

Investigating the Expression of Pinene Synthase and Linalool Genes in Response to Gibberellic Acid in Yarrow (*Achillea millefolium* L.) Plant

Omid Poorraskari¹, Daryoosh Nabati Ahmadi^{2*}, Khosro Mehdikhanlou³ and Leila NejhadSadeghi⁴

- 1- M.Sc. Student of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- 2- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (dnabati@scu.ac.ir)
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 23 September, 2018

Accepted: 6 March, 2019

Abstract

Background and Objectives

Currently, there is an immense attention toward medicinal plant and secondary metabolites. Yarrow (*Achillea millefolium* L.) is a medicinal plant which consists of two important compounds; including pinene and linalool. Since these two compounds have the importance values, the researchers significantly focused on them. The rate of transcript expression of pinene synthesis and Linalool synthesis induced at the end of 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway that caused to produce Pinene and Linalool. In order to evaluate the synthesis of Pinene and Linalool, a research study was carried to examine the exogenous treatment (zero, 25 and 50 mg/l) of gibberellic acid (GA₃) at different times (24, 48 and 74 hr.) on Yarrow at the greenhouse on 1395-1397. The results of R-PCR indicated that significant rate of the transcript expression was related to the Pinene synthesis at 25 mg concentration of GA₃ at the 48 hr after treatment. In the most samples as the rate of the Pinene synthesis increased the rate of Linalool synthesis decreased. The evidences suggested that the exogenous treatment of GA₃ induced a transduction signal in the plant. In which at the end, the plant molecular process respond to it and showed in overall that evaluation of GA₃ implemented different encoding gene expression for these compounds, and illustrated that when the Pinene synthesis increased in the treated plant the Linalool synthesis decreased simultaneously.

Materials and Methods

A greenhouse pot trial was conducted at the Experimental Research Station of College of Agriculture at Shahid Chamran University of Ahvaz. The plants used in this study were provided from the National Center for Genetic and Biological Resources of Iran, with access code P1000093. Two months after seed germination, the desired amounts of gibberellic acid were prepared with distilled water (25 mg/l and 50 mg/l), and then each potted plant was sprayed uniformly with 10cc of prepared solution. Sampling was carried out by collecting the leaves of treated plants at 24, 48 and 72 hours after the treatment. The phenol-chloroform method (Wang and Ghabrial, 2002) was conducted with some modifications to extract RNA of collected



leaves at the two biological replications. Quantity and quality of extracted RNAs were measured using Nanodrop and electrophoresis of %1 agarose gel. Synthesis of cDNA was performed using the Takara cDNA synthetase kit according to its manufacturer's instructions. Partial sequences of pinene synthase and linalool synthase genes were obtained in an early experiment in our laboratory (data is not published). The coding sequence of the target genes in other plants within the same family aligned with our obtained sequences to identify conserved segments for each gene using CLUSTAL W program. The standard housekeeping actin for yarrow with accession number JX679606.1, which is available in the public GenBank database, used to normalize the expression of the genes of interest. The primers of all genes (pinene synthase, linalool synthase and actin) were designed from the conserved sequences by PrimerQuest Tool, and then verified with oligoanalyzer v.3.1. Relative expressions of target genes were determined using real-time PCR with SYBR green fluorescence detection. Relative differences in target gene expression were calculated using REST software.

Results

The acquired result of real-time PCR revealed that in pinene synthase gene, the highest amount of transcription occurred at 48 hours after the treatment with the concentration of 25 mg of gibberellic acid and, interestingly, the lowest expression of the transcript for linalool synthase gene observed at the same level of concentration and time. In most of the samples, with the increase in pinene synthase transcriptase, the amount of linalool synthase transcript decreased.

Discussion

Taking into account the fact that both pinene and linalool are synthesized from the common substrate geranyl diphosphate. Therefore, an increase in the expression one leads to reduction in the transcript expression of the other one in the same pathway. Our results also confirmed that the transcription level of pinene synthase gene has been increasingly altered in response to the applied concentrations of exogenous gibberellic acid, resulting in a reduction in the expression of linalool synthase gene. Evidence suggests that the application of gibberellic acid triggers a cascade of molecular events which ultimately constitutes the plant response to the elicitor.

Keywords: Coding genes, Real time-PCR, Time, Transcript rate

بررسی بیان ژن‌های پینن سنتاز و لینالول سنتاز در پاسخ به تیمار جیبرلیک اسید در گیاه بومادران (*Achillea millefolium* L.)

امید پورعسکری^۱، داریوش نباتی احمدی^{۲*}، خسرو مهدیخانلو^۳ و لیلیا نژادصادق^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- *نویسنده مسئول: دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (dnabati@scu.ac.ir)

۳- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵

چکیده

اخیراً توجه روزافزونی به گیاهان دارویی و متابولیت‌های ثانویه می‌شود. بومادران (*Achillea millefolium* L.) یک گیاه دارویی است که دارای ترکیبات مهمی از جمله پینن و لینالول می‌باشد. این دو ترکیب به سبب اهمیت بالایی که دارند، زمینه‌ساز توجه محققان به خود شدند. در این تحقیق میزان بیان رونوشت دو ژن کدکننده پینن سینتاز و لینالول سینتاز را که در انتهای مسیر مونوترپنی MEP قرار دارند و سبب تولید پینن و لینالول می‌شوند، با اعمال برون‌زاد تیمار جیبرلیک اسید (GA_3) با سه سطح غلظتی (صفر، ۲۵، ۵۰ میلی‌گرم) در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار)، سال ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در گلخانه دانشکده کشاورزی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج واکنش زنجیره پلیمرز در زمان واقعی نشان داد که بیشترین میزان رونوشت در اعمال تیمار جیبرلیک اسید با غلظت ۲۵ میلی‌گرم و زمان نمونه‌برداری ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار، مربوط به ژن پینن سینتاز بود. در بیشتر نمونه‌ها، با افزایش میزان رونوشت پینن سینتاز، میزان رونوشت لینالول سینتاز کاهش می‌یافت. شواهد حاکی از آن است که، کاربرد برون‌زاد جیبرلیک اسید، باعث ایجاد فرآیند مولکولی شده که منتج به پاسخ‌دهی گیاه با تغییر بیان ژن‌های کدکننده پینن سنتاز و لینالول سینتاز می‌شود.

کلیدواژه‌ها: زمان، ژن‌های کدکننده، میزان رونوشت، واکنش زنجیره پلیمرز در زمان واقعی

مقدمه

بومادران هزار برگ با نام علمی *Achillea millefolium* که معمولاً به‌عنوان yarrow شناخته شده است یک گیاه علفی، چندساله و متعلق به خانواده گل ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) می‌باشد (Paulsen, 2002). کارکردهای دارویی مختلف بومادران مانند درمان زخم‌ها و فعالیت‌های ضدالتهابی و ضداسپاسم، آن را به‌عنوان یک گیاه مهم دارویی مطرح ساخته است (Benedek and

Kopp, 2007). اسانس گونه *Achillea millefolium* دارای ترکیب‌های متنوعی است که ترکیبات عمده اسانس آن مونوترپن و سسکوئین ترپن (Sesquiterpene) می‌باشند (Rahimmalek et al., 2009; Ghani and Azizi, 2010).

ترپنوئیدها، یا ترپن‌ها، یکی از مهم‌ترین گروه‌های ترکیبات ثانویه در گیاهان با اندازه مولکولی مختلف و تنوع ساختاری بسیار بالا بزرگ‌ترین گروه متابولیت

تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه نه تنها توسط ژنتیک گیاهی بلکه توسط شرایط محیطی و مولکول‌های پیام‌رسان نیز کنترل می‌شود. (Kim et al., 2006). از طرفی دیگر مواجهه گیاهان با انواع تنش‌های محیطی و الیستورهای (Elicitors) مختلف یا مولکول‌های پیام‌رسان نظیر هورمون‌های گیاهی می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی مؤثر جهت تقویت عملکرد متابولیت‌های دارویی بکار رود (Dixon and Paiva, 1995; Javedan Asl et al., 2015b). یکی از این الیستورها، جیبرلیک اسید می‌باشد. جیبرلیک اسید یک هورمون مهم گیاهان آوندی، قارچ‌ها و باکتری‌ها است که حاوی بیش از ۱۲۵ ترکیب با ساختار مشابه می‌باشد. اسید جیبرلیک فعالیت‌های متنوعی در گیاهان را تنظیم کرده و به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاهی، یکی از ترکیبات بسیار مهم ترپنوئیدی در گیاهان شناخته می‌شود (Schmiderer et al., 2010).

یکی از مراحل مهم زیست‌شناسی مولکولی مدرن، مطالعات الگوی بیان ژن می‌باشد. درک الگوی بیان ژن‌ها، یک ابزار مفید برای شناخت فرآیندهای بیولوژیکی پیچیده مسیرهای متابولیکی و سیگنال‌ها و مطالعه شبکه‌های تنظیمی پیچیده‌ای است که در موجودات زنده رخ می‌دهد، می‌باشد (Nicot et al., 2005). توانایی کمی سنجی سطوح رونویسی یک ژن خاص همیشه محور بسیاری از تحقیقات در رابطه با عمل ژن بوده است (Bustin, 2000). یکی از روش‌هایی که برای کمیت سنجی رونوشت ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد Real time-PCR است. ارزیابی سطوح بیان ژن، به یک عنصر مهم در بسیاری از آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی مولکولی تبدیل شده است (Schmittgen and Livak, 2008). مطالعات استرس گیاهی بیشتر و بیشتر بر اساس بیان ژن است. تجزیه و تحلیل بیان ژن نیازمند اندازه‌گیری‌های حساس، دقیق و قابل تکرار برای توالی‌های mRNA هدف است (Mehdi Khanlou and Van Bockstaele, 2012). برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها با PCR در زمان واقعی، نیاز است بیان ژن‌ها نسبت به ژن‌های

ثانویه گیاهی با بیش از ۶۰/۰۰۰ ترکیب است (Bohlmann and Keeling, 2008). با وجود این که ایزوپرنوئیدها ساختار و عملکرد متفاوتی دارند همه آن‌ها از دو واحد پنج کربن مشتق شده از دو مسیر بیوستتزی پلاستیدی MEP و مسیر بیوستتزی سیتوزولی MVA منشأ می‌گیرند. در مسیر MEP ۸ آنزیم به‌صورت متوالی دخیل هستند تا دو پیش ماده IDP و DMADP که بنای اصلی ترکیبات ایزوپرنوئید هستند را تولید کنند (Cordoba et al., 2009, Aharoni et al., 2005).

مونوترپن‌ها دارای چندین ساختار متفاوت می‌باشند که عبارت‌اند از مونوترپنوئیدهای غیر حلقوی مانند لینالول و میرسن، تک حلقوی مثل دی-لیمونن و دو حلقه‌ای مثل آلفا و بتا پینن. آلفاپینن یک محصول مهم طبیعی است که به‌طور گسترده‌ای در طعم‌دهنده‌ها، عطرها، داروها، مواد شیمیایی خوب و سوخت‌های قابل احتراق با تراکم بالا استفاده می‌شود. پینن با فرمول $C_{10}H_{16}$ و وزن مولکولی ۱۳۶/۲۳۶ یک ترکیب شیمیایی مونوترپن دو حلقه‌ای معطر از طبقه ترپن است که دارای دو ایزومر ساختاری در طبیعت به نام‌های آلفاپینن و بتاپینن می‌باشد (Liu et al., 2013). ژن پینن سنتاز، کدکننده آنزیمی است که تبدیل ژرانیل دی فسفات، پیش‌ساز عمومی مونوترپن‌ها، به پینن و دی فسفات را کاتالیز می‌کند و یکی از فراوان‌ترین مواد مؤثره بومادران پینن است (Bohlmann et al., 1997).

برخی ترپن‌ها مانند لینالول از اتصال گروه هیدروکسیل به هیدروکربن به وجود می‌آیند (Dudareva et al., 2004). لینالول در مسیر بیوستتزی ایزوپرنوئیدها توسط آنزیم مونوترپن سینتاز و از ماده ژرانیل دی فسفات تولید می‌شود (Baydar and Baydar, 2005). لینالول یک الکل مونوترپن طبیعی غیر حلقوی با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{18}O$ و وزن مولکولی ۱۵۴/۲۴ است. لینالول که از ترکیبات روغن اساسی بیشتر زیرگونه‌های بومادران (*A. millefolium*) می‌باشد، قادر است مانع رشد بیش از ۱۷ نوع باکتری و ۱۰ نوع قارچ شود (Aharoni et al., 2005).

خانه‌دار (Housekeeping genes) که در تمام بافت‌ها و تمام مراحل فیزیولوژیکی یک ارگانیسم به صورت یکسان بیان می‌شوند، نرمال (Nicot et al., 2005). در این روش برای پیدا کردن مقدار رونوشت ژن موردنظر، از نسبت میزان رونویسی RNA هدف به میزان رونویسی RNA یک ژن مرجع داخلی استفاده می‌شود، سپس مقدار نسبی به‌دست آمده از رابطه $\Delta\Delta CT$ توسط رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001) به صورت مقادیر مطلق تبدیل می‌شود.

تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییرات بیان ژن پینن سینتاز و لینالول سینتاز در بیوسنتز پینن و لینالول در بافت برگ گیاه بومادران در پاسخ به غلظت‌های متفاوتی از جیبرلیک اسید در دوره‌های زمانی متفاوت صورت گرفت. هدف دیگر تعیین زمان به حداکثر رسیدن میزان رونوشت ژن‌های هدف پس از اعمال تیمار جیبرلیک اسید در گیاه بومادران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار

این آزمایش تحت شرایط نوری طبیعی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه چمران اهواز، خوزستان، ایران، صورت گرفت. گیاهچه‌های بومادران مورد استفاده در این تحقیق از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با کد دسترسی (Accession No: P1000093) تهیه گردید. آبیاری گیاهان هر دو روز یک‌بار صورت گرفت. پس از رشد گیاهان در شرایط گلخانه و باگذشت ۲ ماه از کشت آن‌ها، در مرحله رشد رویشی تیمار اعمال گردید.

جهت تهیه سطوح مختلف هورمون جیبرلیک اسید ساخت شرکت سیگما آلدریج، $GA_0 = 0\text{mg/L}$ ، $GA_1 = 25\text{mg/L}$ ، $GA_2 = 50\text{mg/L}$ پودر GA_3 توزین و در ۱ لیتر آب دو بار تقطیر شده به‌عنوان حلال، حل شده و جهت اعمال تیمار به هر گلدان (۱۸ گلدان) به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به اندام هوایی به صورت یکنواخت و هر کدام با دو تکرار در ساعت ۹ صبح محلول‌پاشی شدند. عمل اسپری گیاهان کنترل نیز فقط با آب دو بار تقطیر صورت پذیرفت. در زمان‌های

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از اندام برگ گیاهچه‌های تحت تیمار و نرمال در دو تکرار بیولوژیک به صورت تازه با روش فنل-کلروفرم (Wang and Ghabrial (2002) با تغییرات اعمال شده، صورت پذیرفت (Pooraskari et al., 2018). جهت تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراجی از دو روش الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد و نانودراپ استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA synthetase شرکت تاکارا توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس PrimeScript™ RTase (Reverse Transcriptase) و پرایمر Oligo-dT در حجم ۱۰ میکرو لیتر و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد.

طراحی آغازگر و انجام PCR

اطلاعات توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به mRNA ژن اکتین و ژن‌های پینن سینتاز و لینالول سینتاز (Javedan Asl et al., 2015a) گیاه بومادران و سایر گیاهان هم‌خانواده که قبلاً شناسایی و در بانک داده‌های توالی‌های ژنی (National Center of Biotechnology Information) ثبت شده‌اند، جمع‌آوری و دسته‌بندی شدند. سپس توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در سایر گیاهان از خانواده‌های نزدیک برای هر ژن به‌طور جداگانه با استفاده از برنامه Clustal W نرم‌افزار Mega7 هم‌ردیف شدند تا بخش‌های حفاظت‌شده (Conserved sequences) تعیین شوند. طراحی جفت پرایمر ژن‌های PINs, LINs از توالی‌های جداسازی شده توسط (2015b) Javedan Asl et al. و ACTIN به‌عنوان ژن مرجع با کد دسترسی (JX679606.1) توسط نرم‌افزار آنالیز Primer Quest صورت پذیرفت (جدول ۱).

Table 1. Sequence of forwards and reverse primers used in qRT-PCR reaction

نوع ژن	آغازگر	توالی آغازگرها (5'-3')	دمای اتصال آغازگرها (°C)	طول قطعه تکثیر شده (bp)
Actin	F	TGGAATGGAAGCTGCTGGTA	58	183
	R	TTGATCTTCATGCTGCTCGG	58	
Penene	F	CAAGGTGGTGGAAGAAAC	55.5	181
	R	GTACCATACACATCATAAACATC	54.5	
Linalol	F	ATATCAGGACCCGTAGCACTTATG	60.9	139
	R	CCAAGTCATCAGTAAGTCGGAAG	59.7	

نرم‌افزار REST® (Relative Expression Software Tool) تهیه شده توسط Pfaffl et al. (2002) محاسبه گردید (Schmittgen and Livak, 2008) آزمون معنی داری مقایسه میانگین بین دو گروه در این نرم‌افزار به کمک محاسبه P-value از روش جایگشتی (Permutation or randomization tests) انجام گرفت. در این روش هیچ گونه فرضی در خصوص نحوه توزیع داده‌ها در نظر نمی‌گیرد. این ویژگی یک مزیت نسبت به آزمون‌های پارامتریک نظیر t تست و ANOVA می‌باشد (Pfaffl et al., 2002).

نتایج و بحث

به دلیل اهمیت و حساسیت واکنش PCR در زمان واقعی، برای اطمینان از کیفیت خوب RNA استخراجی از بافت برگ بومادران با روش فنل-کلروفرم تغییر یافته با بارگذاری بر روی ژل آگاروز ۱ درصد کیفیت‌یابی شدند که طبق نتایج، وجود باندهای مجزای ۲۸s و ۱۸s ریبوزومی در نمونه‌ها به وضوح و بدون تخریب و سالم نشان داده شده‌اند (شکل ۱).

غلظت اندازه‌گیری شده RNA استخراجی و cDNA سنتز شده به وسیله نانودراپ به ترتیب ۱۰۰-۳۰۰ و ۱۱۰۰-۱۸۰۰ ng/μl بوده است. برای اطمینان از کارکرد اختصاصی آغازگرهای طراحی شده و تعیین بهترین دمای اتصال این آغازگرها به رشته الگو، از PCR با شیب دمایی استفاده شد و مناسب‌ترین دما برای حداکثر کارایی آغازگرهای طراحی شده تعیین شد. بهترین دمای اتصال پرایمر برای ژن‌های لینالول سینتاز، پینن سینتاز و اکتین به ترتیب ۵۸، ۵۵ و ۵۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (شکل ۲).

به منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای طراحی شده واکنش PCR انجام شده و در صورت تأیید تکثیر ژن مورد نظر با استفاده از آغازگرهای طراحی شده به منظور مقایسه بیان ژن پینن سینتاز و لینالول سنتاز در شرایط کنترل و تیمار از PCR در زمان واقعی (Real time PCR) استفاده شد، لذا جهت حصول اطمینان از سنتز صحیح و کامل cDNA و همچنین اطمینان از طراحی صحیح پرایمرها و نیز پیدا کردن بهترین دمای اتصال هر پرایمر به cDNA سنتز شده، یک برنامه تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر پیش از انجام واکنش PCR در زمان واقعی برای هر جفت پرایمر در نظر گرفته شد و نتایج بر روی ژل ۱ درصد با استفاده از الکتروفورز بررسی گردید.

واکنش‌های PCR در زمان واقعی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (qRT-PCR) با استفاده از فناوری رنگ SYBR Green I محصول شرکت تاکارا و توسط دستگاه StepOne Real-Time PCR System شرکت ABI (Applied Biosystems، آمریکا) با شرایط دمایی ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه در ادامه ۴۵ سیکل ۹۵ سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۵۵ سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه انجام شد. واکنش Real Time PCR در حجم ۱۰ میکرو لیتر و در دو ۲ تکرار تکنیکال برای هر تکرار بیولوژیک، انجام شد. برای آنالیز داده‌های به دست آمده از روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد که ابتدا چرخه آستانه برای نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع، نرمال‌سازی (Normalization) شد و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده از

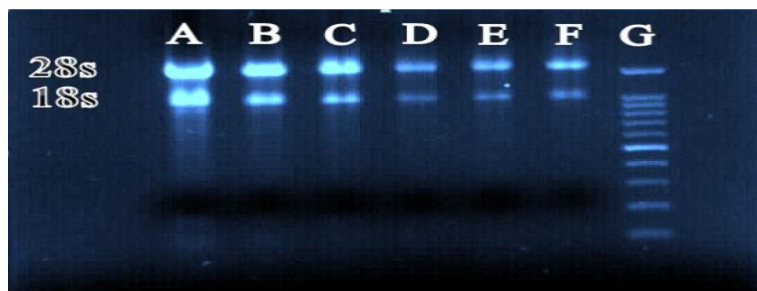


Figure 1. The results of the PCR-based amplification

(A) The results of the PCR reaction with the temperature gradient of the synthetic pinene gene.
 (B) PCR reaction for linalool synthase genes (bp139), pinene synthase (bp181) and actin (bp183)

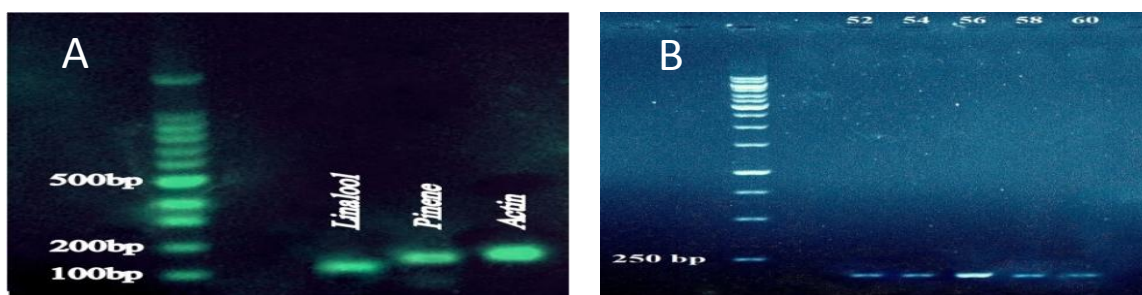


Figure 2. The results of the PCR-based amplification. (A) The results of the PCR reaction with the temperature gradient of the synthetic pinene gene. (B) PCR reaction for linalool synthase genes (bp139), pinene synthase (bp181) and actin (bp183)

تیمار کاهش بیان غیرمعنی دار $1/32$ - برای نسبت به شاهد در خصوص ژن مذکور مشاهده گردید (شکل ۳). با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی بیان ژن‌های مذکور در خصوص اعمال تیمار 50 میلی گرم با الیستور GA_3 ، رونوشت ژن پین سینتاز پس از گذشت 24 ساعت پس از اعمال تیمار با توجه به این که $1/89$ برابر افزایش داشته ولی افزایش از نظر آماری معنی دار نبوده که در ادامه با گذشت 48 ساعت میزان بیان کاهش غیرمعنی داری داشته است. روند نزولی این ژن در 72 ساعت به حداکثر خود می‌رسد و به میزان $1/505$ - برابر کاهش بیان داشته است. در خصوص ژن لینالول سینتاز شرایط به گونه مشابه با وضعیت بیان پین سینتاز می‌باشد به طوری که میزان رونوشت این ژن در اعمال تیمار 50 میلی گرم هورمون GA_3 در 24 ساعت پس از اعمال تیمار به میزان $1/669$ افزایش بیان غیرمعنی دار داشته، در 48 ساعت بعد از اعمال تیمار میزان رونوشت لینالول با کاهش بیان مواجه گردید که این روند نزولی در 72 ساعت به حداکثر میزان خود $1/5$ - برابر رسیده است (شکل ۴).

با توجه به اثرات محرکی برخی الیستورها در بیوسنتز ترپنوئیدها، نقش این مولکول‌های پیام‌رسان در افزایش القاء سطح رونوشت ژن‌های مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. الگوی تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه تحت الیستور GA_3 در ژن‌های مذکور متفاوت بوده است. سطح رونوشت ژن‌ها در گیاهان تحت تیمار GA_3 به میزان جزئی نوسان داشت. در طول بازه زمانی تیمار با 25 میلی گرم GA_3 فراوانی نسخه‌های ژن *pinene synthase* که با تبدیل ژرانیل دی فسفات، پیش‌ساز عمومی مونوترپن‌ها، به پینن و دی فسفات باعث تشکیل پینن می‌شود (Bohlmann et al., 1997)، در طی 24 ساعت پس از اعمال تیمار افزایش بیان به میزان $1/8$ برابر نسبت به گیاه متناظر شاهد داشته ولی این افزایش بیان به صورت معنی دار نبوده است. در صورتی که سطوح رونوشت این ژن پس از گذشت 48 ساعت از اعمال تیمار، افزایش بیان قابل توجهی به میزان $2/748$ برابر نسبت به شاهد داشته و به حداکثر میزان خود رسیده است. این در حالی است که پس از گذشت 72 ساعت پس از اعمال

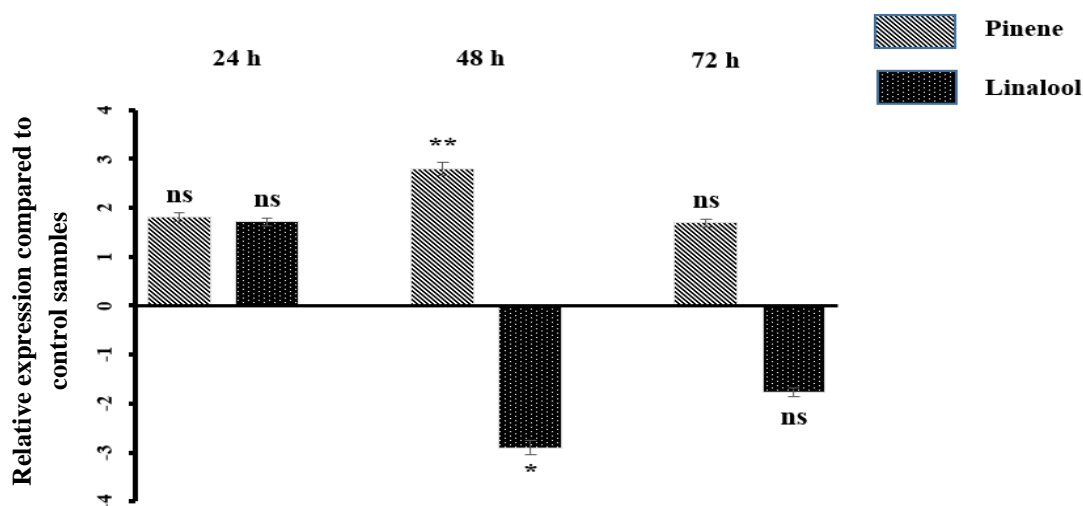


Figure 3. The effect of time in the concentration of 25 milligrams of Elicitor gibberellic acid on the relative transcription of pinene syntase genes and linalool synthase. The symptoms of **, *, and ns, respectively, indicate significant levels of 1%, 5% and non-significant

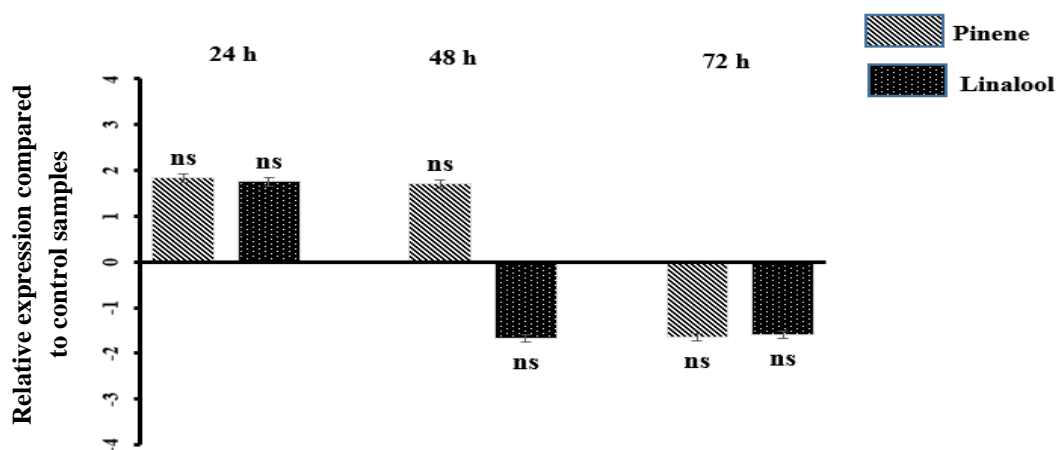


Figure 4. The effect of time in the concentration of 50 milligrams of Elicitor gibberellic acid on the relative transcription of pinene syntase genes and linalool synthase. The symptoms of **, *, and ns, respectively, indicate significant levels of 1%, 5% and non-significant

غلظت GA₃ در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار سبب افزایش بیان میزان پین سنتاز و کاهش بیان لینالول سنتاز گردید. طبق نتایج به دست آمده بیشترین میزان تغییرات سطوح رونوشت ژن‌های مورد بررسی در غلظت ۲۵ میلی گرم و در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار می باشد. ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار GA₃ در غلظت‌های مختلف نشان داده اند که پاسخ دو ژن مذکور معنی دار نگردیده است و زمان مورد نظر جهت بررسی‌ها و مطالعات بعدی مناسب به نظر نمی رسد (شکل‌های ۳ و ۴).

مشاهده می شود که سطوح رونوشت ژن پین سنتاز نسبت به لینالول سنتاز در هر دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی گرم پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال تیمار GA₃ افزایش گردید. سطوح رونوشت ژن پین سنتاز در غلظت ۲۵ میلی گرم پس از گذشت ۴۸ ساعت در پاسخ به تیمار GA₃ تقریباً ۵ برابر نسبت به ژن لینالول سنتاز افزایش بیان داشته که در سطح یک درصد معنی دار بوده در صورتی که میزان رونوشت لینالول سنتاز به صورت کاهشی بوده که در سطح پنج درصد معنی دار نگردیده است در صورتی که هر دو

هم‌زمان با کاربرد برون‌زاد متیل جاسمونات در گیاه *Artemisia annua*، سطح بیان ژن‌های مربوط به دو فاکتور رونویسی خانواده AP2 به شدت افزایش یافت که متعاقب آن، افزایش سطح رونوشت ژن‌های مسیر بیوسنتزی آرتمیزینین و افزایش میزان این ترکیب را به دنبال داشت (Yu et al., 2012). سطح رونوشت ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی منتول تحت تیمار GA_3 به میزان جزئی نوسان داشته است به گونه‌ای که میزان بیان ژن‌های موجود در اوایل مسیر بیوسنتزی منتول بعد از تیمار GA_3 تغییر چندانی حاصل نکرده و فقط ژن‌های درگیر در اواخر این مسیر مانند *m-deh* و *neo-red* کاهش بیان معنی‌داری نسبت به ژن‌های متناظرشان در گیاهان شاهد نشان داده‌اند (Soleymani et al., 2017).

Deschamps and Simon (2006) نیز نشان داده بودند که بالاترین سطح تولید ترپنوئیدها در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) تحت تیمار با متیل جاسمونات در طولانی‌ترین دوره زمانی بعد از آغاز تیمار (۱۹۲ ساعت) به دست آمده است در صورتی که در مطالعه حاضر، بالاترین سطح پینن ترپنوئیدی در گیاه بومادران تحت تیمار GA_3 در غلظت ۲۵ میلی‌گرم و زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار مشاهده گردید. در خصوص تحلیل اثر کاربرد برون‌زاد GA_3 و دامینوزید بر روی بیان ترپن سینتازها و منوترپن‌ها در گیاه مریم‌گلی شواهد نشان داد که محتوای اسانس با افزایش سطوح جیبرلین، افزایش می‌یابد و ترکیباتی دو حلقه‌ای همانند ۸،۱-سینئول (1,8-cineol) و کامفور (camphor) افزایش یافتند در صورتی که دامینوزید سبب توقف انباشت آلفا و بتا توچن (Thujene) گردید و GA_3 در بالاترین سطح نیز باعث کاهش قابل توجهی آلفا و بتا توچن شد. کاربرد GA_3 باعث افزایش بیان ژن‌های منوترپن سینتاز گردید که این نتیجه با نتایج این مطالعه در خصوص بیان ژن پینن سینتاز هم‌خوانی دارد در صورتی که دامینوزید سبب کاهش معنی‌دار بیان این ژن‌ها گردید. میزان دو محصول نهایی ۸،۱-سینئول و کامفور همبستگی مستقیم با سطوح بیان ژن‌های مونوترپن سینتازهای مربوطه داشت (Schmiderer et al., 2010).

مشاهده می‌شود که سطوح رونوشت ژن پینن سینتاز نسبت به لینالول سینتاز در خصوص کاربرد برون‌زاد GA_3 به ترتیب افزایش و کاهش بیان نشان دادند (شکل ۵).

تأثیر الیستورها در تغییرات بیان ژن‌های یک مسیر بیوسنتزی خاص علاوه بر نوع الیستور، به غلظت آن و همچنین مرحله رشدی گیاه که آن تیمار خاص بکار می‌رود بستگی دارد در مطالعه‌ای بیان ژن‌های *ls* و *mfs* در گیاه نعناع فلفلی (مرحله قبل از گلدهی) در اثر تیمار با ۵۰۰ میکرومول متیل جاسمونات، در ساعات اولیه بعد از تیمار تحت تأثیر قرار گرفت به طوری که در ۸ و ۱۲ ساعت بعد از اعمال تیمار به ترتیب مقدار رونوشت ژن‌های *ls* و *mfs* در مقایسه با گیاهان شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (Afkar et al., 2013). در صورتی که با اعمال ۳۰۰ میکرومول متیل جاسمونات، میزان بیان این دو ژن در ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار در گیاه نعناع فلفلی افزایش پیدا کرد (Soleymani and Taheri, 2017). همچنین گزارش شده است که تیمار متیل جاسمونات در گیاه شیرین بیان اسپانیایی (*Glycyrrhiza glabra*) باعث افزایش میزان رونوشت ژن *sgs* (Squalene synthase) شده است (Hayashi et al., 2003). در گیاه یونجه گل زرد (*M. truncatula*) بیشترین بیان ژن‌های فنیل پروپانوئید ۲ ساعت بعد از اعمال متیل جاسمونات در غلظت پایین (۵/۰ الی ۵ میکرومول) صورت گرفت در حالی که میزان رونوشت ژن‌های مسیر بیوسنتزی تری‌ترین‌ها در این گیاه در ۱۲ الی ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار غلظت بالایی از متیل جاسمونات (۵ الی ۵۰۰ میکرولیتر) در مقایسه با گیاهان شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (Suzuki et al., 2005). به منظور بررسی تأثیر متیل جاسمونات در دو سطح غلظتی به عنوان محرک بر میزان بیان ژن‌های مؤثر در تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در گیاه ریحان مطالعاتی صورت گرفت که نتایج بیانگر افزایش بیان ژن CVOMT در غلظت ۵/۰ میلی‌مولار و زمان ۴۸ ساعت بعد از محلول‌پاشی حاصل شد (Hassani et al., 2016). مطالعاتی نیز در راستای شناسایی فاکتورهای رونویسی درگیر در مسیر بیوسنتزی آرتمیزینین (Artemisinin) صورت گرفته است.

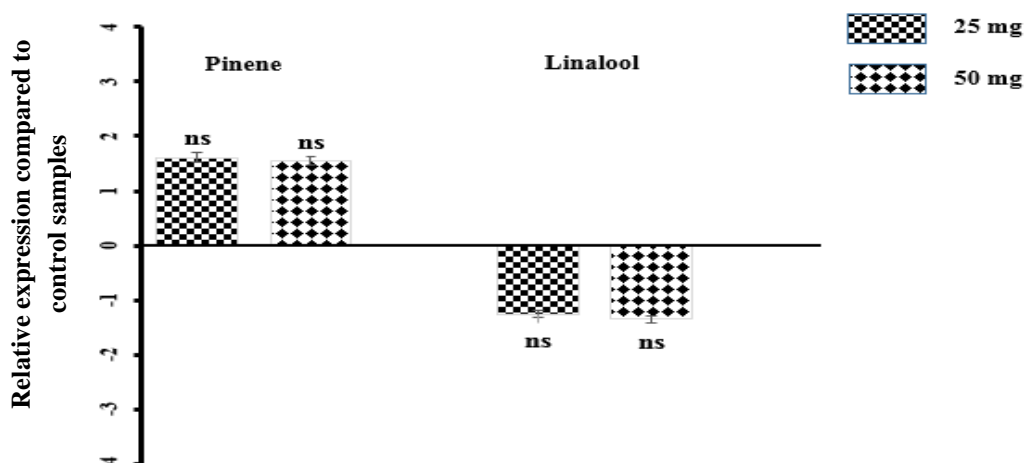


Figure 5. The Effect of Concentrations of 25 and 50 mg Elicitor Gibrallac Acid on the Relative Transcription of Pinene Synthase and Linalool Synthase Genes. The symptoms of **, *, and ns, respectively, indicate significant levels of 1%, 5% and non-significant

رونوشت ژن پینین سنتاز در پاسخ به غلظت‌های به کار برده شده برون‌زاد هورمون جیبرلیک اسید افزایش بیان داشته است که در مقابل میزان بیان ژن لینالول سنتاز در پاسخ به این غلظت‌ها کاهش بیان را نشان داده است.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مقاله از گروه مهندسی تولید و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل مساعدت و فراهم‌سازی امکانات این تحقیق، قدردانی می‌نمایند.

نتیجه‌گیری

تیمار GA_3 به افزایش سطح بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی جیبرلین و به تبع آن افزایش احتمالی میزان جیبرلین داخل سلول منتهی می‌شود می‌تواند سهم مهمی در فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی در گیر در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه داشته باشد با توجه به این که هر دو ماده پینین و لینالول از ژرانیل دی فسفات به عنوان سوبسترا، سنتز می‌شوند لذا می‌توان گفت افزایش بیان در یک ژن سبب کاهش بیان رونوشت سایر ژن‌های متناوب در همان مسیر می‌شود. بررسی‌های به عمل آمده نمایانگر این است که سطوح

References

- Afkar, S. Karimzadeh, Gh. Jalali, M. Sharifi, M. and Behmanesh, M. (2013). Influence of methyljasmonate on menthol production and gene expression in peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Journal of Medicinal Plants and By-Products*, 2(1), 75-82.
- Aharoni, A., Jongsma, M. A. and Bouwmeester, H. J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*, 10(12), 594-602.
- Baydar, H. and Baydar, N. G. (2005). The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascene* Mill). *Industrial Crops and Products*, 21(2), 251-255.
- Benedek, B. and Kopp, B. (2007). *Achillea millefolium* L. revisited: Recent findings confirm the traditional use. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(13-14), 312-314.
- Bohlmann, J. and Keeling, C. I. (2008). Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal*, 54(4), 656-669.
- Bohlmann, J., Steele, C. L. and Croteau, R. (1997). Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene

- synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(35), 21784-21792.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193.
- Cordoba, E., Salmi, M. and Leo, P. (2009). Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 60(10), 2933-2943.
- Deschamps, C. and Simon, J. E. (2006). Terpenoid essential oil metabolism in basil (*Ocimum basilicum* L.) following elicitation. *Essential Oil Research*, 18, 618-621.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenyl propanoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1085-1097.
- Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135(4), 1893-1902.
- Ghani, A. and M. Azizi. (2010). The effect of different drying methods on quantity and quality characteristics of five yarrow species (achillea). *Plant Productions*, 32(1) 1-11. [In Farsi]
- Hassani, L., Abdollahi Mandoulakani, B., Darvishzadeh, R. and Hassani, A. (2016). Increasing the expression of genes chavicol o-methyl transferase and cinnamate 4-hydroxylase under methyl jasmonate treatment in medicinal plant basil (*Ocimum basilicum* L.). *Scientific Journal of Agriculture*, 39(3) 101-112.
- Hayashi, H., Huang, P. and Inoue, K. (2003). Up-regulation of soyasponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell Physiology*, 44(4), 404-411.
- Javedan Asl, M., Rajabi Memari, H., Nabati Ahmadi, D. and Rahnama, A. (2015a). Comparison the different methods of genomic RNA extraction from the medicinal plant of yarrow (*Achillea millefolium*). *Plant Productions*, 39(2), 105-114. [In Farsi]
- Javedan Asl, M., Rajabi Memari, H., Nabati Ahmadi, D. and Rahnama Ghahfarokhi, A. (2015b). Isolation of linalool synthase and pinene synthase genes from yarrow (*Achillea millefolium* L.) medicinal plant. *Plant Genetic Report*, 2(1), 23-349. [In Farsi]
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X. and Rajapakse, N. C. (2006). Effect of methyl jasmonate on secondary metabolite of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2327-2332.
- Liu, S., Zhou, L., Yu, S., Xie, C., Liu, F. and Song, Z. (2013). Polymerization of α -pinene using Lewis acidic ionic liquid as catalyst for production of terpene resin. *Biomass and Bioenergy*, 57, 238-242.
- Mehdi Khanlou, K. and Van Bockstaele, E. (2012). A critique of widely used normalization software tools and an alternative method to identify reliable reference genes in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Planta*, 236(5), 1381-1393.
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L. and Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2907-2914.
- Paulsen, E. (2002). Contact sensitization from Compositae-containing herbal remedies and cosmetics. *Contact Dermatitis*, 47(4), 189-198.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 1-6.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 1-10.
- Pooraskari, O., Nabati Ahmadi, D., Mehdi Khanlou, K. and NejadSadeghi, L. (2018). *The comparison of*

conventional phenol-chloroform method for extracting RNA with modified method in Achillea millefolium L. 15th National Iranian Crop Science Congress, Karaj, Iran. [In Farsi]

- Rahimmalek, M., Tabatabaei, B. E. S., Etemadi, N., Goli, S. A. H., Arzani, A. and Zeinali, H. (2009). Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3), 348-355.
- Schmiderer, C., Grausgruber-Groger, S., Grassi, P., Steinborn, R. and Novak, J. (2010). Influence of gibberellin and daminozide on the expression of terpene synthases and on monoterpenes in common sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Plant Physiology*, 167(10), 779-786.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Soleymani, F. and Taheri, H., (2017). Relative expression of genes of menthol biosynthesis pathway in peppermint (*Mentha piperita* L.) after chitosan, gibberellic acid and methyl jasmonate treatments. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(1), 59-66.
- Suzuki, H., Srinivasa Reddy, M. S., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G. D., Huhman, D. V., Sumner, L. W., Blount, J. W., Mendes, P. and Dion, R. A. (2005). Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic reprogramming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 220(5), 696-707.
- Wang, R. Y. and Ghabrial, S. A. (2002). Effect of aphid behavior on efficiency of transmission of Soybean mosaic virus by the soybean-colonizing aphid, *Aphis glycines*. *Plant Disease*, 86(11), 1260-1264.
- Yu, Z. X., Li, J. X., Yang, C. Q., Hu, W. L., Wang, L. J. and Chen, X. Y. (2012). The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Molecular Plant*, 5(2), 353-365.