

مقاله پژوهشی

# تأثیر الیستور سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیکوشیمیایی و مولکولی بومادران معمولی (*Achillea millefolium* L.)

ساناز سیاهلو<sup>۱</sup>، عنایت‌اله یزدان‌پناه<sup>۱\*</sup>، حمید سبحانیان<sup>۱</sup>، پیمان آقایی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، علوم پایه، پیام‌نور واحد تهران شرق، تهران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، سازمان مرکزی دانشگاه پیام‌نور- مرکز امور بین‌الملل دانشگاه، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۶/۲۷)

## چکیده

با توجه به نقش سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات در تنظیم فرایندهای متابولیکی مهم و پتانسیل آنها در افزایش تولید ترکیبات زیستی مهم، تأثیر تیمار این دو هورمون بر صفات مختلف بومادران معمولی مورد بررسی قرار گرفت. نشاءهای حاصل از بذور تحت شرایط گلخانه در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شدند. سالیسیلیک اسید با غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار و متیل جاسمونات با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار به طور مجزا و ترکیبی، سه دفعه با فاصله ۱۵ روز یکبار بر روی برگ‌ها محلول‌پاشی شدند. بعد از اعمال آخرین تیمار، غلظت فنول‌ها و فلاونوئیدها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و رنگدانه‌های فتوسنتزی، بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز فنیل پروپانوییدها یعنی فنیل‌آلانین آمونیالایز (PAL) و کالکون سنتاز (CHS) و در نهایت عملکرد اسانس در گیاهان تیمار و شاهد مقایسه شدند. تجزیه واریانس گویای تأثیر معنی‌دار این دو هورمون بر صفات موردبررسی بود. به جزء تأثیر منفی متیل‌جاسمونات بر زیست‌توده (وزن خشک و ارتفاع) و کلروفیل و همچنین تأثیر منفی سالیسیلیک اسید بر کارتنوئیدها، تأثیر این دو هورمون بر سایر صفات مثبت بود. جالب اینکه در تیمار ترکیبی، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر اغلب صفات بوته‌های بومادران مشاهده شد. اثر تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات بر صفات مختلف تا حدودی متفاوت بود؛ با این حال، بیشترین عملکرد اسانس و بیان ژن‌های PAL و CHS با تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بدست آمد. در کل، تأثیر متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر بومادران وابسته به نوع صفت بود. با توجه به عملکرد اسانس، غلظت فنول‌ها و فلاونوئیدها و بیان ژن‌های PAL و CHS، تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید برای تقویت رشد بومادران معمولی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، گیاهان دارویی، متابولیت‌های ثانویه، هورمون

## مقدمه

فعال زیستی، خصوصیات درمانی متعددی نظیر فعالیت ضدتوموری، ضدعفونی‌کننده، ضد درد و مسکن، محرک گوارشی و کاهنده پرفشاری خون به بومادران اعطا کرده است. این ارزش‌های بالینی بومادران منجر به جلب توجه محققان به

بومادران معمولی (*Achillea millefolium* L.)، یک گیاه دارویی با ترکیبات مهمی نظیر کامفور، سمبرن، سینئول، آلفا پینن و لینالول است (Ali et al., 2017). وجود این ترکیبات

\*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: enayatallahyazdanpanah@yahoo.com

سمت ایده تقویت رشد و افزایش تولید ترکیبات فعال زیستی مهم آن شده است (Bashir et al., 2022). تاکنون، تکنیک‌های مختلفی به منظور تقویت شاخص‌های رشدی و افزایش غلظت ترکیبات فعال زیستی فلاونوئیدی و فنلی انجام شده است. در این میان، الیستورها با سازوکار تعدیل بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز فنیل پروپانویدها و تغییر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Yadav et al., 2020).

الیستورها عوامل غیرزیستی و زیستی متنوعی را در بر می‌گیرند که سبب بروز تغییرات چشمگیری در فرایندهای گوناگون فیزیولوژیکی و متابولسم متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (Naik and Al-Khayri, 2016). تعدیل بیوسنتز و تجزیه متابولیت‌های ثانویه در سلول‌ها در پی تیمار الیستورهای زیستی و غیرزیستی بدان خاطر می‌باشد که این زیست‌ترکیبات، کارکردهای دفاعی در گیاهان بر عهده دارند و در نتیجه سطح آن‌ها در پی اعمال الیستورها با تغییر محسوسی مواجه می‌شود (Dias et al., 2016). سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات از مهمترین الیستورهای شیمیایی به شمار می‌آیند که با مسیر پیام‌رسانی اختصاصی خود منجر به افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) و متعاقباً فعال‌سازی مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوییدی می‌شوند که پیامد آن، افزایش سطح ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی است (Hou and Tsuda, 2022). در واقع، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات، به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاهی و الیستورهای مؤثر شناخته می‌شوند که در پیام‌رسانی سلولی طی پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی انجام وظیفه می‌کنند. تأثیر این الیستورها بر فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاه وابسته به گونه گیاهی، مرحله نمو، غلظت به‌کاررفته و زمان تیمار است (Gilroy and Breen, 2022).

جهت تقویت رشد و افزایش غلظت متابولیت‌های ثانویه‌ای همچون فنیل پروپانویدها توسط الیستورها، نیاز به شناخت مسیر بیوسنتزی آن و شناسایی ژن‌های کلیدی درگیر در این مسیر است. فلاونوئیدها از طریق مسیر فنیل پروپانوئید بیوسنتز

می‌شوند که اسیدآمینو فنیل‌آلانین را به ۴-کوماروئیل-CoA تبدیل می‌کند (Naoumkina et al., 2010). فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) این مسیر را برای تولید متابولیت‌های مختلف از جمله فلاونوئیدها، فیتوآلکسین‌ها و کومارین‌ها کاتالیز می‌کند. در واقع، این آنزیم دآمیناسیون فنیل‌آلانین را برای تولید اسید ترانس سینامیک کاتالیز می‌نماید. در ادامه، سینامات ۴-هیدروکسیلاز و لیگاز ۴-کومارات کوآنزیم‌آ، تبدیل سینامیک اسید را به ترتیب به پی-کوماریول کوآ و ۴-کوماریول کوآ کاتالیز می‌کنند. این واسطه‌ها به‌نوبه خود می‌توانند به عنوان پیش‌ساز برای تولید ترکیبات فنیل پروپانوئید استفاده شوند (Anwar et al., 2021). آنزیم کالکون سنتاز (CHS)، اولین مرحله بیوسنتز فلاونوئیدها را با هدایت جریان کربن از مسیر عمومی فنیل پروپانوئید به مسیر فلاونوئید کاتالیز می‌کند. در واکنش کاتالیزشده توسط CHS، ستون فقرات کالکون با تبدیل ۴-کوماروئیل-CoA تولید می‌شود تا به عنوان پیش‌ماده برای بیوسنتز فلاونوئیدها استفاده شود (Anwar et al., 2021).

تاکنون، پژوهش‌های محدودی در حوزه محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات و تعیین اثرات آنها بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی انجام شده است. برای مثال، Capite و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که کاربرد خارجی هورمون سالیسیلیک اسید می‌تواند باعث افزایش دو برابری غلظت گلیکوزیدهای تربنوییدی در گیاه دارویی کوهوش سیاه (*Actaea racemosa*) شود. همچنین، Yang و همکاران (۲۰۱۲) مدارکی دال بر این امر ارائه دادند که استفاده از محلول‌پاشی متیل جاسمونات می‌تواند باعث افزایش زیست‌ترکیب تانشینون در گیاه دارویی مریم‌گلی (*Salvia miltiorrhiza*) شود. از میان سازوکارهای مختلف الیستوری، افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی بیشتر مورد توجه محققان بوده است. برای مثال، Anjalani و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند که متیل جاسمونات بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز در گیاه ژینورا (*Gynura pseudochina*) اثر مثبت می‌گذارد. علاوه‌براین، Khattab و همکاران (۲۰۲۲) دریافتند که اسید سالیسیلیک بیان کالکون سنتاز را در گیاه خار مریم

(*Silybum marianum*) افزایش می‌دهد.

علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه، الیستورها بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی نظیر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و رنگدانه‌های فتوسنتزی تأثیر می‌گذارند. در پژوهشی بر روی بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر مورفولوژیکی سرخارگل (*Echinacea purpurea*)، DASTYAR و همکاران (۲۰۱۹) دریافتند که تیمار برگ‌های اسید سالیسیلیک ۲ میلی‌مولار سبب افزایش صفات مورفولوژیکی مثل ارتفاع می‌شود درحالی‌که متیل جاسمونات تأثیر منفی بر صفات موردنظر دارد. همچنین، Ghasimi و همکاران (۲۰۱۸)، دریافتند که سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات سبب افزایش غلظت فنل کل و ترکیبات فنولیک در گیاه دارویی نوروژک (*Salvia terrifolia*) شدند. در مطالعه‌ای دیگر، Hashemyan و همکاران (۲۰۲۰) نیز آشکار ساختند که الیستورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید موجبات تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کلپوره نمدی (*Teucrium polium*) را فراهم می‌کنند. در نهایت، Zare-Hassani و همکاران (۲۰۱۹) هم به این نتیجه رسیدند که اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات میزان کلروفیل و کاروتنوئیدهای را در برگ‌های کاکوتی (*Ziziphora persica*) افزایش می‌دهد.

با توجه به آنچه گفته شد، این مطالعه با هدف تعیین اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی، فیزیکیوشیمیایی و مولکولی بومادران معمولی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی و آزمایش:** بذرهای بومادران معمولی از شرکت پاکان بذر تهیه شد. روش ضدعفونی Kanatas و همکاران (۲۰۲۰) با اندکی تغییرات استفاده شد. جهت ضدعفونی، بذر بومادران به مدت سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳٪ قرار گرفته و سه بار با آب مقطر شستشو شدند. در ادامه، بذرها در سینی نشاء کشت شدند و بعد از گذشت یک ماه، نشاءهای حاصل (سه نشاء به ازای هر کیسه) در کیسه‌های پلاستیکی دارای خاک برگ پوسیده، خاک باغچه، ماسه‌بادی با نسبت

۱:۱:۱ (Salimi et al., 2017) تحت شرایط گلخانه در قالب فاکتوریل طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شدند. خصوصیات فیزیکیوشیمیایی بستر کشت بذر عبارت بودند از: اسیدیته ۷/۴، هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر) ۰/۷۹، نیتروژن ۰/۱٪، پتاسیم ۲۳۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و فسفر ۱/۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم. بر اساس پیشنهاد مطالعات گذشته، شرایط گلخانه به شکل فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی (Shafie et al., 2021)، دمای میانگین ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب شبانه و روزانه (عموی و همکاران، ۱۳۹۵)، رطوبت نسبی ۶۰ درصد (Dehghan and Rahimmalek, 2018) (با استفاده از رطوبت‌سنج و بهره‌گیری از مه‌پاش و کنترل تهویه گلخانه) تنظیم شد.

**تیمارهای آزمایشی:** غلظت‌های هورمونی (Dastyar et al., 2019)، زمان اولین تیمار بعد از استقرار گیاه، تعداد دفعات و فواصل زمانی تیمارها (Bayat et al., 2021) بر اساس مطالعات گذشته انتخاب شدند. یک ماه بعد از انتقال نشاءها به گلدان‌ها، تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار و متیل جاسمونات با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار به طور مجزا و ترکیبی در سه دفعه با فاصله ۱۵ روز یکبار بر روی برگ گیاهان بومادران معمولی محلول‌پاشی شدند. ۳۰ شبانه روز بعد از اعمال آخر تیمار، نمونه‌گیری از برگ‌ها صورت گرفت. برگ گیاهان بدون تیمار (شاهد) نیز با آب مقطر استریل تحت محلول‌پاشی قرار گرفت. تا زمان اجرای آنالیز مولکولی، نمونه‌های برگ‌های در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگه‌داری شدند.

**اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی و فیزیکیوشیمیایی:** ۳۰ شبانه‌روز بعد از اعمال آخر تیمار، تمام ارزیابی‌ها مورفولوژیکی و فیزیکیوشیمیایی انجام شد چرا که بومادران هم به اندازه کافی فنول‌ها و فلاونوئیدها را تولید می‌کند و هم به اندازه کافی رشد کرده است که صفات مورفولوژیکی و فیزیکیوشیمیایی معیار سنجش پاسخ بومادران به تیمار هورمونی باشند (Afshari and Rahimmalek, 2017).

**صفات مورفولوژیکی:** صفات مرتبط با زیست‌توده نظیر

1999, *al.*). محتوی کل فلاونوئیدها بر حسب میلی گرم کاتچین در گرم وزن خشک نمونه توسط منحنی استاندارد غلظت‌های کاتچین مختلف (۱۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر) برآورد شد.

**محتوی رنگدانه‌های فتوسنتزی:** غلظت کلروفیل و کاروتنوئید بر اساس روش Arnon (۱۹۴۹) سنجش شد. برای تعیین جذب نمونه‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید. اسپکتروفتومتر با استون ۸۰ درصد کالیبره و میزان جذب عصاره در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر تعیین شد تا متعاقباً میزان کلروفیل و کاروتنوئید محاسبه شود.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها از طریق نرم‌افزار Excel انجام شد. آنالیز واریانس به طریق ANOVA و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد.

**بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) و کالکون سنتاز (CHS)، استخراج RNA و سنتز cDNA:** لازم به ذکر است که به دلیل اختصاصیت کیت‌ها برای گیاهان، تغییراتی در رویه اجرایی آنها (برای مسائلی مثل حضور فنل‌ها) اعمال نشد. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA ستونی دنایست و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. برای اطمینان از خلوص RNA، نسبت‌های جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد. همچنین، برای اطمینان از یکپارچگی RNA، الکتروفورز ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد صورت پذیرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA دنایست و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. جهت تأیید سنتز cDNA، PCR با استفاده از آغازگرهای ژن کنترل داخلی فاکتور گسترش (Elongation Factor) (EF Forward: GCTTTACCTCCCAAGTCATCATC و EF Reverse: GGCTCCTTCTCAATCTCCTTACC) و مطابق با برنامه (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) انجام شد.

**Real-Time PCR:** ابتدا، توالی ژن‌های PAL و CHS از سایت NCBI جمع‌آوری و آغازگرهای اختصاصی از طریق

وزن خشک اندام هوایی و ارتفاع گیاه به ترتیب با استفاده از ترازو و خط‌کش اندازه‌گیری شدند.

### صفات فیزیکی و بیوشیمیایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل:

توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) تعیین شد. این روش بر اساس کاهش کمپلکس فریک تری‌پیریدیل تری‌آزین (TPTZ) به فرس در مجاورت آنتی‌اکسیدان‌ها است. به طور خلاصه، ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن سه‌آبه، ۱۰ میلی‌مولار TPTZ در ۴۰ میلی‌مولار HCl و ۳۰۰ میلی‌مولار بافر استات سدیم باهم ترکیب شدند. سپس، ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی مخلوط شد. در ادامه، جذب محلول در ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. محتوی آنتی‌اکسیدانی بر اساس میلی‌گرم محلول سولفات آهن II در گرم وزن خشک توسط منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف محلول سولفات آهن II (۱۰ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برآورد شد.

**عصاره‌گیری ترکیبات فنلی:** جهت تهیه عصاره فنولی، ۰/۱ گرم از پودر برگی خشک هر نمونه با ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (حجمی/حجمی) مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و تحت دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

### محتوی فنل کل: محتوی فنل‌های کل با تکنیک Singleton

و همکاران (۱۹۹۹) تعیین شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکروگرم در لیتر عصاره متانولی برگ با ۱ میلی‌لیتر فولین سیوکالچو و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و بعد از گذشت سه دقیقه، ۱ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (وزنی/حجمی) به آن افزوده شد. بعد از ۴۵ دقیقه، جذب نوری در ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. محتوی فنل کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه توسط منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های گالیک اسید مختلف (۱۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) برآورد شد.

**محتوی فلاونوئید کل:** محتوی فلاونوئیدهای کل بر مبنای سنجش کالریمتری آلومینیوم کلرید بررسی شد (Zhishen et

جدول ۱- جفت آغازگرهای ژن‌های PAL و CHS

| نام         | توالی آغازگر            | طول قطعه تکثیری |
|-------------|-------------------------|-----------------|
| PAL Forward | GCAAGGAAAGCCCGAGTTTAC   | ۷۶۰             |
| PAL Reverse | GGACCTTTTGGCTACTTGGC    |                 |
| CHS Forward | CCCGATTACTATTTTCGGATCAC | ۶۱۰             |
| CHS Reverse | CGAGTGAATCAAGGTGAGTGTC  |                 |

مطالعه بوته‌های بومادران داشتند (جدول ۲ و ۳).

#### صفات ریخت‌شناسی: متیل‌جاسمونات سبب کاهش

معنی‌دار وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران شد. این اثر کاهش و وابسته به دوز هورمون بود به‌طوری‌که با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات، کاهش بیشتری در وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران مشاهده شد. در این راستا، غلظت ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات منجر به افت حدود ۵۰ درصدی وزن خشک و همچنین افت حدود ۳۰ درصدی ارتفاع بوته‌های بومادران شد (شکل ۱). سالیسیلیک اسید اثر معکوس متیل‌جاسمونات را بر وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران به نمایش گذاشت و باعث افزایش این دو صفت زراعی شد. این اثر افزایشی وابسته به دوز سالیسیلیک اسید بود به‌نحوی‌که با افزایش غلظت هورمون، افزایش بیشتری در وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران ثبت شد. در این راستا، غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید باعث افزایش حدود ۶۰ درصدی وزن خشک و ۵۵ درصدی ارتفاع بوته‌های بومادران شد (شکل ۱). در تیمار ترکیبی، اثر میانکنشی متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران مشاهده شد. به‌طوری‌که در غلظت ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل‌جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) باعث کاهش ارتفاع بوته‌های بومادران شد درحالی‌که در غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل‌جاسمونات باعث افزایش ارتفاع بوته‌های بومادران شد. در حضور سالیسیلیک اسید، هر دو غلظت متیل‌جاسمونات اثر منفی بر وزن خشک داشتند. ناگفته نماند که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید (از ۱ به ۲ میلی‌مولار)، از اثر منفی متیل‌جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی کاسته شد. بنابراین،

نرم‌افزار PREMIER Biosoft AlleleID v7.7 برای هر ژن طراحی شدند. با توجه به  $T_m$ ، درصد GC، وجود ساقه‌حلقه و دایمرها، بهترین آغازگرهای گزینش شدند (جدول ۱). جهت تعیین بیان ژن‌های PAL و CHS در گیاهان تیمار و شاهد، از واکنش Real Time - PCR استفاده شد. از کیت مسترمیکس سایبرگرین ریل‌تایم دنایزیت برای انجام واکنش به شرح ذیل استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از cDNA رقیق به عنوان الگو در واکنش (شامل ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشتی، ۶/۵ میکرولیتر آب DEPC و ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix) استفاده شد. چرخه حرارتی واکنش Real Time PCR عبارت بود از: واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای مربوطه برای ۱۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه. جهت بررسی تغییرات کمی بین نمونه تیمار و شاهد، از روش کمی‌سازی نسبی  $\Delta\Delta CT$  (Livak's Method) استفاده شد.

**تعیین میزان اسانس:** جهت اسانس‌گیری از گیاه بومادران، نمونه‌های گیاهی در تاریکی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. در ادامه، پیکره رویشی نمونه‌های گیاهی از طریق آسیاب سرامیکی خرد و مخلوط شد. برای هر تکرار و تیمار، عملیات اسانس‌گیری از نمونه‌های ۲۵ گرمی با دستگاه کلونجر و سه ساعت بعد از جوش‌آمدن انجام شد. بر مبنای وزن خشک نمونه‌ها، درصد اسانس (وزن اسانس/ماده خشک  $\times 100$ ) نمونه‌های بومادران برآورد شد.

#### نتایج و بحث

در این مطالعه، اثر اصلی سالیسیلیک اسید، اثر اصلی متیل‌جاسمونات و اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌داری بر صفات مورد

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات خصوصیات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و بیان ژن بومادران معمولی

| منابع تغییر                    | درجه آزادی | ارتفاع بوته | وزن خشک بوته | میانگین مربعات |                   |
|--------------------------------|------------|-------------|--------------|----------------|-------------------|
|                                |            |             |              | محتوی فنول     | محتوی فلاونوئیدها |
| سالیسیلیک اسید                 | ۲          | ۱۲۸/۵۸**    | ۰/۴۷**       | ۱۴۴۲/۹۴**      | ۹۳۶/۱۵**          |
| متیل جاسمونات                  | ۲          | ۹۶/۰۴**     | ۰/۳۱**       | ۲۶۸۸/۰۶**      | ۲۱۲۳/۸۷**         |
| سالیسیلیک اسید × متیل جاسمونات | ۴          | ۳۰/۶۰**     | ۰/۰۰۵*       | ۱۱۴/۳۳*        | ۳۸/۸۰**           |
| خطا                            | ۱۸         | ۴/۱۹        | ۰/۰۰۱        | ۲۶/۳۳          | ۸/۰۳              |
| ضریب تغییرات                   | -          | ۱۱/۰۰       | ۸/۵          | ۹/۶۶           | ۶/۲۳              |

\* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد است.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات خصوصیات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و بیان ژن بومادران معمولی

| منابع تغییر                    | درجه آزادی | کلروفیل a | کلروفیل b | کلروفیل کل | کاروتنوئید | میانگین مربعات |         |
|--------------------------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|----------------|---------|
|                                |            |           |           |            |            | اسانس          | بیان ژن |
| CHS                            | PAL        | بیان ژن   | CHS       | PAL        | بیان ژن    | CHS            | PAL     |
|                                |            |           |           |            |            |                |         |
| سالیسیلیک اسید                 | ۲          | ۰/۰۰۱**   | ۰/۰۰۲۶**  | ۰/۰۰۶۴**   | ۰/۰۰۲۲**   | ۰/۰۸۲**        | ۹/۲۴**  |
| متیل جاسمونات                  | ۲          | ۰/۰۰۰۵**  | ۰/۰۰۳۲**  | ۰/۰۰۶۳**   | ۰/۰۰۳۱**   | ۰/۱۳**         | ۱/۳**   |
| سالیسیلیک اسید × متیل جاسمونات | ۴          | ۰/۰۰۰۰۶*  | ۰/۰۰۰۲**  | ۰/۰۰۰۵۶**  | ۰/۰۰۰۰۶*   | ۰/۰۹۸**        | ۰/۵۶**  |
| خطا                            | ۱۸         | ۰/۰۰۰۰۲   | ۰/۰۰۰۰۴   | ۰/۰۰۰۰۸    | ۰/۰۰۰۰۲۲   | ۰/۰۱۹          | ۰/۰۱۳   |
| ضریب تغییرات                   | -          | ۱۸/۲۸     | ۱۵/۹۵     | ۱۴/۱۰      | ۱۵/۰۴      | ۱۸/۳۰          | ۴/۵     |

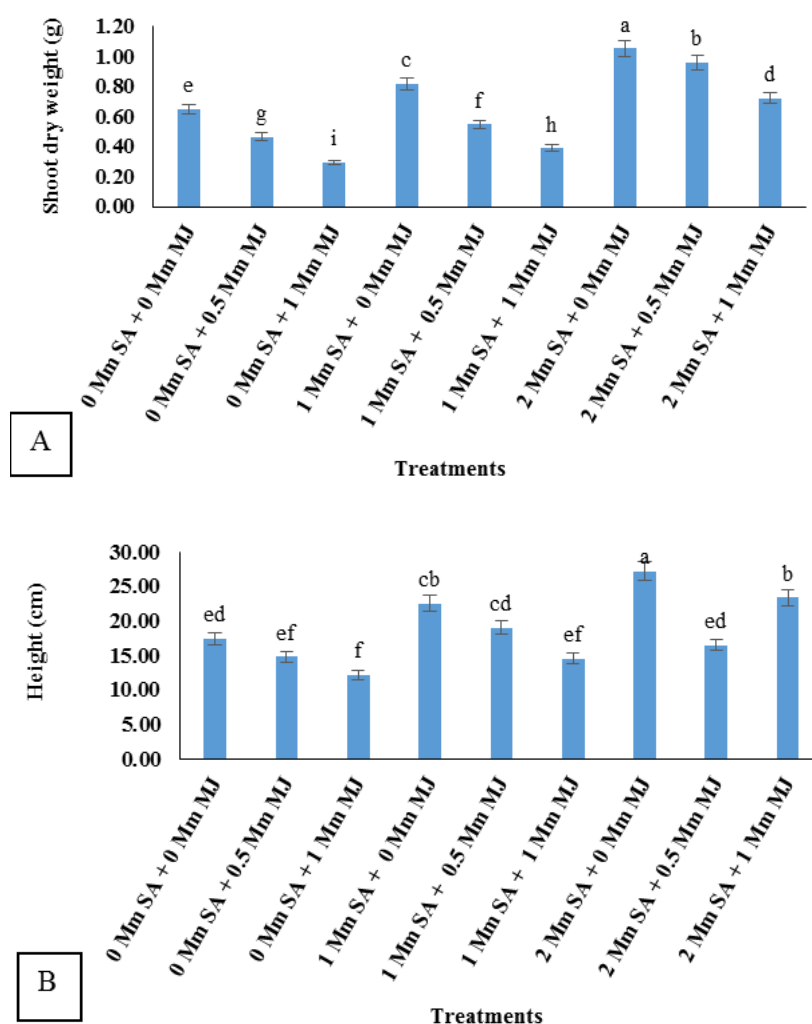
\* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد است.

استفاده از غلظت بیشتر سالیسیلیک اسید برای خنثی‌سازی اثر منفی متیل جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی حائز اهمیت است (شکل ۱).

به نظر می‌رسد که سالیسیلیک اسید با تأثیرگذاری بر مسیرهای پیام‌رسانی سبب تحریک تقسیم سلولی و گسترش سلولی می‌شود و از این طریق منجر به افزایش زیست‌توده گیاهی در قالب ارتفاع و وزن اندام هوایی می‌شود (Hayat et al., 2020). هم‌راستا با نتایج ما، Dastyar و همکاران (۲۰۱۹)، تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات را بر خصوصیات مورفولوژیکی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بررسی نمودند. محققان متوجه شدند که تیمار برگ‌های اسید سالیسیلیک ۲ میلی‌مولار سبب افزایش ارتفاع می‌شود و متیل

جاسمونات تأثیر منفی بر صفات موردنظر دارد. بنابراین، نویسندگان پیشنهاد کردند که کاربرد ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک سبب بیشترین مقدار ارتفاع می‌شود.

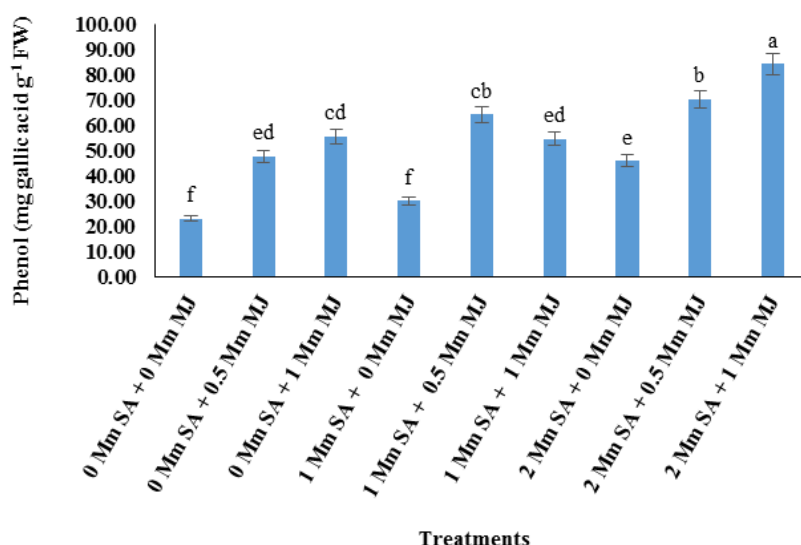
**صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، محتوی فنول: تأثیر هم‌راستا و هم‌افزا متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر محتوی فنول در بوته‌های بومادران مشهود بود. متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید هر دو باعث افزایش معنی‌دار محتوی فنول در بوته‌های بومادران شدند. این تأثیر افزایشی وابسته به دوز هر دو هورمون بود به شکلی که با افزایش غلظت آنها، افزایش بیشتری در غلظت فنول بوته‌های بومادران مشاهده شد. در این راستا، غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به ترتیب**



شکل ۱- وزن خشک (A) و ارتفاع (B) بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

هم‌راستا با مطالعه ما، Ghasimi و همکاران (۲۰۱۸)، اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات را بر تولید ترکیبات فنولیک در گیاه دارویی نوروبک (*Salvia lerrifolia*) بررسی کردند. بالاترین فنل با ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بدست آمد. همچنین، افزایش سطح سالیسیلیک اسید سبب افزایش محتوی فنل کل شد. محققان پیشنهاد کردند که الیسیطورهای فوق سبب افزایش ترکیبات فنولیک می‌شود. در رابطه با مکانیزم‌های پشت پرده تأثیرگذاری متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر سطح ترکیبات فنولی می‌توان اینگونه استنباط کرد که آنها باعث تحریک سیستم ایمنی گیاه در مواجهه با شرایط نامطلوب محیطی می‌شوند و بالطبع گیاه برای پاسخ به چنین شرایطی اقدام به تولید ترکیبات ثانویه‌ای همچون

منجر به افزایش ۱/۵ برابری و ۹۸ درصدی محتوی فنول در بوته‌های بومادران شدند (شکل ۲). در تیمار ترکیبی، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر محتوی فنول بوته‌های بومادران رخ داد. به‌طوری‌که در غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات، افزایش غلظت سالیسیلیک اسید (از ۱ به ۲ میلی‌مولار) باعث افزایش بیشتر غلظت فنول بومادران شد. بیشترین غلظت فنول در تیمار ترکیبی ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد که گویای اثر هم‌افزایی قوی این دو هورمون با یکدیگر است. بنابراین اینگونه می‌توان استنباط کرد که استفاده از غلظت بیشتر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات برای حصول حداکثر سطح ترکیبات فنولی حائز اهمیت است (شکل ۲).



شکل ۲- محتوی فنول بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

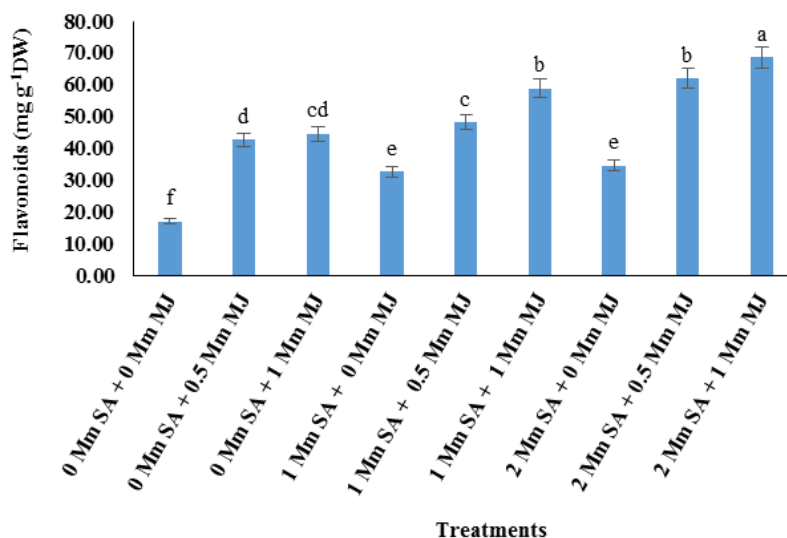
سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات منجر به افزایش بیشتر سطح ترکیبات فلاونوئیدی می‌شود (شکل ۳).

در توافق با مشاهدات ما، Mendoza و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر افزایش تولید ترکیبات فلاونوئیدی را در کشت‌های سوسپانسیون سلول گیاهی خرزهره (*T. peruviana*) مطالعه کردند. بر مبنای یافته‌ها، بالاترین سطح ترکیبات فلاونوئیدی تحت تیمارهای ۳ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۳۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک به دست آمد. مکانیزم‌های تأثیرگذاری متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر سطح ترکیبات فلاونوئیدی شبیه به ترکیبات فنلی هستند چرا که مسیرهای بیوسنتزی آنها با هم همپوشانی دارد. اما اینکه چگونه اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات با هم در القا پاسخ افتراقی گیاهان فعالیت می‌کنند خود موضوعی بحث‌برانگیز است که شامل تلاقی آبخارهای پیام‌رسانی مختلف باهم می‌شود (Monte, 2023).

**ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی:** در بوته‌های بومادران، اثر هم‌راستا و گاهی غیرهم‌راستا متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی مشاهده شد. هورمون‌های متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید هر دو موجبات افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی را در بومادران فراهم کردند با این اختلاف که این اثر افزایشی وابسته به دوز بود. به‌طوری‌که با

فنول‌ها می‌کند که نقش مهمی در پاسخ به محرک‌های داخلی و خارجی گیاه ایفا می‌کنند (Mendoza et al., 2018).

**محتوی فلاونوئیدها:** در بوته‌های بومادران، اثر هم‌راستا و هم‌افزا متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر محتوی فلاونوئیدها واضح بود. هورمون‌های متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید هر دو منجر به افزایش معنی‌دار محتوی فلاونوئیدها شدند. چنین اثر افزایشی وابسته به دوز متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بود به‌صورتی که با افزایش سطح آنها، افزایش بیشتری در غلظت فلاونوئیدهای بوته‌های بومادران رخ داد. غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به ترتیب سبب افزایش حدود ۱/۶ برابری و ۹۷ درصدی محتوی فلاونوئیدها شدند (شکل ۳). در کاربرد توأم هورمون‌ها، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر محتوی فلاونوئیدها بومادران مشاهده شد. به‌صورتی که در غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات، افزایش غلظت سالیسیلیک اسید (از ۱ به ۲ میلی‌مولار) سبب افزایش بیشتر فلاونوئیدها بوته‌های بومادران شد. بیشترین غلظت فلاونوئیدها در تیمار ترکیبی ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید رخ داد که حاکی از اثر هم‌افزایی قوی این دو هورمون با یکدیگر است. در نتیجه، می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که کاربرد غلظت بیشتر



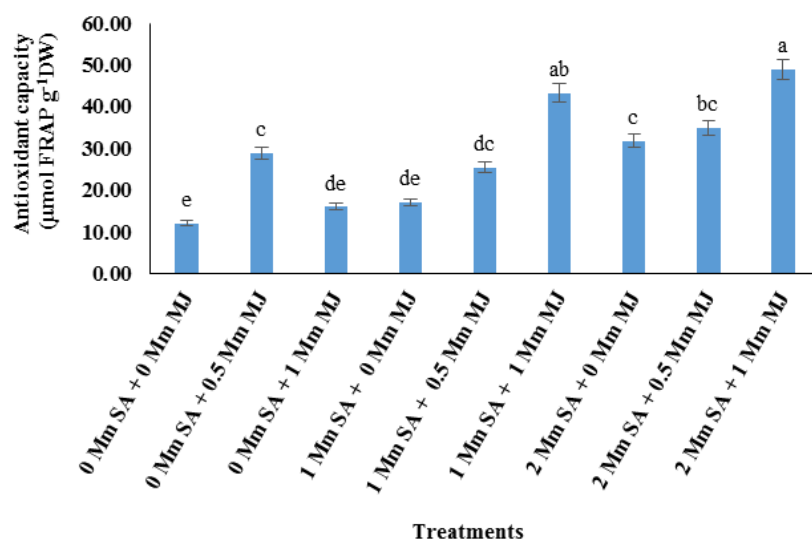
شکل ۳- محتوی فلاونوئیدهای بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

تأثیر این هورمون‌ها باید گفت که تیمار با مولکول‌های سیگنالینگ مثل متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید تولید  $H_2O_2$  را القا می‌کند که به نوبه خود باعث سنتز یا فعال کردن فاکتورهای رونویسی درگیر در بیان سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Jeyasri et al., 2023).

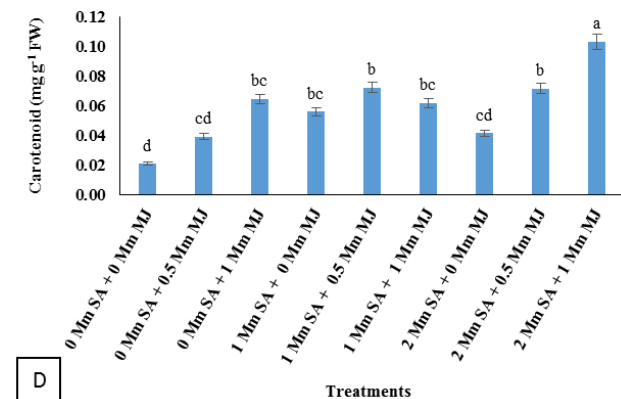
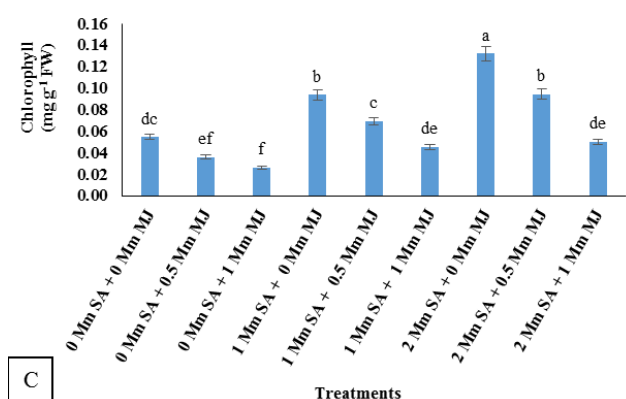
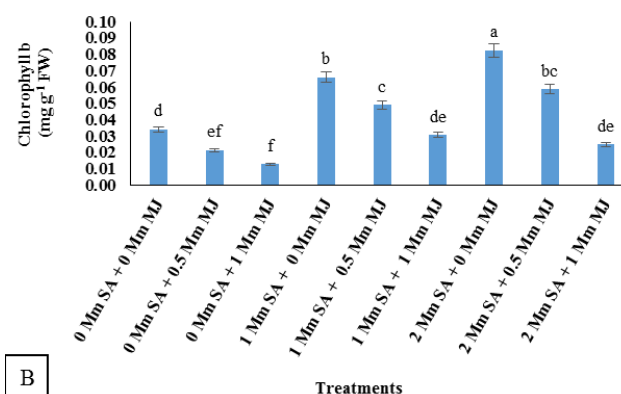
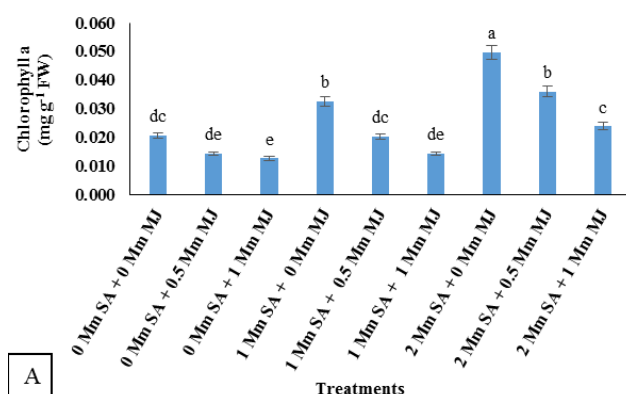
**کلروفیل:** سالیسیلیک اسید سبب افزایش معنی‌دار محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل بوته‌های بومادران شد. این اثر افزایشی وابسته به دوز هورمون بود بدین صورت که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، افزایش بیشتری در محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل بوته‌های بومادران مشاهده شد. غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید منجر به افزایش حدود ۱۲۰ درصدی محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل بومادران شد (شکل ۵). متیل جاسمونات اثر معکوس سالیسیلیک اسید را بر محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل بومادران به نمایش گذاشت و باعث کاهش این سنجش‌ها شد. این اثر کاشی وابسته به دوز متیل جاسمونات بود به نحوی که با افزایش غلظت هورمون، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل کاهش بیشتری یافت. در این راستا، غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات سبب کاهش ۷۰ درصدی کلروفیل‌ها شد (شکل ۵). در کاربرد توأم هورمون‌ها، اثر تقابلی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر مقدار کلروفیل a،

افزایش سطح متیل جاسمونات، روند افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوته‌های بومادران متوقف شد. این درحالی است که اثرگذاری سالیسیلیک اسید به نحوی دیگر بود یعنی با افزایش سطح آن، بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی افزوده شد (شکل ۴). در استفاده همزمان از هورمون‌ها، متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید اثر هم‌افزا بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوته‌های بومادران داشتند. در ترکیب تیماری، در غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات، افزایش غلظت سالیسیلیک اسید (از ۱ به ۲ میلی‌مولار) منجر به افزایش بیشتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوته‌های بومادران شد. بر این اساس، تیمار ترکیبی ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید منجر به حصول بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شد که نشان از اثر هم‌افزایی قوی این دو هورمون گیاهی دارد. بنابراین، استفاده از غلظت بالاتر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات سبب افزایش بیشتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (شکل ۴).

در مطالعه‌ای مشابه، Hashemyan و همکاران (۲۰۲۰)، تأثیر الیستورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید را بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کلپوره نمدی (*Teucrium polium*) بررسی کردند. نویسندگان پیشنهاد کردند که استفاده از غلظت بالاتر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات نقش مفیدی در تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارد. در رابطه با مکانیزم



شکل ۴- ظرفیت آنتی اکسیدانتی بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات



شکل ۵- رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئید (D) بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

غلظت بیشتر سالیسیلیک اسید منجر به ارمغان سطح بالاتری از مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل می‌شود که باید با غلظت کمتر متیل جاسمونات (یعنی ۰/۵ میلی‌مولار) استفاده

کلروفیل b، کلروفیل کل بومادران مشاهده شد. این تقابل به گونه‌ای بود که افزایش غلظت متیل جاسمونات تأثیر مثبت سالیسیلیک اسید را بیشتر خنثی کرد. با تمام این اوصاف،

شود (شکل ۵).

دلیل کاهش محتوی کلروفیل ناشی از تیمار متیل جاسمونات را می‌توان اینگونه توجیح کرد که این هورمون سبب القا فعالیت آنزیم کلروفیلز می‌شود که این آنزیم نقش کلیدی در تجزیه کلروفیل بر عهده دارد. همچنین، متیل جاسمونات باعث کاهش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز کلروفیل (*CHLD, CHLH, CHLI, PORB*) می‌شود (Kim et al., 2023). در مقابل، اسید سالیسیلیک نقش آنتی‌اکسیدانی مهمی ایفا می‌کند و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌دهد و در نتیجه سنتز کلروفیل را افزایش می‌دهد (Arruda et al., 2023).

**کاروتنوئید:** متیل جاسمونات اثر معکوس سالیسیلیک اسید بر غلظت کاروتنوئیدهای برگ‌ها به نمایش گذاشت و سبب افزایش غلظت کاروتنوئیدها شد. این اثر افزایشی وابسته به دوز متیل جاسمونات بود به‌نحوی که با افزایش غلظت هورمون، غلظت کاروتنوئیدها افزایش بیشتری یافت. غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات سبب افزایش ۲/۹ برابری کاروتنوئیدها شد (شکل ۵). در کاربرد توأم هورمون‌ها، معلوم شد که غلظت سالیسیلیک اسید در اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید مهم است. در غلظت ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، محتوی کاروتنوئیدها با افزایش غلظت متیل جاسمونات کاهش یافت درحالی که در غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، با افزایش غلظت متیل جاسمونات، سطح کاروتنوئیدها افزایش یافت (شکل ۵).

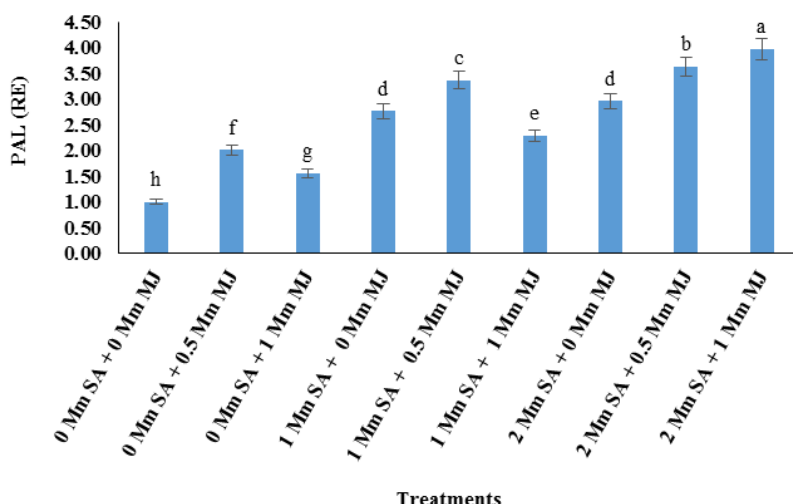
در پژوهشی مشابه، Zare-Hassani و همکاران (۲۰۱۹)، تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات را بر کلروفیل و کاروتنوئیدهای برگ‌های کاکوتی (*Ziziphora persica*) بررسی کردند. محققان پیشنهاد کردند که اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات از پتانسیل بالایی در تحریک بیوسنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی برخوردار هستند. یافته‌های ما با مشاهدات این مطالعه مطابقت دارد به‌طوری که غلظت پایین متیل جاسمونات برای کلروفیل و غلظت پایین اسید سالیسیلیک برای

کاروتنوئیدها مناسب‌تر است. دلیل تأثیر منفی سالیسیلیک اسید و تأثیر مثبت متیل جاسمونات بر محتوی کاروتنوئیدها را می‌توان اینگونه توجیح کرد که این هورمون‌ها به واسطه نقش کلیدی خود در مسیرهای پیام‌رسانی، بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز کلروفیل و کاروتنوئیدها را تغییر می‌دهند و از این طریق سبب کاهش یا افزایش سطح آنها در گیاه می‌شوند. متیل جاسمونات با افزایش بیان ژن‌های *PSY, PDS, BKT* و سالیسیلیک اسید با کاهش بیان آنها سبب تغییر غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شوند (Ali, 2021).

#### سطح رونوشت‌های ژن‌های *PAL* و *CHS*. بیان ژن

***PAL*:** فنیل آلانین آمونیا لایز (*PAL*) یکی از آنزیم‌های شناخته‌شده است که اولین مرحله مسیر فنیل پروپانوید را برای تولید متابولیت‌های مختلف از جمله فلاونوئیدها، فیتوآلکسین‌ها و کومارین‌ها کاتالیز می‌کند. در بوته‌های بومادران، اثر هم‌راستا و هم‌افزا متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر بیان ژن *PAL* مشاهده شد. هورمون‌های متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید هر دو منجر به افزایش بیان ژن *PAL* در بومادران شدند. با این تفاوت که افزایش غلظت متیل جاسمونات از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار باعث کاهش بیان ژن *PAL* شد درحالی که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از ۱ به ۲ میلی‌مولار همچنان به افزایش بیان ژن *PAL* ختم شد. غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید سبب افزایش حدود ۳/۸ برابری بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لایز در بومادران شد (شکل ۶). در کاربرد توأم هورمون‌ها، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لایز بومادران در غلظت بالای سالیسیلیک اسید مشاهده شد. به صورتی که در غلظت ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب کاهش بیان ژن *PAL* شد. در حالی که، در غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب افزایش بیان ژن *PAL* شد. علاوه بر این، غلظت ۲ میلی‌مولار نسبت به ۱ میلی‌مولار تأثیر مثبت بیشتری بر بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لایز داشت (شکل ۶).

هم‌راستا با یافته‌های ما، Chen و همکاران (۲۰۰۶) تأثیر



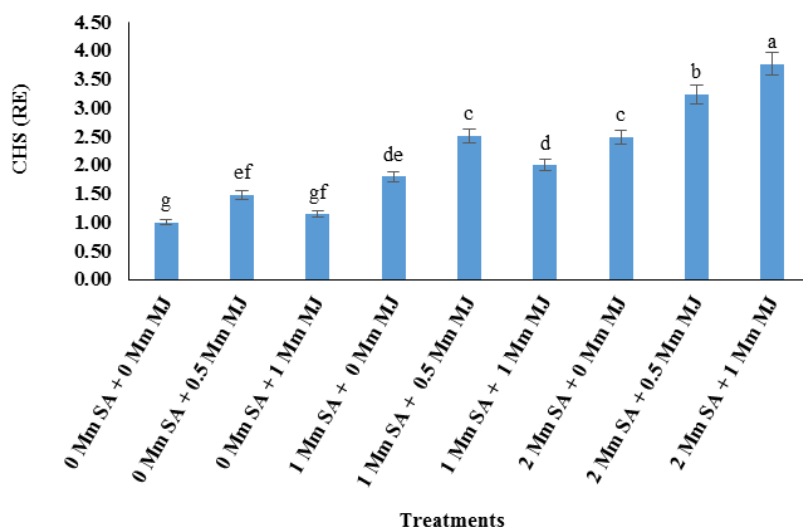
شکل ۶- بیان ژن PAL در بوته‌های بومادران تحت تیمار سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

هم‌راستا سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر بیان ژن *CHS* در بوته‌های بومادران مشاهده شد. هورمون‌های سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات هر دو سبب افزایش بیان ژن کالکون سنتاز شدند. با این تفاوت که افزایش غلظت متیل جاسمونات از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار باعث کاهش بیان ژن *CHS* شد. این در حالی است که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از ۱ به ۲ میلی‌مولار همچنان به افزایش بیان ژن *CHS* ختم شد. سطح ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید باعث افزایش حدود ۲/۵ برابری بیان ژن کالکون سنتاز در بومادران شد (شکل ۷). در استفاده همزمان از هورمون‌ها، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر بیان ژن کالکون سنتاز مشاهده شد. به صورتی که در هر دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب افزایش بیان ژن *CHS* شد (شکل ۷).

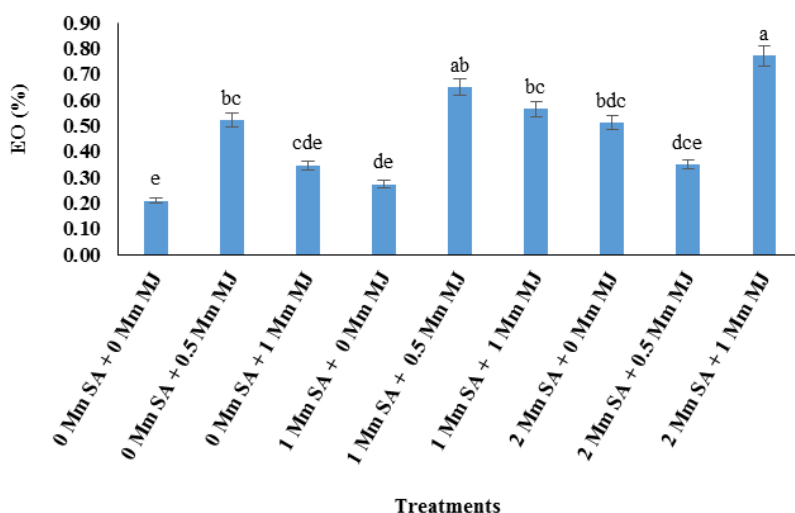
هم‌راستا با مشاهدات ما، Khattab و همکاران (۲۰۲۲) تأثیر اسید سالیسیلیک را بر بیان ژن *CHS* در گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که هر دو غلظت اسید سالیسیلیک باعث افزایش بیان همزمان ژن‌های *CHS* ۱، ۲ و ۳ شدند. همچنین، He و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر متیل جاسمونات بر بیان رونوشت *CtCHS2* و *CtCHS4* توسط qRT-PCR را بررسی کردند. بیان *CtCHS4* در پاسخ به MeJA به طور قابل توجهی افزایش یافت، درحالی‌که بیان

سالیسیلیک اسید بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز را در گیاه انگور (*Vitis vinifera*) مورد بررسی قرار دادند. محققان دریافتند که سالیسیلیک اسید می‌تواند تجمع mRNA PAL را القا کند و در نتیجه، میزان پروتئین PAL و فعالیت را افزایش دهد. چنین مجموعه‌ای از حوادث به نوبه‌خود سبب تجمع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌شود. همچنین، Anjalani و همکاران (۲۰۲۴) تأثیر متیل جاسمونات بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز را در گیاه ژینورا (*Gynura pseudochina*) مورد بررسی قرار دادند. محققان نشان دادند که کاربرد متیل جاسمونات ۱۵۰ میکرومولار منجر به بیان بیشتر ژن *PAL* نسبت به گیاهان کنترل می‌شود. بنابراین، MeJA به طور بالقوه تولید ترکیبات فلاونوئیدی را توسط القای بیان *PAL* افزایش می‌دهد. از نظر مکانیزم درگیر در تأثیرگذاری متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز می‌توان اینگونه استنباط کرد که این هورمون‌ها سبب القا آبشارهای پیام‌رسانی مربوط به پاسخ گیاه به شرایط تنش می‌شوند و با القا بیان ژن *PAL* سبب تحریک بیوستز ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی می‌شوند (Chen et al., 2006).

**بیان ژن CHS:** آنزیم کالکون سنتاز (*CHS*)، به عنوان اولین آنزیم‌های کلیدی مسیر فلاونوئید است. آنزیم *CHS* اولین مرحله بیوستز فلاونوئید را با هدایت جریان کربن از مسیر عمومی فنیل پروپانوئید به مسیر فلاونوئید کاتالیز می‌کند. اثر



شکل ۷- بیان ژن *PAL* در بوته‌های بومادران تحت تیمار سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات



شکل ۸- عملکرد اسانس در بوته‌های بومادران تحت تیمار سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

سالیسیلیک اسید از ۱ به ۲ میلی‌مولار همچنان به افزایش عملکرد اسانس ختم شد. سطح ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید باعث افزایش حدود ۱/۵ برابری عملکرد اسانس در بومادران شد (شکل ۸). در استفاده همزمان از هورمون‌ها، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر عملکرد اسانس مشاهده شد. به‌صورتی‌که در غلظت ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب کاهش عملکرد اسانس شد درحالی‌که در غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب افزایش عملکرد اسانس شد. در کل، بیشترین

*CtCHS2* روند کاهشی را پس از القاء نشان داد. در نتیجه، نویسندگان پیشنهاد کردند که *CtCHS4* یک ژن کلیدی برای تشکیل کار تأمین است و نقش مهمی در تجمع چالکون‌ها طی القا با متیل جاسمونات ایفا می‌کند.

**عملکرد اسانس:** اثر هم‌راستا سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر عملکرد اسانس در بوته‌های بومادران مشاهده شد. هورمون‌های سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات هر دو سبب افزایش عملکرد اسانس شدند. با این تفاوت که افزایش غلظت متیل جاسمونات از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار باعث کاهش عملکرد اسانس شد. این در حالی است که افزایش غلظت

## نتیجه‌گیری

به جز تأثیر منفی متیل جاسمونات بر زیست‌توده و کلروفیل و تأثیر منفی سالیسیلیک اسید بر کارتنوئیدها، تأثیر این دو هورمون بر سایر صفات مثبت بود. اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر اغلب صفات در بوته‌های بومادران مشاهده شد. بیشترین عملکرد اسانس و بیان ژن‌های *PAL* و *CHS* در تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به دست آمد. با توجه به اهمیت عملکرد اسانس، محتوی فنول‌ها- فلاونوئیدها و بیان ژن‌های *PAL* و *CHS*، تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید برای افزایش رشد بومادران توصیه می‌شود.

عملکرد اسانس در تیمار ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به دست آمد (شکل ۸). هم‌راستا با یافته‌های ما، Dastyar و همکاران (۲۰۱۹)، تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات را بر میزان و درصد اسانس گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بررسی نمودند. محققان پیشنهاد کردند که کاربرد برگی ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک سبب بیشترین میزان و درصد اسانس موردبررسی می‌شود. افزایش عملکرد اسانس در پی تیمار هورمونی طبیعی است چراکه از یک طرف اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات باعث القا تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند و از طرف دیگر بخش قابل توجهی از اسانس مربوط به ترپن‌ها است که به شدت از سیگنالینگ اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات تأثیر می‌پذیرند (Gutjahr and Paszkowski, 2009).

## منابع

- عمویی، علی محمد، مجاهد، مریم، و مجاهد، مژگان (۱۳۹۵). بسته کارآفرینی تولید بومادران. انتشارات اسرارعلم.
- Afshari, M., & Rahimmalek, M. (2017). Measurement of phenolic compounds, essential oil content and antioxidant activity in *Achillea millefolium* at different growth stages. *Journal of Plant Process and Function*, 6(21), 15-26.
- Ali, B. (2021). Practical applications of jasmonates in the biosynthesis and accumulation of secondary metabolites in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 38, 102205. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102205>
- Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., & Venkatesalu, V. (2017). Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological properties of *Achillea millefolium* L.: A review. *Phytotherapy Research*, 31(8), 1140-1161. <https://doi.org/10.1002/ptr.5840>
- Anjalani, T. R., Rasmi, S. A., Rahayu, A. E., Ramadhani, M. R. N., Sholihah, M. F., Puspaningtyas, I., ... & Jadid, N. (2024). Methyl jasmonate stimulates growth and upregulates the expression of *Phenylalanine Ammonia-Lyase* (PAL) gene in *Gynura pseudochina* in vitro micropropagation. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 25(5). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d250512>
- Anwar, M., Chen, L., Xiao, Y., Wu, J., Zeng, L., Li, H., ... & Hu, Z. (2021). Recent advanced metabolic and genetic engineering of phenylpropanoid biosynthetic pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9544. <https://doi.org/10.3390/ijms22179544>
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Arruda, T. F. D. L., Lima, G. S. D., Silva, A. A. R. D., Azevedo, C. A. V. D., Souza, A. R. D., Soares, L. A. D. A., ... & Saboya, L. M. F. (2023). Salicylic acid as a salt stress mitigator on chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, and growth of precocious-dwarf cashew in the post-grafting phase. *Plants*, 12(15), 2783. <https://doi.org/10.3390/plants12152783>
- Bashir, S., Noor, A., Zargar, M. I., & Siddiqui, N. A. (2022). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *achillea millefolium*: A comprehensive review. *Edible Plants in Health and Diseases*, 1, 457-481. <https://doi.org/10.1002/ptr.5840>
- Bayat, H., Shafie, F., Aminifard, M. H., & Daghighi, S. (2021). Comparative effects of humic and fulvic acids as biostimulants on growth, antioxidant activity and nutrient content of yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Scientia Horticulturae*, 279, 109912.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

- Chen, J. Y., Wen, P. F., Kong, W. F., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Li, J. M., ... & Huang, W. D. (2006). Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*, 40(1), 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.12.017>
- Dehghan, A., & Rahimmalek, M. (2018). The effect of salt stress on morphological traits and essential oil content of Iranian and foreign yarrow (*Achillea millefolium* L.) genotypes. *Journal of Soil and Plant Interactions*, 9(34), 23-38.
- Dastyar, Y., Alaei, M., & Kheiry, A. (2019). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on morphological traits, enzymatic activity and essential oil percentage of purple coneflower plant (*Echinacea purpurea* L.). *Journal of Horticultural Science*, 50(1).
- De Capite, A., Lancaster, T., & Puthoff, D. (2016). Salicylic acid treatment increases the levels of triterpene glycosides in black cohosh (*Actaea Racemosa*) rhizomes. *Journal of Chemical Ecology*, 42, 13-16. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0655-x>
- Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C., & Ferreira, I. C. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 82, 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>
- Ghasimi, Z., Jokar, S., Bodaghi, H., & Modarres, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the production of rosmarinic acid and caffeic acid in callus culture of *Salvia lerrifolia* Benth. *Journal of Plant Biology*, 10(1), 67-80.
- Gilroy, E., & Breen, S. (2022). Interplay between phytohormone signalling pathways in plant defence—other than salicylic acid and jasmonic acid. *Essays in Biochemistry*, 66(5), 657-671. <https://doi.org/10.1042/EBC20210089>
- Gutjahr, C., & Paszkowski, U. (2009). Weights in the balance: Jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(7), 763-772. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-7-0763>
- Hashemyan, M., Ganjeali, A., & Cheniany, M. (2020). Effect of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on the production of secondary metabolites and antioxidant capacity of *Teucrium polium* L. in-vitro. *Journal of Plant Biology*, 12(2), 61-76.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., & Ahmad, A. (2020). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 14-25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.005>
- He, B. X., Xue, Y. R., Tu, Y. H., Gao, Y., & Guo, M. L. (2018). CtCHS4 induces the accumulation of safflower quinone chalcones in response to methyl jasmonate induction. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 636-645.
- Hou, S., & Tsuda, K. (2022). Salicylic acid and jasmonic acid crosstalk in plant immunity. *Essays in Biochemistry*, 66(5), 647-656. <https://doi.org/10.1042/EBC20210090>
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S. H., & Ramesh, M. (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 (PCTOC)*, 153(3), 447-458. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02485-8>
- Kanatas, P., Dellaportas, V., Kakabouki, I., & Papastylianou, P. (2020). Seed priming effects on germination and first growth of the medicinal plant *Achillea millefolium* L. *Journal of Phytology*, 12, 20-23.
- Khattab, S., Yap, Y. K., & El Sherif, F. (2022). Salicylic acid foliar spray enhanced *Silybum marianum* growth and yield, as well as its chemical constituents and *Chalcone Synthase* gene activity. *Horticulturae*, 8(6), 556. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060556>
- Kim, S. J., Tran, B. Q., & Jung, S. (2023). Methyl jasmonate-induced senescence results in alterations in the status of chlorophyll precursors and enzymatic antioxidants in rice plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 671, 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.06.006>
- Mendoza, D., Cuaspu, O., Arias, J. P., Ruiz, O., & Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, 19, e00273. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00273>
- Monte, I. (2023). Jasmonates and salicylic acid: Evolution of defense hormones in land plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 76, 102470. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102470>
- Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. Abiotic and biotic stress in plants—recent advances and future perspectives. *Rijeka: InTech*, 247-277.
- Naoumkina, M. A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L. I. N. A., Dai, X., Zhao, P. X., & Dixon, R. A. (2010). Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology*, 11(6), 829-846. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00648.x>
- Shafie, F., Bayat, H., Aminifard, M. H., & Daghighi, S. (2021). Biostimulant effects of seaweed extract and amino acids on growth, antioxidants, and nutrient content of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in the field and greenhouse conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 52(9), 964-975. <https://doi.org/10.1080/00103624.2021.1872596>

- Salimi, A., Rowshan, V., & Khanpoor, E. (2017). Effect of salinity on quality and quantity of essential oil components and antioxidant activity in yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 32(6), 948-957. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109309>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *In Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Yang, D., Ma, P., Liang, X., Wei, Z., Liang, Z., Liu, Y., & Liu, F. (2012). PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Physiologia Plantarum*, 146(2), 173-183. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01603.x>
- Yadav, V., Wang, Z., Wei, C., Amo, A., Ahmed, B., Yang, X., & Zhang, X. (2020). Phenylpropanoid pathway engineering: An emerging approach towards plant defense. *Pathogens*, 9(4), 312.
- Zare-Hassani, E., Motafakkerazad, R., Razeghi, J., & Kosari-Nasab, M. (2019). The effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of secondary metabolites in organ culture of *Ziziphora persica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138, 437-444. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01639-x>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

## The effect of elicitor salicylic acid and methyl jasmonate on the morphological, physicochemical and molecular properties of *Achillea millefolium* L.

Sanaz Siahloo<sup>1</sup>, Enayatallah Yazdanpanah<sup>1 \*</sup>, Hamid Sobhaniyan<sup>1</sup>, Peyman Aghaie<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biology, Basic Sciences, Payam Noor, Tehran Sharq, Tehran

<sup>2</sup> Biology, Central Organization of Payam Noor University - International Affairs Center of the University, Tehran

(Received: 2024/07/24, Accepted: 2024/07/19)

### Abstract

Considering the role of salicylic acid and methyl jasmonate in regulating important metabolic processes and their potential in increasing the production of important biological compounds, the effect of the use of these two hormones was investigated on various traits of common yarrow. The seed-derived transplants were grown under greenhouse conditions in a factorial experiment in a completely randomized design with three replications. Salicylic acid with a concentration of 1 and 2 mM and methyl jasmonate with a concentration of 0.5 and 1 mM were sprayed on the leaves separately and in combination three times with an interval of 15 days. The content of phenols, flavonoids, antioxidant capacity, photosynthetic pigments, the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenyl-propanoids, including phenylalanine ammonialyase (*PAL*) and chalcone synthase (*CHS*) genes, and also essential oil yield were compared in the treated and control plants. Variance analysis showed the significant effect of two hormones on the examined traits. Except for the negative effect of methyl jasmonate on biomass (dry weight and height) and chlorophyll, and also the negative effect of salicylic acid on carotenoids, the impact of these two hormones was positive on other traits. Interestingly, in the combined treatment, the synergistic effect of methyl jasmonate and salicylic acid was observed on most traits in yarrow plants. The effect of the combined treatment of salicylic acid and methyl jasmonate was somewhat different in the studied traits, however, the highest yield of essential oil and the expression of *PAL* and *CHS* genes were obtained in the treatment of 1 mM methyl jasmonate and 2 mM salicylic acid. In general, the effect of methyl jasmonate and salicylic acid on yarrow was dependent on the trait type. Considering the performance of the essential oil, the content of phenols and flavonoids, and the expression of *PAL* and *CHS* genes, the treatment of 1 mM methyl jasmonate and 2 mM salicylic acid is recommended to enhance the growth of yarrow.

**Keywords:** Gene expression, Medicinal plants, Secondary metabolites, Hormones

Corresponding author, Email: enayatallahyazdanpanah@yahoo.com