

همسانه سازی ملکولی، بیان و مشخصه یابی راه انداز پاسخ دهنده به تنش خشکی ژن لینالول سنتاز (*Lins*) در برخی از توده های بذری ریحان

Molecular cloning, expression and characterization of drought responsive promoter of linalool synthase gene (*Lins*) in some populations of basil (*Ocimum basilicum* L.)

فاطمه خاکدان^{۱*}، زهرا شیرازی^۲

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، پردیس فرزائگان، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲- استادیار، بخش تحقیقات زیست فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

Khakdan F^{*1}, Shirazi Z²

1- Assistant Professor, Department of Biology, Farzanegan Campus, Semnan University, Semnan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biotechnology Research, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), National Botanical Garden, Tehran Karaj Freeway, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: f.khakdan@semnan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

چکیده

ریحان (*Ocimum basilicum* L.)، گیاهی دارویی و معطر که در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرد. مونوترپن ها، سسکوئی ترپن ها و فیل پروپانوئیدها حجم عمده اسانس ریحان را تشکیل می دهند. بخش قابل توجهی از ترپنوئیدها را ترکیب مونوترپن فرار لینالول تشکیل می دهد که به علت اثرات دفاعی، در مکانیسم تحمل گیاه در برابر انواع تنش های محیطی بسیار مورد اهمیت می باشد. آنزیم لینالول سنتاز (*Lins*) آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها، تبدیل پیش ماده اصلی مونوترپن ها (GPP) را به ترکیب نهایی لینالول را انجام می دهد. در تحقیق حاضر، برای بررسی تاثیر تنش خشکی بر شکل گیری و کنترل تنظیم نسخه برداری بر مسیر بیوسنتز ترکیب لینالول در سه توده دارویی ریحان، پروفیل بیان نسبی ژن کلیدی ObLins در مسیر بیوسنتز لینالول در شرایط شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و سه سطح تنش خشکی (W۱: ۷۵، W۲: ۵۰ و W۳: ۲۵ درصد ظرفیت زراعی)، با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی (qRT-PCR) بررسی شد. به منظور مطالعه نحوه تنظیم الگوی بیان ژن ObLins در شرایط تنش خشکی، جداسازی، مشخصه یابی، آنالیز عملکردی راه انداز pObLins نیز انجام گرفت. نتایج نشان داد، در راه انداز این ژن، عناصر تنظیمی پاسخ دهنده به تنش خشکی شامل MBS، MYB-site، WRKY710S، W-Box، CCAAT-Box، DRE2 و CBFHV و محل اتصال فاکتورهای نسخه برداری مؤثر در نسخه برداری ژن ObLins در مواجهه با تنش خشکی وجود دارد. بیان موقت ژن گزارشگر GUS تحت کنترل راه انداز pObLins در برگ های گیاه توتون نشان داد که با حضور cis-element های پایه و جایگاه اتصال فاکتورها و تقویت کننده های رونویسی، این راه انداز قادر به هدایت و بیان پایه این ژن است. با توجه به حضور عناصر تنظیمی پاسخ دهنده به تنش های زیستی و غیر زیستی در راه انداز ژن ObLins، انتظار می رود این راه انداز قادر به بیان ژن ObLins در پاسخ به تنش های محیطی با تنظیم میزان رونویسی آن باشد.

واژه های کلیدی

بیان ژن
تنش خشکی
راه انداز
عناصر تنظیمی
لینالول

مقدمه

ریحان *Ocimum basilicum* L. (۲n=۴۸)، گیاهی دارویی و معطر از خانواده نعنائیان^۱، در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری، خصوصاً ایران رشد می کند و به عنوان یکی از مهم ترین گیاهان معطر برای تولید اسانس مورد استفاده قرار می گیرد. اسانس ریحان در کرک های (تریکوم های^۲) غده ای موجود در سطح اندام های هوایی گیاه تجمع می یابد و با داشتن ترکیبات مهم آروماتیک و دارویی دارای اهمیت اقتصادی در صنایع غذایی، دارویی، عطرسازی و آرایشی-بهداشتی است (Gang et al. 2005; Kicel et al. 2005). از اسانس این گیاه به طور وسیعی برای درمان بیماری هایی مانند اسهال، سرفه، انگل های روده و ناراحتی های کلیه و کبد استفاده می شود و نیز در ترکیب با داروهای تب بر، ضد مالاریا، تسکین دهنده گی درد، ضد افسردگی و ضد روماتیسم در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار می گیرد (Ekren et al. 2012).

مونوترپن ها، سسکوئی ترپن ها و فیل پروپانوئیدها حجم عمده اسانس ریحان را تشکیل می دهند. بخش قابل توجهی از ترپنوئیدها را ترکیب مونوترپن فرار لینالول تشکیل می دهد که مقادیر آن در توده های مختلف بذری ریحان متأثر از شرایط آب و هوایی و مرحله نموی می باشد که منجر به تنوع عظیم بیوشیمیایی و ژنتیکی در این گیاه شده است. ترپنوئیدها ترکیبات فعالی هستند که توسط انواع میانکنش گیاهان با عوامل زیستی و غیرزیستی از جمله مکانیسم های دفاعی و سازگاری به انواع تنش های محیطی تحت تاثیر قرار می گیرند. لینالول یکی از مهم ترین ترکیبات موجود در اسانس گیاهان معطر خصوصاً گیاه ریحان می باشد که علاوه بر کاربرد آن در صنایع مختلف غذایی و دارویی و نیز در درمان سرطان، با داشتن خاصیت ضد تکثیری (Kim et al. 2015)، به علت اثرات دفاعی بر علیه آفات، در مکانیسم تحمل گیاه در برابر انواع تنش های محیطی بسیار مورد اهمیت می باشد (Gosztoła et al. 2010).

لینالول عمدتاً از مسیر بیوسنتزی غیروابسته به موالونیک اسید (MEP) مشتق می شود. این مسیر با ترکیب پیرووات و گلیسرآلدئید

¹ Lamiaceae

² Trichomes

۳- فسفات که منجر به تشکیل دی اکسی زایلولوز فسفات (DXP) شده شروع می شود و سپس توسط یک مرحله بازآرایی داخلی و احیا DXP، MEP تولید می شود. متعاقباً این ماده در سه مرحله آنزیمی منجر به تولید HMBPP می شود که در نهایت توسط آنزیم HMBPP رودکتاز (HDR) به پیش ماده های اساسی IPP و DMAPP تبدیل می شود. این دو پیش ماده، طی مراحل و پس از تشکیل GPP، توسط آنزیم لینالول سنتاز (Lins) (آنزیم کلیدی و انتهایی مسیر) به سمت تولید ترکیب لینالول پیش می روند (شکل ۱) (Eisenreich et al. 2001). از طرفی سنتز شیمیایی این ترکیبات فرار سخت و پیچیده بوده و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشد، تکیه به گیاهان معطر و بومی ایران خصوصاً ریحان جهت استخراج این ترکیبات و شناخت افزایش میزان آن ها در دوره ای از رشد و در پاسخ به تنش های محیطی می تواند راهی بسیار بارز و اقتصادی در تولید آن ها باشد.

تنش خشکی یکی از مهم ترین فاکتورهای غیرزیستی به شمار می آید که اثرات نامطلوبی بر رشد، باروری و متابولیسم گیاهان دارد (Akula and Gokare 2011). مطالعات نشان می دهد گیاهان برای حفظ حیات خود از تغییر متابولیسم سلولی خود در جهت افزایش سطوح ترپنوئیدها به عنوان بخشی از سیستم دفاعی برای رو به رو شدن با این چالش محیطی در پاسخ و سازگار شدن استفاده می نمایند (Khakdan et al. 2016). مطالعات گذشته نشان می دهد که سطوح نسخه برداری و مقادیر مونوترپن ها تحت انواع تنش های محیطی از جمله خشکی در چندین گیاه دارویی از جمله ریحان با سنجش ظرفیت بیوسنتزی در سطح متابولیت افزایش می یابد (Schmiderer et al. 2010; Grausgruber et al. 2013; Yadav et al. 2012; Groger et al. 2012).

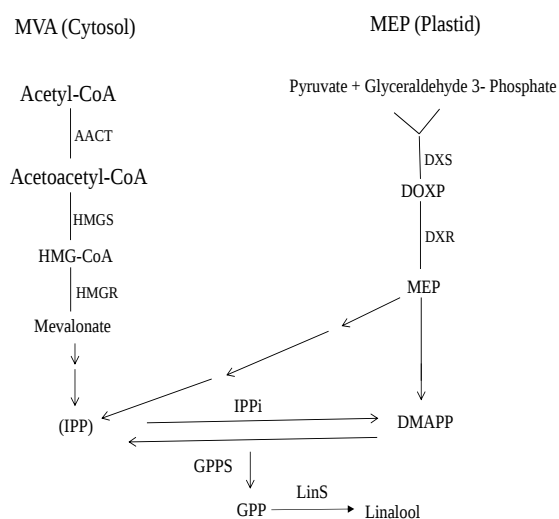
توالی های تنظیمی در ناحیه بالادستی ژن ها در فعال شدن و یا ممانعت از نسخه برداری در پاسخ به شرایط خاص محیطی و یا مراحل مختلف توسعه ای سلول نیز اهمیت به سزایی دارد (Butelli et al. 2008). امروزه رهیافت های مهندسی متابولیک برای افزایش غلظت متابولیت های خاص در یک مسیر متابولیکی به جای استفاده از راه اندازهای ساختاری و قوی، از راه اندازهای تغییر یافته سنتتیک بر پایه توزیع مناسب عناصر تنظیمی مناسب و فعال

مواد و روش ها

بذور سه توده گیاه ریحان به ترتیب توده بذری ۱ از استان فارس و توده بذری ۲ و ۳ از استان مازندران تهیه شد و سپس برای انجام تحقیق در گلخانه کشت شدند. بذرها در خاک با بافت لومی شنی در دمای ۲۰-۳۰ درجه سانتی گراد رشد یافتند. برای مطالعه پاسخ ژن *ObLins* به شرایط تنش خشکی، دو هفته پس از کشت بذرها، تیمارهای مختلف تنش خشکی به صورت وزنی در سه سطح تنش خشکی (۷۱:۷۵، ۷۲:۵۰ و ۷۳:۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و گروه شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) بر روی گیاهچه ها اعمال شد. در ادامه گلدان ها به مدت ۲۹ روز تا انتهای مرحله گلدهی در ظرفیت زراعی مورد نظر نگهداری شدند. در این آزمایش برای هر مرحله سه گلدان (تکرار) استفاده شد. برگ نمونه های برداشت شده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

کل RNA از بافت های تیماریافته برگ توده های بذری مورد مطالعه ریحان در سطوح مختلف تنش خشکی با استفاده از محلول Biozol (شرکت Invitrogen، آمریکا) و مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استخراج شد. سپس کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر ارزیابی شد. از یک میکروگرم RNA کل با استفاده از کیت کپازن (Thermo Scientific، EU) برای ساخت cDNA استفاده شد. در نهایت غلظت cDNA رقیق نموده و به ۴۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رسانیده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور بررسی کمی بیان ژن *ObLins* واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی استفاده شد. ژن اکتین با شماره دسترسی AB002819 به عنوان ژن مرجع استفاده شد. واکنش ها با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل هشت میکرولیتر مخلوط دارای رنگ فلوروسنت Eva Green (کیت شرکت Solis BioDyne)، ۱/۵ میکرولیتر cDNA رقیق شد (۶۰۰ ng)، ۰/۲۵ μM از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و برگشتی (Lins-F و Lins-R) (جدول ۱) و آب دیونیزه در دستگاه Rotor-Gene 6000 ساخت شرکت Qiagen انجام شد. شرایط چرخه های دمایی به ترتیب شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه سپس ۴۵ چرخه با ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشت سازی، برای

استفاده می شود. قطعاً چنین راه اندازهایی می تواند در تنظیم بهتر بیان ژن های کدکننده آنزیم های کلیدی مسیرهای اختصاصی بیوستز متابولیت های ثانویه و متعاقباً تولید متابولیت های خاص با غلظت بیشتر مؤثر باشند (Dey et al. 2015).



شکل ۱- مسیر بیوستزی لینالول

مطالعات نشان می دهد این عناصر تنظیمی در واقع کلیدهای ملکولی دخیل در تنظیم رونویسی ژن ها هستند و اثرات تنظیمی آن ها در ژن های مسیر بیوستز ترپنوئیدها در تجمع محصولات نهایی مرتبط و بسیار مهم است و توسط شبکه پیچیده ای از پروتئین های تنظیم کننده نسخه برداری مانند پروتئین های MYC و MYB کنترل می شود (Liao et al. 2015; Wang et al. 2016). اما تاکنون اطلاعاتی درباره دومین های تنظیمی راه انداز ژن لینالول سنتاز (*pObLins*) و نقش آن ها در بیان این ژن در شرایط انواع تنش های محیطی در دسترس نمی باشد. بنابراین در این تحقیق برای شناخت بهتر مکانیسم تنظیمی ملکولی ژن لینالول سنتاز (*ObLins*) در مسیر بیوستز لینالول در شرایط تنش خشکی، پس از بررسی الگوی بیان این ژن در شرایط تنش خشکی، جداسازی راه انداز این ژن و رابطه میزان بیان این ژن با موتیف های تنظیمی مورد بررسی قرار گرفت و سپس در انتها بیان هیستوشیمیایی ژن گزارشگر *GUS*^۱ تحت راه انداز مذکور در گیاه توتون ترانسژنیک برای اولین بار بررسی شد.

^۱ b-glucuronidase

به‌عنوان آغازگر رفت، آداپتور آغازگر به‌عنوان آغازگر برگشت استفاده شد. واکنش‌ها با استفاده از دستورالعمل touch-down PCR تکثیر یافت، به این ترتیب شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه بود. سپس پنج چرخه با ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و با ۲۶ چرخه با ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه دنبال شد. سپس محصول تکثیر یافته از روی ژل به روش glassmilk (Kim and Morrison 2009) خالص‌سازی نموده و در ناقل pTG19-T (شرکت سیناکلون) همسازسازی و برای توالی‌یابی فرستاده شد. با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و EditSeq نواحی ناخوانا و هم‌پوشان اصلاح شد و توالی نهایی به‌دست آمد. در ادامه هم‌ردیفی قطعه توالی‌یابی شده در برنامه آنالین BLAST انجام و صحت قطعه به‌دست‌آمده تایید شد. سپس از نرم‌افزارهای TSSP و BDGP برای یافتن نقطه آغاز رونویسی^۱ و از برنامه‌های برخط PLANTCARE^۲، PLACE^۳ و PlantPAN^۴ برای یافتن عوامل رونویسی و موتیف‌های عملکردی مختلف در توالی موردنظر استفاده شد.

اتصال ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و برای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه دنبال شد. جهت اطمینان از تکثیر درست بررسی منحنی ذوب انجام گرفت. برای هر ژن سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. همچنین برای هر جفت آغازگر کارایی PCR از طریق محاسبه ارزش Ct‌های مربوط به رقت‌های سریالی cDNA سنجیده شد. DNA ژنومی از توده بذری ۱ با استفاده از روش CTAB جداسازی شد (Aboul-Maaty and Oraby 2019). سپس با استفاده از ساخت کتابخانه Genome Walker از *O. basilicum* الگو گرفتن از Universal Genome Walker Kit (Clontech, USA) کار جداسازی راه‌انداز انجام گرفت. به‌طور خلاصه، رقت‌های متفاوت DNA به‌کمک آنزیم‌های برشی *EcoRI* (Eco321)، *HindIII* و *EcoRV* برش خورده و سپس به آداپتورهای دو رشته‌ای متصل شد. لیست توالی آغازگر و آداپتور در جدول ۱ آورده شده است. سپس از DNA متصل به آداپتور به‌عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دو مرحله صورت گرفت: مرحله اول از آداپتور آغازگر به‌عنوان آغازگر برگشت و آغازگرهای اختصاصی (pLin 1 و pLin 2) به‌عنوان آغازگر رفت استفاده شد (جدول ۱). مرحله دوم شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بود که از رقت‌های ۱ دهم و پنج صدم محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در مرحله اول به‌عنوان الگو برای آغازگرهای اختصاصی شماره ۲

¹ Transcription Start Site

² bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html

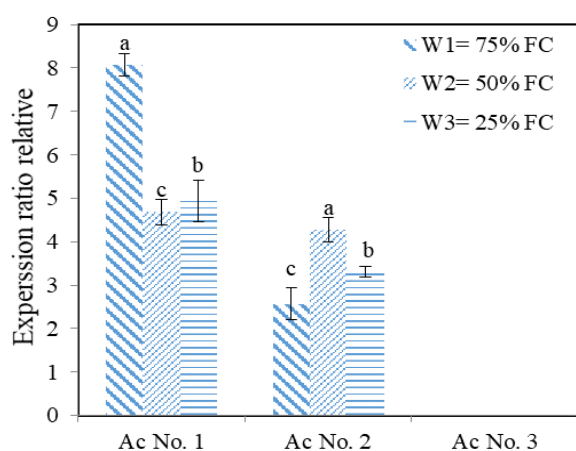
³ http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html

⁴ http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw

جدول ۱- آغازگرها و آداپتورهای طراحی شده به‌منظور آنالیز بیان ژن *ObLins* و تکثیر توالی راه‌انداز *pObLins*

نام ژن / آداپتور	توالی
Lins- F	5'- TGAGAATGGGGCATCAACTG-3'
Lins- R	5'- CCTCGTTCCTCCTCCTCTG-3'
Actin- F	5'- TCTATAACGAGCTTCGTGTTG-3'
Actin- R	5'- GAGGTGCTTCAGTTAGGAGGAC-3'
Adapt-1	5'- CTATAGTGACTGCTGGTTCGAGGGCCCGGGCTGGT-3'
Adapt-EcoV	5'- ACCAGCCC-3'
Adapt-EcoR	5'- AATTACAGCCC-3'
Adapt-Hind	5'- TCGAACCAGCCC-3'
آغازگر اختصاصی ۱- pLins	5'- ATG AGA GGA GTT GAA CTT AGA GGC ACT- 3
آغازگر اختصاصی ۲- pLins	5'- TCC CCG TTG AAT TGA TGT TTT TGC G-3'

معنی‌داری داشت. هر چند، این ژن در توده بذری ۲ در شرایط سطح تنش ۷۵ درصد ظرفیت زراعی نسبت به ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی در مقایسه با گروه شاهد کاهش بیان نشان داد. سطح mRNA این ژن جهت‌گیری متابولیت‌ها را به سمت تولید لینالول با وسعت ۴/۶۸ و ۴/۹۸ برابر در توده بذری ۱ در سطح ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به‌ترتیب افزایش داد. با افزایش میزان بیان ژن در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی در توده بذری ۲، به‌نظر می‌آید که ژن بیوسنتزکننده آنزیم Lins از طریق افزایش بیان در سطح نسخه‌برداری در این سطح تنش بسیار فعال می‌باشد. به‌علاوه در این توده در پاسخ به افزایش سطح تنش خشکی بیان نسبی این ژن نسبت به سطح اول تنش به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، اگرچه هنوز افزایش ۳/۵ برابری نسبت به گروه شاهد در سطح تنش ۲۵ درصد ظرفیت زراعی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. به‌علاوه در توده بذری ۳ الگوی بیانی برای این ژن مشاهده نشد.



شکل ۲- بیان ژن *ObLins* در سه توده بذری ریحان تحت تنش خشکی.

بیان ژن خانه‌دار *Actin* به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵٪ آنالیز شدند. حروف مختلف a, b, c, d بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪، $W1=75\%$ درصد ظرفیت زراعی، $W2=50\%$ درصد ظرفیت زراعی و $W3=25\%$ درصد ظرفیت زراعی.

نتایج مطالعه پیشین بر تاثیر تنش خشکی بر میزان ترکیب لینالول بر سه توده بذری ۱ از استان فارس و ۲ و ۳ از استان مازندران بر طبق داده‌های GC-MS (Khakdan et al. 2021) و بیان ژن نشان

برای ساخت سازه ژنی شامل pObLins که به ژن گزارشگر متصل شده است، ناقل pTG19-T حاوی pObLins و ناقل دوگانه pBI121 با دو آنزیم برشی *Bam*HI و *Hind*III برش داده شد. سپس pObLins به داخل ناقل pBI121 در محل راه‌انداز CaMV 35S الحاق شد. بنابراین قطعه راه‌انداز مورد نظر در ناحیه بالادست ژن گزارشگر *GUS* برای مطالعه عملکرد راه‌انداز مورد نظر قرار گرفت.

پس از تایید سازه نهایی pBI121، انتقال آن به *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 طبق دستورالعمل ترانسفورماسیون این باکتری توسط (Sambrook and Russell 2001) انجام شد. سپس به آگروباکتریوم اجازه داده شد تا به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در محیط کشت مورد نظر حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۱۰۰ mg/l و ریفامپسین ۱۵ mg/l رشد کند تا OD در طول موج ۶۰۰nm به ۰/۷ تا یک برسد. سپس بافت برگ‌های توتون با استفاده از روش آگرواینفیلتریشن در شرایط خلاء تراریخت شد (Wang 2006) و فعالیت ژن گزارشگر *GUS* در نمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت (Jefferson et al. 1987). در ادامه برگ‌های اینفیلتره شده در محلول رنگ‌آمیزی ایکس گلوک شناور نموده و سپس به مدت یک دقیقه تحت خلاء ۲۵۰ میلی بار قرار داده شد و نهایتاً نمونه‌های برگ‌های بین سه تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. پس از آن برگ‌ها در اتانول ۷۵ درصد قرار داده و تا زمان حذف کامل کلروفیل اتانل آن مدام عوض شد. در انتها عکس‌برداری از نمونه‌ها پس از حذف کامل کلروفیل انجام گرفت.

نتایج و بحث

بررسی الگو و میزان بیان ژن *ObLins* در شرایط تنش خشکی تغییرات الگوی بیان ژن *ObLins* در سه توده بذری ریحان تحت شرایط تنش خشکی در شکل ۲ نشان داده شده است. ژن *ObLins* در برگ‌های سه توده مورد مطالعه در پاسخ به تنش خشکی با میزان بیان متفاوتی بین توده‌های بذری مشاهده شد. در هر دو توده بذری ۱ و ۲ بیان این ژن در سطح ظرفیت زراعی ۷۵ درصد ۸/۰۷ و ۲/۵۷ برابر در مقایسه با گروه شاهد افزایش

به عنوان بخشی از سیستم دفاعی به گیاه برای مقابله با شرایط غیرطبیعی کمک می نماید (Vickers et al. 2009; Loreto et al. 2014). عموماً مکانیسم تنظیم کننده بر سرعت تولید و تجمع ترکیبات مهم فرار موجود در اسانس گیاهان معطر و دارویی در شرایط مختلف نامطلوب محیطی مرتبط با کنترل فعالیت های نسخه برداری و آنزیماتیکی ژن ها و آنزیم های درگیر در مسیرهای متابولیک می باشد که معمولاً در سطوح مختلف نسخه برداری ژن، پروسه هایی از جمله تغییرات پس از نسخه برداری، ترجمه و تغییرات پس از ترجمه قابل انتظار است (Vranova et al. 2012). بنابراین افزایش نسخه های ژن لینالول در سطح تنش ۷۵ درصد ظرفیت زراعی مرتبط با افزایش نیاز سلول گیاه توده ۱ به این متابولیت و در نتیجه افزایش مقاومت این توده به تنش خشکی است.

همسازسازی و آنالیز توالی راه انداز pObLins

نتایج آنالیز بیان ژن نشان داد که میزان بیان ژن *ObLins* در توده بذری ۱ نسبت به توده بذری ۲ در سطوح انتهایی تنش بسیار بیشتر می باشد. به لحاظ تکاملی، احتمالاً نیاز توده بذری ۱ به لینالول نسبت به سایر ترکیبات ثانویه بیشتر باشد. این احتمال وجود دارد که نیاز گیاه برای افزایش تحمل و یا دفاع بر علیه تنش خشکی در توده بذری ۱ نسبت به توده بذری ۲ به واسطه افزایش این ترکیب بیشتر احساس می شود و نهایتاً مسیر بیوسنتزی در این توده بذری بیشتر به سمت تولید لینالول متمایل شده است. بنابراین سلول های موجود در هر توده بذری با توجه به شرایط محیطی، در جهت افزایش بیان ژن مورد نظر سازمان دهی ژنومی و بیوشیمیایی خود را برای سازگاری با محیط تغییر می دهد. هر ژنی برای بیان در شرایط مختلف گیرنده های تنظیمی و بیولوژیکی متفاوتی دارد تا کمپلکس های پروتئینی بتوانند پاسخ های دفاعی گیاه را به خاطر حضور این گیرنده ها تحریک کنند (Wang et al. 2016; Wang et al. 2020). بنابراین برای به دست آوردن دید وسیع تری به دستگاه تنظیمی بیان ژن مذکور در ریحان در طول پاسخ دفاعی گیاه به تنش خشکی، شناسایی موتیف های تنظیمی راه انداز این ژن ضروری به نظر می رسد و به علاوه امکان مطالعه گسترده تری بر تنظیم بیان ژن در شرایط تنش خشکی فراهم می نماید. بنابراین توده بذری ۱ با میزان بیان بیشتر این ژن در

داد که به همراه افزایش میزان بیان ژن *ObLins* در توده بذری ۱ تحت تیمار W۱ مقدار لینالول نیز افزایش یافت و پس از آن با کاهش میزان این ترکیب تعداد نسخه های این ژن نیز در دو سطح آخر تنش نیز کاهش یافت. اگرچه در توده بذری ۲ تحت تیمار W۱ افزایش تعداد نسخه های ژن *ObLins* با عدم حضور این ترکیب در داده های GC-MS هماهنگی نداشت اما همراه با افزایش ترکیب لینالول در سطح W۲ میزان بیان این ژن نیز افزایش معنی داری نشان داد و در ادامه کاهش بیان این ژن با کاهش مقدار این ترکیب در W۳ همراه بود.

بیان متعادل و هم زمان در سطح mRNA و متابولیت بیانگر تنظیم ژن *ObLins* در توده بذری ۱ در شرایط تنش خشکی می باشد. سطوح مونوترپن ها اساساً از طریق سطح mRNA مونوترپن سنتتازها تنظیم می شوند (Dudareva et al. 2005; Kampranis et al. 2007; Lane et al. 2010; Grausgruber- Groger et al. 2019; Zhang et al. 2012). بنابراین ارتباط مستقیم بین فروانی نسخه های *ObLins* و غلظت لینالول به صورت تنظیم وابسته به تنش خشکی^۱ نشان دهنده نقش موثر این ترکیب در مواجهه با تنش خشکی است. همچنین کنترل بیان این ژن نقش مهمی در کنترل هدایت پیش ماده های اصلی به سمت مسیر عمده متابولیکی بیوسنتز لینالول در توده های بذری مورد مطالعه ریحان در شرایط سطوح ذکر شده تنش خشکی دارد.

بیوسنتز، متابولیسم و تجمع متابولیت های ثانویه تحت تاثیر گونه، شرایط رشد، بافت گیاه و نیز مراحل توسعه ای و نموی می باشد (Akula and Gokare 2011; Angelova et al. 2006). مطالعات نشان می دهد به عنوان قسمتی از مکانیسم های دفاعی، گیاهان از ایزوپروپونوئیدها برای حفاظت سلول ها در برابر تنش های محیطی از جمله خشکی و گرما استفاده می کنند. افزایش میزان مونوترپن ها در مواجهه با تنش خشکی به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدانتی در مطالعات زیادی گزارش شده است (Vickers et al. 2009; Proshkina et al. 2020). در سطح مولکولی تحریک ژن های پاسخ دهنده از جمله بیوسنتز ترکیبات ثانویه فرار به عنوان پاسخی در جهت تحمل تنش در گیاهان برای سازگاری به شرایط نامطلوب محیطی کمک می کند. در بین ترکیبات فعال، ترپنوئیدها

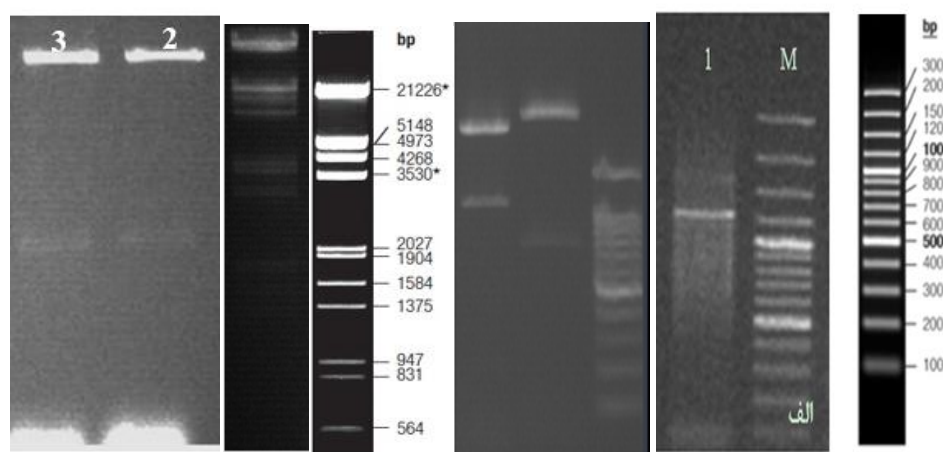
¹ Drought stress-dependent regulation or Drought stress-specific manner

جفت‌باز بالاتر از کدون شروع ترجمه (ATG) قرار گرفته است. توالی راه‌انداز برای حضور *Cis-element* ها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که راه‌انداز pObLins حاوی *Cis-element* های ضروری شامل جعبه TATA و CAAT می‌باشد. نتایج بررسی‌ها برای شناسایی حضور عناصر تنظیمی *Cis-element* ها و موتیف‌های تنظیمی نشان داد عناصر تنظیمی E-box با توالی CANNTG (Hartmann et al. 2005) یکی دیگر از عناصر مؤثر در بیان ژن‌ها در پاسخ به نور است که در راه‌انداز pObLins حضور دارد. مطالعات گذشته نشان می‌دهد تنظیم وابسته به نور مکانیسمی برای کنترل بیوسنتز برنامه‌ریزی شده‌ی کلاس‌های مختلف ایزوپروپونوئیدهای گیاهی است. عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به الیستورهای زیستی از جمله آبسزیک اسید، متیل جاسمونات و اکسین که به‌ترتیب شامل ABRE، CGTCA، TGACG و TCA-element نیز در این راه‌انداز مشاهده شد (Agarwal et al. 2006; Liao et al. 2015; Wang et al. 2019).

شرایط تنش خشکی، برای ادامه مطالعه که شامل جداسازی و شناسایی راه‌انداز ژن ObLins می‌باشد برای فهم بهتر عناصر تنظیمی موجود در راه‌انداز این ژن با میزان بیان متفاوت آن در پاسخ به تنش خشکی انتخاب شد.

در این مطالعه با استفاده از روش Genome walking توالی بالادستی (توالی 5'UTR و راه‌انداز) با طول ۱۰۶۷ جفت‌باز (شکل ۳) تکثیر یافت. قطعه تکثیر یافته در ناقل pTG19-T الحاق شد و این همسانه‌سازی با استفاده از آنزیم برشی BamHI تأیید شد (شکل ۳-ب)

ناقل‌های نو ترکیب جهت توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از توالی‌یابی برای بررسی‌های بیشتر، با استفاده از برنامه BLAST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در نهایت پس از تایید صحت توالی، توالی pObLins به‌عنوان تنها توالی موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI برای راه‌انداز این ژن با شماره دسترسی MW727283 ثبت شد. تعیین جایگاه شروع رونویسی با استفاده از نرم‌افزارهای TSSP، BDGP انجام شد. نتایج نشان داد که جایگاه شروع رونویسی پیش‌بینی شده برای ژن ObLins، ۶۷



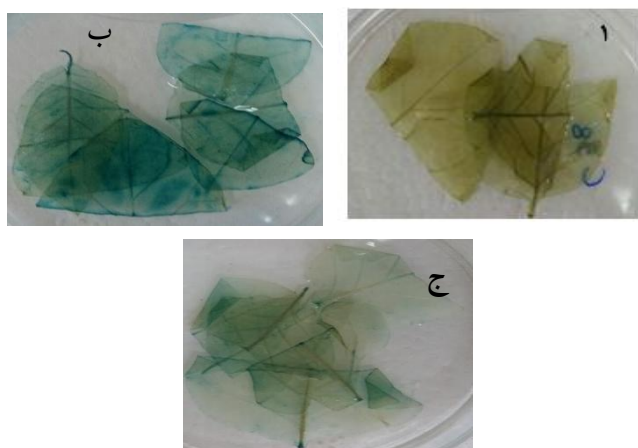
شکل ۳- تأیید مراحل جداسازی و همسانه‌سازی راه‌انداز ژن ObLins. الف) الکتروفورز محصول حاصل از واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Lins-F و Lins-R (چاهک ۱)، نشانگر اندازه DNA، ۱۰۰ جفت‌باز فرمتاز (M). ب) تأیید همسانه‌سازی قطعه راه‌انداز pObLins در ناقل pTG19-T با استفاده از هضم آنزیمی ناقل‌های نو ترکیب توسط آنزیم BamHI (چاهک ۱-۱). نشانگر اندازه DNA، ۱۰۰ جفت‌باز سیناکلون (M). ج) تأیید همسانه‌سازی توالی جداسازی شده راه‌انداز pObLins در ناقل pBI121 توسط آنزیم‌های برشی BamHI و HindIII (چاهک ۲ و ۳)، نشانگر اندازه DNA، لاند (M)

Box، DRE2 و CBFHV و محل اتصال فاکتورهای نسخه برداری مؤثر در نسخه برداری ObLins در مواجهه با تنش کم آبی وجود دارد (جدول ۲). در تنش خشکی بیان مؤثر فاکتورهای رونویسی مرتبط از جمله MYB و MYC افزایش می یابد (Skibbe et al. 2008; Wu et al. 2009; Wang et al. 2019). بیان آنها و اتصال به جایگاه تنظیمی خود بر روی ژن مذکور، میزان فراورده نهایی لینالول تحت تاثیر قرار می گیرد. در گیاهان بیشترین پروتئین های MYB متعلق به زیر خانواده R2R3-MYB است و نقش مهمی در کنترل فرآیندهای اختصاصی گیاه شامل متابولیسم اولیه و ثانویه، توسعه سلول و پاسخ به تنش های زیستی و غیرزیستی دارد.

مطالعات پیشین صورت گرفته در گیاه ریحان تحت سطوح متفاوت تنش خشکی نشان داده است که میزان ترپنوئیدهای فرار تحت تنش های خشکی افزایش می یابد (Simon 1992; Omidbaigi et al. 2003; Khalid 2006; Radcáši et al. 2010; Ekren et al. 2012; Abdollahi mandoulakani et al. 2017; Rezayee et al. 2020; Palesh and Abdollahi mandoulakani; Karimi and Abdollahi Mandoulakani, 2021). به دنبال مطالعات صورت گرفته، مطالعه حاضر نیز افزایش بیان ژن کلیدی مسیر بیوسنتز لینالول در سطح mRNA در شرایط تنش خشکی نشان داد. برای تعیین ارتباط بین مطالعه بیان ژن و عناصر تنظیمی مؤثر در شرایط تنش خشکی آنالیز راه انداز این ژن نشان داد که در راه انداز این ژن عناصر تنظیمی پاسخ دهنده به تنش های خشکی شامل MBS، MYB-site، WRKY710S، W-Box، CCAAT-

جدول ۲- نوع، تعداد و نقش عناصر تنظیمی پیش بینی شده در راه انداز pObLins در توده بذری ۱ ریحان

نام عنصر	تعداد	توالی و عملکرد
ABRE	۵	ACGTG عناصر تنظیمی <i>cis-acting</i> در پاسخ به آیزیک اسید
CCAAT-Box	۲	CCAATT محل اتصال فاکتور نسخه برداری MYBHv1
CGTCA-motif	۳	CGTCA عناصر تنظیمی <i>cis-acting</i> در پاسخ به متیل جازمونات
G-Box	۳	CACGTT عناصر تنظیمی <i>cis-acting</i> در پاسخ به تنش زیستی
TCA-element	۲	AACGAC عناصر تنظیمی <i>cis-acting</i> در پاسخ به اکسین
TGACG-motif	۲	TGACG عناصر تنظیمی <i>cis-acting</i> در پاسخ به متیل جازمونات
MSA-like	۳	(T/C)C(T/C)AACGG(T/C)(T/C)A عناصر تنظیمی <i>cis-acting</i> در تنظیم چرخه سلولی
MBS	۲	GTCAAC مکان اتصال فاکتور نسخه برداری MYB در پاسخ به تنش خشکی و بیوسنتز فلاونوئید
MYB-site	۱	CCGTTG مکان اتصال فاکتور نسخه برداری MYB
WRKY710S	۸	TGAC جایگاه اتصال فاکتور نسخه برداری MYB-WRKY
W-box	۴	TGACT جایگاه اتصال WRKY در بسیاری از پروسه های فیزیولوژیکی
E-box	۲	CANNTG عناصر تنظیمی <i>cis-acting</i> محل اتصال فاکتور BHLH در پاسخ به نور
DRE2COREZMRAB12	۱	ACCGAC عناصر پاسخ دهنده به خشکی در مسیر تولید ABA
MYCCONSENSUSAT	۲	CANNTG مکان شناسایی MYC درگیر در پاسخ به تنش کم آبی و سرما
CBFHV	۲	GTCGAC عناصر تنظیمی در پاسخ به تنش خشکی



شکل ۴- بیان هیستوشیمیایی ژن گزارشگر β -گلوکورونیداز (*GUS*) در توتون ترانسژنیک. الف) کنترل منفی: آگروباکتریوم بدون پلاسمید نوترکیب، ب) رنگ آمیزی موقت ژن گزارشگر *GUS* تحت هدایت راه انداز ۳۵S (*CaMV 35S*) (*GUS*، ج) رنگ آمیزی موقت ژن گزارشگر *GUS* تحت هدایت راه انداز *pObLins* (*pObLins-GUS*)

از طرفی انواع مسیرهای فعال انتقال سیگنال در هر تنش و در هر گونه گیاهی کاملاً مجزا از یکدیگر است اما آن‌ها عناصر خاصی را در این مسیرها به اشتراک می‌گذارند. بنابراین برای روشن شدن عملکرد افتراقی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوستز مونوترپنوئیدها از جمله *Lins* تحت شرایط تنش خشکی و تعیین رابطه تنظیمی، تحقیقات بیشتری برای توضیح این مکانیسم پیچیده با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک مورد نیاز می‌باشد. به علاوه با توجه به بررسی توالی راه انداز این ژن و حضور عناصر و موتیف‌های تنظیمی مرتبط با تنش خشکی، برای تایید و شناخت نقش آن‌ها و سایر موتیف‌های تنظیمی در پاسخ به شرایط مختلف محیطی در فعالیت ژن *ObLins* لزوم مطالعه آن‌ها در هدایت ژن گزارشگر *GUS* تحت شرایط تنش خشکی مورد نیاز است.

بیان ژن گزارشگر *GUS* در گیاه توتون

جهت بررسی راه انداز جداسازی شده، توالی مذکور جایگزین راه انداز *CaMV 35S* در ناقل دوتایی *pBI121* شد. برای مقایسه بهتر بیان ژن *GUS* از راه انداز *CaMV 35S* در ناقل *pBI121* استفاده شد. دو سازه بیانی *pObLins::GUS* و *CaMV 35S::GUS* برای ترانسفورماسیون توتون از طریق روش آگرواینفیلتراسیون تحت خلاء استفاده شد (Wang et al. 2006). در نهایت پس از ۷۲ ساعت نمونه‌ها مورد سنجش هیستوشیمیایی *GUS* قرار گرفتند (Jeferson et al. 1987). بیان ژن *GUS* با دو سازه بیانی مذکور مشاهده شد (شکل ۴). آنالیز عناصر موجود در راه انداز *pObLins* نشان داد که با حضور عناصر پایه، این راه انداز قادر به هدایت و بیان ژن *GUS* می‌باشد. نتایج بیان هیستوشیمیایی ژن *GUS* فعالیت و عملکرد راه انداز *pObLins* را تایید می‌نماید. برای تایید نقش موتیف‌های تنظیمی مرتبط با تنش خشکی و شناخت نقش آن‌ها در فعالیت *ObLins* بررسی حضور این عناصر تنظیمی در هدایت ژن گزارشگر *GUS* تحت شرایط تنش خشکی مورد نیاز می‌باشد. به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده از الگوی بیان ژن *ObLins* و مشاهده تعداد عناصر تنظیمی در راه انداز *pObLins* می‌توان به این نتیجه رسید که عناصر تنظیمی پاسخ دهنده به نور، تنش خشکی، جایگاه فاکتورهای رونویسی *MYB*، *MYC* و سایر فاکتورهای در تنظیم ژن مذکور موثر هستند. بنابراین یکی از دلایل افزایش بیان این ژن در شرایط تنش خشکی می‌تواند مربوط به عناصر تنظیمی پاسخ دهنده به تنش خشکی باشد و افزایش میزان بیان این ژن در توده بذر مورد مطالعه نیز قابل انتظار است. میزان پایداری mRNA و راندمان متفاوت ترجمه بر تولید متابولیت‌ها می‌تواند مؤثر باشد. به علاوه مشاهده پروفیل بیان در پاسخ به تنش‌های گوناگون محیطی و سایر فاکتورهای غیرزیستی بیانگر تنظیم این مسیرها با افزایش شدت تنش و کاربرد انواع سیگنال‌های دفاعی یا زمان مورد مطالعه این مسیرها می‌باشد.

منابع

Abdollahi Mandoulakani B, Eyvazpour E, Ghadimzadeh M (2017) The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of

phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry* 139:1-7.

- Aboul-Maaty NAF, Oraby HAS (2019) Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bull Natl Res Cent* 43:25.
- Akula R, Gokare A (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6:1720-1731.
- Agarwal M, Hao Y, Kapoor A (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biological Chemistry* 281:37636-37645.
- Angelova Z, Georgiev S, Roos W (2006) Elicitation of plants. *Biotechnology Equipment* 20:72-83.
- Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock HP, Matros A, Petersek S (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology* 26:1301-1308.
- Dey N, Sarkar S, Acharya S, Maiti IB (2015) Synthetic promoters in planta. *Planta* 242:1077-1094.
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:933-938.
- Ekren S, Sönmez Ç, Özçakal E, Kurttaş YSK, Bayram E, Gürgülü H (2012) The effect of different irrigation water levels on yield and quality characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Agricultural Water Management* 109:155-161.
- Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* 6:78-84.
- Gang DR (2005) Evolution of flavors and scents. *Annual Review of Plant Biology* 56:301-325.
- Gosztola B, Sarosi SZ, Nemeth E (2010) Variability of the essential oil content and composition of chamomile (*Matricaria rectita* L.) affected by weather conditions. *Natural Product Communication* 5:465-470.
- Grausgruber- Groger S, Schmiderer C, Steinborn R, Novak J (2012) Seasonal influence on gene expression of monoterpene synthase in *Saliva officinalis* (Lamiaceae). *Journal of Plant Physiology* 169:353-359.
- Hartmann U, Sagasser M, Mehrtens F, Stracke R, Weisshaar B (2005) Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Molecular Biology* 57:155-171.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6:3901-3907.
- Karimi Goyjelo, Abdollahi Mandoulakani (2021) Isolation and characterization of cinnamate- 4-hydroxylase gene promoter in *Ocimum basilicum* L. *Modern Genetics Journal* 16:212-218 (In Farsi).
- Kicel A, Kurowska A, Kalembe D (2005) Composition of the essential oil of *Ocimum sanctum* L. grown in Poland during vegetation. *Journal of Essential Oil Research* 17:217-219.
- Kim Y, Morrison SL (2009) A Rapid and Economic In-House DNA Purification Method Using Glass Syringe Filters. *PloS one* 4:e7750.
- Kim KY, Lee HS, Min SS, Seol GH (2015) Neuroprotective Effect of (-)-Linalool against Sodium Nitroprusside-Induced Cytotoxicity. *Medicinal Chemistry* 5:178-182.
- Khakdan F, Ranjbar M, Nasiri J, Shahriari Ahmadi F, Bagheri A, Alizadeh H (2016) The relationship between antioxidant compounds contents and antioxidant enzymes under water stress in the cultivars of basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *Acta Physiologia Plantarum* 38:1-15.
- Kampranis SC, Ioannidis D, Purvis A, Mahrez W, Ninga E, Katerelos NA (2007) Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. *Plant Cell* 19:1994-2005.
- Khalid Kh (2006) Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs *Ocimum* sp.). *International Agrophysics* 20:289-296.
- Lane A, Boeckleemann A, Woronuk GN, Sarker L, Mahmoud SS (2010) A genomics resource for investigating regulation of essential oil production in *Lavandula angustifolia*. *Planta* 231:835-45.
- Liao Y, Shen Y, Chang J, Zhang W, Cheng S, Xu F (2015) Isolation, Expression, and Promoter Analysis of GbWRKY2: A Novel Transcription Factor Gene from *Ginkgo biloba*. *International Journal of Genomics* <https://doi.org/10.1155/2015/607185>
- Loreto F, Pollastri S, Fineschi S, Velikova V (2014) Volatile isoprenoids and their importance for protection against environmental constraints in the Mediterranean area. *Environmental and Experimental Botany* 103:99-106.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2014) The transcriptional regulatory network in the drought response and its cross talk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in Plant Science* 10:3389/fpls.2014.00170.
- Omidbaigi R, Hassani A, Sefidkon F (2003) Essential oil content and composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) at different irrigation regimes. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 6:104-108.
- Palesh H, Abdollahi Mandoulakani B (2020) The effect of drought stress on the expression of some genes involved in monoterpene and sesquiterpanes biosynthesis and essential oil compounds in basil. *Journal of Medicinal Plants* 19:204-212.
- Proshkina E, Plyusnin S, Babak T, Lashmanova E, Maganova F, Koval L, Platonova L, Shaposhnikov M, Moskalev A (2020) Terpenoids as Potential Geroprotectors. *Antioxidants* 9:529.
- Radácsi P, Inotai K, Sárosi Sz, Czövek P, Bernáth J, Németh É (2010) Effect of water supply on the physiological characteristic and production of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *European Journal of Horticultural Science* 75:193-197.
- Rezaie R, Abdollahi Mandoulakani B, Fattahi M (2020) Cold stress changes antioxidant defense system,

- phenylpropanoid contents and expression of genes involved in their biosynthesis in *Ocimum basilicum* L. Sci Rep 10:5290.
- Sambrook JF, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmiderer C, Grausgruber-Groger S, Grassi P, Steinborn R, Novak J (2010) Influence of gibberellin and daminozide on the expression of terpene synthases in common sage (*Salvia officinalis* L.). Journal of Plant Physiology 167:779-86.
- Simon JE, Reiss-bubenheim D, Joly RJ, Charles DJ (1992) Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. Journal of Essential Oil Research 4:71-75.
- Skibbe M, Qu N, Galis I, Baldwin IT (2008) Induced plant defenses in the natural environment: Nicotiana attenuate WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory. Plant Cell 20:1984-2000.
- Vickers C, Gershenzon J, Lerdau M, Loreto F (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. Nature chemical biology doi: 10.1038/nchembio.
- Vranova E, Coman D, Grussem W (2012) Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. Molecular plant 5:1-9.
- Wang R, Yan Y, Zhu M, Yang M, Zhou F, Chen H, Lin Y (2016) Isolation and Functional Characterization of Bidirectional Promoters in Rice. Frontiers in Plant Science 7:766.
- Wang J, Wang J, Yang H (2016) Identification and functional characterization of the NAC gene promoter from *Populus euphratica*. Planta 244:417-427.
- Wang J, Song L, Gong X, Xu J, Minhui L (2020) Functions of Jasmonic Acid in Plant Regulation and Response to Abiotic Stress. International Journal of Molecular Science 21:1446.
- Wang K (2006) Agrobacterium protocols. Humana press, New York, USA.
- Wu XL, Shiroto Y, Kishitani S, Ito Y, Toriyama K (2009) Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. Plant Cell Reports 28:21-30.
- Yadav R, Sangwan R, Sabir F, Srivastava A (2013) Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. Plant Physiology and Biochemistry 74:70-83.
- Zhou H, Shamala F, Yi X, Yan Z, Wei S (2020) Analysis of terpene Synthase family Genes in *Camellia sinensis* with an emphasis on Abiotic Stress conditions. Scientific reports 10:933.
- Zhang X, Niu M, Silva J, Zhang Y, Yuan Y, Jia Y, Xiao Y, Li Y, Fang L, Zeng S, Ma G (2019) Identification and functional characterization of three new terpene synthase genes involved in chemical defense and abiotic stresses in *Santalum album*. Plant Biology 19:115.