Shahid Bahonar University of Kerman

Agricultural Biotechnology Journal

Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Iranian Biotechnology Society

Identification and isolation of cinnamate 4-hydroxylase and chalcon syntase genes in the roots of *scrophularia striata* and study of their expression and some physiological traits under the influence of various abiotic elicitors

Zeinab Rostami

PhD student in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of ilam, Ilam, Iran. E-mail: z.rostami1368@yahoo.com

Arash Fazeli

*Associate Professr, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture University of ilam, Ilam, Iran. E-mail: a.fazeli@ilam.ac.ir

Abstract

Objective

Scrophularia striata is a plant belonging to the Scrophulariaceae family. Due to the importance of phenylpropanoid compounds in this plant, identification and isolation of genes encoding cinnamate enzymes 4-hydroxylase (C4H) and chalcone synthetase (CHS) involved in the biosynthesis of these compounds and also, their expression under the influence of various abiotic elicitors was performed.

Materials and methods

Seeds of wild plants grown around the university were collected and were cultured in greenhouse conditions. Sampling was done before flowering stage. RNA extraction, cDNA synthesis, isolation and sequencing of CHS and C4H genes in the roots of this plant were successfully performed for the first time. The expression of these genes was performed under the influence of three salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and gibberellic acid (GA) each at concentrations of 100 and 300 ppm using a completely randomized design at the transcript level by Real Time PCR method.

Results

The results showed that among the elicitors used, JA and SA with the concentration of 100 ppm had the greatest effect on increasing the expression of C4H and CHS genes so that in investigating the effect of the above-mentioned elicitors on the accumulation of phenylpropanoid compounds, this issue was partially confirmed. Also, in the study, increasing the concentration of JA and SA decreased the expression of C4H and CHS genes.

Conclusions

The general results of the use of elicitors on gene expression and accumulation of secondary metabolites showed that the external use of stimulants in appropriate concentrations, possibly through the induction of the plant immune system, can play a role in the biosynthesis and accumulation of valuable secondary metabolites such as phenylpropanoid compounds in the roots of Scrophularia striata and subsequently identifying and analyzing the expression of genes involved in the biosynthesis of such valuable compounds can be effective in complementary basic research for use in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: *Scrophularia striata*, Elicitor, Chalcon synthase, Cinnamat 4-hydroxylase, Phenylpropanoid.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Rostami Z, Fazeli A (2021) Identification and isolation of cinnamate 4-hydroxylase and chalcon syntase genes in the roots of scrophularia striata and study of their expression and some physiological traits under the influence of various abiotic elicitors. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (1), 1-28.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (1), 1-28. DOI: 10.22103/jab.2021.16328.1253

Received: December 04, 2020. Accepted: January 10, 2021.

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

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

شناسایی و جداسازی ژن‌های سینامات ۴- هیدروکسیلاز و چالکون سنتتاز در ریشه گیاه گل سازوئی *Scrophularia striata* و بررسی بیان آن‌ها و برخی صفات فیزیولوژیک تحت تاثیر الیستورهای غیر زیستی مختلف

زینب رستمی

دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. رایانامه: z.rostami1368@yahoo.com

آرش فاضلی

* دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. رایانامه: a.fazeli@ilam.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱

چکیده

هدف: گل سازوئی (*Scrophularia striata*) گیاهی متعلق به خانواده گل میمون (*Scrophulariaceae*) است. نظر به اهمیت ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در این گیاه، شناسایی و جداسازی ژن‌های کد کننده آنزیم‌های سینامات ۴- هیدروکسیلاز (C4H) و چالکون سنتتاز (CHS) دخیل در مسیر بیوسنتز این ترکیبات و همچنین ارزیابی بیان ژن‌های مذکور تحت تاثیر محرک‌های گوناگون غیر زیستی انجام شد.

مواد و روش‌ها: بذور گیاهان وحشی رشد یافته در اطراف دانشگاه جمع‌آوری و در شرایط گلخانه‌ای کشت داده شدند. قبل از مرحله گلدهی نمونه برداری صورت گرفت. استخراج RNA، سنتز cDNA، جداسازی و تعیین توالی ژن‌های CHS و C4H در ریشه این گیاه برای اولین بار به طور موفقیت آمیزی انجام گرفت. بیان ژن‌های مذکور تحت تاثیر سه الیسیتور سالیسیلیک اسید (SA)، جاسمونیک اسید (JA) و جیبرلیک اسید (GA) هر کدام در غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام در قالب طرح کاملا تصادفی در سطح رونوشت به روش Real Time PCR انجام شد.

نتایج: نتایج آنالیز بیان ژن نشان داد که در بین محرک‌های مورد استفاده، JA و SA در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام بیشترین تاثیر را بر افزایش بیان ژن‌های C4H و CHS داشتند. به طوری که در بررسی تاثیر الیستورهای فوق الذکر بر تجمع ترکیبات فنیل پروپانوئیدی این موضوع به طور نسبی تایید شد. همچنین با افزایش غلظت JA و SA بیان ژن‌های C4H و CHS کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج کلی کاربرد الیسسیتورها روی بیان ژن و انباشت متابولیت‌های ثانویه نشان داد که کاربرد خارجی محرک‌ها در غلظت مناسب احتمالا از طریق القای سیستم دفاعی گیاه می‌تواند در بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه با ارزش همچون ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در ریشه گل سازوئی نقش داشته باشد و به دنبال آن شناسایی و آنالیز بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز چنین ترکیبات با ارزشی می‌تواند در تحقیقات پایه تکمیلی جهت استفاده در صنعت داروسازی و صنایع غذایی موثر واقع شود.

کلیدواژه‌ها: گل سازوئی، الیستور، چالکون سنتتاز، سینامات ۴- هیدروکسیلاز، فنیل پروپانوئید.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: رستمی زینب، فاضلی آرش (۱۴۰۰) شناسایی و جداسازی ژن‌های سینامات ۴- هیدروکسیلاز و چالکون سنتتاز در ریشه گیاه گل سازوئی *Scrophularia striata* و بررسی بیان آن‌ها و برخی صفات فیزیولوژیک تحت تاثیر الیستورهای غیر زیستی مختلف. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۱)، ۱-۲۸.

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

© the authors

مقدمه

گل سازوئی با نام محلی تشنه داری از قدیم الایام به عنوان یک گیاه دارویی کاربرد داشته است (Ghahreman 1987). این گیاه در ایران و برخی از کشورها از جمله کره جنوبی و چین می‌روید (Khanpour-Ardestani 2014). خاستگاه این گیاه در برخی استان‌های غرب و جنوب غربی کشور است. گل میمون سازویی در اکثر مناطق معتدل و سردسیری ایران از جمله ایلام و مناطقی از استان خوزستان، کرمانشاه، کردستان، لرستان، خراسان جنوبی، فارس، چهارمحال بختیاری و کهگیلویه و بویر احمد یافت می‌شود (Shoohani and Taheri Moghadam 2010). همان‌طور که امروزه بسیاری از جوامع بشری به دنبال کسب درآمد و تجارت از طریق گیاهان دارویی حاوی متابولیت‌های ثانویه با ارزش هستند. بنابراین استفاده از این پتانسیل بالقوه می‌تواند بخشی از نیاز کشور را در مورد واردات مواد اولیه دارویی کاهش دهد. گیاهان دارویی اکثراً از لحاظ اقتصادی توجیه‌پذیری دارند و با توجه به شرایط اقلیمی و آب و هوایی از عملکرد مناسبی برخوردارند. با توجه به خواص متعدد گیاه دارویی گل سازویی انجام تحقیقات بیشتر بر روی این گیاه به منظور کاشت این گیاه به صورت زراعی و استخراج مواد موثر آن می‌تواند نقش مهمی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های مربوط به سیستم ایمنی از جمله سرطان و همچنین بیماری‌های گوارشی، انگلی، التهابی و غیره داشته باشد. مطالعات زیادی مبنی بر بررسی آثار ضدباکتریایی و ضدالتهابی گل سازویی بر روی باکتری‌ها و مخمرهای متفاوت از جمله

استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا (Abbasi et al. 2007)، اشریشیا کولی (Sharafati-chaleshtori et al. 2010) و کاندیدا آلبیکنس (Havasian et al. 2012) صورت گرفته است که آثار ضدسرطانی و ضدالتهابی برخی از گونه‌ها را به اثبات رسانده است. به طور کلی، بسیاری از فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد باکتری، ضد التهابی و ضد دردی از ترکیبات فلاونوئیدی در این گیاهان گزارش شده است (Mahboubi et al. 2013). ریشه‌های خشک گونه‌های *Scrophularia* در طب آسیایی به عنوان مکمل درمانی جهت تب، لارنژیت، تورم، یبوست، نوریت و فارنژیت مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Qian et al. 1992; Park et al. 2003). همچنین ریشه‌های *S. ningpoensis* به عنوان یک داروی معروف چینی به نام "Xuan shen" برای معالجه بیماری‌های مختلف التهابی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Li et al. 1999). پتانسیل‌های درمانی خوب گیاهان خانواده *Scrophulariacea* محققان را بر آن داشته است تا نسبت به شناسایی و جداسازی ترکیبات فعال آن همچون فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی که اغلب از طریق مسیر فنیل پروپانوئیدی سنتز می‌شوند، تمرکز نمایند. بیوسنتز فلاونوئیدها پیچیده و مراحل آنزیمی متعددی در آن درگیر هستند. در مراحل اولیه سنتز فلاونوئیدها، فنیل آلانین مشتق از مسیر شیکمیک به وسیله آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی (فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، سینامات ۴- هیدروکسیلاز (C4H) و ۴-کومارات-کوانزیم آ لیگاز (4CL)) به کوماریل کو آنزیم آ تبدیل می‌شود. چالکون سنتاز (CHS) اولین آنزیم سنتز فلاونوئید موجب ترکیب کوماریل کوانزیم آ با سه مولکول مالونیل کوانزیم آ می‌شود. و نارینژنین[1] چالکون تولید می‌شود (Roslan et al. 2013). نارینژنین چالکون با واسطه آنزیم CHI سپس به عنوان مولکول پیشرو برای بیوسنتز رنگدانه‌های آنتوسیانین، پروانتوسیانیدین‌ها، فلاون‌ها و فیتواکسینین‌های ضد میکروبی عمل می‌کند (Jez et al. 2001; Dao et al. 2011). آنزیم چالکون سنتاز که حاصل بیان ژن CHS می‌باشد به عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوشیمیایی ترکیبات فلاونوئیدی از اهمیت ویژه برخوردار است (Sennblad & Bremer 2002).

امروزه با توجه به تنوع بسیار زیاد متابولیت‌های ثانویه، ارزش اقتصادی بالای آن‌ها و همچنین تولید بسیار کم این ترکیبات در گیاهان راه برای استفاده از روش‌های نوین زیست فناوری همچون شناسایی و دستورزی مسیرهای بیوسنتتیک سلول گیاه، استفاده از تکنیک‌های کشت سلول، اندام، بافت و ریشه‌های مویین در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه هموار گردیده است (Gholami 2017). علاوه بر دستورزی‌های ژنتیکی، تولید متابولیت‌های ثانویه مناسب نیازمند مولکول‌های محرک تولید می‌باشد، زیرا مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه جزئی ازمکانیسم دفاعی گیاه در برابر پاتوژن‌ها و گیاه خواران محسوب می‌شود، بنابراین بیان آن نیازمند ترکیبات القا کننده می‌باشد. به طور کلی چنین ترکیباتی که قادر به تحریک بیان ژن‌های مسیرهای دفاعی می‌باشند الیستور (Elicitor) نامیده می‌شوند (Rao & Ravishankar 2002; Zhong 2002; Khosroushahi et al. 2006; Onrubia et al. 2011). برخی از ترکیبات شیمیایی مانند JA، SA و GA به عنوان الیستورهای غیرزیستی به منظور افزایش

[1] Naringenin

تولید این ترکیبات مورد بررسی قرار گرفته‌اند (.Hayat et al 2010). بنابراین می‌توان از هورمون‌های مذکور به عنوان القاء کننده غیرزیستی و زیستی کارآمد که از طریق القای سیستم بیان ژن باعث بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود در بسیاری از گیاهان دارویی استفاده کرد. افزایش بیان ژن منتول دهیدروژناز و میزان منتول تحت تیمار SA در گیاه نعناع فلفلی گزارش شده است (Rasouli et al. 2014). در زیره سبز SA سبب فعال شدن سیستم آنتی اکسیدانی گیاه شده و از طریق افزایش بیان ژن فلاون سنتتاز منجر به افزایش ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین شد (Firoozie et al. 2016). بنابراین به علت نقشی که SA به عنوان یک محرک دارد و باعث افزایش بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه می‌شود، مورد توجه ویژه ای قرار گرفته است (Pu et al. 2009). در پژوهشی Ellard-lver and Douglas (۱۹۹۶) گزارش کردند که متیل جاسمونات در القای بیان ژن‌های درگیر در تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در جعفری موثر می‌باشد (Ellard-Ivey & Douglas 1996). در تحقیق انجام شده توسط .Hassani et al (2016) گزارش شد که غلظت‌های متفاوت از متیل جاسمونات باعث افزایش معنی‌دار در بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های چاویکول o- متیل ترانسفراز (CVOMT) و C4H شد که احتمالا می‌تواند منجر به افزایش تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مانند چاویکول و متیل چاویکول در ریحان شود (Hassani et al. 2016). همچنین در گزارشی تاثیر GA روی افزایش بیوسنتز آرتمیزین در قسمت‌های هوایی گیاه خاراگوش چینی تایید شده است (Smith et al. 1997). در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی[2] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور هم‌زمان 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 خواهد ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چند بعدی 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).

[2] DNA

بخش‌های هوایی و ریشه گیاه به صورت جداگانه و محلی به عنوان ضددرد و ضدالتهاب موضعی توسط مردمان زاگرس‌نشین مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ardeshiri-Lagimi et al. 2010; Kambiz and Afolayan, 2008; Mahesh and Satish 2008) از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای از بافت ریشه این گیاه انجام نشده است، لذا هدف از مطالعه حاضر شناسایی و جداسازی برخی ژن‌های مهم و کلیدی در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها از جمله CHS و C4H است و همچنین تاثیر غلظت‌های متفاوت از سه محرک JA، SA و GA بر بیان ژن‌های فوق‌الذکر بررسی می شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای مورد مطالعه از گیاهان وحشی رشد یافته در دامنه کوه‌های استان ایلام واقع در دانشگاه ایلام با طول جغرافیایی ۴۶ درجه و ۲۸ دقیقه، عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۳۷ دقیقه، ارتفاع از سطح دریا ۱۱۷۴ متر جمع آوری و بر اساس ویژگی‌های گیاه‌شناسی کتاب قهرمان (۱۹۸۷) صحت آن‌ها تایید گردید (Ghahreman 1987). بذور ابتدا با هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی شده و سپس با آب مقطر شسته شدند. جهت شکستن خواب بذور، بذور شسته شده به مدت ۷۲ ساعت با غلظت بهینهٔ اسید جیبرلیک (۴۰۰ پی پی ام) در محیط تاریک و در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس بذور تیمار شده، پس از ضدعفونی و شستشوی مجدد با آب مقطر، بر روی کاغذ صافی درون پتری دیش قرار داده و به ژرمیناتور منتقل شدند. بذور جوانه زده بعد از طی مدت زمان تقریبی یک هفته به گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ایلام منتقل شدند. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی درون گلدان‌های با مساحت پانزده صدم مترمربع و با نسبت مساوی خاک، ماسه و کود اجرا شد. گلدان‌ها در دمای روزانه ۲۵ و شبانه ۲۰ درجه سانتی‌گراد، با شدت نور ۳۵ تا ۴۰ هزار لوکس نگهداری شدند. گیاهان روزانه آبیاری شدند. تیمارهای آزمایشی شامل JA، SA و GA (تهیه شده از شرکت سیگما) هرکدام در ۲ سطح ۱۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام همراه با تیمار شاهد (آب مقطر) کشت شدند. محلول پاشی در سه نوبت ۷۲ ساعت یکبار در مرحله ۴–۵ برگی انجام شد و بعد از آن در فاز رویشی (قبل گلدهی) نمونه برداری انجام گردید. بوته‌های شاهد با آب مقطر پاشش شدند. ریشه‌های گل سازوئی بعد از اعمال تیمار جهت بررسی‌های مولکولی و فیزیولوژی در فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش‌های بیو شیمیایی- سنجش میزان فنل تام: جهت سنجش محتوای فنل، فلاونوئید و فلاونول کل ابتدا عصاره متانولی از نمونه‌ها استخراج شد. به این صورت که در ابتدا ۰/۰۵ گرم از بافت برگی ساییده شده در ازت مایع در سه میلی لیتر متانول ۸۰ درصد همگن و به مدت سه ساعت درون بن ماری در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ با دور ۵ هزار به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت و در نهایت فاز روئی با متانول به حجم ۳ میلی لیتر رسانده شد و عصاره حاصل برای سنجش محتوای فنل و فلاونوئید و فلاونول مورد استفاده قرار گرفت. اندازه گیری میزان فنل تام به روش فولین- سیوکالتیو صورت گرفت (Singleton & Rossi 1965). به این صورت که به ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین

– سیوکالتیو اضافه سپس به مخلوط حاصل بعد از ۵ دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر از بافر سدیم کربنات ۷ درصد اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شـــدند و در نهایت میزان فنل تام، در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اســـتفاده از دســـتگاه اسپکتروفتومتر (UV-Visible مدل Cary-50 ساخت شرکت Varian) قرائت گردید. سپس با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید مقدار این ماده بر حسب میکرو گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Salmanian et al 2014).

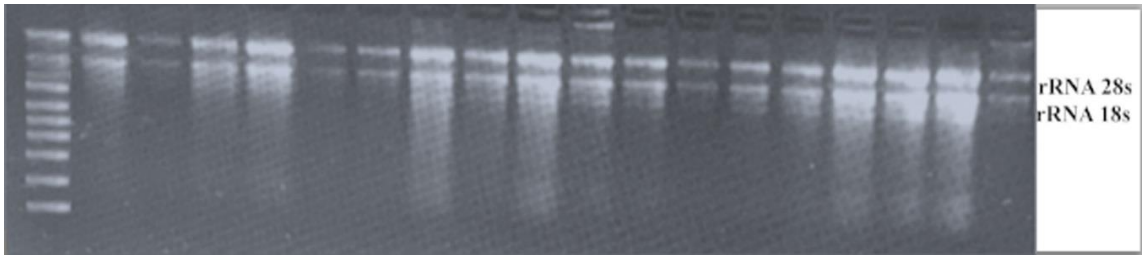
ســـنجش میزان فلاونوئید کل: جهت اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید به یک میلی لیتر از عصـــاره متانولی، ۲۵۰ میکرولیتر از بافر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۲۵۰ میکرولیتر از بافر پتاسیم استات یک مولار اضافه گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با اســتفاده از دســتگاه اســپکتروفتومتر خوانده شــد. در نهایت، میزان فلاونوئید کل براســاس منحنی اســتاندارد کوئرسیتین سنجیده شد (Krizek et al. 1998).

سنجش میزان فلاونول کل: جهت اندازه‌گیری محتوای فلاونول به یک میلی لیتر از عصاره متانولی، مقدار یک میلی لیتر از بافر کلرید آلومینیوم ۲ درصد و سه میلی لیتر از بافر پتاسیم استات ۵ درصد اضافه گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. در نهایت، میزان فلاونول کل نیز براساس منحنی استاندارد روتین سنجیده شد (Ying & Wan 2012).

در نهایت، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ترسیم شکل‌ها در محیط نرم افزار Excel صورت گرفت.

بررسی‌های مولکولی– استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA طبق دستورالعمل (George 2018) به همراه برخی تغییرات انجام شد (George 2018). به منظور بررسی کیفیت RNA، از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شـــد. در ادامه کیفیت و غلظت RNA با محاســـبه نســـبت جذب (A260/280) و (A260/230) با کمک دســـتگاه نانودراپ (NanoDrop1000spectrophotometer) مشـــخص شـــد (شـــکل ۱). از نیم میکروگرم، RNA کل با اســـتفاده از الیگومر تیمیدین ($Oligo\text{-}dt_{18}$) به عنوان آغازگر (پرایمر) برای ساختcDNA استفاده شد. ساختن DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت SMOBIO شرکت پیشگام و طبق دستورالعمل آن انجام شد.

طراحی آغازگر و جدا سازی ژن‌های مورد مطالعه: برای طراحی آغازگرهای ژن‌های CHS و C4H، جستجو در NCBI و پایگاه داده‌های مرتبط با گیاهان دارویی نشـــان داد که توالی‌های مذکور برای گیاه *S. Striata* در پایگاه داده‌های این سایت‌ها موجود نمی‌باشـد لذا بر طبق مطالعات .Kamalipourazad et al (2017) نزدیکترین توالی نوکلئوتیدی برای دو ژن CHS و C4H از سـایت NCBI اسـتخراج شـد. بنابراین، بر اسـاس جسـتجوهای نوکلئوتیدی در *NCBI* در گیاهان خانواده *lamiaceae* توالی ژن *Scutellaria lateriflora* با کد دسترسی (KF039680.*1*) و همچنین توالی ژن گیاه *Sesamum indicum* با کد دسترسی (KP070827.*1*) جهت طراحی پرایمر ژن C4H انتخاب شدند.

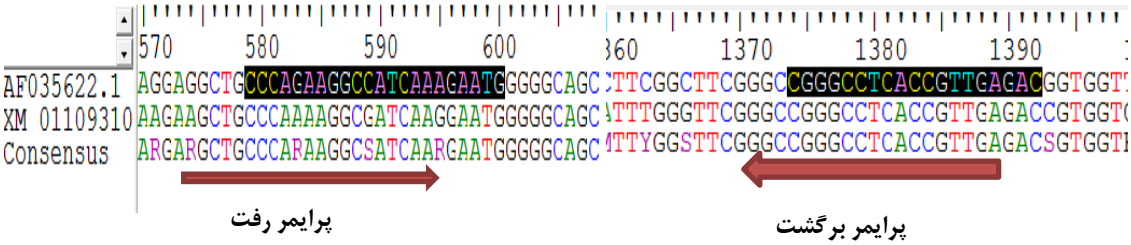


شکل ۱. نمونه‌ای از RNA کل استخراج شده از ریشه گیاه گل سازوئی

Figure 1. An example of the total RNA extracted from the roots of the *Scrophularia striata*

همچنین برای طراحی پرایمر ژن CHS توالی‌های ژنی گیاه *Scutellaria baicalensis* با کد دسترسی (AF035622.*1*) و گیاه *Sesamum indicum* با کد دسترسی (XM_011093100.*2*) انتخاب شدند. توالی‌های حاصل از هر دو ژن استخراج و در نرم افزار BioEdite Sequence Alignment Editor با روش ClustalW همردیف‌سازی شدند. نواحی حفاظت شده در هر دو نمونه مشخص شده و با استفاده از وب سایت *http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html* پرایمرهایی با رعایت ویژگی از جمله دمای ذوب، مقدار *G+C*، نبود پرایمر دایمر و طول پرایمر برای هر دو پرایمر رفت و برگشت طراحی گردید. همچنین با استفاده از نرم افزار BioEdite Sequence Alignment Editor توالی مورد توافق جهت طراحی پرایمر دژنره از نواحی حفاظت شده بر اساس کدهای AUPC توالی‌های نوکلئوتیدی به آدرس *https://www.bioinformatics.org/sms2/iupac.* انجام شد. جهت طراحی پرایمرهای برگشت ناحیه مشخص شده به عنوان پرایمر برگشت در سایت *https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html* جهت به دست آوردن توالی مکمل معکوس قرار داده شد که در شکل ۲ به عنوان نمونه برای ژن CHS آورده شده است و برای سایر ژن‌ها هم از این روش استفاده گردید (جدول ۱). همچنین با استفاده از نرم افزار Oligo calculator دایمر و مشخصات ترمودینامیکی آغازگرها بررسی شد. در نهایت آغازگرها به وسیله شرکت سینا کلون با درجه خلوص High Purified Salt Free به صورت لیوفیلیز ساخته شدند. در ادامه از آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر cDNA با طول قطعات ۶۰۰ و ۵۰۰ جفت باز استفاده شد. به این صورت که PCR برای هر ژن در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱/۸ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۰ میلی مولار، ۱/۸ میکرولیتر dNTP ۱ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر پیش رونده و معکوس (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد)، ۳ میکرولیتر cDNA رقیق نشده و در نهایت با ۱۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه اپندروف (Ependrof)، با برنامه زمانی ۵ دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه دمای اتصال هر آغازگر (دمای توصیه شده جهت اتصال آغازگرها)، ۱ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط و تکثیر صورت گرفت و در نهایت بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. فرآورده‌های حاصل با استفاده از الکتروفورز افقی و ژل آگارز ۱/۸

درصد و بافر TBE نیم برابر در ولتاژ ثابت ۸۰ به مدت ۱/۳۰ ساعت انجام شد. رنگ آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید انجام گردید. جهت تعیین ماهیت و صحت عملکرد آغازگرها، قطعات حاصل از PCR تعیین توالی گردیدند. جهت توالی‌یابی محصول PCR درون تیوب های ۱/۵ لیتری قرار گرفته و با پارافیلم مهرو موم گردید. در نهایت نمونه‌ها بر روی یخ خشک گرانولی (۷۰-) به شرکت بایونیرکره جنوبی با واسطه شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. فرایند تخلیص نمونه‌ها توسط شرکت باینویر قبل از توالی‌یابی انجام گردید.



شکل ۲. نتایج حاصل از همردیف سازی توالی‌ها به روش clustalw و طراحی پرایمر از نواحی حفاظت شده در توالی‌های مورد استفاده برای ژن CHS

Figure 2. Results obtained from sequencing alignment by Clustalw method and primer design of protected regions in sequences used for the CHS gene.

Real Time PCR: تکثیر ژن های C4H و CHS تیمار شـــده با الیســـیتورهای SA، JA و GA هر کدام در غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام نسـبت به کنترل منفی (آب دیونیزه) در بافت ریشـه گیاه گل سـازوئی برای اندازه گیری بیان ژن توسط واکنش Real Time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت. به این صورت که پس از جداسازی و تعیین توالی قسمتی از ژن‌های CHS و C4H آغازگرهای اختصاصی جهت بررسی بیان این ژن‌ها در گل سازوئی طراحی شدند (جدول ۱). واکنش های Real Time PCR با در نظر گرفتن ســـه تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با استفاده از کیت RealQ Plus 2x Master Mix Green no Rox بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده (امپلیکون دانمارک) در دستگاه BIO-RAD CFX96 انجام گرفت. برای بررسی بیان ژن‌های CHS و C4H به صورت کمی در مقایسه با کنترل داخلی، در آزمایش‌های مقدماتی غلظت بهینه آغازگرها و cDNA مشخص شد، همچنین تعداد مناسب چرخه‌ها و دمای بهینه اتصال (Annealing) با استفاده از گرادیان چرخه‌ها و دما برای هریک از ژن‌ها، تعیین گردید. بهترین شرایط تکثیر تعداد ۴۰ چرخه تعیین شد که مبنای انتخاب بر اساس نرسیدن به وضعیت ثابت در تکثیر محصول PCR بود. شرایط دمایی واکنش Real Time PCR شامل فعال سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل واسرشته شدن در دمای

۹۴ درجه به مدت ۵ ثانیه، دمای اتصال (بسته به نوع آغازگر ۴۹–۵۵) (جدول ۱) به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه بود. از ژن Beta actin به عنوان ژن مرجع جهت نرمال سازی داده‌ها استفاده شد. کمیت نسبی به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال به رنگ Syber Green انجام گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Real Time PCR داده‌های خام به صورت Ct (Threshold Cycle) از دستگاه استخراج شد. از روش ΔΔct (Schefe et al. 2006) جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد. لازم به ذکر است جهت تست آلودگی ژنومی در فرایند Real Time PCR از کنترل بدون الگو یا No-Template Control (NTC) استفاده کردیم به این صورت که در این نمونه پرایمر، مستر میکس و معرف‌های لازم برای انجام شدن Real-time PCR وجود دارند، با این تفاوت که DNA اولیه الگو نداریم. NTC برای بررسی تشکیل سیگنال و یا عدم تشکیل آن در غیاب نوکلئیک‌اسید هدف است. این کنترل می‌تواند آلودگی و هرنوع فعل و انفعال پرایمرها و را که باعث مخدوش‌شدن نتایج شود، تشخیص دهد.

نتایج و بحث

تاثیر الیسیتورهای غیر زیستی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه در ریشه گیاه گل سازوئی: در این پژوهش میزان ترکیبات فنیل پروپانوئیدی (فنل ، فلاونوئید و فلاونول کل) تحت تاثیر هورمون‌های JA، SA و GA در ریشه گیاه معنی‌دار (P< ۰/۰۰۰۱) گردید (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان فنل تام در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام SA و کمترین میزان در غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام GA حاصل گردید به طوری که کاربرد تیمار SA در غلظت پایین تر میزان فنل تام را یک و نیم برابر نسبت به عدم استفاده آن (تیمار شاهد) افزایش داد. (شکل۳– الف). نتایج اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید نشان داد که محتوای فلاونوئید تحت تاثیر غلظت‌های ۳۰۰ پی‌پی‌ام GA و SA از بیشترین میزان در حالی که میزان آن در تیمار شاهد از کمترین مقدار برخوردار بود. همچنین در بررسی محتوای فلانوئید در ریشه گیاه مشاهده شد که کاربرد غلظت‌های متفاوت هورمون JA تفاوتی در میزان این صفت ایجاد نکرد (شکل ۳– ب). بررسی میزان فلاونول کل در سلول‌های شاهد و تیمار شده نشان داد که بیشترین میزان فلاونول در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام SA و بعد از آن در همان غلظت در تیمار JA مشاهده شد. کمترین میزان فلاونول نیز در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام در تیمار GA حاصل گردید (شکل۳– ج). روی هم رفته از نتایج سنجش ترکیبات فنیل پروپانوئیدی چنین استنباط شد که در بین هورمون‌های مورد استفاده به ترتیب SA و JA در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام نقش بسزایی در القای ترکیبات موثره دا شتند به طوری که در بررسی میزان ترکیبات بویژه محتوای فنل و فلاونول کل با افزایش غلظت محرک‌ها به ۳۰۰ پی‌پی‌ام مقدار تجمع ماده موثره به طرز محسوسی کاهش یافت.

جدول ۱. مشخصات مربوط به آغازگرها جهت شناسایی و بررسی بیان ژن

Table 1 .Specifications for primers to identify and investigation of gene expression

نام آغازگر Primer name		مرحله مورد استفاده Step used	توالی آغازگر Primer sequence	اندازه محصول Product size	دمای اتصال (c˚) Annealing temperature
C4H	آغازگر رفت Sense Primer	PCR	GGCGCCGTCRCTGGACGCC	470	55
C4H	آغازگر برگشت Antisense Primer		GTCTCAACGGTGAGGCCCGGC		
CHS	آغازگر رفت Sense Primer		CCCARAAGGCSATCAARGAATGG	550	59
CHS	آغازگر برگشت Antisense Primer		GTCTCAACGGTGAGGCCCG		
C4H	آغازگر رفت Sense Primer	Real Time PCR	GAAAGTGCACATATTCTATCCC	89	49
C4H	آغازگر برگشت Antisense Primer		GATTTGGCATCTTTTCAAGGTAG		
CHS	آغازگر رفت Sense Primer		TGCCAGATGGAACGTATGG	124	55
CHS	آغازگر برگشت Antisense Primer		ATGCCATCGAAGCCTGCTT		
Beta	آغازگر رفت Sense Primer		CGGGATGGAAGCTGCTGG	136	50
Beta	آغازگر برگشت Antisense Primer		CCGGTCAGCAATACCCGGG		

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر الیسیتورهای غیر زیستی مختلف بر محتوای ترکیبات فنیل پروپانوئیدی ریشه گل سازویی

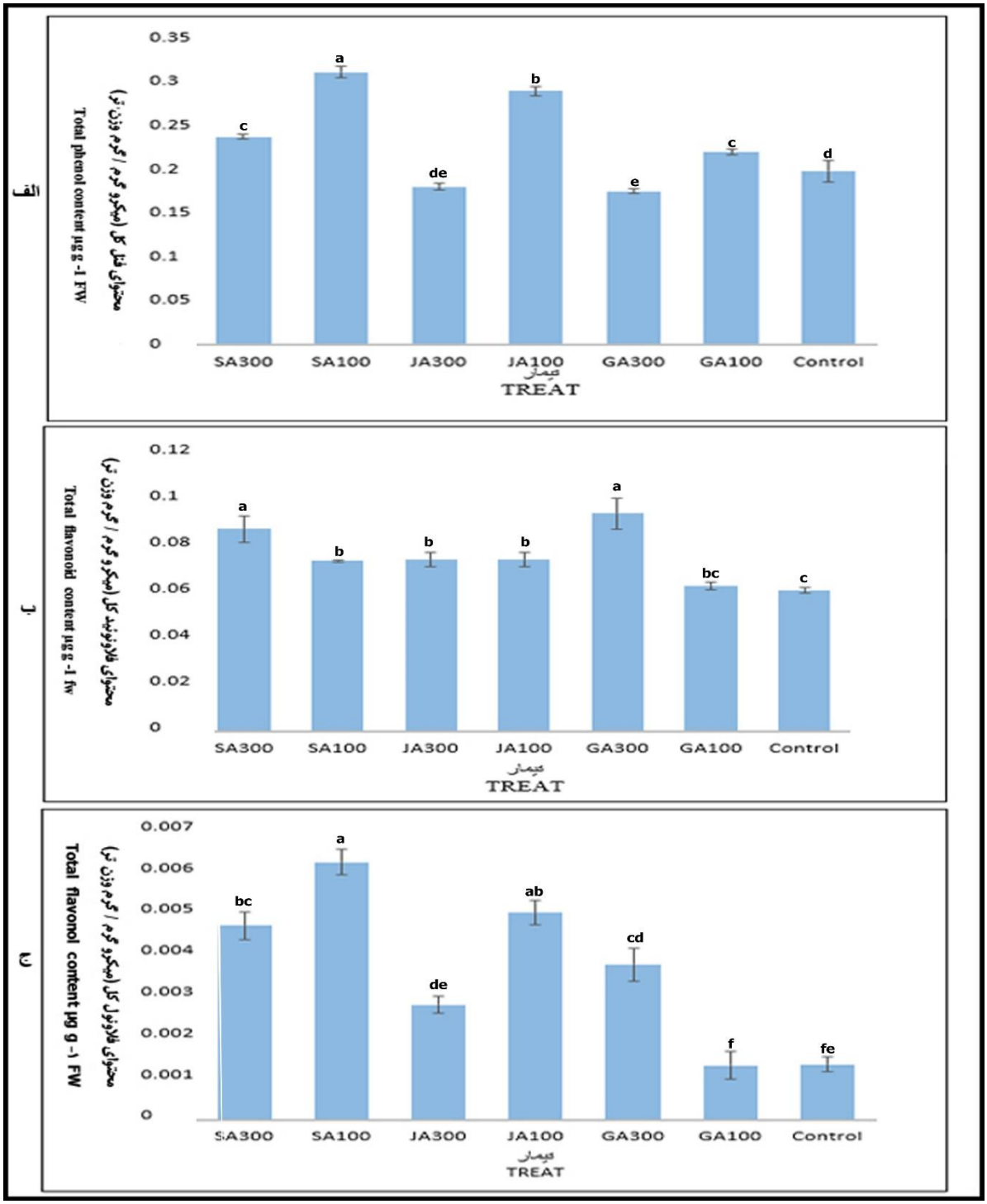
Table 2. ANOVA analysis of the effect of various abiotic elicitors on the content of phenylpropanoid compounds of root of *Scrophularia striata*

فلاونوول Flavonol	فلاونوئید Flavonoid	فنل تام Total Phenol	درجه آزادی (df)	منابع تغییرات Sources of variation
0.0001**	0.0004**	0.00830**	6	تیمار Treat
0.000003	0.000042	0.00011	14	خطا Error
15.745	8.630	4.569		ضریب تغییرات (٪) (CV)

ns ، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

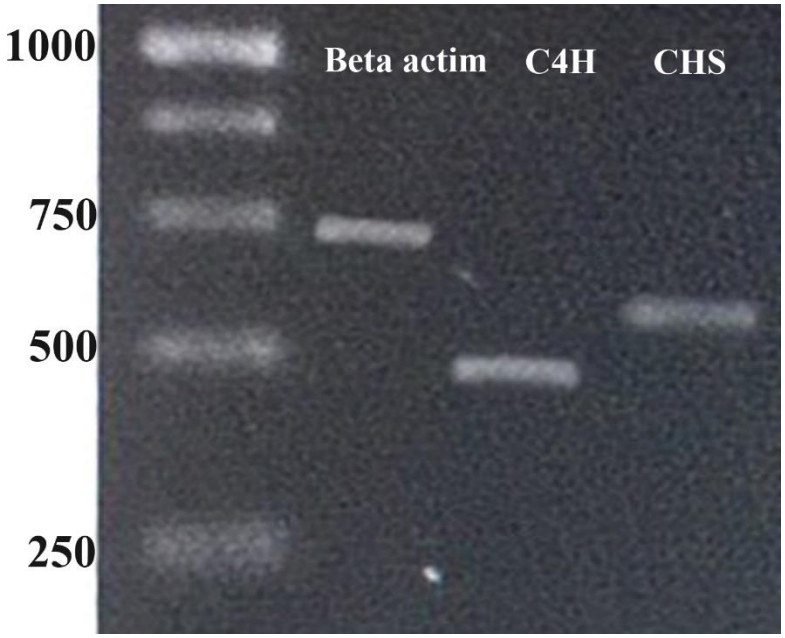
تاثیر الیسـتورهای غیر زیسـتی بر میزان بیان ژن‌های *CHS* و *C4H*: بعد از تعیین توالی قطعات حاصـل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (شکل ۴) و طراحی آغازگرهای اختصاصی از روی توالی‌های بدست آمده، آنالیز بیان ژن‌ها انجام شد. پس از انجام واکنش‌ها، منحنی ذوب۳ (شـکل ۵) مربوط به هرکدام از ژن‌ها مورد آنالیز قرار گرفت. همانطور که در شـکل ۵ آمده است وقوع خطای آزمایشی در حین اجرای آزمایش برای یکی از نمونه‌ها باعث تشکیل منحنی غیر قابل قبول شد و در نهایت این نمونه در تجزیه و تحلیل نهایی حذف گردید. در نهایت با توجه به پیک‌های بدست آمده اختصاصی بودن سایر محصولات و عدم وجود پرایمر دایمر مورد تایید قرار گرفت. بررسی الگوی بیان ژن *C4H* که رمز کننده آنزیم سینامات ۴- هیدروکسیلاز موجود در مراحل اولیه از مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدی عمومی است نشان داد که در گیاهان شاهد میزان بیان این ژن بسیار اندک است. استفاده از الیسیتور باعث افزایش چشمگیر بیان ژن مذکور شد. به طوری که غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام *SA* بیشترین تاثیر را در افزایش میزان بیان ژن *C4H* به عنوان یک آنزیم واسط برای تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی داشت. بعد از آن بیشترین میزان بیان ژن *C4H* در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام *JA* مشاهده شد. همچنین در این تحقیق مشخص شد افزایش غلظت هورمون‌های مورد استفاده باعث کاهش معنی دار بیان این ژن گردید. از طرفی در بین محرک‌های مورد آزمایش GA کمترین تاثیر را در افزایش بیان ژن C4H نشان داد، به طوری که در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام GA میزان بیان ژن مذکور حتی نسبت به نمونه شاهد نیز کمتر بود (شکل ۵). بررسی الگوی بیان ژن CHS که یک ژن رمز کننده آنزیم کلیدی چالکون سنتتاز در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها می‌باشد نشان داد که در نمونه‌های شاهد نسبت به نمونه‌های تیمار شده با الیسیتورهای مختلف میزان بیان ژن به طور محسوسی کمتر است. بیشترین میزان بیان این ژن در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام JA و بعد از آن در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام SA مشاهده شد.

[3] Melting Curve



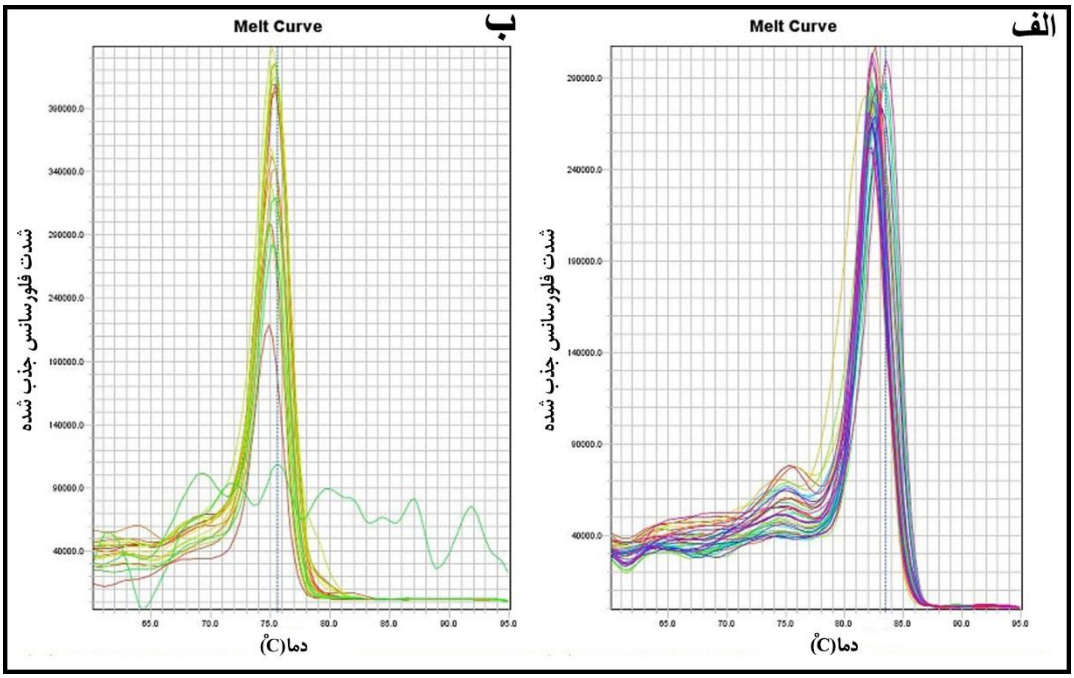
شکل ۳. اثر الیسیتورهای غیر زیستی مختلف بر محتوای ترکیبات فنیل پروپانوئیدی ریشه گل سازویی

Figure 3. Effect of various abiotic elicitors on the content of phenylpropanoid compounds of root of *Scrophularia striata*



شکل ٤. الکتروفورز قطعات حاصل ازPCR

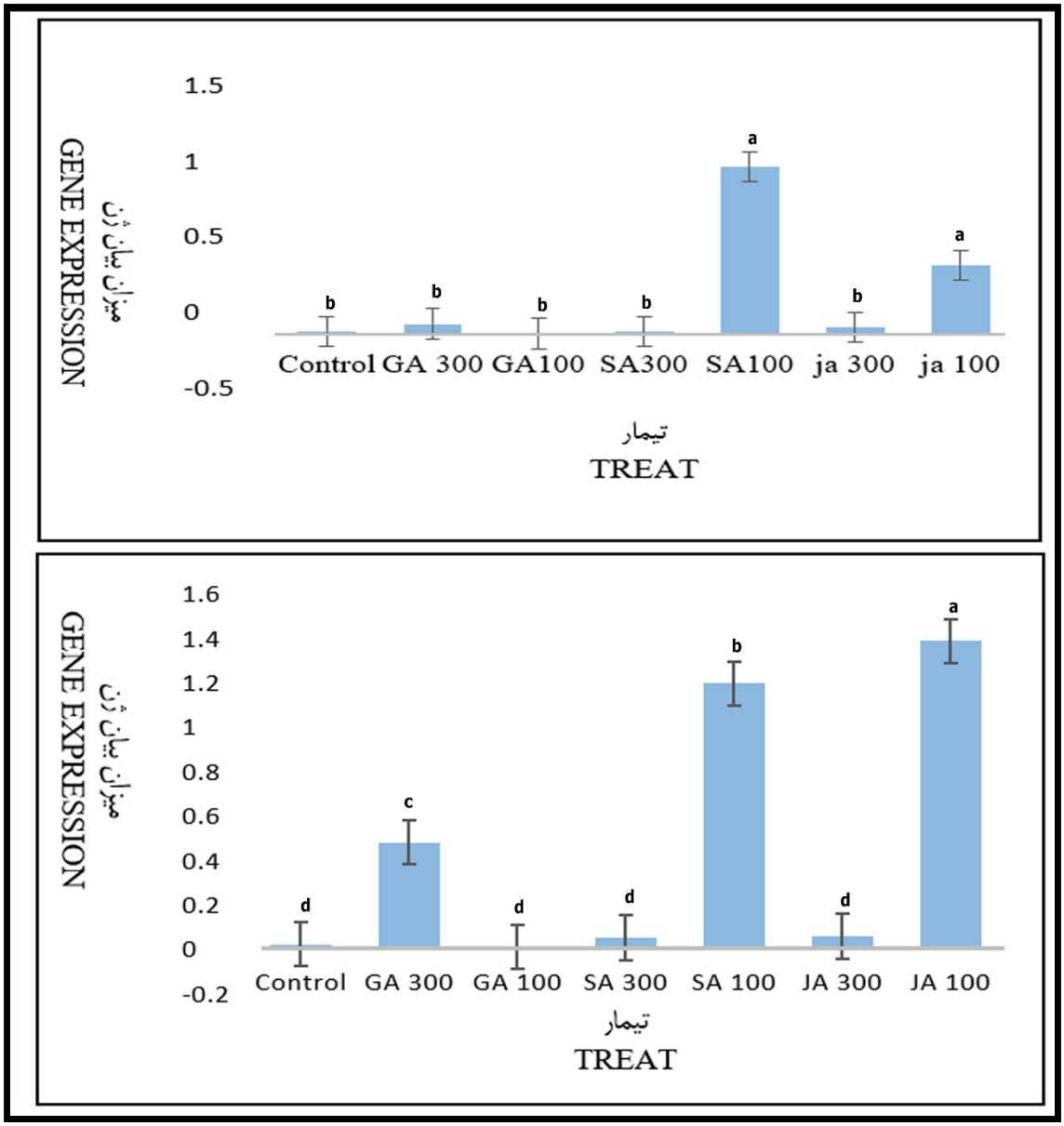
Figure 4. Electrophoresis of PCR components



شکل ٥. منحنی ذوب ژن‌های الف. CHS و ب. C4H

Figure 5. Melting curve of genes A .CHS and B .C4H

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ٦. اثر الیسیتورهای غیر زیستی مختلف بر میزان بیان ژن‌های الف. C4H و ب. CHS در ریشه گیاه گل سازوئی

Figure 6. Effect of various abiotic elicitors on the expression of A. C4H and B. CHS genes in the roots of *Scrophularia striata*

همچنین بر خلاف عدم وجود تاثیر معنی دار تیمار GA بر بیان ژن C4H، میزان بیان ژن CHS در تیمار ۳۰۰ پی‌پی‌ام GA افزایش نسبی نشان داد. همچنین افزایش غلظت‌های مختلف از دو الیسیتور SA و GA در افزایش بیان این ژن تاثیر نداشته و برعکس باعث کاهش بیان ژن مذکور گردیدند (شکل ۶).

بحث

دست‌ورزی ژنتیکی در راستای القای موثر متابولیت‌های ثانویه گیاهی یکی از روش‌های پر اهمیت کنونی است که در این زمینه شناسایی و دست‌کاری ژنتیکی ژن‌های کلیدی در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه همانند ترکیبات فنیل پروپانوئیدی دارای ارزش اقتصادی زیادی است. بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها توسط یک گروه آنزیمی هدایت شده که این آنزیم‌ها یا به صورت آزاد و یا در ارتباط با غشاهای سلولی می‌باشد (Srere 1987). آنزیم PAL یکی از مهمترین آنزیم‌های حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است و اولین آنزیم در مسیر تولید ترکیبات فنلی گیاه و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد (Dixon and Paiva 1995). آنزیمی که بعد از آنزیم PAL در مسیر تولید فنیل پروپانوئیدها نقش دارد آنزیم سینامات ۴- هیدروکسیلاز (C4H) است. محصول ژن سینامات ۴- هیدروکسیلاز با هیدروکسیله کردن سینامیک اسید و تبدیل آن به P- کوماریک اسید به عنوان یک آنزیم واسطه برای تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی عمل می‌کند (Achnine et al. 2004). بعد از آن، آنزیم چالکون سنتاز که حاصل بیـان ژن CHS می‌باشد نیز به عنوان یک آنزیم کلیدی در این مسیر شناخته شده است (Sennblad and Bremer 2002). کلاس‌های فلاونوئیدی از طریق به هم پیوستگی p coumaryl-CoA و سه مولکول از malonyl-CoA با عمل چالکون سنتتاز سنتز می‌شوند (Sennblad and Bremer 2002). به طور کلی، مسیر فنیل پروپانوئید یک مسیر بیوسنتزی برای تولید هیدروکسی سینامیک اسید و سایر مشتقات آن از جمله چندین ماده ثانویه از پلی‌فنول‌ها است که دارای عملکردهای مهم فیزیولوژیکی مانند تشکیل لیگنین و فلاونوئید هستند (Xiong et al. 2017). لیگنین عنصر اصلی دیواره سلولی گیاه است که در رشد ریشه و ساقه گیاهان سلولزی مشارکت می‌کند (Mottiar et al. 2016). سایر مواد ثانویه مانند فلاوون‌ها، فلاونول‌ها، آنتوسیانین‌ها، پروانتوسیانیدین‌ها (رنگدانه‌های موجود در پوشش دانه)، ایزوفلاون‌ها و سایر مواد فلاونوئیدی نقش مهمی در رشد گیاهان، مقاومت در برابر بیماری‌ها و تحمل استرس دارند (Ferreyra et al. 2012). بدین ترتیب آنزیم‌های مذکور در تنظیم بیوسنتز ترکیبات فنلی نقش بسزایی دارند. فعالیت‌های زیستی زیادی مانند فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدالتهابی و ضدعفونی کننده از ترکیبات یا عصاره‌های سرشار از فلاونوئید در گیاهان خانواده *Scrophulariace* گزارش شده است که در تحقیقات متعدد پتانسیل درمانی آشکاری را نشان داده‌اند (Mahboubi et al. 2013; Nasri et al. 2013). از طرف دیگر تحریک پاسخ‌های دفاعی در گیاه بواسطه تاثیر محرک‌های هم‌چون SA، GA و JA شبکه‌ای از انتقال سیگنال را القا می‌کند که با تشخیص مولکول‌های محرک توسط پذیرنده‌ها شروع می‌شود. از سویی دیگر با توجه به بیان پایین ژن‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌توان از این محرک‌ها جهت افزایش بیان ژن‌های درگیر در سنتز آنها استفاده کرد تا پس از تکثیر و کلون کردن آنها در یک وکتور مناسب بتوان تولید متابولیت‌های با ارزش را در گیاهان دیگر و حتی در موجودات دیگر تسهیل کرد. بنابراین انتخاب الیسیتور مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس بزرگ پراهمیت است. در همین راستا جهت دستیابی به اهداف فوق، در *S. Striata* توالی‌های بخشی از ژن‌های C4H و CHS شناسایی و بیان آن‌ها در بافت ریشه و تحت تاثیر سه الیسیتور مهم شیمیایی JA، SA و GA در دو غلظت متفاوت در شرایط کشت گلخانه‌ای برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت. علاوه براین، تاثیر الیسیتورهای مورد آزمایش بر تجمع متابولیت هدف این

ژن‌ها (ترکیبات فنیل پروپانوئیدی اعم از محتوای فنل کل، فلاونول و فلاونوئید کل) نیز مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات متعددی نشان داده که اسید سالیسیلیک باعث افزایش میزان برخی از متابولیت‌های ثانویه به ویژه آن‌هایی که در ساز وکارهای دفاعی گیاه نقش دارند، می‌شود (Kang et al. 2004). همچنین مطالعات نشان داده است که غلظت الیسیتور نقش مهمی در فرایند القا داشته و عامل موثری بر شدت پاسخ است (Vasconsuelo & Boland 2007). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، الیسیتورهای مورد آزمایش در غلظت‌های مختلف باعث افزایش تجمع ترکیبات آنتی اکسیدانی اصلی مانند محتوای فنل، فلاونوئید و فلاونول کل در *S. Striata* شدند. به طور کلی، ترکیبات الیستور بر تنظیم رونویسی ژن‌های آنزیم‌های حیاتی در مسیر فنیل پروپانوئید تأثیر مثبت می‌گذارد. به عنوان مثال، باز تنظیمی رونوشت‌های آنزیم PAL توسط MeJa، SA، و SNP قبلاً گزارش شده است (Creelman et al. 1992; Orozco-Cárdenas et al. 2001; Zhao et al. 2005; Wu et al. 2007; Gill & Tuteja 2010). در *Panax ginseng* کشت ریشه تیمار شده با MeJa و SA تولید جینسینوزیدها را افزایش داد (Ali et al. 2006). روی‌هم‌رفته، القای متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی توسط محرک‌های شیمیایی پتانسیل‌های اصلاح رادیکال‌های آزاد عصاره سلول را بهبود بخشید. فلاونوئیدها و فلاون‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند و ثابت شده که میزان تولید آن‌ها و همچنین بیان ژن مرتبط با سنتز آن‌ها در شرایط اعمال تنش افزایش می‌یابد (Hsieh et al. 2002). بنابراین افزایش محتوی ترکیبات فنیل پروپانوئیدی که در یک مسیر آبشاری و توسط تعداد زیادی آنزیم کاتالیز می‌شوند می‌تواند با افزایش تولید آنزیم‌های این مسیر مرتبط باشد. به همین منظور بیان ژن‌های C4H و CHS درگیر در بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی بررسی شد. در این پژوهش، میزان بیان هر دو ژن در حضور تیمارهای SA و JA در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام افزایش یافت. در این حالت، میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در مقایسه با گیاه طبیعی به طرز چشمگیری تحریک شده بود. میزان بیان اندک ژن‌ها در نمونه‌های شاهد بیانگر نقش این ژن‌ها در متابولیت ثانویه می‌باشد. چرا که در شرایط طبیعی و بدون وجود تنش نیازی به القای بالای ژن‌های دفاعی نمی‌باشد (Croteau et al. 2006; Nims et al. 2006). با این حال، در حضور الیستور GA افزایش چندانی در میزان بیان این ژن‌ها مشاهده نشد. همانطور که سطح mRNA بتا آمیرین سنتاز در کشت سلولی شیرین بیان با کاربرد ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات افزایش و با کاربرد ۱۲ تا ۱۲۲ میکرومولار اسیدجیبرلیک کاهش یافته بود (Hayashi et al. 1990). به طور کلی، مشخص شده که C4H در گیاهان مختلف می‌تواند یک نقش کلیدی در ارتقاء تولید اقتصادی محصول در آینده داشته باشد (Liu et al. 2018). گزارش شده است که محرک‌ها می‌توانند بیان این ژن را افزایش دهند و باعث افزایش بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها شوند. در گیاه نخود محرک قارچی، رونوشت مربوط به ژن C4H را تا ۳/۷۶ برابر افزایش داده است (Frank et al. 1996). در گیاه برنج تیمار برگی متیل جاسمونات و متیل سالیسیلات فعالیت آنزیم C4H را تا ۶۷ درصد افزایش داد (Bi et al. 2007) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارند. همچنین آنالیز بیان ژن CHS در گیاه *polygonum minus* نشان داد که در ریشه‌های این گونه، میزان بیان این ژن افزایش ۱۰ برابری در مقایسه با برگ‌ها و افزایش ۱۵ برابر نسبت به ساقه‌ها نشان داده است (Roslan et al. 2013). از سویی

دیگر، روند تغییرات میزان بیان ژن‌های CHS و C4H با روند تغییرات محتوای ترکیبات فنیل پروپانوئیدی به طور نسبی شباهت دارد (Anterola et al. 2002). بنابراین با احتمال بسیار بالایی می‌توان گفت که آنزیم‌های CHS و C4H بررسی شده در این تحقیق می‌توانند مقدار تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در گیاه گل سازوئی را افزایش دهند. همانطور که در گیاه خار مریم نتایج حاصل نشان داد که فرابیان ژن خارجی CHS قادر به افزایش میزان تولید سیلیمارین و سایر ترکیبات فلاونولیگنانی در ریشه‌های مویین را دارد. بنابراین راهکار جدیدی برای افزایش تولید سیلیمارین ارائه می‌نماید (Rahnama et al. 2011). بر این اساس و در گزارشی دیگر پژوهشگران نشان دادند که تحت شرایط کنترل شده با به‌کارگیری الیسیتورهای غیر زیستی شامل SA، متیل جاسمونات و اشعه UV-B می‌توان بیان ژن‌های DXR و GTS را در گیاه مرزه بالا برده که در پی آن تولید متابولیت ثانویه تیمول و کارواکرول افزایش پیدا کرد (Ghobadi et al. 2016). بنابراین با توجه به وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در این گیاه می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از اثرات حفاظتی در آن‌ها از طریق تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و مهار تولید ROS اعمال می‌گردد بنابراین با کاربرد خارجی برخی محرک‌ها همچون SA و JA در غلظت مناسب می‌توان بیان آنزیم‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز این ترکیبات در بافت ریشه و در نتیجه افزایش مقدار تجمع آن‌ها را باعث شد. روی‌هم‌رفته با بررسی و ردیابی آنزیم‌های کلیدی و اصلی در مسیر تولید ترکیبات فنولی و مخصوصاً فنیل پروپانوئیدها، از نتایج به‌دست آمده در خصوص این ژن‌ها، می‌توان در درک بیشتر مسیرهای بیوسنتزی و تولید گیاهان تراریخت با اهداف مهندسی متابولیت بهره برد. همچنین با توجه موفقیت آمیز بودن کشت تا برداشت این گیاه در شرایط گلخانه‌ای برای اولین بار، با انجام تحقیقات بیشتر به منظور کاشت این گیاه به صورت زراعی و استخراج مواد موثر آن می‌تواند نقش مهمی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها غیره داشته باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، بخش عمده تحقیقات در زمینه متابولیت‌های ثانویه، شناسایی و دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیکی سنتز یک متابولیت ثانویه، متمرکز شده است. به هر حال، استخراج مستقیم این متابولیت‌ها به دلیل غلظت کم آن‌ها در بافت‌های گیاهی معمولاً پیچیده و ناکارآمد است. بیوسنتز و تنظیم متابولیت‌های ثانویه یک شبکه چند لایه است که به مسیرهای سیگنالینگ مشترک و مولکول‌های کلیدی مانند JAها، SA و GA و ... احتیاج دارد. بنابراین می‌توان با انتخاب الیستورهای مناسب و و اعمال آن‌ها با دز و زمان مناسب بیان ژن‌های موثر در مسیر بیوسنتز ترکیبات ثانویه را افزایش و قاعدتا می‌توان تجمع این ترکیبات را القا نمود. همچنین به دلیل اینکه مطالعات بسیار کم و محدودی در جهان درباره ژن‌های شاخص در مسیرهای متابولیکی در گیاه دارویی گل سازوئی بخصوص در بافت ریشه این گیاه انجام شده است. این تحقیق می‌تواند شروعی برای انجام مطالعات مسیرهای مختلف بیوسنتز ترکیبات با ارزش در صنعت داروسازی و صنایع غذایی با استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک در آینده باشد. امیدواریم که با بررسی‌های بیشتر علمی و عملی در حوزه استفاده از مهندسی ژنتیک امکان تولید ترکیبات دارویی با ارزش گیاهی در حجم وسیع در صنعت فراهم گردد.

سپاسگزاری: بدینو سیله از ستاد تو سعه زیست فناوری نهاد ریا ست جمهوری به جهت تامین اعتبار مالی این پروژه با شماره ۹۷۱۱۰۲ و همچنین معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ایلام که در قالب هسته پژوهشی به شماره ۱۷۶۴/۳۲ حمایت مالی نموده اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

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، ۱۵۰-۱۳۵.

توحیدی نژاد فاطمه؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسمعیلی زاده کشکوئیه علی؛ نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی 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، ۱۳۲-۱۱۹.

حسنی لیلا، عبدالهی مندولکانی بابک، درویش زاده رضا، حسنی عباس (۱۳۹۵) افزایش بیان ژن‌های چاویکول O- متیل ترنسفراز و سینامات ۴- هیدروکسیلاز تحت تأثیر متیل جاسمونات در گیاه دارویی ریحان (Ocimum basilicum L.). مجله تولیدات گیاهی ۳۹، ۱۰۱-۱۱۲.

خانپور اردستانی نرگس (۱۳۹۲) بررسی اثر فنیل آلانین و متیل جاسمونات بر میزان اکتیوزید، فعالیت آنزیم و بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در کشت سلول Scrophularia striata. رساله دکتری، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۰ صفحه.

رهنما حسن؛ حسنلو طاهره؛ شمس محمد رضا (۱۳۹۰) انتقال ژن چالکون سنتاز (CHS) به ریشه‌های مویین گیاه خار مریم (Silybum marianum). پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، ایران. ۷۸ ص.

سلمانیان شهلا؛ صادقی ماهونک علیرضا؛ اعلمی مهران؛ قربانی محمد (۱۳۹۳) ارزیابی ترکیبات تام فنولی، فلاونوئیدی، آنتوسیانینی و فعالیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره استونی میوه ولیک. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ۱۳، ۵۳-۶۶.

شرافتی چالشتری رضا؛ شرافتی چالشتری فرهاد؛ شرافتی چالشتری علی؛ اشرفی کورش (۱۳۸۸) بررسی اثر ضد میکروبی و تعیین میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فلاونولی عصاره اتانولی گل میمونی (Scrophularia striata). مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ۱۱، ۳۲-۳۷.

شوهانی بهناز؛ طاهری مقدم میهن (۱۳۸۸) بررسی اثر التیام بخشی عصاره هیدروالکلی گیاه تشنه داری (Scrophularia striata) برروی زخم باز پوستی خرگوش. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام ۱۷، ۹-۱۶.

غلامی علی اکبر (۱۳۹۶) تولید متابولیت های ثانویه از طریق مهندسی ژنتیک و کشت بافت. فصلنامه علمی ایمنی زیستی ۱۰، ۱۷-۳۶.

فیروزی طیبه؛ اسماعیل زاده بهابادی صدیقه؛ فاخری براتعلی؛ فهمیده لیلا (۲۰۱۶) افزایش بیان ژن فلاون سنتتاز و ترکیبات فلاونوئیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان گیاه زیره سبز تحت تاثیر اسید سالیسیلیک. فصلنامه علمی ژنتیک نوین ۱۰، ۴۹۷-۵۰۶.

قبادی سارا؛ معروفی اسعد؛ مجدی محمد (۱۳۹۵) مطالعه بیان ژن‌های کلیدی در بیوسنتز مونوترپن‌ها در بافت‌های مختلف و در پاسخ به الیسیتورهای غیر زیستی در گیاه دارویی مرزه تابستانه (Satureja hortensis). مجله سلول و بافت ۷، ۲۹۲-۲۷۵.

قهرمان احمد (۱۳۶۵) فلور رنگی ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ۸۴۵ ص.

کمالی پورآزاد مریم؛ شریفی محسن؛ زارع مایوان حسن؛ بهمنمنش مهرداد؛ احمدیان چاشمی نجمه (۱۳۹۶) افزایش بیان ژن آنزیم p-کومارات ۳- هیدروکسیلاز و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی تحت تاثیر کیتوزان در کشت سلولی گل میمونی سازویی (Scrophularia striata). نشریه فرآیند و کارکرد گیاهی ۶، ۸۱-۹۰.

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، ۱۲۲-۱۱۱.

نصری سیما؛ چراغی جواد؛ سلطان بیگی سهیلا (۱۳۹۲) بررسی اثر ضد دردی و ضد التهابی عصاره هیدروالکی ریشه و ساقه گیاه گل میمون سازوئی (Scrophularia Striata) در موش کوچک آزمایشگاهی. فصلنامه علمی – پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۹، ۷۴-۸۴.

هواسیان محمدرضا؛ پناهی جعفر؛ پاکزاد ایرج؛ داودیان عبداله؛ جلیلیان آناهیتا؛ زمانیان عضدی مونا (۱۳۹۱) بررسی اثر مهاری عصاره هیدروالکلی گیاه تشنه داری (Scrophularia striata) بر روی کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه علمی و پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدماتی درمانی شهید بهشتی ۳۶، ۱۹-۲۳.

References

Abbasi N, Azizi Jalilian F, Abdi M, Saifmanesh M (2007) A comparative study of the antimicrobial effect of Scrophularia striata Boiss: extract and selective antibiotics against Staphylococcus aureus and Pesudomonas aeruginosa, J Med Plants 1, 10-18.

Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-Hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis, The Plant Cell 16, 3098 – 109.

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).

Ali MB, Yu K–W, Hahn E-J et al. (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture Panax ginseng roots in bioreactors. Plant Cell Rep 25, 613-620.

Anterola AM, Jeon J-H, Davin LB et al. (2002) Transcriptional control of monolignol biosynthesis in Pinus taeda: factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. J Biol Chem 277, 18272-18280.

Ardeshiry-Lajimi A, Rezaie-Tavirani M, Mortazavi SA, Barzegar, M, et al. (2010) Study of anti-cancer property of Scrophularia striata extract on the human astrocytoma Cell Line (1321). Iran J Pharm Res 9, 403-410.

Bi HH, Zeng RS, Su LM et al. (2007) Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. J Chem Ecol 33, 1089-1103.

Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 4938-4941.

Croteau R, Ketchum RE, Long RM et al. (2006) Taxol biosynthesis and molecular genetics. Phytochem. Rev 5, 75-97.

Dao T, Linthorst H, Verpoorte R (2011) Chalcone synthase and its functions in plant resistance. Phytochem. Rev 10, 397.

Dixon RA, Paiva NL (1995) Stresslnduced Phenylpropanoid Metabolism. Plant Cell 7, 1085-1097.

Ellard-Ivey M, Douglas CJ (1996) Role of jasmonates in the elicitor-and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. Plant Physiol 112, 183-192.

Kambiz L, Afolayan A (2008) Extracts from Aloe ferox and Withania somnifera inhibit Candida albicans and Neisseria gonorrhoea. Afr J Biotechnol 7, 012-015.

Khanpour-Ardestani N (2014) Influence of phenylalanine and methyl jasmonate on Acteoside production and gene expression and enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase

(PAL) in Scrophularia striata cell culture, PhD Thesis, Tarbiat Modares University. PP. 130 (In Persian).

Ferreyra MLF, Rius SP, Casati P (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Plant Sci 3, 1-15.

Firoozie T, Esmaeilzadeh Bahabadi S, Fakheri B et al. (2016) Increasing of flavone synthase gene expression and flavonoid compounds and antioxidant enzymes activity of Cuminum cyminum by salicylic acid. Modern Genetics Journal 10, 497-506 (In Persian).

Frank MR, Deyneka JM, Schuler MA (1996) Cloning of wound-induced cytochrome P450 monooxygenases expressed in pea. Plant physiology 110, 1035-1046.

George A (2018) Simple and efficient method for functional RNA extraction from tropical medicinal plants rich in secondary metabolites. Tropical Plant Res 5, 08-13.

Ghahreman A (1987) Iranian Plants Flor. Research institute of forests and ranglands, 845 P.

Ghobadi S, Maroufi A, Majd M (2016) Differential expression of the key genes involved in the biosynthesis of monoterpenes in different tissues and in response to abiotic elicitors in Summer savory (Satureja hortensis). journal of cell and tissue 7, 275-291.

Gholami AA (2017) production of secondary metabolites through genetic engineering and plant tissue culture, Journal of Biosafety 10, 17-36 (In Persian).

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem 48, 909-930.

Hassani L, Abdollahi Mandoulakani B, Darvishzadeh R et al. (2016) Increasing the expression of genes chavicol o-methyl teransferase and cinnamate 4-hydroxilase under methyl jasmonate treatment in medicinal plant basil (Ocimum basilicum L.). Journal of Plant Productions 39, 101-112.

Havasian MR, Panahi J, Pakzad I, Davoodian A, Jalilian A, Zamanian Azodi M. (2013) Invitro inhibitory effect of scrophularia striata hydroalcoholic extract on Candida albicans, Sch Med Stud J 36, 19-23 (In Persian).

Hayashi H, Sakai T, Fukui H et al. (1990) Formation of soyasaponins in licorice cell suspension cultures. Phytochemistry 29, 3127-3129.

Hayat Q, Hayat S, Irfan M et al. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. Environ Exp Bot 68, 14-25.

Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002) How to define resistance to water deficit stress. Plant Physio 130, 618-626.

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).

Jez J, Ferrer J, Bowman M et al. (2001) Structure and mechanism of chalcone synthase-like polyketide synthases. J Ind Microbiol Biotechnol 27, 393-398.

Kamalipourazad M, Sharifi M, Zare maivan H, Behmanesh M, Ahmadian Chashmi N. (2017) Increasing of p-coumarate 3-hydroxylase gene expression and phenylpropanoid compounds of Scrophularia striata by chitosan, j plant proc func 21, 81-90 (In Persian).

Kang S-M, Jung H-Y, Kang Y-M et al. (2004) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of Scopolia parviflora. Plant Science 166, 745-751.

Khosroushahi AY, Valizadeh M, Ghasempour A et al. (2006) Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of Taxus baccata. Cell Biol Int 30, 262-269.

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.

Li Y-M, Jiang S-H, Gao W-Y et al. (1999) Iridoid glycosides from Scrophularia ningpoensis. Phytochemistry 50, 101-104.

Liu F, Chen J-R, Tang Y-H et al. (2018) Isolation and characterization of cinnamate 4-hydroxylase gene from cultivated ramie (Boehmeria nivea). Biotechnol. Biotechnol. Equip 32, 324-331.

Mahboubi M, Kazempour N, Nazar ARB (2013) Total phenolic, total flavonoids, antioxidant and antimicrobial activities of Scrophularia striata Boiss extracts. Jundishapur J Nat Pharm. Prod 8, 15-19.

Mahesh B, Satish S (2008) Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. World J Agric Sci 4, 839-843.

Mottiar Y, Vanholme R, Boerjan W, et al. (2016) Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification. Curr Opin Biotechnol 37, 190–200.

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295 (In Persian)..

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).

Nasri S, Cheraghi J, Soltanbaygi S (2013) Antinociceptive and anti-inflammatory effect of alcoholic extract of root and stem of Scrophularia striata Boiss. in male mice. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 29, 74-84.

Nims E, Dubois CP, Roberts SC et al. (2006) Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. Metab Eng 8, 385-394.

Onrubia M, Moyano E ,Bonfill M et al. (2011) The relationship between TXS, DBAT, BAPT and DBTNBT gene expression and taxane production during the development of Taxus baccata plantlets. Plant Sci 181, 282-287.

Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant Cell 13, 179-191.

Park S-U, Chae Y-A, Facchini P (2003) Genetic transformation of the figwort, Scrophularia buergeriana Miq., an Oriental medicinal plant. Plant Cell Rep 21, 1194-1198.

Pu G-B, Ma D-M, Chen J-L et al. (2009) Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in Artemisia annua L. Plant Cell Rep 28, 1127-1135.

Qian J, Hunkler D, Rimpler H (1992) Iridoid-related aglycone and its glycosides from Scrophularia ningpoensis. Phytochemistry 31, 905-911.

Rahnama H, Hasanlu T, Rezazadeh S (2011) Transfer of chalcone synthase (CHS) gene to capillary roots of Silybum marianum. Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), 78 P.

Rao SR, Ravishankar G (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol. Adv 20, 101-153.

Rasouli D, Solouki M, Fakheri B et al. (2014) The effects of manganese and salicylic acid on gene expression Menthone reductase and menthol content in Mentha piperita Genetic Engineering and Biosafety Journal 3, 1-8.

Roslan ND, Tan C-S, Ismail I et al. (2013) cDNA cloning and expression analysis of the chalcone synthase gene (CHS) from'polygonum minus. Aust J Crop Sci 7, 777.

Salmanian Sh, Sadeghi mahoonak AR, Alami M, Ghorbani M (2014) Evaluation of Total Phenolic, Flavonoid, Anthocyanin Compounds, Antibacterial and Antioxidant Activity of Hawthorn (Crataegus Elbursensis) Fruit Acetonic Extract. J Rafsanjan Univ Med Sci Health Serv 13, 53-66 (In Persian).

Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR et al. (2006) Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C T difference" formula. J Mol Med (Heidelberg, Ger.) 84, 901-910.

Sennblad B, Bremer B (2002) Classification of Apocynaceae s. 1. according to a new approach combining Linnaean and phylogenetic taxonomy. Syst Biol 51, 389-409.

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 16, 144-158.

Shoohani B, Taheri Moghadam M (2010) Effects of Scrophularia striata extract on wound healing in rabbit, SJIMU 17, 9-16 (In Persian).

Sharafati-chaleshtori R, Sharafati-chaleshtori F, Sharafati-chaleshtori A, Ashrafi K (2010) Antimicrobial effects and evaluation of total phenols, flavonoids and flavonols contents of ethanolic extracts of Scrophularia striata, J Shahrekord Univ Med Sci 11, 32-37 (In Persian).

Smith TC, Weathers PJ, Cheetham RD (1997) Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of Artemisia annua: growth and artemisinin production. In Vitro Cell Dev Biol Plant 33, 75-79.

Srere PA (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. Annu. Rev. Biochem 56, 89-124.

Vasconsuelo A, Boland R (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Sci 172, 861-875.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50.

Wu C-H, Tewari RK, Hahn E-J et al. (2007) Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant defense in adventitious roots ofEchinacea purpurea. J Plant Biol (N. Y., NY, U. S.) 50, 636-643.

Xiong D, Lu S, Wu J, et al. (2017) Improving key enzyme activity in phenylpropanoid pathway with a designed biosensor. Metab Eng 40, 115–123.

Ying C, Wan D (2012) Quantitative determination of total and individual flavonoids in stems and leaves of Buddleja davidii and Buddleja albiflora. Pharmacogn Mag 8, 273.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv 23, 283-333.

Zhong J-J (2002) Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. J Biosci Bioeng 94, 591-599.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500