ی مهم *Anthemideae* و متعلق به تیره‌ی کاسنی (*Asteraceae*) می‌باشد، از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. برای ضدعفونی بذرها از هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (V/V) با غلظت کلر فعال پنج درصد استفاده گردید. در هر پتری یک کاغذ صافی مرطوب قرار داده شد و تعداد ۲۰ بذر روی آن قرار گرفت. ترکیبات آلی و معدنی موردنیاز برای رشد بذرها مانند نمک‌های عناصر پرمصرف و کم‌مصرف، محرک شیمیایی از نمایندگی‌های شرکت سیگما و مرک تهیه شد. گیاهچه‌ها در محیط هیدروپونیک جانسون تحت تیمار هورمونی قرار گرفتند (Bahrami *et al.*, 2020) و به ژرمیناتور با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس انتقال یافتند و هر سه روز یک‌بار محلول غذایی به آن‌ها اضافه شد. ۲۴ روز بعد، گیاهچه‌ها به محیط جدید منتقل شدند و از قسمت ریشه با اسید سالسیلیک ۵۰ میلی‌مولار تیمار شدند. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار، در مرحله سه برگچه‌ای نمونه‌برداری از نمونه‌های شاهد و تحت تیمار جهت بررسی بیان ژن‌های aox_2 و pal_2 انجام گرفت. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده و برای استخراج RNA کل در مرحله بعد، در یخچال با دمای ۸۰- نگه‌داری شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل شامل عامل اول اسید سالسیلیک با دو سطح غلظتی (صفر و ۵۰ میلی‌مولار) و عامل دوم زمان نمونه‌برداری (۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار) در سه تکرار اجرا شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: بدین منظور ابتدا ازت مایع به ۰/۱ گرم نمونه بافت برگی اضافه گردید و در ادامه استخراج RNA با چهار روش استفاده از کیت بایوزل (Biosol) با دستورالعمل شرکت سازنده (بیوفلوکس ژاپن)، استفاده از کیت استخراج سیلیکا ژل با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده (جینا بیوسنس)، استفاده از کیت پی‌بایوزل با دستورالعمل شرکت سازنده (بیوفلوکس ژاپن) و در نهایت با استفاده از کیت بایوزل و ماده افزودنی پلی‌ونیل‌پیرولیدین (PVP) و بتامرکاپتواتانول انجام شد.

برای تعیین کیفیت RNA، پنج میکرولیتر از نمونه‌های RNA همراه با نشانگر با اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت‌باز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. برای تعیین کمیت RNA از دستگاه نانوفوتومتر (IMPLEN) با نام تجاری Galileo شرکت سازنده BOECO آلمان استفاده شد. تیمار DNase I به‌منظور از بین بردن DNA ژنومی برای تمامی نمونه‌ها بر اساس شیوه‌نامه شرکت فرمنتاز انجام شد. ساخت cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز و پس از ساخت کتابخانه cDNA، به‌منظور نگهداری، نمونه‌ها به فریزر ۲۰- منتقل شدند. واکنش PCR برای هر نمونه شامل دو تکرار زیستی به‌همراه دو تکرار فنی برای ژن‌های هدف و ژن خانه‌دار (Housekeeping gene) در نظر گرفته شد. در این آزمایش از ژن actin به‌عنوان ژن کنترل داخلی جهت نرمال‌سازی نتایج استفاده شد.

طراحی آغازگرها و ریل تایم PCR: طراحی آغازگرها به کمک اطلاعات موجود در پایگاه داده NCBI (National Center for Biotechnology Information) و هم‌چنین نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶/۰۱) صورت گرفت. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]

جدول ۱- مشخصات اصلی آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده به‌همراه طول قطعات تکثیر شده

Table 1. Basic information for forward and reverse designed primers with amplified fragment length

شماره No.	نام آغازگرها Primer's name	ژن Gene	توالی آغازگر ('3-'5) Primer (5' -3')	طول قطعات Fragments size (bp) (جفت‌باز)	دمای ذوب (سانتی‌گراد) Tm (°C)
1	ACTIN2 F ACTIN2 R	ACTIN2	5' CCTGCTATGTATGTTGCTATT 3' 5' TCATCAAGGAATCGGTAAGA 3'	184	59.6
2	AOX2 F AOX2 R	ALTERNATIVE OXIDSE	5' TGGTTCTAGCAGTTCAAGG 3' 5' TATAGCAATCGCAGGAGC 3'	182	60.9
3	PAL2 F PAL2 R	PHNYL ALANIN AMONIA LYAS	5' A CGCAGTTCGTTCAGGATT 3' 5' GATGTGTCAAGTGGTCAGTAA 3'	134	61.8

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: داده‌های مربوط به واکنش qRT-PCR با استفاده از نرم‌افزار ©Rest (نسخه ۲) ارزیابی شدند (Pfaffl *et al*., 2002) و اطلاعات مربوط به نتایج بیان ژن‌ها با استفاده از داده‌های خروجی از نرم‌افزار iQ5 مقایسه و تفسیر شدند. از روش $^{-\Delta\Delta CT}$۲ برای مقایسه نسبی بیان ژن‌ها استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج RNA: یافتن روشی مناسب برای استخراج RNA از بافت برگی گیاه دارویی بومادران که حاوی پلی‌فنل‌ها و متابولیت‌های ثانویه در مطالعات بیان ژن است، بسیار ضروری به نظر می‌رسد؛ بنابراین، تلاش گردید تا چهار روش در تعیین امکان یافتن روش مناسب استخراج RNA مورد بررسی قرار گیرد. استخراج RNA با استفاده از کیت‌های تجاری اثبات کرد که برای استخراج RNA از این گونه گیاهی به‌دلیل میزان کم RNA، مناسب نبود. با توجه به ژل آگارز، دو باند RNA ریبوزومی نیز مشاهده نگردید. با توجه به اولین روش ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها، داده‌ها نشان دادند که استخراج RNA کل از نمونه‌های تیمار شده با اسید سالسیلیک در مرحله سه برگچه‌ای در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت با استفاده از بایوزل دارای بازده ۸۱/٦ میکروگرم بر گرم RNA از بافت تر برگ بومادران بود و هم‌چنین با استفاده از بایوزل، نسبت A_{260}/A_{280} برای بافت برگ ۱/۰٤ بود که نشان از بازده و کیفیت ضعیف این روش استخراج RNA بود. هم‌چنین نتایج ژل-الکتروفورز این روش شامل باند بسیار ضعیفی برای محصول RNA استخراج شده از بافت برگ گیاه بومادران بود (شکل ۱-B).

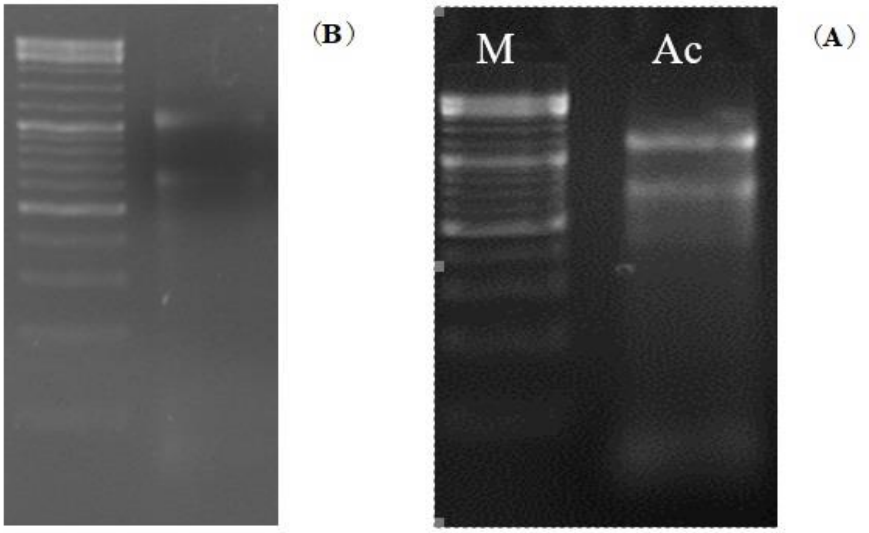
نتایج حاصل از روش بایوزل با PVP و بتامرکاپتوانول (β-ME) برای استخراج RNA، شامل بازده متوسط RNA کل گیاه بومادران با باندهای شفاف بدون هیچ اسمیر یا هاله‌ای بود که ثابت کرد این روش برای استخراج RNA از بافت برگ کارآمد می‌باشد. بازده بالا و کیفیت مطلوب RNA از طریق روش اسپکتروفتومتری نیز برای محصول استخراج شده این روش مشاهده شد. کمیت RNA استخراج شده با استفاده از روش بایوزل با بتامرکاپتوانول و PVP بهتر از دیگر روش‌ها بود (جدول ۲). الکتروفورز RNA استخراج شده با استفاده از روش مذکور بر روی ژل آگارز شامل باندهای RNA ریبوزومی کاملاً واضحی بود که نشان از عدم تخریب محصول استخراجی در این روش می‌باشد (شکل۱-A)؛ بنابراین، این روش استخراج، RNA مناسبی را برای تهیه کتابخانه cDNA جهت سنجش بیان ژن از طریق واکنش qRT-PCR را فراهم نمود.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]

جدول ۲- غلظت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از روش Biosol با بتا مرکاپتواتانول و PVP

Table 2. The concentration and purity of the extracted RNA using the Biosol method supplemented with Beta-Mercaptoethanol and PVP

نمونه Sample	$OD_{260}/_{280}$	غلظت RNA (نانوگرم/میکرولیتر) RNA concentration (ng/µl)
Yarrow بومادران	2.04	700



شکل ۱- الکتروفورز RNA گیاه بومادران استخراج شده با کیت بایوزول، بتامرکاپتواتانول و پلی‌ونیل‌پیرولیدین (A) و الکتروفورز RNA استخراج شده با کیت بایوزول و پی‌بایوزول (B)

Figure 1. Yarrow plant RNA electrophoresis extracted with Biosol kit, β-mercaptoethanol and polyvinyl-pyrrolidine and PVP (A) and RNA electrophoresis extracted with Biosol and P-Biosol kit (B)

مطالعات ترنسکریپتومی در گیاهان دارویی می‌تواند به‌دلیل میزان زیادی از پلی‌فنل‌ها و متابولیت‌های ثانویه پیچیده باشد. روش‌های بسیاری برای غلبه بر این مشکل و حصول به RNA سالم و تخریب نشده در گیاهان مورداستفاده قرارگرفته است؛ بنابراین، وجود روشی مناسب برای استخراج RNA مرحله ضروری است. همان‌طور که در نتایج ذکر شد، در پژوهش حاضر چهار روش استخراج RNA با کیفیت و کمیت مختلف مورد سنجش قرار گرفت. روش بایوزل، روش نامناسبی برای استخراج RNA به‌دلیل حصول RNA با کمیت و کیفیت پایین بود که نسبت A_{260}/A_{280} نیز این امر را تائید نمود. کیت تجاری استخراج RNA (Silica-gel RNeasy kit)، برای این گونه گیاهی مناسب نبود. سالم بودن RNA جداسازی شده از این کیت تجاری استخراج RNA با الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. باندهایی با وضوح بالا مشاهده نگردید که نشان از تخریب RNA در طی استخراج توسط این روش بود. استفاده از بایوزل، پی بایوزل و کیت تجاری استخراج RNA برای آماده‌سازی RNA از این گیاه دارویی با آلودگی بالای فنلی و دیگر ترکیبات نامناسب بود. در مقابل استخراج RNA با استفاده از بایوزل با PVP و بتامرکاپتواتانول، بازده خوبی در حصول RNA کل از بافت برگ تازه داشت. در مطالعه عاسیف و همکاران (Asif *et al.*, 2006) نیز کمیت و کیفیت مناسبی برای RNA استخراجی با این روش حاصل شد به‌طوری که باندهای واضحی برای زیرواحدهای RNA ریبوزومی 18S و 28S در طی الکتروفورز ژل آگارز مشاهده گردید.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]

به‌طور کلی یافته‌های ما نشان داد که در روش بایوزل با افزودن PVP و بتامرکاپتواتانول، به بافر استخراج، RNA کل از بافت برگ گیاه بومادران با کمیت و کیفیت مناسبی به‌دست خواهد آمد. هم‌چنین، نسبت A_{260}/A_{280} و A_{260}/A_{230} حاصل شده از این روش حاکی از آن است که با استفاده از این روش، حداقل آلودگی با پلی‌فنل‌ها، پروتئین و پلی‌ساکاریدها وجود خواهد داشت.

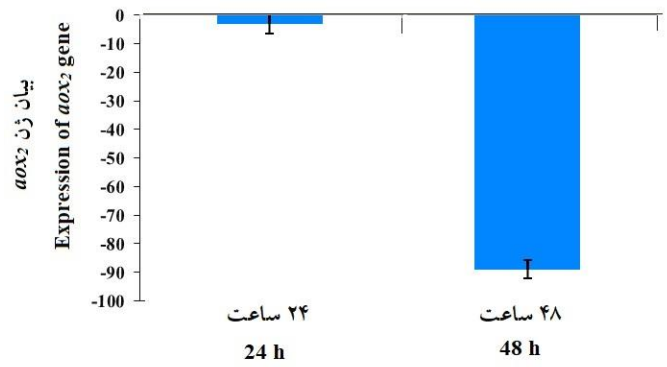
شیوه‌نامه شرح داده شده در جداسازی RNA با کیفیت و کمیت بالا برای مطالعات ژنتیکی بومادران، کارآمد، ساده و سریع، راحت بود. ما معتقدیم که یافته‌های این پژوهش می‌تواند به‌عنوان گامی مؤثر در جداسازی RNA با کیفیت مطلوب در سایر گیاهان دارویی محسوب شود.

بیان ژن‌های *aox2* و *pal2* گیاه بومادران در پاسخ به اسید سالسیلیک: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن *aox2* در ۲۴ ساعت اولیه در بافت برگ کاهش پیدا کرد (شکل ۲). میزان بیان این ژن در بافت برگ و در پاسخ به هورمون اسید سالسیلیک در زمان ۲۴ ساعت کاهش محسوسی نسبت به کنترل (۲/۷۵- Fold change) و در زمان ۴۸ ساعت نسبت به کنترل (۸۹/۰۹- Fold change) با افت شدید مواجه شد. تأثیر القاگرها در تغییرات بیان ژن‌های یک مسیر بیوسنتزی خاص علاوه‌بر نوع القاگر، به غلظت آن و هم‌چنین مرحله رشدی گیاه که آن تیمار خاص به‌کار می‌رود بستگی دارد (Poorraskari *et al.*, 2020). در این تحقیق با افزایش زمان، میزان بیان ژن‌های هدف سیر نزولی نشان داد. در این رابطه اثر القاگر اسید سالسیلیک نیز بر بیان ژن‌ها در سیاه‌دانه مشاهده شده است (Elyasi *et al.*, 2015). مقاومت القا شده در بافت‌های گیاهی درواقع نوعی آماده‌سازی قبلی توسط القاگرها می‌باشد که اجازه واکنش سریع‌تر مکانیسم‌های دفاعی در برابر بیمارگر را فراهم می‌کند (Butt *et al.*, 2019).

از سوی دیگر مطالعات نشان می‌دهد سالسیلات قادر است به‌واسطه اتصال به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را غیرفعال کرده و بدین ترتیب سبب افزایش تدریجی گونه‌های اکسیژن فعال شود (Raman and Ravi, 2011). افزایش گونه‌های اکسیژن فعال نیز منجر به کاهش قابل‌توجهی از مقدار رنگیزه‌ها در گیاهان می‌شوند (Yakhin *et al.*, 2017). یافته‌های بالا، با نتایج تحقیق حاضر در رابطه با کاهش شدید بیان نسبی ژن آنزیم آلترناتیواکسیداز، ۴۸ ساعت بعد از کاربرد ۵۰ میلی‌مولار اسید سالسیلیک مطابقت دارد. محققان در مطالعه‌ای اثرات ۲۰ میکرومولار اسید سالسیلیک بر فعالیت AP (Alternative Path) و بیان ژن *AOX* در میتوکندری تنباکو، دریافتند که تیمار اسید سالسیلیک، فعالیت AP را افزایش داد. در طی فرآیند تیمار اسید سالسیلیک فعالیت AP در ۸ ساعت اولیه تیمار بالا رفت. سپس تا ۱۶ ساعت کاهش یافت و در بین ۱۶ تا ۲۴ ساعت، سطح پایداری را نگه داشت. هم‌چنین سطح رونوشت ژن *aox1*، تغییرات مشابه را در فعالیت AP و سطح پروتئین AOX نشان می‌دهد. القای بیان *AOX* به‌وسیله غلظت‌های پایین اسید سالسیلیک، در گونه‌های اکسیژن واکنشی دخالت می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش فعالیت AP در پاسخ به اسید سالسیلیک با بیان *AOX* در ارتباط است (Lei *et al.*, 2008). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که پیش‌تیمار گیاهان توتون با اسید سالسیلیک منجر به بیان بالای ژن‌های PR می‌شود (Farajollahi *et al.*, 2018).

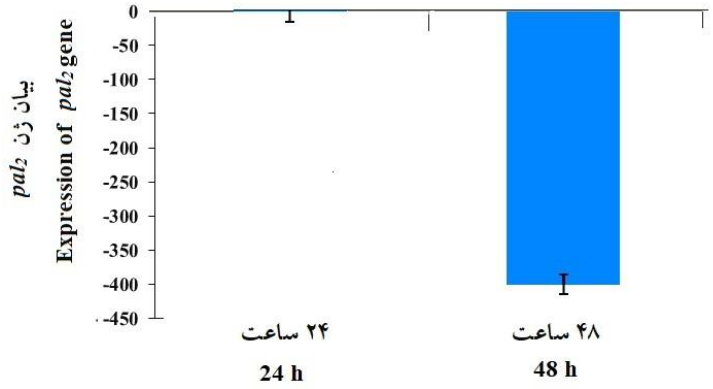
در پژوهش حاضر، بیان ژن *pal2* تحت تیمار اسید سالسیلیک در بافت برگ گیاه بومادران کاهش یافت (شکل ۳). به‌طوری که میزان بیان نسبی این ژن در بافت برگ تحت تیمار هورمون اسید سالسیلیک در زمان ۲۴ ساعت نسبت به شرایط کنترل کاهش یافت (۱/۹۴- Fold change) و ۴۸ ساعت بعد (۴۱۹/۱۸- Fold change) با افت شدید مواجه گردید.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]



شکل ۲- سطح بیان نسبی ژن aox_2 (Fold change) در بافت برگی بومادران

Figure 2. Relative expression level of aox_2 gene (Fold change) in yarrow leaf tissue



شکل ۳- سطح میزان بیان نسبی ژن pal_2 (Fold change) در بافت برگی بومادران

Figure 3. Relative expression level of pal_2 gene (Fold change) in yarrow leaf tissue

محققان دریافتند میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در اواخر دوره رویشی به اوج خود رسیده و در مرحله گل‌دهی میزان بیان ژن آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز مجدداً به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (Ziaei *et al.*, 2012). هم‌چنین در تحقیقی دیگر میزان بیان ژن آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاهان تیمار شده با اسید سالسیلیک در پاسخ به آلودگی باکتریایی پس از زمان اوج کاهش یافت و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی به کم‌ترین میزان بیان خود رسید (Farajollahi *et al.*, 2018). نتایج تحقیقات فوق با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر کاهش چهار برابری میزان بیان نسبی ژن آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در بافت برگی بومادران، ۴۸ ساعت بعد از کاربرد ۵۰ میلی‌مولار اسید سالسیلیک مطابقت دارد. محققان دریافتند که آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز به‌عنوان اولین و مهم‌ترین آنزیم دخیل در تولید ترکیبات پلی‌فنلی تحت تأثیر تیمارهای اسید سالسیلیک قرارگرفته و با بهینه‌سازی غلظت محرک‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه دلخواه را در کنگر فرنگی تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌طوری‌که با افزایش غلظت اسید سالسیلیک روند تغییرات فعالیت آنزیم با فلاونوئیدها یکسان بود (Samadi *et al.*, 2015). از آن‌جایی که افزایش محرک بیش از حد معمول نه‌تنها افزایش متابولیت را در بر ندارد، بلکه از طریق کاهش فعالیت آنزیم (احتمالاً از طریق کاهش بیان ژن مربوطه) تولید متابولیت‌ها را کم و یا متوقف می‌سازد (Samadi *et al.*, 2015)؛ بنابراین می‌توان بیان کرد که کاربرد ۵۰ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید در فعال‌سازی مسیر فنیل‌پروپانوئیدی و بیان ژن آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز تأثیر نداشته است. در نتیجه با بهینه‌سازی غلظت محرک و ترکیبات غذایی محیط کشت می‌توان بدون دست‌کاری در ساختار ژنتیکی گیاه با افزایش فعالیت آنزیم میزان متابولیت ثانویه

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]

مورد نظر را افزایش داد. نکته دیگری که از تحقیق حاضر با توجه به نتایج مطالعات مختلف مبنی بر وجود کارایی و قابلیت‌های ذاتی مؤثر اسید سالسیلیک قابل استنباط است افزایش تولید متابولیت‌ها نه‌تنها تحت تأثیر فعالیت آنزیم، بلکه به غلظت محرک محیطی نیز بستگی دارد. افزایش محرک بیش از حد معمول نه‌تنها افزایش متابولیت را در بر ندارد، بلکه از طریق کاهش فعالیت آنزیم (احتمالاً از طریق کاهش بیان ژن مربوطه) تولید متابولیت‌ها را کم و یا متوقف می‌سازد؛ بنابراین با بهینه‌سازی غلظت محرک و ترکیبات غذایی محیط کشت می‌توان بدون دست‌کاری در ساختار ژنتیکی گیاه با افزایش فعالیت آنزیم میزان متابولیت ثانویه موردنظر را افزایش داد (Samadi *et al.*, 2015). اگرچه تحقیقات زیادی در مورد تأثیر انواع محرک‌ها روی این گروه از ژن‌ها در گیاهان خانواده سولاناسه صورت گرفته است اما مطالعه چندانی در مورد تأثیر اسید سالسیلیک بر میزان بیان این ژن‌ها در گیاهان دارویی انجام نشده است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که اسید سالسیلیک تأثیر معنی‌داری بر کاهش بیان نسبی ژن‌های aox_2 و pal_2 در بومادران داشته و البته باید توجه داشت که تمام ژن‌ها تأثیر یکسانی در تولید آنتی‌اکسیدان‌ها ندارند و اهمیت هر ژن با توجه به جایگاه آن ژن در مسیر بیوسنتزی و ترکیبی که تولید می‌کند تعیین می‌شود.

References

Angourani, H.R. (2020). Investigation of phytochemical compounds of yarrow (*Achillea millefolium*) essential oil in Zanjan province natural habitats. *Journal of Medicinal Plant Biotechnology*, **6(1):** 84-92 (In Persian).

Asif, M., Trivedi, P., Solomos, T. and Tucker, M. (2006). Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) Fruit. *Journal of Agriculture Food chemistry*, **54:** 5227-5229.

Benedek, B., Rothwangl-Wiltschnigg, K., Rozema, E., Gjoncaj, N., Reznicek, G., Jurenitsch, J., Kopp, B. and Glasl, S. (2008). Yarrow (*Achillea millefolium* L.) pharmaceutical quality of commercial samples. *Journal Pharmazie*, **63:** 23-26.

Bahrami, N., Jalali, M. and Zare, A.A. (2020). The Effect of various sources of Iron on the nitrate accumulation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Iranian Journal of Soil and Water Research*, **51(11):** 2953-2963 (In Persian).

Butt, U.R., Naz, R., Nosheen, A., Yasmin, H., Keyani, R., Hussain, I. and Hassan, M.N. (2019). Changes in pathogenesis-related gene expression in response to bioformulations in the apoplast of *maize* leaves against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Interactions*, **14:** 61-72.

Bagal, U.R., Leebens mack, J.H., Walter Lorenz, W.W. and Dean, J.F. (2012). The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific lineage. *BMC Genomics*, **13(3):** 1-9.

Chan, K.L., Ho, C.L., Namasivayam, P. and Napis, S. (2007). A simple and rapid method for RNA isolation from plant tissues with high phenolic compounds and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Group Protocol Exchange*. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.184

Elyasi, R., Majdi, M., Bahramnejad, B. and Mirzaghaderi, G.H. (2015). Expression pattern analysis of genes involved in the biosynthetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with salicylic acid. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **23:** 164-174 (In Persian).

El-Sharkawy, E.E.S., Abdalla, M.Y. and El-Shemy, A.O. (2016). Effect of some resistance chemical inducers on incidence of cucumber Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cucumerinum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, **26:** 1-6.

Farajollahi, F., Babaezadeh, V. and Rahimian, H. (2018). Induction of several pathogenesis-related genes in tobacco plants treated by salicylic and jasmonic acid after challenging with *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*. *Journal of Agriculture Biotechnology*, **9:** 129-150 (In Persian).

Fitzgerald, H.A., Chern, M.S., Navarre, R. and Ronald, P.C. (2004). Overexpression of (At) *NPR1* in rice leads to a BTH-and environment-induced lesionmimic/ cell death phenotype. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **17:** 140-151.

Fengqing, W., Jingyu, Z., Zhongyi, Z., Lina, W., Yanfei, S., Caixia, X., Mingjie, L., Bao, Z., Jiafang, D., Li, G. and Hongzheng, S. (2017). Transcriptome analysis of salicylic acid treatment in *rehmannia glutinosa* hairy roots using RNA-seq technique for identification of genes involved in acteoside biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, **8:** 1-15.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]

Fathi, I., Majdi, M., Maroufi, A. and Dastan, D. (2020). 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*). *Journal of Molecular and Cellular Researches (Iranian Journal of Biology)*, **33:** 87-102 (In Persian).

Hedayati, V., Mousavi, A., Mousavi, S., Hashemabadi, Z. and Hosseini Mazinani, S.M. (2020). Study on the structure of *OeAOX2* gene related to rooting among native olive genotypes (*Olea europea* L.) of Iran. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, **33(2):** 496-504 (In Persian).

Izadpanah, M., Seyedian, S.E. and Salehi Shanjani, P. (2017). Assessment of agro- morphological diversity among populations of *Achillea nobilis* L. and *Achillea aleppica* DC. in Iran. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, **29:** 702-716 (In Persian).

Javedan-Asl, M., Rajabi Memari, H., Nabati Ahmadi, D. and Rahnama Ghahfarokhi, A. (2015). Isolation of linalool synthase and pinene synthase genes from yarrow (*Achillea millefolium* L.) medicinal plant. *Plant Genetic Researches*, **2(1):** 23-34 (In Persian).

Jafari Darehdor, A.H., Mohammadabadi, M.R., Esmailizadeh, A.K. and Riahi Madvar, A. (2016). Investigating expression of *CIB4* gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. *Journal of Small Ruminant Research*, **4:** 119-132 (In Persian).

Lei, T., Yan, Y., Xi, D., Sun, H., Zhag, F., Xu, W. and Lin, H. (2008). Effects of Salicylic Acid on alternative pathway respiration and alternative oxidase expression in tobacco calli. *Zeitschrift für Naturforschung*, **63:** 706-712.

Mahmoodi Jaraghili, P., Mohajjel Shoja, H. and Mohajjel Kazemi, E. (2016). Evaluation of the effect of salinity on the germination and expression of antioxidant genes in two cultivars of tomato plant. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, **5:** 51-60 (In Persian).

Mohammadabadi, M.R. and Tohidinejad, F. (2017). Charachteristics determination of *Rheb* gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, **7:** 289-295 (In Persian).

Mora-Pale, M., Sanchez-Rodriguez, S.P. and Linhardt, R.J. (2014). Biochemical strategies for enhancing the in vivo production of natural products with pharmaceutical potential. *Current Opinion in Biotechnology*, **25:** 86-94.

Mirzaei, A., Akbartabar, M., Sadeghi, H. and Sharifi, B. (2010). The Antioxidant activities and total phenolic of Artemisia martima, Achillea millefolium and *Matricaria recutica*. *Armaghane Danesh*, **15:** 243-252 (In Persian).

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for groupwise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, **30:** 1-10.

Poorraskari, O., Nabati Ahmadi, D., Mehdikhanlou, K. and Nejhadsadeghi, L. (2020). Investigating the expression of pinene synthase and linalool genes in response to gibberellic acid in yarrow (*Achillea millelium* L.) plant. *Plant Productions*, **43:** 13-24 (In Persian).

Raman, V. and Ravi, S. (2011). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *heamatococcus pluvialis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33:** 1043-1049.

Samadi, S., Ghasemnezhad, A. and Alizadeh, M. (2015). Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. *Journal of Plant Production Research*, **21:** 135-148 (In Persian).

Taheri, E., Shirzadian-Khorramabad, R., Sharifi-Sirchi, G., Sabouri, A. and Abbaszadeh K. (2016). Assessment of genetic diversity of three yarrow's wild masses in Hormozgan province using morphological traits. *Plant Genetic Researches*, **2(2):** 73-82 (In Persian).

Upton, R., Graff, A., Jolliffe, G., Länger, R. and Williamson, E. (2016). *American Herbal Pharmacopoeia: Botanical Pharmacognosy-Microscopic Characterization of Botanical Medicines*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Yakhin, O.I., Lubyanov, A.A., Yakhin, I.A. and Brown, P.H. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. Front. *Plant Science*, **7:** 20-49.

Yamchi, A. (2015). Sequencing and phylogenetic study of alternative oxidase gene (*aox*$_2$) in *Anthemideae* subfamily. *Journal of Plant Production Research*, **22:** 217-229 (In Persian).

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 (In Persian).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]

Studying the Expression Pattern of *aox₂* and *pal₂* Genes Associated with the Production of Antioxidants and Flavonoids in Yarrow Plant Following Salicylic Acid Treatment

Sodabeh Jahanbakhsh Godehkahriz[1,*], Fatemah Jalali Shahko[2] and Seyede Yalda Raeesi Sadati[3]

1- Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- Former M.Sc. Student, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3- Ph.D., Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: October 11, 2022 – Accepted: February 14, 2023)

Abstract

The various medicinal functions of Yarrow have made it an important medicinal plant in medicine. Also, yarrow is a rich source of antioxidants and flavonoids that protect plants from the harmful effects of active oxygen species. The aim of this study was to investigate the effect of salicylic acid treatment on the expression pattern of two genes (*aox₂* and *pal₂*) involved in the production of antioxidants and flavonoids in Yarrow plant. For this purpose, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design including salicylic acid at two levels (0 and 50 mM) as the first factor and sampling time with two levels (24 and 48 hours) as the second factor in the greenhouse of the Faculty of Agriculture. First, the yarrow plant was subjected to hormonal treatment in Johnson's hydroponic environment, and 24 and 48 hours after the treatment, leaf tissue sampling was done. The results of qRT-PCR showed that salicylic acid stimulation significantly decreased the expression of two genes in the path of producing antioxidants in yarrow. The lowest relative expression of studied genes occurred 48 hours after treatment with salicylic acid. In general, the use of salicylic acid triggers molecular processes that result in the plant responding by changing the expression level of genes encoding antioxidants and flavonoids; therefore, it is suggested to use other stimulants such as jasmonic acid to investigate the expression of genes encoding antioxidants and flavonoids in future researches.

Keywords: Yarrow, Relative gene expression, Hormonal induction

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.3.6]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.3]

* **Corresponding Author, E-mail: jahanbakhsh@uma.ac.ir**