

The effect of elicitors on the biochemical properties and expression of the genes involved in sesquiterpenes biosynthesis pathway in the hairy root cultures of medicinal plant *Valeriana officinalis* L.

Vida Madani¹, Nasser Zare^{1*}, Rasool Asgahri Zakaria¹

¹ Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Abstract

In order to induction of hairy roots, the leaf and petiole explants from *Valeriana officinalis* L. seedlings grown under *in vitro* condition were inoculated with A4 strain of *Agrobacterium rhizogenes*. Transgenic hairy roots were confirmed by PCR. Transgenic hairy roots were propagated and treated with different concentrations of iron and nickel nano-oxides and methyl jasmonate alone and in combination with 1 mM of L-leucine amino acid. Then, hairy roots were sampled at 24 and 72 hours after treatment. Then the biochemical properties and expression of *VoTPS1* and *VoTPS6* genes were evaluated. The gene expression level was measured using real-time PCR technique and specific primers for each gene. The results showed that the combined application of 100 µM methyl jasmonate and 1 mM L-leucine has increased the activity of catalase enzymes and proline content in *Valerian* hairy root compared to the control. Among the different concentrations of nickel nano-oxide, the treatment containing 30 mg/l nickel nano-oxide with 1 mM L-leucine increased the activity of peroxidase enzyme and containing 60 mg/l nickel nano-oxide increased the total protein content in hairy roots. In addition, among the different concentrations of iron nano-oxide, 30 mg/l of this nano-oxide increased the activity of peroxidase enzyme and the amount of flavonoid content, and a combination of 90 mg/l of this nano-oxide with 1 mM of L-leucine amino acid was led to an increase in proline content. The highest expression for *VoTPS1* gene was observed in treatment containing 60 mg/l iron nano-oxide at 24 hours after elicitation, and for *VoTPS6* gene was observed in treatment containing methyl-jasmonate (100µM) and L-leucine (1mM) at 72 hours after elicitation.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, nano-oxide, Real-time PCR, Secondary metabolites, *Valeriana Officinalis* L.

* Corresponding Author: zarenasser@yahoo.com

ارزیابی تأثیر محرک‌ها بر پاسخ بیوشیمیایی و بیان ژن‌های درگیر در بیوستنز سز کوئی ترپنوئیدها در کشت ریشه‌های موین گیاه دارویی سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.)

ویدا مدنی^۱، ناصر زارع^{۱*}، رسول اصغری زکریا^۱

^۱ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ حاصل از گیاهچه‌های رشد کردهٔ گیاه سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای با *Agrobacterium rhizogenes* سویهٔ A4 تلقیح شدند تا ریشهٔ موین تولید شود. ریشه‌های موین تراریخت پس از تأیید ماهیت تراریختی از طریق PCR تکثیر شدند و با سطوح مختلف نانواکسیدهای آهن و نیکل و متیل جاسمونات به تنهایی و در ترکیب با ۱ میلی مولار آمینواسید L-لوسین تیمار شد؛ سپس در فواصل زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، نمونه برداری ریشه‌های موین انجام شد و ویژگی‌های بیوشیمیایی، میزان فلاونوئید و بیان ژن‌های *VoTPS1* و *VoTPS6* بررسی شد. بررسی سطح بیان ژن‌ها با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. نتایج نشان دادند کاربرد تیمار ترکیبی ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به همراه ۱ میلی مولار آمینواسید L-لوسین باعث افزایش معنادار فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان پرولین نسبت به تیمار شاهد شد. در بین غلظت‌های مختلف نانواکسید نیکل، غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر به همراه ۱ میلی مولار آمینواسید L-لوسین فعالیت آنزیم پراکسیداز و غلظت ۶۰ میلی گرم بر لیتر میزان پروتئین کل را افزایش داد. در بین غلظت‌های مختلف نانواکسید آهن، غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر فعالیت آنزیم پراکسیداز و فلاونوئید و غلظت ۹۰ میلی گرم بر لیتر به همراه ۱ میلی مولار آمینواسید L-لوسین بیشترین میزان پرولین را القا کرد. بیشترین افزایش بیان ژن *VoTPS1* در تیمار ۶۰ میلی گرم بر لیتر نانواکسید آهن در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار و برای ژن *VoTPS6* در تیمار متیل جاسمونات به همراه ۱ میلی مولار آمینواسید L-لوسین در ۷۲ ساعت پس از اعمال محرک دیده شد.

واژه‌های کلیدی: *Agrobacterium rhizogenes*، *Valeriana officinalis* L.، متابولیت ثانویه، نانوذرات، Real-

Valeriana officinalis L. time PCR

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: zarenasser@yahoo.com، شمارهٔ تماس: ۰۹۱۴۳۰۶۶۰۲۶

مقدمه

خانواده Valerianaceae با حدود ۲۰۰ گونه *Valeriana* به‌طور گسترده در سراسر جهان پخش شده است. در میان ۹ جنس متعلق به این خانواده، تنها تعداد محدودی از گونه‌های جنس *Valeriana* با عنوان گیاهان دارویی معرفی شده‌اند که از جمله آنها می‌توان به سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*) اشاره کرد. سنبل‌الطیب، گیاهی با ارتفاع ۸۰ تا ۱۵۰ سانتی‌متر و دارای ریزوم‌های بسیار کوچک است (Omidbeigi, 1995) که به‌شکل مسکن، آرام‌بخش، خواب‌آور، درمان‌کننده اسپاسم، هیستری، هیجان، میگرن و روماتیسم در پزشکی کاربرد دارد. ریشه‌های این گیاه دارویی دارای ترکیبات دارویی هستند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به روغن‌های فرار و مشتقات سزکوئی‌ترپنوئید (والرنیک‌اسید، والرنون و والرنال، والرنیل‌استات)، اپوکسی‌ایروئیداسترها (والپوتریات‌ها) و مواد دیگر مانند بالدرینال، آمینواسیدها (آرژنین، گلوتامین و تیروزین) و آلکالوئیدها اشاره کرد (Omidbeigi, 1995).

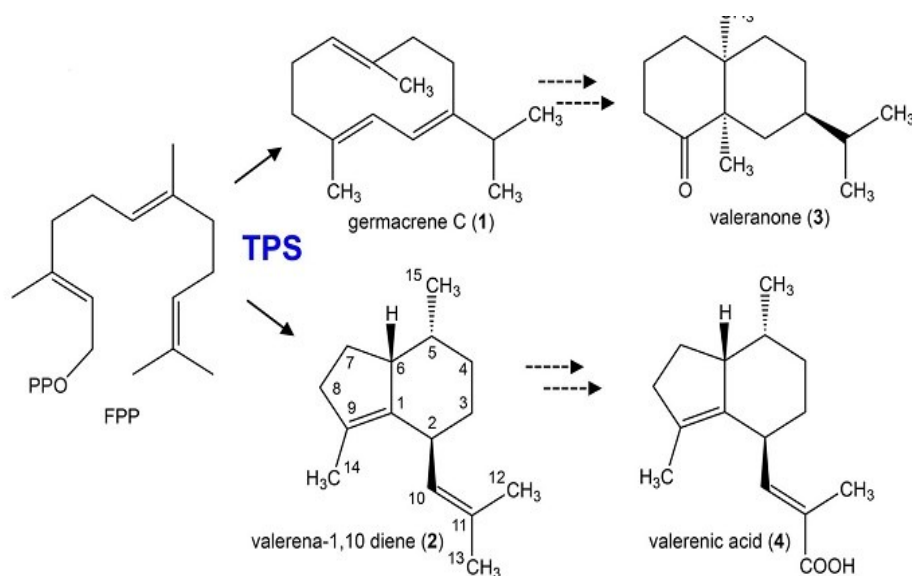
ترین‌ها یا ترپنوئیدها بزرگ‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه در گیاهان را شامل می‌شوند. بیوستنزترین‌ها از استیل‌کوآنزیم A و از طریق مسیر موالونیک‌اسید (MVA) انجام می‌شود. ترین‌ها بر اساس واحدهای ایزوپرن (C_5) تشکیل‌دهنده ساختار اسکلتی دسته‌بندی می‌شوند؛ این واحدهای ایزوپرنی شامل IPP (Isopentenyl diphosphate) و DMAPP (Dimethylallyl diphosphate) هستند که ماده اولیه سنتز سه پیش‌ماده ژرانیل‌دی‌فسفات ($-GPP, C_{10}$)، فارنسیل‌دی‌فسفات ($-FPP, C_{15}$) و

ژرانیل‌ژرانیل‌دی‌فسفات ($GGPP, C_{20}$) به شمار می‌آیند (Yeo et al., 2012). سزکوئی‌ترین‌ها از فارنسیل‌دی‌فسفات (FPP) مشتق‌شده از مسیر MVA به وجود می‌آیند؛ درحالی‌که مونوترپن‌ها و دی‌ترین‌ها به ترتیب از ژرانیل‌دی‌فسفات و ژرانیل‌ژرانیل‌دی‌فسفات که از مشتقات مسیر DXP (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate) هستند، در پلاستیدها به وجود می‌آیند (Pyle et al., 2012). Pyle و همکاران (۲۰۱۲) مسیر سنتز والرنیک‌اسید را که به سزکوئی‌ترین تعلق دارد، در گیاه سنبل‌الطیب بررسی کردند؛ طبق این بررسی، آنزیم VoTPS1 چندین محصول از جمله جرماسرین C، جرماسرین D و جرماسرین B را سنتز می‌کند که جرماسرین C و D عمده‌ترین ترین‌ها هستند. جرماسرین C به ماده دیگری به نام عناصر δ تبدیل می‌شود که پایدارتر است؛ درحالی‌که VoTPS2 به‌طور عمده valerena-4,7(11)-diene را سنتز می‌کند و این ماده به والرنیک‌اسید تبدیل می‌شود. هم‌زمان با Pyle و همکاران (۲۰۱۲)، پژوهشگران دیگری از جمله Yeo و همکاران (۲۰۱۲) پیشنهاد کردند ژن *VoTPS1* فارنسیل‌دی‌فسفات را به والرنین ۱-۱۰ داین تبدیل می‌کند و والرنین ۱-۱۰ داین طی مسیر اکسید و به والرنیک‌اسید تبدیل می‌شود (شکل ۱).

باتوجه به اینکه تولید متابولیت‌های ثانویه در بافت‌های تمایز یافته بیشتر است و بازده کم، تکرارپذیری کم کشت‌ها و بی‌ثباتی تولید، عوامل محدودکننده در زمینه کشت‌های تمایز یافته مانند کالوس و سوسپانسیون سلولی هستند، امروزه از روش کشت ریشه‌موئین برای رفع این کمبودها

متابولیت‌های ثانویه در سلول‌ها می‌شوند؛ محرک از طریق گیرنده‌های موجود در غشای پلاسمایی دریافت می‌شود و از طریق سیستم‌های ترانسپورت علامتی، نسخه‌برداری و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. متیل‌جاسمونات، ترکیب فرار معطری است که برای نخستین بار در گیاه *Jasminum grandiflorum* شناسایی شد. جاسمونیک‌اسید و مشتقات آن مانند متیل‌جاسمونات از جمله ترکیبات مهم در مسیر ترانسپورت علامتی گیاهان هستند که در فرایندهای مختلف رشدی و فیزیولوژیکی از جمله جلوگیری از رشد ریشه، القای پاسخ‌های دفاعی، گسترش گل، پاسخ به زخم و پیری درگیر هستند و در تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه به‌طور گسترده استفاده می‌شوند (Zare et al., 2014; Taherkhani et al., 2019).

استفاده می‌شود. رشد سریع، زمان دو برابر شدن کم، سهولت نگهداری و توانایی سنتز طیف وسیعی از ترکیبات فیتوشیمیایی، کشت ریشه‌موین را به منبع مستمری برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی و افزودنی‌های مواد غذایی تبدیل کرده است. با توجه به توانایی ریشه‌های موین در تولید فیتوهورمون‌های موردنیازشان، کشت ریشه‌موین می‌تواند در محیط بدون هورمون انجام شود (Hu and Du, 2006). مطالعه‌های متعدد نشان داده‌اند فعالیت مسیرهای بیوسنتزی ثانویه و در نتیجه، تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله عوامل محیطی و فیزیولوژیکی مانند محرک‌ها قرار می‌گیرد (Ahmadian Chashmi et al., 2010). محرک‌ها، ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی سبب بیوسنتز و انباشت



شکل ۱- مسیر پیشنهادی برای بیوسنتز سزکوئی‌ترین والرانون (۳) و والرنیک‌اسید (۴) در گیاه سنبل‌الطیب؛ مسیری چندمرحله‌ای که در اولین مرحله، فارنسیل‌دی‌فسفات (FPP) توسط سزکوئی‌ترین سنتازها (TPS) به یکی از دو ماده جرماسرین C (۱) و والرین ۱۰-۱ داین (۲) تبدیل می‌شود و سپس با هیدروکسیله شدن کاهشی جرماسرین C، والرانون ساخته می‌شود و با اکسیداسیون پی‌درپی والرین ۱-۱۰ داین، والرنیک‌اسید به وجود می‌آید (Yeo et al., 2012).

Valeriana officinalis طی مدت ۳ و ۷ روز بررسی و گزارش شد تیمارهای عصاره قارچی و متیل‌جاسمونات بیشترین مقدار والرینیک‌اسید را طی ۷ روز پس از اعمال تیمار تولید می‌کنند (Dini, Torkamani et al., 2014).

کاربرد پیش‌سازهای متابولیت‌های ثانویه از جمله آمینواسیدها در محیط‌های کشت سلولی و ریشه‌های مویین در رشد و نمو سلول‌ها و تحریک مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه مؤثر است. افزایش آمینواسید ال-تیروزین به محیط‌کشت سوسپانسیون سلولی *Papaver bracteatum* سبب افزایش تولید متابولیت تبائین در این سلول‌ها می‌شود (Farjaminezhad et al., 2016)؛ علاوه‌براین، اضافه‌کردن لوسین به ترکیب محیط‌کشت سبب افزایش مونوترپن‌های فرآر آلفا و بتا پنین در کشت‌های سلولی *Perilla frutescens* می‌شود (Mulder-Krieger et al., 1988)؛ بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر نانوآکسیدهای آهن و نیکل و متیل‌جاسمونات به‌تنهایی و در ترکیب با آمینواسید L-لوسین بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و بیان برخی از ژن‌های درگیر در بیوسنتز سزکوئی‌ترین‌ها در ریشه‌های مویین گیاه دارویی سنبل‌الطیب انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه‌ها: در پژوهش حاضر، بذرهای گونه *Valeriana officinalis* L. از شرکت پاکان‌بذر اصفهان تهیه و استفاده شدند. به‌منظور ضدعفونی‌کردن سطحی، بذرها را سنبل‌الطیب پس از شستشو با آب مقطر، ابتدا به‌مدت

نانوبیوتکنولوژی، مجموعه جدیدی از ابزارهای دست‌کاری ژن با استفاده از نانوذرات، نانوالیاف و نانوکیسول را ارائه می‌دهد. نانوذرات به‌علت آثار خاص و ویژگی منحصربه‌فردی که دارند، در زیست‌شناسی گیاهی و کشاورزی برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی، تولید مولکول‌های مختلف لازم برای مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی، استفاده مؤثرتر از مواد مغذی و افزایش رشد گیاه کاربرد دارد (Nair et al., 2010). پژوهش‌هایی در زمینه تأثیر نانوذرات به‌عنوان محرک تولید متابولیت‌های ثانویه و نیز بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز برخی متابولیت‌های ثانویه انجام شده‌اند. نانوآکسید آهن به‌علت حضور فعال در فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سلول‌ها، بیشترین کاربرد را دارد (Aminizadeh et al., 2017; Hussain et al., 2016). در پژوهشی، اثر غلظت‌های مختلف نانوآکسید آهن بر تولید سولفورافان (SFN) در جوانه‌های هفت‌روزه گیاه *Lepidium draba* در فواصل زمانی مختلف (۸ و ۱۶ ساعت) بررسی شد و نتایج نشان دادند پس از ۱۶ ساعت، محتوای SFN در تمام غلظت‌های نانوآکسید آهن افزایش می‌یابد (Aminizadeh et al., 2016)؛ همچنین Ahmadi Moghadam همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند سنتز و تجمع دوپامین در ریشه‌های مویین *Portulaca oleracea* تیمارشده با متیل‌جاسمونات در مقایسه با ریشه‌های تیمارنشده حدود ۴/۳ برابر بیشتر است. در پژوهشی دیگر، تأثیر محرک‌های عصاره قارچی *Fusarium graminearum*، متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید بر تولید والرینیک‌اسید در ریشه‌های مویین

میلی‌گرم برلیتر ریفامپسین اضافه و تا رسیدن به OD₆₀₀ برابر با ۰/۶ تا ۰/۸ در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. سوسپانسیون باکتری یادشده برای تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی استفاده شد. ریزنمونه‌های تهیه‌شده از گیاه به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند و پس از حذف باکتری اضافی با کاغذ صافی استریل، روی محیط کشت MS بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد در تاریکی هم‌کشت شدند. پس از سپری شدن مدت زمان هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS جامد بدون هورمون و حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم برلیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. ریشه‌های موینی که به اندازه ۲ سانتی‌متر یا بیشتر رشد کرده بودند، از ریزنمونه‌ها جدا و در محیط کشت MS مایع بدون هورمون و حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم برلیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم کشت شدند. کشت‌ها روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. رده‌ای از ریشه‌های موین که دارای بیشترین و سریع‌ترین رشد بودند، برای مطالعه‌های بعدی انتخاب و در محیط کشت MS مایع (با همان شرایط یادشده) تکثیر شدند.

تجزیه و تحلیل مولکولی ریشه‌ها با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): استخراج DNA ژنومی ریشه‌های تراریخت احتمالی با استفاده از روش Saghai-marouf و همکاران (۱۹۸۴) انجام شد. به منظور اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های موین از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *rol B* (آغازگر رفت با توالی 3'-gctcttgtagctagattt-5' و

۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد تیمار شدند. بذره‌های ضد عفونی شده سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند و آب اضافی با کاغذ صافی استریل حذف شد. بذره‌های ضد عفونی شده در ظرف‌های شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS جامد کشت و در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با نور فلورسنت و شدت نور ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه‌ها (هفته سوم تا چهارم کشت)، ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ سنبل‌الطیب با استفاده از اسکالپل تیز و استریل و زیر هود لامینار در قطعه‌هایی به اندازه ۱ تا ۲ سانتی‌متر بریده و به منظور تلقیح با *Agrobacterium rhizogenesis* استفاده شدند.

سویه باکتری و تلقیح ریزنمونه‌ها: *Agrobacterium rhizogenesis* سویه A₄ (تهیه شده از آزمایشگاه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی) به منظور القای ریشه‌های موین در گیاه دارویی سنبل‌الطیب استفاده شد. به منظور کشت باکتری از محیط کشت جامد MYA (Sahu et al., 2013) همراه با ۵۰ میلی‌گرم برلیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین استفاده شد. یک کلنی به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MYA مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم برلیتر ریفامپسین منتقل و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی شیکرانکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در تاریکی تکثیر شد؛ سپس حدود ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MYA مایع تازه حاوی ۵۰

ارزیابی ویژگی‌های بیوشیمیایی در ریشه‌های موین تحت تأثیر تیمارهای محرک: اندازه‌گیری میزان پروتئین با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد. به منظور تهیه عصاره پروتئینی، نمونه ریشه موین پس از پودر شدن در ازت مایع، در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار به شکل هموزن درآمد؛ سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند؛ محلول رویی عصاره برای سنجش غلظت پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز استفاده شد. اندازه‌گیری میزان پروتئین با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد؛ به این ترتیب که میزان جذب نوری عصاره پروتئینی در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (BIORAD, Smartspec™ plus, ساخت کشور آمریکا) اندازه‌گیری شد. محلول واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، ۵۰ میکرولیتر معرف برادفورد و ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات بود. از تمام مواد یادشده به‌غیر از عصاره پروتئینی گیاه برای بلانک دستگاه اسپکتروفتومتر و از غلظت‌های مختلف BSA برای کمی‌سازی غلظت پروتئین استفاده شد.

سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Chen و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد. فعالیت آنزیم کاتالاز از طریق ارزیابی کاهش مقدار پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد در حضور آنزیم اندازه‌گیری شد. محلول واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار با اسیدیتة ۷ و ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۵ میلی‌مولار بود که ۶۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی

آغازگر برگشت با توالی-5' (gaaggtgcaagctacctc-3') استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و سپس با دستگاه ژل‌داک مشاهده و بررسی شدند.

اعمال تیمارهای محرک (Elicitor) بر کشت ریشه‌های موین: پس از تکثیر ریشه‌های موین، تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات (Sigma-Aldrich; Product Number: W341002) به تنهایی و به شکل ترکیب با ۱ میلی‌مولار L-لوسین و ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم برلیتر نانو اکسید آهن (20-40 nm) و نانو اکسید نیکل (10-20 nm) به تنهایی و به شکل ترکیبی با L-لوسین و ۱ میلی‌مولار L-لوسین در روز پانزدهم پس از واکنشی بر کشت‌های ریشه موین اعمال شدند. نانو اکسیدهای آهن و نیکل به شکل پودر از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان تهیه شدند. سوسپانسیون (مخلوط) یکنواخت این نانو اکسیدها در آب دیونیزه و با استفاده از امواج فراصوت (دستگاه پروب التراسوند، مدل H UP100، شرکت Hielscher، سوئیس) تهیه و پس از اتوکلاو استفاده شد. غلظت‌های محرک‌ها بر اساس پژوهش‌های Soltani (۲۰۱۵)، Ghorbanpour و همکاران (۲۰۱۴) و Aminizadeh و همکاران (۲۰۱۶) انتخاب شدند. در دوره‌های زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار، نمونه برداری از ریشه‌ها انجام شد. در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، میزان پروتئین کل، میزان پرولین، میزان فلاونوئید و همچنین میزان بیان ژن‌های کدکننده برخی از آنزیم‌های مسیر بیوستز سزکوئی‌ترین‌ها (ژن‌های VoTPS1 و VoTPS6) بررسی شد.

از منحنی استاندارد پرولین خالص تعیین شد. میزان فلاونوئید کل با استفاده از روش Cheng و همکاران (۲۰۰۲) اندازه‌گیری شد؛ به این منظور، ۰/۱ گرم از ریشه‌های مویین با ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک اسید خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً ساییده و عصاره به‌دست آمده به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فلاونوئید کل نمونه‌ها براساس منحنی استاندارد کوئرستین (Quercetin) و با استفاده از روش Cheng و همکاران (۲۰۰۲) سنجیده شد؛ به این ترتیب که ۲۵۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات ۱ مولار به ۱ میلی‌لیتر عصاره گیاهی اضافه و سپس جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۹۸ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد کوئرستین و معادله رگرسیون حاصل از آن برای کمی‌سازی مقدار فلاونوئید نمونه‌ها استفاده شد.

تحلیل آماری داده‌های بیوشیمیایی: آزمایش حاضر به شکل فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار زیستی انجام شد. محاسبه‌های آماری و تجزیه واریانس (ANOVA) با نرم‌افزار SPSS ver. 23 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شدند. نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2016 رسم شدند.

بررسی بیان ژن

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از تیمارهای شاهد، نانوآکسید آهن (۶۰ میلی‌گرم بر لیتر)، متیل‌جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) به اضافه

در حمام یخ به آن اضافه و تغییرات جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه خوانده شد. میزان فعالیت کاتالاز بر حسب واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد. در اندازه‌گیری فعالیت گایاکول‌پراکسیداز، مخلوط واکنش شامل ۰/۸۱ میلی‌لیتر بافر پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷)، ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، ۹۰ میکرولیتر گلایکول (۱۰ میلی‌مولار) و ۹۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (۵ میلی‌مولار) بود. تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر ثبت شدند. مخلوط واکنش در کووت ریخته و تغییرات جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش میزان پرولین با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انجام شد؛ به این منظور، مقدار ۰/۱ گرم از ریشه‌های مویین در ازت مایع پودر و سپس ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳ درصد به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ساتریفیوژ و محلول رویی به میکروتیوب جداگانه‌ای منتقل شد؛ سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین و ۱ میلی‌لیتر استیک اسید خالص به آن اضافه و مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب نگهداری شد؛ سپس ۲ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد و در نهایت، جذب نوری محلول رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت پرولین آزاد نمونه با استفاده

درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه برای سنتز cDNA از روی RNA و مرحله دوم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای توقف واکنش سنتز انجام شد.

طراحی آغازگرها و واکنش Real-time PCR:

توالی ژن‌های *VoTPS1* و *VoTPS6* به ترتیب با شماره دسترسی JX 494704.1 و JX 494699.1 از سایت NCBI گرفته شد و سپس طراحی با استفاده از نرم‌افزارهای تحت وب Primer3web (www.embnet.sk/cgi-bin/primer3) و Primer blast (www.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) و رعایت تمام اصول اساسی در طراحی آغازگر از جمله اینکه پنج باز ناحیه ۵ انتهایی نباید حاوی بیش از دو گوانین و دو سیتوزین باشند، درصد گوانین و سیتوزین باید حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد باشد و انتهای ۵ آغازگرها نباید حاوی توالی تکراری معکوس باشد (Gopesh and George, 2016; Hashemi and Naghavi, 2012)، انجام شد؛ علاوه بر این، اندازه قطعه تکثیری بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت باز انتخاب شد؛ در نهایت، ویژگی‌های آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo analyser بررسی شدند. شرکت BIONEER (کره جنوبی) سنتز آغازگر را انجام داد (جدول ۱). به منظور بهینه‌سازی تکثیر و دمای اتصال آغازگرها، PCR در شیب دمایی ۵۵/۵ تا ۶۳ درجه سانتی‌گراد (باتوجه به دمای ذوب آغازگرها) انجام و از دستگاه ترموسایکلر (PCR) (مدل T100، شرکت BIO RAD، آمریکا) به این منظور استفاده شد؛ در نتیجه، دمای اتصال برای انجام Real-time

آمینواسید L-لوسین در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار (Kabita *et al.*, 2020) و از تیمارهای نانواکسید نیکل (۶۰ میلی‌گرم برلیتر) و نانواکسید نیکل (۶۰ میلی‌گرم برلیتر) به اضافه آمینواسید L-لوسین ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار با استفاده از محلول RNXplus (شرکت سیناکلون، تهران) و طبق دستورعمل شرکت سازنده انجام شد؛ به این ترتیب که به ازای ۰/۱ گرم از ریشه‌های موین پودر شده در ازت مایع، ۱ میلی‌لیتر از محلول RNXplus اضافه شد و پس از طی کامل مراحل استخراج و شستشو با اتانول ۷۵ درصد تهیه شده با آب تیمار شده با DEPC، رسوب RNA در ۴۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ژل آگارز ۱ درصد برای تعیین کیفیت RNAهای استخراج شده از نظر وجود باندهای 28S و 18S استفاده شد. به منظور تعیین غلظت یا کمیت‌سنجی نمونه‌های RNA و همچنین بررسی احتمال وجود آلودگی پروتئینی و مواد فنلی در آن، از میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه NanoDrop استفاده شد. به منظور حذف DNA ژنومی از آنزیم DNase I (شرکت سیناکلون، تهران) طبق دستورعمل شرکت سازنده استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت Vivantis، کره جنوبی) طبق دستورعمل شرکت سازنده انجام شد. محلول واکنش با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل RNA (۳/۵ میکروگرم)، dNTP، الیگو dT و آب بدون نوکلئاز بود. شرایط دمایی، زمانی و چرخه‌ای واکنش نسخه‌برداری معکوس شامل دو مرحله بود که اولین مرحله در دمای ۴۲

شد. به منظور بررسی نمودار منحنی ذوب، میزان جذب فلورسنس آمپلیکون‌ها در دامنه دمایی ۶۶ تا ۹۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. میانگین چرخه‌های آستانه (CT) برای هر ژن محاسبه شد و نرمال‌سازی داده‌های CT مربوط به نمونه‌های مختلف و نمونه شاهد با استفاده از CT ژن مرجع (*18S rRNA*) انجام شد (ΔCT)؛ سپس ΔCT هر نمونه با ΔCT نمونه شاهد کالیبره و تغییر بیان ژن به شکل $\Delta\Delta CT$ گزارش و بیان نسبی ژن‌ها از طریق روش فافل (Pfaffl, 2001) محاسبه شد؛ در نهایت، تجزیه و تحلیل داده‌های بیان نسبی ژن با نرم‌افزار SPSS ver. 23 در قالب طرح کاملاً تصادفی و با توجه به اینکه در تعداد کمی از تیمارها، یکی از تکرارهای زیستی در دسترس نبود، به طور نامتعادل انجام شد.

PCR برای *VoTPS6* و *18S rRNA* برابر ۶۱ درجه سانتی‌گراد و برای *VoTPS1* برابر ۶۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. ژن مرجع با توجه به پژوهش Gopesh و George (۲۰۱۲)، *18S rRNA* انتخاب شد که بیان ثابت این ژن را در گیاه نخود فرنگی (*Pisum sativum L.*) در معرض تنش‌های زیستی و غیرزیستی گزارش کرده‌اند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی برای هر دو ژن هدف و ژن خانه دار *18S rRNA* در ۳ تکرار زیستی و ۳ تکرار تکنیکی با استفاده از دستگاه Real-time PCR (مدل Light cycler 96، شرکت ROCHE، آلمان) (مطابق جدول ۲) و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در ۴۰ چرخه با استفاده از معرف ISYBR green I (شرکت سیناکلون، تهران) انجام

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده برای ارزیابی بیان ژن‌های *VoTPS1* و *VoTPS6* در ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب

ژن	توالی ۵' به ۳' (5'→3')	طول محصول	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
<i>VoTPS1</i>				
آغازگر رفت	GTAGGCATGGGAGTAACTACAG	۱۱۹	۵۷/۶۸	۶۰
آغازگر برگشت	TCGTGTCCAACCTTATCATCC		۵۷/۴۶	۶۰
<i>VoTPS6</i>				
آغازگر رفت	CGTCAAGGTGGTGAAGAGT	۱۳۸	۵۹/۶۱	۶۱
آغازگر برگشت	CCTTTGTGTTGACTCTCCTGCT		۶۰/۴۹	۶۱

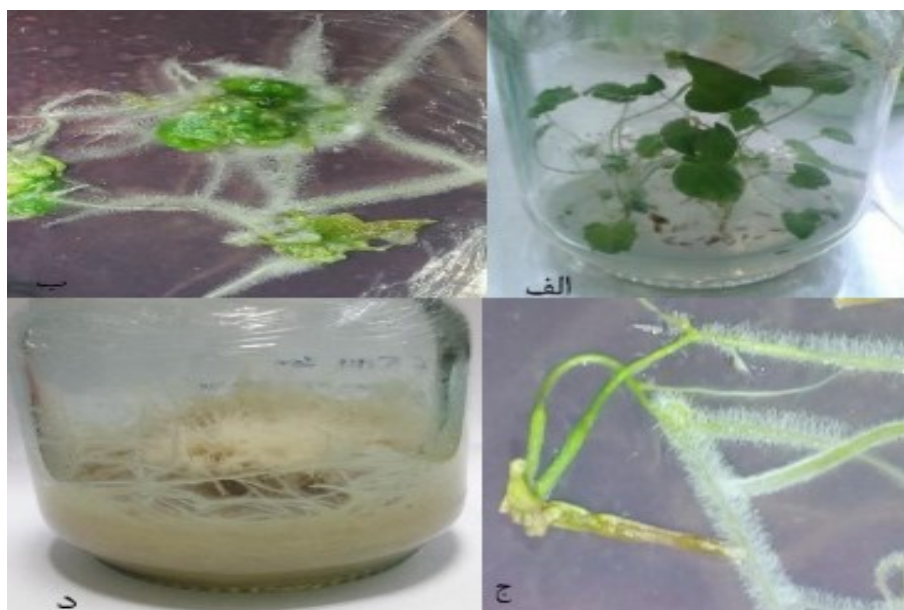
جدول ۲- اجزای تشکیل دهنده مخلوط واکنش Real-time PCR

حجم در یک واکنش	مخلوط پایه واکنش
۱۰ μ l	مخلوط پایه SYBR GREEN
۰/۵ μ l	آغازگر رفت
۰/۵ μ l	آغازگر برگشت
۸ μ l	آب بدون نوکلئاز
۱ μ l	cDNA
۲۰ μ l	حجم نهایی واکنش

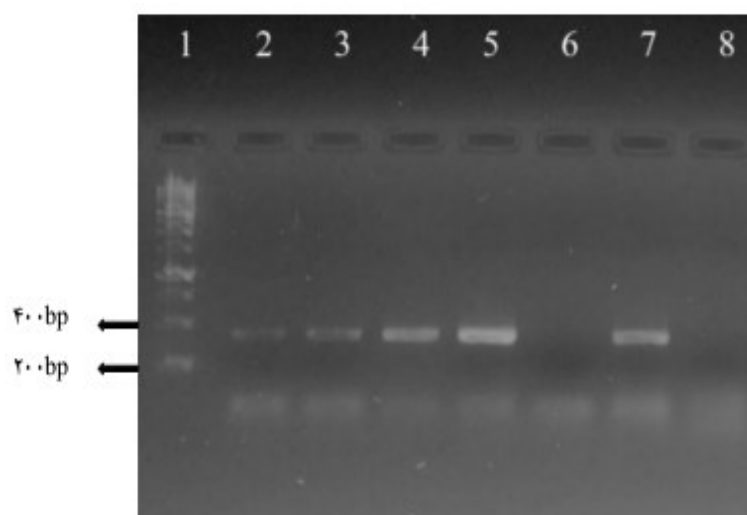
نتایج

القا و تأیید مولکولی ریشه‌های موئین: پس از گذشت دو تا سه هفته از تلقیح ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ گیاه سنبل‌الطیب با *Agrobacterium rhizogenesis* سویه A4، ریشه‌های موئین ظاهر

شدند. با توجه به قابلیت رشد زیاد ریشه‌های موئین حاصل از ریزنمونهٔ برگ، این ریزنمونه برای ادامهٔ کار استفاده شد. نمونه‌ای از ریشه‌های موئین تولیدشده و رشد کرده در محیط‌کشت‌های MS جامد و مایع در شکل ۲ دیده می‌شود.



شکل ۲- القا و کشت ریشه‌های موئین سنبل‌الطیب؛ الف. گیاهچه‌های درون شیشه‌ای استفاده‌شده برای تهیهٔ ریزنمونه، ب و ج. به ترتیب ریشه‌های موئین القاشده در ریزنمونه‌های برگ و ساقه، د. تکثیر ریشهٔ موئین در محیط مایع بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی



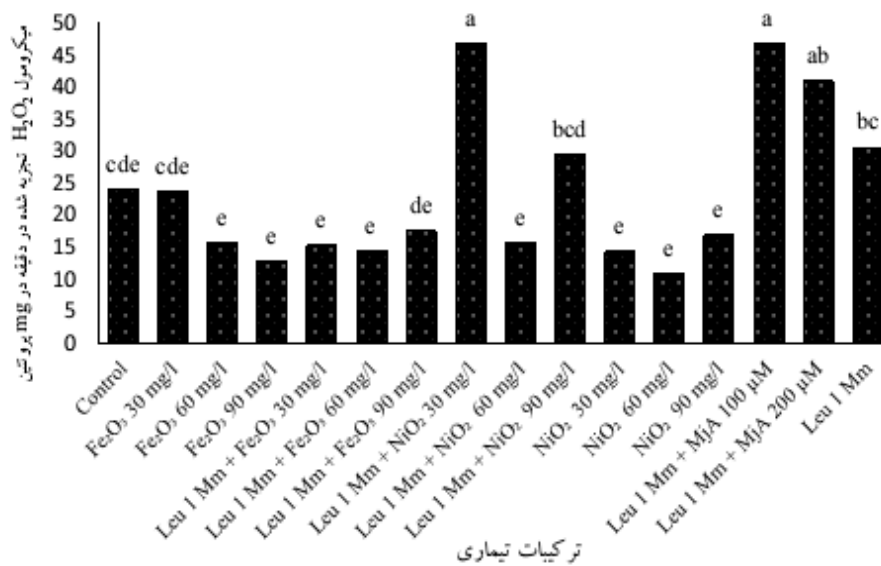
شکل ۳- بررسی تراریختی ریشه‌های موئین گیاه سنبل‌الطیب از طریق PCR با آغازگر اختصاصی ژن rol B؛ ستون ۱: نشانگر Ladder 1 kb DNA، ستون ۲-۵ و ۷. ریشه‌های موئین تراریخته، ستون ۶. ریشه‌های غیرتراریخت، ستون ۸. شاهد منفی

متقابل تیمار محرک و دوره‌های زمانی پس از اعمال تیمار قرار گرفت؛ اما تأثیر دوره‌های زمانی پس از اعمال تیمار بر این صفت از نظر آماری معنادار نبود. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمار ترکیبی ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات همراه با ۱ میلی‌مولار L-لوسین و تیمار غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید نیکل همراه با ۱ میلی‌مولار L-لوسین به دست می‌آید که تفاوت معناداری نسبت به شاهد و سایر تیمارها دارد (شکل ۴)؛ اما اختلاف معناداری بین سایر تیمارها از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده نشد.

به منظور تأیید ترا ریختی ریشه‌های موین از روش PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *rol B* استفاده شد. ژن *rol B* از ژن‌های موجود در ناحیه T-DNA پلاسمید *Agrobacterium Ri* (Christey and Braun, 2005) همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، تکثیر DNA مربوط به ژن *rol B* (تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۳۲۰ جفت باز از این ژن) در DNA ریشه‌های موین بیان‌کننده تلفیق موفق T-DNA در ژنوم و ترا ریخت بودن این ریشه‌هاست.

ارزیابی بیوشیمیایی ریشه‌های موین تحت تأثیر تیمار محرک

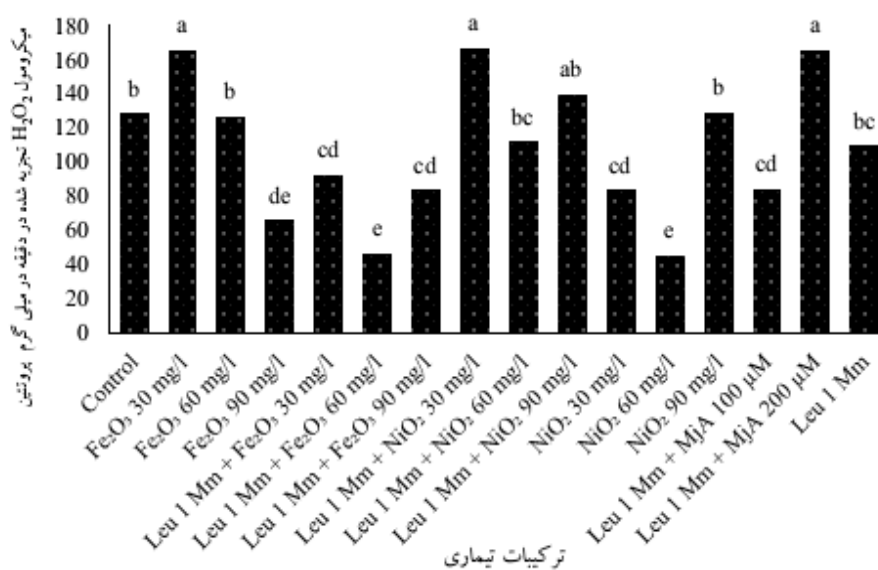
فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور معناداری تحت تأثیر تیمار محرک و اثر



شکل ۴- تأثیر تیمار غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات، آمینواسید L-لوسین و نانو اکسید آهن و نیکل بر فعالیت آنزیم کاتالاز در کشت ریشه‌های موین سنبل‌الطیب؛ Fe₂O₃: نانو اکسید آهن، NiO₂: نانو اکسید نیکل، MjA: متیل‌جاسمونات، Leu: آمینواسید L-لوسین. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیان‌کننده عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۵ درصد است.

غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید نیکل مشاهده می‌شود. در بین غلظت‌های نانو اکسید آهن، غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید آهن بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز را داشت؛ همچنین غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات همراه با ۱ میلی‌مولار L-لوسین در زمان ۷۲ ساعت، بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را نشان داد (شکل ۵).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به‌طور معناداری تحت تأثیر تیمار محرک، اثر متقابل تیمار محرک و دوره‌های زمانی پس از اعمال تیمار قرار گرفت. مقایسه میانگین ترکیب‌های تیماری نشان داد آنزیم پراکسیداز با اعمال تیمار ۱ میلی‌مولار L-لوسین همراه با ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید نیکل بیشترین فعالیت را دارد و این در حالیست که کمترین فعالیت این آنزیم در



شکل ۵- تأثیر تیمار غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات، آمینو اسید L-لوسین و نانو اکسید آهن و نیکل بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در کشت ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب؛ Fe₂O₃: نانو اکسید آهن، NiO₂: نانو اکسید نیکل، MjA: متیل جاسمونات، Leu: آمینو اسید L-لوسین. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیان‌کننده عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۵ درصد است.

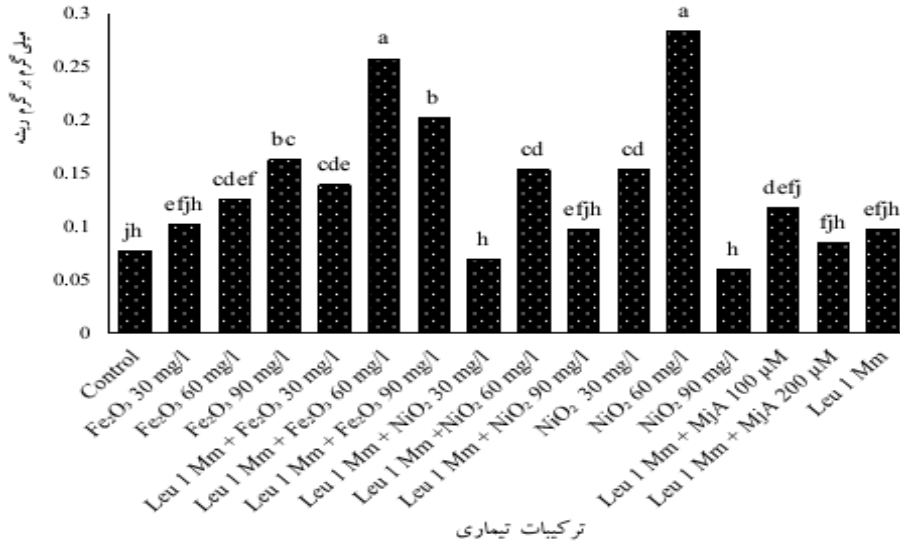
شاهد نشان داد؛ در حالی که کمترین میزان پروتئین کل در تیمار ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید نیکل مشاهده شد (شکل ۶).

میزان پروتئین: میزان پروتئین ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب به‌طور معناداری تحت تأثیر تیمارهای محرک و اثر متقابل تیمار محرک و زمان پس از اعمال محرک قرار گرفت. ترکیب تیمار ۱۰۰

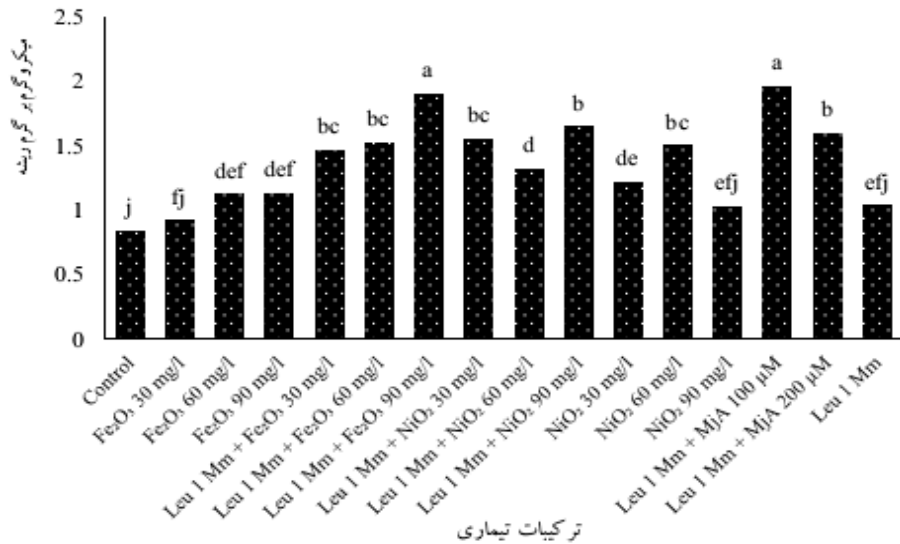
میزان پروتئین کل: محتوای پروتئین کل ریشه‌های مویین به‌طور معناداری تحت تأثیر تیمارهای محرک و اثر متقابل تیمار محرک و دوره‌های زمانی پس از اعمال تیمار قرار گرفت. تیمار ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید نیکل و تیمار ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید آهن با ۱ میلی‌مولار L-لوسین بیشترین میزان پروتئین کل را در مقایسه با

غلظت پرولین و تیمار شاهد کمترین غلظت پرولین را داشت (شکل ۷).

میکرومولار متیل‌جاسمونات و ۹۰ میلی‌گرم‌برلیتر نانوآکسید آهن با ۱ میلی‌مولار L-لوسین بیشترین



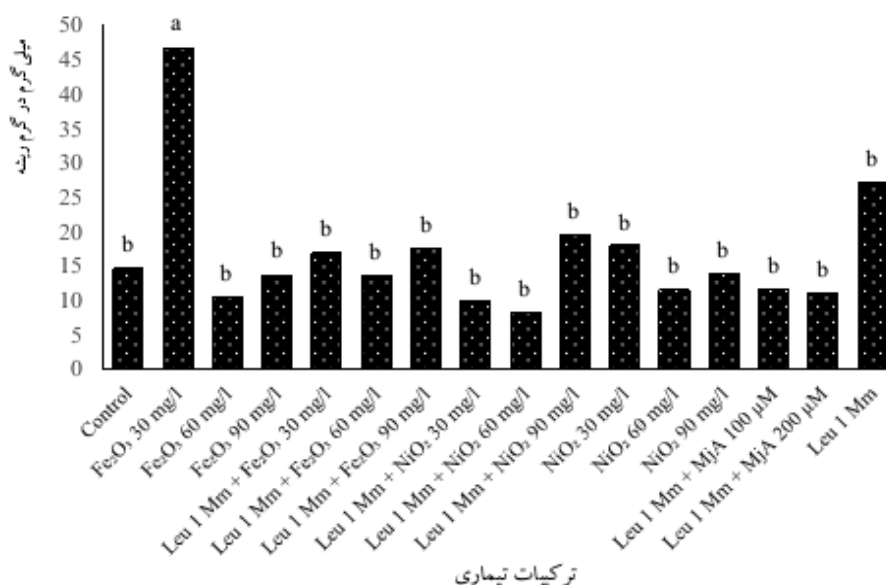
شکل ۶- تأثیر تیمارهای نانوآکسید آهن و نیکل و متیل‌جاسمونات و L-لوسین بر میزان پروتئین کل در کشت‌های ریشه‌مویین سنبل‌الطیب؛ Fe₂O₃: نانوآکسید آهن، NiO₂: نانوآکسید نیکل، MJA: متیل‌جاسمونات، Leu: آمینواسید L-لوسین. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیان‌کننده عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل ۷- تأثیر تیمارهای نانوذرات آهن و نیکل و متیل‌جاسمونات و L-لوسین بر میزان پرولین در کشت ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب؛ Fe₂O₃: نانوآکسید آهن، NiO₂: نانوآکسید نیکل، MJA: متیل‌جاسمونات، L-Lucine: آمینواسید L-لوسین. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیان‌کننده عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۵ درصد است.

و کمترین میزان فلاونوئید کل به ترتیب با اعمال غلظت‌های ۳۰ میلی‌گرم برلیتر نانو اکسید آهن و ۶۰ میلی‌گرم برلیتر نانو اکسید نیکل همراه با ۱ میلی‌مولار L-لوسین به دست آمد (شکل ۸).

میزان فلاونوئید کل: مقدار فلاونوئیدها در ریشه‌های مویین به طور معناداری تحت تأثیر تیمارهای محرک و اثر متقابل تیمار محرک و زمان پس از اعمال تیمار قرار گرفت؛ به طوری که بیشترین



شکل ۸- تأثیر تیمارهای نانوذرات آهن و نیکل و متیل جاسمونات و L-لوسین بر میزان فلاونوئید در کشت ریشه‌های مویین سنبل الطیب؛ Fe₂O₃: نانو اکسید آهن، NiO₂: نانو اکسید نیکل، MjA: متیل جاسمونات، L-Lucine: آمینواسید L-لوسین. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیان‌کننده عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۵ درصد است.

داد RNAهای استخراج‌شده کیفیت خوبی دارند؛ به طوری که RNAهای بدون خردشدگی، بدون آلودگی و باندهای 28S و 18S مشاهده شدند. همان‌طور که شکل ۹ نشان می‌دهد وجود باندهای مربوط به rRNAهای 28S و 18S، وجود یکدستی در RNAهای استخراج‌شده را به وضوح نشان می‌دهند. نوار (باند) بالاتر از 28s rRNA احتمالاً بیان‌کننده وجود آلودگی DNA در RNA استخراج‌شده است؛ بنابراین، پیش از سنتز cDNA از تیمار آنزیم DNase I استفاده شد. بر اساس نتایج نانودراپ نیز جذب نوری در ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر،

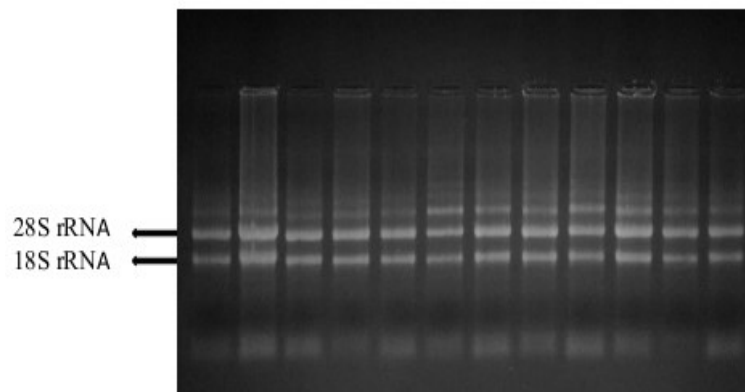
ارزیابی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سزکوئی‌ترپنوئیدها

استخراج RNA و تعیین کیفیت و کمیت آن:

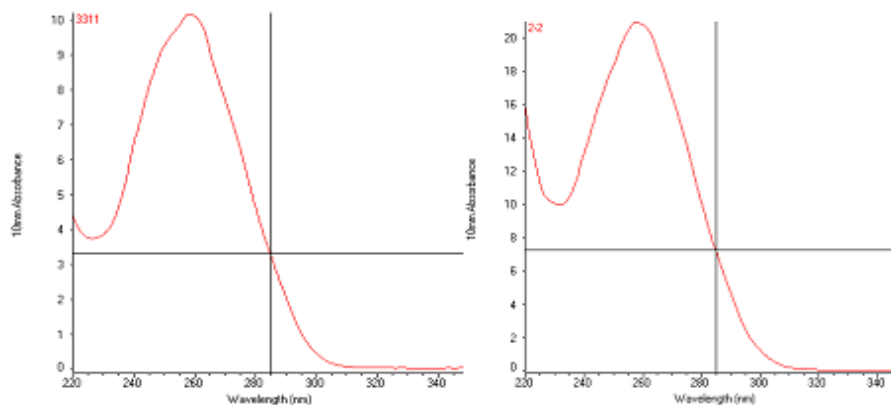
استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن در تیمارهای شاهد، نانو اکسید آهن (۶۰ میلی‌گرم برلیتر)، نانو اکسید نیکل (۶۰ میلی‌گرم برلیتر)، نانو اکسید نیکل (۶۰ میلی‌گرم برلیتر) به اضافه L-لوسین و متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) به اضافه آمینواسید L-لوسین ارزیابی انجام شد. ارزیابی کیفی و کمی RNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و نانودراپ نشان

محدوده ۱/۸ تا ۲ قرار داشت که وجودناشتن آلودگی پروتئینی یا فنلی در نمونه‌های RNA را نشان می‌دهد.

حداقل و در طول موج ۲۶۰ نانومتر، حداکثر بود که نشان‌دهنده خلوص مناسب RNA استخراج‌شده است (شکل ۱۰)؛ علاوه‌براین، نسبت ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ در نمونه‌های RNA استخراج‌شده در



شکل ۹- ارزیابی کیفیت استخراج RNA به‌ویژه از نظر وجودناشتن خردشدگی در RNA از طریق الکتروفورز ژل آگارز ادرصد



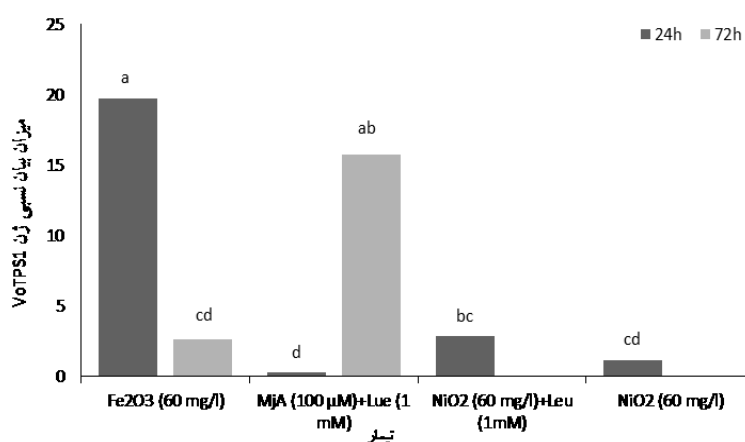
شکل ۱۰- منحنی جذب نوری دو نمونه از RNA استخراج‌شده در طول موج‌های مختلف

افزایش تدریجی دما در انتهای واکنش به‌منظور ترسیم منحنی‌های نقطه ذوب اجرا شد. تحلیل منحنی ذوب (Melting Curve Analysis)، تکثیر اختصاصی هر یک از ژن‌ها با نقطه ذوب مشخص را نشان داد. با توجه به وجود یک پیک در تمام محصولات PCR ژن‌های *VoTPS1*، *VoTPS6* و *18S rRNA* می‌توان گفت تکثیر تمام قطعه‌ها به‌طور اختصاصی و بدون محصولات غیراختصاصی مانند آغازگر دایمر انجام شده است.

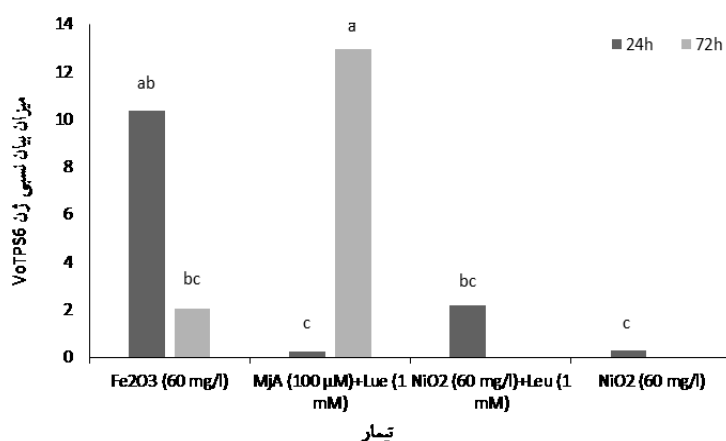
واکنش PCR در زمان واقعی: با توجه به نمودارهای تکثیر به‌دست آمده از واکنش PCR در زمان واقعی می‌توان نتیجه گرفت آغازگرها در دمای اتصال تعیین شده به‌شکل مناسبی به قطعه‌های هدف اتصال یافته‌اند و موجب تکثیر آنها شده‌اند. تکثیر هر قطعه الگو طی چهار فاز خط پایه، نمایی، خطی و کفه رخ داده است. به‌منظور اطمینان یافتن از وجودناشتن محصولات غیراختصاصی طی واکنش، یک مرحله

بیان نسبی ژن *VoTPS1* را نسبت به شاهد نشان دادند که به‌طور معناداری بیشتر از سایر تیمارها بود؛ کمترین میزان بیان نسبی این ژن در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسونات به اضافه ۱ میلی‌مولار L-لوسین در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد.

تأثیر تیمارهای محرک بر بیان نسبی ژن‌های *VoTPS1* و *VoTPS6*: اختلاف معناداری بین محرک‌های مختلف از نظر میزان بیان نسبی ژن‌های *VoTPS1* و *VoTPS6* وجود داشت. با توجه به شکل ۱۱، تیمار ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید آهن در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار و تیمار متیل‌جاسونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در زمان ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار بیشترین میزان افزایش



شکل ۱۱- تأثیر تیمارهای محرک بر بیان نسبی ژن *VoTPS1* در کشت‌های ریشه‌مویین سنبل‌الطیب؛ Fe_2O_3 ، نانو اکسید آهن، NiO_2 ، نانو اکسید نیکل، MjA، متیل‌جاسونات، L-Lucine، آمینو اسید L-لوسین. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار است. حروف یکسان بیان‌کننده عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل ۱۲- تأثیر تیمارهای محرک بر بیان نسبی ژن *VoTPS6* در کشت‌های ریشه‌مویین سنبل‌الطیب؛ Fe_2O_3 ، نانو اکسید آهن، NiO_2 ، نانو اکسید نیکل، MjA، متیل‌جاسونات، L-Lucine، آمینو اسید L-لوسین. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار است. حروف یکسان بیان‌کننده عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۵ درصد است.

(Christy and Braun, 2005). در مطالعه حاضر بر اساس پژوهش‌های قبلی (Soltani, 2015)، تراریختی ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ گیاه سنبل‌الطیب و ایجاد ریشه‌های مویین با *Agrobacterium rhizogenes* سویه A4 انجام شد. بررسی ماهیت تراریختگی آنها به روش PCR انجام شد و تکثیر قطعه مربوط به ژن *rol B* بیان‌کننده تراریخته شدن گیاه مدنظر توسط *Agrobacterium rhizogenes* سویه A4 بود. Khelifi و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی‌های خود گزارش کردند در بین سویه‌های مختلف *Agrobacterium* سویه A4 بیشترین درصد تراریختگی را در گیاه *Datura innoxia* ایجاد می‌کند؛ همچنین در مطالعه‌ای، تلقیح ریزنمونه‌های مختلف با سه سویه A7، A4 و 9435 نشان داده است سویه A4 و ریزنمونه برگ مناسب‌ترین سویه باکتریایی و ریزنمونه گیاهی به‌منظور القای ریشه‌های مویین در گیاه گل‌مکزیکی (*Agastache foeniculum*) هستند (Norouzi, 2013).

زمانی که گیاه با تنش‌های محیطی مواجه شود، مسیر اصلی انتقال الکترون مسدود می‌شود و انتقال الکترون در مسیر فرعی جریان می‌یابد و سبب احیای ناقص اکسیژن و تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) می‌شود. طی تیمار با محرک‌ها، گیاهان مقدار بیشتری ROS تولید می‌کنند که سبب ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (Andrea and Ricardo, 2007). گیاهان با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز از خود در برابر تنش دفاع می‌کنند. گزارش شده است تنش‌های محیطی سبب افزایش یا کاهش

باتوجه به شکل ۱۲، بیشترین میزان بیان نسبی ژن *VoTPS6* در ریشه‌های مویین تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به همراه ۱ میلی‌مولار L-لوسین در زمان ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار و تیمار نانوآکسید آهن در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار مشاهده شد؛ به طوری که میزان بیان نسبی ژن *VoTPS6*، ۱۰/۹۴ تا ۱۲ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت. کمترین میزان بیان نسبی ژن نسبت به شاهد در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به همراه ۱ میلی‌مولار L-لوسین در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار و تیمار نانوآکسید نیکل مشاهده شد. در بین محرک‌های نانوآکسید آهن و نیکل، نانوآکسید آهن در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار و نانوآکسید نیکل به همراه L-لوسین در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار به ترتیب ۱۰/۳۸ و ۲/۱۶ برابر افزایش بیان نسبی ژن را نسبت به شاهد نشان دادند.

بحث

طی سال‌های اخیر، کشت ریشه‌های مویین برای مطالعه مسیر بیوسنتز متابولیت‌ها کمک درخور توجهی به بهبود و تقویت پژوهش در زمینه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه کرده است. باکتری *Agrobacterium rhizogenes* با انتقال قطعه T-DNA حاوی ژن‌های القاکننده ریشه (*Rol A*)، *rol B*، *rol C* و *rol D* به سلول‌های گیاهی، آنها را تراریخت می‌کند؛ این ژن‌ها تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی چشمگیری را در سلول‌ها ایجاد می‌کنند، فرایندهای رشد و نمو سلول را تغییر می‌دهند و به القای ریشه‌زایی مویین منجر می‌شوند

همین امر به افزایش حساسیت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌انجامد. کاتالاز یکی از آنزیم‌هایی است که در فرایند سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد شرکت دارد و پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز برای غلبه بر افزایش پراکسید هیدروژن است که به سیستم مهارکننده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) برای خنثی کردن آثار نامطلوب آن در پایداری غشای سلولی نیاز دارد. در اعمال تیمارهایی نظیر متیل‌جاسمونات، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوای زیاد آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی برای تحمل گیاه به تنش بسیار مهم است تا گیاه را از آثار مضر آنها در امان نگه دارد (Cacmak, 2000; Nasibi, 2010).

در ارزیابی فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز، نانوآکسید نیکل در غلظت ۳۰ میلی‌گرم برلیتر به‌طور ترکیبی با ۱ میلی‌مولار L-لوسین و متیل‌جاسمونات در غلظت ۲۰۰ میکرومولار با ۱ میلی‌مولار L-لوسین و نانوآکسید آهن با غلظت ۳۰ میلی‌گرم برلیتر سبب افزایش فعالیت آنزیم شد (شکل ۵). Sinha و Saxena (۲۰۰۶) با بررسی اثر تیمار آهن روی نوعی گیاه دارویی به نام *Bacopa monnieri* دریافتند با کاربرد آهن، فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه، افزایش و در برگ، کاهش یافت. گایاکول‌پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی نظیر گایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه آب‌اکسیژنه استفاده می‌کند و در سیتوسل، دیواره سلولی و واکوئل نیز دیده می‌شود. ترکیبات فنلی مانند گایاکول به‌عنوان دهنده الکترون به پراکسید هیدروژن عمل می‌کنند. مطالعه‌های گذشته

فعالیت آنزیم کاتالاز (بسته به شدت، مدت و نوع تنش) می‌شوند (Andrea and Ricardo, 2007). در پژوهش حاضر، تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در ترکیب با ۱ میلی‌مولار L-لوسین از بین ترکیبات تیماری مختلف، تأثیر بیشتری بر فعالیت آنزیم کاتالاز داشت و فعالیت این آنزیم را به‌طور معناداری در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد (شکل ۴). به نظر می‌رسد متیل‌جاسمونات تولید ROS را در گیاهان القا می‌کند؛ بنابراین، وجود دستگاه آنتی‌اکسیدانی مؤثر برای حفظ عملکردهای متابولیسمی در شرایط القا ضروریست تا از آسیب بیشتر جلوگیری شود. Nafie و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند در کشت سلول‌های سوسپانسیون خربزه، کاربرد تیمار متیل‌جاسمونات سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد می‌شود. گزارش شده است در میوه تمشک و توت‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات، قدرت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها افزایش می‌یابد (Ghasemnezhad and Javaherdashti, 2008). در بین تیمارهای نانوذرات، نانوآکسید نیکل با غلظت ۳۰ میلی‌گرم برلیتر به‌طور ترکیب با ۱ میلی‌مولار L-لوسین بیشترین تأثیر را بر فعالیت آنزیم کاتالاز داشت و فعالیت این آنزیم را در مقایسه با سایر تیمارهای نانوذرات و تیمار شاهد به‌طور معناداری افزایش داد (شکل ۴)؛ یکی از دلایل این امر را می‌توان حضور یون‌های فلزی همچون نیکل، آهن، روی، مس، منگنز و منیزیم به‌عنوان کوفاکتور در ساختمان بسیاری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دانست؛ همچنین در شرایط کمبود ریزمغذی‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاهش می‌یابد و

می‌رسد افزایش پرولین نسبت به شاهد از فعال‌سازی بیوسنتز و غیرفعال‌شدن مسیرهای تجزیه آن در طول تنش ناشی می‌شود؛ علاوه بر این، تبدیل برخی آمینواسیدها مانند اورنیتین، آرژنین و گلوتامین به پرولین در افزایش پرولین نقش دارد (Abdalla and El-khoshiban, 2007). در بین نانواکسیدهای آهن و نیکل، غلظت ۹۰ میلی گرم برلیتر نانواکسید آهن به همراه ۱ میلی مولار L-لوسین و غلظت ۹۰ میلی گرم برلیتر نانواکسید نیکل به همراه ۱ میلی مولار L-لوسین، میزان پرولین بیشتری را در نمونه‌ها القا کردند. تمام تیمارها به افزایش پرولین منجر شدند؛ بنابراین، به نظر می‌رسد این تیمارها به‌عنوان محرک سبب افزایش قدرت سیستم آنتی‌اکسیدانی و کاهش تنش اکسیداتیو می‌شوند و سنتز پرولین را افزایش می‌دهند (شکل ۷). پرولین نقش بسیار مهمی در حفاظت از سلول‌های گیاهی در برابر تنش‌های غیرزیستی دارد. برخی پژوهشگران بیان کرده‌اند تجمع پرولین در گیاهان عالی، واکنشی عمومی به تنش است و نقش اساسی در پایداری ساختارهای زیرسلولی (غشاها و پروتئین‌ها) و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش دارد (Sanchez *et al.*, 2003).

همان‌طور که شکل ۸ نشان می‌دهد بیشترین میزان فلاونوئید کل در ریشه‌های مویین سنبل‌الطیب با اعمال تیمار غلظت ۳۰ میلی گرم برلیتر نانواکسید آهن مشاهده می‌شود. کوچک بودن اندازه نانوذرات و سطح مقطع و واکنش‌پذیری زیاد آنها سبب افزایش جذب این ذرات توسط گیاه می‌شود. گزارش شده است کاربرد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) در گیاه مریم گلی

نشان داده‌اند واکنش آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتی به فلزات مبهم است و بین گونه‌های گیاهی و حتی بافت‌های مختلف یک گیاه متفاوت است (Mazhoudi *et al.*, 1997).

در ارزیابی میزان پروتئین کل، بیشترین میزان پروتئین ریشه‌های مویین در تیمار نانواکسید نیکل با غلظت ۶۰ میلی گرم برلیتر و نانواکسید آهن با غلظت‌های ۶۰ و ۹۰ میلی گرم برلیتر در ترکیب با ۱ میلی مولار L-لوسین مشاهده شد (شکل ۶). در غلظت ۹۰ میلی گرم برلیتر نانواکسید نیکل، کمترین مقدار پروتئین نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۶). علت کاهش میزان پروتئین در شرایط تنش ممکن است بازداشته شدن فعالیت آنزیم‌های نترات‌ردوکتاز، گلوتامین سنتتاز، گلوتامات سنتتاز باشد که حساسیت بیشتری به تنش دارند (Khan *et al.*, 2003). تیمار با نانوذرات در کشت سوسپانسیون گیاه *Artemisia absinthium*، افزایش تولید متابولیت ثانویه، محتوای فنلی کل، مقدار کل فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و محتوای کل پروتئین را در پی داشته است. این پژوهشگران افزایش میزان پروتئین کل را به تجمع پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به محرک نسبت داده‌اند که بسته به غلظت و اندازه محرک متفاوت است (Hussain *et al.*, 2017).

ارزیابی سطوح تیماری مختلف بر میزان پرولین ریشه‌های مویین نشان داد تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به همراه ۱ میلی مولار L-لوسین بیشترین غلظت پرولین و تیمار شاهد کمترین غلظت پرولین را در نمونه‌ها القا می‌کند (شکل ۷). به نظر

VoTPS1 و *VoTPS6* در ریشه‌های موین گیاه دارویی سنبل‌الطیب و تحت‌تأثیر محرک‌های مختلف به‌تنهایی یا در ترکیب با آمینواسید L-لوسین بررسی شد. نتایج بررسی اثر تیمارهای محرک بر افزایش بیان نسبی ژن‌های *VoTPS1* و *VoTPS6* نشان دادند با افزودن محرک به محیط‌کشت ریشه‌موین، میزان بیان نسبی این ژن‌ها افزایش می‌یابد (شکل‌های ۱۱ و ۱۲). بیشترین افزایش بیان نسبی ژن *VoTPS1* نسبت به شاهد در غلظت ۶۰ میلی‌گرم برلیتر نانوآکسید آهن در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد؛ به‌طوری‌که میزان بیان نسبی این ژن ۱۹/۷۴ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت (شکل ۱۱). این نتایج نشان دادند تیمار نانوآکسید آهن می‌تواند سطح رونوشت ژن *VoTPS1* را که در مسیر بیوستنز والرنیک‌اسید نقش دارد، به میزان درخور توجهی در ریشه‌های موین افزایش دهد. به نظر می‌رسد اندازه کوچک و سطح مقطع زیاد نانوذرات، نفوذپذیری آنها به درون سلول‌ها را تسهیل می‌کند و واکنش‌پذیری زیاد این ذرات سبب پاسخ فیزیولوژیکی مانند تغییر بیان ژن‌ها در سلول‌های گیاهی می‌شود. فلزاتی مانند آهن، نیکل، کبالت و نقره سبب تحریک تولید دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند. در گزارش دیگری مشخص شده است فلزاتی مانند Fe^{2+} ، Ni^{2+} ، Co^{2+} و Ag^{2+} تولید گسترده‌تری از متابولیت‌های ثانویه را در گونه‌های مختلف گیاهان تحریک می‌کنند (Zhao et al., 2005).

همان‌طور که در شکل ۱۲ مشاهده می‌شود بیشترین میزان بیان نسبی ژن *VoTPS6* در تیمار ۱۰۰

(*Salvia officinalis*) سبب افزایش محتوای فنل و فلاونوئید کل می‌شود (Ghorbanpour et al., 2014)؛ به‌طوری‌که غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم برلیتر از این نانوذره فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری در مقایسه با سایر غلظت‌ها نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده است نانوذرات اکسیدمس (CuO) و اکسیدروی (ZnO) بر محتوای متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی در گیاه شیرین‌بیان اثر مثبت دارند (Mazhoudi et al., 1997). فلاونوئیدها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که همانند سایر ترکیبات فنولی توانایی جذب رادیکال‌های آزاد را دارند. در تنش‌های اکسیداتیو، ترکیبات فنلی به‌ویژه فلاونوئیدها می‌توانند با فسفولیپیدهای غشا از طریق پیوند هیدروژنی با سرهای قطبی فسفولیپیدها ارتباط برقرار کنند؛ در نتیجه، این ترکیبات در سطح داخل و خارج غشا تجمع می‌یابند و با جلوگیری از دستیابی مولکول‌های آسیب‌رسان به ناحیه هیدروفوبی دوقطبی به حفظ سیالیت و تمامیت غشا کمک می‌کنند (Michalak, 2006).

دست‌ورزی ژنتیکی در راستای افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهی یکی از روش‌های مهم و کاربردی در عصر جدید است که در این زمینه، شناسایی و دست‌کاری ژنتیکی ژن‌های مؤثر در سنتز متابولیت‌های ثانویه مانند سزکوئی‌ترپنوئیدها ارزش زیادی دارد؛ بنابراین، اولین گام برای به‌کارگیری روش مهندسی ژنتیک و افزایش بیان نسبی ژن‌ها در مسیر بیوستنزی، مطالعه بیان ژن‌ها به‌ویژه ژن‌های کلیدی در مسیر بیوستنزی متابولیت‌های ثانویه است و در این راستا، بیان نسبی دو ژن

زمان‌های مناسب می‌توان بیان نسبی ژن‌های مؤثر در مسیر بیوستنز ترکیبات ثانویه و در نهایت، تولید آنها را افزایش داد.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، استفاده از متیل‌جاسمونات، آمینوآسید L-لوسین و نانوآکسیدهای آهن و نیکل سبب القای تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل مقابله‌کننده با تنش شد و در نهایت، این عوامل توانستند سبب کاهش آثار تخریبی تنش در گیاه شوند؛ همچنین بیان نسبی ژن‌های *VOTPS1* و *VOTPS6* به‌عنوان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوستنز سزکوئی‌ترین‌ها در سنبل‌الطیب تحت تأثیر محرک‌های یادشده قرار گرفت. بیان نسبی ژن *VOTPS1* در تیمار ترکیبی نانوآکسید آهن و ۱ میلی‌مولار L-لوسین بیشتر از سایر تیمارها بود؛ همچنین بیان نسبی ژن *VOTPS6* در تیمار ترکیبی متیل‌جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار و ۱ میلی‌مولار L-لوسین افزایش بیشتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد.

References

- Abdalla, M. M. and El-khoshiban, N. H. (2007) The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticium aestivum* cultivars. *Journal of Applied Sciences Research* 3(12): 2062-2074.
- Ahmadi Moghadam, Y., Piri, Kh., Bahramnejad, B. and Habibi, P. (2013) Methyl Jasmonate and Salicylic acid effects on the dopamine production in hairy root cultures of *portulaca oleracea* (Purslan). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences* 2(6): 89-94.

میکرومولار متیل‌جاسمونات به همراه ۱ میلی‌مولار L-لوسین در زمان ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار است؛ به طوری که میزان بیان نسبی ژن ۱۲/۹۴ برابر در مقایسه با شاهد افزایش می‌یابد. در بررسی بیان برخی از ژن‌های درگیر در بیوستنز آلکالوئید موروفین در کشت ریشه‌های موین گیاه *Papaver orientale* L. با استفاده از محرک‌های غیرزیستی نشان داده شده است بیان ژن‌های *SalR*، *Salsyn*، *SaLAT*، *T6ODM* و *CODM* تحت تأثیر متیل‌جاسمونات طی ۴۸ ساعت افزایش می‌یابد (Hashemi and Naghavi, 2016). در پژوهشی گزارش شده است بیان نسبی زیاد ژن‌های سزکوئی‌ترین‌سنتاز برنج با نام *OsTPS3* - β -(E) (*caryophyllene*) سبب تولید مقدار زیادی بتاکاریوفیلین پس از تیمار با متیل‌جاسمونات می‌شود (Cheng et al., 2007). در پژوهش حاضر، افزایش بیان نسبی *VoTPS6* در ریشه‌های موین سنبل‌الطیب پس از ۲۴ ساعت از اعمال تیمار نانوآکسید آهن مشاهده شد (شکل ۱۲). مطالعه Cheng و همکاران (۲۰۱۳) در ریشه موین *Salvia miltiorrhiza* نشان داده است بیان نسبی ژن *SmCPS* تحت تأثیر محرک‌های عصاره مخمر، متیل‌جاسمونات و یون فلز نقره به طور درخور توجهی افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند استفاده از محرک‌های خارجی در کشت‌های ریشه موین گیاه سنبل‌الطیب می‌تواند سبب فعال شدن واکنش‌های دفاعی در گیاه شود و در نتیجه، افزایش بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم ثانویه و احتمالاً افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه را در پی داشته باشد؛ بنابراین با انتخاب محرک‌های مناسب و اعمال آنها در

- Ahmadian Chashmi, N., Sharifi, M., Karimi, F. and Rahnama, H. (2010) Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of *Atropa belladonna* L. by salicylic acid treatments. *Iranian Journal of Plant Biology* 2: 63-76 (in Persian).
- Aminizadeh, M. A., Riahi, M. and Mohammadi, M. (2016) Nano-Metal oxides induced sulforaphane production and peroxidase activity in seedlings of *Lepidium draba*, *Brassicaceae*. *Progress in Biological Sciences* 6(1): 75-83.
- Andrea, V. and Ricardo, B. (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* 172: 861-875.
- Bates, C. J., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cacmak, I. (2000) Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist* 146: 185-205.
- Chen, T., Li, W., Hu, X., Guo, J., Liu, A. and Zhang, B. (2015) A cotton MYB transcription factor, GbMYB5, is positively involved in plant adaptive response to drought stress. *Plant and Cell Physiology* 56(5): 917-929.
- Cheng, C., Yang, M. H., We, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Cheng, A., Lou, Y., Mao, Y., Lu, S., Wang, L. and Chen, X. (2007) Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 179-186.
- Cheng, Q., He, Y., Li, G., Liu, Y., Gao, W. and Huang, L. (2013) Effects of combined elicitors on tanshinone metabolic profiling and SmCPS expression in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Molecules* 18: 7473-7485.
- Christey, M. C. and Braun, R. H. (2005) Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. In: *Methods in molecular biology*, vol. 286. *Transgenic plants: Methods and protocols* (Ed. Pena, L.) 47-60. Humana Press, New Jersey.
- Dini Torkamani, M. R., Jafari, M., Abbaspour, N., Heidari, R. and Safaie, N. (2014) Enhanced production of valeric acid in hairy root culture of *Valeriana officinalis* by elicitation. *Central European Journal of Biology* 9: 853-863.
- Farjaminezhad, R., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and Farjaminezhad, M. (2016) The Effect of L-tyrosine on Thebaine Production in Cell Suspension Culture of Iranian Poppy (*Papaver bracteatum*). *Journal of Medicinal Plants* 15(58): 110-119 (in Persian).
- Ghasemnezhad, M. and Javaherdashti, M. (2008) Effect of methyl jasmonate treatment on antioxidant capacity, internal quality and postharvest life of raspberry fruit. *Caspian Journal of Environmental Sciences* 6(1): 73-78.
- Ghorbanpour, M., Hatami, M. and Hatami, M. (2014) Activating antioxidant enzymes, hyoscyamine and scopolamine biosynthesis of *Hyoscyamus niger* L. plants with nano-sized titanium dioxide and bulk application. *Acta agriculturae Slovenica* 105(1): 23-32.
- Gopesh, C. S. and George, J. V. (2012) Evaluation of expression stability of candidate reference genes among green and yellow pea cultivars (*Pisum Sativum* L.) subjected to abiotic and biotic stress. *American Journal of Plant Sciences* 3: 235-242.
- Hashemi, S. and Naghavi, M. (2016) Production and gene expression of

- morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. *Plant Cell and Tissue Organ Culture* 125: 31-41.
- Hu, Z. B. and Du, M. (2006) Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology* 48(2): 121-127.
- Hussain, M. N., Raja, I., Mashwani, Z. U-R., Iqbal, M., Sabir, S. and Yasmeen, F. (2017) In vitro seed germination and biochemical profiling of *Artemisia absinthium* exposed to various metallic nanoparticles. *3 Biotech* 7(3): 101-109.
- Kabita, K. C., Sanatombi, K. and Sharma, S. K. (2020) Efficient enhancement of capsaicinoids biosynthesis in cell suspension cultures of *Capsicum chinense* Jacq. cv. 'Umorok' by elicitors and differential gene expression analysis of elicited cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 141: 145-154.
- Khan, W., Prithviraj, B. and Smith, D. L. (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Journal of Plant Physiology* 160: 485-492.
- Khelifi, L., Zarouri, B., Amdoun, R., Harfi, B., Morsli, A. and Khelifi-Slaoui, M. (2011) Effects of elicitation and permeabilization on hyoscyamine content in *Datura stramonium* hairy roots. *Advances in Environmental Biology* 5(2): 329-334.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M. H. and El Ferjani, E. (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Plant Science* 127(2): 129-137.
- Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(4): 523-530.
- Mulder-Krieger, T., Verpoorte, R., Svendsen, A. and Scheffer, J. (1988) Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 13: 85-114.
- Nafie, E., Hathout, T. and Al Mokadem, A. (2011) Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 23: 161-174.
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y. and Sakthi, K. (2010) Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179: 154-163.
- Nasibi, F. (2010) Effect of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on oxidative damages induced by drought stress in tomato plant. *Iranian Journal of Plant Biology* 9: 36-74 (in Persian).
- Norouzi, E. (2013) The effect of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots in Mexican Flower (*Agastache foeniculum*). MSc thesis, Urmia University, Urmia, Iran (in Persian).
- Omidbeigi, R. (2008) Production and processing of medicinal plants approaches. vol. 3, 5th edition, Astan Quds Publication, Tehran (in Persian).
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2001-2007.
- Pyle, B. W., Tran, H. T., Pickel, B., Haslam, T. M., Gao, Z., MacNevin, G., Vederas, J. C., Kim, S. U. and Ro, D. K. (2012) Enzymatic synthesis of valeren-4,7(11)-diene by a unique sesquiterpene synthase from the valerian plant (*Valeriana officinalis*). *The FEBS Journal* 279(17): 3136-3146.
- Saghai-Marouf, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. and Allard, R. (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81(24): 8014-8018.
- Sahu, L., Jena, S., Swain, S. S., Sahoo S.

- and Chand P. K. (2013) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of a multi-medicinal herb, *Boerhaavia diffusa* L.: optimization of the process and anti-microbial activity against bacterial pathogens causing urinary tract infections. *Frontiers in Life Science* 7: 3-4.
- Sanchez, F., de Andres, E. F., Tenorio, J. L. and Ayerbe, L. (2003) Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. *Field Crops Research* 86: 81-90.
- Sinha, S. and Saxena, R. (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidant and bacoside-A content in medicinal plant. *Chemosphere* 62: 134-135.
- Soltani, N. (2015) Effect of Elicitor on secondary metabolite production and enzymatic activity in *Valeriana officinalis* L. transformed hairy roots. MSc thesis, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (in Persian).
- Taherkhani, T., Asghari-Zakaria, R., Omidi, M. and Zare, N. (2019) Effect of ultrasonic waves on crocin and safranal content and expression of their controlling genes in suspension culture of saffron (*Crocus sativus* L.). *Natural Product Research* 33(4): 486-493.
- Yeo, Y.S., Nybo, S. E., Chittiboyina, A. G., Weerasooriya, A. D., Wang, H., Góngora-Castillo, E. and Chappell, J. (2012) Functional identification of valerena-1, 10-diene synthase, a terpene synthase catalyzing a unique chemical cascade in the biosynthesis of biologically active sesquiterpenes in *Valeriana officinalis*. *Journal of Biological Chemistry* 288(5): 3163-3173.
- Zare, N., Farjaminezhad, R., Asghari-Zakaria, R. and Farjaminezhad, M. (2014) Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding. *Natural Product Research* 28: 711-717.
- Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283-333.