

ORIGINAL ARTICLE

Expression analysis of key genes involved in terpenes biosynthesis and antioxidant enzymes in hairy root of *Origanum vulgare* elicited with methyl jasmonate

Faezeh Alibabaei¹, Forough Sanjarian^{2*}, Nima Ahmadi³

¹Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

²Department of Plant Bioproducts, Agricultural Biotechnology Research Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

³Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Correspondence

Forough Sanjarian

Email: fsanjarian@nigeb.ac.ir

How to cite

Alibabaei, F., Sanjarian, F., & Ahmadi, N. (2023). Expression analysis of key genes involved in terpenes biosynthesis and antioxidant enzymes in hairy root of *Origanum vulgare* elicited with methyl jasmonate. *Crop Biotechnology*, 12(41), 11-21

ABSTRACT

In the current study, the effects of three levels of methyl jasmonate concentration were studied on the hairy root cultures of *Origanum vulgare*. For this purpose, *A. rhizogenes* strain A13 was used to create stable hairy root lines from shoot explants. In this regard, two co-cultivation media (MS and modified MS), two inoculation times (5 and 10 min) as well two concentrations of acetosyringone (0 and 100 μ M) were attentively studied. Propagated hairy roots were treated with different concentrations of methyl jasmonate (0.1, 0.2, and 0.5 μ M). Sampling after 24 and 96 h of methyl jasmonate application, the activities of antioxidant enzymes were evaluated. Moreover, the gene expression level of *OvDXR* and *OvTPS2*, two important genes involved in the MEP pathway, were studied using real-time PCR technique. The highest transformation rate was observed in the explants cultured modified MS which were incubated in the bacterial suspension with acetosyringone for 10 minutes. The biomass of hairy root cultures was significantly decreased by methyl jasmonate compared to control samples. In addition, the results indicated that the concentration of methyl jasmonate, harvesting time, and their interactions significantly affected the activity of catalase, peroxidase, and SOD enzymes. The expression of *OvDXR* significantly increased after 24 h of treatment by 0.2 μ M methyl jasmonate, while in the same sample, the expression of *OvTPS2* decreased noticeably. The expression of *OvDXR* and *OvTPS2* genes was significantly increased by 0.5 μ M methyl jasmonate after 96 h. The application of methyl jasmonate as an efficient elicitor in hairy root culture system of *O. vulgare* is suggested for the production of valuable metabolites.

KEYWORDS

Catalase, Gene expression analysis, Peroxidase, Transformation rate.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی بیان ژن‌های کلیدی درگیر در سنتز ترپن‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موپین *Origanum vulgare* در پاسخ به متیل جاسمونات

فائزه علی بابایی^۱، فروغ سنجریان^{۲*}، نیما احمدی^۳

چکیده

در این مطالعه تاثیر سه غلظت از محرک متیل جاسمونات بر تولید متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌موپین *Origanum vulgare* بررسی شد. به این منظور، سویه A13 باکتری *Agrobacterium rhizogenes* برای تهیه لاین‌های پایدار ریشه‌موپین از ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در این راستا، دو محیط هم‌کشتی (MS و MS تغییر یافته)، دو زمان تلقیح (۵ و ۱۰ دقیقه) و دو غلظت استوسیرینگون (صفر و ۱۰۰ میکرومولار) آزمایش شدند. پس از تکثیر، ریشه‌های موپین با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میکرومولار) تیمار شدند. بعد از ۲۴ و ۹۶ ساعت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شد. علاوه بر آن، بیان ژن‌های *OvDXXR* و *OvTPS2*، دو ژن کلیدی مسیر MEP، با تکنیک Real time PCR بررسی شد. بیشترین نرخ تراریختی در ریزنمونه‌های کشت شده در MS تغییر یافته، بعد از ۱۰ دقیقه غوطه‌وری در سوسپانسیون باکتری همراه با استوسیرینگون به غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود. ریشه‌های موپین تیمار شده با متیل جاسمونات در مقایسه با شاهد بطور معنی‌داری بیوماس کمتری تولید کردند. همچنین نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات، زمان برداشت و همچنین اثر متقابل آن‌ها بطور معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز تاثیر دارند. مقدار بیان ژن *OvDXXR* پس از ۲۴ ساعت از تیمار با ۰/۲ میکرومولار متیل جاسمونات، افزایش معنی‌داری داشت، در حالیکه در همین نمونه بیان *OvTPS2* بطور معنی‌داری کاهش یافت. بیان هر دو ژن *OvDXXR* و *OvTPS2* پس از ۹۶ ساعت از تیمار با ۰/۵ میکرومولار متیل جاسمونات افزایش معنی‌داری نشان داد. کاربرد متیل جاسمونات بعنوان یک محرک کارآمد در سیستم کشت ریشه‌موپین *O. vulgare* می‌تواند برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند باشد.

واژه‌های کلیدی

آنالیز بیان ژن، پراکسیداز، کاتالاز، نرخ تراریختی.

^۱ گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
^۲ گروه زیست‌فراورده‌های گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
^۳ گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

فروغ سنجریان

ایمانامه: fsanjarian@nigeb.ac.ir

استناد به این مقاله:

علی بابایی، فائزه، سنجریان، فروغ و احمدی، نیما (۱۴۰۲). بررسی بیان ژن‌های کلیدی درگیر در سنتز ترپن‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه‌های موپین گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) در پاسخ به متیل جاسمونات. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۱)، ۲۱-۱۱.

مقدمه

کشت ریشه‌های موبین گیاهان دارویی و معطر از جمله فناوری‌های مورد استقبال برای تولید متابولیت‌های ثانویه و ارزشمند دارای خواص دارویی در دهه‌های اخیر بوده است (Gantait & Mukherjee, 2021). ریشه‌های موبین دارای ویژگی‌هایی نظیر انشعابات فرعی فراوان، نگه‌داری آسان، پایداری ژنتیکی و بیوسنتزی می‌باشند. بعلاوه زمان رشد ریشه‌های موبین سریع و زمان لازم برای دو برابر شدن آن کوتاه می‌باشد (et al., 2022). با توجه به اینکه ژنوم کامل ریشه‌های موبین اطلاعات لازم برای تولید متابولیت‌های تخصصی گیاه وجود دارد، استفاده از آن‌ها راهکاری سریع و کارآمد برای استخراج مواد موثره گیاهی است. علاوه بر این ریشه‌های موبین می‌توانند پلات فرمی برای تراریختی و دستکارهای مسیرهای بیوسنتزی گیاه نیز فراهم آورند (Gutierrez-Valdes et al., 2020). از طرف دیگر تغییر در مواد و شرایط محیط کشت و یا استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی در کشت ریشه‌های موبین بر روی میزان بیان ژن‌های درگیر تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیر گذاشته و راندمان تولید این متابولیت‌ها را تغییر می‌دهد (Kaur et al., 2021). بنابراین امکان تنظیم مسیر متابولیکی در کشت ریشه موبین فراهم است. به همین دلیل و با توجه به توسعه بیوراکتورهای کاملاً کنترل شده در مقیاس بزرگ اکنون این سیستم‌های بیانی آماده استفاده در صنایع مختلف مانند بخش‌های دارویی، آرایشی و غذایی هستند (Gutierrez-Valdes et al., 2020; Kaur et al., 2021).

گیاه مرزنجوش با نام علمی *Origanum vulgare* L. به آن مرزنجوش وحشی هم گفته می‌شود، متعلق به تیره نعناعیان Lamiaceae یا Labiatae می‌باشد. این جنس در منطقه مدیترانه و منطقه غربی و جنوب غربی اوراسیا پراکنده شده است. استفاده از این گیاه در ایران و سایر رستگاری‌های آن سابقه‌ای طولانی دارد و به عنوان گیاه ادویه‌ای و دارویی مصرف متداول دارد (Bharti & Vasudeva, 2013; Soltani et al., 2021). مواد شیمیایی گیاه *O. vulgare* بر اساس ویژگی‌های آب‌دوست شامل ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی و آب‌گریز که شامل ترکیبات ترپنوئیدها، تانن‌ها و استرول‌ها، تقسیم‌بندی می‌گردند (Morshedloo et al., 2018). اسانس مرزنجوش وحشی یک منبع عالی از مونوترپن‌های تک حلقه ای تیمول، گاماترپین، کارواکرول، و پی‌سیمن است (Soltani et al., 2021). دو مسیر بیوسنتزی موالونیک اسید (MVA) و مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) برای تولید ترپنوئیدها شناخته

شده‌اند (Koley et al., 2020). مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها مسیر MEP است که از هفت مرحله آنزیمی تشکیل شده است و در طی واکنش‌های متوالی، پیروات و گلیسرآلدئید-۳-فسفات تحت چگالش و احیا قرار می‌گیرند تا در نهایت ایزوپنتنیل‌دی‌فسفات (IPP) و دی‌متیل‌ایل‌دی‌فسفات (DMADP) تولید شوند. آنزیم‌های این مسیر توسط ژن‌های هسته‌ای کد می‌شوند و پروتئین‌های ساخته‌شده در سیتوپلاسم به پلاستیدها منتقل می‌شوند. آغاز مسیر MEP واکنش تراکم پیروات و گلیسر-آلدئید-۳-فسفات توسط آنزیم ۱-داکسی-D-گزیلولوز-۵-فسفات سنتاز (DXS) است که در طی آن ۱-داکسی-D-گزیلولوز-۵-فسفات (DXP) تولید شده، CO₂ آزاد می‌شود. آنزیم کلیدی این مسیر ۱-داکسی-D-گزیلولوز-۵-فسفات ردوکتوایزومراز (DXR) است که تبدیل برگشت ناپذیر DXP به ۲-C-میتیل-D-اریتریتول-۴-فسفات (MEP) را کاتالیز می‌کند. از طریق عمل متوالی سه آنزیم MEP به میتیل اریتریتول ۲،۴-سیکلودی‌فسفات (MEcPP) تبدیل می‌شود. در طی دو مرحله آنزیمی بعدی IPP و DMAPP تولید می‌شوند، سپس توسط ایزوپرن فسفات سنتازها به ژرانیل‌دی‌فسفات (GPP) پیش‌ساز مونوترپن‌ها، یا ژرانیل‌ژرانیل‌دی‌فسفات (GGPP) پیش‌ساز دی‌ترپن‌ها و یا فارنزیل‌دی‌فسفات (FPP) پیش‌ساز سسکویی‌ترپن‌ها تبدیل می‌شوند (Alfieri et al., 2022). ترپن سنتازها (TPs) آنزیم‌هایی هستند که پیش‌سازها را به متابولیت‌های نهایی تبدیل می‌کنند. آنزیم گاماترپین سنتاز (TPS2) دیگر آنزیم کلیدی در تولید متابولیت‌های ثانویه است و ساخت مونوترپن گاماترپین را کاتالیز می‌کند که این ماده توسط سیتوکروم‌های P450 به تایمول و کارواکرول تبدیل می‌شود (Huang et al., 2021; Azimzadeh et al., 2023).

یکی از راهکارهای افزایش راندمان تولید مواد موثره در ریشه‌های موبین استفاده از الیسیتورهاست. در مطالعه‌ای جامع در مورد الیسیتورهای زیستی انتخابی در ریشه‌های موبین گزارش شده که میتیل جاسمونات پرکاربردترین و موثرترین الیسیتور است (Alcalde et al., 2022). در این پژوهش، ریشه‌های موبین گیاه *Origanum vulgare* پس از القا تکثیر شدند و تاثیر الیسیتور میتیل جاسمونات بر روی تغییرات بیان ژن‌های کلیدی مسیر MEP و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در این ریشه‌های موبین بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و تکثیر ریشه‌مویین

بذر گیاه *Origanum vulgare* از شرکت زرین دشت ارومیه خریداری شد. بذرها با محلول هیپوکلریت ۱۰٪ ضد عفونی شده و در محیط 0.5X MS (Murashige & Skoog, 1962) جامد کشت شدند. ظروف کشت در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. برای تهیه ریزنمونه‌های استریل از گیاهان رشد کرده در اتاقک رشد استفاده شد. سویه *A13* باکتری *Agrobacterium rhizogenes* (موجود در بانک میکروارگانیزم پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) در محیط مایع LB تا رسیدن به OD_{600} بین ۰/۶ تا ۰/۸ در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. ریزنمونه زخمی شده ساقه گیاه در سوسپانسیون باکتری بهمراه دو سطح از استوسیرینگون صفر و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شد. پس از حذف باکتری‌های اضافی با کاغذ صافی استریل، ریزنمونه‌ها به محیط هم‌کشت انتقال داده شدند و در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. دو نوع محیط هم‌کشت استفاده شده در این مطالعه عبارتند از محیط کشت MS کامل و محیط MS تغییر یافته فاقد عناصر ماکرو. پس از هم‌کشتی ریزنمونه‌ها به محیط جامد دارای آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته در محیط کشت با شیب کاهشی غلظت آنتی‌بیوتیک واگشت شدند و در نهایت پس از گذشت ۲۱ روز از عمل تراریختی، ریشه‌مویین مشاهده گردید. بعد از اینکه ریشه‌های موئین به اندازه ۲ سانتی‌متر رشد کردند به محیط کشت مایع MS و روی شیکر ۱۰۰ دور در دقیقه منتقل شدند.

تراریختی ریشه‌های موئین، با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی ژن *rol B* روی DNA استخراج شده از ریشه‌های موئین اثبات شد. آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B* شامل آغازگر رفت: $5'GCTCTTGCAGTGCTAGATTT 3'$ و آغازگر برگشت: $3'GAAGGTGCAAGCTACCTCTC 5'$ بودند. برای اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی در ریشه‌مویین‌های کشت شده، وجود ژن *vir G* در DNA استخراجی از آن با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعات بعدی رده‌ای از ریشه‌مویین که دارای بیشترین و سریع‌ترین رشد بود انتخاب شده و در محیط کشت مایع تکثیر شد. منحنی رشد ریشه‌مویین برحسب وزن تر و در طی ۲۴ روز کشت، ترسیم شد.

اعمال تیمار متیل جاسمونات بر کشت ریشه‌های موئین

پس از تکثیر ریشه‌مویین و با توجه به منحنی رشد و در فاز صعودی آن، تیمار متیل جاسمونات در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میکرومولار با افزودن آن به محیط کشت انجام شد. برداشت نمونه‌ها پس از مدت زمان ۲۴ و ۹۶ ساعت از انجام تیمار صورت پذیرفت. نمونه‌ها بلافاصله بعد از برداشت به نیتروژن مایع منتقل شدند و تا انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

تهیه عصاره به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌ها

برای بررسی فعالیت آنزیم‌ها در ریشه‌مویین، ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم از نمونه با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی ساییده و بطور کامل هموزن شد. سپس ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سرد (pH 7.5) دارای EDTA به آن اضافه شد. هموزن حاصل در $1500 \times g$ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. روشناور حاصل در ارزیابی‌های آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار پروتئین کل موجود در روشناور حاصل توسط روش برادفورد (Bradford, 1976) تعیین شد.

بررسی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. مخلوط واکنش آنزیمی شامل: ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، بافر فسفات، NBT ۰/۷۵ میکرومولار، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و ربیوفلاوین ۷۵ میکرومولار بود. واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با روشن شدن لامپ فلورسنت (W40) آغاز شد و پس از ۱۵ دقیقه با خاموش کردن لامپ، واکنش متوقف گردید. از شاهد تاریکی برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. در هر بار سنجش در کنار نمونه‌های حاوی عصاره یک لوله آزمایش بعنوان شاهد روشنایی در نظر گرفته شد. در این نمونه به دلیل عدم وجود آنزیم، احیای NBT در حضور نور (احیای نوری) به طور ۱۰۰ درصد انجام و تمام نیترو بلو تترازولیوم موجود در مخلوط واکنش در حضور نور به فورمازون تبدیل می‌شود. میزان جذب شاهد روشنایی در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده ۱۰۰ درصد احیای نوری NBT است و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی است. بنابراین، یک واحد

دقیقه اندازه‌گیری شد و سپس با استفاده از ضریب خاموشی فعالیت واحد آنزیم بدست آمد.

بررسی آماری

طرح آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار زیستی بود. برای انجام تجزیه آماری و تجزیه واریانس با نرم افزار SAS نسخه ۹ انجام شد. مقایسه میانگین‌های صفات اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

بررسی بیان ژن

آغازگرها با استفاده از توالی mRNA ژن‌های موجود در پایگاه NCBI، و نرم‌افزار Perl Primer طراحی شدند. سپس آغازگرهای طراحی شده برای اطمینان از اختصاصی بودن آنها در پایگاه NCBI با سایر توالی‌ها BLAST شدند. مشخصات آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ آورده شده است.

استخراج RNA با استفاده از کیت GenUP™ Plant RNA kit شرکت Biotechrabbit (آلمان) و طبق دستورالعمل پیشنهادی انجام شد. بطور خلاصه، ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه گیاهی را به همراه ازت مایع کاملاً پودر نموده و سپس به آن ۴۵۰ میکرولیتر از بافر LYSIS LR اضافه گردید. پس از عبور نمونه‌ها از فیلتر آبی به محلول فیلتر شده هم حجم اتانول افزود شد و به فیلتر بنفش منتقل شدند. پس از سانتریفیوژ، صافی فیلتر بنفش با محلول‌های WASH A و WASH B شستشو داده شد. در نهایت RNA استخراجی با مقدار ۸۰ میکرولیتر آب DEPC از فیلتر شسته و جمع‌آوری شد. پس از تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراجی به ترتیب با استفاده از ژل آگاروز و نانودراپ، RNA استخراج شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگاهداری شدند.

آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیای نوری احیای نیترو بلو تترازولیوم (با جلوگیری از تبدیل آن به فورمازان) می‌گردد. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده مهار احیای نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه است. با محاسبه اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه‌ها محاسبه و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) در ۵۰ میکرولیتر عصاره بیان شد (Jahantigh et al., 2016).

بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

برای سنجش فعالیت پراکسیداز از سوبسترای گایاکول استفاده شد. به ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده، یک میلی‌لیتر بافر فسفات، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA یک میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار اضافه شد. مقدار جذب واکنش آنزیمی در طول موج ۴۷۰ نانومتر در زمان شروع واکنش به مدت یک دقیقه (هر ده ثانیه یکبار) خوانده شد. واحد فعالیت آنزیمی براساس میزان تترایاکول تشکیل شده پس از زمان یک دقیقه و ضریب خاموشی $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد.

بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز با پیگیری تجزیه آب اکسیژنه توسط آنزیم ارزیابی شد. برای اینکار مقداری از عصاره حاوی ۴۰ میکروگرم پروتئین با بافر فسفات به حجم دو میلی‌لیتر رسانده شده، در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار داده شد و دستگاه با آن کالیبره شد. سپس به آن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۳٪ پراکسید هیدروژن افزوده شد. تغییرات جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر در یک

جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده برای ارزیابی بیان ژن‌های *OvTPS2* و *OvDXR* در ریشه‌های موین مرزنجوش

Table 1. Primers for RT-PCR of *OvTPS2* and *OvDXR* genes in hairy roots of *Origanum vulgare*

طول محصول	T _m °C	توالی آغازگر	نام ژن
114	59.68	5'GGTAGTGATTTCAAGGCGA 3'	آغازگر رفت
	59.61	5'AAATACTCTTGCTTGCTCCA 3'	آغازگر برگشت
171	55.29	5'CTTCTATAACTTCTAGACCCT 3'	آغازگر رفت
	56.56	5'TGAGGCGTATAATCTTGAC 3'	آغازگر برگشت
166	59.15	5'CACCGTCCACTCTATTACC 3'	آغازگر رفت
	59.98	5'CATAACAGTCAACTTTCCGT 3'	آغازگر برگشت

قبل از ساخت cDNA، جهت حذف آلودگی با DNA، RNAهای استخراجی با استفاده از Dnase (Fermentas، Germany)، تیمار شدند. ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertUP™ II Reverse Transcriptase (Biotechrabbit، Germany) و آغازگر Oligo (dt) طبق دستورالعمل پیشنهادی انجام شد. برای بهینه سازی تکثیر و دمای اتصال آغازگر از واکنش زنجیره ای پلیمرز در شیب دمایی ۵۴ تا ۶۲ درجه سانتی گراد با دستگاه ترموسایکلر (MyCycler™، BIO RAD) انجام شد. با توجه به نتایج دمای اتصال واکنش Real-time PCR برای ژن *DXR* برابر ۵۵ درجه سانتی گراد و برای ژن های *TPS2* و *GAPDH* معادل ۵۹ درجه سانتی گراد انتخاب شد. برای واکنش پلیمرز در زمان واقعی و بررسی بیان ژن ها از مستر میکس Real Q Plus Master Mix Green without ROX (AMPLIQON، Denmark) استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۱۰ میکرولیتر که شامل ۵ میکرولیتر مستر میکس، ۱۰۰ نانومولار آغازگرهای رفت و برگشت، ۹۵ نانوگرم cDNA و ۳ میکرولیتر آب بود که در ۲ تکرار زیستی و ۳ تکرار تکنیکی با استفاده از دستگاه MIC PCR شرکت Bio Molecular Systems، کشور استرالیا انجام شد. میانگین سیکل های آستانه (CT) برای هر ژن محاسبه و نرمال سازی با استفاده از CT ژن مرجع انجام شد. سنجش تغییرات بیان ژن ها در نمونه های تیمار شده نسبت به شاهد با نرم افزار Rest2009 و روش فافل (Pfaffl، 2001) انجام شد.

نتایج و بحث

بی شک گیاهان بدلیل واقع شدن در مراحل ابتدایی زنجیره غذایی اهمیت غیر قابل انکاری در زندگی انسان دارند. اما این تنها دلیل

اهمیت این موجودات برای زیست انسانی نیست. گیاهان منبع بی همتا از محصولات طبیعی هستند که کاربردهای دارویی و غذایی-دارویی دارند. در حال حاضر ۶۶ درصد از داروهای ضد میکروبی و ۵۲ درصد از داروهای ضدسرطانی منشا گیاهی دارند و این درحالی است که قسمت عظیمی از پتانسیل واقعی گیاهان در درمان بیماری ها هنوز ناشناخته است (Gielecinska et al., 2021; Vaou et al., 2023). استفاده از سیستم های رایج کشت گیاه و تولید گیاه کامل برای مقاصد دارویی نه تنها به صرفه نیست، بلکه ممکن است موجب از دست رفتن ساختارهای کشاورزی در راستای امنیت غذایی شود. بنابراین راه حل جایگزین استفاده از تکنیک های کشت سلول و بافت برای تهیه متابولیت های ثانویه ارزشمند گیاهی است (Ozyigit et al., 2023). سیستم کشت ریشه موپین (HR) یک استراتژی جایگزین عالی برای سیستم کل گیاه برای تولید ترکیبات ارزشمند است (Gutierrez-Valdes et al., 2020).

گذشته از نوع گیاه و ویژگی های ژنتیک خاص آن، عوامل بسیاری بر فراوانی القا ریشه موپین تاثیر گذار هستند که می توان به عواملی از جمله سویه های مختلف باکتری *Agrobacterium rhizogenes* وجود و عدم وجود استوسیرینگون، زمان غوطه وری و همچنین نمک های موجود در محیط هم کشت اشاره کرد (Sathasivam et al., 2022). در این مطالعه از سویه *A13* باکتری *A. rhizogenes* جهت تراریختی گیاه *O. vulgare* استفاده شد و بعد از ۲۱ روز ریشه موپین ها ظاهر شدند. استوسیرینگون در دو سطح صفر و ۱۰۰ میکرومولار و زمان غوطه وری به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه بود. نتایج نشان داد بیشترین نرخ تراریختی (۱۰٪) در ریزنمونه هایی مشاهده شد که با استوسیرینگون به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه ور بودند (شکل ۱).



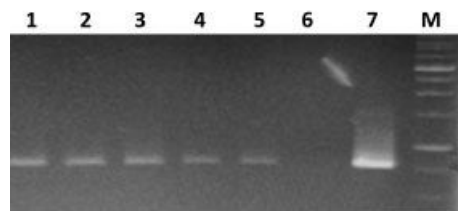
شکل ۱. مراحل مختلف القا و تکثیر ریشه موپین در مرزنجوش. الف. محیط آلقای ریشه موپین، ب. ریشه موپین القا شده در ریزنمونه ساقه ج. انتقال به محیط کشت مایع د. تکثیر در محیط کشت مایع

Figure 1. The stages of induction and proliferation of hairy roots in *Origanum vulgare* A. Cultivation in glass explants, B. Induced hairy root in stem explant C. Transfer to liquid culture medium D. Propagation in liquid culture medium

استفاده شد. تکثیر این ژن نشانگر درج موفق T-DNA در ژنوم و تراریختی ریشه‌های حاصل است (شکل ۲).

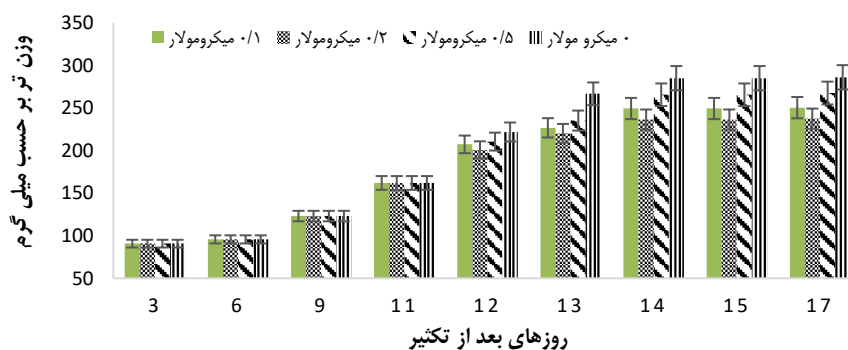
برای مطالعات بعدی رده‌ای از ریشه‌مویین که دارای سریع‌ترین رشد بود انتخاب و تکثیر شد. جهت بدست آوردن بهترین زمان اعمال ایسیاتور، رشد ریشه‌مویین برحسب وزن تر و در طی ۲۴ روز کشت مورد بررسی قرار گرفت، در روزهای ۱۶-۱۱ بعد از تکثیر، رشد ریشه‌های مویین القا شده به صورت صعودی بود (شکل ۳). براساس نتایج حاصله، اعمال ایسیاتور متیل جاسمونات در روز یازدهم کشت انجام شد. تغییرات وزن تر نمونه‌ها، در زمان‌های ۲۴ و ۹۶ ساعت بعد از اعمال ایسیاتور اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که تیمار با متیل جاسمونات باعث کاهش سرعت رشد نسبت به نمونه شاهد می شود. بیشترین کاهش در ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۲ میکرومولار متیل جاسمونات، و کمترین کاهش در تیمار ۰/۵ میکرومولار مشاهده شد (شکل ۳). کاهش وزن تر و خشک در اثر تیمار با متیل جاسمونات در ریشه‌های مویین گیاه بذربنج مشبک نیز گزارش شده است (Norozzi et al., 2018). در ریشه مویین گیاه شاییزک، تیمار با سالیسیلیک‌اسید منجر به کاهش رشد قابل ملاحظه در نمونه‌ها شد که این کاهش با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید تشدید گردید (Ahmadian Chashmi et al., 2010).

القا ریشه‌مویین در محیط هم‌کشتی MS تغییر یافته که فقط دارای $MgSO_4$ و نمک‌های میکرو بود، اتفاق افتاد. در سایر ریزنمونه‌ها ریشه‌مویین القا نشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که القای ریشه‌مویین با حذف عناصر میکرو از محیط هم‌کشتی به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. یکی از دلایل این موضوع می تواند حذف $CaCl_2$ باشد چون کلسیم اثر بازدارندگی بر بیان ژن‌های باکتریایی دارد. عوامل دیگری مانند کمبود PO_4 که در فعال کردن بیان ژن *vir G* دخیل است، نیز در این امر موثرند (Winans, 2010; Azadi et al., 1997; Flego et al., 1990). تنها یک مورد القای ریشه‌مویین در گیاه *O. vulgare* با استفاده از این محیط هم‌کشت گزارش گردیده است (Habibi et al., 2016). در مطالعه‌ای برای القا ریشه‌مویین از گیاه *Nepeta pogonosperma* با سویه‌های مختلف باکتری *A. rhizogenes*، بالاترین نرخ تراریختی با استفاده از محیط هم‌کشتی تغییر یافته مشابه بدست آمد (Valimehr et al., 2014). همچنین مشخص شده است که فقدان نمک‌های میکرو موجب افزایش درصد بالایی از نمونه‌های تراریخت شده گیاه دارویی *Ginkgo biloba* در محیط هم‌کشت می‌شود (Dupre et al., 2003). به منظور تایید تراریختی ریشه‌های مویین از روش PCR و تکثیر DNA با آغازگرهای اختصاصی ژن *rol B*



شکل ۲. اثبات تراریختی ریشه‌های مویین گیاه مرزنجوش با تکثیر اختصاصی ژن *rol B* ۱-۶ ریشه‌مویین‌های تراریخت، ۷ ریشه گیاه (شاهد منفی)، M باکتری *Agrobacterium rhizogenes* (شاهد مثبت)

Figure 2. PCR analysis of the *rol B* from hairy roots lines of marjoram, 1-5: transgenic hairy roots, 6: plant roots (negative control), 7: *Agrobacterium rhizogenes* (positive control), M: ladder



شکل ۳. نمودار رشد ریشه‌های مویین. اعمال تیمار متیل جاسمونات در روز یازدهم انجام شده است. تغییرات در رشد ریشه‌های مویین در روزهای بعد از تیمار معنی‌دار است. Figure 3. Growth chart of hairy roots. Methyl jasmonate treatment was applied on the 11th day. The changes in the growth rate are significant after the treatment.

بررسی نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس (جدول ۲)، نشان داد که اثر ساده غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات، اثر ساده زمان و همچنین اثر متقابل دوگانه بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز) در سطح یک درصد معنی‌دار است.

تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پس از اعمال ایسیتور متیل‌جاسمونات در گیاه کامل یا ریشه‌های مویین به دفعات گزارش شده‌است. بنابر اجماع موجود در اکثر مطالعات، اتصال متیل‌جاسمونات به گیرنده خود در غشا منجر به القای پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن در طی فرآیند پیام‌رسانی شده و متعاقب آن تغییر در فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز را بدنبال دارد (Ho *et al.*, 2020). در مطالعه حاضر نیز اثر هورمسیس (Hormesis effect) غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر میزان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز ۲۴ ساعت بعد از تیمار در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ میکرومولار نسبت به شاهد کاهش را نشان می‌داد، اما در غلظت ۰/۵ میکرومولار ۳/۹۹۸ برابر فعالیت نمونه شاهد بود. پس از ۹۶ ساعت از تیمار، بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۰/۱ میکرومولار سنجش شد که ۳/۹۹۷ برابر نمونه شاهد بود. فعالیت پراکسیداز در سایر نمونه‌های این ساعت کمتر از نمونه شاهد بود. بیشترین فعالیت کاتالاز ۲۴ ساعت پس از تیمار در نمونه تیمار غلظت ۰/۵ میکرومولار با افزایش ۴/۰۳ برابری نسبت به نمونه شاهد بود. تیمار ۰/۱ میکرومولار نیز افزایش ۱/۴۵ برابری نسبت به شاهد را نشان می‌داد. فعالیت کاتالاز ۹۶ ساعت بعد از تیمار در غلظت ۰/۱ با افزایش ۱/۶۷ برابری نسبت به شاهد همراه بود. در سایر نمونه‌ها فعالیت کاتالاز از شاهد کمتر بود. فعالیت سوپراکسیددیسموتاز ریشه‌های مویین ۲۴ ساعت بعد از تیمار

بر اثر غلظت‌های مختلف ایسیتور افزایش اندکی را نشان داد، اما ۹۶ ساعت بعد از اعمال غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات فعالیت آن در ۰/۱ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته، در ۰/۲ میکرومولار افزایش و در ۰/۵ میکرومولار دوباره کاهش یافت. تاثیرات غیرخطی غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز در *Haematococcus pluvialis* گزارش شده است (Raman & Ravi, 2011). همچنین اثر هورمسیس در تولید تانیشیون و اسیدهای فنلی برای غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید در ریشه‌های مویین گیاه *Salvia przewalskii* گزارش شده‌است (Li *et al.*, 2020). در ریشه‌های مویین گیاه بذربالنج مشبک نیز تیمار متیل‌جاسمونات منجر به تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز شد که این تغییرات با غلظت ایسیتور رابطه خطی نداشتند (Norozi *et al.*, 2018).

مطالعه بیان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی بمنظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بر همین اساس در این تحقیق بیان دو ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها تحت تاثیر محرک متیل‌جاسمونات مورد بررسی قرار گرفت. استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها در نمونه‌های شاهد و تیمار شده ۲۴ و ۹۶ ساعت بعد از اعمال غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات انجام شد. پس از حذف آلودگی DNA ژنومی با تیمار DNase، نسبت به ساخت cDNA اقدام گردید. سپس با بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها، پروفایل بیانی ژن‌های آنزیم ۱- D-گزیلولوز-۵-فسفات ردوکتوازیومراز (DXR) و آنزیم گاماترپین سنتاز (TPS) با واکنش پلیمرز در زمان واقعی مورد مطالعه قرار گرفت. تکثیر مطلوب و اختصاصی توالی هدف، در زمان‌ها و تیمارهای مختلف با بررسی منحنی ذوب هر ژن مشخص شد.

جدول ۲. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات و زمان‌های مختلف برداشت

Table 2. Analysis of variance of antioxidant enzymes in different concentrations of methyl-jasmonate and different harvesting times

منابع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین کل	کاتالاز	پراکسیداز	سوپراکسیددیسموتاز
غلظت (A)	۳	۰/۰۵۸۹۵۱۸۱ ^{ns}	۰/۰۰۸۲۴۴۴۴ ^{**}	۰/۰۳۹۶۴۷۸۷ [*]	۰/۰۰۰۱۰۵۲ ^{**}
زمان (B)	۱	۰/۲۳۵۷۱۶۰۶ ^{ns}	۰/۰۴۳۰۶۹۸۷ [*]	۰/۰۴۲۱۷۲۱۹ [*]	۰/۰۰۳۶۸۱ ^{**}
A*B	۳	۰/۰۳۲۲۸۶۰۷ [*]	۰/۰۱۲۴۵۲۱۰ ^{**}	۰/۰۲۰۷۳۶۸۶ [*]	۰/۰۰۰۰۸۳۳۴ ^{**}
خطای آزمایشی	۱۶	۰/۰۰۱۰۲۵۰۹	۰/۰۰۰۴۴۳۱۳	۰/۰۰۴۵۷۱۷۳	۰/۰۰۰۳۳۱۸۹

ns * و **: به ترتیب غیرمعنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.

متیل جاسمونات گزارش شد و تفاوت معنی داری بین ۱۰ و ۲۰۰ میکرومولار در *T. migricus* وجود نداشت. بالاترین سطح رونوشت *TPS2* برای *T. daenensis* در ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات (۶/۳۴ برابر شاهد)، در حالی که کمترین سطح در ۱۰ میکرومولار (۲/۳۴ برابر شاهد) مشاهده شد (Kianersi et al., 2021). در بومادران تیمار با متیل جاسمونات بیان ژن *DXR* را در بافت برگ و گل بطور معنی داری افزایش داد (Fathi et al., 2020). بررسی بیان همین ژن در گیاه زنیان پس از ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار متیل جاسمونات نشان داد که بیان این ژن در ساعت ۲۴ به حداکثر (بیش از دو برابر) می‌رسد. علاوه براین، مطالعه ترکیبات شیمیایی اسانس زنیان تیمار شده با متیل جاسمونات نیز مشخص کرد که مقدار گاماترپنین (پیش‌ساز مونونرین تایمول) نیز در همین ساعت افزایش قابل ملاحظه‌ای (از ۶۳/۲۱٪ به ۸۳/۷۸٪) داشت (Sadat Noori et al., 2019). قرار گرفتن کالوس زیره سیاه در معرض ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر AgNPs سبب افزایش قابل توجه بیان *C-TPS2* در ۲۴ ساعت پس از تیمار شد (Dehghani-Aghchekohal et al., 2022). بطور معمول بیان ژن‌های در سطح رونویسی با مقدار پروتئین (آنزیم) و فعالیت آن رابطه مستقیم دارد. از طرف دیگر میزان فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر نیز با مقدار متابولیت تولیدی ارتباط مستقیم دارد (Alberts et al., 2002; Hammerschmidt, 1999). استفاده از الیسیتور در کشت‌های ریشه‌مویین و کالوس و یا سوسپانسیون سلولی می‌تواند سبب فعال شدن واکنش‌های دفاعی در سلول‌های گیاه شود و افزایش بیان ژن‌های بیوسنتزی مواد موثره می‌تواند افزایش احتمالی تولید این متابولیت‌ها را بدنبال داشته باشد. (Giri and Zaheer, 2016; Fazili et al., 2022; Halder et al., 2019). برای بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه مورد نظر لازم است غلظت الیسیتور و زمان برداشت پس از اعمال آن بهینه‌سازی شوند. این پژوهش نشان داد که بیشترین افزایش بیان ژن‌های *DXR* و ژن *TPS2*، ژن‌های کلیدی در ابتدا و انتهای مسیر MEP، با اعمال متیل جاسمونات ۰/۵ میکرومولار و ۹۶ ساعت پس از اعمال آن اتفاق می‌افتد. لازم به ذکر است که مطالعه مقدار مونوترپن‌ها مورد نظر در ریشه‌مویین تیمار شده می‌تواند تکمیل‌کننده نتایج این پژوهش باشد.

References

- Ahmadian Chashmi, N., Sharifi, M., Karimi, F., & Rahnama, H. (2010). Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of *Atropa belladonna* L. by salicylic acid treatments. *Iranian Journal of Plant Biology*, 2(3), 63-76.
- Alcalde, M. A., Perez-Matas, E., Escrich, A., Cusido, R. M., Palazon, J., & Bonfill, M. (2022). Biotic

نتایج نشان داد که ژن *OvDXR* نمونه‌هایی که در معرض ۰/۲ میکرومولار متیل جاسمونات در مدت ۲۴ ساعت بودند دارای بیشترین بیان (۲/۱۱۸ برابر شاهد) بود. در نمونه‌هایی که در معرض ۰/۵ میکرومولار همین ساعت تغییرات معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند. پس از ۹۶ ساعت الگوی بیانی تغییر کرده و بیشترین بیان در این ساعت در نمونه‌های تیمار شده با ۰/۵ میکرومولار (۱/۹۵۴ برابر شاهد) بود و سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان ندادند. پس از ۲۴ ساعت از تیمار، بیان ژن *OvTPS2* در غلظت ۰/۲ میکرومولار نسبت به شاهد (۰/۷۰۸ برابر) کمتر شده بود و در سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. اما پس از ۹۶ ساعت تیمار ۰/۲ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن (۱/۵۹۲ برابر شاهد) شد. بیان ژن *OvTPS2* در غلظت ۰/۵ میکرومولار متیل جاسمونات ۹۶ ساعت پس از تیمار تفاوت فاحشی با سایر تیمارها (۹/۶۰۹ برابر شاهد) داشت. بنظر می‌رسد تأثیرپذیری ژن *OvTPS2* تاخیر بیشتری نسبت به ژن *OvDXR* داشته باشد.

جدول ۳. بیان نسبی ژن‌های *OvDXR* و *OvTPS2* در ریشه‌های مویین گیاه

مرزنجوش تیمار شده با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات در مقایسه با شاهد

Table 3. Relative expression of *OvDXR* and *OvTPS2* genes in hairy root of *Origanum vulgare* in response to treatment with different concentrations of methyl-jasmonate compared to the control

ژن	۲۴ ساعت بعد از اعمال الیسیتور			۹۶ ساعت بعد از اعمال الیسیتور		
	غلظت متیل جاسمونات			غلظت متیل جاسمونات		
	0.5 μM	0.2 μM	0.1 μM	0.5 μM	0.2 μM	0.1 μM
<i>OvDXR</i>	۱/۹۵۴↑	ns	ns	۲/۱۱۸↑	۱/۵۸↑	
<i>OvTPS2</i>	۹/۶۰۹↑	۱/۵۹۲↑	ns	۰/۷۰۸↓	ns	

ns، ↑ و ↓ به ترتیب غیرمعنی‌داری، بیان بیش از شاهد، بیان کمتر از شاهد

مطالعات اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر روی چند گونه آویشن از جمله *Thymus daenensis*، *T. vulgaris* و *T. migricus* نشان داد که حداکثر سطح بیان ژن *TPS2* در *T. vulgaris* و *T. migricus* با اعمال الیسیتور ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به ترتیب ۵/۵۹ و ۷/۴۷ برابر شاهد، قابل سنجش است. حداقل سطوح بیان در هر دو گیاه در تیمار با ۱۰ میکرومولار

elicitors in adventitious and hairy root cultures: A review from 2010 to 2022. *Molecules*, 27(16), 5253.

- Alfieri, M., Ambrosone, A., Vaccaro, M., De Tommasi, N., & Leone, A. (2022). Overcoming Metabolic Constraints in the MEP-Pathway Enrich *Salvia sclarea* Hairy Roots in Therapeutic Abietane Diterpenes. *Applied Sciences*, 12(14), 7116.

- Azadi, P., Chin, D. P., Kuroda, K., Khan, R. S., & Mii, M. (2010). Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture PCTOC*, 101(2), 201-209.
- Azimzadeh, Z., Hassani, A., Mandoulakani, B. A., Sepehr, E., & Morshedloo, M. R. (2023). Intraspecific divergence in essential oil content, composition and genes expression patterns of monoterpene synthesis in *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* and subsp. *gracile* under salinity stress. *BMC Plant Biology*, 23(1), 380.
- Baek, S., Han, J. E., Ho, T. T., & Park, S. Y. (2022). Development of hairy root cultures for biomass and triterpenoid production in *Centella asiatica*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(2), 148.
- Barros, J., & Dixon, R. A. (2020). Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends in plant science*, 25(1), 66-79.
- Bharti, V., & Vasudeva, N. (2013). *Oreganum vulgare* Linn. leaf: an extensive pharmacognostical and phytochemical quality assessment. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3(2), 277.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Dehghani-Aghchekohal, Z., Omid, M., Azizinezhad, R., & Etminan, A. (2022). Stimulation of secondary metabolites and γ -terpinene synthase by silver nanoparticles in callus cultures of *carum carvi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(7), 3228-3241.
- Dupre P, Lacoux Y, Neutelings G, Matar-Lavrain D, Flinaux MA, David A, Jacquin-Dubreuil A (2003). Genetic transformation of *Ginkgo biloba* by *A. tumefaciens*. *Physiol Plant*, 108:413-419.
- Fathi, I., Majdi, M., Maroufi, A., & Dastan, D. (2020). Expression pattern analysis of some genes involved in the biosynthetic pathway of terpenoids and phenylpropanoids in tissues, developmental stages and under methyl jasmonate treatment in yarrow (*Achillea millefolium* subsp. *millefolium*). *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 33(1), 76-86.
- Fazili, M. A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U., & Geelani, S. N. (2022). In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: A review. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 1-12.
- Flego, D., Pirhonen, M., Saarilahti, H., Palva, T. K., & Palva, E. T. (1997). Control of virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Microbiology*, 25(5), 831-838.
- Gantait, S., & Mukherjee, E. (2021). Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 35-53.
- Giełecińska, A., Kciuk, M., Mujwar, S., Celik, I., Kołat, D., Kałuzińska-Kołat, Ż., & Kontek, R. (2023). Substances of Natural Origin in Medicine: Plants vs. Cancer. *Cells*, 12(7), 986.
- Giri, C. C., & Zaheer, M. (2016). Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126, 1-18.
- Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K. M., Ritala, A., & Cardon, F. (2020). Hairy root cultures—a versatile tool with multiple applications. *Frontiers in plant science*, 11, 33.
- Habibi, P., de Sa, M. F. G., da Silva, A. L. L., Makhzoum, A., da Luz Costa, J., Borghetti, I. A., & Soccol, C. R. (2016). Efficient genetic transformation and regeneration system from hairy root of *Origanum vulgare*. *Physiology and molecular biology of plants*, 22(2), 271-277.
- Halder, M., Sarkar, S., & Jha, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in life sciences*, 19(12), 880-895.
- Hammerschmidt, R. (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 77-84.
- Ho, T. T., Murthy, H. N., & Park, S. Y. (2020). Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 716.
- Huang, Y., Xie, F. J., Cao, X., & Li, M. Y. (2021). Research progress in biosynthesis and regulation of plant terpenoids. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1799-1808.
- Jahantigh, O., Najafi, F., Badi, H. N., Khavari-Nejad, R. A., & Sanjarian, F. (2016). Changes in antioxidant enzymes activities and proline, total phenol and anthocyanine contents in *Hyssopus officinalis* L. plants under salt stress. *Acta Biologica Hungarica*, 67(2), 195-204.
- Kaur, G., Prakash, P., Srivastava, R., & Verma, P. C. (2021). Enhanced secondary metabolite production in hairy root cultures through biotic and abiotic elicitors. *Plant cell and tissue*

- differentiation and secondary metabolites: fundamentals and applications*, 625-660.
- Kianersi, F., Pour-Aboughadareh, A., Majdi, M., & Poczai, P. (2021). Effect of methyl jasmonate on thymol, carvacrol, phytochemical accumulation, and expression of key genes involved in thymol/carvacrol biosynthetic pathway in some Iranian Thyme species. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11124.
- Koley, S., Grafahrend-Belau, E., Raorane, M. L., Junker, B. H. (2020). The mevalonate pathway contributes to monoterpene production in peppermint. *bioRxiv*, 2020-05.
- Li, J., Li, B., Luo, L., Cao, F., Yang, B., Gao, J., & Hu, B. (2020). Increased phenolic acid and tanshinone production and transcriptional responses of biosynthetic genes in hairy root cultures of *Salvia przewalskii* Maxim. treated with methyl jasmonate and salicylic acid. *Molecular Biology Reports*, 47, 8565-8578.
- Maehly, A. C., & Chance, B. (1954). The assay of catalases and peroxidases. *Methods of biochemical analysis*, 1, 357-424. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Mondal, A., Bose, S., Mazumder, K., & Khanra, R. (2021). Carvacrol (*Origanum vulgare*): Therapeutic properties and molecular mechanisms. *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications*, 437-462.
- Morey, K. J., & Peebles, C. A. (2022). Hairy roots: An untapped potential for production of plant products. *Frontiers in Plant Science*, 13, 2808.
- Morshedloo, M. R., Salami, S. A., Nazeri, V., Maggi, F., & Craker, L. (2018). Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. *Industrial Crops and Products*, 119, 183-190.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Norozi, A., Hosseini, B., Jafari, M., & Farjaminezhad, M. (2018). Effects of methyl jasmonate on root growth, biochemical characteristics and h6h gene expression in *Hyoscyamus reticulatus* L. hairy roots. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 33(6), 1072-1084. doi: 10.22092/ijmapr.2018.110930.2051
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I. E., ... & Kaya, Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 14.
- Raman, V., & Ravi, S. (2011). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis*. *Acta physiologiae plantarum*, 33, 1043-1049.
- Sadat Noori, S. A., Jamshidi, M., & Mortazavian, M. M. (2019). Study the Quantitative Expression Pattern of Some Involved Genes on Monoterpenoid Biosynthesis Pathway and Identification of Essential Compounds Affected by Methyl jasmonate in Ajowan Plant. *Agricultural Biotechnology Journal*, 11(3), 133-152. doi: 10.22103/jab.2019.2478
- Sathasivam, R., Choi, M., Radhakrishnan, R., Kwon, H., Yoon, J., Yang, S. H., ... & Park, S. U. (2022). Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 983776.
- Sathasivam, R., Choi, M., Radhakrishnan, R., Kwon, H., Yoon, J., Yang, S. H., ... & Park, S. U. (2022). Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 983776.
- Soltani, S., Shakeri, A., Iranshahi, M., & Boozari, M. (2021). A Review of the Phytochemistry and Antimicrobial Properties of *Origanum vulgare* L. and Subspecies. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 20(2), 268.
- Valimehr S, Sanjarian F, Sohi HH, Sharafi A, Sabouni F. (2014). A reliable and efficient protocol for inducing genetically transformed roots in medicinal plant *Nepeta pogonosperma*. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 20(3):351-356.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041.
- Wilkesman, J., Castro, D., Contreras, L. M., & Kurz, L. (2014). Guaiacol peroxidase zymography for the undergraduate laboratory. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 42(5), 420-426.
- Winans, S. C. (1990). Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media. *Journal of bacteriology*, 172(5), 2433-2433.