

تأثیر تیمارهای متفاوت کلسیم کلراید بر بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) و ۴-کومارات کوآ لیگاز (4Cl) در گیاه *Melissa officinalis* L.

صبا پیرطریقت^۱ و مریم قنادنیا^{۲*}

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
پست الکترونیک: ghannadnia_ma@yahoo.com

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷

چکیده

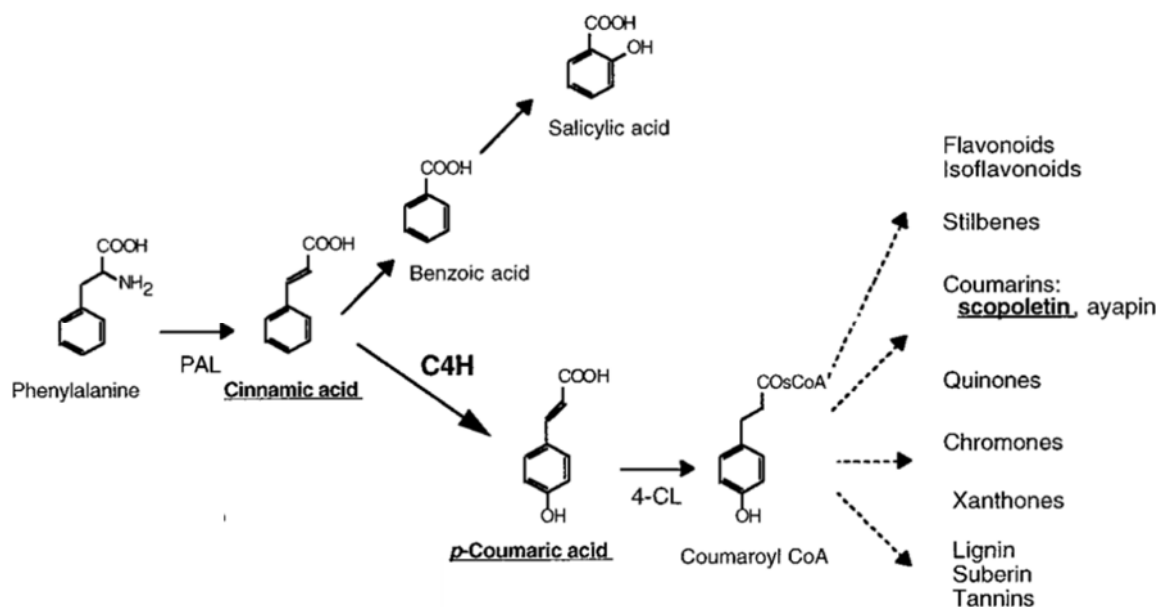
بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) از خانواده نعنا به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم شناخته شده و از زمان‌های قدیم مورد استفاده مردم بوده است. مطالعه مسیره‌های بیوسنتزی ترکیب‌های دارویی گیاه برای شناسایی مواد تأثیرگذار بر این مسیرها به‌منظور تغییر در کمیت یا کیفیت تولید ترکیب‌های آنها اهمیت ویژه‌ای دارد. مسیر متابولیسمی فنیل پروپانویید شامل مسیره‌های پیچیده‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی است که مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی مثل فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، لیگنین‌ها، آنتوسیانین‌ها و غیره را سنتز می‌کنند. فنیل آلانین آمونیلایز و ۴-کومارات کوآ لیگاز دو آنزیم اصلی مسیر فنیل پروپانویید می‌باشند که در بیوسنتز ترکیب‌های فنولی گیاهان نقش اساسی دارند. با توجه به اینکه بخشی از پاسخ به تنش و تغییرات محیطی در گیاهان شامل تغییر در بیان ژن‌های خاصی می‌شود، در این مطالعه بیان ژن‌های این دو آنزیم در گیاه بادرنجبویه رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای تحت تیمار کلسیم کلراید به روش Real Time PCR بررسی شده و همچنین پروتئین کل استخراج شده و به‌صورت کمی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که افزایش و کاهش کلسیم کلراید به میزان ۸۸۰ و ۲۲۰ mg/L باعث کاهش بیان ژن فنیل آلانین آمونیلایز و افزایش بیان ژن ۴-کومارات کوآ لیگاز شده و همچنین میزان پروتئین کل گیاه به میزان ۵۸۵ و ۵۹۵ g/L به‌ترتیب در تیمارهای ۸۸۰ و ۲۲۰ کاهش یافت. همچنین براساس نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز مشخص شد که در تیمارها نسبت به شاهد برخی ترکیب‌های فنولی، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و پروتئین‌ها کاهش یافته است. این نتایج تأثیر یون کلسیم را در تنظیم بیان برخی ژن‌ها و تولید متابولیت‌های آنها نشان می‌دهد. بنابراین کلسیم در برخی از انواع فعل‌وانفعالات گیاهی و سنتز متابولیت‌های آنها نقش داشته و با تغییر مقدار آن می‌توان به میزان کنترل شده از ترکیب‌های گیاهی به‌منظور اهداف خاص استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)، بیان ژن، پروتئین کل، طیف‌سنجی مادون قرمز، فنیل آلانین آمونیلایز، ۴-کومارات کوآ لیگاز.

مقدمه

ویژه یافت می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه نقش اکولوژیکی مهمی در واکنش‌های دفاعی گیاهان داشته و برخی از آنها کاربرد صنعتی در تغذیه انسان و دام دارند. عوامل مختلفی بر تولید و انباشته شدن متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت مؤثر هستند که برخی از آنها عبارت از محرک‌ها، لاین‌های سلولی پرمحصول، میزان مواد غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌باشند (Neumann *et al.*, 2009). بیشتر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های درگیر در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه شناسایی و تعیین توالی شده‌اند که این امر دست‌ورزی ژنتیکی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه را آسان کرده است (Hwang *et al.*, 2014). نقش ترکیب‌های فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون و احیای آنها است که نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، فرونشانی اکسیژن‌های فعال و پراکسیدهای تجزیه‌کننده دارند (Javanmardi *et al.*, 2002).

بادرنجبویه یکی از گیاهان خانواده نعنا، گیاه دارویی با ارزشی است که بومی مناطق مدیترانه شرقی و آسیای غربی است (Moradkhani *et al.*, 2010). برگ‌های تازه و خشک شده قسمت هوایی گیاه دارای استفاده دارویی است (Janina, 2003). از زمان‌های قدیم، از خواص دارویی گیاه بادرنجبویه برای مصارف دارویی مانند ضد تشنج، مقوی، ضدنفخ، معرق، پانسمن زخم و تسکین سردرد ناشی از استرس استفاده می‌شده است (Blumenthal *et al.*, 2000). گیاهان طیف وسیعی از ترکیب‌های آلی موسوم به ترکیب‌های ثانویه را تولید می‌کنند که برخلاف متابولیت‌های اولیه جزئی از ساختار مولکولی پایه سلول نبوده و ظاهراً نقش مهم و ضروری در رشد و نمو موجود زنده ندارند. این ترکیب‌ها از بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و در مقادیر کمی تولید می‌شوند و در بافت‌های خاص و یا در مراحل نموی



شکل ۱- مسیر متابولیکی فنیل پروپانویید

ترکیب‌های اولیه و ثانویه گیاهی دارای گروه‌های عاملی مختلف مانند OH ، CH_3 ، CO ، =CH ، $\text{C}\equiv\text{C}$ ، $\text{C}\equiv\text{N}$ ، NH و دیگر گروه‌ها هستند (Pavia et al., 2008). از سوی دیگر روش طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) که به دلیل حساسیت بالا، قابلیت اعتماد و سرعت زیاد در اندازه‌گیری بر سایر روش‌های متداول آنالیز مواد سلولی ارجحیت دارد (Stehfest et al., 2005)، برای تشخیص این عوامل که در ترکیب‌های آلی نیز موجود هستند، در بسیاری از تحقیقات برای تشخیص متابولیت‌های گیاهی و تغییرات آنها در مقابل تیمارهای مختلف استفاده شده است (Hoang et al., 2015). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که روش FTIR توان غلبه بر محدودیت‌های سایر روش‌های بیوشیمیایی را دارد (Stehfest et al., 2004). بنابراین در این پژوهش نیز از روش FTIR برای بررسی تغییرات ایجاد شده در گروه‌های عاملی و در نتیجه متابولیت‌های ثانویه و حتی اولیه گیاهی تحت تأثیر تیمارهای مختلف کلسیم کلراید استفاده شده است.

رفتارهای مختلف در سلول از طریق تغییر در مقدار کپی‌برداری از ژن‌ها انجام می‌گردد که بیان ژن نامیده می‌شود. بدین جهت تجزیه و تحلیل رفتار سلول با بررسی بیان ژن انجام می‌شود. روش‌های مختلفی برای بررسی بیان ژن وجود دارد که روش Real Time PCR به دلیل حساسیت بالا و تکرارپذیری، بیشتر از سایر روش‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Frederick & Snyder, 2001)؛ (Lorkowski & Cullen, 2006). با توسعه این روش‌ها در سال‌های اخیر، توجه محققان به مقایسه الگوی بیان ژن‌ها در گیاهان حساس و مقاوم به تنش‌های محیطی مختلف جذب شده است. کلسیم به چند روش باعث تنظیم بیان ژن‌ها در پاسخ به محرک‌های داخلی و خارجی می‌شود. کلسیم یا به‌طور مستقیم به فاکتورهای رونویسی متصل شده و یا به کالمدولین اتصال یافته و این کمپلکس یا به پروموتور متصل می‌شود و یا اینکه به فاکتورهای رونویسی متصل شده و به این شکل فعالیت آنها را تنظیم می‌کند (Edel et al., 2017)؛ (Kim et al., 2009). در این مطالعه با تغییر در مقدار کلسیم

مسیر متابولیکی فنیل پروپانوئید، شامل شاخه‌های مشتق شده پیچیده‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی است. دو آنزیم اصلی مسیر فنیل پروپانوئید، فنیل آلانین آمونیا لیاز و ۴-کومارات کوآ لیگاز است. فنیل آلانین آمونیا لیاز، آنزیمی است که واکنش انتقال L-فنیل آلانین به ترنس سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند (Zhang & Liu, 2015). فنیل آلانین آمونیا لیاز اولین مرحله در مسیر فنیل پروپانوئید است، بنابراین در بیوستنز ترکیب‌های فنلی مثل فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئید و لیگنین در گیاهان دخالت دارد (Singh et al., 2009). آنزیم ۴-کومارات کوآ لیگاز گروه کربوکسیل را از کوماریک اسید توسط تشکیل یک پیوند تیواستر کاتالیز می‌کند. آنزیم 4Cl جریان کربن را به p-کومارول کوآ انتقال می‌دهد و مولد کاتالیز زیرشاخه‌های بعدی است، بنابراین مرحله حیاتی در مسیر فنیل پروپانوئیدی عمومی است (Di et al., 2012) (شکل ۱).

به‌طور کلی چهار عملکرد بیولوژیکی برای کلسیم تعریف می‌شود که می‌تواند بر گیاه مؤثر باشد که شامل تأثیر بر: الف) غشاهای سلولی، ب) آنزیم‌ها، ج) دیواره سلولی و د) اثرهای متقابل کلسیم با فیتوهورمون‌ها است (Bangerth, 1979). بنابراین به نظر می‌رسد مهمترین ویژگی کلسیم توانایی همکاری آن در برقراری ارتباط متقابل برگشت‌پذیر در پاسخ به تغییرات سریع شرایط می‌باشد، به طوری که عملکرد کلسیم تحت تأثیر غلظت، قدرت اتصال، ساختار و نسبت پایداری آن است (Williams, 1976). نقش کلسیم در گیاه را می‌توان به تأثیر آن در تقسیم سلولی، ارتباط آن با هورمون اکسین در تأثیر بر ساختار دیواره سلولی و خاصیت کشسانی سلول مرتبط دانست (Hepler, 2005). یون کلسیم نقش کلیدی در اتصال با پکتین دیواره سلولی داشته و همچنین غلظت‌های کم آن نفوذپذیری غشای پلاسمایی را افزایش می‌دهد (Gul & Khan, 2008).

بیشتر گیاهان دارای ترکیب‌های مختلف شیمیایی مانند تیوسیانات، نیترات، کلرید، تریپتوئید، پلی‌پتید و انواع متنوع دیگری از این گونه ترکیب‌ها هستند که جزء ترکیب‌های ثانویه محسوب می‌شوند (Darout et al., 2000).



شکل ۲- گیاه بادرنجبویه رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای

استخراج RNA و واکنش نسخه‌برداری معکوس

RNA نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت دنا زیست استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (Ziaei *et al.*, 2012). توالی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 طراحی و پس از مقایسه با توبولین، از ژن 18S rRNA به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. توالی الیگونوکلوئیدی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. پس از اطمینان از کیفیت RNA، واکنش نسخه‌برداری معکوس انجام شد. تهیه cDNA با استفاده از RevertAid M_MUL VReverse Transcriptase شرکت سینا کلون انجام شد. تمام cDNAهای سنتز شده با استفاده از دستگاه نانو دراپ مدل VVD 3200 ساخت شرکت لبومد آلمان غلظت‌سنجی شده و رقیق شدند تا به غلظت $400 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ برسند.

میزان بیان ژن‌های 18S rRNA، PAL و 4CL با استفاده از تکنیک Real Time PCR و با استفاده از معرف eva green (5x Hot FirePol) شرکت پیشگام در سه تکرار بررسی شد. داده‌های qRT-PCR با استفاده از نرم‌افزار Rest تجزیه و تحلیل شدند.

موجود در محیط کشت به‌عنوان عاملی مؤثر در میزان تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است. بنابراین انتظار می‌رود با کشت گیاهان در تیمارهای مختلف کلسیم کلراید، گیاه و برخی از ژن‌های مؤثر در متابولیسم آن متأثر شده و تغییر در فعالیت آنزیم‌ها و در نتیجه تغییر در مقدار متابولیت‌های ثانویه ایجاد گردد. همچنین با بررسی بیان ژن دو آنزیم کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید و همچنین پروتئین کل، نحوه تأثیر تیمارها در این گیاه مورد مطالعه قرار می‌گیرد. غلظت‌های کلسیم انتخاب شده در این پژوهش برای مقایسه آن در محیط معمولی موراشیگ و اسکوگ با مقادیر نصف و دو برابر آن در نظر گرفته شده است. نتایج این تحقیق می‌تواند با توجه به هدف مورد نظر محققان، برخی شرایط لازم را برای تغییرات کمیّت و کیفیت انواعی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی از طریق تأثیر بر بیان ژن‌ها امکان‌پذیر سازد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک و آلدریچ و بذر گیاه بادرنجبویه از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد. به‌منظور ضدعفونی، بذرها ابتدا در الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه غوطه‌ور شده و پس از آبکشی با آب مقطر استریل، در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ غوطه‌ور و پس از ۱۵ دقیقه، سه بار با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۵ دقیقه آبکشی شدند. بذرها پس از ضدعفونی در محیط کشت MS (حاوی ساکارز ۳٪، میواینوزیتول 100 mg/l ، آگار ۴/۵٪، pH: ۵/۸) در سه تیمار مختلف کلسیم کلراید شامل 440 mg/l (مقدار اصلی در محیط کشت MS)، 220 mg/l و 880 mg/l در سه تکرار کشت شدند. پس از جوانه‌زنی، دانه‌رست‌هایی که در مرحله نموی یکسان بودند انتخاب شده و در محیط کشت MS حاوی همان مواد واکنش شدند (Pirtarighat *et al.*, 2017). پس از گذشت ۴۵ روز، گیاهانی که در مرحله ۸ برگی بودند انتخاب شده (شکل ۲) و پس از تثبیت در ازت مایع به فریزر -80°C منتقل گردیدند.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده

18S rRNA	F	5'-TCTTAGTTGGTGGAGCGATT-3'
	R	5'-GAACATCTAAGGGCATCACACA-3'
Tubulin	F	5'-CAGCCAGATCTTCACGAGCTT-3'
	R	5'-GTTCTCGCGCATTGACCATA-3'
PAL	F	5'-CATCACGAGGAGTCCAACGG-3'
	R	5'-CTGAACTCCTCCACCATCCG-3'
4CL	F	5'-TCGCCAAATACGACTTTC-3'
	R	5'-TGCTTCAGTCATCCCATACCC-3'

شده با پتاسیم برماید به نسبت ۱ به ۱۰۰ ترکیب شده و قرص‌های دستگاه FTIR ساخته شد.

نتایج

بررسی کیفیت RNA استخراج شده

کیفیت RNA استخراج شده از اندام هوایی بادرنجبویه، بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ (w/v) بررسی شد. وجود دو باند 18S rRNA و 28S rRNA نشان‌دهنده کیفیت مطلوب RNA بود (شکل ۳).

همچنین در بررسی کمیّت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در تمام تیمارها و تکرارها نسبت A260/A280 بیشتر از ۱/۸ و نسبت A230/A280 بیشتر از ۲ بدست آمد.

نتایج حاصل از سنتز cDNA

به‌منظور اطمینان از کیفیت cDNAهای سنتز شده، واکنش PCR ژن‌های مربوطه به همراه آغازگرهای 18S rRNA و توبولین انجام شده و بعد الکتروفورز روی ژل آگارز انجام شده و مورد تأیید قرار گرفت. براساس نتایج الکتروفورز، ژن 18S rRNA به‌عنوان ژن خانه‌دار انتخاب شد (شکل ۴).

بررسی بیان ژن PAL با استفاده از روش Quantitative Real Time PCR

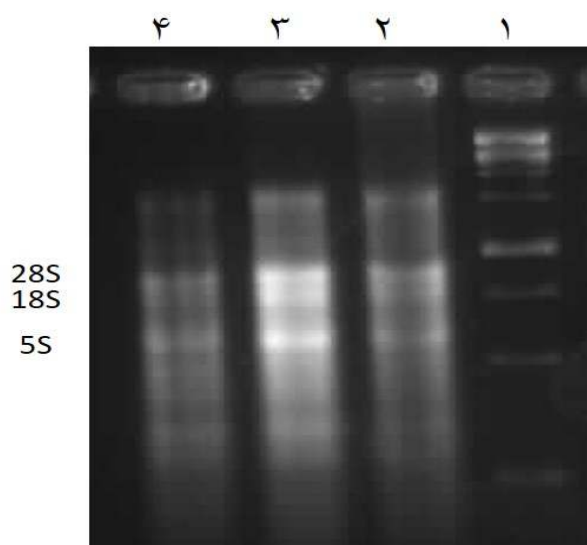
با توجه به داده‌های Real Time PCR مشخص شد که ژن فنیل آلانین آمونیاکاز در تمام تیمارهای کلسیم کلراید بیان شده است (شکل ۵). تیمار CaCl₂ با غلظت ۲۲۰ mg/L نسبت به تیمار CaCl₂ با غلظت ۴۴۰ mg/L (شاهد) به میزان ۱/۰۲۳ کاهش بیان داشت. همچنین تیمار CaCl₂ با غلظت ۸۸۰ mg/L نسبت به شاهد ۱/۳۹۸ کاهش بیان داشته است (شکل ۵).

استخراج پروتئین کل

پروتئین کل با استفاده از روش محققان قبلی با اندکی تغییر استخراج شد (Ziaei *et al.*, 2012). مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت ذخیره شده در فریزر -80°C در ۲ میلی‌لیتر بافر Tris-HCL (۵۰ mM، pH=۸/۸) به‌همراه ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱ mM Dithioerythritol (DDT) بر روی یخ ساییده شد تا محلول همگن بدست آید. نمونه‌ها دو بار به مدت ۱۵ دقیقه، ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از هر بار، محلول رویی جدا شده پس از تقسیم در لوله‌های اپندروف، در فریزر با دمای -20°C درجه سانتی‌گراد تا زمان سنجش پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نگهداری گردید.

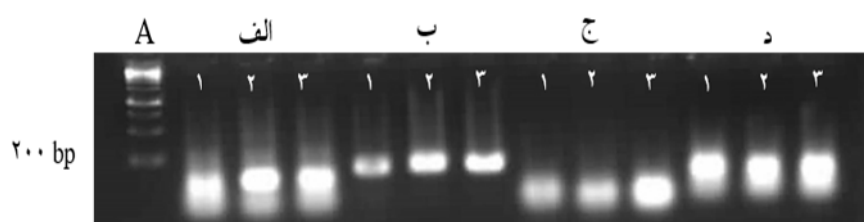
اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش FTIR

تعیین میزان تغییر در متابولیت‌های ثانویه در تیمارهای مختلف با استفاده از دستگاه Bruker Tensor 27 spectrophotometer انجام شد (Hoang *et al.*, 2015; Oves *et al.*, 2018). عصاره‌های آبی گیاه در تیمارهای مختلف استخراج شده و در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پودر عصاره گیاهان جمع‌آوری



شکل ۳- بررسی کیفیت RNA استخراج شده؛

(۱) خط کش، (۲) تیمار ۸۸۰ mg/L، (۳) تیمار ۴۴۰ mg/L و (۴) تیمار ۲۲۰ mg/L کلسیم کلراید



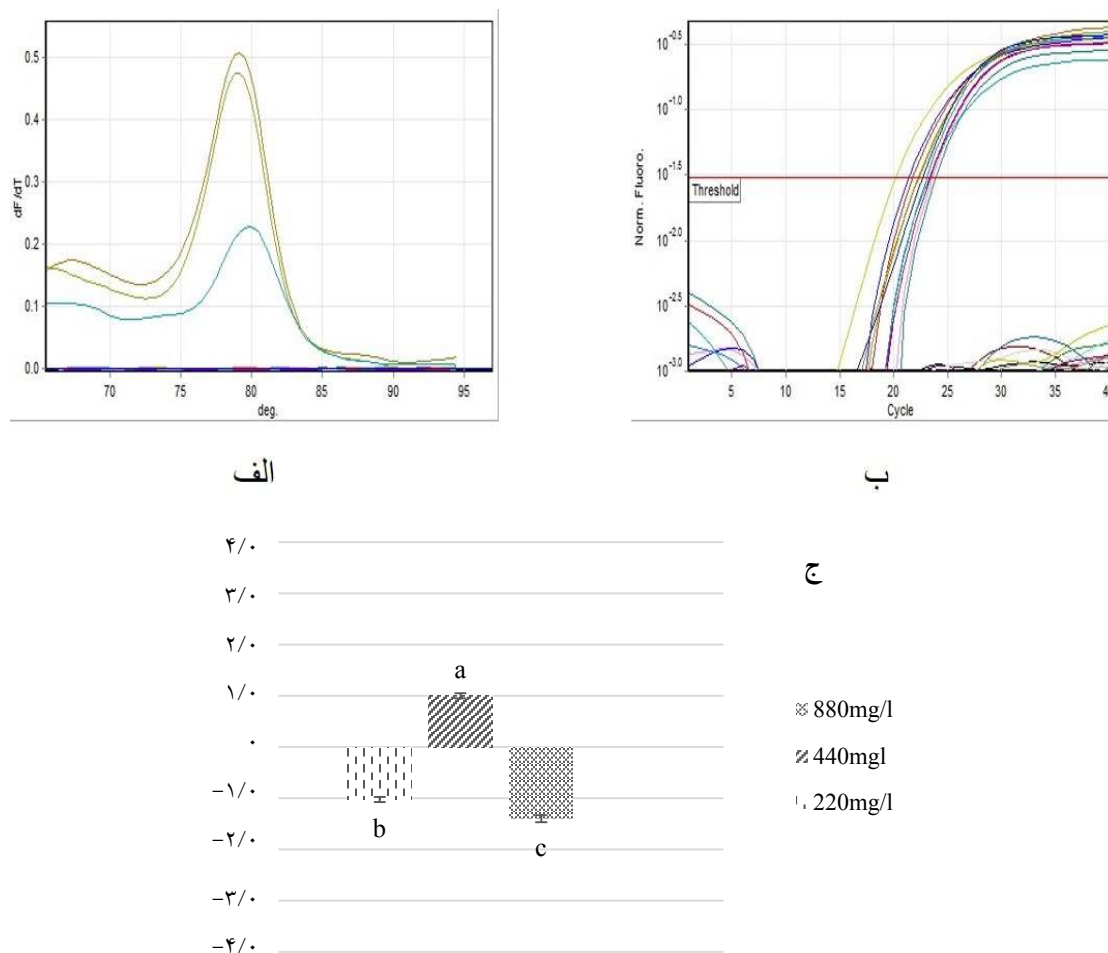
شکل ۴- درستی سنتز cDNA و آغازگرهای طراحی شده؛ (A) خط کش، (الف) توبولین، (ب) 18S rRNA، (ج) PAL و (د) 4CL در تیمارهای مختلف گیاه بادرنجبویه شامل: (۱) ۲۲۰ mg/L؛ (۲) ۴۴۰ mg/L و (۳) ۸۸۰ mg/L کلسیم کلراید

می‌دهد که آغازگرها با کارایی بالا فقط به ژن مورد نظر اتصال یافته‌اند. تیمار $CaCl_2$ ۲۲۰ mg/L نسبت به شاهد $CaCl_2$ ۴۴۰ mg/L (۱/۴۵۲) برابر افزایش بیان داشت. همچنین تیمار $CaCl_2$ ۸۸۰ mg/L نسبت به شاهد ۱/۱۵۶ افزایش بیان داشت (شکل ۶).

بررسی بیان ژن 4CL با استفاده از روش **Quantitative**

Real Time PCR

با استفاده از داده‌های qRT-PCR برای بررسی بیان ژن 4CL-کومارات کوآ لیگاز در تیمارهای مختلف کلسیم کلراید مشخص شد که ژن مورد نظر در تمام تیمارها بیان شده است (شکل ۶). همچنین منحنی ذوب در شکل ۶- الف نشان



شکل ۵- الف) منحنی ذوب، ب) تکثیر و ج) نمودار تفاوت در میزان بیان ژن PAL در تیمارهای مختلف گیاه بادرنجبویه با استفاده از تکنیک qRT-PCR

است. همچنین فهرست گروه‌های عاملی و ترکیب‌های شناسایی شده به روش جذب مادون قرمز در جدول ۲ قابل مشاهده است (Pavia *et al.*, 2008). در تیمار ۸۸۰mg/l کاهش جذب در فرکانس مربوط به گروه عاملی OH در فرکانس >3000 مربوط به ترکیب‌های الکلی، فنلی و کربوکسیلیک اسید (Stehfest *et al.*, 2004) مشاهده شد. درصد جذب در بازه گروه عاملی CH لیپیدی در تیمار ۸۸۰mg/l نسبت به شاهد افزایش یافته است که نشان‌دهنده غلظت بیشتر این ترکیب‌ها در این تیمار نسبت به شاهد است و در تیمار ۲۲۰mg/l کاهش یافته است. همچنین درصد جذب گروه عاملی $C\equiv C$ در سیانیدها در تیمارها نسبت به

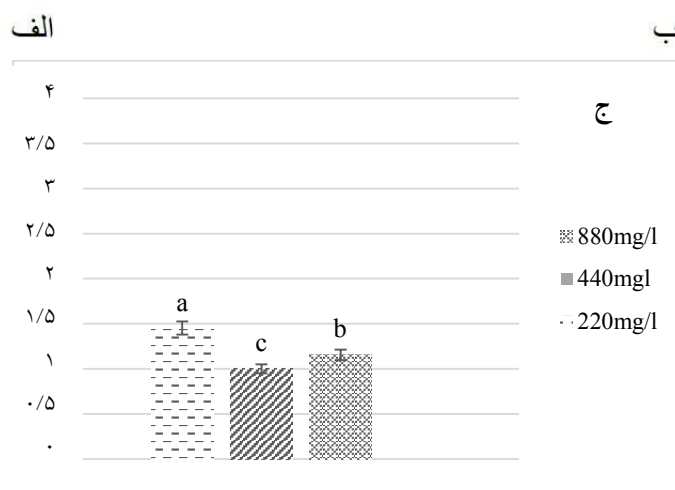
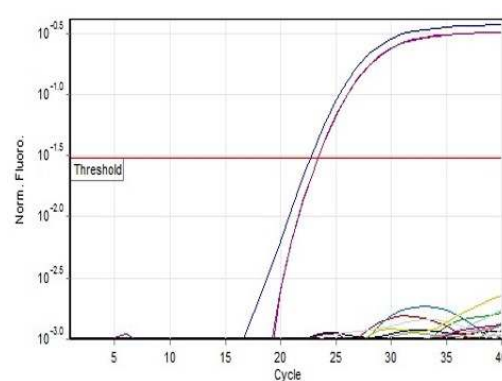
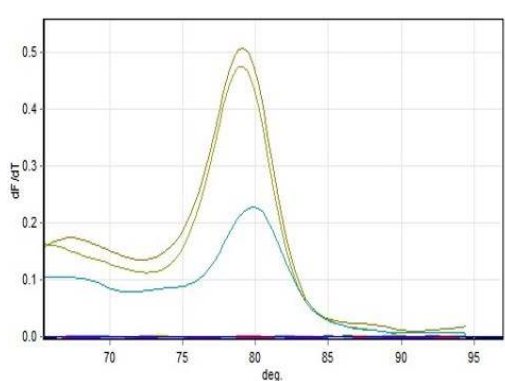
میزان پروتئین کل

نتایج حاصل از اندازه‌گیری کمی پروتئین نشان داد که میزان پروتئین کل در شاهد (تیمار $CaCl_2$ ۴۴۰mg/L) به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو تیمار دیگر بود، همچنین تیمار ۸۸۰mg/L میزان پروتئین کل نسبت به تیمار ۲۲۰mg/L کاهش معنی‌دار داشت (شکل ۷).

تغییرات در گروه‌های عاملی و متابولیت‌های ثانویه آنالیز FTIR برای شناسایی تغییرات در زیست مولکول‌ها انجام شد. تغییر در پیک‌ها در منحنی‌های جذب FTIR عصاره گیاهان در تیمارهای مختلف در شکل ۸ آمده

ترکیب‌های فنلی را افزایش دهد. گروه عاملی CH_3 مربوط به آلکان‌ها در کربوهیدرات‌ها فقط در شاهد مشاهده شد. درصد جذب پیوند CO (در کربوکسیلیک اسید، استرها، اترها و آلکالوئیدها) و سولفات‌ها در تیمارها نسبت به شاهد کاهش یافت. درصد جذب در فرکانس مربوط به گروه عاملی $=\text{CH}$ در تیمار 880mg/l نسبت به شاهد کاهش یافت. مقدار نور جذب شده در آلکیل‌های تیمارها با شاهد برابر بود. پیوند سولفیدی در تیمار 880mg/l مشاهده نشد.

شاهد کاهش یافته است. گروه عاملی $\text{N}=\text{C}$ فقط در شاهد مشاهده شد که مبین این موضوع است که ترکیب‌های مربوط به این گروه عاملی در تیمارها حذف شده‌اند. درصد جذب در گروه عاملی NH (آمید I) در پروتئین‌ها در هر دو تیمار نسبت به شاهد کاهش یافته است که نشان‌دهنده کاهش غلظت این ترکیب‌ها در تیمارهاست. درصد جذب در گروه عاملی OH مربوط به ترکیب‌های فنلی در تیمار 220mg/l نسبت به شاهد کاهش یافته و در تیمار 880mg/l افزایش یافته است، به این معنی که افزایش کلسیم می‌تواند تولید

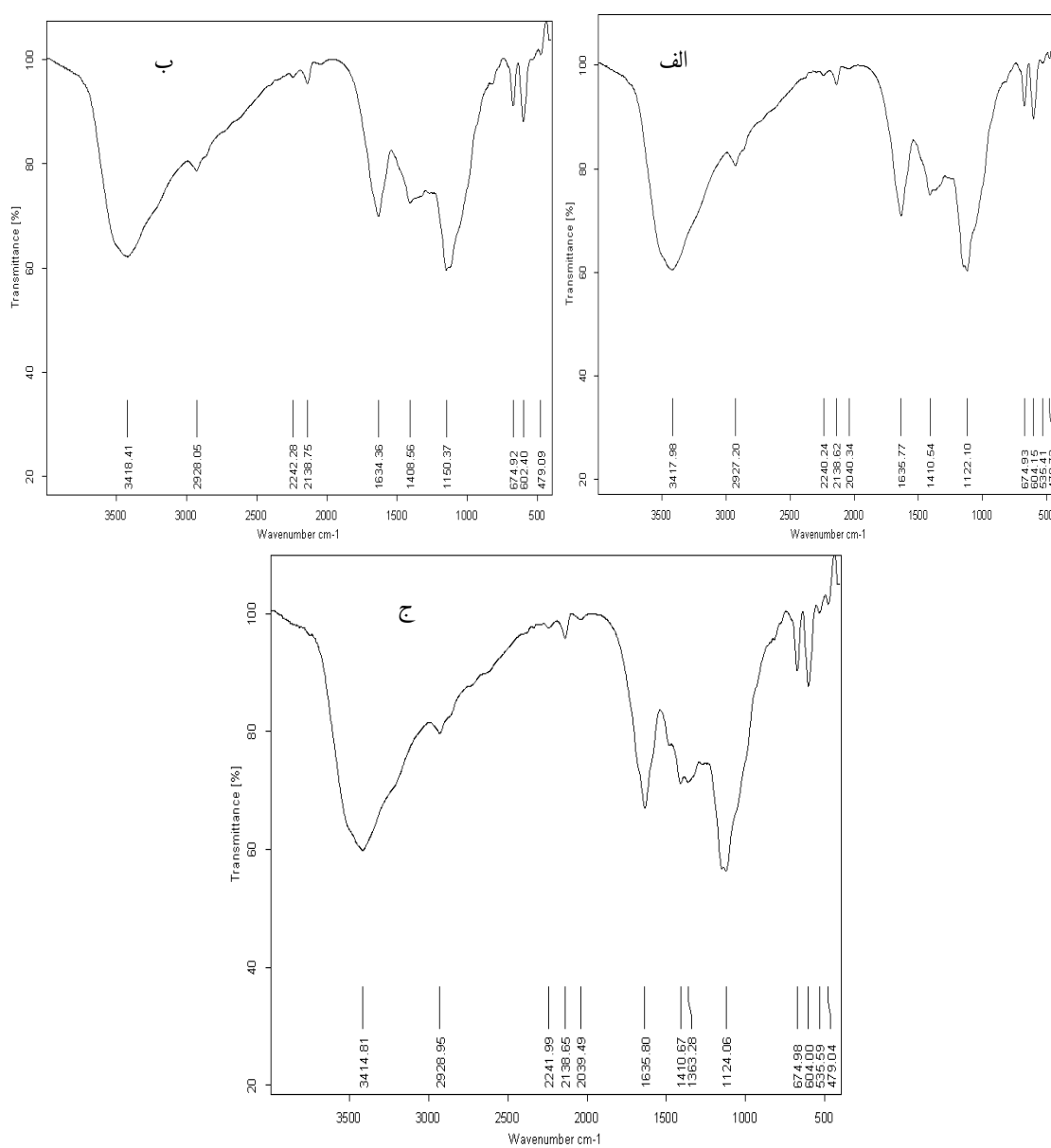


شکل ۶- الف) منحنی ذوب، ب) تکثیر و ج) نمودار تفاوت در میزان بیان ژن 4CL در تیمارهای مختلف گیاه بادرنجبویه

با استفاده از تکنیک qRT-PCR



شکل ۷- میزان پروتئین کل در تیمارهای مختلف کلسیم کلراید در گیاه بادرنجبویه



شکل ۸- منحنی FTIR عصاره گیاهان در تیمارهای مختلف: الف) ۲۲۰ mg/l، ب) ۴۴۰ mg/l و ج) ۸۸۰ mg/l

جدول ۲- جدول فرکانس‌های جذب مادون قرمز (FTIR) گروه‌های عاملی تشخیص داده شده در نمونه‌های گیاهی

محدوده طیف‌های جذبی	گروه‌های شیمیایی	برخی ترکیب‌های آلی احتمالی دارای گروه‌های شیمیایی موجود در گیاه
۳۲۰۰-۳۶۵۰	OH	الکل‌ها-فنل‌ها
۳۱۰۰-۳۵۰۰	NH	ترکیب‌های آمیدی (پروتئین‌ها)
۲۹۰۰-۳۰۰۰	CH ₂	آلکان‌ها (لیپید و اسیدهای چرب) در غشاهای سلولی
۲۰۰۰-۲۵۰۰	C≡C C≡N	ترکیب‌های سیانیدی (polyacetylene) و ترکیب‌های نیتریلی (amygdaline)
۱۴۷۵-۱۶۰۰	C=C	حلقه‌های آروماتیک (بنزن) در ترکیب‌های معطر (polyphenols) و مونوترپن‌ها (α -terpinene)
۱۱۲۶-۱۴۶۲	CH ₃	آلکان‌های موجود در کربوهیدرات‌ها
۱۰۰۰-۱۳۰۰	CO	الکل‌ها، اترها، استرها، اسیدهای کربوکسیلیک و آلکالوئیدها
۶۰۰-۸۰۰	=CH	مونوترپن‌های دو حلقه‌ای معطر (α -pinene, β -pinene و sabinene)
۵۰۰-۸۰۰	C-Cl	آلکیل‌هالیدها (هالوگانی‌ها)
۳۵۰-۴۵۰	SO ₄ ²⁻	ترکیب‌های دارای گوگرد (اسید آمینه سیستئین)

بحث

آلانین آمونیاک‌ناز نسبت به شاهد شد، همچنین باعث افزایش بیان ژن ۴-کومارات لیگاز در تیمارهای مورد بررسی نسبت به شاهد شد. این نتایج نشان می‌دهد که مصرف کلسیم کمتر و بیشتر از مقدار مورد نیاز آن در محیط کشت MS باعث تغییر در بیان ژن‌ها می‌شود. تأثیر کلسیم کلراید بر کاهش فعالیت آنزیم فیل آلانین آمونیاک‌ناز در گیاه کاهو (Roura *et al.*, 2008) مشاهده شده است که مطابق با نتایج این آزمایش است. کاربرد همزمان محلول کلسیم کلراید با اتفن در گیاه انگور باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL شده و ذخیره آنتوسیانین گیاه را افزایش داده است (Scavroni *et al.*, 2018). محققان مشاهده کردند که فعالیت فنیل آلانین آمونیاک‌ناز قابل استخراج قبل از مشاهده ظاهری نشانه‌های روزت افزایش یافت (Hyodo *et al.*, 1978؛ Ke & Saltveit Jr, 1986). مشاهده شده است که کاربرد کلسیم نترات باعث کاهش فعالیت فنیل آلانین آمونیاک‌ناز قابل استخراج نسبت به شاهد می‌شود (Ke & Saltveit Jr, 1986) که با نتایج بدست‌آمده در این آزمایش یکسان است. در مطالعه‌ای محققان مشاهده کردند که ژن 4Cl همزمان با

عوامل مختلفی بر تولید و انباشته شدن متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت مؤثر هستند که بکارگیری محرک‌ها به صورت تنش فیزیکی و شیمیایی یکی از موفق‌ترین روش‌هایی است که باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود که در حالت معمولی بسیار کم تولید می‌شوند. الیستورها به صورت مستقیم و غیرمستقیم با فعال کردن ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ترکیب‌های ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیب‌ها می‌گردند (Neumann *et al.*, 2009). میزان اثر محرک‌ها در کشت بافت معمولاً به غلظت محرک اضافه شده و زمان وابسته است (Wang & Wu, 2010). محققان دریافته‌اند که با بهینه‌سازی غلظت محرک‌ها، می‌توان تولید متابولیت‌های ثانویه را در کنگر فرنگی در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر قرار داد (Samadi *et al.*, 2015). تحقیقات کمی در رابطه با تأثیر تیمارهای مختلف کلسیم کلراید بر افزایش متابولیت‌های ثانویه انجام شده است. در آزمایش انجام شده، کلسیم کلراید به‌عنوان محرک شیمیایی در تیمارهای مختلف باعث کاهش بیان ژن فنیل

براساس نتایج جذب مادون قرمز وجود پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها و دیگر ترکیب‌های سلولی در عصاره گیاهان تأیید شد. کارآمدی روش FTIR برای اندازه‌گیری ترکیب‌های سلولی و متابولیت‌های ثانویه از جمله رزمارینیک اسید در تحقیقات ثابت شده است (Stehfest *et al.*, 2004). در پژوهشی محققان با استفاده از روش FTIR مشاهده کردند که در گیاه گوجه‌فرنگی در تیمار شوری میزان سیانیدها و نیتریل‌ها افزایش یافته است (Smith *et al.*, 2003) اما در این آزمایش میزان ترکیب‌های سیانیدی در هر دو تیمار کاهش یافته است. همچنین در آزمایشی افزایش کربوهیدرات‌ها در تیمار شوری در گیاه انگور مشاهده شد (Oliveira *et al.*, 2009). نتایج FTIR کاهش ترکیب‌های دارای آمید و پیوند سولفیدی و سولفات‌ها را که در پروتئین‌ها حضور دارند در تیمارها نشان داد که با نتایج حاصل از بررسی پروتئین کل مطابقت دارد. بررسی نتایج کلی طیف FTIR در تیمار ۲۲۰mg/l در فرکانس‌های مختلف کاهش برخی ترکیب‌های فنلی، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها را نشان داد. همچنین براساس این نتایج مشخص شد که در تیمار ۸۸۰mg/l ترکیب‌های لیپیدی افزایش یافته و ترکیب‌های فنلی و کربوهیدرات‌ها کاهش یافته‌اند. این یافته‌ها با نتایج حاصل از بررسی بیان ژن PAL مبنی بر کاهش بیان این ژن در تیمارها مطابقت داشته ولی در تضاد با نتایج بیان ژن 4Cl است. البته باید در نظر داشت که کاهش یا افزایش بیان ژن همیشه به مفهوم کاهش یا افزایش ماده حاصل نیست. البته همواره بیان یک ژن با مقدار متابولیتی که تولید می‌کند ارتباط مستقیمی ندارد. در رابطه با میزان بیان ژن و مقدار محصول چند نکته مهم وجود دارد: ۱- برخی آنزیم‌ها بیشتر از یک محصول تولید می‌کنند؛ ۲- برخی متابولیت‌های ثانویه توانایی تبدیل به یکدیگر را دارند؛ ۳- تنظیم بیان ژن در سطح رونوشت‌برداری یا پس از آن (ترجمه و پس از ترجمه) انجام می‌شود. در برخی موارد مقدار ماده مورد نظر و سطح بیان ژن ارتباط مستقیم با هم دارند اما در برخی دیگر از

بیان ژن PAL در فعل‌وانفعالات فعال می‌شود (Lee *et al.*, 1995). همچنین نتایج نشان داد که میزان پروتئین کل در تیمارها نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. این نتایج با یافته‌های Mundree و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد که اعلام کردند در شرایط تنش آبی میزان پروتئین کل گیاه کاهش می‌یابد. محققان اثبات کردند که کاهش قابلیت آبی در سویا باعث کاهش پروتئین و افزایش آمینواسیدها می‌گردد که نشان‌دهنده هیدرولیز و تخریب پروتئین است (Fukutoku & Yamada, 1981). همچنین در آزمایشی مشاهده شد که کاربرد نیترات کلسیم باعث کاهش اسید آمینه کل ریشه و نسبت اسید آمینه ریشه را به برگ افزایش داد (Nasseri Kholari *et al.*, 2016). گزارش شده است که بکار بردن کلسیم در تیمارهای شوری باعث غیرفعال شدن ژن‌هایی می‌شود که در شرایط شوری فعال می‌شوند، زیرا با توجه به نقش کلیدی کلسیم در گیاه نیازی به تولید این پروتئین‌ها نیست (Rus *et al.*, 2001).

مسیر مرکزی متابولیسم فنیل پروپانوئید با فعالیت دائمی آنزیم‌های PAL، C4H و 4CL که برای بیوسنتز تعداد زیادی از محصولات طبیعی ضروری هستند، انجام می‌شود (Hahlbrock & Scheel, 1989). تنظیم متابولیسم فنیل پروپانوئیدها به‌طور اولیه از طریق تنظیم بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسیر اتفاق می‌افتد (Hahlbrock & Scheel, 1989; Lamb *et al.*, 1989). انباشت mRNAهای PAL و 4Cl و فعالیت پروموت‌های آنها در طول تمایز سلول‌ها و بافت‌ها تغییر می‌کند (Bevan *et al.*, 1989; Ohl; Liang *et al.*, 1989; Haufl *et al.*, 1991; Schmelzer *et al.*, 1989; *et al.*, 1990)، یعنی زمانی که سلول‌های خاصی برای تولید ترکیب‌های مشتق شده از فنیل پروپانوئید مانند لیگنین، فلاونوئیدها و کومارین تخصصی می‌شوند. در گیاهانی که به‌دقت بررسی شده‌اند، مشاهده شده است که بیان ژن‌های PAL و 4Cl به‌طور هماهنگ تنظیم می‌شود (Lois *et al.*, 1989; Lois & Hahlbrock, 1992; Wu & Hahlbrock, 1992; Schmelzer *et al.*, 1989).

- calcium-based signalling in plants. *Current Biology*, 27(13): 667-679.
- Frederick, R.D. and Snyder, C.L., 2001. Real-time fluorescent PCR detection of fungal plant pathogens using the Smart Cycler. *Phytopathology*, 91: S29.
 - Fukutoku, Y. and Yamada, Y., 1981. Sources of Proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max* L.) I. Protein metabolism and proline accumulation. *Plant and Cell Physiology*, 22(8): 1387-1404.
 - Ghannadnia, M., Zarinkamar, F., Haddad, R. and Sharifi, M., 2011. Effect of different concentration of manganese on essence components, limonene synthase gene expression and some cell organelles ultrastructure in generation stage of *Cuminum cyminum* L. Ph.D in Biology. Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran.
 - Gul, B. and Khan, M.A., 2008. Role of calcium in alleviating salinity effects in coastal halophytes: 107-114. In: Khan, M.A. and Weber, D.J., (Eds.). *Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants*, Springer, 404p.
 - Hahlbrock, K. and Scheel, D., 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 40(1): 347-369.
 - Hauffe, K.D., Paszkowski, U., Schulze-Lefert, P., Hahlbrock, K., Dangel, J.L. and Douglas, C.J., 1991. A parsley 4CL-1 promoter fragment specifies complex expression patterns in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 3(5): 435-443.
 - Hepler, P.K., 2005. Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*, 17(8): 2142-2155.
 - Hoang, T.M., Moghaddam, L., Williams, B., Khanna, H., Dale, J. and Mundree, S.G., 2015. Development of salinity tolerance in rice by constitutive-overexpression of genes involved in the regulation of programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, 6: 175.
 - Hwang, K.S., Kim, H.U., Charusanti, P., Palsson, B.Ø. and Lee, S.Y., 2014. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 32(2): 255-268.
 - Hyodo, H., Kuroda, H. and Yang, S.F., 1978. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. *Plant Physiology*, 62(1): 31-35.
 - Janina, M., 2003. *Melissa officinalis*. *International Journal of Aromatherapy*, 10: 132-139.
 - Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H. and Vivanco, J., 2002. Chemical characterization of basil
- تحقیقات با وجود بیان بالای ژن مقدار ماده کاهش می‌یابد. این نتایج می‌تواند ارتباط غیرمستقیم بیان ژن و مقدار ماده را تفسیر نماید، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که همواره بیان یک ژن با مقدار متابولیتی که تولید می‌کند ارتباط مستقیمی ندارد (Ghannadnia *et al.*, 2011). بنابراین با توجه به نتایج این آزمایش مشخص می‌شود که مقدار کلسیم موجود در محیط کشت باعث تغییر بیان ژن‌های مورد مطالعه شده و بر برخی ترکیب‌هایی که از بیان آن ژن‌ها تولید می‌شوند، تأثیر گذاشته و همچنین میزان پروتئین کل را تغییر داده است. از نتایج این آزمایش می‌توان در پژوهش‌هایی که نیاز به تغییرات کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه دارند، استفاده کرد. البته آزمایش‌های تکمیلی برای سنجش دقیق متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌ها برای مشخص شدن نحوه تأثیر کلسیم بر بیان ژن‌ها و میزان متابولیت‌های ثانویه ضروری به نظر می‌رسد.

منابع مورد استفاده

- Bangerth, F., 1979. Calcium-related physiological disorders of plants. *Annual Review of Phytopathology*, 17(1): 97-122.
- Bevan, M., Shufflebottom, D., Edwards, K., Jefferson, R. and Schuch, W., 1989. Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *The EMBO Journal*, 8(7): 1899-1906.
- Blumenthal, M., Goldberg, A. and Brinckmann, J., 2000. *Herbal Medicine. Expanded Commission E monographs: Integrative Medicine Communications*. Newton, 519p.
- Darout, I.A., Christy, A.A., Skaug, N. and Egeberg, P., 2000. Identification and quantification of some potentially antimicrobial anionic components in miswak extract. *Indian Journal of Pharmacology*, 32(1): 11-14.
- Di, P., Hu, Y., Xuan, H., Xiao, Y., Chen, J., Zhang, L. and Chen, W., 2012. Characterization and the expression profile of 4-coumarate: CoA ligase (Ii4CL) from hairy roots of *Isatis indigotica*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(28): 2166-2175.
- Edel, K.H., Marchadier, E., Brownlee, C., Kudla, J. and Hetherington, A.M., 2017. The evolution of

- nitrate reductase activity, amino acids, nitrate and ion accumulation of *Pistacia vera* L., Badami Zarand, under sodium chloride stress. The Plant Production (Scientific Journal of Agriculture), 38(4): 35-48.
- Neumann, K., Kumar, A, and Imani, J., 2009. Plant cell and tissue culture-a tool in biotechnology, principles and practice: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 333p.
 - Ohl, S., Hedrick, S.A., Chory, J. and Lamb, C.J., 1990. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from Arabidopsis. The Plant Cell, 2(9): 837-848.
 - Oliveira, H., Barros, A.S., Delgadillo, I., Coimbra, M.A. and Santos, C., 2009. Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and biochemistry of in vitro grapevines: emphasis on sugar composition changes by FT-IR analyses. Environmental and Experimental Botany, 65(1): 1-10.
 - Oves, M., Aslam, M., Rauf, M.A., Qayyum, S., Qari, H.A., Khan, M.S., Alam, M.Z., Tabrez, S., Pugazhendhi, A. and Ismail, I.M., 2018. Antimicrobial and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized from the root hair extract of Phoenix dactylifera. Materials Science and Engineering: C, 89: 429-443.
 - Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. and Vyvyan, J.A., 2008. Introduction to Spectroscopy: Cengage Learning. 752p.
 - Pirtarighat, S., Ghannadnia, M. and Baghshahi, S., 2017. Antimicrobial effects of green synthesized silver nanoparticles using *Melissa officinalis* grown under in vitro condition. Nanomedicine Journal, 4(3): 184-190.
 - Roura, S., Pereyra, L. and Del Valle, C., 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in fresh cut lettuce subjected to the combined action of heat mild shocks and chemical additives. LWT-Food Science and Technology, 41(5): 919-924.
 - Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B.H., Matsumoto, T.K., Koiwa, H., Zhu, J.K., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M., 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(24): 14150-14155.
 - Samadi, S., Ghasemnejhad, A. and Alizadeh, M., 2015. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. Journal of Plant Production, 21(4): 135-148.
 - (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(21): 5878-5883.
 - Ke, D. and Saltveit Jr, M.E., 1986. Spotting and phenylalanine ammonia-lyase activity in iceberg lettuce. HortScience, 21(5): 1169-1171.
 - Kim, M.C., Chung, W.S., Yun, D.J. and Cho, M.J., 2009. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. Molecular Plant, 2(1): 13-21.
 - Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M. and Dixon, R.A., 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell, 56(2): 215-224.
 - Lee, D., Ellard, M., Wanner, L.A., Davis, K.R. and Douglas, C.J., 1995. The Arabidopsis thaliana 4-coumarate: CoA ligase (4CL) gene: stress and developmentally regulated expression and nucleotide sequence of its cDNA. Plant Molecular Biology, 28(5): 871-884.
 - Liang, X., Dron, M., Schmid, J., Dixon, R.A. and Lamb, C.J., 1989. Developmental and environmental regulation of a phenylalanine ammonia-lyase-beta-glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(23): 9284-9288.
 - Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K. and Schulz, W., 1989. A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. The EMBO Journal, 8(6): 1641-1648.
 - Lois, R. and Hahlbrock, K., 1992. Differential wound activation of members of the phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate: CoA ligase gene families in various organs of parsley plants. Zeitschrift für Naturforschung C, 47(1-2): 90-94.
 - Lorkowski, S. and Cullen, P.M., 2006. Analysing Gene Expression: A Handbook of Methods, Possibilities, and Pitfalls: John Wiley & Sons, 950p.
 - Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A. and Meftahizade, H., 2010. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A. Journal of Medicinal Plants Research, 4(25): 2753-2759.
 - Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Vander Willigen, C., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S. and Farrant, J.M., 2002. Physiological and molecular insights into drought tolerance. African Journal of Biotechnology, 1(2): 28-38.
 - Nasserri Kholari, S., Heydari, M., Jafari, S. and Daneshvar, M., 2016. Effects of calcium nitrate on

- composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7): 717-726.
- Wang, J.W. and Wu, J.Y., 2010. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2): 437-449.
 - Williams, R., 1976. Calcium chemistry and its relation to biological function. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. London, Cambridge University Press. 30: 1-17.
 - Wu, S.C. and Hahlbrock, K., 1992. In situ localization of phenylpropanoid-related gene expression in different tissues of light-and dark-grown parsley seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 47(7-8): 591-600.
 - Zhang, X. and Liu, C.J., 2015. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Molecular Plant*, 8(1): 17-27.
 - Ziaei, M., Sharifi, M., Behmanesh, M. and Razavi, K., 2012. Gene expression and activity of phenyl alanine amonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stages. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10(1): 32-39.
 - Scavroni, J., Ferreira, L.C., Ferrarese, M.L.L., Ono, E.O. and Rodrigues, J.D., 2018. Ethephon and calcium chloride, a combination that improves skin color of 'Rubi' table grape. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(1): 1-10.
 - Schmelzer, E., Kruger-Lebus, S. and Hahlbrock, K., 1989. Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. *The Plant Cell*, 1(10): 993-1001.
 - Singh, K., Kumar, S., Rani, A., Gulati, A. and Ahuja, P.S., 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Functional and Integrative Genomics*, 9(1): 125-134.
 - Smith, A., Johnson, H. and Hall, M., 2003. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 1: 153-163.
 - Stehfest, K., Boese, M., Kerns, G., Piry, A. and Wilhelm, C., 2004. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. *Journal of Plant Physiology*, 161(2): 151-156.
 - Stehfest, K., Toepel, J. and Wilhelm, C., 2005. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass

Effects of calcium chloride on the expression of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and 4-coumarate-CoA ligase (4CL) genes in *Melissa officinalis* L.

S. Pirtarighat¹ and M. Ghannadnia^{2*}

1- Department of Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2*- Corresponding author, Department of Horticultural science, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

E-mail: ghannadnia_ma@yahoo.com

Received: August 2018

Revised: January 2019

Accepted: February 2019

Abstract

Melissa officinalis L. (Lamiaceae) has been used as an important medicinal herb since ancient times. The study of the biosynthetic pathways of the plant medicinal metabolites is of particular importance in identifying the materials affecting these pathways in order to change the quantity or quality of the medicinal metabolites. The metabolic pathway of phenylpropanoid includes sophisticated pathways of biochemical reactions that synthesize a set of secondary plant metabolites such as flavonoids, isoflavonoids, lignins, anthocyanins, etc. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and 4-coumarate-CoA ligase (4CL) are two main enzymes of the phenylpropanoid pathway, playing a fundamental role in the biosynthesis of plant phenolic compounds. Regarding the fact that stress and environmental changes lead to changes in the expression of certain genes in plants, in this study, the gene expression of two PAL and 4CL enzymes was investigated using Real-Time PCR technique in *Melissa officinalis* L. grown under in vitro conditions treated by calcium chloride. Moreover, the total protein was extracted and quantitatively measured. The results showed that increasing and decreasing calcium chloride by 880 and 220 (mg l⁻¹) caused reduced PAL gene expression and increased 4CL gene expression, respectively. Also, the total plant protein content decreased by 585 and 595 (g l⁻¹) in 880 and 220 (mg l⁻¹) of calcium chloride treatment, respectively. According to Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, it was found that some phenolic compounds, carbohydrates, lipids, and proteins decreased in calcium chloride treatment than the control group. These results show the effect of calcium ion on the regulation of some genes expression and the production of their metabolites. Therefore, by changing the amount of calcium, the controlled amount of plant compounds could be achieved for specific purposes.

Keywords: *Melissa officinalis* L., gene expression, total protein, fourier transform infrared spectroscopy, phenylalanine ammonia lyase, 4-coumarate CoA ligase.