Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**
Vol. 4, No. 2, Autumn & Winter 2023, p. 291-306 **جلد ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲، صفحه ۳۰۶-۲۹۱**
مقاله پژوهشی
DOI : 10.22034/PLANT.2024.141075.1091

بیان ژن‌های پلی کتاید سنتاز در گیاه دارویی گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) تحت تاثیر متیل جاسمونات

اسعد معروفی[۱]، بتول رحیمی[۲]، محمد مجدی [۱]

۱. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۲

چکیده

گل راعی یک گیاه دارویی است که به دلیل خواص ضد افسردگی خود معروف است. هایپریسین و هیپرفورین دو ترکیب فعال از متابولیت‌های ثانویه گل راعی هستند که دارای بیشترین ارزش دارویی می باشند. با توجه به اهمیت این ترکیبات در گل راعی، نیاز به افزایش تولید آنها با استفاده از فناوری های زیستی احساس می شود. برای این منظور و بعنوان مطالعات مقدماتی بیان دو ژن کلیدی پلی‌کتاید سنتاز شامل *HpPKS2* و *HpPKS1* در مسیر بیوسنتزی هایپریسین مطالعه شد. الیسیتور متیل‌جاسمونات به عنوان القاگر بیان ژن در غلظت‌های صفر، ۱۰ و ۱۰۰میکرومولار در مرحله قبل از گلدهی مورد استفاده قرار گرفت. پس از اعمال تیمار، نمونه برداری از برگ و ساقه گیاهان در زمان‌های صفر، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. میزان بیان ژن ها با روش RT-PCR نیمه کمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو ژن در اثر اعمال متیل جاسمونات در بافت‌های برگ و ساقه افزایش بیان داشتند و در غلظت‌های ۱۰ و به ویژه ۱۰۰ میکرومولار اختلاف با شاهد معنی دار بود. همچنین میزان بیان هر دو ژن *HpPKS2* و *HpPKS1* در سری زمانی صفر، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اسپری متیل جاسمونات درهر دو بافت روندی صعودی را نشان داد و در ۴۸ ساعت عموما بیشترین افزایش بیان مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو ژن کلیدی پلی‌کتاید سنتاز تحت تاثیر متیل‌جاسمونات القا و منجر به بیان بیشتر آنها می‌شود.

کلید واژگان: القاگر، بیان ژن، گل راعی، مسیر بیوسنتز، هایپریسین

*ایمیل نویسنده مسئول: a.maroufi@uok.ac.ir

مقدمه

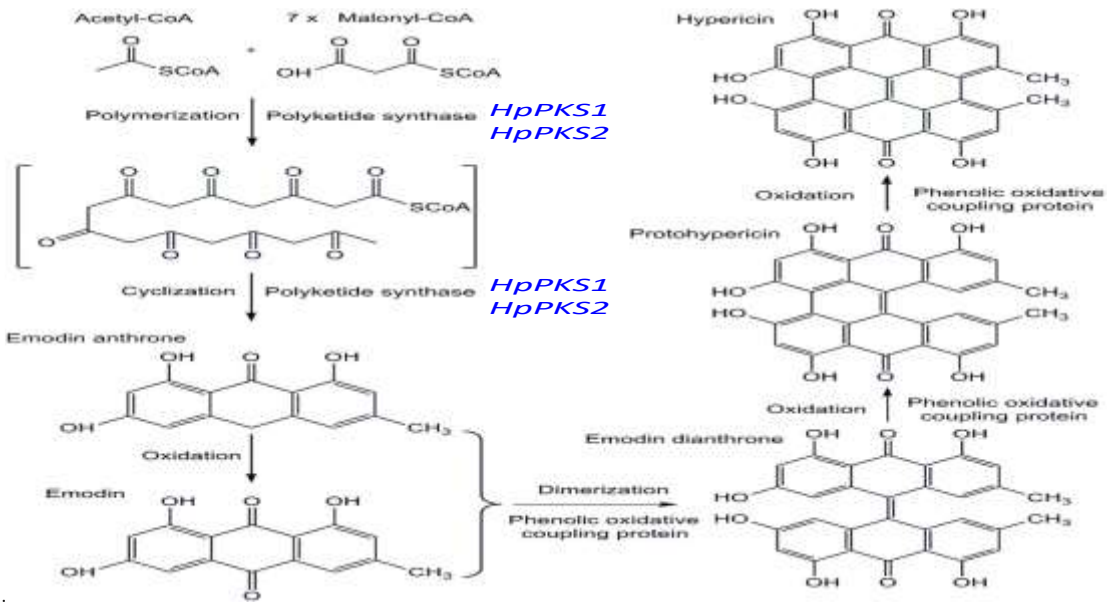
از سال‌های بسیار دور، بشر به استفاده از گیاهان برای حفظ سلامتی خویش وابسته بوده است. همچنین به دلیل وجود عوارض جانبی داروهای شیمیایی توجه روز افزون به گیاهان دارویی به دلیل داشتن مواد طبیعی و موثر و عوارض کمتر در حال افزایش است (Grover *et al*., 2002). به علاوه، وجود مشکلات سیستم دارویی مدرن مانند هزینه‌های بالا، استفاده از منابع غیر تجدید شونده و ناتوانی بشر برای ساخت برخی از مواد دارویی که به طور طبیعی در گیاهان وجود دارند، باعث توجه هرچه بیشتر بشر به گیاهان دارویی شده است. بر اساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت، تقریباً ۸۰ درصد از جمعیت جهان برای نیازهای اولیه و مراقبت‌های بهداشتی خود به داروهای سنتی به ویژه داروهای گیاهی و یا داروهای مبتنی بر فرمولاسیون‌های گیاهی متکی هستند (Kumari and Kotecha, 2016). یکی از مهمترین مشکلات کنونی بشر بیماری‌های اعصاب و روان و به ویژه افسردگی است. تاکنون تحقیقات بسیار زیادی در این زمینه انجام شده است و همچنان رو به افزایش است (Kenda *et al*., 2022). برای درمان افسردگی سالیان درازی است که از انواع داروهای شیمیایی استفاده می‌شود، ولی چون درمان این بیماری گاهی برای درمان افسردگی سالیان درازی است که از انواع داروهای شیمیایی استفاده می‌شود، ولی چون درمان آن گاهی تا چندین سال به طول می انجامد، بنابرین مصرف کنندگان این داروها همیشه از عوارض آن نگران هستند. لذا میل به استفاده از گیاهان دارویی بیشتر شده است و به همین دلیل در چند دهه گذشته تحقیقات گسترده ای روی گیاهان دارویی که دارای ویژگیهای ضد افسردگی، آرام بخش و ضد درد هستند، صورت گرفته است (Kenda *et al*., 2022). تا کنون تعدادی داروی گیاهی موثر با حداقل اثرات جانبی به بازار جهانی عرضه شده است، که می‌توانند در بسیاری از موارد جایگزین داروهای ضدافسردگی شیمیایی شوند.

گل راعی (*Hypericum perforatum*) در حال حاضر یکی از پر مصرف‌ترین گیاهان دارویی در جهان است (Ng *et al*., 2017). نام انگلیسی آن Saint John's wort و در فارسی به گیاه علف چایی، هوفاریقون، گل راعی، گل شهناز شناخته می‌شود (Mozaffarian, 2013). فرآورده‌های روغنی حاصل از گیاه برای درمان سوختگی‌های جزئی، زخم‌ها، التهاب پوست و دردهای عصبی استفاده شده است (Barnes *et al*., 2001; Greeson *et al*., 2001; Patocka, 2003). همچنین این گیاه برای درمان اضطراب و افسردگی خفیف تا متوسط مورد استفاده قرار گرفته است (Vuko *et al*., 2021; Galeotti, 2021). به نظر می‌رسد فعالیت ضد افسردگی این گیاه عمدتاً با هایپریسین و هیپرفورین ارتباط نزدیکی دارد (Volz, 2022). گل راعی به عنوان یک درمانگر ضد افسردگی تنها جایگزین گیاهی برای داروهای ضد افسردگی مصنوعی می‌باشد (Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2006). در ایران شرکت دارویی پورسینا از عصاره‌ی این گیاه قطره و قرص با نام تجاری هایپیران تولید کرده است. رویشگاه گل راعی بیشتر در اروپا، غرب سیبری تا شمال غرب چین، آسیای صغیر، نواحی مدیترانه، شمال آفریقا، کانادا و استرالیا می‌باشد. گل راعی در ایران دارای ۱۹ گونه است ولی باارزش ترین آن گونه پرفوراتوم است. این گیاه در بیشتر مناطق خشک تا مرغزارها و مراتع آفتابگیر می‌روید. گل راعی علف هرز اختصاصی مزارع چایی است، در ایران این گیاه در نواحی مختلف البرز، کرج، شمال ایران، خراسان و غرب ایران دیده می‌شود (Omidbeygi, 2000). تاثیر گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها به دلیل داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی آنها است و این ترکیبات جزو ترکیبات ثانویه یا همان متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌روند. متابولیت‌های ثانویه، ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که محصولات جانبی از متابولیسم اولیه گیاهان هستند، آنها نقش آنچنانی در رشد و توسعه گیاهان ندارند، اما در دفاع گیاهان علیه تنش‌های غیر زیستی و زیستی نظیر آفات و پاتوژن‌های بیماریزا نقش دارند (Oksman-Caldentey and Inzé, 2004). امروزه با توجه به شناخت از متابولیت‌های ثانویه به عنوان ترکیبات دارویی، پیش‌ساز ترکیبات شیمایی، مکمل‌ها و چاشنی‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Oksman-Caldentey and Inzé, 2004). گل راعی (*H. perforatum*) دارای ترکیبات شیمیایی مختلفی شامل مشتقات آنتراکینونی (نفتو دی انترون‌ها)، فلاونویدها، فلوروگلوسینول‌ها، تانن‌ها، برخی ازفنل‌ها، روغن‌های فرار می‌باشد که به ویژه نفتو دی انترون‌ها، فلوروگلوسینول و فلاونوئیدها فراوانتر هستند. اما مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه در گل راعی هایپریسین و سودوهایپریسین هستند (Naik *et al*., 2016). مطالعات فارماکولوژیک متعددی تایید

کرده‌اند که این ترکیبات عامل اصلی فعالیت ضد افسردگی این گونه گیاهی هستند (Butterweck *et al*., 2003). استفاده از این گیاه برای جلوگیری از عوارض جانبی مرتبط با داروهای ضد افسردگی مناسب تشخیص داده شده است (Qin *et al*,. 2017). این دو ترکیب در گونه perforatum بیشتر نقش دفاعی در برابر آفات و پاتوژن‌های گیاهی دارند (Onelli *et al*., 2002; Bruni and Sacchetti, 2009). با توجه به خاصیت فتودینامیک هایپریسین، این ترکیب دارای پتانسیل دارویی بوده به عنوان ضد ویروس به ویژه رترو ویروس ها و بر علیه تومور کاربرد دارد (Miskovsky, Cole *et al*., 2008;)2002; Kubin *et al*., 2005 (Kacerovská *et al*., 2008). در چندین آزمایش ثابت شده است که هایپریسین در برابر افسردگی، سرطان و چندین ویروس از جمله ویروس نقص ایمنی بدن (HIV)، ویروس سیتومگالوویروس، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) و تبخال موثر است (Agostinis *et al*., 2002; Taher *et al*., 2002). همچنین گزارش شده است که عصاره این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی موثری روی باکتری‌های گرم منفی مانند *Staphylococcus aureus*، *Basillus sereus* و *Klebsiella* sp می باشد (Kubin *et al*., 2005).

با توجه به پرهزینه بودن سنتز شیمیایی و مشکلات این روشها تهیه هایپریسین از طریق منابع گیاهی ترجیح داده می‌شود. اما معمولا تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان پایین است، در نتیجه در بیوتکنولوژی گیاهان دارویی راه‌های افزایش متابولیت های ثانویه، بیشتر مورد توجه قرارگرفته است. هر چند که بهره برداری از گیاهان دارویی برای استخراج متابولیت‌های ثانویه از رویشگاه‌های طبیعی روشی معمول است، اما از بین بردن منابع ژنتیکی و اثرات مضر این روش از عمده‌ترین معایب آن است. همچنین کشت گیاهان در مزارع هم به دلیل وجود تنش‌های زنده و غیره زنده میزان ماده موثره را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین استفاده از روش‌های دیگر برای تولید هایپریسین مثل کشت‌های کنترل شده، کشت سلول و بافت گیاهی در بیوراکتورها، استفاده از محرک‌های زیستی و شیمیایی جهت افزایش ترکیبات ثانویه مانند هایپریسین و یا حتی دیگر روش‌های بیوتکنولوژی مانند انتقال ژن بسیار مناسب‌تر هستند. امروزه استفاده از محرک‌ها در کشت‌های کنترل شده و کشت سلول و بافت گیاهی یکی از روش‌های بسیار مناسب و کم‌هزینه برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی است (Bhaskar *et al*., 2022). محرک‌ها یا الیسیتورهای زنده و غیر زنده می‌توانند مسیرهای سنتز متابولیت‌های ثانویه را از طریق تغییر در بروز ژنها تحت تأثیر قرار بدهند و در نهایت باعث افزایش میزان تولید آن‌ها شوند (Humbal and Pathak, 2023)، متیل جاسمونات از تنظیم‌کننده (یا هورمون) های مهم گیاهی می‌باشد که اثرات تحریک کنندگی موثری از طریق افزایش بیان ژن‌های کلیدی روی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی دارد (Jeyasri *et al*., 2023). از آنجا که هایپریسین دارای اهمیت بالایی در داروسازی می‌باشد و سنتز شیمیایی آن پرهزینه است، نیاز به روش‌های تولید جایگزین طبیعی مانند تولید در شرایط کنترل شده و درون شیشه‌ای بیشتر احساس می شود. استفاده از کشت‌های گلخانه‌ای با به کارگیری غلظت مناسب محرک‌ها به منظور تاثیر بر بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه هدف و افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی که می‌توانند منجر به تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه شوند، یکی از راهکارهای پیشرو است که امروزه توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Humbal and Pathak, 2023).

هایپریسین و ترکیبات مرتبط با آن بیشتر در غده‌های تیره برگ‌ها تجمع می‌یابند (Briskin and Gawienowski, 2001; Pasqua *et al*., 2003). مطالعات نشان می‌دهند که بیوسنتز هایپریسین از طریق مسیر پلی کتاید نوع سه انجام می‌گیرد (شکل ۱) که که در آن پلی‌کتاید سنتازهای *HpPKS2*, *HpPKS1* به‌عنوان آنزیم‌های کلیدی نقش دارند (Bais *et al*., 2002; Klingauf *et al*., 2005). این ژن‌ها به همراه ژن‌های دیگری مانند پروتئین‌های اتصال فنولیک (*HpPOCP2*, *HpPOCP1*, *HpPOCP3*) و اوکتا کتید سنتازها (*HpOKS*) از مهمترین ژن‌های کلیدی مرتبط با بیوسنتز هایپریسین هستند (Pradeep and Franklin, 2022). بنابراین به منظور بهره برداری از تنظیم بیان ژنهای *HpPKS2*, *HpPKS1* توسط الیسیتور متیل جاسمونات و تاثیر آن بر افزایش احتمالی متابولیت هایپریسین این آزمایش طراحی و اجرا گردید.



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی هایپریسین-در ابتدای این مسیر پلی‌کتاید سنتازهای *HpPKS2* و*HpPKS1* به رنگ آبی مشخص است

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمارها

از گیاهان گل راعی رقم توپاز (Topas) تهیه شده از شرکت اکسیر طبیعت کوهسار اراک نشاهای یکسان تهیه شد و سپس در گلدان‌های بیست لیتری حاوی خاک یکنواخت (شامل ماسه، کمپوست وخاک مزرعه هر یک به حجم یک سوم) در گلخانه تحقیقاتی با مختصات ۳۵/۲۸ درجه شمالی و ۴۶/۹۹ درجه شرقی کشت گردیدند. گیاهان در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۱۰۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه) با ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسب ۵±۷۰ درصد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پرورش یافتند. تیمار متیل جاسمونات به صورت اسپری در زمان گلدهی در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار در ساعت ده قبل از ظهر انجام شد. نمونه‌گیری از ساقه و برگ‌های گیاهان تیمار شده و شاهد در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار انجام شد. برای این آزمایش سه تکرار منظور شد و گلدان‌ها به صورت طرح کاملا تصادفی مرتب شدند. در پایان در هر دو آزمایش نمونه‌های برگ و ساقه جداگانه تهیه و تا زمان استخراج RNA در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی آغازگرها

RNA کل از ساقه و برگ گیاهان با روش ماتزرا و جیمز (Mazzara and James, 2000) استخراج شد. سپس با استفاده از کیت سنتز شرکت یکتا تجهیز آزما cDNA تهیه شد. برای سنتز cDNA، ابتدا آلودگی DNA ژنومی از RNAهای به دست آمده با استفاده از آنزیم DNaseI برداشته شد. سپس RNAهای خالص شده هم غلظت (۱µg) و سنتز cDNA با استفاده دستورالعمل شرکت یکتا تجهیز آزما انجام شد. آغازگرها برای ژن‌های مورد مطالعه از توالی‌های نوکلئوتیدی قابل دسترس در بانک ژن طراحی شد. ژن بتا توبولین به عنوان ژن کنترل داخلی یا ژن رفرنس (Zhou *et al.*, 2019) و ژن‌های پلی کتید سنتاز ۱ و ۲ (*HpPKS1* و *HpPKS2*) به عنوان ژن‌های هدف بودند. آغازگرهای اختصاصی از روی نواحی کاملا حفاظت شده این ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار VectorNTi طراحی شدند و آنالیزها و بررسی‌های دقیق تر پرایمرها مانند دمای اتصال، تشکیل دایمر و لوپ نیز انجام شد. در جدول ۱ توالی آغازگرها و مشخصات مهم آنها آمده است.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

ژن	شماره دسترسی (NCBI)	توالی آغازگر ('3→'5)	دمای اتصال (°C)	طول قطعه (bp)
Beta tubulin	KJ669725.1	TGATGTCGTGAGGAAGGAAG مستقیم CTGGGTGTAGTGAGCTTGAG معکوس	۶۰	۳۱۲
HpPKS1	JQ073294.1	GATGTTCGTCGTGTGATGATGCTC مستقیم GTACTCCATTACATACAACACTG معکوس	۶۰/۳	۵۹۸
HpPKS2	EF186676.1	TGTGCTGCGAGTTGATGGTGT مستقیم GGCACACTTCGGAGCACCAT معکوس	۶۱	۵۸۸

بهینه سازی PCR و آنالیز بیان ژن

ابتدا به وسیله آغازگرهای طراحی شده امکان تکثیر آمپلیکون‌ها (Amplicon- قطعات تکثیر شونده) با سایزهای مورد انتظار (جدول ۱) با انجام واکنش‌های PCR بررسی شد. PCR در دستگاه ترمال سایکلر مدل T100 ساخت کمپانی BIORAD انجام شد. هر نمونه PCR شامل ۰/۷ µM ازهر آغازگر، ۵ میلی لیتر مستر میکس (شرکت سینا کلون) و ۱۰۰ نانوگرم cDNA در حجم نهایی ده میلی لیتر بود. شرایط دمایی واکنش‌های PCR و تعداد چرخه‌ها طبق جدول ۲ انجام گرفت. پس از انجام واکنش‌های RT-PCR برای تمامی نمونه‌ها و بارگزاری محصولات PCR بر روی ژل، عکس‌های با کیفیت گرفته شد. برای کمی‌سازی باندهای تکثیر شده از نرم افزار *GelQuant.NET* ارائه شده توسط biochemlabsolutions.com استفاده شد. با محاسبه نسبت داده‌های مربوط به ژن‌های مورد مطالعه (*HpPKS1* و *HpPKS2*) به داده‌های متناظر ژن رفرنس (بتا توبولین)، داده‌ها نرمال سازی شد و بیان نسبی[1] هر دو ژن پلی کتاید ۱ و ۲ برای تمامی نمونه‌ها در هر دو آزمایش به دست آمد. در پایان تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن‌ها (در سطح رونوشت) در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون LSD (حداقل اختلاف معنی‌دار) با استفاده از نرم افزار SAS 8.2 انجام شد. برای تجزیه و تحلیل دقیق تر داده‌ها و تفسیر نتایج، نمودارهای مربوط به بیان نسبی ژن‌ها نیز با استفاده از برنامه Microsoft Office Excel 2019 رسم شدند.

جدول ۲- چرخه حرارتی به‌کار برده شده برای واکنش PCR

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما (°C)
۱	واسرشت اولیه	۵ (دقیقه)	۹۴
۲۹	واسرشت	۳۰ (ثانیه)	۹۴
	اتصال	۳۰ (ثانیه)	*
	بسط	**	۷۲
۱	بسط نهایی	۸ (دقیقه)	۷۲

* بسته به نوع پرایمر

نتایج و بحث

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA از نمونه‌های برگ و ساقه با موفقیت استخراج شد. غلظت RNAهای استخراج شده در محدوده ۱۵۰۰ تا ۱۸۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر به دست آمدند و نسبت جذب نوری ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر این نمونه‌ها از ۱/۹-۱/۶ نانومتر بود که کیفیت مناسب آنها را نشان می‌دهد. همچنین برای اطمینان از کیفیت RNA نمونه‌ها بر روی ژل نیز بارگزاری شدند که نتایج کیفیت RNA استخراج شده را تایید می کرد. برای تایید سنتز cDNA، برای ژن بتا توبولین PCR انجام شد. لازم به ذکر است که قطعه تکثیر شونده این ژن به گونه‌ای طراحی شد که یک بخش انترونی به طول ۲۳۰ جفت باز (bp) را در بر بگیرد به طوری که در صورت وجود آلودگی ژنومی و یا عدم سنتز cDNA، هیچ قطعه‌ای تکثیر نشود. در شکل ۲ نتایج استخراج RNA و تکثیر قطعات ژن‌های مورد مطالعه نشان داده شده است.

شکل ۲- الف) استخراج RNA در برگ (RNAL) و ساقه (RNAS) ، ب) تکثیر قطعات ژن‌های *HpPKS1* و *HpPKS2*، ج) تکثیر قطعه ژن بتا توبولین در cDNA و gDNA (ژنومی)، M مارکر 100 bp.

PCR نیمه‌کمی و اندازه‌گیری بیان ژن‌ها

الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه (*HpPKS1* و *HpPKS2*) به عنوان دو ژن کلیدی مرتبط با بیوسنتز هایپریسین، تحت تاثیر متیل جاسمونات به صورت نیمه کمی بررسی شد. بدین منظور پس از ساختن cDNA، PCR نیمه‌کمی برای هر دو ژن به همراه ژن بتا توبولین به عنوان ژن رفرنس انجام شد. باندهای حاصل از PCR (شکل ۳ و ۵) با استفاده از نرم‌افزار *GelQuant.Net* به داده‌های کمی تبدیل شدند. سپس این داده‌ها به صورت فاکتوریل (غلظت و زمان) در قالب طرح کاملا تصادفی برای دو ژن و دو بافت تجزیه واریانس و بیان ژن‌ها در سطح رونوشت به صورت نمودار ارایه شدند.

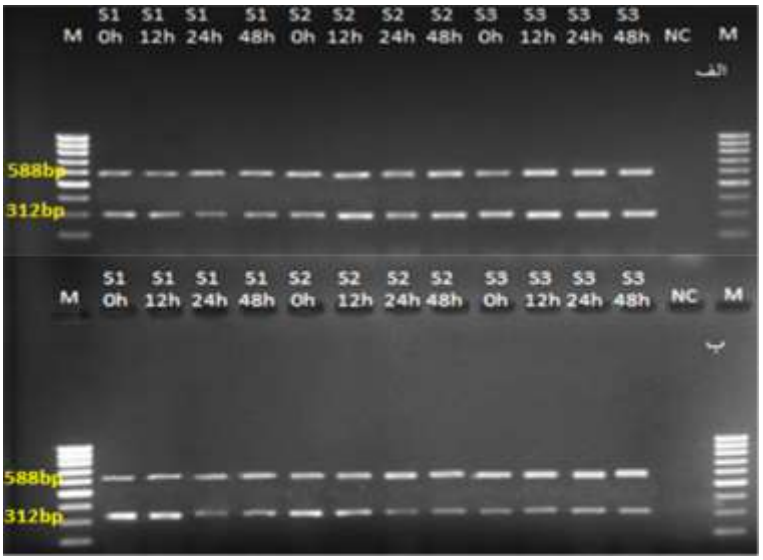
بیان ژن *HpPKS1* تحت تیمار با متیل جاسمونات در بافت‌های برگ و ساقه

بررسی بیان ژن *HpPKS1* در برگ و ساقه گیاه گل راعی به روش PCR نیمه‌کمی (شکل ۳) انجام شد. آنالیز داده‌های به دست آمده نشان داد که پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات بر روی گیاهان، میزان سطح بیان این ژن در غلظت‌های مختلف در بافت‌های برگ و ساقه تغییر می‌کند و روند آن برای هر دو بافت از صفر تا ۱۰۰ میکرمولار به صورت صعودی است (شکل ۴)

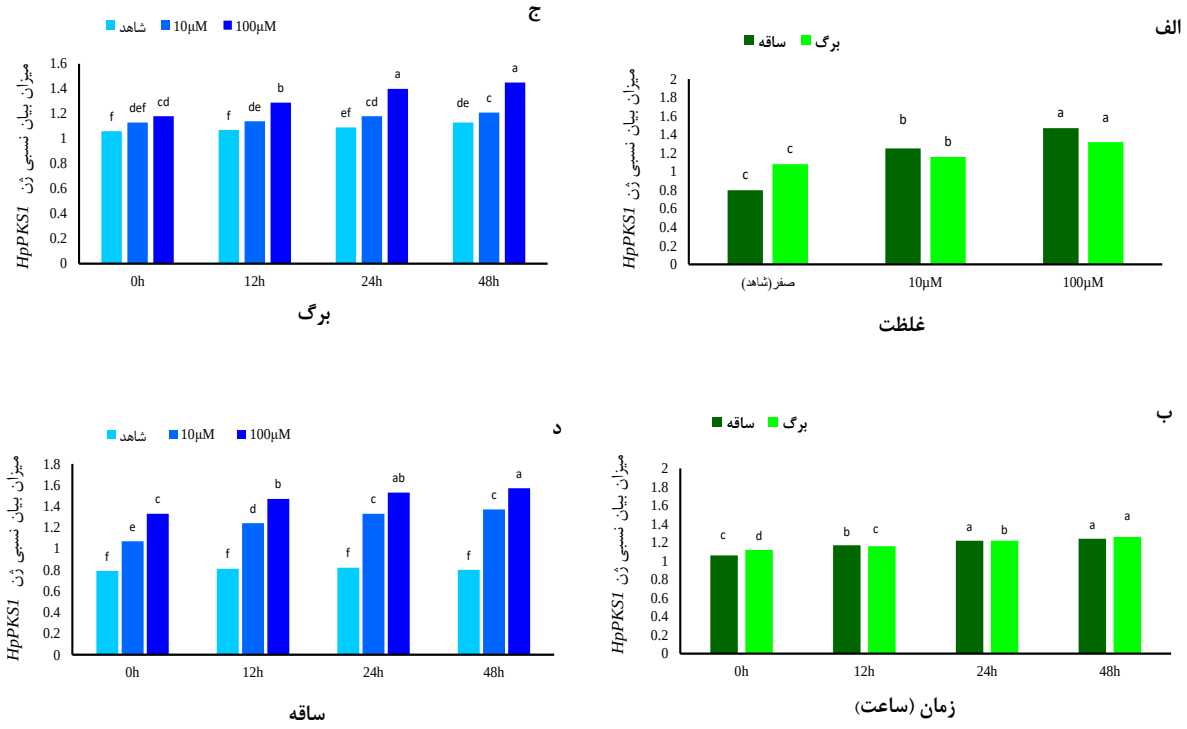
هم در بافت برگ و هم در ساقه بیشترین میزان بیان ژن *HpPKS1* در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به دست آمد و به ترتیب مقدار آن در برگ ۱/۲۳ و در ساقه ۱/۸۳ (برابر نسبت به شاهد بود شکل ۴ الف). به علاوه میزان بیان ژن *HpPKS1* در سری زمان‌های صفر، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اسپری متیل جاسمونات در بافت برگ روند کاملا صعودی را نشان داد و بیشترین میزان بیان این ژن در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار به دست آمد و

نسبت به شاهد ۱/۱۲ برابر بیشتر بود (شکل ۴ ب). برای بافت ساقه بین ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت اختلاف معنی داری مشاهده نشد ولی در ۴۸ ساعت هم مقدار عددی میزان بیان بیشتر از ۲۴ ساعت بود و بیان ژن در بافت ساقه همچنان روند صعودی افزایشی داشت. در هر دو بافت بیشترین میزان بیان این ژن در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و پس از ۴۸ ساعت اتفاق افتاد. همچنین نتایج آنالیزهای آماری نشان داد که اثرات متقابل غلظت و زمان‌های مورد مطالعه معنی‌دار است (جدول ۳) و در حالت اثر متقابل بین غلظت و زمان میزان بیان ژن HpPKS1 در بافت برگ (شکل ۴ ج) و ساقه (شکل ۴ د) در همه زمان‌ها برای هر غلظت متیل جاسمونات به طور محسوسی تغییر می‌کند و دارای روندی کاملا افزایشی است و بیشترین سطح بیان همیشه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد. همچنین آنالیز دقیق‌تر داده‌ها نشان می‌دهد که میزان بیان ژن HpPKS1 در بافت برگ بیشتر از ساقه است.

.



شکل ۳- PCR نیمه‌کمی ژن *HpPKS1* در برگ (الف) و در ساقه (ب): به ترتیب از چپ به راست، M (مارکر 100 bp)، S1 (غلظت صفر یا شاهد)، S2 (غلظت ۱۰ میکرومولار)، S3 (غلظت ۱۰۰ میکرومولار)، زمان (0h, 12h, 24h, 48h)، NC (کنترل منفی)، اندازه باند تکثیر شده ژن *HpPKS1* به طول ۵۸۸ جفت باز و اندازه باند ژن رفرنس (*Beta tubulin*) به طول ۳۱۲ جفت باز.



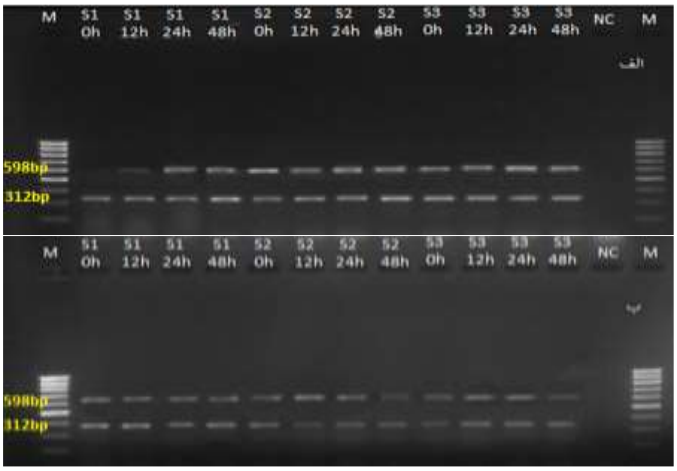
شکل ۴- میزان بیان ژن *HpPKS1* در دو بافت برگ و ساقه تحت تیمار متیل‌جاسمونات الف) غلظت‌های مختلف، ب) زمان‌های مختلف، ج) اثر متقابل زمان و غلظت در برگ و د) اثر متقابل زمان و غلظت در ساقه . حروف یکسان نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است.

جدول۳- تجزیه واریانس برای ژن *HpPKS1* در بافت برگ و ساقه

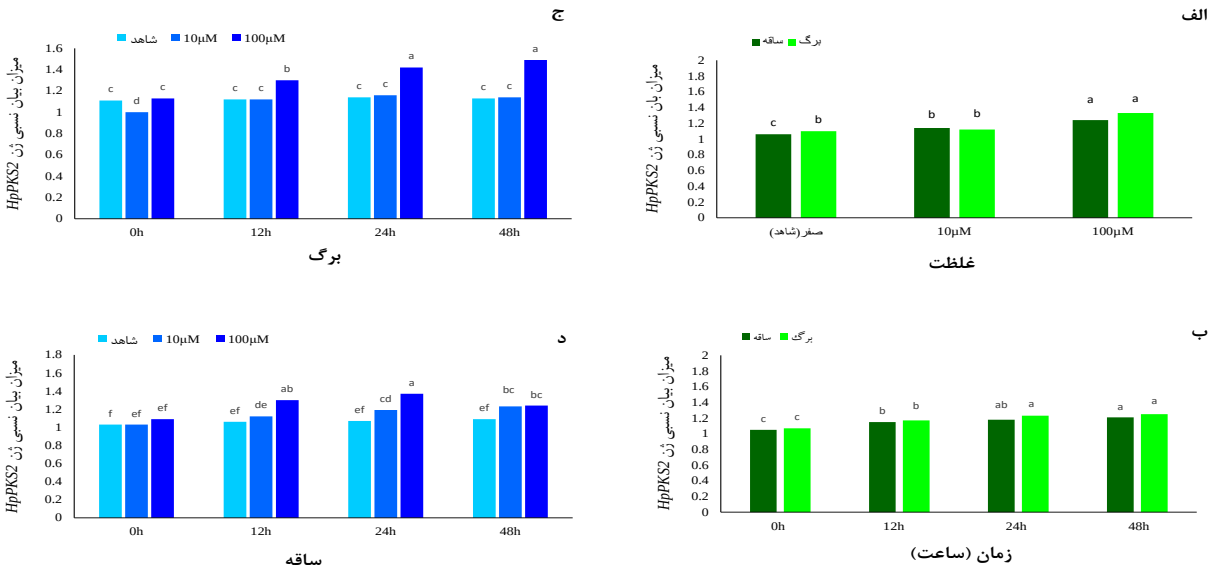
منابع تغیرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F-Value	Sig.
بافت برگ					
تیمار (غلظت × زمان)	۱۱	۰/۵۱۷	۰/۰۴۷	۳۲/۳۱	<۰/۰۰۰۱
خطای آزمایش	۲۴	۰/۰۳۴	۱/۰۰۱		
کل	۴۵	۰/۵۵۲			
بافت ساقه					
تیمار (غلظت × زمان)	۱۱	۳/۰۴۵	۰/۲۷۶	۱۹۰/۵۴	<۰/۰۰۰۱
خطای آزمایش	۲۴	۰/۰۳۴	۰/۰۰۱		
کل	۳۵	۳/۰۷۹			

بیان ژن *HpPKS2* تحت تیمار با متیل جاسمونات در بافت‌های برگ و ساقه

بیان ژن *HpPKS2* در بافت‌های برگ و ساقه گیاه گل راعی به روش از PCR نیمه‌کمی (شکل ۵) انجام شد. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که متیل جاسمونات بر روی سطح بیان ژن *HpPKS2* در گیاهان تیمار شده در هر دو بافت تاثیر دارد و در غلظت ۱۰۰ میکرومولار هم در برگ و هم ساقه بیشترین میزان بیان به دست آمد به طوری که سطح بیان در برگ‌ها ۱/۱۸ و در ساقه ۱/۱۷ برابر نسبت به شاهد بود (شکل ۶ الف). از غلظت صفر تا ۱۰۰ میکرومولار روند بیان در ساقه کاملا به صورت افزایشی ولی در برگ‌ها تفاوت معنی داری بین ۱۰ و صفر میکرومولار مشاهده نشد (شکل ۶ الف). آنالیز داده‌ها در زمان‌های صفر، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال الیسیتور متیل جاسمونات نشان داد در هر دو بافت بیان ژن *HpPKS2* پس از ۴۸ ساعت به بیشترین مقدار خود رسید (شکل ۶ ب) و این نتیجه کاملا با نتایج ژن *HpPKS1* مشابه می باشد. برای این ژن نیز نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل غلظت و زمان-های مورد مطالعه معنی‌دار است (جدول ۴) و در حالت اثر متقابل بین غلظت و زمان، میزان بیان ژن *HpPKS2* تنها در ساقه در همه زمان‌ها (صفر تا ۴۸ ساعت) از غلظت صفر به سمت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات دارای روندی کاملا افزایشی است (شکل ۶ د) و در برگ چنین روندی مشاهده نشد (شکل ۶ ج). بیشترین سطح بیان همیشه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد. به علاوه آنالیز دقیق تر داده‌ها نشان داد که میزان بیان ژن *HpPKS2* در بافت برگ بیشتر از ساقه است. در پایان لازم به ذکر است که به طور کلی میانگین میزان بیان ژن *HpPKS1* بیشتر از *HpPKS2* بود.



شکل ۵- PCR نیمه‌کمی ژن HpPKS2 در برگ (الف) و در ساقه (ب): به ترتیب از چپ به راست، M (مارکر ۱۰۰ bp)، S1 (غلظت صفر یا شاهد)، S2 (غلظت ۱۰ میکرومولار)، S3 (غلظت ۱۰۰ میکرومولار)، زمان (0h, 12h, 24h, 48h)، NC (کنترل منفی)، اندازه باند تکثیر شده ژن HpPKS2 به طول ۵۹۸ جفت باز و اندازه باند ژن رفرنس (Beta tubulin) به طول ۳۱۲ جفت باز.



شکل ۶- میزان بیان HpPKS2 در دو بافت برگ و ساقه تحت تیمار متیل‌جاسمونات الف) غلظت‌های مختلف، ب) زمان‌های مختلف، ج) اثر متقابل زمان و غلظت در برگ و د) اثر متقابل زمان و غلظت در ساقه . حروف یکسان نشان دهنده عدم اختلاف است.

جدول۴- تجزیه واریانس برای ژن *HpPKS2* در بافت برگ و ساقه

منابع تغیرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F-Value	Sig.
بافت برگ					
تیمار (غلظت × زمان)	۱۱	۰/۶۶۳	۰/۰۶	۲۴/۰۶	<۰/۰۰۰۱
خطای آزمایش	۲۴	۰/۰۶۰	۰/۰۰۲		
کل	۳۵	۰/۷۲۴			
بافت ساقه					
تیمار (غلظت × زمان)	۱۱	۰/۴۰۷	۰/۰۳۷	۱۵/۱۶	<۰/۰۰۰۱
خطای آزمایش	۲۴	۰/۰۵۸	۰/۰۰۲		
کل	۳۵	۰/۴۶۵			

در گیاهان متابولیت‌های ثانویه از طریق مسیرهای بیوسنتزی تولید می‌شوند و کاملا تحت کنترل ژن‌ها هستند و این ژن‌ها با بیان خود دستور تولید آنزیم‌ها برای واکنش‌های لازم در طی مسیر بیوسنتزی را می‌دهند. برای تولید افزایشی متابولیت‌های ثانویه، از رویکردهای بیوتکنولوژیکی مختلفی استفاده می‌شود، اما به کارگیری الیسیتورها یک رویکرد بیولوژیکی و بازوی قوی برای افزایش تولید زیست توده ترکیبات فعال دارویی در گیاهان در طی کشت مزرعه و یا کشت بافت است (Halder *et al*., 2019; Kandoudi *et al*., 2021) الیسیتورها به عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده عمل می‌کنند و این سیگنال‌ها توسط گیرنده‌های متصل به غشای سلولی گیاهی شناسایی می‌شوند و مسیرهای انتقال سیگنال را فعال می‌کنند و در نتیجه بیان تنظیم کننده‌های کلیدی را تغییر می‌دهند که سرانجام آن افزایش سنتز و تجمع ترکیبات ثانویه گیاهی است (Zhai *et al*., 2017; Miladinova-Georgieva *et al*., 2023). الیسیتورها یا محرک‌ها ممکن است ژن‌هایی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه می‌اندازند و باعث تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. الیسیتور یا القاگر می‌تواند در غلظت‌های کم به یک سیستم زنده مانند گیاه برای القاء و تولید بیشتر بیوسنتز ترکیبات زیستی فعال (مانند های ثانویه) کمک کندمتابولیت (Zhai *et al*., 2017; Miladinova-Georgieva *et al*., 2023) چرا که آنها نقشاساسی در انتقال سیگنال و افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه دارند. متیل جاسمونات متعلق به خانواده جاسمونات‌ها از ترکیبات شیمیایی گیاهی است که بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژی گیاهان را تنظیم می‌کند. نقش متیل جاسمونات به عنوان یک مولکول سیگنالینگ مهم در تنش‌های زیستی و غیر زیستی به خوبی شناسایی شده است. متیل جاسمونات می تواند ارتباطات درون و بیرون گیاهان و تنظیم پاسخ‌های دفاعی را ، این ترکیب به عنوان یک (Ali *et al*., 2021) تسهیل کند محرک با ارزش شناخته شده که برای مقابله با تنش‌ها و همچنین سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارای اهمیت زیادی است. قرار گرفتن سلول‌های گیاهی در معرض عوامل استرس زا و همچنین پاسخ‌های دفاعی اولیه و ثانویه آن‌ها، منجر به افزایش تولید ترکیبات گیاهی، بیان ژنتیکی، سیگنال دهی چند جزئی، تغییرات در فرآیندهای متابولیکی و دخالت ترانس کریپشن فاکتورهای مختلف می‌شود که همه این فعالیت‌ها با سیگنال متیل جاسمونات و همچنین سالیسیلیک اسید از بسیاری جهات هماهنگ می‌شوند (Jeyasri *et al*., 2023). تحقیقات نقش کلیدی فاکتورهای رونویسی و شبکه‌های ژنی مختلف را در مسیرهای سیگنالینگ سیگنالینگ متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در محافظت از گیاهان در برابر عوامل استرس زا و افزایش تولید متابولیت¬های ثانویه را آشکار کرده است (Khare *et al*., 2020). به کارگیری متیل جاسمونات به صورت برون زاد یا خارجی در کشت¬های درون شیشه‌ای و یا مزرعه‌ای به عنوان یک روش جدید برای افزایش بیان ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتزی و در نهایت افزایش تولید متابولیت¬های ثانویه شناخته شده است (Murthy *et al*., 2014; Ho *et al*., 2020). در این تحقیق اثر الیسیتور مهم متیل جاسمونات بر بیان دو ژن کلیدی مسیر بیوسنتزی هایپریسین در گل راعی مطالعه شد. نتایج حاکی از تاثیر افزایشی این ترکیب هم در غلظت¬های مورد استفاده و هم در بازه زمانی بر میزان بیان در سطح رونوشت ژن-های *HpPKS1* و *HpPKS2* بود. بر اساس تحقیقات انجام شده ژن‌های *HpPOCP* و *HpPKS2* ارتباط مستقیمی با رشد و نمو غده¬های سیاه و بیوسنتز هایپریسین در گل راعی دارند (Pradeep and Franklin, 2022). مطالعات نشان داده است که *HpPKS2* در واکنش‌های کلیدی مراحل اولیه در بیوسنتز هایپریسین در گل راعی نقش دارد (Khan *et al*., 2022; Soták *et al*., 2016). در این مطالعات مشخص شده است که ممانعت از تولید هایپریسین منجر به کاهش بیان ژن‌هایی مانند *HpPOCP1*، *HpPOCP2*، *HpPOCP3*، *HpOKS* و *HpPKS2* می‌شود که در بین اینها شدت کاهش بیان برای *HpPKS2* به مراتب بیشتر است، لذا به نظر می‌رسد این ژن یک ژن کلیدی و مهم برای بیوسنتز هایپریسین باشد (Pradeep and Franklin, 2022). نتایج این تحقیق به خوبی بیان می‌کند که به کار بردن متیل جاسمونات به صورت مه پاشی خارجی می‌تواند بر بیان ژن‌های *HpPKS1* و *HpPKS2* که ژن‌های ابتدایی تولید امودین از پلی کتایدهای نوع سه

گیاهی و پیش ساز مهم هایپریسین هستند، تاثیر بگذارد. اگر این ژن‌ها فعال شوند احتمال دارد میزان تولید هایپریسین افزایش ¬یابد چرا که دو تا پیش ماده اولیه مهم (مالونیل کوآنزیم آ و استیل کوآنزیم آ) که برای تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه دیگر ضروری هستند با حضور بیشتر پلی کتید سنتازها سریعتر به مواد حد واسطی مانند امودین تبدیل شده و در ادامه به هایپریسین بیوسنتز بشوند. همچنان که خان و همکاران (Khan *et al*., 2020) نشان دادند که بیش بیان ژن *HpPKS2* در گیاهان تراریخته گل راعی منجر به افزایش تقریبا ده برابری هایپریسین شده است. در مطالعه دیگری نیز گیاهان گل راعی رشد یافته در دماهای پایین‌تر از حد نرمال تجمع هایپریسین همراه با تحریک بیان ژن¬های مسیر بیوسنتزی را نشان دادند .(Su *et al*., 2021) بنابراین ارتباط مستقیم بین بیان ژن‌های پلی کتید سنتاز و هایپریسین به خوبی نشان داده شده است. در پژوهش‌های دیگر نیز ارتباط تاثیر الیسیتور و تولید متابولیت هایپریسین مشاهده شده است به عنوان مثال گیاهان حاصل از کشت مریستم گل راعی حاوی غلظت ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات به صورت معنی داری هایپریسین بیشتری نسبت به شاهد تولید کردند .(Sirvent and Gibson, 2000) به نظر می رسد غلظت ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات برای تیمار گیاهان مناسب باشد، همچنان که در تحقیق ما نیز ۱۰۰ میکرو مولار غلظت مناسبی برای افزایش بیان ژن¬های *HpPKS1* و *HpPKS2* بود. درمطالعه‌ای دیگر کاربرد جاسمونیک‌اسید در کشت سلولی گل راعی تولید هایپریسین را افزایش داد و مشخص شد که جاسمونیک اسید یک محرک موثر برای تولید هایپریسین است .(Walker *et al*., 2002) اثرات جاسمونیک‌اسید از مشتقات متیل جاسمونات بر تولید متابولیت‌های ثانویه در گونه‌های *Hypericum hirstutum* و *Hypericum maculatum*نیز بررسی شده است و جاسمونیک ¬اسید در غلظت حداقل ۲۵۰ میکرومولار تجمع هایپریسین و سودوهایپریسین را در هر دو گونه افزایش داد ,.Coste *et al*) 2011).

الیستور متیل جاسمونات در گیاهان دیگری نیز برای برانگیختگی و افزایش بیان ژن‌ها و تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گرفته و نتایج امید بخشی حاصل شده است. بنا به مقاله مروری جیسری و همکاران (Jeyasri *et al*., 2023) در میان انواع مختلف السیتورها، متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید محرک‌هایی هستند که گزارشات بسیاری از استفاده از آنها ارائه شده است. در کشت سوسپانسیون سلولی در انگور (*Vitis vinifera*) ترکیب متیل جاسمونات (متیل جاسمونات) تأثیر عمده-ای بر افزایش بیوسنتز استیلبن نشان داده است ,.Rodziewicz et al) 2014; Xu *et al*., 2015).در ناز باتلاقی (Bacopa monnieri) تولید ترکیب زیست فعال باکوزید A با استفاده از متیل جاسمونات از طریق کشت شاخساره افزایش یافت (Largia *et al*., 2015; Sharma *et al*., 2015). همچنین در گیاه براهمی (*Bacopa monnieri*) استفاده از غلظت‌های ۲۰۰-۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به صورت اگزوژن می‌تواند یک روش بالقوه برای افزایش محتوای باکوزید در نهال‌های این گیاه باشد .(Bunjan *et al*., 2018) در گونه‌های Salvia abrotanoides و Salvia yangii B.T. Drew تحت تاثیر متیل جاسمونات افزایش بیان ژن‌هایPAL ، ۴ CL و RAS و نهایتا تولید بیشتر متابولیت ثانویه رزمارینیک اسید گزارش شده است .(Kianersi *et al*., 2023) در کشت سلولی سوسپانسیون گیاه *Rhodiola imbricata* پس از تیمار با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات، بیان در سطح رونوشت ژن¬های (UGT C 73و (TDC) از ژن‌های مسیر بیوسنتزی سالیدروزاید و همپنین بیان ژن‌های (CAD) و(CCR) در مسیر بیوسنتزی روزاوین افزایش نشان دادند ضمن اینکه مقدار متابولیت ثانویه مربوطه نیز تجمع چشمگیری داشت .(Rattan et al., 2023) در گیاه Prunella vulgaris نیز متیل جاسمونات به طور موثری سطوح بیان ژنهایPv4CL، PvPAL، PvC4H و PvTAT را افزایش داده است.(Tang *et al*., 2023)

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نیاز روز افزون بشر به ترکیبات ارزشمند گیاهی، شناسایی روش‌های جایگزین برای تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه برای پاسخگویی به تقاضای عظیم بازار بسیار مهم است. امروزه برانگیختن یکی از رویکردهای تکنولوژی زیستی موثر برای القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از طریق افزایش بیان ژن‌های کلیدی و همچنین افزایش زیست توده (بیوماس)

گیاهان در کشت‌های آزمایشگاهی است (Baenas *et al*., 2014). در این تحقیق مشخص شد که متیل جاسمونات در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار می‌تواند بر بیان ژن کلیدی پلی‌کتاید سنتاز شامل *HpPKS2* و*HpPKS1* در مسیر بیوسنتزی هایپریسین در برگ و ساقه تاثیر گذار باشد. همچنین در بازه زمانی صفر تا ۴۸ ساعت هر چه زمان می‌گذرد افزایش بیان هم بیشتر می‌شود. بیشترین مقدار بیان برای هر دو ژن در غلظت ۱۰۰ میکرومولار و پس از ۴۸ ساعت از تیمار گیاهان مشاهده شد و روند افزایش بیان برای هر دو ژن در دو بافت برگ و ساقه تقریبا یکسان بود. احتمالا این دو ژن در مراحل اول مسیر بیوسنتزی هایپریسین هم زمان فعال بوده و هماهنگ عمل می کنند .

سپاسگزاری

از دانشگاه کردستان برای حمایت مالی این پروژه تشکر می شود.

منابع

Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *53*, 583–600. doi: 10.1211/0022357011775910.

Bhaskar, R., Xavier, L.S.E., & Udayakumaran, G. (2022). Biotic elicitors: a boon for the in-vitro production of plant secondary metabolites. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *149*, 7–24. https://doi.org/10.1007/s11240-021-02131-1.

Bais, H.P., Walker, T.S., Stermitz, F.R., Hufbauer, R.A., & Vivanco, J.M. 2002b. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology*, *128*, 1173-1179.

Baenas, N.; Garcia-Viguera, C.; Moreno, & Elicitation, D.A. (2014). A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 2014, 19, 13541–13563.

Bunjan, W., Sujipuli, K., & Prasarnpun, S. (2018) Effect of methyl jasmonate elicitation on biomass, gene expression and saponin accumulation in *Bacopa monnieri*. *International Journal of Biological Sciences*, *13*(4), 369-377.

Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C. & Coldea, G. (2011). Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *106*, 279-288.

Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A. & et al. (2013). The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphtodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,*113*, 25–39. https://doi.org/10.1007/s11240-012-0248-0.

Galeotti, N. (2017). *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. *Journal of Ethnopharmacology*, *200*, 136–146.

Greeson, J.M., Sanford, B., & Monti, D.A. (2001). St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology, 153*, 402–414. doi: 10.1007/s002130000625.

Grover, J.K., Yadav, S., & Vats, V. (2002). Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, *81*, 81–100.

Humbal, A., & Pathak, B. (2023) Influence of exogenous elicitors on the production of secondary metabolite in plants: A review ("VSI: secondary metabolites"), *Plant Stress*, 8,100166,

Halder, M., Sarkar, S., & Jha, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences*, 19, 880.

Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K. & et al. (2023). Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *153*, 447–458. https://doi.org/10.1007/s11240-023-02485-8.

Kandoudi, W., Radácsi, P., Gosztola, B., Zámborine Németh, E. (2021). Elicitation of medicinal plants in vivo—Is it a realistic tool? The effect of methyl jasmonate and salicylic acid on lamiaceae species. *Horticulturae*, *8*(1), 5: https://doi.org/10.3390/horticulturae8010005.

Kenda, M., Kočevar Glavač, N., Nagy, M., & Sollner Dolenc, M. (2022). Medicinal plants used for anxiety, depression, or stress treatment: An update. *Molecules 15*;27(18):6021. doi: 10.3390/molecules27186021.

Khan, S.A., Verma, P., & Parasharami, V.A. (2022). RETRACTED ARTICLE: Homo and heterologous expression of the HpPKS2 gene in *Hypericum perforatum* and *Bacopa monnieri*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *148*, 215. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01965-5.

Kianersi, F., Amin Azarm, D., Fatemi, F., Jamshidi, B., Pour-Aboughadareh, A., Janda, T. (2023). The influence of methyl jasmonate on expression patterns of rosmarinic acid biosynthesis genes, and phenolic compounds in different Species of *Salvia* subg. *Perovskia* Kar L. *Genes*, *5*, 14(4):871. doi: 10.3390/genes14040871.

Klingauf, P., Beuerle, T., Mellenthin, A., El-Moghazy, S.A., Boubakir, Z., & Beerhues, L. (2005). Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry*, *66*, 139-145.

Kumari, R., &Kotecha, M. (2016) A review on the standardization of herbal medicines. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 97–106.

Largia, M.J.V., Pothiraj, G., Shilpha, J., Ramesh, M. (2015). Methyl jasmonate and salicylic acid synergism enhances bacoside A content in shoot cultures of *Bacopa monnieri* (L). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *122*(1), 9–20.

Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C.D., Pauls, A., Weidenhammer, W., & Melchart, D. (1996). St. John's wort for depression. *British Medical Journal, 313*, 253-258.

Mazzara, M., & James, D.J. (2000). The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria× ananassa* Duch.) tissue. *Molecular biotechnology, 15*, 237-241.

Miladinova-Georgieva, K., Geneva, M., Stancheva, I., Petrova, M., Sichanova, M., & Kirova, E. (2022). Effects of different elicitors on micropropagation, biomass and secondary metabolite production of *Stevia rebaudiana* Bertoni.—A Review. *Plants*, *12*, 153. https://doi.org/10.3390/plants12010153.

Mozaffarian, V. (2015). Identification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran. Farhang Moaser Publishers, 1444 p. (In Persian).

Oksman-Caldentey, K.-M. and Inzé, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in plant science, 9: 433-440.

Omidbeygi, R. (2000). Approaches Production and Processing of Medicinal Plants. Fekre Rooz Publishers, 242 p. (In Persian).

Patocka, J. (2003). The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *Journal of Applied Biomedicine, 1*, 61–70.

Pradeep, M., & Franklin, G. (2022). Understanding the hypericin biosynthesis via reversible inhibition of dark gland development in *Hypericum perforatum* L. *Industrial Crops and Products, 182*,114876,

Qin, X., Venkatanarayanan, N., & Yih Xian Ho, C. (2017). Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: A meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, *210*, 211-221, https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.12.048.

Rattan, S., & Warghat Ashish., R. (2023). Comparative analysis of salidroside and rosavin accumulation and expression analysis of biosynthetic genes in salicylic acid and methyl jasmonate elicited cell suspension culture of *Rhodiola imbricata* (Edgew.). *Industrial Crops and Products,* 198, 2023,116667.

Sharma, M., Ahuja, A., Gupta, R., & Mallubhotla, S. (2015) Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors. *Natural Product Research, 29*, 745–749.

Sirvent, T., Gibson, D. (2002). Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 60*, 311-320.

Sirvent. T, Krasnoff, S.B., Gibson, D. (2003). Induction of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* in response to damage by herbivores. Journal of Chemical Ecology, *29*(12), 2667-81.

Soták, M., Czeranková, O., Klein, D., Jurčacková, Z., Li, L., & Čellárová, E. (2016). Comparative transcriptome reconstruction of four *Hypericum* species focused on hypericin biosynthesis. *Frontiers in Plant Sciences*, 7,1039. doi: 10.3389/fpls.2016.01039.

Su, H., Li, J., Chen, S., Sun, P., Xing, H., Yang, D., Zhang, X., Li, M., & Wei, J. (2021). Physiological and transcriptomic analysis provide insight into low temperature enhancing hypericin biosynthesis in *Hypericum perforatum*. *Molecules*, *26*(8), 2294. https://doi.org/10.3390/molecules26082294.

Tang, H., Hu, J., Zhao, M., & *et al.* (2023). Comparative study of the physiological responses, secondary metabolites, and gene expression of medicinal plant *Prunella vulgaris* L. treated with exogenous methyl jasmonate and salicylic acid. *Acta Physiol Plant*, *45*, 20. https://doi.org/10.1007/s11738-022-03498-0.

Volz, H.P. (2022). Hypericum and depression. In: Riederer, P., Laux, G., Nagatsu, T., Le, W., & Riederer, C. (eds) NeuroPsychopharmacotherapy. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62059-2_93.

Vuko, E., Dunkić, V., Ruščić, M., Nazlić, M., Mandić, N., Soldo, B., Šprung, M., Fredotović, Ž. (2021). Chemical composition and new biological activities of essential oil and hydrosol of *Hypericum perforatum* L. ssp. veronense (Schrank) H. Lindb. *Plants*. *10*(5):1014. https://doi.org/10.3390/plants10051014.

Walker, T.S., Bais, H.P., & Vivanco, J.M. (2002). Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry, 60*, 289-293.

Wurglics, M., & Schubert-Zsilavecz, M. (2006). *Hypericum perforatum*: a ‘modern’ herbal antidepressant: pharmacokinetics of active ingredients. *Clinical Pharmacokinetics, 45*, 449–468. doi: 10.2165/00003088-200645050-00002.

Zhou, W., Wang, S., Yang, L., Sun, Y., Zhang, Q., Li, B., Wang, B., Li, L., Wang, D., & Wang, Z. (2019). Reference genes for qRT-PCR normalisation in different tissues, developmental stages, and stress conditions of *Hypericum perforatum*. *PeerJ*, *7*, e7133. doi: 10.7717/peerj.7133

Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**
Vol. 4, No. 2, Autumn & Winter 2023, p. 291-306 **جلد ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان، ۱۴۰۲، صفحه ۳۰۶-۲۹۱**
Research Article **DOI:** 10.22034/PLANT.2024.141075.1091

Influence of methyl jasmonate on expression patterns of polyketide synthase genes in *Hypericum perforatum* L.

Asad Maroufi[1], Batoul Rahimi[2], Mohammad Majdi[1]

1. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2. MSc. graduate, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: 11-04-2024
Accepted: 01-05-2024

Abstract

St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) is a medicinal plant that is well known for its anti-depressant properties. Hypericin and hyperforin are the two active compounds that have the greatest medicinal value. Considering the importance of these compounds, it is necessary to have solutions to increase their production through biotechnology. Therefore, as preliminary study the expression of two key polyketide synthase genes including *HpPKS2* and *HpPKS1* in hypericin biosynthetic pathway was studied. Methyl jasmonate was used as elicitor to stimulate gene expression in concentrations of 0, 10 and 100 micromolar before flowering stage. Leaves and stems samples were then collected at 0, 12, 24 and 48 hours after MeJA treatment. The expression level of genes was examined by semi-quantitative RT-PCR method. The results showed that the expression level of both *HpPKS2* and *HpPKS1* genes were increased in leaf and stem tissues due to the application of MeJA, and at the concentrations of 10 and especially 100 µm, there was a significant difference with the control (0 concentration). Moreover, the expression level of both genes showed a rising trend in the time series of 0, 12, 24 and 48 hours after spraying MeJA in both tissues, and generally the greatest increase in expression was observed at 48 hours. The results of this study showed that both polyketide synthase genes are induced under the influence of methyl jasmonate and lead to their higher expression.

Keywords: Elicitor, gene expression, St. John's wort, biosynthetic pathway, hypericin

Citation: Maroufi, A., Rahimi, B., & Majdi, M. (2023). Influence of methyl jasmonate on expression patterns of polyketide synthase genes in *Hypericum perforatum* L. *Plant Production and Genetics*, 4(2), 291-306. https://doi.org/10.22034/PLANT.2024.141075.1091

Copyrights:
Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Corresponding Author Email: a.maroufi@uok.ac.ir