ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحه ۲۰۳ - ۱۹۳

همسانه‌سازی ملکولی، بیان و مشخصه‌یابی راه‌انداز پاسخ‌دهنده به تنش خشکی ژن لینالول سنتاز (*Lins*) در برخی از توده‌های 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*[1]، زهرا شیرازی[2]

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، پردیس فرزانگان، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۲- استادیار، بخش تحقیقات زیست فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

Khakdan F*[1], Shirazi Z[2]

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 بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. مونوترپن‌ها، سسکوئی ترپن‌ها و فنیل پروپانوئیدها حجم عمده اسانس ریحان را تشکیل می‌دهند. بخش قابل توجهی از ترپنوئیدها را ترکیب مونوترپن فرار لینالول تشکیل می‌دهد که به‌علت اثرات دفاعی، در مکانیسم تحمل گیاه در برابر انواع تنش‌های محیطی بسیار مورد اهمیت می‌باشد. آنزیم لینالول سنتاز (Lins) آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها، تبدیل پیش‌ماده اصلی مونوترپن‌ها (GPP) را به ترکیب نهایی لینالول را انجام می‌دهد. در تحقیق حاضر، برای بررسی تاثیر تنش خشکی بر شکل‌گیری و کنترل تنظیم نسخه‌برداری 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 (W1: ۷۵، W2: ۵۰ و W3: ۲۵ درصد ظرفیت زراعی)، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (qRT-PCR) بررسی شد. به‌منظور مطالعه نحوه تنظیم الگوی بیان ژن ObLins در شرایط تنش خشکی، جداسازی، مشخصه‌یابی، آنالیز عملکردی راه‌انداز pObLins نیز انجام گرفت. نتایج نشان داد، در راه‌انداز این ژن، عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش خشکی شامل MBS، MYB-site، WRKY710S، W-Box، CCAAT-Box، DRE2 و CBFHV و محل اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری مؤثر در نسخه‌برداری ژن ObLins در مواجه با تنش خشکی وجود دارد. بیان موقت ژن گزارشگر GUS تحت کنترل راه‌انداز pObLins در برگ‌های گیاه توتون نشان داد که با حضور cis-elementهای پایه و جایگاه اتصال فاکتورها و تقویت کننده‌های رونویسی، این راه‌انداز قادر به هدایت و بیان پایه این ژن است. با توجه به‌حضور عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیر زیستی در راه‌انداز ژن ObLins، انتظار می‌رود این راه‌انداز قادر به بیان ژن ObLins در پاسخ به تنش‌های محیطی با تنظیم میزان رونویسی آن باشد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
تنش خشکی
راه‌انداز
عناصر تنظیمی
لینالول

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

ریحان *Ocimum basilicum* L. (۲n=٤٨)، گیاهی دارویی و معطر از خانواده نعناعیان[1]، در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری، خصوصاً ایران رشد می‌کند و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان معطر برای تولید اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسانس ریحان در کرک‌های (تریکوم‌های[2]) غده‌ای موجود در سطح اندام‌های هوایی گیاه تجمع می‌یابد 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 به‌طور وسیعی برای درمان بیماری‌هایی مانند اسهال، سرفه، انگل‌های روده و ناراحتی‌های کلیه و کبد استفاده می‌شود و نیز در ترکیب با داروهای تب‌بر، ضدمالاریا، تسکین‌دهندگی درد، ضدافسردگی و ضدروماتیسم در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ekren et al. 2012).

مونوترپن‌ها، سسکوئی ترپن‌ها و فنیل پروپانوئیدها حجم عمده اسانس ریحان را تشکیل می‌دهند. بخش قابل توجهی از ترپنوئیدها را ترکیب مونوترپن فرار لینالول تشکیل می‌دهد که مقادیر آن در توده‌های مختلف بذری ریحان متأثر از شرایط آب و هوایی و مرحله نموی می‌باشد 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 مکانیسم‌های دفاعی و سازگاری به انواع تنش‌های محیطی تحت تاثیر قرار می‌گیرند. لینالول یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس گیاهان معطر خصوصاً گیاه ریحان می‌باشد که علاوه بر کاربرد آن در صنایع مختلف غذایی و دارویی و نیز در درمان سرطان، با داشتن خاصیت ضدتکثیری (Kim et al. 2015)، به‌علت اثرات دفاعی بر علیه آفات، در مکانیسم تحمل گیاه در برابر انواع تنش‌های محیطی بسیار مورد اهمیت می‌باشد (Gosztola et al. 2010).

لینالول عمدتاً از مسیر بیوسنتزی غیروابسته به موالونیک اسید (MEP) مشتق می‌شود. این مسیر با ترکیب پیروات و گلیسرآلدئید ۳- فسفات که منجر به تشکیل دی اکسی زایلولوز فسفات (DXP) شده شروع می‌شود و سپس توسط یک مرحله بازآرایی داخلی و احیا DXP، MEP تولید می‌شود. متعاقباً این ماده در سه مرحله آنزیمی منجر به تولید HMBPP می‌شود که در نهایت توسط آنزیم HMBPP رودکتاز (HDR) به پیش ماده‌های اساسی IPP و DMAPP تبدیل می‌شود. این دو پیش‌ماده، طی مراحلی و پس از تشکیل GPP، توسط آنزیم لینالول سنتاز (Lins) (آنزیم کلیدی و انتهایی مسیر) به سمت تولید ترکیب لینالول پیش می‌روند (شکل ۱) (Eisenreich et al. 2001). از طرفی سنتز شیمیایی این ترکیبات فرار سخت و پیچیده بوده و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد، تکیه به گیاهان معطر و بومی ایران خصوصا ریحان جهت استخراج این ترکیبات و شناخت افزایش میزان آن‌ها در دوره‌ای از رشد و در پاسخ به تنش‌های محیطی می‌تواند راهی بسیار باارزش و اقتصادی در تولید آن‌ها باشد.

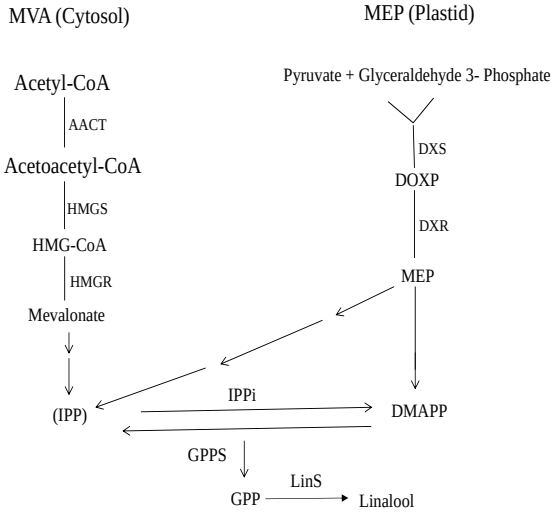
تنش خشکی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای غیرزیستی به‌شمار می‌آید که اثرات نامطلوبی بر رشد، باروری و متابولیسم گیاهان دارد (Akula and Gokare 2011). مطالعات نشان می‌دهد گیاهان برای حفظ حیات خود از تغییر متابولیسم سلولی خود در جهت افزایش سطوح ترپنوئیدها به‌عنوان بخشی از سیستم دفاعی برای رو به رو شدن با این چالش محیطی در پاسخ و سازگارشدن استفاده می‌نمایند (Khakdan et al. 2016). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که سطوح نسخه‌برداری و مقادیر مونوترپن‌ها تحت انواع تنش‌های محیطی از جمله خشکی در چندین گیاه دارویی از جمله ریحان با سنجش ظرفیت بیوسنتزی در سطح متابولیت افزایش می‌یابد (Schmiderer et al. 2010; Grausgruber-Groger et al. 2012; Yadav et al. 2013).

توالی‌های تنظیمی در ناحیه بالادستی ژن‌ها در فعال شدن و یا ممانعت از نسخه‌برداری در پاسخ به شرایط خاص محیطی و یا مراحل مختلف توسعه‌ای سلول نیز اهمیت به‌سزایی دارد (Butelli et al. 2008). امروزه رهیافت‌های مهندسی متابولیک برای افزایش غلظت متابولیت‌های خاص در یک مسیر متابولیکی به‌جای استفاده از راه‌اندازهای ساختاری و قوی، از راه‌اندازهای تغییریافته سنتتیک بر پایه توزیع مناسب عناصر تنظیمی مناسب و فعال

[1] Lamiaceae
[2] Trichomes

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

استفاده می‌شود. قطعاً چنین راه اندازهایی می‌تواند در تنظیم بهتر بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کلیدی مسیرهای اختصاصی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و متعاقباً تولید متابولیت‌های خاص با غلظت بیشتر مؤثر باشند (Dey et al. 2015).



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی لینالول

مطالعات نشان می‌دهد این عناصر تنظیمی در واقع کلیدهای ملکولی دخیل در تنظیم رونویسی ژن‌ها هستند و اثرات تنظیمی آن‌ها در ژن‌های مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها در تجمع محصولات نهایی مرتبط و بسیار مهم است و توسط شبکه پیچیده‌ای از پروتئین‌های تنظیم‌کننده نسخه‌برداری مانند پروتئین‌های MYC و MYB کنترل می‌شود (Liao et al. 2015; Wang et al. 2016). اما تاکنون اطلاعاتی درباره دومین‌های تنظیمی راه‌انداز ژن لینالول سنتاز (pObLins) و نقش آن‌ها در بیان این ژن در شرایط انواع تنش‌های محیطی در دسترس نمی‌باشد. بنابراین در این تحقیق برای شناخت بهتر مکانیسم تنظیمی ملکولی ژن لینالول سنتاز (*ObLins*) در مسیر بیوسنتز لینالول درشرایط تنش خشکی، پس از بررسی الگوی بیان این ژن درشرایط تنش خشکی، جداسازی راه‌انداز این ژن و رابطه میزان بیان این ژن با موتیف‌های تنظیمی مورد بررسی قرار گرفت و سپس در انتها بیان هیستوشیمیایی ژن گزارشگر *GUS*[1] تحت راه‌انداز مذکور در گیاه توتون ترانسژنیک برای اولین بار بررسی شد.

[1] b-glucuronidase

مواد و روش‌ها

بذور سه توده گیاه ریحان به‌ترتیب 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 ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد رشد یافتند. برای مطالعه پاسخ ژن *ObLins* به شرایط تنش خشکی، دو هفته پس از کشت بذرها، تیمارهای مختلف تنش خشکی به‌صورت وزنی در سه سطح تنش خشکی (W۱: ۷۵ ، W۲: ۵۰ و W۳: ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و گروه شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) بر روی گیاهچه‌ها اعمال شد. در ادامه گلدان‌ها به مدت ۲۹ روز تا انتهای مرحله گلدهی در ظرفیت زراعی موردنظر نگهداری شدند. در این آزمایش برای هر مرحله سه گلدان (تکرار) استفاده شد. برگ نمونه‌های برداشت شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

RNA کل از بافت‌های تیماریافته برگ توده‌های بذری مورد مطالعه ریحان در سطوح مختلف تنش خشکی با استفاده از محلول Biozol (شرکت Invitrogene، آمریکا) و مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استخراج شد. سپس کیفیت و کمیتRNA 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 کیاژن (Thermo Scientific, EU) برای ساخت cDNA استفاده شد. در نهایت غلظت cDNA رقیق نموده و به ٤۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رسانیده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به‌منظور بررسی کمی بیان ژن *ObLins* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی استفاده شد. ژن اکتین با شماره دسترسی AB002819 به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. واکنش‌ها با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل هشت میکرولیتر مخلوط دارای رنگ فلوئورسنت Eva Green (کیت شرکت Solis BioDyne)، ۱/۵ میکرولیتر cDNA رقیق شد (٦۰۰ng)، ۰/۲۵µM از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و برگشتی (Lins-F وLins-R) (جدول ۱) و آب دیونیزه در دستگاه Rotor-Gene 6000 ساخت شرکت Qiagen انجام شد. شرایط چرخه‌های دمایی به‌ترتیب شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه سپس ٤۵ چرخه با ۹٦ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشت‌سازی، برای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

اتصال ٦١ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٠ ثانیه و برای تکثیر ٧٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٠ 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 cDNAها سنجیده شد.

DNA ژنومی از توده بذری ١ با استفاده از روش CTAB جداسازی شد (Aboul-Maaty and Oraby 2019). سپس با استفاده از ساخت کتابخانه Genome Walker از *O. basilicum* با الگو گرفتن از Universal Genome Walker Kit (Clontech, USA) کار جداسازی راه‌انداز انجام گرفت. به‌طور خلاصه، رقت‌های متفاوت DNA به‌کمک آنزیم‌های برشی *Eco*RV (*Eco*321)، *Eco*RI و *Hin*dIII برش خورده و سپس به آداپتورهای دو رشته‌ای متصل شد. لیست توالی آغازگر و آداپتور در جدول ١ آورده شده است. سپس از DNA متصل به آداپتور به‌عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 ١). مرحله دوم شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی بود که از رقت‌های ١ دهم و پنج صدم محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مرحله اول به‌عنوان الگو برای آغازگرهای اختصاصی شماره ٢ به‌عنوان آغازگر رفت، آداپتور آغازگر به‌عنوان آغازگر برگشت استفاده شد. واکنش‌ها با استفاده از دستورالعمل touch-down PCR تکثیر یافت، به این ترتیب شامل ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه بود. سپس پنج چرخه با ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ٦٣ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ٧٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه و با ٢٦ چرخه با ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ٦١ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ٧٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه دنبال شد. سپس محصول تکثیریافته از روی ژل به روش glassmilk (Kim and Morrison 2009) خالص‌سازی نموده و در ناقل pTG19-T (شرکت سیناکلون) همسانه‌سازی 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 آنلاین BLAST انجام و صحت قطعه به‌دست‌آمده تایید شد. سپس از نرم‌افزارهای TSSP و BDGP برای یافتن نقطه آغازرونویسی[1] و از برنامه‌های برخط PLANTCARE[2]، PLACE[3] و PlantPAN[4] برای یافتن عوامل رونویسی و موتیف‌های عملکردی مختلف در توالی موردنظر استفاده شد.

[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 ١- 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'- CCTCGTTCTTCCTCCTCCTG-3
Actin- F	5'- TCTATAACGAGCTTCGTGTTG-3'
Actin- R	5'- GAGGTGCTTCAGTTAGGAGGAC-3'
Adapt-1	5'- CTATAGTGACTGCTGGTCGAGGGCCCGGGCTGGT-3'
Adapt-EcoV	5'- ACCAGCCC-3'
Adapt-EcoR	5'- AATTACCAGCCC-3'
Adapt-Hind	5'- TCGAACCAGCCC-3'
pLins آغازگر اختصاصی ١-	5'- ATG AGA GGA GTT GAA CTT AGA GGC ACT- 3
pLins آغازگر اختصاصی ٢-	5'- TCC CCG TTG AAT TGA TGT TTT TGC G-3'

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

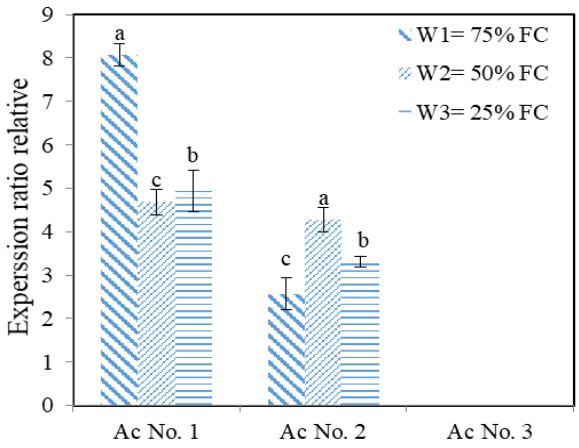
برای ساخت سازه ژنی شامل pOblins که به ژن گزارشگر متصل شده است، ناقل pTG19-T حاوی pOblins و ناقل دوگانه pBI121 با دو آنزیم برشی *Bam*HI و *Hin*dIII برش داده شد. سپس pOblins به داخل ناقل pBI121 در محل راه‌انداز CaMV 35S الحاق شد. بنابراین قطعه راه‌انداز مورد نظر در ناحیه بالادست ژن گزارشگر *GUS* برای مطالعه 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 اگروباکتریوم 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 برگی توتون با استفاده از روش اگروایفیلتریشن 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 برگی 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 معنی‌داری داشت. هر چند، این ژن در توده بذری ۲ در شرایط سطح تنش ۷۵ درصد ظرفیت زارعی 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 ٤/٦٨ و ٤/٩٨ 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= ۷۵ درصد ظرفیت زراعی، W2= ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و W3= ۲۵ 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

داد که به‌همراه 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 نسخه‌های این ژن نیز در دو سطح آخر تنش نیز کاهش یافت. اگرچه در توده بذری ۲ تحت تیمار W۱ افزایش تعداد نسخه‌های ژن *ObLins* با عدم حضور این ترکیب در داده‌های GC-MS هماهنگی نداشت اما همراه با افزایش ترکیب لینالول در سطح W۲ میزان بیان این ژن نیز افزایش معنی‌داری نشان داد و در ادامه کاهش بیان این ژن با کاهش مقدار این ترکیب در W۳ همراه بود.

بیان متعادل و هم‌زمان در سطح mRNA و متابولیت بیانگر تنظیم ژن *ObLins* در توده بذری ۱ در شرایط تنش خشکی می‌باشد. سطوح مونوترپن‌ها اساساً از طریق سطح mRNA مونوترپن سنتتازها تنظیم می‌شوند (Dudareva et al. 2005; Kampranis et al. 2007; Lane et al. 2010; Grausgruber- Groger et al. 2012; Zhang et al. 2019) بنابراین ارتباط مستقیم بین فروانی نسخه‌های *ObLins* و غلظت لینالول به‌صورت تنظیم وابسته به تنش خشکی[1] نشان‌دهنده نقش موثر این ترکیب در مواجه با تنش خشکی است. همچنین کنترل بیان این ژن نقش مهمی در کنترل هدایت پیش ماده‌های اصلی به سمت مسیر عمده متابولیکی بیوسنتز لینالول در توده‌های بذری مورد مطالعه ریحان در شرایط سطوح ذکر شده تنش خشکی دارد.

بیوسنتز، متابولیسم و تجمع متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر گونه، شرایط رشد، بافت گیاه و نیز مراحل توسعه‌ای و نموی می‌باشد (Akula and Gokare 2011; Angelova et al. 2006). مطالعات نشان می‌دهد به‌عنوان قسمتی از مکانیسم های دفاعی، گیاهان از ایزوپرونوئیدها برای حفاظت سلول‌ها در برابر تنش های محیطی از جمله خشکی و گرما استفاده می‌کنند. افزایش میزان مونوترپن‌ها در مواجه با تنش خشکی به‌عنوان ترکیبات آنتی اکسیدانتی در مطالعات زیادی گزارش شده است (Vickers et al. 2009; Proshkina et al. 2020). در سطح مولکولی تحریک ژن‌های پاسخ دهنده از جمله بیوسنتز ترکیبات ثانویه فرار به‌عنوان پاسخی در جهت تحمل تنش در گیاهان برای سازگاری به شرایط نامطلوب محیطی کمک می‌کند. در بین ترکیبات فعال، ترپنوئیدها به‌عنوان بخشی از سیستم دفاعی به گیاه برای مقابله با شرایط غیرطبیعی کمک می‌نماید (Vickers et al. 2009; Loreto et al. 2014). عموماً مکانیسم تنظیم‌کننده بر سرعت تولید و تجمع ترکیبات مهم فرار موجود در اسانس گیاهان معطر و دارویی در شرایط مختلف نامطلوب محیطی مرتبط با کنترل فعالیت‌های نسخه‌برداری و آنزیماتیکی ژن‌ها و آنزیم‌های درگیر در مسیرهای متابولیک می‌باشد که معمولاً در سطوح مختلف نسخه‌برداری ژن، پروسه‌هایی از جمله تغییرات پس از نسخه‌برداری، ترجمه و تغییرات پس از ترجمه قابل انتظار است (Vranova et al. 2012). بنابراین افزایش نسخه‌های 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.

همسانه‌سازی و آنالیز توالی راه‌انداز 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 می‌باشد. به لحاظ تکاملی، احتمالا 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 به‌واسطه افزایش این ترکیب بیشتر احساس می‌شود و نهایتاً مسیر بیوسنتزی در این توده بذری بیشتر به سمت تولید لینالول متمایل شده است. بنابراین سلول‌های موجود در هر توده بذری با توجه به شرایط محیطی، در جهت افزایش بیان ژن مورد نظر سازمان‌دهی ژنومی و بیوشیمیایی خود را برای سازگاری با محیط تغییر می‌دهد. هر ژنی برای بیان در شرایط مختلف گیرنده‌های تنظیمی و بیولوژیکی متفاوتی دارد تا کمپلکس‌های پروتئینی بتوانند پاسخ‌های دفاعی گیاه را به خاطر حضور این گیرنده‌ها تحریک کنند (Wang et al. 2016; Wang et al. 2020). بنابراین برای به‌دست آوردن دید وسیع‌تری به دستگاه تنظیمی بیان ژن مذکور در ریحان در طول پاسخ دفاعی گیاه به تنش خشکی، شناسایی موتیف‌های تنظیمی راه‌انداز این ژن ضروری به‌نظر می‌رسد و به‌علاوه امکان مطالعه گسترده‌تری بر تنظیم بیان ژن در شرایط تنش خشکی فراهم می‌نماید. بنابراین توده بذری ۱ با میزان بیان بیشتر این ژن در

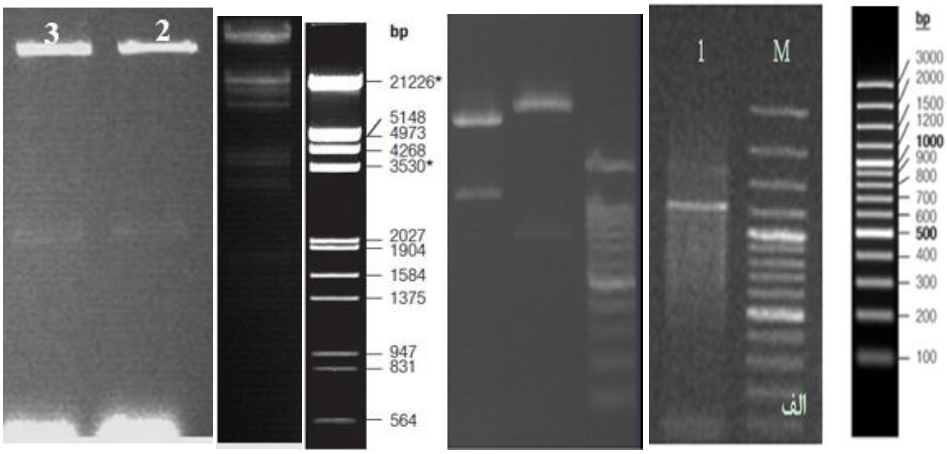
[1] Drought stress-dependent regulation or Drought stress-specific manner

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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 تکثیریافته در ناقل pTG19-T الحاق شد و این همسانه‌سازی با استفاده از آنزیم برشی *Bam*HI تائید شد (شکل ۳–ب)

ناقل‌های نوترکیب 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 جفت‌باز بالاتر از کدون شروع ترجمه (ATG) قرار گرفته است. توالی راه‌انداز برای حضور *Cis*-elementها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که راه‌انداز pObLins حاوی *Cis*-elementهای ضروری شامل جعبه TATA و CAAT می‌باشد. نتایج بررسی‌ها برای شناسایی حضور عناصر تنظیمی *Cis*-elementها 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 ایزوپرونوئیدهای گیاهی است. عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به الیسیتورهای 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).



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 فرمنتاز (M). ب) تایید همسانه‌سازی قطعه راه‌انداز pObLins در ناقل pTG19-T با استفاده از هضم آنزیمی ناقل‌های نوترکیب توسط آنزیم *Bam*HI (چاهک ۱–۱). نشانگر اندازه DNA، ۱۰۰ جفت‌باز سیناکلون (M). ج)تایید همسانه‌سازی توالی جداسازی شده راه‌انداز pObLins در ناقل pBI121 توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III. (چاهک ۲ و ۳)، نشانگر اندازه DNA، لاندا (M)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مطالعات پیشین صورت گرفته در گیاه ریحان تحت سطوح متفاوت تنش خشکی نشان داده است که میزان ترپنوئیدهای فرار تحت تنش‌های خشکی افزایش می‌یابد (Simon 1992; Omidbaigi et al. 2003; Khalid 2006; Radcási 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 2021). به‌دنبال 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 موثر در شرایط تنش خشکی آنالیز راه‌انداز این ژن نشان داد که در راه‌انداز این ژن عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش‌های خشکی شامل MBS، MYB-site، WRKY710S، W-Box، CCAAT-Box، DRE2 و CBFHV و محل اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری مؤثر در نسخه‌برداری ObLins در مواجه با تنش کم آبی وجود دارد (جدول ۲). در تنش خشکی بیان مؤثر فاکتورهای رونویسی مرتبط از جمله MYB وMYC افزایش می‌یابد (Skibbe et al. 2008; Wu et al. 2009; Wang et al. 2019) و سپس با افزایش بیان آن‌ها و اتصال به جایگاه تنظیمی خود بر روی ژن مذکور، میزان فراورده نهایی لینالول تحت تاثیر قرار می‌گیرد. در گیاهان بیشترین پروتئین‌های 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 تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد.

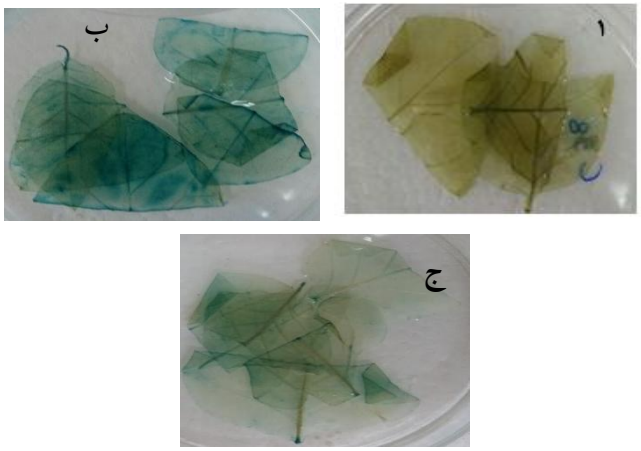
جدول ۲- نوع، تعداد و نقش عناصر تنظیمی پیش‌بینی شده در راه‌انداز pObLins در توده بذری ۱ ریحان

نام عناصر	تعداد	توالی و عملکرد
ABRE	۵	ACGTG عناصر تنظیمی *cis*-acting در پاسخ به آبسزیک اسید
CCAAT-Box	۲	CCAATT محل اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYBHv1
CGTCA-motif	۳	CGTCA عناصر تنظیمی *cis*-acting در پاسخ به متیل جازمونات
G-Box	۳	CACGTT عناصر تنظیمی *cis*-acting در پاسخ به تنش زیستی
TCA-element	۲	AACGAC عناصر تنظیمی *cis*-acting در پاسخ به اکسین
TGACG-motif	۲	TGACG عناصر تنظیمی *cis*-acting در پاسخ به متیل جازمونات
MSA-like	۳	(T/C)C(T/C)AACGG(T/C)(T/C)A عناصر تنظیمی *cis*-acting در تنظیم چرخه سلولی
MBS	۲	GTCAAC مکان اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYB در پاسخ به تنش خشکی و بیوسنتز فلانوئید
MYB-site	۱	CCGTTG مکان اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYB
WRKY710S	۸	TGAC جایگاه اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYB-WRKY
W-box	٤	TGACT جایگاه اتصال WRKYدرگیر در بسیاری از پروسه‌های فیزیولوژیکی
E-box	۲	CANNTG عناصر تنظیمی *cis*-acting محل اتصال فاکتور BHLH در پاسخ به نور
DRE2COREZMRAB12	۱	ACCGAC عناصر پاسخ‌دهنده 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

بیان ژن گزارش‌گر *GUS* در گیاه توتون

جهت بررسی راه‌اندازجداسازی شده، توالی مذکور جایگزین راه‌انداز CaMV 35S در ناقل دوتایی pBI121 شد. برای مقایسه بهتر بیان ژن *GUS* از راه‌انداز CaMV 35S در ناقل pBI121 استفاده شد. دو سازه بیانی pObLins::GUS و CaMV 35S::GUS برای ترانسفورماسیون توتون از طریق روش اگروباکتریوم تحت خلاء استفاده شد (Wang et al. 2006). در نهایت پس از ۷۲ ساعت نمونه‌ها مورد سنجش هیستوشیمیایی GUS قرارگرفتند (Jeferson et al. 1987). بیان ژن *GUS* با دو سازه بیانی مذکور مشاهده شد (شکل ٤). آنالیز عناصر موجود در راه‌انداز pObLins نشان داد که با حضور عناصر پایه، این راه‌انداز قادر به هدایت و بیان ژن *GUS* می‌باشد. نتایج بیان هیستوشیمیایی ژن *GUS* فعالیت و عملکرد راه‌انداز 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 به‌دست آمده از الگوی بیان ژن ObLins و مشاهده تعداد عناصر تنظیمی در راه‌انداز pObLins می‌توان به این نتیجه رسید که عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده 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 پاسخ‌دهنده به تنش خشکی باشد وافزایش میزان بیان این ژن در توده بذری مورد مطالعه نیز قابل انتظار است. میزان پایداری mRNA و راندمان متفاوت ترجمه بر تولید متابولیت‌ها می‌تواند مؤثر باشد. به‌علاوه مشاهده پروفیل بیان در پاسخ به تنش‌های گوناگون محیطی و سایر فاکتورهای غیرزیستی بیانگر تنظیم این مسیرها با افزایش شدت تنش و کاربرد انواع سیگنال های دفاعی یا زمان مورد مطالعه این مسیرها می‌باشد.



شکل ٤- بیان هیستوشیمیایی ژن گزارشگر β- گلوکورونیداز (*GUS*) در توتون ترانسژنیک. الف) کنترل منفی: اگروباکتریوم بدون پلاسمید نوترکیب، ب) رنگ آمیزی موقت ژن گزارشگر *GUS* تحت هدایت راه‌انداز ۳۵S (CaMV 35S-GUS)، ج) رنگ‌آمیزی موقت ژن گزارشگر *GUS* تحت هدایت راه‌انداز 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 بیوسنتز 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. به‌علاوه با توجه به بررسی توالی راه‌انداز 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 موردنیاز است.

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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, Peterek 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, Kalemba 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, Boecklemann 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 Science10.3389/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,

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

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, Gruissem 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 Science7:766.
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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]