تأثیر محرک‌های سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر بر بیان ژن‌های *HMGR* و *GPPS* دخیل در بیوسنتز ترپن‌ها در گیاه دارویی چویل در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی

سید مهران علوی مهریان[۱]، ناصر زارع[۲،*]، اسد معصومی اصل[۳]، پریسا شیخ‌زاده مصدق[٤] و رسول اصغری[٥]

۱- دانشجوی دکتری، گروه تولید و مهندسی ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲- دانشیار، گروه تولید و مهندسی ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج
٤- دانشیار، گروه تولید و مهندسی ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
٥- استاد، گروه تولید و مهندسی ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۲۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰٦/۰۲)

چکیده

چویل (*Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss) از گیاهان دارویی با ارزش و بومی ایران است که غنی از ترکیبات ترپنی بوده و به لحاظ داشتن خواص ضد میکروبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این تحقیق، تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر در کشت‌های سوسپانسیون سلولی چویل بر الگوی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز ترپن‌ها (*HMGR* و *GPPS*) برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت. کشت سوسپانسیون سلولی چویل با استفاده از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ انجام شد و محرک‌های اسید سالیسیلیک و عصاره مخمر (با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) در مرحله رشد فعال سوسپانسیون به محیط کشت اضافه گردید و ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از تیمار، نمونه سلولی تهیه گردید. از کشت‌های سلولی بدون اعمال تیمار محرک به‌عنوان شاهد استفاده شد. بررسی الگوی بیانی ژن‌های *HMGR* و *GPPS* با استفاده از Real-time PCR نشان داد که بیان هر دو ژن به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع و غلظت محرک و مدت‌زمان پس از تیمار قرار گرفت. بیان نسبی ژن‌های *HMGR* و *GPPS* با تیمار محرک‌های مورد بررسی نسبت به شاهد افزایش یافت، ولی افزایش میزان بیان نسبی این ژن‌ها در تیمار سالیسیلیک اسید به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار عصاره مخمر بود. بیشترین بیان نسبی ژن‌های *GPPS* و *HMGR* مربوط به تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ٢٤ ساعت پس از تیمار بود. با این حال، بیشترین بیان نسبی این ژن‌ها در زمان‌های ٢٤ و ٧٢ ساعت پس از تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر مشاهده شد. نتایج این مطالعه می‌تواند در زمینه مهندسی متابولیت گیاه چویل مورد بهره‌گیری و استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ترپنوئیدها، کشت‌سلولی، گیاه دارویی، محرک، Real-time PCR

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **nzare@uma.ac.ir**

مقدمه

در طول تکامل، گیاهان همواره مکانیسم‌هایی را به‌منظور مقابله و سازگاری با انواع تنش‌های زنده و غیرزنده کسب کرده‌اند. ماهیت سلول یا سلول‌ها در بافت‌ها به‌قدری پیچیده است که با هر محرکی از محیط، فرآیندهای پیچیده از مسیرهای سیگنالی که دارای اثرات متقابل یا هماهنگ هستند، فعال می‌شوند. این اثرات متقابل احتمالاً به نحوی تکامل یافته‌اند که موجود زنده را با کم‌ترین و مناسب‌ترین مسیر زیستی قادر به واکنش کنند (Vasconsuelo and Boland, 2007).

محرک‌ها (Elicitors) ترکیباتی با منشأ زیستی و یا غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao *et al.*, 2005). محرک‌های زیستی شامل پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ‌ها، سلولز و پکتین گیاهان و میکروارگانیسم‌ها (کیتین و گلوکان) می‌باشد (Vasconsuelo and Boland, 2007). بر اساس ماهیت، محرک‌های غیرزیستی منشأ زیستی نداشته و به دو گروه عوامل فیزیکی و ترکیبات شیمیایی تقسیم می‌شوند. این ترکیبات را می‌توان بر اساس تأثیر متقابل گیاه–محرک هم به دو گروه محرک‌های عمومی و محرک‌های ویژه نژادی طبقه‌بندی کرد (Vasconsuelo and Boland, 2007). محرک‌های زیستی و غیرزیستی با تحریک و فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی از جمله مسیرهای بیوسنتزی ثانویه، باعث افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه و کاهش زمان دست‌یابی به غلظت بالای این محصولات در سلول‌های گیاهی می‌شوند (Zhao *et al.*, 2005). مولکول‌های علامت‌رسان در برخی از سیستم‌های انتقال پیام، منجر به القای فعالیت ژن‌های ویژه‌ای می‌شوند که واکنش‌های بیوسنتزی مربوط به تولید ترکیبات دفاعی را کاتالیز می‌کنند. این مولکول‌های علامت‌رسان، وقتی به‌طور خارجی به‌کار برده شوند نیز با روشی معین باعث تحریک بیان ژن‌های درگیر در سیستم‌های دفاعی گیاه می‌شوند (Kozlowski *et al.*, 1999). سالیسیلیک اسید یک مولکول مؤثر است که موجب ایجاد مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهان می‌شود. تأثیر سالیسیلیک اسید وابسته به غلظت، نوع گیاه و مرحله نموی آن است (Zare *et al.*, 2014). کاربرد سالیسیلیک اسید به‌عنوان محرک در گیاه *Panax ginseng* افزایش قابل‌توجه میزان فلاونوئیدها را به همراه داشت (Ali *et al.*, 2007). نشان داده شده که میزان آنتوسیانین در هویج تحت تأثیر ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در طول ۹ روز اول کاهش یافته ولی در طول یک دوره زمانی ۲۱ روزه افزایش یافته است (Sudha and Ravishankar, 2003).

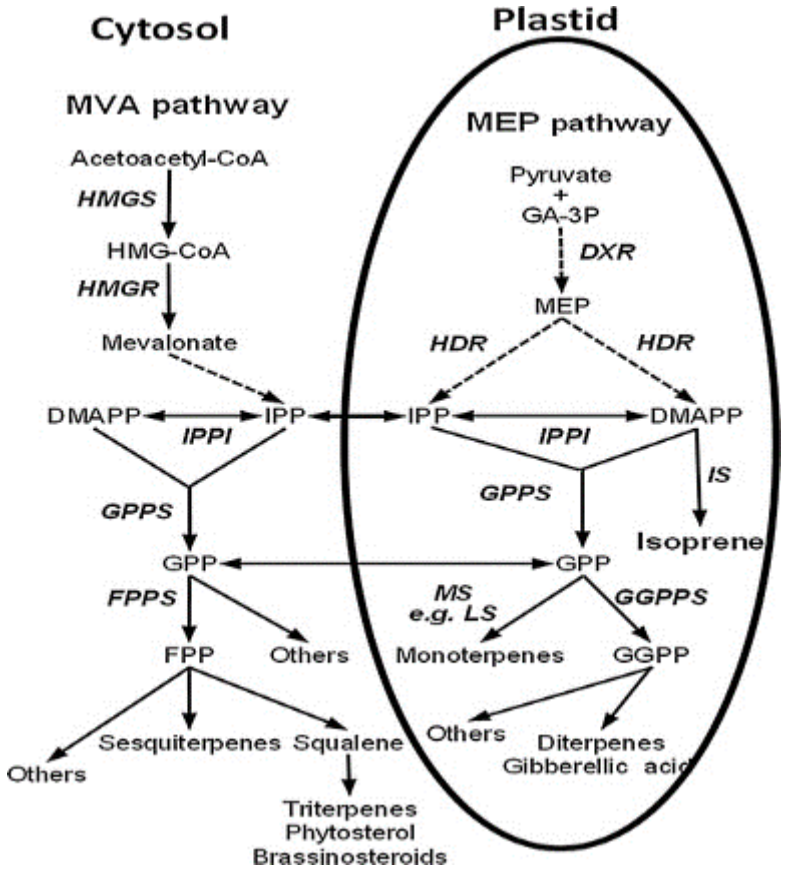
عصاره مخمر که از مخمر ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisia*) تهیه می‌گردد به‌عنوان یک محرک زنده شناخته می‌شود (Hakobyan *et al.*, 2012). از اثرات شناخته شده عصاره مخمر، ایجاد تنش در گیاهان و تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد. به‌طوری‌که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در اثر تیمار گیاهچه‌های سویا (*Glycine max*) با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است (Arastehfar *et al.*, 2013).

گیاه چویل با نام علمی *Ferulago angulata* (*Schlecht*) Boiss متعلق به خانواده Apiaceae می‌باشد. این جنس دارای ۳۵ گونه در سراسر دنیا می‌باشد که هفت گونه‌ی آن در ایران رویش دارد. این گیاه که بومی ایران و خاص منطقه غرب ایران است، گیاهی پایا، به ارتفاع ۱۶۰–۵۰ سانتی‌متر و موسم گل‌دهی آن خرداد تا تیرماه است (Mozaferian, 1983). اسانس این گیاه دارای خواص ضدعفونی کننده، ضدمیکربی و تسکین‌دهنده بوده و همچنین دارای تأثیرات حفاظتی و نگهدارنده مواد غذایی می‌باشد. علاوه‌بر این، این گیاه در درمان بیماری‌های گوارشی و کرم‌های روده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Taran *et al.*, 2010; Alavi *et al.*, 2019). همچنین به‌علت عطر خوشایند، قابلیت استفاده در صنایع عطرسازی را داراست و از گل‌های باز شده و برگ‌های جوان آن برای خوش‌بو و خوش‌طعم کردن دوغ، ماست و کره استفاده می‌شود. به‌طوری که از دیرباز به‌صورت سنتی با افزودن به مواد لبنی به‌خصوص روغن، با ایجاد طعم بسیار مطبوع، از فاسد شدن آن

جلوگیری و با قرار دادن آن در لابه‌لای گوشت برای مدتی آن را نگهداری می‌کرده‌اند؛ اما علوفه آن برای دام خوش‌خوراک نیست. اسانس گیاه چویل حاوی ترپن‌های متنوع می‌باشد (Golfakhrabadi *et al*., 2015).

ترپن‌ها بزرگ‌ترین گروه متابولیت ثانویه در گیاهان را شامل می‌شوند. این ترکیبات نقش مهمی را در ساختار غشاء، واکنش‌های اکسایشی، بازدارندگی نوری و حفاظت نوری، تنظیم رشد و نمو گیاهان و همچنین حفاظت گیاهان در برابر آفات و بیماری‌ها و جلب حشرات گرده‌افشان ایفا می‌کنند. ویژگی‌های منحصربه‌فرد ترپن‌ها شامل فعالیت‌های حشره‌کشی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدباکتریایی است (Wasternack and Parthier, 1997). مونوترپن‌ها گروه بزرگی از ترپنوئیدها هستند که از سلول‌های گیاهان تک‌لپه، دولپه، قارچ‌ها و جلبک‌ها ترشح می‌شوند و مثل همه ترپن‌های دیگر از ایزوپنتنیل‌دی‌فسفات (IPP) و ایزومر آن دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (DMAPP) منشأ می‌گیرند (Holopainen and Gershenzon, 2010). مونوترپن‌ها از اجزای اصلی اسانس می‌باشند که دارای خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌توموری می‌باشند. تری‌ترپنوئیدها علاوه‌بر اهمیت زیاد در داروسازی در تولید لوازم آرایشی و بهداشتی به کار می‌روند و به‌خاطر خواص ضدسرطانی، در رژیم غذایی انسان و دام اهمیت بالایی دارند (Irmler *et al*., 2000).

در گیاهان، مسیر MEP (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) در پلاستیدها و مسیر MVM (Mevalonic acid) در سیتوزول مسئول بیوسنتز ترپن‌ها می‌باشند که تولید پیش‌ماده‌های عمومی ترپن‌ها یعنی ایزوپنتیل‌دی‌فسفات (IDP) و دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات (DMADP) می‌کنند (Rohmer *et al*., 2003).



شکل ۱– مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها در سلول‌های گیاهی شامل مسیر MVA و مسیر MEP به‌ترتیب در سیتوزول و پلاستید (Aharoni *et al*., 2006).

Figure 1. The biosynthesis pathway of terpenes in plant cells, including the MVA pathway and the MEP pathway in the cytosol and plastid, respectively (Aharoni *et al*., 2006).

مسیر MVA به‌وسیله تلفیق شدن استیل کوآنزیم A به ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوتاریل کوآنزیم A توسط آنزیم 3-hydroxy- glutaryl-coenzyme A reductase) *HMGR*) صورت می‌پذیرد (Aharoni *et al*., 2006). در گیاهان آنزیم ۳-هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم A، ماده ۳-هیدروکسی متیل و ۳-متیل گلوتاریل کوآنزیم A (*HMGR*) را با استفاده از دو مولکول NADPH به موالونیک اسید تبدیل می‌کند (موالونیک اسید اولین حد واسط اختصاصی مسیر بیوسنتزی MVA می‌باشد). مسیر MEP کلروپلاستی با عمل آنزیم ۱-دئوکسی زیلولوز ۵-فسفات‌سنتاز آغاز می‌گردد. این آنزیم ماده ۱-دئوکسی زیلولوز ۵-فسفات (DXP) را با یک واکنش تراکمی بین دو پیش‌ساز گلیسرآلدئید فسفات و پیرووات، سنتز می‌کند (Rohmer, 2003). آنزیم بعدی که با عمل بر روی DXP تولید ۲-c-متیل اریتریتول ٤-فسفات (MEP) می‌کند، آنزیم DXP ردوکتاز ایزومراز است که آخرین آنزیم در مسیر تولید MEP می‌باشد. پس از تولید MEP چند مرحله آنزیمی پیاپی دیگر تا تولید IPP وجود دارد (شکل ۱) (Aharoni *et al*., 2006).

ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز (*GPPS*) یکی از مهم‌ترین ژن‌های مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها است. محصول این ژن، آنزیم ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز است که منجر به اتصال دو مولکول ۵ کربنه دی‌متیل آلیل دی‌فسفات (DMAPP) و ایزوپنتیل دی‌فسفات (IPP) به یکدیگر می‌شود و ژرانیل دی فسفات (GPP) ۱۰ کربنه را تشکیل می‌دهند که پیش‌ساز ترپن‌ها است (شکل ۱) (Tholl, 2006).

کشت سوسپانسیون سلولی، تعلیقی از سلول‌های در حال رشد و تقسیم سریع می‌باشد که در محیط مایع کشت و در پاسخ به دست‌ورزی‌های آزمایشگاهی از انعطاف‌پذیری بیشتری برخوردارند. کشت‌های سوسپانسیون سلولی اغلب از مخلوطی از توده‌های سلولی و نیز سلول‌های منفرد پراکنده تشکیل شده‌اند. با این وجود از طریق چندین نسل گزینش می‌توان یک کشت تعلیق سلولی متشکل از تک‌سلول‌ها و توده‌های سلولی کوچک را ایجاد و نگهداری کرد (Farjaminezhad *et al*., 2014). در کشت سلولی، رشد و ریخت‌زایی به‌وسیله نوع و غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و برهمکنش آن‌ها کنترل می‌شود. سیتوکینین‌ها به‌طور مستقیم روی چرخه سلولی اثر گذاشته و در تنظیم تولید پروتئین‌های دخیل در تشکیل و عملکرد رشته‌های دوک نقش دارند. اکسین‌ها نیز از طریق افزایش انبساط‌پذیری دیواره سلول و تحریک رونویسی mRNAهای رمزکننده پروتئین‌های درگیر با رشد سلول، در چرخه سلولی تأثیر می‌گذارند (Richard *et al*., 2002).

با توجه به این‌که گیاه چویل غنی از ترکیبات ترپنی می‌باشد و ژن‌های *HMGR* و *GPPS* دو ژن کلیدی در تولید انواع متنوعی از ترکیبات ترپنی می‌باشند؛ لذا تأثیر محرک‌های سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی گیاه چویل بر میزان بیان ژن‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد روش‌ها

بذور *F. angulata* از ارتفاعات دنا (طول جغرافیایی ″٤٢، ′٤١، °٥١ شرقی، عرض جغرافیایی ″٤٩، ′٤٠، °٣٠ شمالی و ارتفاع ٢٨٤٣ متر از دریا) جمع‌آوری شد. با توجه به وجود خواب فیزیولوژیک بذر در این گیاه، برای به‌دست آوردن گیاهچه‌های درون شیشه‌ای از جداسازی و کشت درون شیشه‌ای جنین استفاده شد. به‌منظور تولید کالوس، ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه از گیاهچه‌های حاصل از کشت جنین، تهیه و روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA کشت گردید (Alavi *et al*., 2019). برای تهیه محیط کشت سوسپانسیون سلولی، کالوس‌های تولید شده به محیط کشت MS مایع حاوی غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) از تنظیم‌کننده‌های NAA و BAP، انتقال و روی شیکر انکوباتور با ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. زیرکشت (Subculture) سلول‌ها هر ١٤ روز یک‌بار انجام گردید.

به‌منظور بررسی میزان رشد سلول‌ها در کشت سوسپانسیون، از شاخص‌های PCV (Packed Cell Volume) و SCV (Settled Cell Volume) استفاده شد. برای رسم منحنی رشد سلولی، هر سه روز یک‌بار از سوسپانسیون سلولی نمونه‌برداری انجام و شاخص‌های PCV و SCV اندازه‌گیری شد. پس از استقرار و تکثیر سلولی، محرک‌های اسید سالیسیلیک و عصاره مخمر (هرکدام در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) در مرحله رشد فعال سوسپانسیون سلولی (اواخر مرحله رشد نمایی که تراکم سلولی حداکثر بود) به‌صورت جداگانه به محیط کشت اضافه گردید. از کشت‌های سلولی بدون اعمال تیمار محرک به‌عنوان شاهد استفاده شد. برداشت نمونه سلولی در زمان‌های ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت پس از تیمار (به‌عنوان عامل دوم مورد بررسی) انجام گرفت. استخراج RNA از کشت‌های سلولی چویل طبق روش وانگ و گابریل (Wang and Ghabrial, 2002) انجام گرفت. به‌منظور حذف آلودگی احتمالی به DNA از آنزیم DNase I (سیناکلون) استفاده شد. جهت سنتز cDNA از کیت cDNA Synthesis Kit YT4500، طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد.

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز ترپنوئیدها، آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های *GPPS*، *HMGR* و ژن خانه‌دار *GAPDH* از شرکت Microsynth AG در سوئیس (www.microsynth.ch) تهیه شدند (جدول ۱). واکنش Real-time RT-PCR با استفاده از دستگاه Biorad مدل c1000 touch و کیت RealQ Plus 2x Master Mix Green (تهیه شده از شرکت کهن ژن کوثر) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (جدول ۲ و جدول ۳). سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان نسبی ژن‌ها محاسبه گردید (Livak and Schmittgen, 2001).

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در بررسی بیان ژن در کشت سوسپانسیون سلولی چویل

Table 1. Sequence of primers used for gene expression analysis in cell suspension culture of *F. angulata*

ژن Gene	نام آغازگر Primer Name	توالی آغازگر Primer Sequences	دمای ذوب TM ℃
GPPS	*GPPS*-F	5'-ACCCAAATCGGTCCGTGATGGT-3'	64.2
	GPPS-R	5'-GCAAGCAAGCTAACGACCTCTGT-3'	64.6
HMGR	*HMGR*-F	5'-CTTCCATAGAGGTTGGCACAGTTG-3'	65.2
	HMGR-R	5'-GAGCGTTTGAGCCTGGTGATTC-3'	64.2
GAPDH	*GAPDH*-F	5'-GTTGACTTGACTGTGAGACTTGAG-3'	63.6
	GAPDH-R	5-'CCTTGAGGTTGCCTTCGGATTC-3'	64.2

جدول ۲- ترکیبات مورد استفاده در واکنش Real-time PCR برای تکثیر ژن‌ها

Table 2. Compounds used in real-time PCR reaction for gene amplification

ترکیبات Component	حجم (µL) Volume (µL)	غلظت نهایی Final concentration
RealQ Plus 2x Master Mix Green	12.5	1X
cDNA	2	100 ng/µL
Forward Primer (10 μM) آغازگر رفت	0.5	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM) آغازگر برگشت	0.5	0.2 μM
آب مخصوص PCR PCR-grade H2O	9.5	-
حجم نهایی Total volume	25	

جدول ۳- چرخه حرارتی استفاده شده در واکنش Real-time PCR برای تکثیر

Table 3.Thermal cycle used in real-time PCR reaction for amplification

مرحله واکنش Reaction stage	تعداد چرخه Number of cycles	دما (°C) Temperature (°C)	زمان Time
واسرشت‌سازی اولیه Initial Denaturation	1	94°C	7 min
واسرشت‌سازی Denaturation	40	94°C	30 s
اتصال Annealing	40	57°C	30 s
بسط Extention	40	72°C	30 s

آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با فاکتورهای غلظت محرک (در ۷ سطح شامل ۳ غلظت اسید سالیسیلیک، ۳ غلظت عصاره مخمر و شاهد) و زمان نمونه‌گیری (در ۳ سطح) با سه تکرار انجام گرفت. علاوه‌بر این، در واکنش Real-time RT-PCR از سه تکرار تکنیکی و سه تکرار زیستی نیز استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 صورت گرفت و نمودارها با استفاده از Excel 2010 رسم گردید. همچنین مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

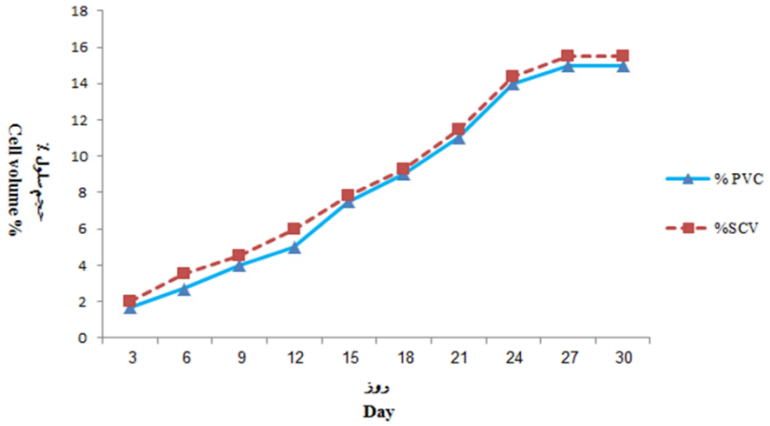
نتایج و بحث

در این تحقیق از محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP برای کالوس‌زایی و تولید کالوس از ریزنمونه برگ چویل (*F. angulata*) استفاده شد. به‌منظور دست‌یابی به سوسپانسیون سلولی گیاه چویل، کالوس‌هایی که از لحاظ ظاهری نسبت به بقیه کالوس‌ها، تردتر و شیری‌رنگ بودند، انتخاب شدند. برای استقرار کشت سوسپانسیون سلولی از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ استفاده گردید. بر اساس ارزیابی بصری، رشد و تکثیر سلول‌ها چویل در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشتر از بقیه تیمارها بود؛ بنابراین، از این محیط کشت برای تکثیر کشت‌های سلولی چویل جهت اعمال محرک استفاده گردید. شکل ۲ منحنی رشد سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی در این محیط کشت را نشان می‌دهد.

ارزیابی کیفی و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و نانودراپ نشان داد که RNAهای استخراج شده از کیفیت خوبی برخوردار بودند. به‌طوری‌که RNAهای بدون خردشدگی، عدم وجود آلودگی و باندهای 28S، 18S و 5S مشاهده گردید (شکل ۳).

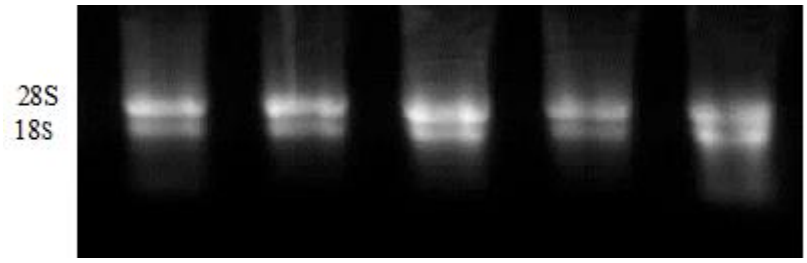
نتایج بررسی اثر دو محرک بر الگوی بیان دو ژن تنظیمی و کلیدی مؤثر در بیوسنتز ترپن‌ها در سوسپانسیون سلولی گیاه چویل از طریق Real-time PCR نشان داد که بیان نسبی ژن‌های *HMGR* و *GPPS* به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع و غلظت محرک و مدت‌زمان پس از تیمار و اثر متقابل بین آن‌ها قرار گرفته است (جدول ٤). مقایسه الگوی بیان نسبی ژن *GPPS* نشان داد که رونوشت‌های این ژن در کلیه تیمارهای محرک مورد بررسی نسبت به شاهد افزایش یافته است (شکل ٤).

مقایسه میانگین تأثیر سالیسیلیک اسید بر بیان نسبی ژن *GPPS* نشان داد که سطوح مختلف این محرک در زمان‌های مختلف بر بیان نسبی ژن اثر مثبت و معنی‌داری داشته‌اند. همان‌طور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود الگوی بیان این ژن در کشت‌های سلولی گیاه دارویی چویل بسته به غلظت محرک و مدت‌زمان پس از اعمال تیمار متفاوت بود. بیشترین بیان نسبی این ژن مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک اسید در ٢٤ ساعت پس از اعمال تیمار بود که به‌طور معنی‌داری بیشتر از بقیه تیمارها بود. در این غلظت سالیسیلیک اسید و ٤٨ ساعت پس از اعمال تیمار، میزان بیان نسبی این ژن نسبت به ٢٤ ساعت پس از اعمال محرک، کاهش یافت. برعکس، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک اسید، بیشترین بیان نسبی این ژن مربوط به ۷۲ ساعت بعد از تیمار با محرک مشاهده شد.



شکل ۲- منحنی رشد سوسپانسیون سلولی گیاه چویل در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP

Figure 2. Cell suspension growth curve of the *F. angulata* in MS culture medium containing 2 mg/L of NAA hormone and 0.5 mg/L BAP hormone



شکل ۳- ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده از سوسپانسیون سلولی گیاه چویل از طریق الکتروفورز ژل آگارز یک درصد

Figure 3. Evaluation of the RNA quality extracted from the cell suspension of the *F. angulata* using 1% agarose gel electrophoresis

جدول ٤- تجزیه واریانس بیان ژن‌های *HMGR* و *GPPS* تحت تیمار سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر

Table 4. Analysis of variance of *HMGR* and *GPPS* expression under salicylic acid and yeast extract treatments

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		GPPS	*HMGR*
تیمار Treatment	20	7844.0999**	4586.7000**
محرک Elicitor	6	25193.9187**	53575.8379**
زمان Time	2	957.1372**	1456.76.28**
محرک × زمان Time × Elicitor	12	317.0177**	408.4688**
خطا Error	42	5.9016	0.359
ضریب تغییرات (٪) CV (%)		5.0694	0.9272

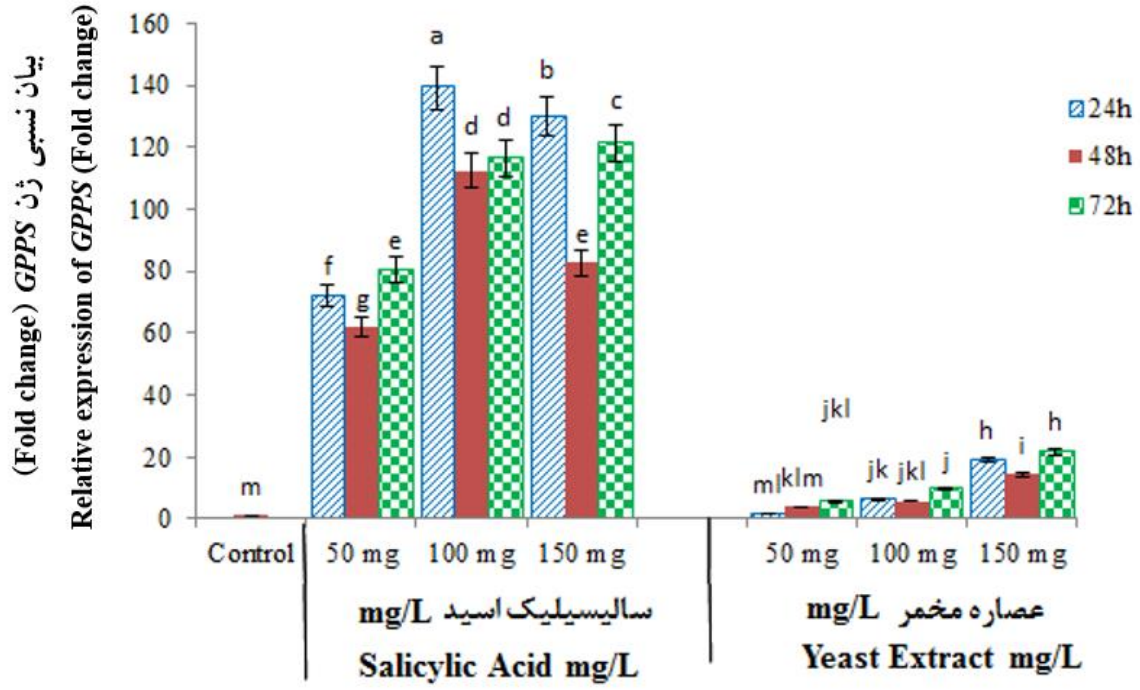
**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**: Significant at 1% probability level

در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز بیشترین بیان نسبی ژن *GPPS* مربوط به ۲٤ ساعت پس از تیمار با محرک به‌دست آمد و در ٤۸ ساعت پس از اعمال تیمار، نسبت به ۲٤ ساعت پس از اعمال محرک کاهش یافت و در ۷۲ ساعت پس از اعمال محرک، دوباره به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در تیمار با محرک سالیسیلیک اسید کمترین میزان بیان نسبی ژن مربوط به تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و ٤۸ ساعت پس از تیمار با محرک بود. در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از سالیسیلیک اسید اختلاف معنی‌داری بین ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار وجود نداشت (شکل ٤).

به‌طورکلی افزایش میزان بیان نسبی ژن *GPPS* در تیمار سالیسیلیک اسید به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار عصاره مخمر بود (جدول ۵). همان‌طور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود در کشت سلولی چویل تیمار شده با عصاره مخمر بیشترین میزان بیان ژن در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در زمان‌های ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از تیمار مشاهده شد.

ارزیابی تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر بیان نسبی ژن *HMGR* نشان داد بیشترین سطح بیان این ژن متعلق به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در ۲٤ ساعت پس از اعمال محرک و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در ۷۲ ساعت پس از اعمال محرک بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از سطوح دیگر تیماری بودند. در همه سطوح غلظت سالیسیلیک اسید در٤۸ ساعت بعد از اعمال تیمار نسبت به ۲٤ و ۷۲ ساعت بیان کمتری نشان داد، ولی تغییرات میزان بیان در ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از تیمار بسته به غلظت محرک متفاوت بود که نشان دهنده اثر متقابل بین غلظت سالیسیلیک اسید و مدت‌زمان پس از تیمار است (شکل ۵).



شکل ٤- الگوی بیان نسبی ژن *GPPS* در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی چویل در پاسخ به محرک‌های سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر نسبت به شاهد

Figure 4. Relative expression pattern of *GPPS* gene in cell suspension culture of *F. angulata* in response to salicylic acid and yeast extract elicitors

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

Different letters indicating the significant differences according to Duncan's multiple range tests at 5%

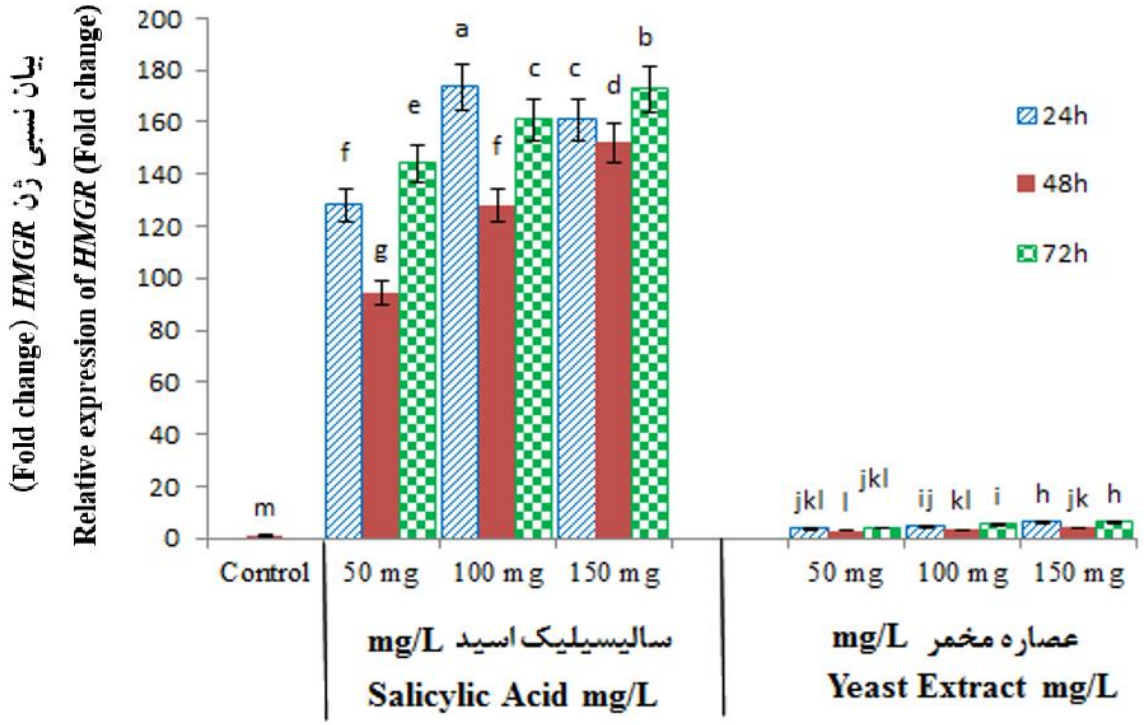
جدول ۵- مقایسه‌های متعامد میانگین بیان نسبی ژن‌های *GPPS* و *HMRG* بین محرک‌های سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر

Table 5. Orthogonal contrast comparison of relative expression of *GPPS* and HMGR genes between salicylic acid and yeast extract elicitors

نوع محرک Elicitor types	بیان نسبی ژن *HMRG* Relative expression of *HMRG*	بیان نسبی ژن *GPPS* Relative expression of *GPPS*
سالیسیلیک اسید (SA) Salicylic acid (SA)	146.0541	101.6905
عصاره مخمر (YE) Yeast extract (YE)	4.3848	9.7913
میانگین مربعات مقایسه متعامد SA در برابر YE Mean of squares of orthogonal contrast	16947.05**	7727.65**

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**: Significant at 1% probability level



شکل ۵- الگوی بیانی ژن *HMGR* در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی چویل در پاسخ به محرک‌های سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر نسبت به شاهد

Figure 5. Relative expression pattern of *HMGR* gene in cell suspension culture of *F. angulata* in response to salicylic acid and yeast extract elicitors

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ٪۵ می‌باشد.

Different letters indicating the significant differences according to Duncan's multiple range tests at 5%

مقایسه میانگین تأثیر عصاره مخمر در زمان‌های مختلف پس از اعمال تیمار بر بیان نسبی ژن *HMGR* نیز نشان داد که بیشترین بیان نسبی ژن متعلق به غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از اعمال محرک بود که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از بقیه تیمارها بودند. کمترین میزان بیان نسبی ژن در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و ٤۸ ساعت پس از تیمار محرک مشاهده گردید. به‌طورکلی ژن *HMGR* در ٤۸ ساعت پس از اعمال

تیمار نسبت به ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از اعمال بیان نسبی ژن کمتری داشته، ولی افزایش غلظت عصاره مخمر باعث افزایش بیان این ژن شد (شکل ۵).

عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ و شرایط فیزیولوژیک گیاه مادری، نوع ریزنمونه و نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌ای رشد گیاهی در رشد و نمو سلول‌ها در کشت درون شیشه‌ای مؤثر هستند (Alavi *et al*., 2019; Zare *et al*., 2009). در مطالعه حاضر نیز کشت‌های سوسپانسیون سلولی حاصل از کالوس‌های برگی چویل رشد و تکثیر بالاتری داشتند. به‌عبارت دیگر نوع ریزنمونه قابلیت کالوس‌زایی و استقرار و رشد سوسپانسیون سلولی را تحت تأثیر قرار داد. به‌عبارت دیگر، NAA در سطح ۲ میلی‌گرم و BAP در سطح ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌منظور ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی مؤثر بود. سیتوکینین‌ها به مقدار ناچیز برای کالوس‌زایی و سوسپانسیون سلولی مؤثر می‌باشند به‌طوری‌که در بسیاری از گونه‌های دیگر استفاده از مقادیر پایین غلظت سیتوکینین توصیه شده است (Ozgen *et al*., 1998; Zare *et al*., 2009). همچنین نشان داده شده که شاخص‌های PCV و SCV از معیارهای سریع و مناسب برای اندازه‌گیری رشد و تکثیر سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی بوده و همبستگی معنی‌دار و بسیار بالایی بین این شاخص‌ها و تراکم سلولی گزارش شده است (Farjaminezhad *et al*., 2013).

ارزیابی بیان دو ژن کلیدی در مسیر موالونیک اسید (*TpHMGR* و *TpGAS*) با استفاده از Real-time PCR در برگ‌های و گل‌های گیاه دارویی بابونه کبیر نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها می‌تواند تحت تأثیر مرحله رشدی و ژنوتیپ تغییر کند (Majdi *et al*., 2014). در تحقیقی دیگر بیان ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز در سطح رونوشت از طریق RT-PCR نیمه‌کمی در بافت‌های مختلف گیاه دارویی سیاه‌دانه مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شد که بیان ژن ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز (*GPPS*) در ساقه و برگ به‌طور معنی‌داری بیشتر از ریشه، کپسول و بذر می‌باشد (Shamsi-Fard *et al*., 2014). در مطالعه حاضر در سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی چویل، بیان ژن *HMRG* و *GPPS* تحت تأثیر محرک‌ها افزایش یافت. به‌طورکلی در این مطالعه تیمار سالیسیلیک اسید منجر به افزایش بیان بیشتری نسبت به عصاره مخمر گردید (شکل‌های ٤ و ۵) که این می‌تواند گویای نقش این مولکول زیستی به‌عنوان محرکی در القای بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه ترپنوئیدها در گیاه دارویی چویل باشد. اعمال اسید سالیسیلیک و فنیل‌آلانین در کشت سوسپانسیون کنجد باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن C_3H نسبت به شاهد شده است (Amanelahy *et al*., 2017). در پژوهشی که در مورد چگونگی عمل برخی از ترکیبات از جمله اسید سالیسیلیک در القای مقاومت و توقف رشد عوامل بیماری‌زا در گیاهان صورت گرفته، نشان داده شد که هم‌زمان با افزایش دفاع اکتسابی (Systemic Acquired Resistance) (SAR) و تولید پروتئین‌های PR (که در اثر تیمار اسید سالیسیلیک ایجاد می‌شود) افزایش تولید ساپونین به‌عنوان یکی از ترکیبات ضدمیکروبی، تنها در محل آلودگی القا می‌شود. هم‌زمان با القای سریع و مؤثر ساپونین در محل آلودگی آسیب کمتری به گیاه وارد شده و از گسترش آلودگی در گیاه جلوگیری می‌گردد و در نتیجه طول عمر گیاه افزایش می‌یابد (Hammerschmidt, 1999). استفاده از تیمار اسید سالیسیلیک بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای دفاعی را افزایش می‌دهد با توجه به افزایش بیان این ژن‌ها احتمالاً ترکیبات ضدمیکروبی آن‌ها از جمله ساپونین‌ها افزایش می‌یابد (Malamy and Klessig, 1992). نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نیز نشان دهنده افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز ترپن‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی چویل می‌باشد. با توجه به اینکه معمولاً میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در سطح رونوشت با میزان متابولیت مربوطه ارتباط مستقیم دارد (Malamy and Klessig, 1992; Hammerschmidt, 1999) بنابراین در مواردی که هدف به‌دست آوردن و جداسازی یک ترکیب خاص باشد می‌توان با استفاده از تیمارهایی مانند اسید سالیسیلیک در زمان مناسب، بیشترین مقدار از ترکیب را به‌دست آورد. در پژوهشی که توسط الیاسی و همکاران (Elyasi *et al*., 2015) در مورد بیان نیمه‌کمی ژن‌های مونوترپن‌سنتاز، ژرانیل دی‌فسفات‌سنتاز، بتاآمیرین سنتاز و اسکوآلن اپوکسیداز در برگ‌های سیاه‌دانه

تیمار شده با اسید سالیسیلیک انجام شد، نتایج نشان دهنده القای بیان این ژن‌ها در پاسخ به اسید سالیسیلیک بود. همچنین در گیاه درمنه خزری (*Artemisia annua*) رابطه مثبتی بین میزان دی‌هیدروآرتمیزینیک اسید به‌عنوان پیش‌ماده آرتمیزینین و میزان بیان ژن‌های *ADS* و *CYP71AV1* گزارش شده است (Arsenault *et al*., 2010). در تحقیقی روی الگوی بیوشیمیایی و مولکولی در بیوسنتز ترپن‌ها و فنیل‌پروپن‌ها در سه رقم ریحان که قابلیت متفاوتی در سنتز ترپن‌ها داشتند گزارش شد که در رقمی که به‌طور عمده لینالول (R-linalool) تولید می‌کند میزان رونوشت ژن لینالول سنتاز (R-linalool synthase) خیلی بیشتر بود. در عین‌حال، نشان داده شد که میزان فعالیت نسبی ژرانیل‌دی‌فسفات‌سنتاز و فارنسیل دی‌فسفات‌سنتاز با نسبت کلی مونوترپن‌ها به سزکویی‌ترپن‌های گیاه در ارتباط است (Ijima *et al*., 2004). بررسی فعالیت آنزیم منتول‌دهیدروژناز در گونه *Mentha Piperita* نشان داد که فعالیت آنزیم منتول‌دهیدروژناز تحت تیمار اسید سالیسیلیک به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد به‌طوری که تفاوت بسیار معنی‌داری با شاهد داشت (Durner *et al*., 1997).

عصاره مخمر، غنی از آمینواسیدهای مختلف، ویتامین‌ها و سایر ترکیب‌های تحریک‌کننده رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد و می‌تواند به‌صورت ترکیبی از آمینواسیدها مورد استفاده قرار گیرد که مزایای زیادی نسبت به کاربرد یک آمینواسید به‌تنهایی دارد (Hakobyan *et al*., 2012)؛ بنابراین، می‌تواند رشد بافت‌ها را در محیط کشت‌هایی با مقادیر نسبتاً کم ویتامین یا نیتروژن افزایش دهد، اما تأثیر دقیق آن بر گیاهان هنوز مشخص نشده است (Wu and Shi, 2008). محرک‌های مختلف و غلظت بهینه برای محرک خاص و هم‌چنین مدت‌زمان تیمار برای بهبود تحریک بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مورد نظر، مهم و ضروری است (Zare *et al*., 2014). همان‌طور که در شکل‌های ٤ و ٥ نشان داده شده است پاسخ کشت‌های سلولی چویل برای محرک‌های مختلف و مدت‌زمان تیمار از نظر میزان بیان ژن‌های *GPPS* و *HMRG* که از ژن‌های کلیدی و مؤثر در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها است، متفاوت است. در نتیجه برای حصول پاسخ مطلوب باید از محرک و غلظت مناسب و همچنین مدت‌زمان تیمار بهینه استفاده شود تا با کمترین تأثیر بازدارندگی بر رشد و نمو سلول‌ها و حداکثر تولید و تجمع محصولات ژنی و متابولیت‌ها همراه باشد. برای مثال تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان بیان ژن‌ها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بیشتر از همان غلظت‌های عصاره مخمر بود (شکل ٤ و ٥). نتایج مطالعات مختلف نشان داده که عصاره مخمر به‌عنوان محرک زیستی، نقش مؤثری در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف دارد (Shad and Deepa, 2015). کاربرد عصاره مخمر در کشت ریشه‌های موئین چریش (*Azadirachta indica*) میزان تولید و تجمع آزادیراکتین را نسبت به شاهد ١/٦ برابر افزایش داد (Srivastava and Srivastava, 2013). با توجه به اینکه تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً پرهزینه، مشکل و یا غیرممکن می‌باشد و نیز به‌دلیل اهمیت اقتصادی این متابولیت‌ها و تولید اندک آن‌ها در گیاهان دارویی، راه‌کارهایی مثل کشت سوسپانسیون سلولی، کشت ریشه‌های موئین و استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی می‌تواند تولید این متابولیت‌ها را بهبود ببخشد (Udomsuk *et al*., 2011). یانگ‌چوا و همکاران (Young-Choa *et al*., 2008) با استفاده از تیمار ترکیبی محرک‌های عصاره مخمر، متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید موفق به افزایش ٢/٥ برابری سنگوئینارین و ٥/٥ برابری هیدروسنگوئینارین در ٩٢ ساعت پس از اعمال تیمار در گیاه خشخاش شدند. نتایج حاصل از اعمال تیمارهای مختلف در این مطالعه نشان می‌دهد که ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق در اثر تیمار با این محرک‌ها القاء می‌شوند. به‌عبارت دیگر، افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها در تحقیق حاضر در کشت سلولی چویل (شکل‌های ٤ و ٥)، می‌تواند به‌دلیل نقش ترپن‌ها در مسیرهای دفاعی و انتقال پیام باشد. با توجه به این نتایج می‌توان تیمار سالیسیلیک اسید و عصاره مخمر را برای افزایش بیان ژن‌ها و آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها و القای تغییر در مسیر بیوسنتزی ترکیبات ترپنوئیدی پیشنهاد

کرد، زیرا بر اساس مطالعات مختلف میزان تولید ترکیبات ترپنی با میزان رونوشت ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتزی آن‌ها ارتباط مستقیم دارد (Malamy and Klessig, 1992; Hammerschmidt, 1999). برای مثال، با ارزیابی بیان نسبی ژن‌های درگیر در بیوسنتز منتول و میزان متابولیت‌های ثانویه در اندام‌های مختلف، یک رابطه مستقیم بین مقدار منتول و میزان بیان نسبی ژن پولگان‌ردوکتاز (*Pr*) در برگ و همچنین بین مقدار منتوفوران و میزان بیان نسبی ژن منتوفوران‌سینتاز (*Mfs*) در گل گیاه دارویی نعناع فلفلی گزارش شده است (Afkar *et al*., 2015).

نتایج این پژوهش نشان داد که محرک‌های مورد استفاده باعث افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز ترپن‌ها (*HMGR* و *GPPS*) شده‌اند. با توجه به اینکه تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای جهت بررسی بیان ژن در گیاه چویل که غنی از متابولیت‌های ثانویه از نوع ترپنوئیدها می‌باشد صورت نگرفته است، این مطالعه به‌عنوان گام نخست در زمینه مهندسی متابولیت‌های ثانویه در گیاه چویل به‌شمار می‌رود.

References

Afkar, S., Karimzadeh, G. and Jalali Javaran, M. (2015). Gene expression pattern of key genes in menthol biosynthesis pathway in different organs of peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Genetic Researches*, **2(1):** 1-10 (In Persian).

Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.Y., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. and Bouwmeester, H.J. (2006). Metabolic engineering of terpeniod biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, **5:** 49-58.

Alavi, S.M., Masoumiasl, A., Zare, N., Asghari Zakaria, R. and Sheikhzade Mosaddegh, P. (2019). The role of ecotype, explant and plant growth regulators on cell Suspension culture of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. *Journal of Horticultural Science*, **33(3):** 525-536 (In Persian).

Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in Panax ginseng bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, **12:** 607-621.

Amanelahy, S., Dehghan Nayeri, F. and Mohammadi Bazrgani, M. (2017). Effect of salicylic acid and phenylalanine on expression of key genes involved in the sesamin biosynthesis pathway in sesame. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, **5(2):** 155-166 (In Persian).

Arastehfar, A., Riyahi-Madvar, A., Tohidfar, M. andYousefi, K. (2013). Investigation of the effects of yeast extract on isoflavone synthase gene expression and some biochemical parameters in Glycine max seedlings. *Agricultural Biotechnology Journal*, **5(3):** 1-18 (In Persian).

Arsenault, P.R., Vail, D., Wobbe, K.K., Erickson, K. and Weathers, P.J. (2010). Reproductive development modulates gene expression and metabolite levels with possible feedback inhibition of artemisinin in *Artemisia annua*. *Plant Physiology*, **154:** 958-968.

Durner, J., Shah, J. and Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Science*, **7:** 266-274.

Elyasi, R., Majdi, M., Bahramnejad, B. and Mirzaghaderi, G. (2015). Expression pattern analysis of genes in volved in the biosyn thetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with salicylic acid. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **23(2):** 164-174 (In Persian).

Farjaminezhad, R., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and Farjaminezhad, M. (2013). Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum* a biotechnology approach for thebaine production. *Turkish Journal of Biology*, **37:** 689-697.

Golfakhrabadi, F., Khanavi, M., Ostad, S.N., Saeidnia, S., Vatandoost, H., Abai, M.R., Hafizi, M. and Yousefbeyk, F. (2015). Biological Activities and Composition of *Ferulago* carduchorum Essential Oil. *Journal Arthropod-Borne Diseases*, **9(1):** 104-115.

Hakobyan, L., Gabrielyan, L. and Trchounian, A. (2012). Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by Rhodobacter sphaeroides strains from mineral springs. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37(8):** 6519-6526.

Hammerschmidt, R. (1999). Induced disease resistance how to induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55:** 77-84.

Holopainen, J.K. and Gershenzon, J. (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science*, **15:** 176-184.

Ijima, Y., Davidovich-Rikanati, R., Fridman, E., Gang, D.R., Bar, E., Lewinsohn, E. and Pichersky, E. (2004). The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant Physiology*, **136:** 3724-3736.

Irmler, S., Schorder, G., St-Pierre, B., Crouch, N.P., Hotze, M., Schmidt, J., Strack, D., Matern, U. and Schroder, J. (2000). Indole alkaloid biosynthesis in *Catharan thusroseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P-450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant Journal*, **24:** 797-804.

Kozlowski, G., Buchala, A. and Metraux, J.P. (1999). Methyl jasmonate protects Norway spruce (*Picea* abies (L.) Karst.) seedlings against Pythium against *Pythium ultimum* Trow. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55:** 53-58.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, **25:** 402-408.

Majdi, M., Karimzadeh, G. and Malboobi. M.A. (2014). The study of relative gene expression of key genes of terpene biosynthesis in tissues and different developmental stages of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) genotypes using Real-Time PCR. *Plant Genetic Researches*, **1(2):** 25-32 (In Persian).

Malamy, J. and Klessig, D.F. (1992). Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant Journal*, **2:** 643-654.

Mozaferian, V. (1983). *The family of Umbelliferae in Iran, Key and distribution*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, IR (In Persian).

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiolagia Plantarum*, **15:** 473-497.

Ozgen, M., Turet, M., Altinok, S. and Sancak, C. (1998). Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports*, **18:** 331-335.

Richard, D., Lescot, M., Inze, D. and De-Veylder L. (2002). Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **69:** 167-176.

Rohmer, M. (2003). Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis: elucidation and distribution. *Pure and Applied Chemistry*, **75:** 375-388.

Shad, V. and Deepa, M.A. (2015). Elicitation, biovonversion and quantification of berberine from *Cissampelos pariera* callus cultures. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **6(6):** 2636-2640.

Shamsi-Fard, M.H., Mirzaghaderi, G. and Majdi, M. (2014). Transcript expression analysis of geranyl diphosphate synthase gene in different tissues of black cumin (*Nigella sativa* L.). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **22(2):** 143-155 (In Persian).

Srivastava, S. and Srivastava, A.K. (2013). Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **6:** 664-676.

Sudha, G. and Ravishankar, G.A. (2003). Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of Capsicum frutescens Mill. *Current Science*, **85:** 1212-1217.

Taran, M., Ghasempour, H.R. and Shirinpour, E. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. Carduchorum. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **3(1):**10-21.

Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, **9:** 1-8.

Udomsuk, L., Jarukamjorn, K., Tanaka, H. and Putalun, W. (2011). Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnology Letters*, **33:** 369-374.

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

Wang, R.Y. and Ghabrial, S.A. (2002). Effect of aphid behavior on efficiency of transmission of soybean mosaic virusby the soybean-colonizing aphid, Aphisglycines. *Plant Disease*, **86(11):** 1260-1264.

Wasternack, C. and Parthier, B. (1997). Jasmonate signalled plant gene expression. *Trends in Plant Sciences*, **2:** 302-307.

Wu, J.Y. and Shi, M. (2008). Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **78(3):** 441-448.

Young-Choa, H., Young-Sona, S., Soon-Rheea, H., Sung-Yong, H., Yoonb-Carolyn, W.T., Parsonsc-Jong, L. and Parka, M. (2008). Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in Eschscholtzia californica suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, **135:** 117-122.

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.

Zare, N., Valizadeh, M., Tohidfar, M., Mohammadi, S.A., Malboobi, M.A. and Habashi, A.A. (2009). Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. **7:** 567-572.

Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, **23:** 283-333.

Effect of Salicylic Acid and Yeast Extract Elicitors on the Expression of *HMGR* and *GPPS* Genes Involved in Biosynthesis of Terpenes in Medicinal Plant *Ferulago angulata* under Cell Suspension Culture Condition

Syed Mehran Alavi Mehryan[1], Nasser Zare[2,*], Asad Masumiasl[3], Parisa Sheikhzadeh Mosadegh[4] and Rasol Asghari[5]

1- Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran
4- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
5- Professor, Department of Plant Production and Genetics Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: April 11, 2020 – Accepted: August 23, 2020)

Abstract

Ferulago angulata (Schlecht) Boiss is one of the valuable and endemic medicinal plants of Iran, which is of great importance due to the source of terpenoid compounds and antimicrobial properties. In current study, the effects of different concentrations of salicylic acid and yeast extract in cell suspension culture of *F.angulata* on expression pattern of the *HMGR* and *GPPS* genes (involved in terpenes biosynthesis) were investigated for the first time. The *F. angulata* cell suspension cultures were initiated and established using calli derived from leaf explants, and salicylic acid and yeast extract elicitors (with 50, 100 and 150 mg/L concentrations) were added to the cultures during active growth. Then, the cell samples were prepared at 24, 48 and 72 hours after treatment. Analysis of expression pattern of *HMGR* and *GPPS* genes using Real-time PCR showed that the expression of both genes were significantly influenced by the type and concentration of the elicitors and also the times after treatment. The relative expression of *HMGR* and *GPPS* genes under elicitors were increased compared to the control, and furthermore, the increase in the relative expression of these genes under salicylic acid treatment was significantly higher than that of yeast extract treatment. The highest relative expression of *GPPS* and *HMGR* genes was related to 100 mg/L salicylic acid treatment at 24 hours after treatment. However, the highest relative expression of these genes was observed under the 24 and 72 hours after treatment of 150 mg/L yeast extract. The results of this study could be useful in metabolic engineering of *F. angulata*.

Keywords: Terpenoids, Cell cultures, Medicinal plant, Elicitor, Real-time PCR

[*] **Corresponding Author, E-mail: nzare@uma.ac.ir**