

Journal of Crop Breeding Vol. 17, Issue 1, 2025



## **Research Paper**

# The Study of Farnesyl Diphosphate and Squalene Synthase Gene Expression Levels in *Artemisia absinthium* Exposed to Environmental Gamma Radiation

# Sadegh Rahbarnejad<sup>1</sup>, Ali Asghari<sup>2</sup>, Noraddin Hosseinpour Azad<sup>3</sup> <sup>(b)</sup> and Ehsan Shokri<sup>4</sup>

1- Ph.D. student in Plant Genetics, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Professor, Department of Crop and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3- Associate Professor, Department of Plant Sciences and Medicinal Plants, Meshgin Shahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, (Corresponding Author: gmplant21@gmail.com)

4- Assistant Professor, Nanotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran

Received:7 June, 2024

Revised: 30 September, 2024

Accepted: 22 October, 2024

## **Extended Abstract**

**Background:** *Artemisia absinthium*, commonly known as Afsantin, is an important perennial medicinal herb native to Asia, the Middle East, Europe, and North Africa. During the evolutionary process, plants have developed mechanisms that not only allow them to survive under the most severe radiation doses but also respond effectively to small changes in radiation intensity through physiological adjustments. One of the plant defense mechanisms against radiation is evolutionary changes in gene expression levels. Among these genes, farnesyl diphosphate synthase (FDS) is a key enzyme in the terpenoid metabolic pathway that catalyzes the synthesis of sesquiterpenoid compounds from the farnesyl pyrophosphate (FPP) precursor and plays an important role in regulating plant growth and development. The present study investigated the effects of radiation from radioactive waste in an abandoned uranium mine on the expression changes of the FDS and squalene synthase (SQS) genes in *A. absinthium*, grown for many years in the radioactive sampling site environment.

**Methods:** Plant material was sampled from the altitudes of Kojanaq village located 18 km northwest of Meshginshahr City with the geographical coordinates of 38° 29' 17.7" N and 47° 30' 15.1" E. All calculations related to the geographical position were performed using a Garmin satellite positioning device (Oregon model, 650). For complete access to radiation contamination information in the study area, a point-by-point radon radiation map was prepared at 10 points using a radiation meter over two consecutive years with a Victoreen 451 radiation meter (Fluke Biomedical Company, USA). These measurements included points at the same altitude on two opposite mountains (mountains with radioactive material points A and non-radioactive B). A. absinthium shoots were sampled systematically in three different biological replicates. Total RNA was extracted from the sampled plant leaves, and the first cDNA strand was synthesized afterward. The Primer 3 Plus online software was used to design qPCR primers, which were then analyzed using the Oligo Analyzer tool and the NCBI/Primer-BLAST plugin in the NCBI genetic database. Initially, the gene regions controlling the farnesyl diphosphate and squalene synthase enzymes were amplified using the synthesized cDNA for all control and non-control samples as templates to ensure the accuracy of the designed primers. Quantitative analysis of the target gene expression was performed by the Real-Time PCR method using the Corbett Real-Time PCR (3000) and the CyberGreen kit (Sinaclon Company). The gene expression pattern changes in all synthesized cDNAs from the studied samples were measured using the Amplicon SYBR Green High ROX master mix.

**Results:** Statistical analysis using GraphPad Prism 10 software showed that the expression levels of both studied genes were higher in samples collected from radioactive points than in non-radioactive points. The highest relative increase in gene expression was observed in the squalene synthase-controlling gene, which is one of the key genes in the biosynthetic pathway of the isoprenoid metabolite group. Statistical comparison of the relative expression pattern of the SQS gene in non-radioactive (Bsqs) and radioactive (Asqs) samples showed a significant difference in the SQS gene expression levels between samples collected from radioactive and non-radioactive areas at a 99% probability level. Furthermore, statistical analysis of the relative expression pattern of the FDS gene in non-radioactive (Bfds) and radioactive (Afds) samples revealed no significant difference in FDS gene expression levels between samples collected from radioactive and non-radioactive difference in FDS gene expression levels between samples collected from radioactive and non-radioactive difference in FDS gene expression levels between samples collected from radioactive and non-radioactive difference in FDS gene expression levels between samples collected from radioactive and non-radioactive difference in FDS gene expression levels between samples collected from radioactive and non-radioactive difference in FDS gene expression levels between samples collected from radioactive and non-radioactive and non-radio



Copyright ©2025 Rahbarnejad et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. This work is licensed under a <u>Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License</u> which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

Rahbarnejad et al	Rahba	rnejad	et	al
-------------------	-------	--------	----	----

Journal of Crop Bro	eeding Vol. 17, Iss	sue 1, 2025	 	
• • • • • • • • • • • • • • • • • • •				

radioactive areas at a 99% probability level. Additionally, the P-value for the relative expression of the SQS gene in radioactive and non-radioactive area samples was calculated as 0.0077, and it was 0.6039 for the FDS gene.

**Conclusion:** Considering that the expression level of the SQS gene was highest at an altitude of 860-900 m with an average radiation intensity of 0.567 mSv, and at an altitude of 910-930 m with the highest radiation level (1.25 mSv), the squalene gene expression level showed a severe decrease. It can be inferred that the optimal radiation intensity for inducing the SQS gene expression is around 0.5 mSv, and an increase in radiation intensity leads to a significant reduction in the expression of this gene. Presumably, with an increase in radiation intensity and ionizing rays, the plant intelligently modulates the biosynthetic pathway of squalene and directs the biosynthetic pathway toward the synthesis of sesquiterpenoids, which compete with the SQS enzyme for the common precursor farnesyl diphosphate. Since the mutagenic effect of radioactive elements has been proven, it can be concluded that long-term exposure of perennial plants to radioactive radiation leads to genetic changes. These mutations alter the structure and behavior of enzymes involved in the biosynthetic pathways of secondary metabolites and likely represent a genetic-biochemical protective response of the plant to combat the damage caused by free radicals generated by radioactive materials.

Keywords: Artemisia absinthium, Gene Expression, Farnesyl Diphosphate, Squalene Synthase

**How to Cite This Article:** Rahbarnejad, S., Asghari, A., Hosseinpour Azad, N., & Shokri, E. (2025). The Study of Farnesyl Diphosphate and Squalene Synthase Gene Expression Levels in *Artemisia absinthium* Exposed to Environmental Gamma Radiation. *J Crop Breed*, 17(1), 117-128. DOI: 10.61186/jcb.17.1.117





# مقاله پژوهشی

# بررسی الگوی بیان ژنهای فارنسیل دیفسفات و اسکوآلن سنتاز تحت تأثیر اشعه گامای محیطی در گیاه درمنه کوهی

صادق رهبرنژاد'، علی اصغری'، نورالدین حسین پور اَزاد ؓ 🔍، احسان شکری ٗ

۱- دانشجوی دکترای ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران ۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران ۳- دانشیار، گروه علوم گیاهی و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی مشگینشهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، (نویسنده مسوول: gmplant21@gmail.com) ۴- استادیار، بخش فناوری نانو، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرچ، ایران

> تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۸ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۹ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۸/۱ صفحه ۱۱۲ تا ۱۲۸

#### چکیدہ مبسوط

مقدمه و هدف: درمنه کوهی (Artemisia absinthium) که معمولاً با نام افسنطین شناخته می شود، یک گیاه دارویی بوتهای و چندساله مهم بومی آسیا، خاورمیانه، اروپا و شمال آفریقا است. در فرآیند تکامل، گیاهان مکانیسمهایی را توسعه دادهاند که نمتنها تحت شدیدترین دزهای تشعشعات زنده میمانند، بلکه از طریق تنظیمات فیزیولوژیکی به تغییرات کوچک در شدت تشعشعات پاسخ مؤثری می دهند. یکی از مکانیسمهای دفاعی گیاهان در برابر تشعشعات، بلکه تغییرات تکاملی در سطوح بیان ژنها می باشد. از جمله این ژنها، فارنسیل دی فسفات سنتاز (FDS)، آنزیم کلیدی مسیر متابولیکی ترپنها است که سنتز ترکیبات سسکوئی ترپن از پیش ماده فارنسیل پیرو فسفات (FPP) را کاتالیز نموده و نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاهان ایفا می کند. در تحقیق حاضر اثرات پرتوهای حاصل از پسماندهای مواد رادیواکتیو در یک معدن متروکه اورانیوم بر روی تغییر بیان ژنهای فارنسیل دی فسفات (FDS) و اسکوآلن سنتاز (SQS) در گیاه درمنه کوهی که بهدلیل چندساله بودن، سالیان متمادی در محیط رادیواکتیویته محل نمونیرداری رشد یا و براسی دی فسفات (SQS)

**مواد و روش ها:** نمونه برداری مواد گیاهی از ارتفاعات روستای کوجنق واقع در هیجده کیلومتری شمال غربی شهرستان مشگین شهر با موقعیت جغرافیایی ۸۷ ۲۰.۳۱ (20 38 و E تا 15.1 ن 40 (20 نجام شد. کلیه محاسبات مربوط به موقعیت جغرافیایی با استفاده از دستگاه مکان یاب ماهواره ای گارمین (مدل اور گون (۵۹ صورت پذیرفت. برای دسترسی کامل به اطلاعات آلودگی تابشی منطقه مورد مطالعه، نقشه تشعشعات رادونی نقطه به نقطه در دستگاه تابش سنج (Sa) مورت پذیرفت. برای دسترسی کامل به اطلاعات آلودگی تابشی منطقه مورد مطالعه، نقشه تشعشعات رادونی نقطه به نقطه در ۱۰ نقطه با استفاده از دستگاه تابش سنج (Sa) در این دسترسی کامل به اطلاعات آلودگی تابشی منطقه مورد مطالعه، نقشه تشعشعات رادونی نقطه به نقطه در ۱۰ نقطه با استفاده از دستگاه تابش سنج (Sa) در این در این دسترسی کامل به اطلاعات آلودگی تابشی منطقه مورد مطالعه، نقشه تشعشعات رادونی نقطه به نقطه در ۱۰ نقطه با استفاده از دو کوه مقابل هم (کوه دارای نقاط حاوی مواد رادیواکتو A و فاقد مواد رادیواکتیو B) بود. نمونه برداری از سرشاخههای گیاه درمنه کوهی (Maisi A . برای طراحی آغاز گرهای PCR رای مختلف زیستی انجام پذیرفت. RNA کل از برگهای گیاهان نمونه برداری شده استخراج و رشته اول محات سنز شد. برای طراحی آغاز گرهای PCR از نرمافزار آنلاین PUS Prime-BLAF ماستفاده شد و سپس با ابزار Oligo analyzer و غیرکنترل به عنوان الگو، نواحی ژنتیکی NCBI/Prime-BLAST در پایگاه ژنتیکی NCBI برسی شدند. در مرحله اول، با به کارگیری PUS مینتز شده برای تمامی نمونههای کنترل و غیرکنترل به عنوان الگو، نواحی ژنی کنترل کننده آنزیمهای فارنسیل دی فسفات و اسکوآلن سنتاز برای اطمینان از صحت آغاز گرهای طراحی شده تکثیر یافتند. بررسی کمی بیان ژن های مورد نظر به روش انزیمهای فارنسیل دی فسفات و اسکوآلن سنتاز شده ای مورد مطالعه از مستر میکس CyberGree (شد کرسی کمی نیان زن های مربی گوی انجوا شد. برای سنجش الگوی انزیمهای فارنسیل دی فسفات و اسکوآلن سنتاز شده ای مورد مطالعه از مستر میکس CyberGree (شدن سین کون) انجام شد. برای سنجش الگوی انزیمهای در تمامی CDNمهای سنتز شده از نمونههای مورد مطالعه از مستر میکس CyberGree (شد رسی کمی یون ژنهای مرای در می سر اله در مام در در سین کون انجام شد. برای سنجش الگوی در ای درمای درمای CDNمهای سنتز شده ای مستر میکس کره یکی CyberG

**یافتهها:** آنالیز آماری دادهها با نرمافزار Graph Pad Prism 10 نشان داد که سطح بیان هر دو ژن مورد بررسی در نمونههای جمعآوری شده از نقاط حاوی تشعشعات رادیواکتیو نسبت به نقاط فاقد تشعشعات رادیواکتیو بیشتر است. بیشترین افزایش نسبی بیان ژنی در ژن کنترل کننده اسکوآلن سنتاز مشاهده شد که این ژن از جمله ژنهای کلیدی در مسیر بیوسنتزی گروه متابولیتی ایزوپرونوئیدها است. مقایسه آماری الگوی نسبی بیان ژن اسکوآلن (SQS) در نمونههای غیر رادیواکتیویته (Bsqs) و در نمونههای رادیواکتیویته (Asqs) نشان داد که بین میزان بیان ژن اسکوآلن سنتاز در نمونههای جمعآوری شده از مناطق رادیواکتیو و غیر رادیواکتیویته (Bsqs) و در نمونههای رادیواکتیویته (Asqs) نشان داد که بین میزان بیان ژن اسکوآلن سنتاز در نمونههای جمعآوری شده از مناطق رادیواکتیو و غیر رادیواکتیو در سطح اطمینان ۹۹ درصد اختلاف معنیداری وجود دارد. همچنین، آنالیز آماری الگوی نسبی بیان ژن فارنسیل دی فسفات (FD) در نمونههای غیر رادیواکتیویته (Bfds) و نمونههای رادیواکتیویته (Afds) نشان داد که بین میزان بیان ژن اسکوآلن سنتاز در نمونههای جمعآوری شده از مناطق رادیواکتیو نمونههای غیر رادیواکتیویته (Bfds) و نمونههای رادیواکتیویته (Afds) نشان داد که بین میزان بیان ژن فارنسیل دی فسفات (Pote مناطق رادیواکتیو و غیر رادیواکتیو در سطح احتمال ۹۹ درصد اختلاف معنیداری باهم ندارند. علاوه بر این، مقدار ارزش pote (Pote

**نتیجه گیری کلی:** با توجه به اینکه میزان بیان ژن اسکوآلن سنتاز در ارتفاع ۹۰۰–۸۶۰ متر با متوسط شدت تشعشع (۱/۵۶۷ میلی سیورت)، در بالاترین مقدار خود بود که در ارتفاع ۹۳۰–۹۱۰ با بالاترین میزان تشعشع (۱/۲۵ میلی سیورت) میزان بیان ژن اسکوآلن افت شدیدی پیدا کرد. میتوان استنباط نمود که بهینه شدت تشعشع برای تحریک بیان ژن اسکوآلن سنتاز در محدوده ۵/۰ میلی سیورت بوده و افزایش شدت تشعشعات منجر به کاهش شدید بیان این ژن میگردد و احتمالاً با افزایش شدت تشعشعات و پرتوهای یونیزان، گیاه هوشمندانه فعالیت مسیر بیوسنتزی ماده اسکوآلن افت شدیدی پیدا کرد. میتوان استنباط نمود که بهینه سنتز سسکوئی ترپن ها که برای استفاده از پیش ماده مشتر ک فارنسیل دی فسفات با آنزیم اسکوآلن نستاز در رقابت هستند، هدایت می میماید. با توجه به این که جهشزایی عناصر پرتوزا اثبات شده است، میتوان نتیجه گرفت که قرار گرفتن طولانی مدت گیاهان چندساله در معرض تابش های رادیواکتیو منجر به ایجه تغییرات ژنتیکی میشود. احتمالاً این جهش ها با تغییر ساختمان و رفتار آنزیمهای دخیل در معیستان مایشهای ژنویه، یک نوع ژنتیکی– بیوشیمیایی گیاه برای مقابله با آسیبهای عناصر رادیکالهای آزاد ایجاد شده در اثر تشعمات موالی پیوستز میافت ژنتیکی– بیوشیمیایی گیاه برای مقابله با آسیبهای عناصر رادیکالهای آزاد ایجاد شده در اثر تشعشعات مواند می شدی تشعشعات مار راد ترفیزان میتوان مین را می می را به سمت ژنتیکی– بیوشیمیایی گیاه برای مقابله با آسیبهای عناصر رادیکالهای آزاد ایجاد شده در اثر تشعشعات مواد پرتوزا میباشد.

**واژدهای کلیدی:** اسکواّلن سنتاز، بیان ژن، تشعشعات رادیواکتیو، درمنه کوهی، فارنسیل دی فسفات

## مقدمه

که معمولاً با نام (Artemisia absinthium) که معمولاً با نام افسنطین شناخته می شود، یک گیاه دارویی بوته ای و چندساله مهم بومی آسیا، خاورمیانه، اروپا و شیمال آفریقا است

(Sharopov et al., 2012). جنس Artemisia یکی از غالبترین و پراکندهترین جنسها در خانواده Asteraceae است که دارای بیش از ۵۰۰ گونه مختلف است و بهعنوان گیاهان طبیعی یکساله، چند ساله و دو ساله یا درختچههای

کوچک طبقهبندی می شوند (Batiha et al., 2019). گیاهان بهدلیل سبک زندگی بینظیرشان نمی توانند از بسیاری از فشارهای نامطلوب محیطی فرار کنند. بنابراین، مجموعهای از تنظیمات مورفو تشریحی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را برای سازگاری با طیف گستردهای از شرایط محیطی ایجاد کردهاند Moller & Mousseau, 2015; Shabala et al., 2015; ) Vodeneev et al., 2015; Sukhov, 2016). به عنوان مثال، گیاهان می توانند در برابر اثرات مضر پر توهای یونیزان (IR) در محدوده غلظتی مقاومت کنند که برای سایر موجودات زنده از جمله انسان کشنده است. برای مثال، دوز کشنده برای یک انسان تنها Gy ۵ Gy است (Joiner et al 2009). در حالی که، بیشتر گیاهان دوزهای ۵۰Gy و بالاتر را تحمل میکنند. همچنین، گزارش شــده اســت که برخی از گیاهان میتوانند دوزهایی تا سطح Gy ۱۰۰۰ را تحمل نمایند ( & Caplin Willey, 2018; Sparrow & Miksche, 1961). در فرأيند تکامل، گیاهان مکانیسمهایی را توسعه دادهاند که نهتنها تحت شدیدترین دوزهای تشعشعات زنده میمانند، بلکه از طریق تنظیمات فیزیولوژیکی به تغییرات کوچک در شدت تشعشعات پاسے مؤثری میدھند ( Vanhoudt et al., 2014; ) Geras'kin et al., 2017). یکی از مکانیسے مهای دفاعی گیاهان در برابر تشعشعات، تغییرات تکاملی در سطوح بیان ژنها میباشد. از جمله این ژنها، فارنسیل دی فسفات سنتاز (FPS)، أنزيم كليدي مسير متابوليكي ترينها است كه سنتز ترکیبات سـسـکوئی ترپن از پیش ماده فارنسـیل دی فسفات

(FPP) را کاتالیز نموده و نقش مهمی در تنظیم رشـد و نمو گیاهان ایفا می کند. آنزیم فارنسیل دی فسفاتسنتاز با کاتالیز اتصـال سـر به دم واحدهای دی متیلل دی فسفات (IPP; C5) و ایزوپنتیل دی فسفات (IPP; C1) منجر به ایجاد متابولیت ژرانیل دی فسفات (GPP; C10) می گردد. نهایتاً با اتصـال بیشـتر واحدهای IPP، متابولیت ۲۵ کربنه فارنسیل دی فسفات ایجاد می شود (IPA متابولیت ۵۵ کربنه فارنسیل دی فسفات ایجاد می شود (SQS)، دیگر ژن بررسی شده در این تحقیق، ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز تری ترپنوئیدها است (Gao et al., 2019 است مسیر بیوسند تری ترپنوئیدها است (Gao et al., 2019 است که توسط FPS سنتز می شود. بیان و فعالیت SPS بر تولید که توسط FPS بر تولید می شود. بیان و فعالیت FPS بر تولید سسکوئی ترپنها در گیاهان تأثیر می گذارد.

بر اساس بررسیهای انجام شده ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) و دی متیلل پیرو فسفات (DMAPP) از پیش مادههای سازنده در مسیر بیوسنتزی ایزوپرونوئیدها بوده و با پیوستن بههم دیگر بهواسطه آنزیم فارنسیل دی فسفات (FDS)، فارنسیل دی فسفات را میسازند. همچنین، در این مسیر نوسنتزی فارنسیل دی فسفات (FPP) بهواسطه آنزیم اسکوآلن سنتاز (SQS) به متابولیت اسکوآلن تبدیل میگردد ( & Kirby Kirby 2009). در این مسیر بیوسنتزی، ژنهای انتخاب شده بیان آبشاری داشته و ماده هدف فارنسیل دی فسفات شده برای آنزیم فارنسیل دی فسفات (FDS) بهعنوان پیش ماده برای آنزیم اسکوآلن سنتاز (SQS) می،اشد (شکل ۱).



(Kirby & Keasling, 2009) شكل ۱- مسير بيوسنتزى پيشنهاد شده براى ايزوپرونوئيدها در گياهان و ريز جلبکها Figure 1. Proposed Biosynthetic Pathway for Isoprenoids in Plants and Microalgae (Kirby & Keasling, 2009)

ثابت شده است که افزایش تولید متابولیتهای ثانویه در پاسخ به تنشهای مختلف زیستی و غیرزیستی امکان پذیر است. در تحقیقی افزایش ۵ تا ۲۰ برابری با دوز تابش ~۲۰ گری مشاهده شد. افزایش فعالیت برخی از آنزیمهای بیوسنتزی کلیدی تحت تنش تشعشعات، بازده تولید متابولیتهای ثانویه را افزایش میدهد. شناسایی دوز بهینه بترگ و صنعتی است (Vardhan & Shukla, 2017). گیاهانی که در زیستگاههای طبیعی خود رشد می کنند، به طور خودبه خود با انواع تنشها از جمله تنشهای ناشی از تابش نور خورشید مواجه می شوند. برای حفظ فعالیت ساولی و بقا،

گیاهان از مکانیسـمهای مولکولی زیربنایی پاسـخهای گیاهی استفاده میکنند که شامل فعالیت شبکههای آنزیمی متابولیک مرتبط با پروتئینهای پاسـخدهنده اسـت ( & Kong مرتبط با پروتئینهای پاسـخدهنده اسـت ( & Chi *et al.*, 2019; Okajima, 2016) رکیبات زیسـتی فعال، با القاء قابل توجهی از ژنهای کلیدی در مسیر بیوسـنتزی متابولیت آرتمیزینین پس از تابش اشـعه فرابنفش رخ داد. احتمال داده شـد که تشـعشعات با سرکوب آنزیمهای رقابتی در این مسـیر بیوسـنتزی و در عین حال افزایش بیان ژنهای کلیدی باعث افزایش تولید ماده آرتمیزینین در گیاه درمنه شده است (Zhang *et al.*, 2018) پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی/ سال هفدهم/ شماره ۱/ ۱۴۰۴ ......

بر الگوی بیان ژنهای کلیدی فارنسیل دی فسفات و اسکوآلن سینتاز مسیر متابولیتی ایزوپرونوئیدها در گیاه درمنه کوهی رویش یافته تحت تاثیر اشعه گامای محیطی انجام شد.

# مواد و روشها

طبق گزارشات متعدد مراجع علمی، در کشور ما بالغ بر ۱۷ گونه از جنس ارتمیزیا موجود می باشد. در منطقه مورد پژوهش، چهار گونه از جنس آرتمیزیا از جمله A. vulgare A. absinthium A. siberi و جود داشت. درمنه کوهی (A. absinthium) برای بررسی اثرات تشعشع بر الگوی بیان ژنهای مورد مطالعه انتخاب شــد. با توجه به این که آلودگی به مواد رادیواکتیو در منطقه در ســطح نســبتاً وسیعی پراکنده بود، برای دستیابی به نتایج با تکرارپذیری بالا از نمونه گیری سیستماتیک بر اساس اهداف آزمایش استفاده گردید. در هرنقطه مشـخص شـده از نقشـه پراکنش شـدت تشعشع، نمونه گیری های گیاهی با سه تکرار بیولوژیک از یک بوته صورت گرفت. نمونه برداری مواد گیاهی از ارتفاعات روســتای کوجنق واقع در هیجده کیلومتری شــمال غربی شهرستان مشگین شهر با موقعیت جغرافیایی "15.1 '30 °47 E و N "17.7 '29 380 انجام شد. كليه محاسبات مربوط به موقعیت جغرافیایی با استفاده از دستگاه مکانیاب ماهوارهای گارمین (مدل اورگون ۶۵۰) صورت پذیرفت. فرض بر این بود که طی سالیان متمادی، گیاهان منطقه تأثیرپذیری تدِریجی از تابشهای رادیواکتیو محیطی داشته باشند. معمولاً تغییرات حاصل از این گونه تابشها که بیشتر از نوع به تابشهای گاما می باشند، منجر به تغییرات عمده ای در ماده ژنتیکی موجودات می شوند که این تغییرات (جهشها) به صورتهای مختلف خود را نمایان میسازند. هر اثر جهشی که ممکن است ناشی از آسیبهای ژنی یا ژنومی باشد، می تواند به صورت تغییرات مورفولوژیکی (تغییرات ظاهری) و یا تغییرات بیوش\_یمیایی (تغییر در ســنتز مواد مؤثره گیاهی یا متابولیتهای ثانویه) یا تركيبي از اين تغييرات يعنى مورفوشيميايي باشد. جهت اثبات فرضيه جهشزايي مواد راديواكتيو منطقه نياز بود كه براي تفکیک اثرات پارامترهای مختلف از جمله تأثیرات تشعشعات، عناصـر موجود در خاک و ارتفاع، منطقههایی انتخاب میشـد که دارای پارامترهای یکسان از نظر موقعیت جغرافیایی، ارتفاع و عناصر خاک باشند و تنها فاکتور متفاوت بین آنها، شدت تابش حاصل از وجود مواد رادیواکتیو باشد. برای این منظور، دو کوه مجاور در روستای کوجنق از توابع شهرستان مشگین شـــهـر کـه روبـهروی هـم بـا مـوقـعـيـت مشـــابـه ("E۴۷°۴۱'۵۵", N۳۸°۲۲'۵۶) قرار داشتند، انتخاب شدند. در کوه اول (A) معدن متروکه اورانیوم قرار داشت و کوه دوم (B) فاقد پسماندهای مواد رادیواکتیو بود (شکل ۲، جدول ۱). موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه گیری با سیستم جیپیاس گارمین مدل ۷۵۰ (ســاخت کشــور آمریکا) بهطور کامل یادداشت برداری شد. این منطقه از استان اردبیل دارای میانگین

دمایی سالانه متغیر در دامنه C° ۱۴– در زمستان تا ۳۱C+ در تابستان میباشد. جهت دسترسی کامل به اطلاعات آلودگی تابشـي نواحي منطقه مورد مطالعه، نقشـه تشـعشـعات رادوني نقطه به نقطه در ۵۰ نقطه با استفاده از دستگاه تابش سنج Victoreen 451 (Fluke biomedical company, USA) طی دو سال متمادی مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۲). این اندازه گیری مشـــتمل بر نقاط هم ارتفاع در هر دو کوه مورد مطالعـه (کوه حـاوی مواد رادیواکیتو A و کوه فـاقـد مواد رادیواکتیو B) بود. در محل نمونه برداری از منطقه B (منطقه بدون رادیواکتیو) و A (منطقه رادیواکتیو) تعداد ۱۰ منطقه انتخاب شده با کدهای اختصاصی جهت سهولت در آنالیزهای بعدی مشخص گردیدند. به عنوان مثال نقطه گذاری شده B1000/R0/16 بیانگر محل نمونه گیری از شاهد (B) از ارتفاع ۱۰۰۰ متری بود که دارای شدت تشعشع ۱۶/۰ میلی سيوورت مي باشد. هم چنين، نقطه كدگذارى شده A1000/R0/5 بيانگر محل نمونه گيري از منطقه راديو اکتيو (A) از ارتفاع ۱۰۰۰ متری) بود که دارای شدت تشعشع ۵/۰میلی سیوورت است. بدین ترتیب نقاط مختلف نمونهبرداری بهصورت دوبهدو در روبروی هم در ارتفاع مشخص قرار گرفته بودند. تمامی این پارامترها برای جلوگیری از بروز اشتباهات أزمایشی و تحلیل دقیق اطلاعات حاصله از أنالیزهای بیان ژن و متابولیت بود که در نتیجه مقایسات میانگین حاصل از تجزیه آماری نقاط هم ارتفاع حاصــل میگردید. برای بررســی تغییر الگوی بیان ژنهای فارنسیل دی فسفات (FDS) و اسکوالن سنتاز (SQS)، RNA كل با استفاده از معرف ترايزول طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. علاوه بر این، RNA استخراج شده با DNase فاقد RNase (ساخت شرکت سيناكلون) طبق دستورالعمل سازنده براى حذف هرگونه الودگی DNA ژنومی تیمار شد و برای اطمینان از عدم تکثیر ألودگی احتمالی با DNA ژنومی، از دو استراتژی استفاده شد: (۱) انجـام واکنش PCR بـا الگوی RNA برای هر جفت أغازگر، (۲) انجام واکنش PCR با جفت أغازگرهای طراحی شده براي هر دو ژن از نواحي ژني اگزون-اگزون. کيفيت و كميت RNA به ترتيب با اســـتفاده از الكتروفورز ژل اگارز و اسپکتروفتومتر نانودراپ (ترمو، ألمان) ارزيابي شد. رشته اول cDNA با ۱ میکروگرم از RNA کل با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت یکتا تجهیز) طبق پروتکل شرکت سازنده به منظور به دست أوردن ۲۰ میکرولیتر حجم از محصول سنتز شد. برای طراحی أغازگرهای qPCR از نرم افزار أنلاین Primer 3 Plus استفاده شد و سپس با ابزار Oligo analyzer و افزونـه NCBI/Primer-BLAST در پایگاه ژنتیکی NCBI بررسی شدند (جدول ۲). بر اساس مطالعات مو و همكاران (Mu et al., 2023) توالى هاى ژنى اكتين (Actin) و توالی ریبوزومال (rps18) به عنوان ژن مرجع انتخاب شدند (جدول ۲). بررسی الگوی بیان ژنهای فارنسیل دیفسفات و اسکوالن سنتاز تحت تأثیر اشعه گامای محیطی



(A. absinthium) شكل ۲- نقشه ألودگى به تشعشعات راديواكتيو در نقاط نمونه گيرى از سرشاخههاى گياه درمنه كوهى (شدت پرتوزايى بهصورت تغيير رنگ نشان داده شده است) Figure 2. Radioactive contamination map at sampling points of A. absinthium (Radiation intensity indicated by color change)

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی ثبت شده برای نقاط نمونهبرداری از نواحی رادیو اکتیو (A) و غیر رادیواکتیو (B) Table1. Recorded geographical characteristics for sampling points from Radioactive (A) and Non-Radioactive (B) Areas

		А					В		
Location	Exposure (mSv)	Altitude (m)	Longitude	Latitude	Location	Exposure ( µSv)	Altitude (m)	Longitude	Latitude
A830/R0.37	0.37	830	38°30′08/90″	47°31′30/09″	B830/R0.13	0.13	830	38°20'08/93"	47°31′20/11″
A860/R0.5	0.5	860	38°30′08/91″	47°31′80/09″	B860/R0.3	0.3	860	38°20'08/83"	47°31′20/13″
A880/R0.6	0.6	880	38°30′08/93″	47°31′20/08″	B880/R0.3	0.3	880	38°20'08/63"	47°31′20/15″
A900/R0.6	0.6	900	38°30′08/99″	47°31′20/85″	B900/R0.13	0.13	900	38°30′08/73″	47°31′20/14″
A910/R1.15	1.15	910	38°30′08/92″	47°31′20/84″	B910/R0.17	0.17	910	38°30'08/43"	47°31′20/09″
A920/R0.8	0.8	920	38°30′08/96″	47°31′20/19″	B920/R0.2	0.2	920	38°20'08/23"	47°31′20/11″
A930/R1.8	1.18	930	38°30′08/97″	47°31′20/29″	B930/R0.16	0.16	930	38°30′08/63″	47°31′20/14″
A940/0.65	0.65	940	38°30′08/95″	47°31′20/18″	B940/R0.16	0.16	940	38°30'08/43"	47°31′20/15″
A950/R0.65	0.65	950	38°30′08/9″	47°31′20/01″	B960/0.13	0.13	950	38°20'08/13"	47°31′20/18″
A1000/R0.5	0.5	1000	38°30′08/98″	47°31′20/05″	B1000/0.16	0.16	1000	38°30′08/53″	47°31′20/15″

جدول ۲– آغازگرهای طراحی شده با نرمافزار Primer 3 Plus برای تکثیر نواحی ژنی SQS و FDS و Table 2. Designed primers using Primer 3 Plus software for amplification of Gene regions SQS and FDS

طوا قطعه تكثير بافته	تمال أغانگ ('3 <- '5)	نام آغازگ	دىف	
Amplicons' length	Primer sequence $(5' -> 3')$	Primer name	No	
150	AGA TTG ACC TTG AAA CAA CAA CGA	rps18-F	1	
-	GGC TCT AAG ACT AGG AGT TCT AG	rps18-R	2	
180	CCA GGC TGT TCA GTC TCT GTA T	actin-F	3	
-	CGC TCG GTA AGG ATC TTC ATC A	actin-R	4	
175	AAT GAG GGA CAC ATA CCA ACC AC	sqs-F	5	
-	GAG GTT CAG AGA CAG CCC ATT C	sqs-R	6	
150	GAC GAG TCT CAT ACA CGC AGA G	fds1-F	7	
-	ATC CAC ATA GTA AGG CTT TCC TC	fds1-R	8	

با استفاده از کیت CyberGreen (شرکت سینا کلون) انجام شد. برای سنجش الگوی تغییر بیان ژنها در تمامی CDNAهای سنتز شده از نمونههای مورد مطالعه از مستر میکس Ampliqon SYBR green Master Mix High میکس ROX استفاده شد. واکنشهای PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر (۱۰ میکرولیتر از مستر میکس، سه پیکومول از جفت آغازگرها در مرحله اول، با بکارگیری cDNA سنتز شده برای تمامی نمونههای کنترل و غیرکنترل بهعنوان الگو، نواحی ژنی کنترل کننده آنزیمهای فارنسیل دی فسفات و اسکوآلن سنتاز برای اطمینان از صحت آغازگرهای طراحی شده تکثیر یافتند. بررسی کمی بیان ژنهای مورد نظر بهروش Real Time PCR set Corbett (3000) استفاده از دستگاه (3000)

پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی/ سال هفدهم/ شماره ۱/ ۱۴۰۴ .

و یک میکرولیتر از cDNA) در چرخههای: واسرشت اولیه بهمدت ۱۰ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد ، سپس ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد (۲۰ ثانیه)، ۵۷ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه) و در نهایت طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. qPCR با سه تکرار بیولوژیکی برای هر نمونه و سه تکرار فنی برای هر نمونه بیولوژیکی انجام پذیرفت. کنترل منفی Master Mix علاوه بر أغازگرها در تمام اجزاء qPCR در نظر گرفته شد. دادههای فلورسانس ویژگی خوبی را برای محصولات PCR نشان داد. منحنی تکثیر برای هر جفت آغاز گر به شکل سیگموئید بود و منحنی ذوب تنها یک پیک را نشان داد که مربوط به یک محصول خاص بود (شکلهای ۳ و ۴). برای تجزیه و تحلیل نسبت بیان ژنهای هدف SQS و FDS در مقایسه با ژنهای کنترل rps18 و Actin برای تمام تیمارها از روش PCR استفاده شد. میزان بازده PCR برای هر ژن از فرمول Ratio= 2 - محت آمد. همچنین، برای بررسی و تأیید عدم وجود آلودگی ژنومی از نمونه کنترل منفی (No RT Control) استفاده شد. پس از بررسی میزان تکثیر از طریق PCR Time Real، برای دستیابی به چرخه آستانه و میزان غلظت بیان ژنها از نرم افزار دستگاه استفاده شد. پس از مرتب کردن اعداد مربوط به چرخه آستانه، دادهها برای تجزیه واریانس در نرم افزار گراف پد پریسم (GraphPad Prism10) وارد و تجزیه شدند. آزمون T برای مقایسات دو به دو در سطح احتمال ۲/۰۵ انجام و علاوه بر این، خطای استاندارد (SEM) نیز محاسبه گردید.

# نتايج و بحث

در منطقه مورد مطالعه و در دو کوه رادیواکتیو A و غیر رادیواکتیو B، ۱۰ نقطه با شدتهای تابشی متفاوت جهت نمونهبرداری سیستماتیک تعیین شدند که هرکدام در ارتفاع متفاوتی قرار گرفته بودند. بدینمنظور برای جلوگیری از اتلاف

هزینه و کاهش خطاهای ازمایشی ناشی از تفاوت جغرافیایی، دو کوه هم ارتفاع در یک نقطه مشابه جغرافیایی جهت نمونهبرداری انتخاب گردید. این نقاط به صورت روبروی هم در ارتفاع یکسانی واقع شده بودند. وجود مقادیر متفاوت از عناصر پرتوزا همچون اورانیوم، توریوم و پتاسیم، شدتهای متفاوتی از تشعشع را در نقاط مختلف انتخاب شده ایجاد می کرد و همبستگی مثبتی بین مقادیر این عناصر با شدت تابش مشاهده شد. تفاوت اصلی نمونههای برداشته شده از این نقاط بهدلیل تحت تأثير قرار گرفتن از مقدار شدت تشعشع و خاک محل رویش بود. طبیعتاً انتظار میرفت نقاط شاهد دارای بافت یکسانی از نظر ترکیبات عناصری باشند و همچنین ارتفاع مختلف در نقاط شاهد بهدلیل عدم وجود عناصر رادیواکتیو در محل دارای تشعشع شبیه حالت نقاط غیر رادیواکتیو بودند. در این صورت مقایسه متابولیتی نمونهها در دو منطقه نمونه گیری (A و B) برای جدا نمودن اثرات شدت تشعشع امکان پذیر بهنظر میرسید. دلیل انتخاب گیاه درمنه کوهی (A. absinthium) داشتن شرایط رشدی چندساله این گیاه بود که طبیعتاً سالیان سال تحت شرایط تشعشعات محیطی ساتع شده از پسماندهای مواد رادیواکتیو در منطقه، رشد یافته بود و می توانست الگوی بهتری برای مطالعه اثر تشعشعات نسبت به دیگر گیاهان با شرایط رشدی یکساله باشد. منحنی ذوب حاصل از سنجش کمی ژن کد کننده فارنسیل دی فسفات (FDS) شدت نورفلورسانس را تقریباً ۸۵ درجه سانتی گراد (شکل ۳) و برای ژن کدکننده آنزیم اسکوآلن سنتاز (SQS) ۸۱ درجه سانتیگراد (شکل ۴) نشان داد. وجود پیک در یک دما برای تمامی تیمارها نشان از اختصاصی بودن محصول واکنش بود. پس از اتمام فرایند Real time PCR با توجه به مشاهده منحنیهای ذوب (شکلهای ۳ و ۴) میتوان گفت که أغازگرها بهصورت اختصاصی عمل کردهاند و یک نمونه منفرد از cDNA را تکثیر نمودند.



(A. absinthium) شكل ٣- آناليز منحنى ذوب PCR Real time ژن كدكننده فارنسيل دى فسفات (FDS) در گياه درمنه كوهى Figure 3. Real-time PCR Melting curve analysis of Farnesyl Diphosphate Synthase (FDS) Gene in A. absinthium

بررسی الگوی بیان ژنهای فارنسیل دیفسفات و اسکوالن سنتاز تحت تأثیر اشعه گامای محیطی



(A. absinthium) شکل ۴– أناليز منحنى ذوب PCR Real time ژن کدکننده آنزيم اسکوآلن سنتاز (SQS) در گياه درمنه کوهى (Figure 4. Real-time PCR melting curve analysis of the Squalene Synthase (SQS) Gene encoding enzyme in A. absinthium

ژن فارنسیل دی فسفات در نمونههای جمع آوری شده از مناطق رادیواکتیو و غیر رادیواکتیو در سطح احتمال ۹۹ درصد اختلاف معنیداری باهم ندارند (شکل ۵). میزان تغییرات بیان ژنهای مورد مطالعه در شکل ۶ آورده شده است. علاوه بر این، مقدار ارزش P (value ) برای بیان نسبی ژن اسکوآلن سنتاز در نمونههای مناطق رادیواکتیو و غیر رادیواکتیو ۷/۰۰۷۷ و برای ژن فارنسیل دی فسفات مقدار ۶/۶۰۳۹ محاسبه گردید. مقایسه آماری الگوی نسبی بیان ژن اسکوآلن (SQS) در نمونههای غیر رادیواکتیویته (Bsqs) و در نمونههای رادیواکتیویته (Asqs) نشان داد که بین میزان بیان ژن اسکوآلن سنتاز در نمونههای جمع آوری شده از مناطق رادیواکتیو و غیر رادیواکتیو در سطح احتمال ۹۹ درصد اختلاف معنیداری وجود دارد. همچنین، آنالیز آماری الگوی نسبی بیان ژن فارنسیل دی فسفات (FDS) در نمونههای غیر رادیواکتیویته (Bfds) و نمونههای رادیواکتیویته (Afds) نشان داد که بین میزان بیان



SQS & FDS Genes

شکل ۵– مقایسه الگوهای بیان نسبی دو ژن SQS. (Bsqs؛ بیان ژن اسکوآلن در نمونههای غیر رادیواکتیویته، Asqs؛ بیان ژن اسکوآلن در نمونههای رادیواکتیویته و Bfds) FDS؛ بیان ژن فارنسیل دی فسفات در نمونههای غیر رادیواکتیویته، Afdp: بیان ژن فارنسیل دی فسفات در نمونههای غیر رادیواکتیویته)

Figure 5. Comparison of Relative Expression patterns of two Genes, SQS (Bsqs: Squalene Gene Expression in Non-Radioactive Samples, Asqs: Squalene Gene Expression in Radioactive Samples) and FDP (Bfdp: Farnesyl Diphosphate Gene Expression in Non-Radioactive Samples, Afdp: Farnesyl Diphosphate Gene Expression in Radioactive Samples)

پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی/ سال هفدهم/ شماره ۱/ ۱۴۰۴ ......



شکل ۶– نمودار مقایسه میزان تغییرات بیان دو ژن SQS (Bsqs؛ بیان ژن اسکواَلن در نمونههای غیر رادیواکتیویته، Asqs؛ بیان ژن اسکواَلن سنتاز در نمونههای زادیواکتیویته، Bfdp) FDP؛ بیان ژن فارنسیل دی فسفات در نمونههای غیر رادیواکتیویته، Afdp: بیان ژن فارنسیل دیفسفات در نمونههای غیر رادیواکتیویته)

دى فسفات در نمونه هاى غير راديواكتيويته) Figure 6. Comparative bar graph showing expression changes of two Genes, SQS (Bsqs: Squalene Gene Expression in Non-Radioactive Samples, Asqs: Squalene Synthase Gene Expression in Radioactive Samples) and FDS (Bfds: Farnesyl Diphosphate Gene Expression in Non-Radioactive Samples, Afds: Farnesyl Diphosphate Gene Expression in Non-Radioactive Samples)

> برای تفکیک بهتر اثرات تشعشعات مواد رادیواکتیو در ارتفاعات مختلف میانگین تغییرات الگوی بیان دو ژن SQS و FDS در نمونههای گیاهی مورد مطالعه رویش یافته در

ارتفاعات مختلف مناطق رادیواکتیو (Radiation) و میانگین بیان نسبی ژن در ناحیه غیر رادیواکتیو (Control) نیز محاسبه شدند (شکل ۷ و ۸).



Altitude (m)

شکل ۷ – مقایسه تغییرات الگوی بیان ژن FDS در نمونههای گیاهی مورد مطالعه رویش یافته در ارتفاعات مختلف مناطق رادیواکتیو و میانگین بیان نسبی ژن در ناحیه غیر رادیواکتیو (Control). میانگین تشعشعات برای (ناحیه کنترل: 0/18 میلیسیورت، ارتفاع 900-860: 0/567، ارتفاع 930-910: 1/25، ارتفاع 1/00-910: 1/26، میلی سیورت) اندازهگیری شد.

Figure 7. Comparison of FDS Gene expression pattern changes in plant samples grown at different altitudes in radioactive areas and average Relative Gene Expression in Non-Radioactive Area (Control). Average Radiation for (Control Area: 0.18 mSv, Altitude 860-900: 0.567, Altitude 910-930: 1.25, Altitude 940-1000: 0.6 mSv) was Measured.

بررسی الگوی بیان ژنهای فارنسیل دی فسفات و اسکوالن سنتاز تحت تأثیر اشعه گامای محیطی



Altitude (m)

شکل ۸– مقایسه تغییرات الگوی بیان ژن SQS در نمونههای گیاهی مورد مطالعه رویش یافته در ارتفاعات مختلف مناطق رادیواکتیو و میانگین بیان نسبی این ژن در ناحیه غیر رادیواکتیو (Control). میانگین تشعشعات برای (ناحیه کنترل: ۱۸/۰ میلی سیورت، ارتفاع 900-860: مایلی میلی سیورت) اندازه گیری شد.

Figure 8. Comparison of SQS Gene Expression Pattern Changes in plant samples grown at different altitudes in radioactive areas and average Relative Gene Expression in Non-Radioactive Area (Control). Average Radiation for (Control Area: 0.18 mSv, Altitude 860-900: 0.567, Altitude 910-930: 1.25, Altitude 940-1000: 0.6 mSv) was Measured.

آزمایشات با گیاهان رشد یافته از دانههای پرتودهی شده نشان داده است که دوزهای متوسط و بالای پرتوهای یونیزان باعث تجمع پروتئین محلول در بافتهای گیاهی می شود (Alikamanoglu et al., 2011; Desai & Rao., 2014) تغییرات در محتوا و فعالیت پروتئین ها پس از تابش می تواند نتيجه تغييرات در تعادل سرعت سنتز و تجزيه پروتئين باشد. رادیکالهای آزاد تشکیل شده در طول تابش باعث اكسيداسيون پروتئينها شده كه مىتواند طول عمر عملكردى پروتئینها را کاهش دهد. ثابت شده است که تشعشعات منجر به تجمع پروتئین های یوبی کوئیتین شده (پروتئین هایی که آسیب دیده و آماده تجزیه پروتئولیتیک هستند) می شود. با این حال، مشخص شده است که فعالیت پروتئازومها پس از تابش كاهش مى يابد (Pervan et al., 2005). اما فعاليت عملكردى بخشی از مولکول پروتئین علارغم افزایش در مقدار آن، ممکن است از بین برود. در تحقیقی حسنزاده و همکاران (Hassanzadeh et al., 2022) به بررسی اثر پسماندهای معدن متروكه اورانيوم بر تغييرات بيوش\_يميايي اس\_انس گياه درمنه کوهی پرداخته و تغییرات معنیداری را در مقادیر متابولیتها در هر دو نمونه مورد مطالعه تحت تابش رادیواکتیو و شاهد مشاهده نمودند. بهطوری که، تغییرات افزایشی را در مقادیر متابولیتهای گاما تریینن، اکالییتول، توژون و کامفور اثبات نموده و نتیجه گرفتند، قرار گرفتن طولانی مدت گیاهان چندساله در معرض تابشهای محیطی منجر به تغییرات بیوشیمیایی شده که ممکن است در نتیجه جهشزایی عناصر پرتوزا در ژنهای دخیل در مسیرهای بیوسنتزی متابولیتهای ثانویه باشد. در تحقیق حاضر تغییر در بیان ژنها کاملاً مشهود بوده و افزایش چندین برابری بیان ژن فارنسیل دی فسفات و ژن اسکوآلن سنتاز میتواند تغییرات افزایشی در متابولیتهای هدف این ژنها را تقویت نماید. همچنین، بهدلیل بیان آبشاری ژنهای مورد مطالعه در مسیر بیوسنتزی ایزوپرونوئیدها و نقش اساسی ماده اسکوآلن در مهار رادیکالهای آزاد ایجاد

شــده در اثر تشــعشــعات محيط نمونـهبرداري، احتمـالاً نسخهبرداری توالی ژنی کد کننده آنزیم اسکوآلن سنتاز با مقدار و سرعت بیشتری انجام پذیرفته است که نیاز است در زمینه تغییرات بیوشیمیایی حاصل شده در مسیر، مطالعات بیشتری انجام پذیرد. تشعشعات علاوه بر ایجاد تغییر در میزان کلی سنتز و تجزیه پروتئینها، ویژگی پروتئینها را نیز تحت تاثیر قرار میدهد. این تغییرات در نتیجه اثر بر تنظیم رونویسی و ترجمه در سطح بیان ژنها میباشیند. با این حال، گزارش شده است که قرار گرفتن در معرض عوامل استرسزا، از جمله پرتوهای یونیزان، منجر به همبستگی ضعیف بین سطوح MRNA و پروتئينهاي مربوطه مي شود () القاد ( Lü et al., 2006 Gicquel et al., 2011). عدم وجود همبستگی با این واقعیت توضيح داده مي شود كه سنتز يك پروتئين نه تنها به فعاليت رونویسی ژنهای مربوطه بلکه فعالیتهای قبل و پس از ترجمـه mRNA نيز بســتگى دارد ( ;mRNA نيز بســتگى Braunstein et al., 2009; Trivigno et al., 2013). علاوه بر این، تعداد ژنهایی که فعالیت ترجمهای آنها توسط تشعشع تغییر داده شد، چندین برابر بیشتر از ژنهایی بود که رونویسیی آنها تحت تأثیر قرار گرفت. علاوه بر مسیرهای استاندارد پاسن به استرس، ارگانیسمهای تیمار یافته با تشعشعات، تغییراتی را در ترجمه پروتئینهای دخیل در تنظیم رونویسی و بیان ژن مرتبط با آن نشان میدهند. پس میتوان نتیجه گرفت که اثرات پرتوها در سطح ترجمه ممکن است بر روى برخى از عوامل رونويسى باشد (Lü et al., 2006).

میزان بیان ژن اسکوآلن سنتاز در ارتفاع ۸۶۰–۹۰۰ متر با متوسط شدت تشعشع (۸۵۶۷ میلی سیورت)، در بالاترین مقدار خود بود که در ارتفاع ۹۱۰–۹۳۰ با بالاترین میزان تشـعشـع (۱/۲۵ میلی سیورت) میزان بیان ژن اسکوآلن افت شـدیدی پیدا کرد. می توان استنباط نمود که بهینه شدت تشعشع برای تحریک بیان ژن اسکوآلن سنتاز در محدوده ۰/۵ میلی سیورت بوده و افزایش شدت تشعشعات منجر به کاهش شدید بیان پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی/ سال هفدهم/ شماره ۱/ ۱۴۰۴ ......

ژنها با استفاده از روش Real time PCR نشان داد که گیاهان پلی پلوئید افزایش بیان معنیداری نسبت به گیاهان دیپلوئید و پایه مادری دارند و این افزایش بیان منجر به افزایش متابولیتهای ثانویه تحت کنترل ژنهای این مسیر بيوســنتزى شــده اســت (Madani *et al.*, 2021). اخيراً، فناورىهايى مانند ترانسكريپتوميكس براى ارائه پاسخ خاص به اثرات پرتو گاما بر ژنوم استفاده شدهاند. با استفاده از مطالعات مرتبط با اعمال تنش از جمله تشميعات يونيزان امکان شــناسـایی ژنهای درگیر در مسـیرهای بیوســنتزی متابولیتهای گیاهی و فعال در پاسخ به عوامل محیطی فراهم می گردد. همچنین، با شناسایی فعالیتهای ژنی در برابر انواع تنشها امکان بکارگیری این عوامل در تحریک مسیرهای بیوسنتزی در شرایط کنترل شده برای تولید در مقیاس وسیع فراهم خواهد شد. با توجه به این که جهش زایی عناصر پرتوزا اثبات شده است، می توان نتیجه گرفت که قرار گرفتن طولانیمدت گیاهان چندساله در معرض تابشهای رادیواکتیو منجر به ایجاد تغییرات ژنتیکی میشود. احتمالاً این جهشها با تغییر ساختمان و رفتار آنزیمهای دخیل در مسیرهای بيوسنتز متابوليتهاى ثانويه، يك نوع واكنش محافظتي ژنتیکی بیوشـیمیایی گیاه برای مقابله با آسـیبهای عناصـر رادیکالهای آزاد ایجاد شده در اثر تشعشعات مواد پرتوزا باشد.

این ژن می گردد و احتمالا با افزایش شدت تشعشعات و پرتوهای یونیزان، گیاه هوشـمندانه فعالیت مسـیر بیوسـنتزی ماده اسکوالن را تعدیل نموده و مسیر بیوسنتزی را به سمت سنتز سسکوئی ترپن ها که برای استفاده از پیش ماده مشترک فارنسیل دی فسفات با آنزیم اسکوآلن سنتاز در رقابت هستند، هدایت مینماید. ثابت شده است که انواع سسکوئی ترپنها در گیاهان، دارای اثرات فعال زیستی بوده و نقش جلوگیری از تجمع رادیکال های آزاد داشته و از فسادپذیری سلولی ممانعت مى نمايند (Bartikova et al., 2014). علاوه بر آسيب مستقیم به ماکرومولکولهای زیستی که در چرخههای واكنشى شركت دارند، پرتوهاي يونيزان چندين فرايند تنظيمي را مختل می کند. از جمله، فرایندهایی که در سطح بیان ژنی حضور دارند، کنترل کنندههایی که وضعیت سایتهای حساس به اکسایش آنزیمها را کنترل می کنند و فرایندهایی که ترکیب چربیهای غشاها را تحت تأثیر قرار میدهند. اثبات شده است که مشارکت این مکانیسمهای مبتنی بر تنظیم در تأثیر کلی پرتوهای یونیزان بر فتوسنتز معنی دار است ( Sukhov et al., 2014; Shikanai, 2016; Sukhov, 2016). در تحقيقي حسين زاده و همكاران (Hassanzadeh *et al.*, 2022) با هدف مقایسه تغییر بیان برخی از ژنهای مسیر بیوسنتزی تانشمینونها بین گیاهان با پایه کروموزومی دیپلوئید و تتراپلوئید در گیاه مریم گلی پرداختند، نتایج مقایسات کمی

### References

- Alikamanoglu, S., Yaycili, O., & Sen, A. (2011). Effect of gamma radiation on growth factors, biochemical parameters, and accumulation of trace elements in soybean plants (*Glycine max* L. Merrill). *Biological Trace Element Research*, 141, 283-293. <u>https://doi.org/10.1007/s12011-010-8709-y</u>
- Bartikova, H., Hanusova, V., Skalova, L., Ambroz, M., & Bousova, I. (2014). Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(22), 2478-2494. https://doi: 10.2174/1568026614666141203120833
- Batiha, G. E., Beshbishy, A. M., Tayebwa, D. S., Adeyemi, O. S., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2019). Anti-piroplasmic potential of the methanolic Peganum harmala seeds and ethanolic Artemisia absinthium leaf extracts. *The Journal of Protozoology Research*, 29(1-2), 8-25. <u>https://doi.org/10.32268/jprotozoolres.29.1-2\_8</u>
- Braunstein, S., Badura, M. L., Xi, Q., Formenti, S. C., & Schneider, R. J. (2009). Regulation of protein synthesis by ionizing radiation. *Molecular and Cellular Biology*, 29(21), 5645-5656. <u>https://doi.org/10.1128/mcb.00711-09</u>
- Caplin, N., & Willey, N. (2018). Ionizing radiation, higher plants, and radioprotection: from acute high doses to chronic low doses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 375099. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00847</u>
- Chi, Y. H., Koo, S. S., Oh, H. T., Lee, E. S., Park, J. H., Phan, K. A. T., Wi, S. D., Bae, S. B., Paeng, S. K., & Chae, H. B. (2019). The physiological functions of universal stress proteins and their molecular mechanism to protect plants from environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 444151. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00750</u>
- Desai, A. S., & Rao, S. (2014). Effect of gamma radiation on germination and physiological aspects of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) millsp). Seedlings. *International Journal of Research in Applied*, *Natural and Social Sciences*, 2(6), 47-52. <u>https://doi: 10.1002/fsn3.50</u>
- Dhar, M. K., Koul, A., & Kaul, S. (2013). Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. *New Biotechnology*, 30(2), 114-123. <u>https://doi: 10.1016/j.nbt.2012.07.001</u>
- Gao, R., Yu, D., Chen, L., Wang, W., Sun, L., & Chang, Y. (2019). Cloning and functional analysis of squalene synthase gene from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. *Protein Expression and Purification*, 155, 95-103. <u>https://doi: 10.1016/j.pep.2018.07.011</u>
- Geras' kin, S., Vasiliyev, D., Makarenko, E., Volkova, P., & Kuzmenkov, A. (2017). Influence of longterm chronic exposure and weather conditions on Scots pine populations. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 11240-11253. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-017-8692-3</u>
- Gicquel, M., Esnault, M.-A., Jorrín-Novo, J. V., & Cabello-Hurtado, F. (2011). Application of proteomics

to the assessment of the response to ionising radiation in Arabidopsis thaliana. *Journal of Proteomics*, 74(8), 1364-1377. <u>https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.025</u>

- Hassanzadeh, F., Asghari Zakaria, R., Darvishzadeh, R., & Hosseinpour Azad, N. (2022). Enhanced Expression of Genes Involved in the Biosynthesis Pathway of Tanshinones in Tetraploid Plants of Salvia Officinalis L. Journal of Crop Breeding, 14(41), 184-193. <u>https://doi:10.52547/jcb.14.41.184</u> [In Persian]
- Hassanzadeh, M., Hosseinpour azad, N., & Zoulfagharpour, F. (2022). The Mutagenic Effects of Environmental Radon Gas Radiation on the Tanshinone Related Metabolites in *Artemisia Absinthium*. *Journal of Crop Breeding*, *14*(41), 129-137. <u>https://doi:10.52547/jcb.14.41.129</u> [In Persian]
- Joiner, M.C., van der Kogel, A.J. and Steel, G.G. (2009) Introduction: The Significance of Radiobiology and Radiotherapy for Cancer Treatment. In: Joiner, M. and van der Kogel, A., Eds., Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition, Hodder Arnold Publication, London, 1-10. http://dx.doi.org/10.1201/b13224-2
- Madani, H., Escrich, A., Hosseini, B., Sanchez-Muñoz, R., Khojasteh, A., & Palazon, J. (2021). Effect of Polyploidy Induction on Natural Metabolite Production in Medicinal Plants. *Biomolecules*, 11(6), 899. <u>https://doi.org/10.3390/biom11060899</u>
- Mu, J., Wang, Y., Wang, M., Zhang, D., & Liu, M. (2023). Identification of reliable reference genes for gene expression studies in mouse models under microplastics stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 252, 114569. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114569
- Kirby, J., & Keasling, J. D. (2009). Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. Annual Review of Plant Biology, 60, 335-355. <u>https://doi:</u> 10.1146/annurev.arplant.043008.091955
- Kong, S.-G., & Okajima, K. (2016). Diverse photoreceptors and light responses in plants. Journal of Plant Research, 129, 111-114. <u>https://doi 10.1007/s10265-016-0792-5</u>
- Lü, X., de la Peña, L., Barker, C., Camphausen, K., & Tofilon, P. J. (2006). Radiation-induced changes in gene expression involve recruitment of existing messenger RNAs to and away from polysomes. *Cancer Research*, 66(2), 1052-1061. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3459
- Møller, A. P., & Mousseau, T. A. (2015). Strong effects of ionizing radiation from Chernobyl on mutation rates. *Scientific Reports*, 5(1), 8363. <u>https://doi.org/10.1038/srep08363</u>
- Pervan, M., Iwamoto, K. S., & McBride, W. H. (2005). Proteasome structures affected by ionizing radiation. *Molecular Cancer Research*, 3(7), 381-390. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-05-0032
- Shabala, S., White, R. G., Djordjevic, M. A., Ruan, Y.-L., & Mathesius, U. (2015). Root-to-shoot signalling: integration of diverse molecules, pathways and functions. *Functional Plant Biology*, 43(2), 87-104. <u>https://doi.org/10.1071/FP15252</u>
- Sharopov, F. S., Sulaimonova, V. A., & Setzer, W. N. (2012). Composition of the Essential oil of Artemisia absinthium from Tajikistan. *Records of Natural Products*, 6(2). <u>https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.946.949</u>
- Shikanai, T. (2016). Regulatory network of proton motive force: contribution of cyclic electron transport around photosystem I. *Photosynthesis Research*, 129, 253-260. <u>https://doi.org/10.1007/s11120-016-</u> 0227-0
- Sparrow, A. H., & Miksche, J. P. (1961). Correlation of nuclear volume and DNA content with higher plant tolerance to chronic radiation. *Science*, 134(3474), 282-283. <u>https://doi.org/10.1126/science.134.3474.282</u>
- Sukhov, V. (2016). Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. *Photosynthesis Research*, 130, 373-387. <u>https://doi.org/10.1007/s11120-016-0270-x</u>
- Sukhov, V., Sherstneva, O., Surova, L., Katicheva, L., & Vodeneev, V. (2014). Proton cellular influx as a probable mechanism of variation potential influence on photosynthesis in pea. *Plant, Cell & Environment*, 37(11), 2532-2541. <u>https://doi.org/10.1111/pce.12321</u>.
- Trivigno, D., Bornes, L., Huber, S. M., & Rudner, J. (2013). Regulation of protein translation initiation in response to ionizing radiation. *Radiation Oncology*, 8, 1-12. <u>https://doi.org/10.1186/1748-717x-8-35</u>
- Vanhoudt, N., Horemans, N., Wannijn, J., Nauts, R., Van Hees, M., & Vandenhove, H. (2014). Primary stress responses in Arabidopsis thaliana exposed to gamma radiation. *Journal of Environmental Radioactivity*, 129, 1-6. <u>https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.11.011</u>
- Vardhan, P. V., & Shukla, L. I. (2017). Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production. *International Journal of Radiation Biology*, 93(9), 967-979. <u>https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1344788</u>
- Vodeneev, V., Akinchits, E., & Sukhov, V. (2015). Variation potential in higher plants: mechanisms of generation and propagation. *Plant Signaling & Behavior*, 10(9), e1057365. <u>https:// doi.org/10.1080/15592324.2015.1057365</u>
- Zhang, D., Sun, W., Shi, Y., Wu, L., Zhang, T., & Xiang, L. (2018). Red and blue light promote the accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Molecules*, 23(6), 1329. https://doi.org/10.3390/molecules23061329

۱۲۸ .....