

## **Effects of sucrose and chitosan elicitors on expression of CYP79F1 gene and sulforaphane content in lepidium draba seedlings**

**Ali Riahi-Madvar** 

\*Associate Professor, Biotechnology Department, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. Tel: +983433776610, Email: [riahi.ali@gmail.com](mailto:riahi.ali@gmail.com)

**Fereshteh Jadid Bonyad**

Former M.Sc. Student, Biotechnology Department, Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. Email: [fereshtehjadidbonyad@gmail.com](mailto:fereshtehjadidbonyad@gmail.com)

**Fatemeh Rezaee**

Former Ph.D. Student, Biology Department, Faculty of science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Email: [acer.rezaee@yahoo.com](mailto:acer.rezaee@yahoo.com)

**Mahmood Maleki** 

Assistant Professor, Biotechnology Department, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. Email: [maleki.li@gmail.com](mailto:maleki.li@gmail.com)

**Mahshid Ghazizadeh Ahsaei**

Former M.Sc. Student, Biotechnology Department, Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. Email: [mah.ghz@gmail.com](mailto:mah.ghz@gmail.com)

### **Abstract**

#### **Objective**

Glucoraphanine is an aliphatic glucosinolate, which largely found in *Lepidium draba* from Brassicaceae family. This glucosinolate convert to isothiocyanate, sulforaphane (SFN) in the presence of myrosinase which has different biological activities such as the

antioxidant and anti bacterial properties, and also able to prevent proliferating of cancer cells. CYP79F1 is the first enzyme in the biosynthesis pathway of glucoraphanine.

### Materials and Methods

In this study, *L. draba* seedlings were grown for 7 days in the presence of different concentration of sucrose and chitosan (0, 25, 50, 100, 200 and 400 mg/L), in fully-random designs with three repetitions. After collection of the seedlings, SFN content in the aerial parts of them were measured using HPLC apparatus. Furthermore, in the treated seedlings, the gene expression level of CYP79F1 were examined using the Real Time PCR technique.

### Results

The results showed, that SFN content in the sucrose treated seedlings significantly increased compared to the control. While in the chitosan treated seedlings significant increase in SFN content was only seen at the 200 mg/L concentration. The results showed that the expression of CYP79 F1 was significantly increased in the treated seedlings with 50 mg/L sucrose and 50 and 100 mg/L chitosan compared to the control.

### Conclusions

According to the results, it concluded that the mentioned elicitor's concentrations can stimulate aliphatic glucosinolate biosynthesis through expression of CYP79F1 gene. Based on the role of SFN as a valuable medicinal metabolite and also the role of CYP79F1 enzyme in the glucoraphanine biosynthesis, it suggested that the effects of others concentrations and time of treatment of the mentioned elicitors were analyzed on this plant.

**Keywords:** Chitosan, Gene expression, *Lepidium draba*, Sucrose, Sulforaphane.

**Citation:** Riahi-Madvar A, Jadid Bonyad F, Rezaee F, Maleki M, Ghazizadeh Ahsaei M, (2020) Effects of Sucrose and Chitosan Elicitors on Expression of CYP79F1 Gene and Sulforaphane Content in *Lepidium draba* Seedlings . *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (2), 63-80.

*Agricultural Biotechnology Journal* 12 (2), 63-80.

DOI: 10.22103/jab.2020.15354.1201

Received: March 17, 2020; Accepted: May 2, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

## تاثیر محرک‌های ساکارز و کیتوزان بر بیان ژن کد کننده آنزیم CYP79 F1 و محتوی

### سولفورافان در گیاهچه‌های از مک

#### علی ریاحی مدوار

\*نویسنده مسول، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. تلفن: ۰۳۴۳۴۳۳۷۷۶۶۱۰، ایمیل: [riahi.ali@gmail.com](mailto:riahi.ali@gmail.com)

#### فرشته جدید بنیاد

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. ایمیل: [fereshtehjadidbonyad@gmail.com](mailto:fereshtehjadidbonyad@gmail.com)

#### فاطمه رضائی

دانش‌آموخته دکتری، گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران. ایمیل: [acer.rezaee@yahoo.com](mailto:acer.rezaee@yahoo.com)

#### محمود ملکی

گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. ایمیل: [maleki.li@gmail.com](mailto:maleki.li@gmail.com) تلفن: ۰۹۱۲۵۶۸۳۶۹۸

#### مهشید قاضی زاده احسایی

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. ایمیل: [mah.ghz@gmail.com](mailto:mah.ghz@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۳

#### چکیده

**هدف:** گلوکورافانین، یک گلوکوزینولات ایفاتیک است که در گیاه از مک (*Lepidium draba*) از خانواده شب‌بو به فراوانی یافت می‌شود. این گلوکوزینولات در حضور آنزیم میروزیناز به ایزوتیوسیانات سولفورافان تبدیل می‌شود که فعالیت‌های زیستی مختلفی از قبیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی و همچنین توانایی مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی را دارد. CYP79 F1 اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز گلوکورافانین است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، گیاهچه‌های ازمک با سه تکرار مستقل و در قالب طرح کاملاً تصادفی بمدت ۷ روز در حضور غلظت‌های مختلف ساکارز و کیتوزان (صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) رشد کردند. پس از جمع‌آوری گیاهچه‌ها، محتوای سولفورافان در اندام هوایی گیاهچه‌ها با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، میزان بیان ژن CYP79 F1 در گیاهچه‌های تیمار شده با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد آنالیز قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج نشان داد که محتوای سولفورافان در گیاهچه‌های تیمار شده با ساکارز با افزایش غلظت آن در محیط به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است، درحالی‌که در گیاهچه‌های تیمار شده با کیتوزان، افزایش معنی‌دار محتوای سولفورافان فقط در غلظت ۲۰۰ mg/L مشاهده گردید. نتایج حاصله نشان داد که بیان ژن CYP79 F1 در گیاهچه‌های تیمار شده با ساکارز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و با کیتوزان در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به نمونه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است.

**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که غلظت‌های مذکور این محرک‌ها می‌توانند با اثر بر بیان ژن CYP79F1 بیوسنتز گلوکوزینولات‌های آلیفاتیک را تحریک نمایند. با توجه به نقش و اهمیت سولفورافان به عنوان یک متابولیت دارویی باارزش و همچنین نقش آنزیم CYP79F1 در سنتز گلوکورافانین، پیشنهاد می‌شود تاثیر الیستورهای مذکور بر تولید سولفورافان و بیان ژن CYP79F1 در غلظت‌ها و زمان‌های دیگر نیز بر روی این گیاه مورد آنالیز قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** ازمک، سولفورافان، بیان ژن، ساکارز، کیتوزان.

## مقدمه

ازمک (*Lepidium draba*) گیاهی چندساله و علفی با سیستم ریشه عمیق متعلق به خانواده Brassicaceae است که توسط بذر و قطعات ریشه تکثیر می‌شود. این گیاه بومی جنوب غرب آسیا از جمله ایران و همچنین جنوب شرق اروپا است (Young, et al. 1995). از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه این خانواده می‌توان به گلوکوزینولات‌ها اشاره نمود (Stiehl & Bible 1989). گلوکوزینولات‌ها، متابولیت‌های حاوی نیتروژن و سولفور بوده و در آب محلول و مقاوم در برابر حرارت می‌باشند (Rask et al. 2000). به‌طور کلی اعتقاد بر این است که گلوکوزینولات‌ها در سیستم دفاعی گیاهان نقش دارند (Cutler 1988). گلوکوزینولات‌ها بر اساس آمینواسید پیش‌سازشان و انواع تغییرات در گروه Rشان به گلوکوزینولات‌های آروماتیک، آلیفاتیک و ایندولی طبقه‌بندی می‌شوند. یک مرحله کلیدی در بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها، N-هیدروکسی لاسیون آمینواسیدهای پیشرو به آلدوکسیم‌های مشابه است (Andersen et al. 2000). در مسیر بیوسنتز ساختار پایه گلوکوزینولات‌ها، تبدیل آمینواسیدها به آلدوکسیم‌ها توسط سیتوکروم P450 متعلق به خانواده CYP79 تسریع می‌شود (Nielsen & Møller 2000). CYP79 F1 اولین آنزیم در تشکیل آلدوکسیم در بیوسنتز گلوکوزینولات‌های آلیفاتیک است که به‌صورت هترولوگوس بیان

می‌شود و مشخص شده است که CYP79F1 مونو تا هگزا همومیتوین را متابولیزه می‌کند و هر دو گلوکوزینولات‌های آلیفاتیک کوتاه و بلند زنجیره را سنتز می‌کنند (Hansen et al. 2001).

گلوکوزینولات‌ها به محض آسیب گیاه در معرض آنزیم میروزیناز قرار گرفته و به گلوکز و یک ترکیب حد واسط بنام آگلیکون تبدیل می‌شود. با توجه به ساختار زنجیره جانبی و حضور پروتئین‌ها و کوفاکتورهای اضافی، آگلیکون سپس به شکل محصولات مختلفی از جمله ایزوتیوسیانات، اگزالودین ۲- تیون‌ها، نیتریل‌ها، اپی نیتریل‌ها و تیوسیانات‌ها بازآرایی می‌شوند (Risk et al. 2000). رایج‌ترین محصولات هیدرولیز گلوکوزینولات‌ها در بسیاری از خانواده‌های Brassicaceae مخصوصاً آن‌هایی که از جنس Brassica هستند، ایزوتیوسیانات‌ها می‌باشند. سولفورافان (۴- متیل سولفنیل بوتیل ایزوتیوسیانات) نوعی ایزوتیوسیانات است که از هیدرولیز گلوکورافانین (نوعی گلوکوزینولات آلیفاتیک) تولید می‌شود و به‌طور فراوان در کلم بروکلی و گیاه از مک یافت می‌شود (Zhang 2004). این ایزوتیوسیانات خصوصیات درمانی متفاوتی از قبیل خواص پیشگیری و درمانی بر روی سرطان‌ها (Radonic et al. 2011; Liang & Yuan 2012)، خواص ضد باکتری (Fahey et al. 2002) و آنتی اکسیدانی (Gao et al. 2001; Yeh & Yen 2009) از خود نشان می‌دهد. مطالعات گذشته نشان دادند که برخلاف سایر اعضای خانواده براسیکا، گیاه از مک، بطور عمده حاوی دو گلوکوزینولات؛ گلوکورافانین و گلوکوسینالین است (Powell et al. 2005). بنابراین این گیاه، گزینه مناسبی برای استخراج گلوکورافانین (پیش‌ساز سولفورافان) می‌باشد (Powell et al. 2005). مطالعات اخیر نشان داده است که بیشترین محتوای سولفورافان در این گیاه، در گیاهچه‌های ۳ تا ۷ روزه می‌باشد (Mohammadi et al. 2104). مطالعات اخیر نیز بیانگر این موضوع هستند که محتوای این ایزوتیوسیانات در گیاه از مک تحت تاثیر محرک‌های مختلف از قبیل سالیسیلیک اسید و فلزات سنگینی از قبیل روی (Mohammadi et al. 2104) و نانو ذراتی از قبیل نانو اکسید آهن (Aminizadeh et al. 2016) قرار می‌گیرد.

محرک‌ها ترکیباتی با منشأ زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao et al. 2005). کیتوزان به‌عنوان یکی از رایج‌ترین محرک‌های زیستی جهت تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در بافت‌های گیاهی بکار می‌رود و دارای خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد باکتری و ضد قارچی است و در کنترل بیماری‌های گیاهان کاربرد دارد. برخی از محققین گزارش کرده‌اند که کیتوزان در القاء واکنش‌های دفاعی گوناگون گیاه از قبیل تشکیل کالوس و لیگنین، سنتز پروتئین‌های وابسته به پاتوژن‌ها و چندین آنزیم دفاعی (از قبیل فنیل آلانین آمینو لیاز (PAL) و پراکسیداز) مؤثر است. باین‌حال، مکانیسم دقیق عمل کیتوزان هنوز ناشناخته است (Ferri et al. 2009). ساکارز یکی دیگر از محرک‌های زیستی است که از مولکول‌های سیگنالینگ مؤثر در طول زندگی گیاهان شناخته شده است. این قند بسیاری از فرآیندهای متابولیکی و رشدی از قبیل پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، جوانه‌زنی، رشد و توسعه گیاه، فتوسنتز، متابولیسم کربن و نیتروژن، گلدهی، واکنش به تنش‌ها و پیری را در گیاهان تعدیل می‌کند (Lunn 2008).

در اواخر دهه ۸۰ میلادی، مطالعات و بررسی‌های انجام شده نشان داد که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi & Tohidinejad 2017). DNA یک سلول دارای تعداد زیادی ژن است که به طور همزمان هیچ‌گاه بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی می‌ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016). در این تحقیق اثر ساکارز و کیتوزان بر بیان ژن CYP79 F1 و همچنین محتوی سولفورافان در گیاهچه‌های از مک مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی محیط کشت:** بذرهای گیاه از مک در اواخر بهار و اوایل تابستان از اطراف شهر کرمان برداشت شدند و توسط کارشناس خبره مورد تأیید قرار گرفتند. بذرها با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد و الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس چندین مرتبه با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند. بذرهای ضدعفونی شده بر روی محیط کشت محلول غذایی MS (Murashige & Skoog 1962) با pH برابر ۷ که حاوی آگار ۰/۸ درصد و غلظت‌های مختلف ساکارز و کیتوزان (صفر (به‌عنوان شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) درون پتری دیش‌های ۹ سانتی‌متری کشت داده شدند. پتری دیش‌ها درون ژرمیناتور با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۶۰-۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ (تاریکی: روشنایی) به مدت ۷ روز قرار گرفتند. از گیاهان رشد یافته، اندام‌های هوایی جدا و بعد از شستشو با آب مقطر استریل برای انجام آزمایشات در داخل فویل آلومینیوم استریل قرار گرفتند و پس از انجماد سریع در ازلت مایع به فریزر  $-80$  منتقل شدند.

**اندازه‌گیری میزان تولید سولفورافان توسط HPLC:** اندازه‌گیری تولید سولفورافان به روش Mohammadi

et al. (2014) با استفاده از دستگاه HPLC (1100 Series شرکت Agilent) انجام شد. به‌منظور تهیه عصاره، ۰/۳ گرم از بافت تازه گیاهچه درون هاون سائیده شد و یک میلی‌لیتر آب اسیدی (pH=۵) به آن اضافه شد. این محلول به فالفکون ۱۵

میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم با دمای  $42 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر استونیتریل به مخلوط حاصل اضافه و توسط دستگاه سونیکاتور به مدت ۳ دقیقه سونیکیت گردید تا بافت به اندازه کافی متلاشی شود. عصاره به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $10000 \text{ rpm}$  و در دمای اتاق ساتریفیوژ گردید. محلول رویی پس از عبور از فیلتر سرسنگی  $0/2$  میکرومتر در دمای آزمایشگاه به ستون (C18:  $0/46 \times 25$  سانتی‌متر) دستگاه HPLC تزریق شد. جهت جداسازی از یک حلال دوفازی شامل استونیتریل و آب به نسبت  $0/4$  و  $0/6$  استفاده شد. بعد از آماده نمودن ستون ابتدا استاندارد سولفورافان (Sigma) به دستگاه تزریق شد تا پیک استاندارد و زمان نگهداری نمونه در ستون مشخص گردد سپس نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه به ستون تزریق شدند. برای شناسایی این ترکیب از طول موج  $254$  نانومتر استفاده شد.

#### آنالیزهای مولکولی: استخراج RNA کل از بافت (فریز شده) طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA (RNX-Plus)

؛ شرکت سیناژن) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و UV اسپکتروفوتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور حذف DNA ژنومی از RNA استخراج شده از کیت DNase I (Fermentas) طبق دستورالعمل مربوطه استفاده شد. ساخت کتابخانه cDNA از روی رشته RNA الگو با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس (MMuLV) از شرکت فرمنتاز) و پرایمر الیگو dT طبق روش ارائه شده توسط Nasiri-Bezenjani et al. (2014) انجام شد. لازم به ذکر است که در طی مراحل سنتز cDNA همه مواد روی یخ نگهداری و جابه‌جا شدند. در نهایت cDNA ساخته شده به فریزر  $-20$  درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

#### بررسی بیان ژن CYP79F1 در گیاهچه‌های تیمار شده: به منظور بررسی بیان این ژن، توالی یک جفت آغازگر

برای تکثیر قطعه  $180 \text{ bp}$  مربوط به ژن CYP79F1 بر اساس توالی ثبت شده این ژن از گیاه *L. draba* در وب سایت GenBank با شماره دسترسی KT626603 و همچنین توالی آغازگرهای مربوط به ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی از روی توالی ژن آن در گیاه *Armoracia rusticana* با استفاده از نرم افزار توسط نرم افزار gene runner طراحی و توسط شرکت ماکروژن ساخت شدند (جدول ۱).

#### جدول ۱. توالی آغازگرها مربوط به ژن CYP79 F1 و GAPDH

Table 1. Primers sequences related to the CYP79F1 and GAPD

GC (%)	Tm (C°)	توالی آغازگرها Primers sequence	نام آغازگر Primer name
45.4	60.3	5'- AAGAAAGCTGGTATGATCCCTC -3'	F-GAPDH
50	58.4	5'-TACCTTAACCGCAGTGCATC-3'	R-GAPDH
45.83	63.5	5'- CACTCTATGTATAAACGGTCCGAG -3'	F-CYP79F1
45	56.4	5'- TTCCGCCTTTCCTAATCTTC -3'	R-CYP79F1

جهت تکثیر ژن CYP79 F1 و GAPDH با استفاده از کیت Syber Green (تاکارا) طبق شرایط زیر واکنش انجام گردید. واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، واسرشت‌سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و یک سیکل، و ۴۵ سیکل شامل اتصال آغازگرها در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در مرحله ذوب افزایش دما از ۷۲ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه Rotor Gene 3000 انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real Time PCR از روش Livak and Schmittgen ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) استفاده شد.

**اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید:** جهت اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد از روش Kirzek et al. (1998) استفاده شد. به این منظور، میزان ۰/۲ گرم از برگ تازه گیاه در ۳ میلی‌لیتر اتانول اسیدی شامل اتانول و اسیدکلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱ به‌طور کامل سائیده شد و پس از سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰rpm به مدت ده دقیقه، محلول رویی به‌آرامی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن میزان جذب محلول به‌دست‌آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در سه طول‌موج ۲۷۰، ۳۰۰، ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئید از ضریب خاموشی  $33000 \text{ cm}^{-2} \text{ mol}^{-6}$  استفاده و مقدار آن به صورت تجمعی و بر حسب میکروگرم ( $\mu\text{g}$ ) بر گرم وزن تر گزارش گردید (Krizek et al. 1998; Rezaee et al. 2013).

**آنالیزهای آماری:** تمامی آزمایش‌ها زیستی با ۳ تکرار مستقل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS توسط آزمون دانکن و با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۵٪ مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفتند.

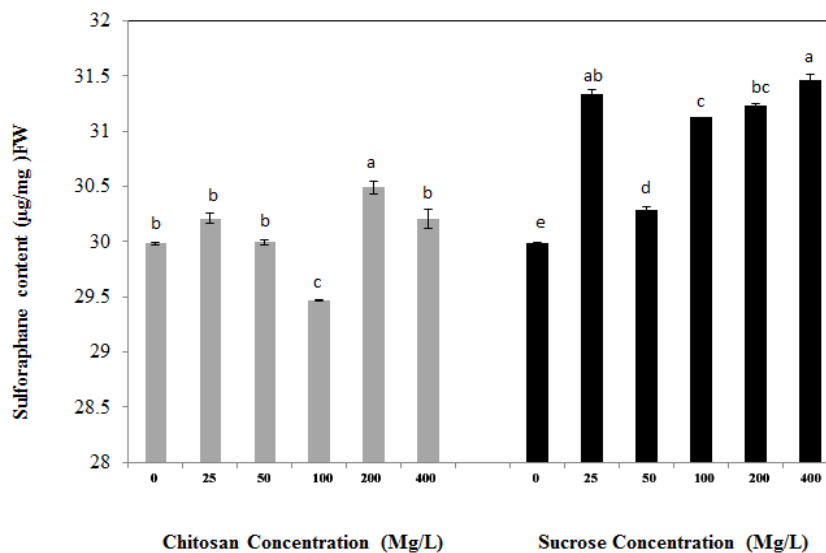
## نتایج

با توجه به اهمیت سولفورافان در درمان بیماری‌های مختلف از قبیل سرطان، در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و کیتوزان به عنوان الیسیاتور بر محتوای این ایزوتیوسیانات در گیاهچه‌های از مک مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین به‌منظور بررسی مکانیسم احتمالی این الیسیاتورها بر محتوای سولفورافان، بیان ژن آنزیم CYP79F1 به عنوان یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز سوبسترای این ماده مورد بررسی قرار گرفت.

**محتوی سولفورافان:** همان‌طور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، حضور ساکارز در محیط باعث افزایش معنی‌دار محتوی سولفورافان در گیاهچه‌ها می‌شود. بیشترین محتوی سولفورافان در تیمار با غلظت  $400 \text{ mg/L}$  این محرک مشاهده گردید. درحالی‌که در تیمار با کیتوزان، تغییر در محتوی سولفورافان تنها در تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که



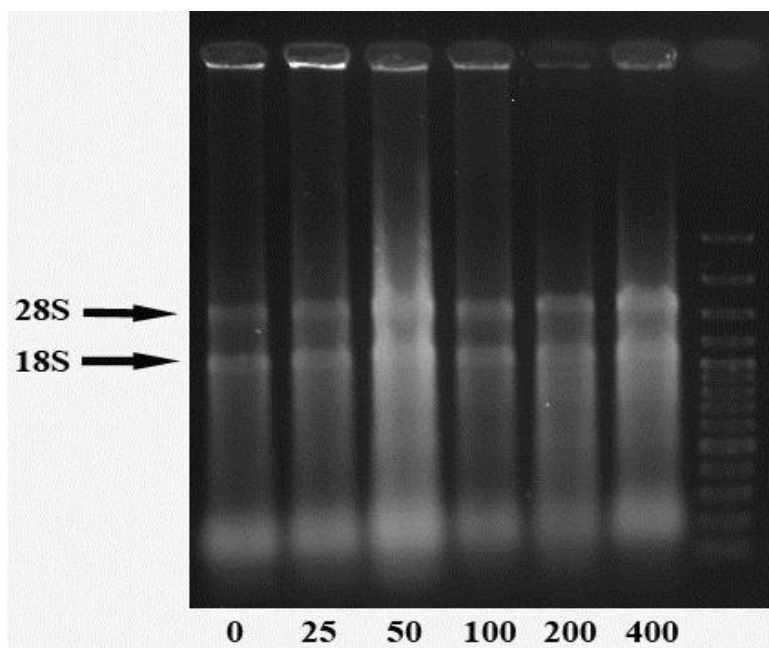
بترتیب بصورت معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد کاهش و افزایش نشان دادند و در حضور سایر غلظت‌ها محتوی سولفورافان مشابه نمونه شاهد است.



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و کیتوزان بر میزان تولید سولفورافان در گیاهچه‌های ۷ روزه *Lepidium draba*. حروف متفاوت در بالای نمودارها معنی‌داری در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

**Figure 1. Effect of different concentrations of sucrose and chitosan on solforaphane content in 7 days *Lepidium draba* seedlings. Signs with different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$ .**

آنالیز بیان ژن CYP79 F1؛ استخراج RNA کل و سنتز cDNA: همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد دو باند 28S و 18S مربوط به RNA ریبوزومی به‌وضوح برای تمامی نمونه‌ها قابل مشاهده است که نشان‌دهنده سالم بودن RNA استخراج شده می‌باشد. از روی RNA تخلیص شده با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) و پرایمر Oligo dT، کتابخانه cDNA سنتز شد و با استفاده از روش Real time PCR میزان بیان این ژن مورد آنالیز قرار گرفت.



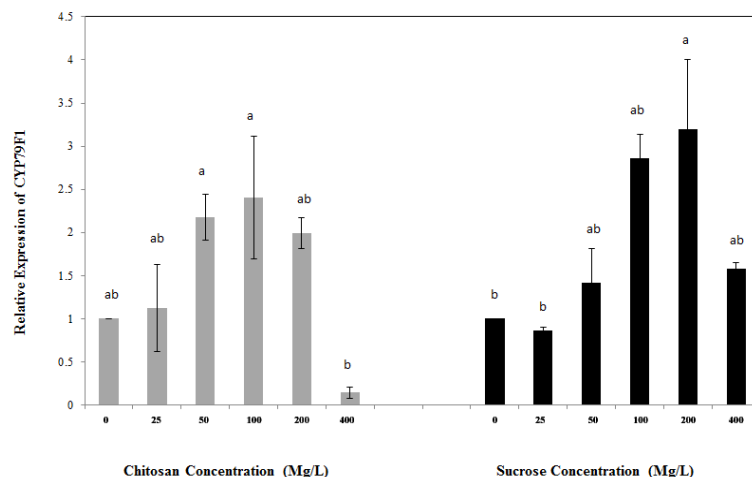
شکل ۲. نمونه‌ای از ژل آگارز یک درصد مربوط به RNAهای استخراج شده از گیاهچه‌های ۷ روزه از مک در تیمار با غلظت‌های مختلف ساکارز.

**Figure 2. Sample of 1% agarose gel related to the RNA extracted of *Lepidium draba* seedlings with different concentrations of sucrose.**

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود تنها در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ساکارز بیان ژن CYP79 F1 نسبت به نمونه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است و در سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده نگردید. از طرف دیگر، تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان این ژن در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان و نمونه شاهد مشاهده نشد. ولی بیان این ژن در تیمار با بالاترین غلظت یعنی ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بصورت معنی‌داری نسبت به گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش نشان داد.

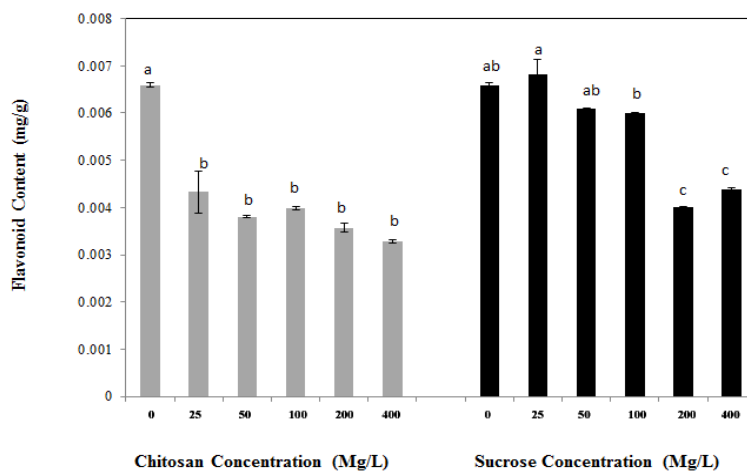
#### اثر ساکارز و کیتوزان بر محتوی فلاونوئید گیاهچه‌ها: همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، محتوی

فلاونوئیدی گیاهچه‌ها در تیمار با غلظت‌های ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ساکارز مشابه نمونه شاهد است، ولی با افزایش غلظت ساکارز محتوی فلاونوئیدی به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته است. در حالیکه کاهش معنی‌دار محتوی فلاونوئیدی در تیمار با تمامی غلظت‌های کیتوزان نسبت به نمونه شاهد مشاهده نگردید.



شکل ۳. مقایسه بیان ژن CYP79F1 در گیاهچه‌های تیمار شده از مک با غلظت‌های ساکارز و کیتوزان. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح پنج درصد است.

Figure 3. Comparison of relative expression of CYP79F1 gene in treated *Lepidium draba* seedlings with different concentrations of sucrose and chitosan. Signs with different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$ .



شکل ۴. محتوی فلاونوئید گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف ساکارز و کیتوزان. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد می‌باشند.

Figure 4. Total flavonoid content in *Lepidium draba* seedlings with different concentrations of sucrose and chitosan. Signs with different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$ .

محرك‌ها ترکیباتی با منشأ زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. گیاهان تنوع گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که نقش برجسته‌ای در دفاع گیاه در برابر گیاهخواران و پاتوژن‌ها بازی می‌کنند. گلوکوزینولات‌ها محصولات گیاهی ثانویه مشتق شده از آمینواسیدهای حاوی سولفور و نیتروژن هستند. به‌طور کلی اعتقاد بر این است که سیستم گلوکوزینولات/ میروزیناز در سیستم دفاعی گیاهان نقش داشته باشد (Cutler 1988). از آنجائیکه گیاه از مک بطور عمده حاوی دو گلوکوزینولات می‌باشد، گزینه مناسبی برای استخراج گلوکورافانین (پیش‌ساز سولفورافان) می‌باشد (Powell et al. 2005). اخیراً مشخص شده است که بیشترین محتوای ایزوتیوسیانات در این گیاه، در گیاهچه‌های ۳ تا ۷ روزه می‌باشد (Mohammadi et al. 2104).

در این پژوهش، محتوی سولفورافان، بیان ژن CYP79 F1 و همچنین محتوای فلاونوئید کل در گیاهچه‌های از مک که بمدت ۷ روز در معرض غلظت‌های مختلف ساکارز و کیتوزان رشد کرده‌بودند، مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که محتوای سولفورافان وابسته به ترکیب الیسیاتور و دوز آن تحت تاثیر قرار می‌گیرد. درحالی‌که در تیمار گیاهچه‌های با ساکارز، افزایش معنی‌دار سولفورافان مشاهده گردید، در تیمار گیاهچه‌ها با کیتوزان، تنها در غلظت ۲۰۰ mg/L افزایش معنی‌دار این ماده مشاهده شد. در آزمایش مشابهی که روی اثر ساکارز بر محتوی سولفورافان جوانه‌های بروکلی انجام شده بود، افزایش معنی‌دار محتوی سولفورافان جوانه‌های تحت تیمار با این قند مشاهده شد (Guo et al. 2011). همچنین در مطالعه‌ای مشابه که توسط Guo et al. (2011) روی اثر قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز بر محتوی گلوکوزینولات‌های تجمع یافته در جوانه‌های بروکلی انجام شد، آن‌ها گزارش کردند که این قندها بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها را در جوانه‌های بروکلی تحریک می‌کنند و ساکارز قدرتمندترین و مؤثرترین قند در تحریک تجمع متابولیت‌های ثانویه است (Guo et al. 2011). ساکارز یک دی ساکارید (قند گیاهی) است که از گلوکز و فروکتوز ساخته شده است. در دسترس بودن ساکارز در محیط کشت این امکان را برای گیاه فراهم می‌کند که با تجزیه آن به گلوکز میزان تولید گلوکوزینولات افزایش یافته و به همین ترتیب نیز میزان تولید متابولیت‌های ثانویه هم افزایش یابد. Wei et al. (2011) ثابت کردند که این محرک اثر مثبتی بر روند تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارد (Wei et al. 2011). از آنجایی که گلوکز پیش‌ساز سنتز گلوکوزینولات‌ها است، افزایش سطح گلوکز در گیاه منجر به تولید بیشتر گلوکوزینولات‌ها می‌شود. Rezaee et al. (2018) نیز نشان دادند که حضور گلوکز در محیط کشت گیاه از مک منجر به افزایش سولفورافان در این گیاه می‌شود (Rezaee et al. 2018). اثر سیگنالی گلوکز که به‌طور مثبت بیوسنتز گلوکوزینولات‌های آلیفاتیک را تنظیم می‌کند توسط Miao et al. (2013) مشاهده گردید. آن‌ها نشان دادند که گلوکز به‌طور معنی‌داری محتوی تکی و مجموع گلوکوزینولات‌های آلیفاتیک را افزایش می‌دهد (Miao et al. 2013).

به منظور بررسی مکانیسم احتمالی تاثیر این الیسیتورها بر تولید سولفورافان، بیان ژن CYP79 F1 به عنوان بیان ژن یکی از کلیدی ترین آنزیمها در تبدیل اسید آمینه به آلدوکسیم (Nielsen & Møller 2000) در گیاهچه های ۷ روزه *Lepidium draba* تحت تیمار با این الیسیتورها مورد آنالیز قرار گرفت. همان طور که در نتایج مشاهده می شود، بیان این ژن در تیمار با ساکارز در حضور غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر بطور معنی داری نسبت به نمونه شاهد افزایش و در تیمار با بالاترین غلظت کیتوزان بطور معنی داری نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته است. مطالعات مختلف نیز نشان داده است که بیان این ژن در گیاه از مک تحت تاثیر تیمار با گلوکز (Rezaee et al. 2018)، استرس شوری (Jamshidi Goharrizi et al. 2019) و اکسید روی (Mohammadi et al., 2016) تحت تاثیر قرار می گیرد. که با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. نتایج حاصل از سنجش محتوی فلاونوئید گیاهچه های تیمار شده با ساکارز و کیتوزان نشان دادند که محتوی این ترکیبات نیز تحت تاثیر این محرکها قرار می گیرد. بطوریکه محتوی فلاونوئیدها در حضور ساکارز در غلظت های بالاتر از ۱۰۰ mg/L بطور معنی داری نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته بود در تیمار با کیتوزان، کاهش معنی دار این مواد در تمامی غلظت ها مشاهده گردید.

ترکیبات فنولیک به عنوان عوامل مهم شرکت کننده در فعالیت های آنتی اکسیدان ها در گیاهان شناخته شده اند. ترکیبات فنولی در گیاهان از طریق مسیر فنیل پروپانوید تولید می شوند و PAL یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز پلی فنولها است (Guo et al. 2011). همچنین در آزمایشی مشابه اثر قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز بر محتوی آنتوسیانین جوانه های بروکلی انجام شده بود افزایش معنی دار سطح آنتوسیانین در تمامی تیمارهای قندی در جوانه های بروکلی در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد که با نتایج بدست آمده از مطالعه ما هم خوانی داشت (Guo et al. 2011). Solfanelli et al. (2006) نشان دادند که مسیرهای بیوسنتزی فلاونوئید و آنتوسیانین به شدت در حد بالایی به دنبال تیمار با ساکارز تنظیم می شوند و ساکارز بر محتوی فلاونوئید و آنتوسیانین در *Arabidopsis thaliana* تاثیر می گذارد (Solfanelli et al. 2006). این گزارشات با نتایج حاصل از این تحقیق هم خوانی ندارد. نکته قابل توجه اینکه، محتوی سولفورافان و فلاونوئید تقریباً روند معکوسی را در گیاهچه های تحت تیمار با الیسیتورها نشان می دهند. هماهنگ با نتایج مشاهده شده در اینجا، که افزایش محتوی سولفورافان و کاهش محتوی فلاونوئید مشاهده گردید، Rezaee et al. (2017) نیز در تیمار این گیاه با الیسیتور جاسمونات روندی مشابه را گزارش کردند. درحالی که محتوی سولفورافان در تیمار با جاسمونات کاهش یافته بود افزایش محتوی فلاونوئیدی را مشاهده کردند (Rezaee et al. 2017).

**نتیجه گیری:** مطالعات نشان داده است که محتوی گلوکوزینولات های گیاهان بازتابی از دو فرآیند است؛ القای بیوسنتز گلوکوزینولاتها به وسیله محرکها و هیدرولیز آنها به وسیله میروزیناز است (Mithen, Dekker et al. 2000). بر اساس نتایج حاصله که نشان دهنده تحت تاثیر قرار گرفتن بیان ژن CYP79 F1 تحت تیمار با این الیسیتورها، چنین بنظر می رسد که دلیل افزایش محتوی سولفورافان به این علت است که ساکارز و همچنین کیتوزان به عنوان یک مولکول سیگنالیگ عمل کرده و با اثر

بر بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز گلوکوزینولات‌ها سبب افزایش تولید آن شده است. بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که سولفورافان تولید شده می‌تواند تحت تاثیر میزان بیان و عملکرد آنزیم میروزیناز نیز قرار گیرد. مطالعات قبلی نشان داده است که حضور گلوکز در محیط کشت گیاه ازمک، بیان میروزیناز را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Rezaee et al. 2018) و همچنین فعالیت این آنزیم در حضور برخی فلزات تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Mohammadi et al. 2016). در هر صورت، مطالعات بیشتری لازم است تا مکانسیم دقیق عملکرد اسیتورهای ساکارز و کیتوزان بر تولید سولفورافان در این گیاه مشخص گردد. با توجه به اهمیت سولفورافان در پیشگیری از سرطان و جلوگیری از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، تلاش برای افزایش تولید این ماده در گیاهچه‌های ازمک که بطور عمده حاوی دو گلوکوزینولات می‌باشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

**سپاسگزاری:** این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته با قرارداد شماره ۷/۹۴/۳۶۱۹/ص انجام شده است. بنابراین، مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

## منابع

- احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.
- توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.
- جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.
- رضائی فاطمه، لاهوتی مهرداد، ملکی محمود، گنجعلی علی (۱۳۹۷) تغییرات محتوای سولفورافان و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های ازمک (*Lepidium draba L.*) در پاسخ به جاسمونات. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۷(۲۶)، ۴۵-۵۶.
- محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.
- محمدی مهدی؛ ریاحی مدوار علی؛ پورسیدی شهرام و امینی‌زاده مریم (۱۳۹۵) بررسی اثر یون‌های مس و روی بر فعالیت آنزیم میروزیناز و تشکیل سولفورافان در گیاه *Lepidium draba*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۸(۱)، ۹۴-۸۱.

## References

- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Effect of roasted soybean and canola seeds on peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPARG) gene expression and cattle milk characteristics. *Iran J Appl Anim Sci* 9, 635-642.
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 11, 135-150 (In Persian).
- Aminizadeh M, Riahi-Madvar A, Mohammadi M (2016) Nano-metal oxides induced sulforaphane production and peroxidase activity in seedlings of *Lepidium draba* (Brassicaceae). *P Bio Sci* 6, 75-83.
- Andersen MD, Busk PK, Svendsen I, Møller BL (2000) Cytochromes P-450 from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes. *J Biol Chem* 275, 1966-1975.
- Cutler HG (1988) Biologically active natural products: potential use in agriculture, American Chemical Society Washington, DC.
- Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM et al. (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo [a] pyrene-induced stomach tumors. *PNAS* 99, 7610-7615.
- Ferri M, Tassoni A, Franceschetti M et al. (2009) Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics* 9, 610-624.
- Gao X, Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2001) Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. *PNAS* 98, 15221-15226.
- Guo R, Yuana G, Wang Q (2011) Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. *Sci Hortic* 128, 159-165.
- Guo R, Yuan G, Wang Q (2011) Sucrose enhances the accumulation of anthocyanins and glucosinolates in broccoli sprouts. *Food Chem* 129, 1080-1087.
- Halkier BA, Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* 57, 303-333.

- Hansen CH, Wittstock U, Olsen CE et al. (2001) Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates. *J Biol Chem* 276, 11078-11085.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture for growing plants without soil. *California AES* 347, 25–32.
- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. *J Rumin Res* 4, 119-132 (In Persian).
- Jamshidi Goharrizi K, Riahi-Madvar A, Rezaee F et al. (2019) Effect of salinity stress on enzymes' activity, ions concentration, oxidative stress parameters, biochemical traits, content of sulforaphane, and cyp79f1 gene expression level in *Lepidium draba* plant. *J Plant Growth Regul* <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10047-6>.
- Krizek DT, Britz SJ, Mirecki RM (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. *Physiol Plant* 103, 1-7.
- Liang H, Yuan Q (2012) Natural sulforaphane as a functional chemopreventive agent: including a review of isolation, purification and analysis methods. *Crit Rev Biotechnol* 32, 218–234.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402–408.
- Lunn JE (2008) Sucrose metabolism. *eLS*.
- Miao H, Wei J, Zhao Y et al. (2013) Glucose signalling positively regulates aliphatic glucosinolate biosynthesis. *J Exp Bot* 64, 1097–1109.
- Mithen RF, Dekker M, Verkerk R et al. (2000) The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J Sci Food Agric* 80, 967-984.
- Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. *Brazil J Med Biol Res* 50, e6177.
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (in Persian).
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 289-295.



- Mohammadi M, Riahi-Madvar A, Pourseyedi S (2014) Elicitors induced sulforaphane production in *Lepidium draba*. *AJBPS* 4, 64-70.
- Mohammadi M, Riahi-Madvar A, Pourseyedi S, Aminizadeh M (2016) The study of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> effects on myrosinase activity and sulforaphane production in *Lepidium draba*. *Agric Biotechnol J* 8, 81-94 (in Persian).
- Nasiri-Bezenjani M, Riahi-Madvar A, Baghizadeh A, Ahmadi A (2014) Rosmarinic acid production and expression of tyrosine aminotransferase gene in *Melissa Officinalis* seedlings in response to yeast extract. *JAST* 16, 921-930.
- Nielsen JS, Møller BL (2000) Cloning and expression of cytochrome P450 enzymes catalyzing the conversion of tyrosine to p-hydroxyphenylacetaldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Triglochin maritima*. *Plant Physiol* 122, 1311-1322.
- Powell EE, Hill GA, Juurlink BH, Carrier DJ (2005) Glucoraphanin extraction from *Cardaria draba*: Part 2. Countercurrent extraction, bioactivity and toxicity testing. *J Chem Technol Biot* 80, 992-997.
- Radonic A, Blazevic I, Mastelic J et al. (2011) Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Cardaria draba* (L.) Desv. volatiles. *Chem Biodivers* 8, 1170–1181.
- Rask L, Andréasson E, Ekbom B et al. (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* 42, 93-113.
- Rezaee F, Ghanati F, Behmanesh M (2013) Antioxidant activity and expression of catalase gene of *Eustoma grandiflorum* L in response to boron and aluminum. *S Afr J Bot* 84, 13-18.
- Rezaee F, Lahouti M, Maleki M, Ganjeali A (2018) Comparative proteomics analysis of whitetop (*Lepidium draba* L.) seedlings in response to exogenous glucose. *Int J Biol Macromol* 120, 2458-2465.
- Rezaee F, Lahouti M, Maleki M, Ganjeali A (2018) Variations of sulforaphane and activity of some antioxidant enzymes in response to jasmonate in *Lepidium draba* L. seedlings. *J Plant Proc Func* 7, 45-56 (in Persian).
- Solfanelli C, Poggi A, Loreti E et al. (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant physiol* 140, 637-646.
- Stiehl B, Bible B (1989) Reaction of crop species to thiocyanate ion toxicity. *Hort Scienc* 24, 99-101.
- Wei J, Miao H, Wang Q (2011) Effect of glucose on glucosinolates, antioxidants and metabolic enzymes in *Brassica* sprouts. *Sci Hortic* 129, 535-540.

- Yeh CT, Yen GC (2009) Chemopreventive functions of sulforaphane: A potent inducer of antioxidant enzymes and apoptosis. *J Funct Foods* 1, 23-32.
- Young JA, Turner CE, James LF (1995) Perennial pepperweed. *Rangelands Archives* 17, 121-123.
- Zhang C, Yan Q, Cheuk Wk, Wu J (2004) Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag<sup>+</sup> elicitation and nutrient feeding. *Planta Med* 70, 147-151.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23, 283-333.