مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه۱۶۶-۱۵۵

تاثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین روی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزامین در کنجد

Effect of salicylic acid and phenylalanine on expression of key genes involved in the sesamin biosynthesis pathway in sesame

شهره امان‌الهی[۱]، فاطمه دهقان نیری[۲،*]، میترا محمدی بازرگانی[۳]

Shohreh Amanelahy[1], Fatemeh Dehghan Nayeri[2*], Mitra Mohammadi Bazrgani[3]

۱- کارشناس‌ارشد، ۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

۳- استادیار پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

1. M.Sc. 2. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

3. Assistant Professor of Agriculture Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mitra_cb@yahoo.com
fatemeh_dn@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹)

چکیده

گیاه کنجد (*Sesamum indicum* L.) منبع منگنز، مس و سرشار از کلسیم، منیزیم، آهن، فسفر، ویتامین B1، روی و فیبرهای غذایی است. همچنین حاوی دو ترکیب منحصر به فرد از فیبرهای ویژه مفید گروه لیگنان‌ها با نام‌های سزامین و سزامولین می‌باشد که باعث کاهش کلسترول در بدن انسان می‌شوند. دراین تحقیق تاثیر الیسیتور اسیدسالیسیلیک و پیش ماده فنیل‌آلانین بر میزان بیان دو ژن کلیدی دخیل در بیوسنتز سزامین (*CYP81Q1* و *C3H*) در کشت سوسپانسیون سلولی کنجد بررسی گردید. تیمارهای اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین به ترتیب در غلظت‌های (۰/۱، ۰/۵ و ۱) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نمونه‌برداری انجام شد. بیان ژن‌ها با روش qRT-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز سزامین در همه نمونه‌های تیمار شده با اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین افزایش یافت. در مورد ژن *CYP81Q1* بیشترین افزایش بیان مربوط به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک در بازه زمانی ۷۲ ساعت و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین در بازه زمانی ۷۲ ساعت بود. بیشترین افزایش بیان ژن *C3H* مربوط به غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک در بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین در بازه زمانی ۷۲ ساعت بود.

واژه‌های کلیدی

کنجد،
سزامین،
اسیدسالیسیلیک،
فنیل‌آلانین،
qRT-PCR.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]

مقدمه

گیاهان دارویی از منابع قابل توجه در تهیه داروهای گیاهی و مصنوعی هستند و شرکت‌های داروسازی از بیش از ۲۵۰۰۰ گیاه برای تهیه داروها استفاده می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه مسئول خاصیت دارویی گیاهان هستند. اغلب متابولیت‌های ثانویه با قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش‌های گوناگون تولید می‌شوند. کشت سوسپانسیون سلولی شامل توده‌های سلولی پراکنده و در حال رشد در محیط کشت مایع در حال تکان خوردن است. شروع این کشت معمولاً با انتقال قطعات کوچکی از کالوس ترد و تمایز نیافته به محیط کشت مایع است. ارلن‌های حاوی ریزنمونه یا کالوس روی یک شیکر به طور یکنواخت و مداوم تکان داده می‌شوند. تکان دادن محیط کشت با استفاده از شیکر با اعمال فشار ملایمی بر توده‌های سلولی آن‌ها را به توده‌های کوچک‌تر و سلول-های انفرادی می‌شکند و پراکنش یکنواختی از سلول‌ها در محیط کشت ایجاد می‌شود. همچنین در اثر این حرکت، تبادل گازی مطلوبی بین محیط کشت و هوا برقرار می-شود. از کشت سوسپانسیون سلولی برای بررسی ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی و نیز به عنوان منبعی برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش استفاده می‌شود. کنجد احتمالا قدیمی‌ترین دانه روغنی است که توسط انسان شناخته و به عنوان یک منبع غذایی استفاده شده است کنجد سرشار از منگنز، مس، کلسیم، منیزیم، آهن، فسفر، ویتامین B1، روی و فیبرهای غذایی است. به جز این مواد مغذی مهم، کنجد حاوی دو ترکیب منحصر به فرد از فیبرهای ویژه مفید به نام لیگنان‌ها شامل سزامین و سزامولین است که باعث کاهش کلسترول در بدن انسان می‌شوند، از فشار خون بالا جلوگیری می‌کنند و مشتقات ویتامین E را در حیوانات افزایش می‌دهند. روغن کنجد در بین روغن‌های خوراکی به ملکه روغن‌ها مشهور است (Wahid, 2007; Moazzami et al., 2006). روغن کنجد حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و تاثیر چشمگیری در پیشگیری از بیماری‌های مختلف دارد (Hirose, 1991; Kang et al., 1999)، به دلیل کاربرد آن در درمان بیماری‌ها به خصوص سرطان‌ها در دهه گذشته تلاش‌های زیادی در راستای شناخت بیشتر فواید سزامین، ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز سزامین و افزایش میزان بیان ژن-های دخیل در مسیر بیوسنتز آن انجام شده است. یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر تولید سزامین ژن *CYP81Q1* است که با افزایش بیان آن در مراحل تشکیل دانه کنجد محتوای سزامین دانه افزایش می‌یابد. بطورکلی ترکیبی از انتقال ژن، نور، و الیسیتور یک استراتژی امیدوار کننده برای بهبود بیشتر تولید و بهره وری لیگنان ها از جمله سزامین می باشد (Satake et al., 2015)، که از سه عامل نام برده شده تا کنون فقط اثر دوره روشنایی بر رشد گیاهان، و محتوای سزامین و بیان ژن *CYP81Q1* درگیاه کنجد بررسی شده است (Hata et al., 2012). سنتز سزامین از پینورزینول توسط ژن *CYP81Q1* طی دو مرحله صورت می‌گیرد (Ono et al., 2006; Hata et al., 2010). روش RT-PCR کمی از معتبرترین روش‌های اندازه‌گیری بیان ژن می‌باشد. اساس این روش بر پایه نسبت بیان ژن موردنظر به بیان ژن خانه‌دار است. یکی از روش‌های نمایش داده‌های RT-PCR کمی روش CT مقایسه‌ای است که به عنوان روش $۲^{-\Delta\Delta CT}$ شناخته می-شود. در این روش $۲^{-\Delta\Delta CT}$ به عنوان Fold Change (FC) است یعنی ژن موردنظر چند برابر ژن خانه‌دار بیان شده است. از این روش برای بررسی بیان ژن در نمونه‌های مختلف نسبت به نمونه شاهد استفاده می‌شود. طی دهه-های اخیر تحقیق روی آنتی‌اکسیدان‌ها اهمیت زیادی پیدا کرده و مطالعه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در غذا و فواید سلامتی بالقوه آنها مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Qusti et al., 2010). هدف از این مطالعه بررسی تاثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین روی میزان بیان دو ژن دخیل در سنتز سزامین (*CYP81Q1* و *C3H*) در محیط کشت سوسپانسیون سلولی کنجد است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]

مواد و روش‌ها

کشت سوسپانسیون سلولی

دانه کنجد رقم کرج۱ از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. در این مطالعه از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) به عنوان محیط کشت پایه جهت کشت دانه و تولید گیاهچه درون شیشه‌ای، کالوس‌زایی و تهیه سوسپانسیون سلولی استفاده شد. برای این منظور دانه‌های کنجد ابتدا به مدت دو دقیقه در الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت‌سدیم ۲۰ درصد غوطه‌ور شدند و در نهایت با آب مقطر اتوکلاو شده ۳ مرتبه و هر بار به مدت دو دقیقه شستشو شدند. تمام مراحل ضدعفونی زیر هود لامینار و در ظروف استریل انجام گرفت. پس از ضدعفونی، دانه‌ها در ظروف کشت حاوی محیط MS فاقد هورمون و حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم شد. دانه‌ها به منظور جوانه‌زنی ۳ روز در تاریکی نگهداری و سپس به اتاق کشت با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. در این پژوهش از هیپوکوتیل گیاهچه‌های ۱۸ روزه رقم کرج۱ به عنوان ریزنمونه استفاده شد. هیپوکوتیل به قطعات یک سانتی‌متری برش داده شد و به حالت افقی و به صورت جداگانه روی محیط کشت قرار گرفت. پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های کالوس‌زایی پتری‌های حاوی کشت در شرایط تاریکی در اتاقک رشد با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هر دو هفته یک بار واکشت ریزنمونه‌ها انجام شد. برای تهیه سوسپانسیون سلولی، در یک ارلن متناسب با حجم تیمارها، ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر، به عنوان منبع کربن در آب مقطر به وسیله همزن مغناطیسی حل شد. سپس نمک‌های محیط MS به محلول اضافه و با آب مقطر به حجم نهایی رسانده شد. پس از اضافه کردن هورمون‌ها، با استفاده از آب مقطر حجم نهایی هر ارلن تعیین و pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم شد و برای ضدعفونی اتوکلاو گردید. سپس از محیط‌های به دست آمده به میزان ۳۰ میلی‌لیتر به ارلن‌های ۱۰۰ میلی-لیتری منتقل شد. به ارلن‌ها ۰/۵ گرم کالوس انتقال داده شد. ارلن‌های حاوی سوسپانسیون سلولی روی شیکر با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند.

اعمال محرک (الیسیتور)

جهت افزایش تولید سزامین، از الیسیتور اسیدسالیسیلیک و پیش ماده فنیل‌آلانین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی استفاده شد. برای این منظور تیمارهای اسیدسالیسیلیک با غلظت‌های (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و فنیل‌آلانین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، در روز هجدهم در کشت سوسپانسیون سلولی اعمال شدند. نمونه‌برداری در ۳ بازه زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. آزمایش تیمار سوسپانسیون سلولی کنجد با الیسیتورها در سه تکرار مجزا صورت گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA

نمونه‌برداری از کشت‌های سلولی در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال الیسیتور انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA کل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-PLUS (ساخت شرکت سیناکلون) انجام شد. قبل از ساخت cDNA، جهت حذف آلودگی احتمالی RNA با DNA ژنومی، از آنزیم *DNase*I (شرکت سیناکلون) استفاده شد. کمیت RNA با استفاده از ژ ل الکتروفورز و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید. در این روش میزان جذب نمونه RNA در طول موج‌های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر به منظور بررسی کیفیت RNA اندازه-گیری شد. این نسبت برای نمونه‌های RNA استخراج شده از سلولها، بین ۱/۸ تا ۲ بود که نشانگر کیفیت مطلوب RNA استخراج شده است. cDNA طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (شرکت سیناکلون) سنتز

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]

شد. جهت اطمینان از سنتز cDNA ها، با استفاده از آغازگر ژن *18S rRNA* (ژن خانه‌دار) واکنش PCR انجام شد و درستی ساخت آنها مورد تایید قرار گرفت. با استفاده از توالی ژن‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و نرم‌افزار Oligo5 آغازگرهای موردنظر طراحی شدند. آغازگرهای طراحی شده از لحاظ عدم اتصال غیر اختصاصی و تشکیل دایمر با استفاده از Primer blast مورد بررسی و تایید قرار گرفتند. اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

جدول ۱- طراحی آغازگرهای واکنش qRT-PCR

Table 1. Primer design for qRT-PCR

شماره دسترسی ژن accession number	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای ذوب Tm (°C)	% GC	اندازه محصول PCR PCR product size
KP771974	CYP81Q1 F	5'-TCTCGCTCTCACCTTCGCC-3'	57.4	60	169 bp
	CYP81Q1 R	5'-CTGGGAGAAGTCGTATAGTG -3'	60.9	50	
AY065995	C3H F	5'- GCCCCCACTATGTTAAGGTC -3'	66.8	55	173 bp
	C3H R	5'- GTATTCACGCAACACCAAAG -3'	65.2	45.6	
AJ236041	18SrRNA F	5- TCTTAGTTGGTGGAGCGATT -3	65.9	45	171 bp
	18SrRNA R	5- GAACATCTAAGGGCATCACA -3	64.6	45	

واکنش qRT-PCR

میزان بیان دو ژن دخیل در مسیر سنتز سزامین شامل *CYP81Q1* و *C3H* در میکروپلیت‌های ۷۲ چاهکی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با روش qRT-PCR بررسی شد. برای اطمینان از آلوده نبودن ترکیبات بکار رفته در این واکنش از کنترل منفی استفاده شد. در این روش از معرف SYBR Green (شرکت امینسان) و دستگاه ترمال سایکلر Rotor Gene Q (شرکت کیاژن) استفاده شد. برنامه PCR در ٤٠ چرخه انجام شد.

نتایج

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از نمونه های تیمار شده با کیت RNX-PLUS (شرکت سیناکلون) انجام شد. به منظور اطمینان یافتن از کیفیت RNAها مقدار ۳ میکرولیتر از RNAهای استخراج شده روی ژل اگارز ۱/۵٪ (w/v) الکتروفورز شد. وجود دو باند مربوط به *18S rRNA* و *28S rRNA* و عدم کشیدگی باندها نشان‌دهنده کیفیت مطلوب RNA بود. از این RNA برای سنتز cDNA و بررسی بیان ژن استفاده شد. تمام cDNAهای سنتز شده (با غلظت ۱ میکروگرم در میکرولیتر) به میزان ۱۵ برابر رقیق شدند و در واکنش qRT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش qRT-PCR

برای بررسی میزان بیان دو ژن دخیل در مسیر سنتز سزامین از روش qRT-PCR استفاده شد. جهت اطمینان برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. برای انجام این آزمایش از معرف SYBR Green در میکروپلیت‌های ۷۲ چاهکی و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده گردید. نتایج به دست آمده از آنالیز منحنی ذوب نشان داد که تکثیر تمام ژن‌ها به صورت اختصاصی و بدون محصولات غیراختصاصی مثل دایمر آغازگر بود. در این آزمایش جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی در ترکیبات مورد استفاده در واکنش از کنترل

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]

منفی استفاده شد که نتایج غیرآلوده بودن ترکیبات مورد استفاده را نشان دادند. نرمال‌سازی داده‌های CT مربوط به نمونه‌های مختلف و نمونه شاهد با استفاده از روش CT ژن مرجع و صورت گرفت. بیان ژن‌ها در نمونه‌های مختلف تیمار شده با الیسیتورها به صورت FC گزارش شد.

مقایسه میانگین بیان ژن‌ها

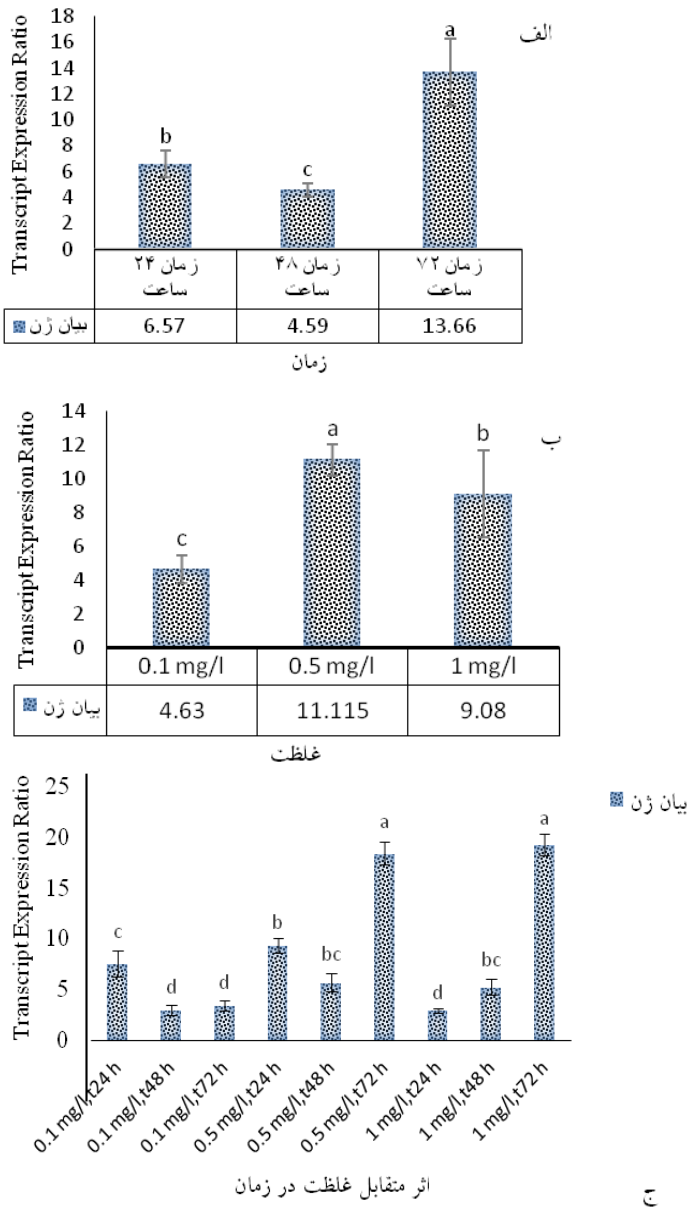
تاثیر الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر میزان بیان ژن *CYP81Q1*

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای مختلف زمانی الیسیتور اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بدون در نظر گرفتن غلظت الیسیتور، بین زمان‌های مختلف ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ٧٢ ساعت بعد از اعمال الیسیتور و کمترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ٤٨ ساعت بعد از اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک به دست آمد (شکل۱-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت‌های مختلف الیسیتور اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف الیسیتور اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ٠/٥ میلی-گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک و کمترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ٠/١ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *CYP81Q1* نشان داد که افزایش غلظت تا حدی باعث افزایش بیان ژن نسبت به شاهد شده است و هرچه غلظت از مقدار مشخصی بیشتر شده است بیان ژن به همان نسبت افزایش پیدا نکرده بلکه به مقدار کمی کاهش یافته است که این نشان می‌دهد همیشه افزایش غلظت الیسیتور باعث افزایش بیان ژن به همان نسبت نمی‌شود بلکه ممکن است تاثیرات منفی نیز داشته باشد. به عبارتی رابطه مستقیم بین غلظت اسیدسالیسیلیک و میزان بیان ژن وجود ندارد (شکل۱-ب).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان الیسیتور اسیدسالیسیک بر بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد نشان می‌دهد بیشترین تغییر در بیان ژن، در بازه زمانی ٧٢ ساعت بعد از اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک در غلظت ٠/٥ و ١ میلی‌گرم در لیتر الیسیتور اسیدسالیسیلیک حاصل شد به‌طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند و کمترین تغییر در بیان ژن، در دو بازه زمانی ٢٤ و ٤٨ ساعت به ترتیب در غلظت های ١ و ٠/١ میلی‌گرم در لیتر و ٧٢ ساعت بعد از اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک در غلظت ٠/١ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد به طوری که این تیمارها تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. همانطور که در شکل ١ مشاهده می‌شود اعمال الیسیتور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن نسبت به شاهد شده است (شکل۱-ج).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]



شکل ۱- بیان ژن *CYP81Q1* الف) تیمارهای زمانی مختلف بعد از تیمار با اسیدسالیسیلیک. ب) غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک. ج) اثر متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک در زمان. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$ هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند

Figure 1. CYP81Q1 gene expression at A) Different times after treatment with salicylic acid. B) Different concentrations of salicylic acid. C) Interaction of salicylic acid concentrations and time. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$.

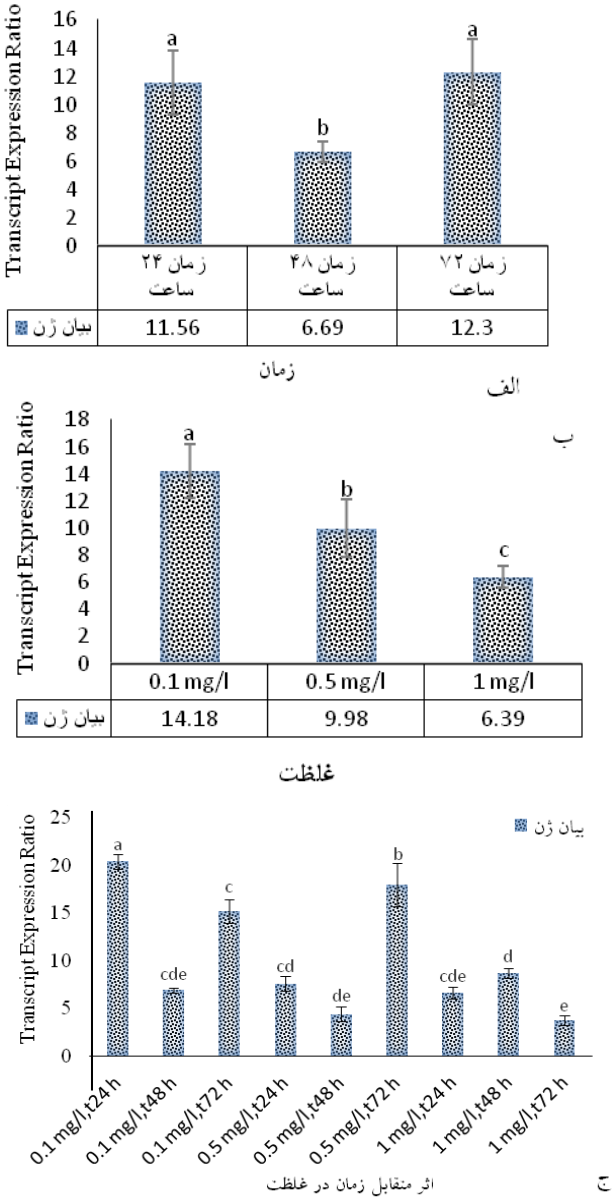
تاثیر الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر میزان بیان ژن

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در تیمار های مختلف زمانی اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می دهد که بدون در نظر گرفتن غلظت الیسیتور بین زمان های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اعمال اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری وجود دارد ولی زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند بطوریکه بیشترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت و کمترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال اسیدسالیسیلیک به دست آمد (شکل۲-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *C3H* نشان داد که افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک باعث کاهش بیان این ژن نسبت به شاهد شده است. در نتیجه همیشه افزایش غلظت الیسیتور باعث افزایش بیان یک ژن به همان نسبت نمی شود و رابطه مستقیم بین آنها وجود ندارد (شکل۲-ب).

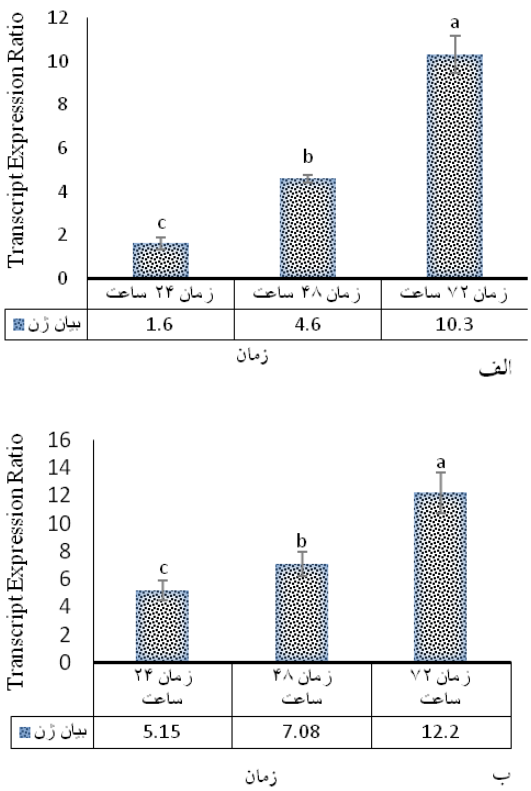
نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان، الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیشترین تغییر در میزان بیان ژن بعد از اعمال ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک در بازه زمانی ۲۴ ساعت حاصل شد و کمترین تغییر در میزان بیان ژن، در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال اسیدسالیسیلیک در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود اعمال الیسیتور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد شده است و تیمارها تفاوت معنی‌دار با هم داشتند (شکل۲-ج).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]



شکل۲- بیان ژن *C3H* در الف) تیمارهای زمانی مختلف بعد از تیمار با اسیدسالیسیلیک. ب) غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک. ج) اثر متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک در زمان. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند.

Figure 2. *C3H* gene expression at A) Different times after treatment with salicylic acid. B) Different concentrations of salicylic acid. C) Interaction of salicylic acid concentrations and time. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$



شکل۳- بیان ژن‌های *CYP81Q1* (الف) و *C3H* (ب) در تیمارهای زمانی مختلف بعد از تیمار با فنیل‌آلانین. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند.

Figure 3. *CYP81Q1* and *C3H* genes expression at different times after treatment with phenylalanine. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$

تاثیر فنیل‌آلانین بر میزان بیان ژن‌های *CYP81Q1* و *C3H*

آنالیز داده‌های تاثیر فنیل‌آلانین در زمان‌های مختلف در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بر میزان بیان ژن *CYP81Q1* به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس تاثیر فنیل‌آلانین در زمان‌های مختلف بر میزان بیان ژن *CYP81Q1* نشان از معنی‌دار بودن اثر زمان در سطح یک درصد داشت. براساس نتایج حاصل دو تیمار زمانی با هم اختلاف معنی‌دار بر بیان ژن *CYP81Q1* دارند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین زمان‌های مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین و به ترتیب بعد از آن زمان ٤۸ و ۲٤ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین بیشترین تاثیر را داشتند. بعبارت دیگر هرچه زمان بیشتری از اعمال فنیل‌آلانین می‌گذرد بیان ژن *CYP81Q1* افزایش بیشتری پیدا کرده است. میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر فنیل‌آلانین نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده و تفاوت معنی‌داری با آن دارد. (شکل۳-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین بین زمان‌های مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد ولی زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین تفاوتی معنی‌داری با هم نداشتند. بیشترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین و کمترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۲٤ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین به دست آمد. بیان ژن *C3H* تحت تاثیر فنیل‌آلانین روند تصاعدی نشان داد بطوری‌که هرچه از زمان اعمال فنیل-آلانین می‌گذرد بیان ژن *C3H* افزایش بیشتری پیدا کرده است. میانگین بیان ژن *C3H* در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیان ژن *C3H* در غلظت مورد استفاده نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده است و تفاوت معنی‌داری با آن دارد (شکل۳-ب).

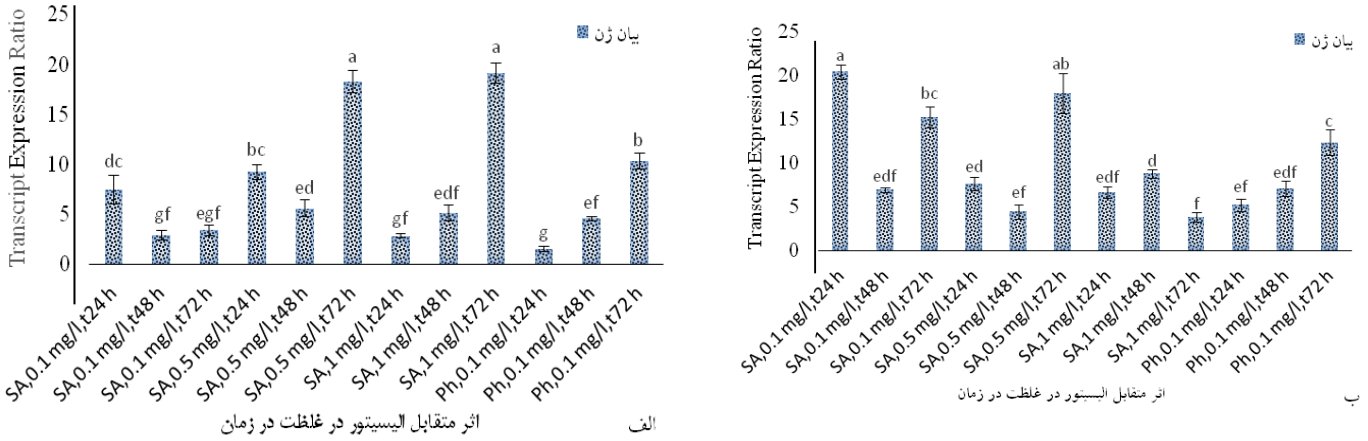
تاثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت در زمان بر میزان بیان ژن‌های *CYP81Q1* و *C3H*

نتایج مقایسه میانگین اثر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت در زمان بر بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد نشان می‌دهد بیشترین میزان بیان ژن در تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار بدست آمد به-طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. کمترین میزان بیان ژن، در تیمار فنیل‌آلانین در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در بازه زمانی ۲٤ ساعت بعد از اعمال آن حاصل شد. همان‌طور که در نمودار زیر مشاهده می‌شود اعمال اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد شده است. معنی‌دار شدن اثر الیسیتور در غلظت در زمان نشان‌دهنده تاثیر متفاوت غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تیمار با اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین بر بیان ژن *CYP81Q1* می‌باشد (شکل٤-الف).

نتایج مقایسه میانگین اثرهای اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت در زمان بر بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیشترین میزان بیان ژن در تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت ۰/۱ و پس از آن در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب در دو بازه زمانی ۲٤ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار بدست آمد به‌طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری داشتند. کمترین میزان بیان ژن در تیمار اسیدسالیسیلیک در غلظت ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب در دو بازه زمانی ۷۲ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال الیسیتور حاصل شد به‌طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی داری با هم داشتند. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می-شود اعمال اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین باعث افزایش بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد شده است. معنی‌دار شدن اثرهای الیسیتور در غلظت در زمان نشان‌دهنده تاثیر متفاوت اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین با غلظت‌ها و زمان-های مختلف بر بیان ژن *C3H* می‌باشد (شکل٤-ب).

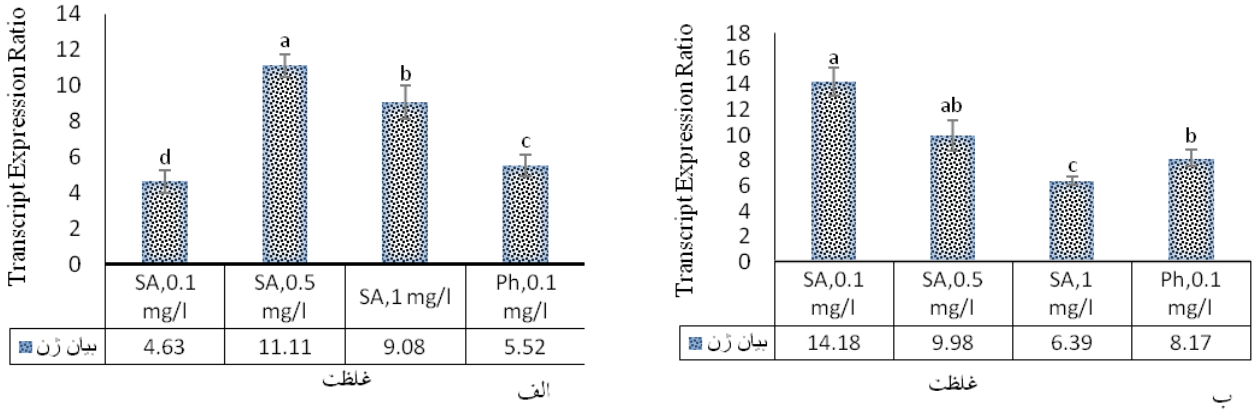
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]



شکل ٤- تغییر بیان ژن‌های *CYP81Q1* (الف) و *C3H* (ب) در اثر متقابل زمان و غلظت اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند.

Figure 4. Changes in *CYP81Q1* and *C3H* genes expression at the interaction of time and concentration of salicylic acid and phenylalanine elicitors. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$



شکل ٥- تغییر بیان ژن‌های *CYP81Q1* (الف) و *C3H* (ب) در غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین. داده‌ها $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD هستند و حروف اختلاف آماری در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهند.

Figure 5. Changes in *CYP81Q1* and *C3H* genes expression at different concentrations of salicylic acid and phenylalanine elicitors. Data represent the means of $2^{-\Delta\Delta CT}$ ± SD. Letters represent statistical difference at $P \leq 0.05$

تاثیر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت‌های مختلف بر میزان بیان ژن‌های *CYP81Q1* و *C3H*

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک رخ داده است به‌طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند و کمترین میزان بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین به دست آمد به-

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]

طوری که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (شکل۵-الف).

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بین غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک و کمترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد به ترتیب در غلظت ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل۵-ب).

بحث

بررسی بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین

در مطالعه تیمارهای مختلف اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین در غلظت‌های مختلف و بازه‌های زمانی مختلف به طور جداگانه، افزایش بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به نمونه شاهد مشاهده گردید. با توجه به نتاج حاصل از مقایسه میانگین، اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین باعث افزایش بیان ژن *CYP81Q1* می‌شوند، در نتیجه به دلیل افزایش بیان این ژن در اثر اعمال الیسیتور، افزایش احتمالی لیگنان سزامین مورد انتظار است زیرا ژن *CYP81Q1* از ژن‌های اصلی مسیر سنتز سزامین می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیشترین تغییر در بیان ژن، در بازه زمانی ۷۲ ساعت بعد از اعمال الیسیتور اسیدسالیسیلیک در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدسالیسیلیک حاصل شد به‌طوری که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *CYP81Q1* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل-آلانین نسبت به شاهد نشان می‌دهد که در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین بین زمان‌های مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد و بیشترین بیان ژن *CYP81Q1* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال آن مشاهده گردید. هرچه زمان اعمال فنیل‌آلانین بیشتر شده است بیان ژن *CYP81Q1* افزایش پیدا کرده است. از آنجایی که فنیل آلانین پیش ماده تولید سزامین است می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که افزایش پیش ماده (فنیل‌آلانین) در محیط سبب القای بیان ژن و تولید آنزیم لازم (CYP81Q1) برای تبدیل آن به ماده نهایی (سزامین) می-شود. با توجه به منحنی رشد سلول‌ها در بازه زمانی روزهای ۱۸ تا ۲۲ سلول‌ها در مرحله رشد لگاریتمی هستند و سپس وارد فاز سکون می‌شوند (Heidarifar and Dehghan Nayeri, 2015). همچنین طبق تحقیقات به عمل آمده اسیدسالیسیلیک باعث افزایش تقسیم سلولی می‌شود (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). بر اساس منحنی رشد سلول‌های کنجد، تکثیر سلول‌ها به‌طور طبیعی تا حدود روز ۲۲ ادامه دارد که در حضور اسیدسالیسیلیک افزایش می‌یابد و در نتیجه نسخه‌های بیشتری از ژن در محیط کشت تولید می‌شوند و از سوی دیگر تأثیر مثبت الیسیتور روی القای احتمالی بیان ژن طی ۷۲ ساعت که می‌توانند دلایل افزایش بیان ژن طی این مدت باشند. تحقیقات کمی در مورد تأثیر اسیدسالیسیلیک بر عملکرد نهایی گیاهان صورت گرفته است از جمله در آزمایشی، محلول‌پاشی برگ‌های گیاهان ۳۰ روزه *Brassica junce* با غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار این ماده، موجب افزایش غلاف‌ها (۱۳/۷۸ درصد) و افزایش عملکرد دانه (۸/٤ درصد) گردید که نشان دهنده این واقعیت است که ترکیبات فنلی در انتقال دادن مواد فتوسنتزی به سمت مقصد دخالت می‌کنند. ضمن اینکه افزایش ماده خشک نیز از طریق افزایش در میزان فتوسنتز خالص، بازده کربوکسیلاسیون و افزایش در فعالیت نیترات‌ردوکتاز و کربنیک‌آنهیدراز در مقایسه با گیاهان شاهد در این گیاه گزارش شده است. فعالیت بالاتر آنزیم کربنیک‌آنهیدراز به طور معنی‌داری با فتوسنتز خالص همبستگی نشان داده است. فتوسنتز خالص بالاتر کسب شده از کاربرد غلظت‌های پایین اسیدسالیسیلیک، به طور

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]

طبیعی در رشد بهتر گیاهان و افزایش تولید ماده خشک منعکس گردیده است. از طرفی ترکیبات فنلی و از جمله سالیسیلات‌ها مانع اکسیداسیون اکسین می‌گردند. به این ترتیب کاهش در محتوای اکسین اکسید شده نیز دلیل دیگری است که منجر به افزایش فتوسنتز خالص می‌گردد (Fariduddin et al., 2003).

بررسی بیان ژن *C3H* در تیمارهای اسیدسالیسیلیک و فنیل‌آلانین

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت در زمان الیسیتور اسیدسالیسیلیک بر بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد نشان می‌دهد که بیشترین تغییر در بیان ژن، در بازه زمانی ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از افزودن ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر این الیسیتور به محیط کشت سلولی کنجد حاصل شد به طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی را از طریق تنظیم سرعت بیوسنتز آنها، ذخیره و انتقال واکوئلی، تجزیه و یا تغییر و تبدیل آنها تحت تأثیر قرار می‌دهند (Jeong and Park, 2006). براساس تحقیقات انجام شده ترشح جنیستئین از ریشه-های گیاه لوپن زرد توسط اسیدسالیسیلیک، کیتوزان و سیانیدپتاسیم افزایش می‌یابد. به عبارتی پیش‌ماده‌های مسیرهای بیوسنتزی می‌توانند جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون گیاه مورد استفاده قرار گیرند (Zhang et al., 2006). در این رابطه در این تحقیق نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *C3H* در تیمارهای مختلف زمانی فنیل‌آلانین نسبت به شاهد نشان داد که در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر فنیل‌آلانین بین زمان‌های مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از عمال فنیل-آلانین تفاوت معنی‌داری وجود دارد ولی زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین تفاوتی معنی‌داری با هم نداشتند. بیشترین بیان ژن *C3H* نسبت به شاهد در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال فنیل‌آلانین به دست آمد. با افزایش زمان اعمال فنیل‌آلانین بیان ژن *C3H* نیز افزایش پیدا کرده است. ژن *C3H* از ژن‌های کلیدی در مسیر فنیل‌پروپانوئید است که کافئیل‌شیکیمات را به P-کوماریل‌شیکیمات تبدیل می‌کند. این ترکیب در ادامه‌ی مسیر به لیگنان‌های گروه S و G تبدیل می‌شود (Ralph et al., 2006). بنابراین می‌توان گفت که احتمالا با افزایش بیان ژن *C3H* تحت تاثیر الیسیتور می‌توان تولید سزامین و دیگر لیگنان‌ها را افزایش داد.

براساس نتایج حاصل از این تحقیق بنظر می‌رسد که وجود پیش ماده فنیل‌آلانین در غلظت بکار رفته برای کشت سوسپانسیون سلولی کنجد سمی نبوده است و براحتی در اختیار سلول‌ها قرار گرفته وسبب القای بیان دو ژن کلیدی در مسیر تولید سزامین شده است. از اینرو احتمالا می‌توان از این ماده برای افزایش سزامین استفاده کرد که برای اثبات این موضوع باید مقدار سزامین در محیط کشت سوسپانسیون سلولی تیمار شده و نمونه شاهد اندازه‌گیری شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های کشت بافت و بیولوژی مولکولی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) و گروه بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. Photosynthetica 41: 281-284.

Hata N, Hayashi Y, Okazawa A, Ono E, Satake H, Kobayashi A. 2012. Effect of photoperiod on growth of the plants, and sesamin content and CYP81Q1 gene expression in the leaves of sesame (Sesamum indicum L.). Environmental and experimental botany 75:.212-219.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]

Hata N, Hayashi Y, Okazawa A, Ono E., Satake H, Kobayashi A. 2010. Comparison of sesamin contents and *CYP81Q1* gene expressions in aboveground vegetative organs between two Japanese sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties differing in seed sesamin contents. Plant Science 178: 510-516.

Heidarifar M, Dehghan Nayeri F. 2015. Establishment of callus and suspension culture in *Sesamum indicum* L. Inte tional Jou l of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 7(4): 255-258.

Hirose NIT, Nishihara K, Sugano M, Akimoto K, Shimizu S,Yamada H. 1991. Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. Jou l of Lipid Research 32: 629-638.

Jeong GT, Park DH. 2006. Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system: effect of abiotic elicitors. Applied biochemistry *and* biotechnology 29(132): 436-46.

Kang MH, Kawai Y, Naito M, Osawa T. 1999. Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. The Jou l of Nutrition 129: 1885-1890.

Moazzami AA, Andersson RE, Kamal Eldin A. 2006. HPLC analysis of sesaminol glucosides in sesame seeds. Jou l of Agricultural and Food Chemistry 54: 633-638.

Ono E, Nakai M, Fukui Y, Tomimori N., Fukuchi Mizutani M, Saito M, Satake H, Tanaka T, Katsuta M, Umezawa T. 2006. Formation of two methylenedioxy bridges by a Sesamum CYP81Q protein yielding a furofuran lignan,(+)-sesamin. Proceedings of the National Academy of Sciences 103**:** 10116-10121.

Qusti S, Abo Khatwa A, Lahwa M. 2010. Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holly Quran. Jou l Biological Sciences 2: 40-51.

Ralph J, Akiyama T, Kim H, LU F, Schatz PF, Marita JM, Ralph SA, Reddy MS, Chen F, Dixon RA. 2006. Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure. Jou l of Biological Chemistry 281**:** 8843-8853.

Rivas San Vicente M, Plasencia J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. Jou l of Experimental Botany 62(10): 3321-3338.

Satake H, Koyama T, Bahabadi SE, Matsumoto E, Ono E, Murata J. 2015. Essences in metabolic engineering of lignan biosynthesis. Metabolites. 5(2): 270-290.

Wahid OARA. 2007. El-Bramawy, Resistance of some sesame (*Sesamum indicum* L.) collections against root rot disease (*Rhizoctonia solani* Kühn) under field conditions. Jou l of Plant Protection Research 47: 321-327.

Zhang B, Hettiarachchy N, Chen P, Horax R, Cornelious B, Zhu D. 2006. Influence of the application of three different elicitors on soybean plants on the concentrations of several isoflavones in soybean seeds. Jou l of Agricultural and Food Chemistry 54 (15): 5548–5554.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.13.0]