

جدا سازی ژن کلیدی تری بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (5-3-hydroxysteroid dehydrogenase) در بیوسنتز کاردنولیدها و بررسی بیان آن تحت تأثیر الیستورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در گیاه دارویی گل انگشتانه ایرانی (*Digitalis nervosa* L)

اسعد معروفی^{۱*}، وحیده سلیمی^۲ و محمد مجدی^۳

*۱- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

پست الکترونیک: a.maroufi@uok.ac.ir

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۳

چکیده

گل انگشتانه از منابع مهم ترکیبات دارویی گلیکوزیدهای قلبی مانند دیگوکسین، دیژیتوکسین و لاناتوزیدها می‌باشند که در نارساییهای احتقانی قلب کاربرد درمانی دارند. جنس *Digitalis* دارای چندین گونه با ارزش است و تنها گونه بومی ایران گونه نروسا (*Digitalis nervosa*) می‌باشد که تعدادی گلیکوزید قلبی در آن شناسایی شده است. نظر به اهمیت مطالعه و بررسی گیاهان بومی به منظور استفاده در صنایع دارویی، این پژوهش بر روی گونه نروسا انجام شد. یکی از ژن‌های کلیدی مهم در مسیر بیوسنتز کاردنولیدها در گیاه گل انگشتانه ژن *HSD-3* می‌باشد که کدکننده آنزیم *HSD-3* است که در مراحل اولیه بیوسنتز کاردنولیدها نقش کلیدی دارد. هدف این تحقیق توالی‌یابی، بررسی‌های فیلوژنتیکی و بیان ژن *HSD-3* در بافت‌های مختلف و تحت تیمار با الیستورهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بود. نتایج به دست آمده آشکار کرد که توالی کدکننده این آنزیم با گونه *Digitalis lanata* قرابت بسیار نزدیکی دارد. در بررسی بیان ژن *HSD-3* در سطح رونوشت نیز مشخص شد که در بافت برگ دارای میزان بیان چشمگیری است و تحت تیمارهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید میزان بیان این ژن افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در راستای افزایش کاردنولیدها از طریق مهندسی متابولیک و دست‌ورزی ژنتیکی مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: تری بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز، گل انگشتانه، گلیکوزیدهای قلبی، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات.

مقدمه

و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند، به‌علاوه بسیاری از داروهای شیمیایی نیز با الگوبرداری از ترکیبات شیمیایی گیاهی ساخته شده‌اند (Tripathi & Tripathi, 2003). معمولاً داروهای گیاهی خواص متعدد و عوارض کمتری داشته و در برخی موارد به‌عنوان تنها درمان مؤثر برای یک بیماری خاص،

استفاده بشر از گیاهان به‌عنوان منابع دارویی از ابتدای تمدن بشری وجود داشته است و در عصر جدید نیز ادامه دارد (Dattner, 2003; Fong, 2002). سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم به‌صورت سنتی

ترین آنها مانند دیگوکسین، دیژیتوکسین، انواع لاناتوزیدها و ژیتوکسین بیشتر در گونه‌های گل انگشتانه تولید می‌شوند (Samuelson, 2004). به‌طور کلی در کاردنولیدها ترکیبات استروئیدی به‌عنوان آگلیکون‌ها (بخش غیر قندی) شناخته می‌شوند. قسمت قندی گلیکوزیدهای قلبی خنثی است و به‌واسطه پیوندش با آگلیکون خصوصیت ویژه‌ای به مولکول می‌دهد که باعث جذب و انتقال آن در موجود زنده می‌شود و در نهایت عضلات قلبی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. گلیکوزیدهای قلبی که دارای انتهای گلوکزی می‌باشند، گلیکوزیدهای قلبی اولیه و زمانی که فاقد چنین دنباله‌ای باشند گلیکوزیدهای ثانویه نامیده می‌شوند. دیگوکسین گلیکوزید اختصاصی گونه *Digitalis lanata* است (Samuelson, 2004). همچنین در برگ گونه *Digitalis lanata* چندین گلیکوزید مهم به‌نامهای لاناتوزید-های A، B و C به‌دست آمده است، که به‌ترتیب استیل دیجیتوکسین، استیل جیتوکسین و استیل دیگوسین نامیده می‌شوند. گلیکوزیدهای A و B یعنی دیجیتوکسین و استیل جیتوکسین از گونه *Digitalis purpurea* نیز قابل جداسازی می‌باشند. در گونه *Digitalis nervosa* نیز چندین نوع گلیکوزید از جمله لاناتوزید A، لاناتوزید B، لاناتوزید E، گلوکوژیتوروزید، گلوکوژیتروفوکوزید، اودورویبوزید، گلوکواواترومنوزید، دیژیتالینوم و روم، دیژیتوکسی ژنین گلوکز و آلفا استیل دیژیتوکسین شناسایی شده‌اند که این ترکیبات در دو گروه دیژیتوکسیژنین و ژیتالوژنین قرار می‌گیرند. به‌طوری‌که لاناتوزید A بیشترین مقدار کاردنولید موجود در برگ این گیاه را تشکیل می‌دهد و متعلق به دسته دیژیتوکسی ژنین می‌باشد (Azadbakht & Ghasemi Dehkordi, 2001). تنها گونه بومی گل انگشتانه در ایران گونه *Digitalis nervosa* می‌باشد که در مناطق شمالی و غرب کشور به‌فراوانی رویش دارد. نظر به اهمیت و خاصیت دارویی گلیکوزیدهای قلبی و در دسترس بودن گونه *Digitalis nervosa* در ایران، اهمیت تحقیق بر روی این گیاه با ارزش دارویی بیشتر آشکار می‌شود. بررسی‌های انجام شده بر روی مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای قلبی در گیاه گل انگشتانه نشان داده است که

مورد توجه قرار گرفته‌اند (Huseini et al., 2006; Salem & Hossain, 2000). برای ساخت فراورده‌های دارویی از گیاه، ابتدا باید ماده مؤثره موجود در آن گیاه دارویی را شناسایی کرد، که این ماده مؤثره ممکن است در قسمت‌ها و اندام‌های مختلف گیاه موجود باشد. به‌طور کلی گیاهان دارویی حاوی محدوده وسیع و متنوعی از انواع ترکیبات مختلف با اثرات متفاوت می‌باشند که برخی از آنها دارای اثرات درمانی مفید هستند. بیشتر این ترکیبات از نوع متابولیت‌های ثانویه بوده که مواد آلی شیمیایی پیچیده‌ای هستند که گیاهان در طول حیات خود آنها را تولید می‌کنند. از جمله گیاهان دارویی مهم، گونه‌های متعلق به جنس دیجیتالیس (*Digitalis*) از خانواده گل میمونی (Scrophulariaceae) می‌باشند که منبع ترکیبات دارویی بسیار مهم و متنوع گلیکوزیدی قلبی مانند لاناتوزیدها، دیگوکسین و دیژیتوکسین می‌باشند. به‌طور کلی گلیکوزیدهای قلبی در انواع نارسایی‌های احتقانی قلب، فیبریلاسیون دهلیزی، تکیکاردی حمله‌ای، دهلیزی، شوک قلبی، صرع و رماتیسم مفصلی کاربرد درمانی دارند (Warren, 2005). اما در بسیاری از موارد مصرف زیاد آن برای انسان سمی می‌باشد (Maffe et al., 2010; Lin et al., 2009). از خواص دیگر این گیاه، خاصیت درمانی آن برای بیماری سرطان به‌ویژه سرطان پروستات و پستان در انسان می‌باشد (Lopez-Lazaro et al., 2008; Newman et al., 2001; Yeh et al., 2003). بعضی از یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهد که شیوع سرطان‌ها در میان بیمارانی که گلیکوزیدهای قلبی دریافت کرده‌اند پایین‌تر بوده و این ترکیبات به‌علت شباهت ساختمانی آنها با استروژن تا حدودی اثر حفاظتی در برابر سرطان ایجاد می‌کنند (Fujii et al., 1994). امروزه از برگ چند گونه از گل انگشتانه مانند *Digitalis purpurea* و *Digitalis lanata* در صنایع داروسازی برای تولید داروهای تقویت‌کننده و تنظیم‌کننده ضربان قلب و درمان نارسایی‌های قلبی استفاده می‌شود. این ترکیبات با ارزش در برگ‌های انواع گونه‌های مختلف گل انگشتانه نیز وجود دارند (Trease & Evans, 1998). تاکنون بیش از ۲۰۰ ترکیب کاردنولیدی (از ترکیبات گلیکوزیدی مهم) در گیاهان مختلف شناسایی شده‌است، اما مهمترین و معروف-

طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار با غلظت ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و غلظت ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات تیمار شدند. همچنین از آب مقطر به‌عنوان تیمار شاهد استفاده شد. غلظت‌ها بر اساس تأثیر معنی‌دار آنها بر بیان ژن در گل انگشتانه و دیگر گونه‌های حاوی کاردنولید انتخاب شدند (Munkert et al., 2014). اعمال تیمارها به‌صورت محلول‌پاشی و در حالت چند برگگی گیاهان انجام شد. همچنین آب مقطر به‌عنوان تیمار شاهد بر روی برگ گیاهان اعمال شد. قبل از اعمال تیمارها (ساعت صفر)، ۱ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار از ریشه، ساقه و برگ‌ها نمونه‌گیری به‌عمل آمد. نمونه‌ها تا هنگام استخراج RNA در شرایط °C ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

از نمونه‌های گیاهی با استفاده از روش Piotr و Sacchi (۲۰۰۶)، RNA استخراج شد. کیفیت RNA بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ تعیین و غلظت RNA با دستگاه نانو دراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم در میکرولیتر محاسبه شد. پس از هم غلظت‌سازی RNAها (مقدار ۵۰۰ نانوگرم برای هر نمونه)، cDNA به‌کمک آغازگر Oligo-dt و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (M-MuLV RT) طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Vivantis) سنتز شد.

طراحی آغازگرها

ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی ژن *HSD-3* در هفت گونه گیاهی از جنس *Digitalis* از پایگاه اطلاعاتی مرکز بین‌المللی اطلاعات زیست‌فناوری NCBI دریافت شد. هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین Boxshade و CLUSTALW (Thompson et al., 1994) انجام شد. آغازگرهای موجود در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 v. 0.4.0 (Rosen & Skaletsky, 2000) طراحی شدند (جدول ۱). انتظار می‌رفت این آغازگرها محصولی به‌طول تقریبی ۸۰۰ جفت باز را در

یازده خانواده ژنی مهم در این مسیر وجود دارند (Wu et al., 2012). یکی از ژن‌های کلیدی، ژن *HSD-3* می‌باشد که کدکننده آنزیم 3-hydroxysteroid dehydrogenase (*HSD-3*) است. این آنزیم در مراحل اولیه مسیر بیوسنتز کاردنولیدها نقش اساسی را دارد (Wu et al., 2012). آنزیم *HSD-3* ترکیب پروژسترون از پیش‌سازهای مهم لاناتوزیدها را کاتالیز می‌کند، بنابراین یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز ترکیبات استروئیدی مانند گلیکوزیدهای قلبی است. از این رو به‌نظر می‌رسد برای افزایش متابولیت‌هایی مانند گلیکوزیدهای قلبی دست‌ورزی ژنتیکی و تعیین خصوصیت این ژن بسیار مفید خواهد بود. بنابراین با توجه به اهمیت گونه ایرانی این جنس و نیز به‌دلیل نقش کلیدی ژن *HSD-3* در مسیر بیوسنتز کاردنولیدها و دیگر لاناتوزیدهای با ارزش که دارای خواص دارویی هستند، در این تحقیق توالی‌یابی، بررسی خصوصیات و همچنین بیان آن در بافت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. تاکنون ژن کدکننده آنزیم *HSD-3* در چند گونه گل انگشتانه شناسایی و توالی‌یابی شده است (Kreis, 2007) و اطلاعات به‌دست آمده در راستای افزایش ترکیبات گلیکوزیدی قلبی بسیار با ارزش بوده است. به‌علاوه نظر به اهمیت این ترکیبات با ارزش، در گونه‌های دیگری که از خانواده گل انگشتانه نیستند نیز شناسایی کاردنولیدها و ژن‌های کلیدی مانند *HSD-3* مورد توجه بوده است، به‌عنوان مثال Munkert و همکاران (۲۰۱۴) در گونه *Erysimum crepidifolium* از خانواده شب‌بو بیان ژن *HSD-3* را شناسایی، توالی‌یابی و بیان آن را بررسی کرده‌اند و نتایج با ارزشی ارائه شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه‌های بافتی

بذر گیاه گل انگشتانه گونه *Digitalis nervosa* از بانک ژن (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) دریافت شد و در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای °C ۲۴ ± ۲ کشت شد. برای بررسی بیان ژن تحت تأثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات گیاهان در قالب

واکنشهای PCR و RT-PCR نیمه کمی ابتدا برای جداسازی و کلون ژن *HSD-3* با استفاده از آغازگرهای طراحی شده (جدول ۱) PCR انجام شد. مواد لازم و شرایط PCR به ترتیب در جدول ۲ و ۳ ارائه شده است. برای بررسی بیان ژن به روش RT-PCR نیمه کمی از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژن *HSD-3* و آغازگرهای اختصاصی ژن یوبی کیتین (Ubiquitin) به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. نسبت‌های مواد به کار رفته و چرخه‌های حرارتی در (جدول ۲) و (جدول ۴) آورده شده است. کلیه واکنش‌های PCR در دستگاه ترمو سایکلر شرکت BioRad انجام شد.

واکنش RT-PCR تکثیرکنند. همچنین پس از تعیین توالی قطعه تکثیر شده به عنوان ژن *HSD-3* در گونه *Digitalis nervosa* آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس برای بررسی بیان ژن *HSD-3* طراحی شد (جدول ۱). آغازگرهای طراحی شده از نظر شرایط ترمودینامیکی و دایمر توسط نرم افزار oligo calc ارزیابی شدند. آغازگرهای ژن یوبی کیتین (Ubiquitin) به عنوان ژن رفرنس (ژن کنترل داخلی) با همان مشخصات و توالی از تحقیق Wu و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده و مشخصات مربوط به آنها

نام آغازگر	توالی آغازگر (۵' به ۳')	دمای اتصال
F-3 -HSD1*	ATGTCGTCAAAGCCAAGGT	56.7 °C
R-3 -HSD1*	CGAAGTGGCAGCACGCAATC	59.7 °C
F-Ubiquitin	CTCTCATTGGTGTGAGGCTTC	59.9 °C
R-Ubiquitin	TGCCTCACATATCGATGGTGTC	59.6 °C
F-3 -HSD2**	GCTACGCGGTGGAGAAATAC	53.7 °C
R-3 -HSD2**	ATCTGACTCGGTGTCATTCC	54.0 °C

F آغازگر مستقیم، R آغازگر معکوس، * آغازگر برای جداسازی ژن *HSD-3*، ** آغازگر برای بررسی بیان ژن

جدول ۲- ترکیب مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR

مواد	غلظت در محلول پایه	حجم استفاده شده
cDNA	-	۱ μL
آغازگر مستقیم-معکوس	۵ pmol/μl	۱ μL هر یک
آنزیم تک DNA پلی مراز	۱۰ u/μl	۰/۱ μL
کلرید منیزیم	۵۰ mM	۰/۳ μL
بافر PCR	۱۰ X	۱ μL
dNTP	۱۰ mM	۰/۲ μL
آب	-	۵/۴ μL
کل	-	۱۰ μL

جدول ۳- چرخه حرارتی واکنش PCR برای تکثیر ژن HSD-3

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما (°C)
۱	واسرشت اولیه	۴ (دقیقه)	۹۴
	واسرشت	۳۰ (ثانیه)	۹۴
۳۵	اتصال	۳۰ (ثانیه)	۵۸
	بسط	۵۰ (ثانیه)	۷۲
۱	بسط نهایی	۷ (دقیقه)	۷۲

جدول ۴- چرخه حرارتی واکنش RT-PCR نیمه کمی

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما (°C)
۱	واسرشت اولیه	۴ (دقیقه)	۹۴
	واسرشت	۳۰ (ثانیه)	۹۴
۲۸	اتصال	۳۰ (ثانیه)	*
	بسط	۳۵ (ثانیه)	۷۲
۱	بسط نهایی	۷ (دقیقه)	۷۲

* با توجه به نوع ژن (جدول ۱)

دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. نمودارهای مناسب برای تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار Microsoft Excel رسم شدند.

نتایج

استخراج RNA با کیفیت مناسب از بافت های برگ، ریشه و ساقه، گیاه گل انگشتانه ایرانی انجام شد. برای اطمینان از ساخت cDNA واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ژن یوبی کیتین انجام شد که قطعه ای به طول ۱۱۰ جفت باز را توانست تکثیر کند (شکل ۱). آغازگر-های طراحی شده (جدول ۱) برای جداسازی HSD-3 در گونه *Digitalis nervosa* طبق انتظار قطعه در حدود ۸۰۰ جفت باز را تکثیر کردند (شکل ۲). در مرحله بعد محصول PCR به دست آمده، در دو جهت مستقیم و

تجزیه های بیوانفورماتیکی

برای بررسی توالی شناسایی شده، ارزیابی بیوانفورماتیکی و هم ردیفی به کمک تجزیه بلاست (Blast) انجام شد. تجزیه فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA4 (Tamura et al., 2007) انجام شد، و در نهایت درخت فیلوژنتیکی (دندروگرام) با روش نزدیکترین همسایگی رسم شد.

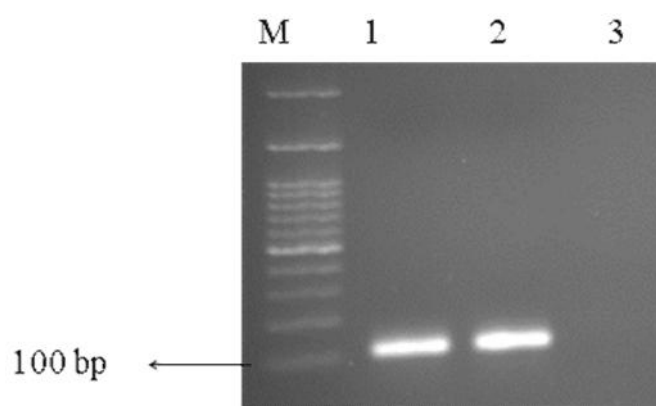
کمی کردن RT-PCR نیمه کمی و تجزیه داده ها

با استفاده از نرم افزار GelQuantNET عکس های مرتبط با هر ژل (داده های حاصل از RT-PCR نیمه کمی) به داده های کمی تبدیل شد. این نرم افزار شدت باندهای حاصل را به داده های کمی تبدیل می کند. تمامی تجزیه های انجام شده براساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده ها به روش آزمون

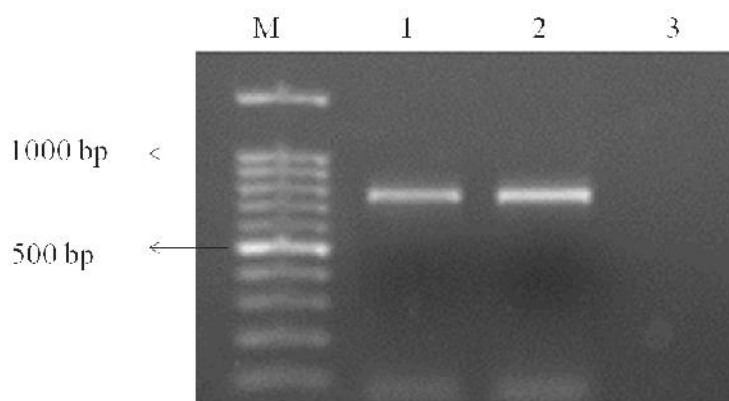
جدا سازی ژن کلیدی تری بتا هیدروکسی ...

داده‌ها مشخص شد که قطعه تکثیر شده متعلق به ژن *HSD3* می‌باشد (جدول ۵). در پایان برای تعیین قرابت ژنتیکی دندروگرام براساس ترجمه پروتئینی توالی به دست آمده، رسم گردید (شکل ۴) و سرانجام قرابت بالایی بین گونه *Digitalis nervosa* با گونه *Digitalis lanata* به دست آمد.

معکوس توالی‌یابی شد و طول آن ۷۸۰ جفت باز به دست آمد (شکل ۳). سپس توالی به دست آمده که احتمالاً ژن *HSD3* در *Digitalis nervosa* است، در پایگاه داده NCBI بلاست (Blastx) شد. با توجه به E-value و درصد یکسانی توالی کلون شده در گونه *Digitalis nervosa* با سایر توالی‌های موجود در پایگاه



شکل ۱- نمایش قطعه تکثیر شده به طول ۱۱۰ جفت باز توسط آغازگرهای Ubiquitin بر روی ژل آگارز. ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب بافت برگ و ساقه، ستون ۳ کنترل منفی با RNA و M اندازه نما (مارکر) DNA را نشان می‌دهد.



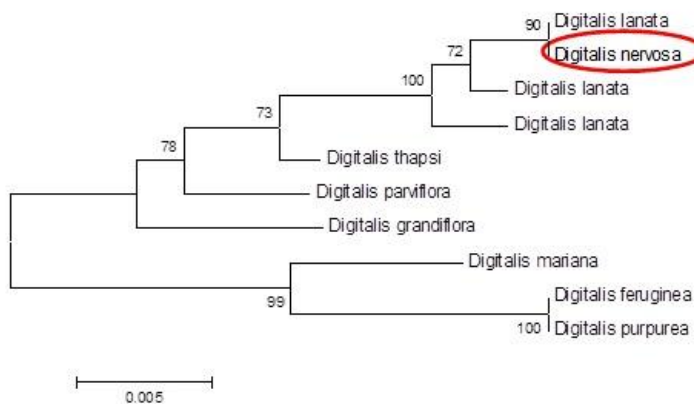
شکل ۲- نمایش قطعه تکثیر شده به طول حدود ۸۰۰ جفت باز توسط آغازگرهای *HSDI3* در واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز. ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب بافت برگ و ساقه، ستون ۳ کنترل منفی با RNA و M اندازه نما (مارکر) DNA را نشان می‌دهد.

>3 -HSD in *Digitalis nervosa*

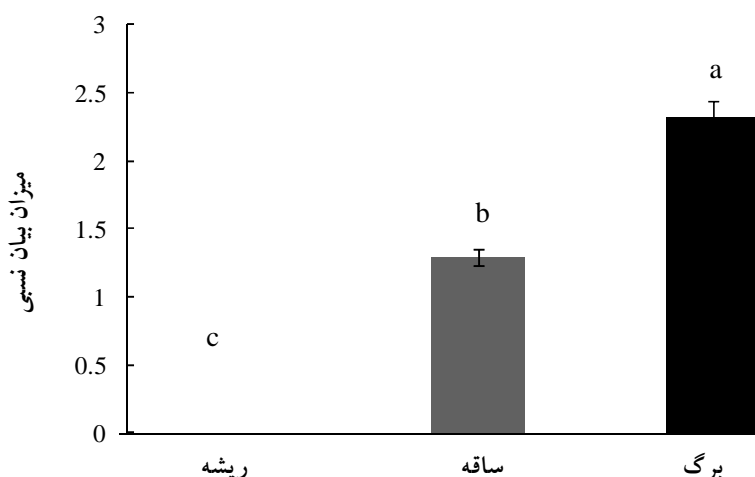
TCAATTCCTCTAGACTAGATCTAATTAACAGTTTATATGTTATTGACAGGTTGGAGGG
TAAAGTGGCAATCATCACCGGAGCCGCTAGCGGCATCGGCGAGGAGACGGCAAGATTGT
TCGTGGAGCATGGCGCCTCAGTGGTGGTGGCGGACGTCCAGGACGAATTGGGGCGCCAG
GTCGTGCGCTTCCGTAAACTCTGACGACAAGATAAGTTACTACCAC TGCGACGTCAGAGA
TGA AAAACAAGTGGCGGCCACCGTCCGCTACGCGGTGGAGAAATACGGGGCGCCTCGACA
TCATGCTGAGCAACGCCGGAGTCTTCGGGGCCTTGATGACGAACGTAATCGATCTCGAC
ATGGTTGACTTTGAAAATGTATTGGCGACTAACGTGCGCGGAGTTGCCAACACTATAAAA
GCACGCGGCACGAGCCATGGTGGAGGGGAAGGTCAAGGGTCCATCATTTGCACCGCCA
GCGTGTGCGCGAGCCTTGGAGGCATGGGCCCGCCCGCTTACACGGCTTCCAAACACGCC
GTCCTGGGCCTAGTCAAGGGCGCTTGCGCCGAGTTGGGGGTGCACGGGATCCGAGTCAA
CTCGGTGGCGCCGTACGGTGTGGCGACCCCGATGCGGTGCAGTGCTTACGGAATGACAC
CGAGTCAGATGGAGGAGGCCAATAACTCCAGGGCTAACTTGAAGGGGGTGGTTTTGAAG
GCTAAGCACGTAGCTGAGGCGGCTCTCTTCTTGGCTTCCGATGAGTCGGCTTATGTCTAG
TGGACAAAACCTTGGCTGTAGACGGCGGCTTCA

شکل ۳- تعیین توالی ژن *HSD-3* در جهت ۳' به ۵'جدول ۵- نتیجه بلاست توالی جدا شده از گونه *Digitalis nervosa* با سایر گونه‌ها

توصیف توالی	نمره حداکثر	نمره کل	درصد پوشش	ارزش E	درصد همسانی	شماره دسترسی
<i>Digitalis lanata</i> , mRNA, complete cds	1424	1424	100%	0.0	99%	AY844960.1
<i>Digitalis lanata</i> , complete cds	1413	1413	98%	0.0	100%	DQ466890.1
<i>Digitalis lanata</i> , mRNA	1413	1413	100%	0.0	99%	AJ345026.1
<i>Digitalis thapsi</i> , complete cds	1365	1365	98%	0.0	99%	AY789452.1
<i>Digitalis parviflora</i> , complete cds	1338	1338	98%	0.0	98%	AY789450.1
<i>Digitalis ferruginea</i> , complete cds	1336	1336	100%	0.0	98%	KM406483.1
<i>Digitalis grandiflora</i> , complete cds	1327	1327	98%	0.0	98%	AY789449.1
<i>Digitalis mariana</i> , complete cds	1271	1271	98%	0.0	97%	AY844959.1
<i>Digitalis ferruginea</i> , complete cds	1254	1254	98%	0.0	96%	AY789451.1

شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس ترجمه ژن *HSD-3* از گونه‌های مختلف گل انگشتانه

گیاهان در شرایط نرمال (بدون اعمال تنش) نشان داد که بیشترین میزان بیان در بافت برگ و پس از آن در ساقه مشاهده شد و هیچ بیانی در ریشه‌ها دیده نشد (شکل ۵). همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف در سطوح بیان ژن از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

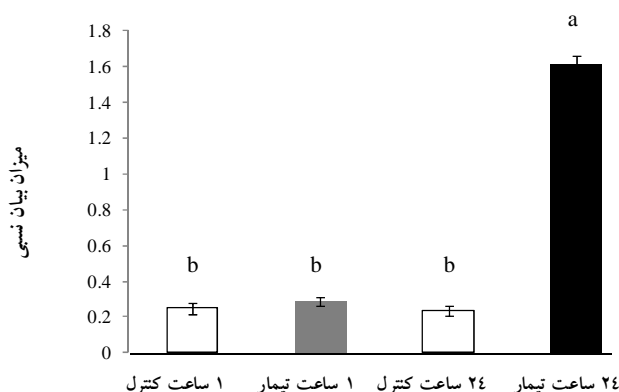


شکل ۵- میزان بیان نسبی ژن *HSD-3* در بافتهای مختلف گیاه گل انگشتانه حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن است.

اسید یک ترکیب فنولی است و در تنظیم رشد و نمو گیاهان نقش دارد و همچنین در اثر متقابل با سایر موجودات زنده و نیز در پاسخ به تنشهای غیر زنده نقش مهمی را ایفا می‌کند (Popova et al., 2015) و نیز نقش آن به عنوان یک محرک در افزایش بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانوی به خوبی نشان داده شده است (Pu et al., 2009)، بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن *HSD-3* در گیاه گل انگشتانه تحت تیمار با سالیسیلیک اسید در ارتباط با نقش این ترکیب زیستی باشد.

بیان نیمه کمی ژن *HSD-3* در اندام‌های مختلف گیاه گل انگشتانه در سطح رونوشت برای بررسی بیان ژن از ریشه، ساقه و برگ گونه *Digitalis nervosa* در شرایط نرمال و تحت تیمار نمونه‌گیری انجام شد. سپس به روش نیمه کمی بیان ژن *HSD-3* اندازه‌گیری شد. ابتدا نتایج بیان ژن در بافتهای مختلف در

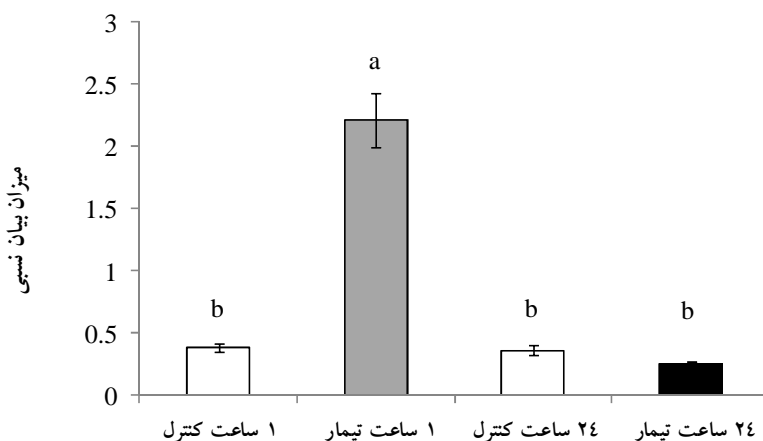
در مرحله بعد تأثیر سالیسیلیک اسید بر روی میزان بیان ژن *HSD-3* در برگها بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار نشان داد که بیان ژن مذکور پس از ۲۴ ساعت افزایش چشمگیری ($P < 0.05$) داشت (شکل ۶). در شرایط شاهد یک روند تقریباً یکنواخت در میزان بیان ژن *HSD-3* مشاهده شد. تجزیه بیان ژن آشکار کرد که سطح بیان این ژن بعد از اعمال تیمار با سالیسیلیک اسید پس از ۲۴ ساعت نسبت به کنترل حدود ۶/۵ برابر افزایش نشان داده است (شکل ۶). با توجه به اینکه سالیسیلیک



شکل ۶- میزان بیان نسبی ژن *HSD-3* در برگ در زمان‌های ۱ و ۲۴ ساعت پس از تیمار گیاه با سالیسیلیک اسید در گل انگشتانه گونه *nervosa* (حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن است).

محرک‌ها در فعال کردن بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی و در نتیجه تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان مختلف می‌باشد (Zhao et al., 2005). به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهد که در اثر تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید در ساعات اولیه اعمال تنش افزایش بیانی برای ژن *HSD-3* مشاهده نشود اما پس از ۲۴ ساعت افزایش بیان معنی‌دار باشد. به‌عکس در اثر اعمال تیمار متیل جاسمونات در ساعات‌های اولیه افزایش بیان معنی‌داری مشاهده شود و پس از ۲۴ ساعت افزایشی مشاهده نشود.

همچنین بیان ژن *HSD-3* در گیاهان تحت تیمار با متیل جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان این ژن در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد ۱ ساعت بعد از اعمال تیمار حدود ۵/۷ برابر بیشتر است که این افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) بود (شکل ۷) و پس از ۲۴ ساعت بیان آن به مقدار جزئی نسبت به کنترل کاهش یافت. در گیاهان کنترل یک روند تقریباً یکنواخت در میزان بیان ژن *HSD-3* مشاهده شد. گزارش شده است که ایستوری مانند متیل جاسمونات یکی از مؤثرترین



شکل ۷- میزان بیان نسبی ژن *HSD-3* در برگ در زمان‌های ۱ و ۲۴ ساعت پس از تیمار گیاه با متیل جاسمونات در گل انگشتانه گونه *nervosa*. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با آزمون دانکن است.

بحث

گونه‌های گل انگشتانه همچنان مهمترین منبع دستیابی به گلیکوزیدهای قلبی می‌باشند (Mohammed et al., 2015)، از این رو بررسی شرایط افزایش این متابولیت‌های مهم، فاکتورهای مؤثر بر افزایش آنها، به دست آوردن اطلاعات ژنتیکی و مولکولی مرتبط با مسیر بیوسنتز آنها برای دستکاری‌های ژنتیکی از اهمیت زیادی برخوردار است. از آنجایی که در کشورهای مختلف از گونه‌های متفاوت *Digitalis* مانند *lanata* و *purpurea* برای تهیه داروهای مؤثر در بیماری نارسایی احتقانی قلب استفاده می‌شود، در صورت مطالعات تکمیلی به‌ویژه مطالعات فارماکولوژی و ژنتیکی در مورد گونه گل انگشتانه در ایران نیز ممکن است به این دسته از داروها دسترسی یافت. با توجه به اینکه مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای قلبی مسیر پیچیده‌ای است، از این رو شناسایی دقیق اجزا و به‌ویژه آنزیم‌های کلیدی دارای ارزش فراوانی در راستای افزایش متابولیت‌های نهایی مانند لاناتوزید می‌باشد. یکی از آنزیم‌های کلیدی آنزیم *HSD-3* می‌باشد (Kreis et al., 1998) که یک پروتئین محلول بوده و دو عملکرد برای آن اشاره شده است که شامل اکسیداسیون پرگن‌نولون (Pregnenolone) به ایزوپروژسترون (isoprogestron) و کاهش -pregnane-5-3-20-dione به -pregnane-3-ol-20-on-5 می‌باشد (Seidel et al., 1990; Finsterbusch et al., 1999). با توجه به نقش مهم این آنزیم، ضروری به نظر می‌رسد که مطالعات دقیق به‌ویژه در گونه‌هایی که اطلاعات کاملی در مورد آن در دسترس نیست، انجام شود.

به‌منظور جداسازی و توالی‌یابی ژن *HSD-3* در گونه ایرانی گل انگشتانه، ابتدا یک جفت آغازگر با توجه به توالی‌های ژن *HSD-3* در دیگر گونه‌های متعلق به جنس *Digitalis* طراحی شد، سرانجام قطعه با سایز مورد انتظار تکثیر شد، هر چند که اندازه قطعه تکثیر شده اولین نشانه از صحیح بودن کلون ژن است، اما دلیل کافی برای صحت روند نمی‌باشد. در نتیجه در مرحله بعدی توالی‌یابی قطعه تکثیر شده انجام شد. مقایسه نتایج حاصل از توالی‌یابی

نشان داد که درجات بسیار بالایی از یکسانی با ژن -3 *HSD* در دیگر گونه‌های متعلق به جنس *Digitalis* وجود دارد که نشان از حفظ‌شدگی بسیار بالای ژن *HSD-3* است. در بررسی روابط خویشاوندی این ژن در میان گونه‌های وابسته به جنس *Digitalis* رابطه فیلوژنی بسیار نزدیکی با گونه *D. lanata* مشاهده شد. همچنین Herl و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که در شش گونه از *Digitalis* (*thapsi purpurea lanata ferruginea mariana grandiflora arviolata*) درجه بالایی از شباهت (۹۴ تا ۹۸ درصد) توالی ژن *HSD-3* وجود دارد. بنابراین با اطمینان زیادی می‌توان صحت توالی کلون شده در گونه *nervosa* را تأیید کرد.

نتایج مربوط به RT-PCR نیمه‌کمی برای مطالعه بیان ژن *HSD-3* در گونه *nervosa* نشان داد که بافت‌های برگ، ساقه و ریشه اساساً بیان متفاوتی را نشان می‌دهند، به‌طوری‌که میزان بیان ژن *HSD-3* به ترتیب در اندام‌های برگ و بعد ساقه بیشتر و در ریشه قابل تشخیص نبود. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده از سایر مطالعات یکسان به نظر می‌رسد. ارنست و همکاران اشاره کرده‌اند که در گونه *lanata* در برگها میزان بیان ژن *HSD-3* بالاست (Ernst et al., 2010). در تحقیقات انجام شده در گیاه گل انگشتانه گونه *D. lanata* مشخص شده است که کاردنولیدها در اندام‌های هوایی مخصوصاً برگها تجمع دارند و در ریشه‌ها کاردنولید دیده نمی‌شود (Hoelz et al., 1992)، بنابراین ممکن است ژن *HSD-3* که در مسیر بیوسنتزی کاردنولیدها فعال می‌باشد، در اندام‌های هوایی بیشترین بیان را داشته باشد. همچنین مطالعات بیان ژن *HSD-3* در بین چند گونه گل انگشتانه آشکار کرد که بیشترین میزان بیان در گونه *lanata* مشاهده شده است (Herl et al., 2007). با توجه به تولید صنعتی دیگوکسین از گونه *lanata* (Heinrich et al., 2004) و قرابت بسیار نزدیک گونه *nervosa* به گونه *lanata* از لحاظ ژن *HSD-3* احتمال دارد که *HSD-3* در گونه *nervosa* نیز همانند *lanata* نقش مؤثری در افزایش گلیکوزیدهای قلبی اختصاصی داشته باشد.

که تنظیم بیان ژن *HSD-3* در گیاهان تحت شرایطی کنترل شود و با توجه به اینکه میزان بیان ژن‌های کلیدی مانند *P5 R2* و *HSD-3* عموماً با میزان متابولیت نهایی ارتباط مستقیمی دارند، بنابراین در صورت نیاز می‌توان با اعمال تیمارهای سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات مقادیر بیشتری از آن متابولیت‌ها را القا کرد. در پایان می‌توان گفت ژن *HSD-3* در اثر تیمار گیاه گل انگشتانه گونه *nervosa* با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات نیز میزان افزایش بیان چشمگیری نشان می‌دهد، از این‌رو این نتایج می‌تواند در راستای افزایش تولید کاردنولیدها به‌کار گرفته شود. بنابراین نظر به اهمیت نقش ژن *HSD-3* در مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای قلبی، اطلاعات حاصل از این تحقیق می‌تواند در راستای اهداف دست‌ورزی ژنتیکی و مهندسی متابولیک مفید باشد.

منابع مورد استفاده

- Āzadbakht, M. and Ghasemi Dehkordi, N., 2001. Identification of cardiac glycosides of Iranian *Digitalis* species by HPLC. The Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 11: 25-31.
- Dattner, A.M., 2003. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. *Dermatologic Therapy*, 16: 106-113.
- Ernst, M., de Pádua, R.M., Herl, V., Müller-Uri, F. and Kreis, W., 2010. Expression of 3 - HSD und P5 R, genes encoding for 5-3 -hydroxysteroid dehydrogenase (3 -HSD) and progesterone 5 - reductase (P5 R) in leaves and cell cultures of *Digitalis lanata* Ehrh. *Planta Medica*, 76: 923-927
- Finsterbusch, A., Lindemann, P., Grimm, R., Eckerskorn, C. and Luckner, M., 1999. Delta(5)-3beta-hydroxysteroid dehydrogenase from *Digitalis lanata* Ehrh. - a multifunctional enzyme in steroid metabolism? . *Planta*, 209(4): 478-86.
- Fong, H., 2002. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospect. *Integrative Cancer Therapies*, 3: 287-293.
- Fordyce, J.A. and Malcolm, S.B., 2000. Specialist weevil, *Rhyssomatus lineaticollis*, does not spatially avoid cardenolide defenses of common milkweed by ovipositing into pith tissue. *Journal of Chemical Ecology*, 26(12): 2857-2874.

در واکنش دفاعی گیاهان بر ضد حشرات و بیماری‌گرهای میکروبی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید دارای نقش کلیدی هستند (Reymond & Farmer, 1998; Smith *et al.*, 2009). تیمار گیاهان با متیل جاسمونات منجر به افزایش مقاومت به تنش گیاه‌خواری می‌شود (Fraire-Velázquez *et al.*, 2011). حمله حشرات گیاه‌خوار مانند *Manducasexta* در تنباکو باعث فعال شدن مسیر سیگنالی جاسمونات شده است (Paschold *et al.*, 2007). هورمون‌هایی مانند سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات در طول دفاع در گیاهان تجمع می‌یابند و موجب بیان هماهنگ ژن‌ها در دفاع می‌شوند (Fraire-Velázquez *et al.*, 2011). از طرفی کاردنولیدها به‌عنوان دفاع مستقیم در برابر گیاه‌خواران عمل می‌کنند (Fordyce & Malcolm, 2000). پس با توجه به اینکه متیل جاسمونات در مقاومت به تنش‌های گیاه‌خواری نقش مؤثری دارد، بنابراین تأثیر آن بر تغییر در میزان بیان ژن *HSD-3* به‌عنوان یک ژن کلیدی در بیوسنتز کاردنولیدها در گونه *nervosa* بررسی شد. نتایج نشان داد که ژن *HSD-3* به احتمال زیاد تحت تأثیر مستقیم این ترکیبات باشد، بنابراین تولید کاردنولیدها را افزایش دهد. در تجزیه بیان ژن استروئید ردوکتاز (- 5 steroid P5 R2; reductase)، یک ژن کلیدی دیگر در مسیر بیوسنتز کاردنولیدها، در گونه *purpurea* در شرایط تیمار گیاهان با متیل جاسمونات در ۴ و ۸ ساعت افزایش بیان و در ۲۴ و ۴۸ ساعت کاهش بیان مشاهده شده است، همچنین در تیمار با سالیسیلیک اسید افزایش بیان ژن در ۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد (Perez-Bermudez *et al.*, 2010). در گیاهان *Erysimum crepidifolium* که از جمله گیاهان تولیدکننده کاردنولید می‌باشند، ژن *HSD3-3* تحت تأثیر متیل جاسمونات افزایش بیانی تا شش برابر گیاهان شاهد نشان داده است (Munkert *et al.*, 2014). در کشت ریشه‌های موئین در گونه *Calotropis gigantean* که از تولیدکنندگان کاردنولید می‌باشد، تحت تأثیر تیمارهای متفاوت از جمله متیل جاسمونات مقدار تولید کاردنولید به‌صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد (Sun *et al.*, 2012). بنابراین به‌نظر می‌رسد

- intoxication of a whole family. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 10:727–732.
- Mohammed, A., Yücesan, B., Demir-Ordu, Ö., Cihangir, C., Eker, I., Kreis, W. and Gürel, E., 2015. *In vitro* regeneration and cardenolide determination of an endemic foxglove, *Digitalis cariensis* (Aegean Foxglove). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 51: 438-444.
 - Munkert, J., Ernst, M., Muller-Uri, F. and Kreis, W., 2014. Identification and stress-induced expression of three 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases from *Erysimum crepidifolium* Rchb. and their putative role in cardenolide biosynthesis. *Phytochemistry*, 100: 26–33.
 - Newman, R., Yang, P. and Pawlus, A., 2008. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Molecular Physiology*, 8: 36-49.
 - Paschold, A., Halitschke, R. and Baldwin, I.T., 2007. Co(i)-ordinating defenses: NaCO11 mediates herbivore induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *The Plant Journal*, 51: 79-91.
 - Perez-Bermudez, P., Garcia, A.A., Tunon, I. and Gavidia, I., 2010. *Digitalis purpurea* P5 beta R2, encoding steroid 5 beta-reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. *New Phytologist*, 185: 687–700.
 - Piotr, C. and Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1: 581-585.
 - Popova, L., Pancheva T. and Uzunova, A., 1997. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 23: 85–93.
 - Pu, G.B., Dong-Ming, M., Chen, J.L., Ma, L.Q., Wang, H., Li, G.F. and Ye, H.C., 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Reports*, 28:1127–1135.
 - Reymond, P. and Farmer, E.E., 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(5): 404–411.
 - Rosen, S. and Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. 365-386. In: Misener, S. and Krawetz, S.A., (Eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 460p.
 - Salem, M.L. and Hossain, M.S., 2000. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *International Journal of Immunopharmacology*, 22(9): 729-740.
 - Fraire-Velázquez, S., Rodríguez-Guerra, R. and Sánchez-Calderón, L., 2011. Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants. 3–26. In: Shanker, A.K. and Venkateswarlu, B., (Eds). *Abiotic stress response in plants- physiological, biochemical and genetic perspectives*. In Tech, Rijeka, 358p.
 - Fujii, Y., Ikeda, Y. and Yamazaki, M., 1994. High-performance liquid chromatography determination of lanatosides in *Digitalis lutea* and *Digitalis ambigua* leaves. *Journal Liquid Chromatogram*, 17: 4451-4461.
 - Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. and Williamson, E.M., 2004. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Edinburgh, 336pp.
 - Herl, V., Frankenstein, J., Meitinger, N., Müller-Ur, F. and Kreis, W., 2007. 5-3 - hydroxysteroid dehydrogenase (3 -HSD) from *Digitalis lanata*. Heterologous expression and characterization of the recombinant enzyme. *Planta Medicalogy*, 73: 704-710.
 - Hoelz, H., Kreis, W., Haug, B., and Reinhard, E., 1992. Storage of cardiac glycosides in vacuoles of *Digitalis lanata* mesophyll cells. *Phytochemistry*, 31: 1167-71.
 - Huseini, H., Larijani, B., Radjabipour, B. and Mohsin, R., 2006. The Efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Silymarin) in the Treatment of Type II Diabetes: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Clinical Trial. *Phytotherapy Research*, 20: 1036–1039.
 - Kreis, W., Hensel, A. and Stuhlemmer, U., 1998. Cardenolide Biosynthesis in Foxglove. *Planta Medicalogy*, 64: 491-99.
 - Kreis, W., 2007. 5-3 -hydroxysteroid dehydrogenase (3 -HSD) from *Digitalis lanata*. Heterologous expression and characterisation of the recombinant enzyme. *Planta Medicalogy*, 73: 704-710.
 - Lin, C.C., Yang, C.C., Phua, D.H., Deng, J.F. and Lu, L.H., 2010. An outbreak of foxglove leaf poisoning. *Journal of the Chinese Medical Association*, 73:97–100.
 - Lopez-Lazaro, M., Palma De La Pena, N., Pastor N., Martin-Cordero, C., Navarro, E., Cortes, F. and Ayuso, M.J., 2003. Anti-tumour activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. heywoodii. *Planta Medicalogy*, 69: 701-704.
 - Maffe, S., Cucchi, L., Zenone, F., Bertocelli, C., Beldi, F., Colombo, M.L., Bielli, M., Paino, A.M., Parravicini, U., Paffoni, P., Dellavesa, P., Perucca, A., Pardo, N.F., Signorotti, F., Didino, C. and Zanetta, M., 2009. *Digitalis* must be banished from the table: a rare case of acute accidental *Digitalis*

- and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-80.
- Trease, G.E. and Evans, W.C., 1998. *Trease and Evans Pharmacognosy*. Saunders Ltd., Lodon, 616pp.
 - Tripathi, L. and Tripathi, J. N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2): 243-253.
 - Warren, B., 2005. *Digitalis purpurea*. *The American Journal of Cardiology*, 95(4): 544.
 - Wu, B., Li, Y., Yan, H., Ma, Y., Luo, H., Yuan, L., Chen, S. and Lu, S., 2012. Comprehensive transcriptome analysis reveals novel genes involved in cardiac glycoside biosynthesis and mlncRNAs associated with secondary metabolism and stress response in *Digitalis purpurea*. *BMC Genomics*, 13:15.
 - Yeh, J., Hunag, W., Kan, S. and Wang, P., 2001. Inhibitory effects of *Digitalis* on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *Urology*, 166: 1937-1942.
 - Zhao, J., Davis, L. and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4): 283-333.
 - Samuelson, G., 2004. *Drugs of Natural Origin, A textbook of Pharmacognosy*. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 620pp.
 - Seidel, S., Kreis, W. and Reinhard, E., 1990. 5-3 - hydroxysteroid dehydrogenase 5/ 4-ketosteroid isomerase (3 -HSD), a possible enzyme of cardiac glycoside biosynthesis, in cell cultures and plants of *Digitalis lanata* Ehrh. *Plant Cell Report*, 8: 621-24.
 - Smith, J.L., De Moraes, C.M. and Mescher, M.C., 2009. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science*, 65: 497-503.
 - Sun, J., Xiao, J., Wang, X., Yuan, X. and Zhao, B., 2012. Improved cardenolide production in *Calotropis gigantea* hairy roots using mechanical wounding and elicitation. *Biotechnology Letters*, 34(3): 563-569.
 - Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
 - Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties

Isolation of 5-3 -hydroxysteroid dehydrogenase involved in the biosynthetic pathway of cardenolides and its expression level under the influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitors in foxglove (*Digitalis nervosa* L)

A. Maroufi^{1*}, V. Salimi² and M. Majdi³

1* - Corresponding author, Assist. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. Iran Email: a.maroufi@uok.ac.ir

2 - M.Sc., Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran

3- Assoc. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran

Received: 14.03.2016 Accepted: 25.06.2016

Abstract

Foxglove plants are important sources of medicinal cardiac glycosides compounds such as digoxin and digitoxin, which are used for treatment of congestive heart failure and cardiac arrhythmia. *Digitalis* has several valuable species but the only species native to Iran is *digitalis nervosa*. Considering the importance of study on native plants in order to be used in pharmaceutical industry this research was carried out. One of the key genes in the biosynthesis of digitalis cardenolide in plants is 3 -HSD, which encodes the enzyme 3 -HSD with important role in early stage of the cardenolide biosynthesis pathway. Purpose of the present study was to determine nucleotide sequence of 3 -HSD, phylogenetic analyses and its expression under influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitors in different tissues. Results revealed that a sequence encoding the enzyme show very close affinity to *Digitalis lanata*. In addition expression pattern of 3 -HSD in the transcript level revealed that a significant expression level was detected in leaf tissue, and also under treatment of methyl jasmonate and salicylic acid the expression level raised. Findings of our study could be used to increase cardenolide through metabolic engineering and genetic manipulation.

Key words: Cardiac glycosides, foxglove, methyl jasmonate, salicylic acid, 5-3 -hydroxysteroid dehydrogenase.