Journal of Medicinal Plants Biotechnology
JMPB

Original Article

Molecular investigation of selected genes involved in the biosynthesis of flavonoids in two cumin ecotypes

Fereshte Lotfi[1], Seyed Mohammad Mahdi Mortazavian[2], Ali Izadi Darbandi[2], Hossein Ramshini[2]

1.Former student of agricultural biotechnology Associate Professor, Department of 2.Agricultural Sciences and Plant Breeding, Aburihan College, University of Tehran, Pakdasht

ARTICLEINFO

Article history

Submitted: 2021-06-07
Revised: 2021-07-23
Accepted: 2021-09-25

KEYWORDS

cumin, gene validation, secondary metabolites, flavonoids.

ABSTRACT

Active substances or secondary metabolites in medicinal plants are regularly produced in response to biotic and abiotic stresses and determine the ability of plants to adapt during growth and development. In order to increase the quantity and quality of the effective substance of the green cumin medicinal plant, with the scientific name Cuminum cyminum L from the Chetrian family, we need to identify the germplasm and useful genes in domestic and wild populations of this plant. In the current research, five selected genes in the biosynthesis pathway of flavonoids in cumin, obtained from previous research based on NGS method, which had the highest expression changes in drought stress, were validated. DNA from young leaves of selected ecotypes was extracted and quality measured with agarose gel. Considering the PCR test and the observation of a single band in all cases and the lack of difference in the length of the amplified fragment among the selected ecotypes; The length polymorphism of the fragments resulting from the amplification was rejected due to the presence of deletion and addition regions between different genotypes. This experiment could not confirm the placement of the two studied ecotypes of Sadouq and Rafsanjan in terms of seed yield, essential oil and extract content, in two different groups in terms of the studied genes. Also, he could not confirm the difference in the expression of two genes (with sequence numbers DN1196 and DN32640) in drought stress and normal irrigation in the previous research.

* Corresponding author: ***Seyed Mohammad Mahdi Mortazavian***
✉ E-mail: *mortazavian@ut.ac.ir*
Journal homepage:

مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

JMPB

مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی ژن‌های منتخب دخیل در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در دو اکوتیپ زیرهٔ سبز

فرشته لطفی[۱]، سید محمد مهدی مرتضویان[۲]*، علی ایزدی دربندی[۲]، حسین رامشینی[۲]

۱.دانشجوی سابق بیوتکنولوژی کشاورزی

۲.دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات دانشکدگان ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت

چکیده

مادهٔ موثره یا متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی به طور منظم در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده ساخته شده و توانایی گیاهان را برای سازگاری در طول رشد و نمو تعیین می‌کنند جهت افزایش کمی و کیفی مادهٔ موثرهٔ گیاه داروئی زیرهٔ سبز، با نام علمی Cuminum cyminum L از خانواده چتریان، نیازمند شناسایی ژرم پلاسم و ژن‌های مفید در توده‌های اهلی و وحشی این گیاه هستیم در تحقیق حاضر، پنج ژن منتخب در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در زیرهٔ سبز، حاصل از تحقیقات قبلی مبتنی بر روش NGS که بیشترین تغییر بیانی را در تنش خشکی داشتند، مورد اعتبارسنجی قرارگرفتند DNA از برگ‌های جوان اکوتیپ‌های منتخب کشت شده، استخراج و با ژل آگارز کیفیت سنجی شد با توجه به انجام آزمایش PCR و مشاهدهٔ تک باند در تمام موارد و عدم وجود تفاوت در طول قطعه تکثیر شده میان اکوتیپ‌های منتخب؛ چندشکلی طولی قطعات حاصل از تکثیر به دلیل وجود نواحی دارای حذف و اضافه بین ژنوتیپ‌های مختلف، رد شد این آزمایش نتوانست قرار گرفتن دو اکوتیپ مورد مطالعه صدوق و رفسنجان از نظر عملکرد دانه، اسانس و محتوای عصاره، در دو گروه متفاوت را از نظر ژن های مورد بررسی تایید کند همچنین نتوانست تفاوت بیان دو ژن (با شماره توالی های DN1196 و DN32640) را در تنش خشکی و آبیاری معمولی در تحقیق گذشته تایید نماید

اطلاعات مقاله

تاریخ

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۴

بازنگری: ۱۴۰۰/۰۵/۱۹

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۴

کلید واژه

زیرهٔ سبز، اعتبارسنجی ژن، متابولیت‌های ثانویه، فلاونوئیدها.

* *نویسنده مسئول:* **سید محمد مهدی مرتضویان**

ایمیل: *mortazavian@ut.ac.ir*

آدرس اینترنتی: *mpb.znu.ac.ir*

مقدمه

گیاهان داروئی دارای مادۀ موثره‌ای حاوی انواع متابولیت‌های ثانویه از جمله فلاونوئیدها، با خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشند (Franco et al., 2018). در طی فرایند طولانی تکامل، گیاهان توانایی‌های خود را برای تولید این متابولیت‌ها جهت فراهم نمودن مکانیسم‌های تطبیقی مورد نیاز برای بقا در محیط‌های متغیر، به دست آورده و گاهی نیز از دست داده اند (Yonekura-sakakibara, 2019). متابولیت‌های ثانویه که بیشتر خاصیت دارویی دارند، ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که از متابولیت‌های اولیه مشتق می‌شوند و نقشی در متابولیسم‌های اولیه فتوسنتزی و تنفسی ندارند (Alqethami and Aldhebiani, 2021). از آنجائی‌که متابولیت‌های ثانویه گیاهی به طور منظم در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده سنتز شده و توانایی گیاهان را برای سازگاری و زنده ماندن در طول زندگی تعیین می‌کنند، مطالعۀ این که کدام مواد فیتوشیمیایی و در پاسخ به چه عواملی تولید شده و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها چیست، بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Jan et al., 2021). در میان گیاهان دارویی زیرۀ سبز گیاهی یکساله و علفی متعلق به خانواده جعفری یا چتریان[7] بوده که در حالت دیپلوئید دارای فرمول ۱۴ = ۲x = ۲n و یکی از قدیمی‌ترین و اقتصادی‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد (سورنی و همکاران، ۱۳۹۱). زیرۀ سبز در ایران رتبه اول سطح زیر کشت را در میان گیاهان دارویی دارد (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶) که ۹۰ درصد آن مختص استان خراسان است (کرمانی و همکاران، ۱۳۸۷). توده‌های بومی ارقام اولیه ای هستند که تکامل یافته و تحت تاثیر انتخاب طبیعی به شرایط محیطی منطقه خود سازش یافته‌اند. عامل این سازش پذیری، تنوع ژنتیکی بالای این ارقام می‌باشد ولی به علت عملکرد پایین آن‌ها، می‌بایست ارقام اصلاح شده جایگزین آن‌ها گردد (سمیعی و همکاران، ۱۳۹۰). با توجه به اهمیت گیاهان داروئی و به خصوص توجه به گیاهان بومی کشور ازجمله گیاه زیرۀ سبز، در راستای اقتصاد مقاومتی و تولید پایدار، شناسایی ژن‌های کلیدی و موثر در مسیر بیوسنتز

7 Apiaceae

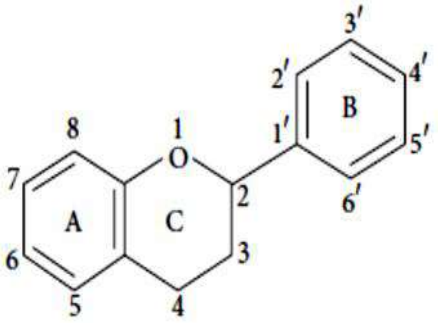
فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات دارویی چند وجهی و بررسی وجود تنوع اللی احتمالی در آن‌ها، ضروری به نظر می‌رسد. لذا تحقیق حاضر در راستای تایید (اعتبارسنجی) نتایج حاصل از تحقیقات گذشته و نیز پیدا کردن تنوع اللی احتمالی در ژنوتیپ‌های منتخب زیرهٔ سبز طرح ریزی گردیده است.

در تحقیقی که در دانشکدگان ابوریحان انجام شده است، نخستین پروفایل توالی رونوشت درگیاه زیرهٔ سبز به روش NGS گزارش شده است که مقدمه‌ای است تا بر اساس آن بتوان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه را شناسایی کرده و در تحقیقات بعدی جهت اصلاح این گیاه مورد استفاده قرار داد. تحقیقی که بر روی خواص حشره‌کشی اسانس‌های چهار اکوتیپ زیرهٔ سبز شامل دو اکوتیپ از کرمان و یک اکوتیپ از فارس و خراسان شمالی علیه لاروهای سن ۴ کرم ساقه خوار ذرت انجام شد، مشخص شد تمامی اکوتیپ‌های زیرهٔ سبز روی آفت مذکور اثر سمی داشته‌اند. نتایج نشان می‌دهد که اسانس‌های زیرهٔ سبز می‌تواند جایگزین مناسبی برای حشره‌کش‌های شیمیایی در مدیریت تلفیقی کرم ساقه‌خوار ذرت باشد. در این تحقیق اسانس اکوتیپ رفسنجان کرمان به دلیل درصد بیش‌تر مونوترپن سایمن، بیش‌ترین قدرت کشندگی را دارا بوده است (رضا صادقی و همکاران، ۱۴۰۰). در تحقیق SIOW درباره محتوای پروتئینی بذر زیرهٔ سبز، آمده است بذر این گیاه با توجه به محتویات پروتئینی آن می‌تولند به عنوان یک ماده غذایی قابل توجه، باخاصیت آنتی‌اکسیدانی و کنترل کننده سطح قند بیماران دیابتی مورد استفاده قرار گیرد (Siow and Gan, Sybiy 2014) در تحقیقی روی ۴ نمونه غلات، ۵ نمونه سبزیجات و ۱۳ نمونه ادویه‌جات هندی از جمله زیرهٔ سبز، با توجه به طیف وسیع متابولیت‌های ثانویه از جمله فنول‌ها و فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدهای آن‌ها، نتیجه گرفت تنها زیرهٔ سبز بالاترین پتانسیل مهار بیماری‌های باکتریایی (۹۰٪) را از خود نشان می‌دهد. زیره از طریق کاهش بیان ژن‌های مقاومت در مقابل آنتی‌بیوتیک، در باکتری، از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می‌کند. بنابراین از گیاهانی مانند زیره به علت تولید طیف متنوعی از ترکیبات، می‌توان به

پالایشگاه زیستی تعبیر نمود (Sybiya Vasantha Packiavathy et al., 2012). تحقیقات زیادی در جهت یافتن تنوع، از جهات مختلف (تنوع مورفولوژیکی و مولکولی پروتئینی و مبتنی بر DNA)، در توده‌های بومی زیرۀ سبز انجام شده است. جهاد سورنی و همکاران تنوع ژنتیکی ۲۴ توده زیرۀ سبز از سراسر کشور را ازنظر نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی مورد بررسی قرار داده و هردو نشانگر ارزیابی مشابهی از روابط ژنتیکی را نشان دادند. در تحقیق ایشان تنوع در سطح مولکولی تنوع در سطح مزرعه را تایید کرد (سورنی و همکاران.، ۱۳۹۱). بهمنکار پس از بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ تودۀ زیرۀ سبز از جهات مختلف، به نتایجی از جمله افزایش اسانس در توده‌های دیررس در مقابل توده‌های زودرس دست یافت (Bahmankar et al., 2019) تحقیقات دیگری در مورد شناخت تنوع ژنتیکی زیرۀ سبز با مارکرهای متفاوت، از جمله نشانگر SCoT در ۴۹ ژنوتیپ (ابراهیمیان و همکاران، ۱۳۹۶)، RAPD و ISSR (ضابط و همکاران.، ۱۳۹۷) و SRAP (Bhatt et al., 2017) انجام شده است که نشان از وجود تنوع ژنتیکی بین توده‌های مختلف زیرۀ سبز می‌باشد. با اینحال اطلاعات بسیار اندکی از ژنوم و مکانیسم‌های بیوشیمیایی ترکیبات موجود در این گیاه ارزشمند در دست می‌باشد. صادقی در تحقیقی به ارزیابی توالی رونوشت زیرۀ سبز با استفاده از RNA-Seq پرداخته و نخستین پروفایل توالی رونوشت این گیاه را که بیشتر شامل شناسایی ژن‌های مرتبط با تنظیم رونویسی و فعالیت‌های غشایی می‌باشد، گزارش کرده است (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶). طبق گزارش صادقی بیوسنتز فلاونوئیدهای زیرۀ سبز در غشاء واکوئل صورت گرفته و از طریق نقل و انتقال غشائی به تنش خشکی موجود در محیط پاسخ داده می‌شود (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶).

متابولیت‌های ثانویه با وزن مولکولی کم و ساختار متنوع، منبع مهمی در فعالیت‌های بیولوژیکی و اکولوژیکی از جمله سازگاری با محیط‌های مختلف و دفاع در برابر تنش‌های زیستی و نیز توسعه داروها و محصولات طبیعی هستند. این مولکول‌ها از جهت ساختاری به سه دسته عمده فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها

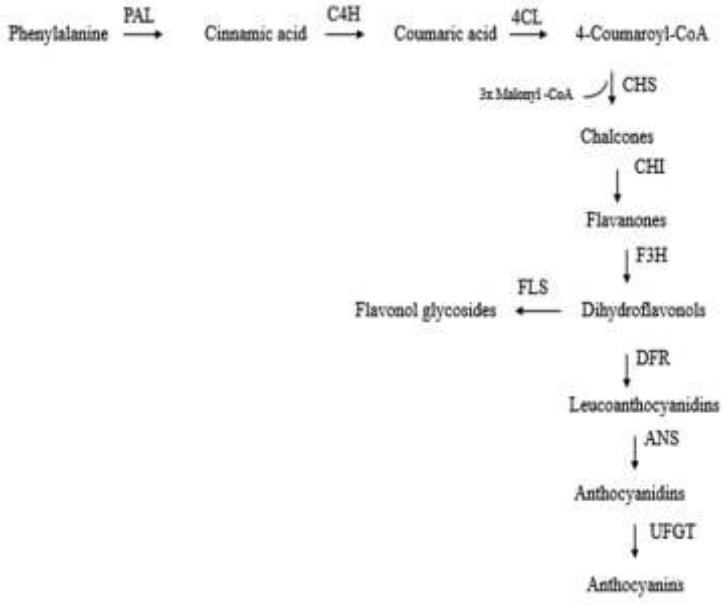
تقسیم می‌شوند (درافشان و همکاران، ۱۳۹۸). گروه اصلی متابولیت‌های ثانویه، ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئیدها هستند (Singh et al., 2021). فلاونوئیدها با بیش از ۹۰۰۰ ترکیب، یکی از گروه‌های اصلی متابولیت‌های تخصصی بوده (Yonekura-sakakibara, 2019) و در میان ترکیبات فنلی، بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Casati, 2012). تشکیل تعداد زیادی از ترکیبات فلاونوئیدی به علت حلقه هتروسیکلیک C و تعداد گروه‌های هیدروکسیل یا متیل روی حلقه بنزنی A و B و نیز گلیکوزیون، آسیلاسیون و .... و پلیمریزاسیون مولکولی می‌باشد (Liu et al., 2021). مهمترین اثر فلاونوئیدها خاصیت آنتی اکسیدانی قوی و نیز آثار درمانی آن‌ها در رابطه با بیماری‌هایی مانند پیری و سرطان است که در اثر استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شوند. فلاونوئیدها دسته ای از رنگیزه‌های گیاهی می‌باشند که محل تجمع آن‌ها در واکوئل سلول است (درافشان و همکاران، ۱۳۹۸). فلاونوئیدها مانند آنتوسیانین‌ها (رنگدانه‌های قرمز و نارنجی، آبی و بنفش) چالکون و آئورون‌ها (رنگدانه‌های زرد) و فلاونول و فلاون‌ها (رنگدانه‌های سفید و زرد کم رنگ) رنگ‌های متنوعی را در گیاهان ایجاد می‌کنند. پیشگیری از پوکی استخوان، الزایمر و سرطان و شرکت در جذب حشرات جهت گرده‌افشانی و شرکت در متابولیسم اکسین از آثار فلاونوئیدها می‌باشد (Liu et al., 2021). فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نه تنها موجب از بین رفتن رادیکال‌های آزاد در گیاه می‌شوند، بلکه مانع از تولید بیشتر آن‌ها می‌گردند. فلاونوئیدها به واسطه گروه‌های هیدروکسیلی در حلقه‌های ساختاری خود دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و موجب پاک‌سازی اکسیژن‌های فعال می‌شوند. آنتوسیانین‌ها نیز با محافظت از ساختارهای حساس مانند غشاء سلولی موجب مقاومت گیاه در مقابل خشکی می‌شوند (حشمتی و همکاران، ۱۳۹۵). فلاونوئیدها در ساختار پایه خود دارای ۳ حلقه فنولی A-B-C می‌باشند که از ۱۵ اتم کربن به صورت C6-C3-C6 تشکیل می‌شود. حلقه بنزنی A، ۶ کربنی در کنار حلقه C است که با یک پیوند یگانه به حلقه فنولی بنزنی B متصل است (شکل ۱).



شکل ۱-ساختار اصلی فلاونوئید (Amer, 2018)

طبقه بندی فلاونوئیدها بر اساس سطح اکسیداسیون هتروسیکل C مرکزی و نیز وجود جایگزین‌های هیدروکسیل و متیل در حلقه‌های A و B و نیز تغییرات تکمیلی مانند گلیکوزیلاسیون، آسیلاسیون و پلیمریزاسیون می‌باشد (Bogs et al., 2011) (Lou et al., 2021). به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی فلاونوئیدها، محققان جهت تولید میوه‌ها و سبزیجات غنی شده با این ترکیبات که دارای خواص غذایی و داروئی فراوان می‌باشند، به درک مراحل مختلف مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها و تنظیم ژن‌های آن‌ها، توجه فراوانی نموده‌اند (Bogs et al., 2011). فلاونوئیدها از طریق مسیر عمومی فنیل پروپانوئید از فنیل آلانین مشتق می‌شوند و به دلیل داربست-C6 C3 حاصل از اولین مرحله بیوسنتز، به این نام خوانده می‌شوند. این مسیر پیش‌سازهایی را فراهم می‌کنند که در چندین شاخه، منجر به بسط هزاران ترکیب دیگر می‌شوند (Bogs et al., 2011). در نهایت فعالیت فیزیولوژیکی فلاونوئیدها با تزئین ستون فقرات آن‌ها با قندها، گروه‌های متیل و قطعات آسیل و با تغییر حلالیت، واکنش پذیری و تعامل آن‌ها با اهداف سلولی، تعدیل می‌گردد (Kaur et al., 2021). فلاونوئیدها می‌توانند آزاد (آگلیکون) و یا مرتبط با قند باشند. آنتوسیانین‌ها همان آنتوسیانیدین‌های گلیکوزیله هستند. وجود یک بخش قند در مولکول آنتوسیانین موجب تغییر در رنگ، جذب جانوران و به دنبال آن افزایش گرده افشانی می‌گردد. رایج ترین قند، گلوکز

می‌باشد. گلیکوزیلاسیون موجب افزایش حلالیت، توزیع و متابولیسم از طریق تسهیل انتقال از غشاء می‌شود و متیلاسیون موجب افزایش ورود فلاونوئیدها به سلول و محافظت از آن‌ها می‌شود (Silva, 2021). UFGT(UDP-glucose-flavonoid3-O-glycosyltransferase) آنزیمی است که مولکول‌های قند را به گروه C3- OHآنتوسیانیدین متصل کرده و آنتوسیانین‌های مسئول رنگ‌های مختلف تولید می‌کند (شکل ۲) درجه هیدروکسیله شدن حلقه B موجب ایجاد رنگ‌های متنوع می‌شود.



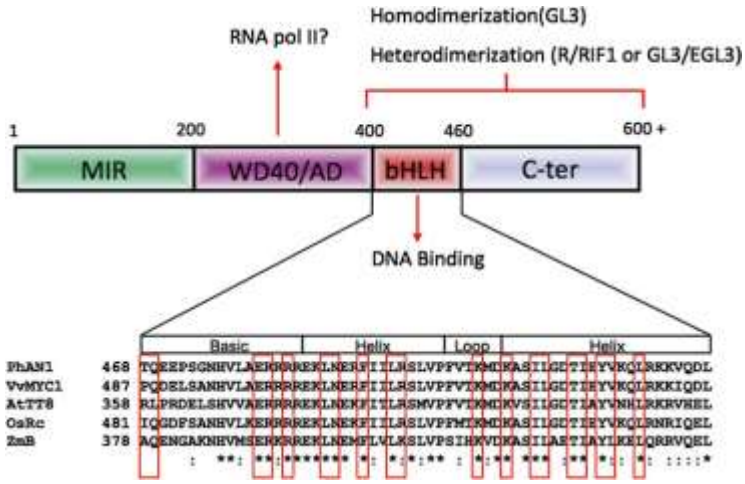
شکل ۲- نمایش ساده ای از مسیر بیوسنتزی فلاونوئید (آنتوسیانین) (Kaur et al., 2021)

ژن تنظیم کننده MYB با اتصال به پروموتر ژن UFGT فعالیت آن را تنظیم می‌کند (Kaur et al., 2021). آنتوسیانین‌ها محلول در آب می‌باشند. این گروه بعلت خاصیت آنتی اکسیدانی دارای اهمیت غذایی بالایی بوده و از اکسیداسیون چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک جلوگیری می‌کنند. افزایش سیستم ایمنی بدن، ترمیم ناهنجاری‌های بینایی، کاهش چاقی و بهبود بیماری‌های قلبی و انواع سرطان از آثار مهم این گروه فلاونوئیدی

می‌باشد. شدت و الگوی بیوسنتز آنتوسیانین و در حالت کلی کنترل بیان ژن‌های ساختاری متفاوت تحت نظر ژن‌های تنظیم کننده قرار دارند (کاظم زاده بنه و همکاران، ۱۳۹۳). تجمع فلاونوئیدها در اندام‌ها و بافت‌ها به نسبت مراحل رشد و شرایط محیطی، متفاوت می‌باشد، تا بتوانند فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوتی را انجام دهند. بنابراین تولید و توزیع آن‌ها مستلزم تنظیم دقیق مکانی و زمانی مسیر بیوسنتزی می‌باشد و به ترکیب خاصی از عوامل رونویسی نیاز دارد (Bogs et al., 2011). عوامل رونویسی پروتئین‌هایی هستند که با اتصال به نواحی پروموتر ژن‌های هدف سرعت رونویسی را از طریق RNA پلی مراز تغییر می‌دهند (Jan et al., 2021). کمپلکس MBW ترکیبی از خانواده‌های پروتئین‌های MYB، bHLH و WD40 می‌باشد؛ اما نحوه عملکرد آن‌ها به نسبت نوع فلاونوئید و گیاه متفاوت است. مثلا ممکن است مسیر فلاونول نسبت به نوع گیاه شامل یک فاکتور رونویسی MYB به تنهایی و یا یک دایمر MYB-bHLH باشد (Bogs et al., 2011). ژن‌های درگیر در مسیر آنتوسیانین ازطریق برهمکنش عوامل رونویسی - MYB R2R3 bHLH - WD40 فعال‌سازی و بیان می‌شوند (Casati, 2012). کمپلکس MBW نیز مانند مسیر فلاونوئید در تمام گیاهان به شدت حفاظت شده است (Kaur et al., 2021) و تنظیم ژن‌های رمزگذار آنزیم‌هایی که به طور خاص در مراحل پایانی مسیر منتهی به بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و تانن‌های متراکم هستند، را بر عهده دارد (Bogs et al., 2011). بزرگترین خانواده فاکتورهای رونویسی، میلو بلاستوزها (MYB TFs) هستند که در سطح رونویسی، بیوسنتز فلاونوئیدها را در همه یوکاریوت‌ها تنظیم می‌کنند. MYB TFs دارای یک دامنه MYB متصل به DNA با ۵۳-۵۰ اسید آمینه (Jan et al., 2021) و ۴ تکرار (R) ناقص پشت سر هم است که آن را به ۴ کلاس R1-R2-R3-R (Jan et al., 2021) تقسیم می‌کند. WD40 ها به طور مستقیم به پروموتر ژن هدف متصل نمی‌شوند، بلکه، با تعامل با پروتئین‌های دیگر از جمله bHLH، در بیوسنتز فلاونوئیدها شرکت می‌کنند (Liu et

.al., 2021)

bHLH ها پروتئین‌هایی مشـــهور به MYCهســـتند که با تعامل با پروتئین‌های خانواده‌های MYB و WD40، تنظیم کننـده‌هـای اصـــلی رونویســـی ژن‌های مســـیر بیوســـنتزی فلاونوئیدها هستند. پروتئین‌های گیاهی bHLH به ۱۲ خانواده تقسیم می‌شوند که همگی در دامین محافظت شـــده و مناطق خاص خارج از دامین مشـــترک می‌باشـــند. این دامنه با نزدیک به ۶۰ اســـید آمینه دارای ۱۹ اســـید آمینه حفاظت شده است که ۵ اسید آمینه در ناحیه پایه، ۵ آســـید آمینه در مارپیچ اول، یک اسید آمینه در حلقه و ۸ اسید آمینـــه آن در مـــارپیچ دوم قرار دارد (Bogs et al., 2011) (شکل ۳).



شکل ۳- ساختار کلی فاکتورهای رونویسی bHLH تنظیم کننده بیوسنتز فلاونوئیدها

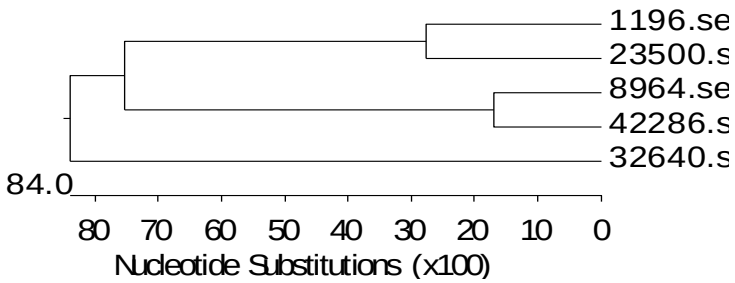
در شـــکل ۳ هم‌ترازی توالی دامنه bHLHچهار پروتئین bHLH گیاهی که در تنظیم بیوســـنتز فلاونوئید نقش دارند، نشان داده شده است. اعداد نشان دهندۀ موقعیت اولین اسید آمینه دامنه در توالی کامل پروتئین مربوطه اســـت. ۱۹ باقیمانده حفظ شده مشخصه دامنه bHLHبا اســـتفاده از کادرهای قرمز برجســـته می‌شـــوند (Bogs et al., 2011) bHLH . ها به طور گسترده و مســـتقل و یا از طریق تعامل با ســـایر خانواده‌های پروتئینی در تنظیم ژن‌های مســـیر فنیـــل‌پروپـــلنوئیـــد، بیوســـنتز آنتوســـیانین و فلاونوئیدها نقش دارند (Jan et al., 2021). با این حال که فلاونوئیدها در تمام گیاهان با غلظت‌های

مختلف به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید می‌شوند، اما مهمترین منبع تولید این مواد، گیاهان دارویی و معطر می‌باشند که می‌توان با تکنیک‌های مختلف آن‌ها را استخراج و تجاری سازی نمود (Amer, 2018).

درتحقیق حاضر به دنبال تایید حضور برخی از ژن‌های مهم دخیل در مسیرهای متابولیتی در زیرهٔ سبز، به لحاظ اهمیت ترکیبات فنلی به عنوان متابولیت‌های ثانویه، تنوع ژنتیکی توده‌های منتخب زیرهٔ سبز از جهت ژن‌های منتخب دخیل در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها مورد بررسی قرار گرفت. جهت اطمینان از صحت عملیات، پس از شناسایی و تایید حضور ژن‌های مربوطه مطالعات تکمیلی در خصوص وجود چند شکلی احتمالی در برخی از آن‌ها صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در تحقیق انجام شده در دانشکدگان ابوریحان دانشگاه تهران تعداد زیادی ژن‌های بالقوه و کلندید در زیرهٔ سبز با روش NGS مورد شناسایی قرار گرفته است.. در ابتدا ژن‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها از میان ژن‌هایی که در تحقیق گذشته، بیشترین تغییر بیان را در شرایط تنش خشکی داشتند جدا شدند. طبق تحقیق گذشته، در دو اکوتیپ ۳ (سیوند فارس) و ۱۸ (کوهبان کرمان) در شرایط تنش و آبیاری نرمال، در کل از ۱۱۶ ژن که بیشترین تغییر بیان را داشتند، ۸۱ ژن در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها شناسایی شد. از این ۸۱ ژن، با نرم‌افزار REVIGO، ۵ توالی که بلندتر از همه بودند، انتخاب شدند. از نرم افزار DNASTAR (MEGALIGN 5.00) برای رسم درخت فیلوژنتیکی توالی‌های منتخب استفاده شد. پس از هم ردیفی توالی‌ها به روش CLUSTALW درخت فیلوژنتیکی رسم شد (شکل ۴).



شکل ۴- فاصله ژنتیکی پنج ژن شامل بلندترین توالی‌ها در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در زیرهٔ سبز

برای اطمینان از میزان اختلاف میان این پنج توالی و خصوصا دو توالی DN1196 و DN32640، ابتدا در نرم افزار PRIMER3 آغازگر رفت و برگشت برای هر یک از پنج توالی طراحی شد. جهت اطمینان از اختصاصی بودن، از نرم افزار PRIMER BLAST استفاده شد. به دلیل عدم وجود اطلاعات ژنتیکی از زیرهٔ سبز در سایت NCBI وBLAST، در بخش organism از هم خانواده آن، هویج که بیشتر از۹۰ درصد با آن هم خوانی داشت، استفاده شد. خصوصیات کلی هر جفت آغازگر و ارتباط آغازگر رفت و برگشت برای هر توالی با نرم افزار Oligo Analyzer 1.0.2 بررسی گردید. آغازگرها جهت ساخت به آلمان فرستاده شد (جدول ۱). به منظور تایید بعضی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در زیرهٔ سبز، اکوتیپ‌های ۲۸-۲۱-۱۸-۷-۳ به علت عملکرد بهتر نسبت به سایر اکوتیپ‌ها، جهت کشت از بانک ژن دانشکدگان ابوریحان تهیه شد (جدول ۲).

	نام توالی	توالی آغازگر	دمای اتصال
۱	DN23500	GTGATGCTAACCGAGAGTGG CTTGTGATGGGCGTCGTAG	۵۵˚C
۲	DNDN32640	ACCTCATCAATTAAACGCA CCACAGTCCTCATTCAGTA	۵۵˚C
۳	DN8964	ACAGAGGTAGGTGGTTGGG GCCCGAAGATTACGAGAGC	۵۵˚C
۴	DN42286	CAGAGGGGCGTTTACATCG CTAGGCGGGTTTGTGATCG	۵۵˚C
۵	DNDN1196	GCCATCATACGCAGAGCAG CTACAACCGCCGTCAACAG	۵۵˚C

جدول ۱- خصوصیات توالی آغازگرهای ژن‌های منتخب فلاونوئیدی زیرهٔ سبز

شماره اکوتیپ	جمعیت (استان)	اکوتیپ (شهرستان)
۳	فارس	سیوند
۷	یزد	صدوق
۱۸	کرمان	کوهبان
۲۱	کرمان	رفسنجان

۲۸	خراسان جنوبی	درمیان

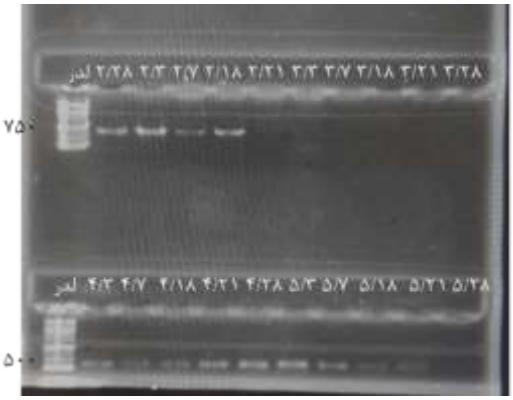
جدول ۲- محل جمع آوری و شماره بندی ۵ اکوتیپ زیرهٔ سبز مورد استفاده

اکوتیپ‌های منتخب زیرهٔ سبز شامل اکوتیپ‌های ۳ و ۷ و ۱۸ و ۲۱ و ۲۸ (جدول ۲)، در سینی کشت شامل ۷۵٪ کوکوپیت و ۲۵٪ پرلیت کاشته و در انکوباتور، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. آبیاری با فواصل ۲ تا ۳ روز یک‌بار صورت گرفت. پس از تقریبا دو هفته که بوته‌ها به اندازهٔ تقریبی ۱۵ سانتی‌متر رسیدند، برگ‌های جوان پس از وزن کردن بلافاصله درون تیوپ ۲ میلی‌لیتری روی یخ قرارگرفته و به نیتروژن مایع و سپس فریزر ۸۰- منتقل شدند. برای استخراج DNA، از کیت استخراج DNA گیاهی geneall کره، استفاده شد. براساس دستورالعمل کیت استخراج Plant SV mini در هر آزمایش میزان ماده اولیه گیاهی حداکثر ۱۰۰ میلی‌گرم (وزن مرطوب) از بافت‌های گیاهی تازه و جوان توزین شد. نمونه‌ها در نیتروژن مایع پودر شده و مراحل استخراج طبق دستورالعمل دنبال شد. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۷۰ به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. پس از رنگ آمیزی به مدت ۲۰ دقیقه در اتیدیوم بروماید، در دستگاه ژل داک[8] شرکت UVP آمریکا، زیرپرتو UV مشاهده و عکس برداری شد. آزمایش PCR با مسترمیکس حاوی بافر بارگذاری قرمز با غلظت ۲ میلی مولار کلرید منیزیم[9] شرکت امپلیکن دانمارک[10] و پنج جفت آغازگر انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز ژل در محلول اتیدیوم بروماید ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و در دستگاه ژل داک توسط پرتو UV مشاهده و از محصول عکس گرفته شد (شکل ۵ و ۶)

8 GEL-DOC

9 Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red, 1.5 mm MgCl 2

10 Denmark Ampliqon



شکل ۵- آزمایش PCR از نمونه‌های ۳، ۷، ۱۸، ۲۱ و ۲۸ با آغازگرهای ۲،۳،۴،۵

شکل ۶- آزمایش PCR از نمونه‌های ۳، ۷، ۱۸، ۲۱و۲۸ با آغازگر ۱ و تکرار آزمایش نمونه های ۷ و ۲۱ و ۲۸

به علت آنکه بعضی از این نمونه‌ها در آزمایش اول باند واضحی ندادند و نیز جهت اطمینان از اختلاف ژنتیکی میان دو توالی DN1196 و DN32640، و باتوجه به آزمایشات قبلی و تفاوت معنی دار در میزان ترکیبات فنلی عصاره دو اکوتیپ ۷ و ۲۱ در شرایط تنش خشکی و حالت معمولی (نتایج نشان داده نشده است)، و تفاوت در میزان عملکرد و اسانس (جدول ۳)، هم چنین قرار گرفتن این دو اکوتیپ در دو گروه مختلف با استفاده از با نشانگرهای ISSR و SCOT (ابراهیمیان و همکاران، ۱۳۹۶)، آزمایش PCR از دو اکوتیپ ۷ و ۲۱، با آغازگرهای ۲،۴، و ۵ تکرار شد.

جدول ۳- میزان عملکرد و اسانس اکوتیپ صدوق و رفسنجان در شرایط نرمال و تنش خشکی (ابراهیمیان و همکاران، ۱۳۹۶)

اسانس (درصد)	عملکرد (g/m^2)	اکوتیپ	شرایط
۱/۰۵	۷۴/۸۸	صدوق	نرمال
۱/۲۶	۷۸/۹۷	رفسنجان	نرمال
۱/۳۴	۵۸/۷۱	صدوق	تنش خشکی
۱/۵۵	۶۵/۳۱	رفسنجان	تنش خشکی

بحث

با توجه به درخت فیلوژنتیکی بیشترین فاصله، مربوط به دو توالی DN1196 و DN32640، می‌باشد. توالی ژن DN1196 کدکننده پروتئین UDP-α-D-glucose از خانواده GT6 در زیرۀ سبز است که یک گلیکوزیل ترانسفراز و عامل گلیکوزیله کردن فلاونول‌ها می‌باشد. در گزارش صادقی این توالی از خانواده GT6 در توت فرنگی گزارش شده است. بیان این ژن در تنش خشکی در هر دو اکوتیپ ۳ و ۱۸ دو برابر حالت معمول بوده است (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶).

توالی ژن DN32640 در زیرۀ سبز کد کننده پروتئینی است که فاکتور رونویسی و دارای دامین bHLH بوده و از خانواده TFs می‌باشد. این پروتئین با اتصال توالی پایه b به DNA و تشکیل همو و یا هترودایمر از پروتئین‌های درگیر در رونویسی از ژن هدف توسط

بخش HLH، در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها شرکت می‌کند. طبق تحقیق صادقی بیان ژن DN32640 در تنش خشکی در اکوتیپ ۳ نصف و در اکوتیپ ۱۸ دو برابر شده است (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶). این مساله نشان از اهمیت این دو ژن در حالت تنش و آبیاری معمولی در افزایش یا کاهش تولید آنتوسیانین، در بین اکوتیپ‌های مختلف می‌باشد. این دو توالی بالاترین محصول PCR را در میان پنج توالی منتخب دارند. با توجه به شکل ۵ و ۶ هر پنج توالی در تمام اکوتیپ های منتخب دارای تک باند و اندازه یکسان بودند .

نتایج

در تحقیق حاضر ضمن تایید (اعتبارسنجی) نتایج تحقیقات گذشته (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶)، تنوع للی احتمالی در ژنوتیپ‌های منتخب زیرۀ سبز به علت یکسان بودن اندازه باندها در تمام اکوتیپ‌ها، رد شد. دو توالی DN1196 و DN32640 از میان پنج ژن منتخب پیشنهادی در زیرۀ سبز در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی که بیشترین تغییر بیان را در تنش خشکی در تحقیقات قبلی داشتند، مرتبط با دو خانواده متفاوت پروتئنی شناخته شدند. هردو توالی بلندترین محصول PCR را داشته و در آزمایشات PCR دارای تک باند واضح و روشنی بودند. دو توالی DN1196 و DN32640 با وجود اختلاف بیان در دو اکوتیپ ۳ و ۱۸ در تنش خشکی، در دو اکوتیپ ۷ و ۲۱ تفاوتی از نظر اندازه نشان ندادند. باتوجه به آزمایشات قبلی و تفاوت معنی‌دار در میزان ترکیبات فنلی عصاره دو اکوتیپ ۷ و ۲۱ در شرایط تنش خشکی و حالت معمولی (نتایج نشان داده نشده است)، تفاوت در میزان عملکرد و اسانس (جدول ۳)، قرار گرفتن این دو اکوتیپ در دو گروه مختلف با استفاده از نشانگرهای ISSR و SCOT (ابراهیمیان و همکاران، ۱۳۹۶) و همچنین تفاوت در میزان بیان ژن‌های مسیر، یکی از فرضیات وجود تفاوت در ژن‌های کلیدی مرتبط با بیوسنتز فلاونوئیدها در این دو اکوتیپ بود. علیرغم تفاوت بیان ژن‌های DN1196 و DN32640 در شرایط تنش خشکی و آبیاری نرمال در اکوتیپ‌های زیرۀ سبز (داریوش صادقی و همکاران، ۱۳۹۶) و

داشتن بیشترین فاصله خانوادگی در دندوگرام روابط خانوادگی؛ با توجه به عدم مشاهده تفاوت در اندازه بلند در آزمایش PCR، مطالعه حاضر، نتوانست دلیل تفاوت‌های ژنتیکی بین دو اکوتیپ مورد بررسی را به اختلاف در طول قطعات ژنی منتسب کند.

ولی به دلیل اختلافی که دو اکوتیپ ۷ و ۲۱ در میزان محتویات اسانس و عصاره دارند، پیشنهاد می‌شود جهت تحقیقات بیشتر و دقیقتر آزمایش RT-PCR نیز انجام گیرد.

ملاحظات اخلاقی:

حامی مالی: این پژوهش هیچ کمک مالی از سازمان های تأمین مالی دریافت نکرده است.

تعارض منافع: طبق اظهار نویسنده، این مقاله تعارض منافع ندارد.

برگرفته از پایان نامه/رساله: این مقاله برگرفته از پایان نامه/رساله نبوده است.

منابع

- ابراهیمیان، م. ابراهیمی، م. مرتضویان، م. رامشینی، ح. (۱۳۹۶) بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی زیرهٔ سبز(*Cuminum cyminum L*) با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT. مجله ژنتیک نوین، دوره دوازدهم، شماره ۲، تابستان ص ۲۹۲-۲۸۵.
- حشمتی، س. امینی دهقی، م. رضازاده، ع. فتحی امیرخیز، ک. (۱۳۹۵) بررسی اثر حاصل‌خیزکننده‌های مختلف فسفر بر خصوصیات فیزیولوژیکی رنگدانه‌های فتوسنتزی و قندهای محلول در گلرنگ تحت شرایط کمبود آب. نشریهٔ پژوهش‌های زراعی ایران، جلد ۱۴، شماره ۲، تابستان، ص ۳۱۷-۳۰۴.
- درافشان، م. سلطانی حویزه، م. شریعتی، و. (۱۳۹۸) شناسایی ژن‌های مسیر بیوسنتزی اسکلت ترپنوئید در میوهٔ گیاه دارویی هندوانهٔ ابوجهل (Citrullus colocynthis (L.) Schrad. نشریهٔ علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۳۵، شماره ۴، ص۷۰۲-۶۹۱.
- سمیعی، ک. قزوینه، س. (۱۳۹۰) اهمیت و نقش ژرم پلاسم بومی گیاهان زراعی در امنیت غذایی آینده کشور. اولین سمینار ملی امنیت غذایی، حوزه معاونت پژوهش و فناوری، دانشگاه آزاد اسلامی سواد کوه.
- سورنی، ج. رستمی احمدوندی، ح. کهریزی، د. معصومی، م. چقامیرزا، ک. کیانی، س. (۱۳۹۱) بررسی ارتباط نشانگرهای پروتئینی و مورفولوژِیکی درتوده‌های گیاه داروئی زیرهٔ سبز(. Cuminum cyminum L). انجمن ژنتیک ایران، دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران.
- صادقی، د. مرتضویان، م. بختیاری زاده، م. (۱۳۹۶) ارزیابی توالی رونوشت گیاه داروئی زیرهٔ سبز(Cuminum cyminum L.) با استفاده از RNA-seq. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۹، شماره ۴، ص۱۱۶-۱۰۱.
- صادقی، ر. عشرتی، م. مرتضویان، م. جمشیدنیا، ا. عباداللهی، ع. (۱۴۰۰) اجزای شیمیایی و خواص حشره‌کشی اسانس‌های استخراج شده از چهار اکوتیپ زیرهٔ سبز روی لاروهای کرم ساقه‌خوار ذرت. مجله به زراعی کشاورزی، دوره ۲۳، شماره ۲، تابستان، ص ۴۱۶-۴۰۹.
- ضابط، م. رحیمی، آ. ایزانلو، ع. علیزاده، ز. (۱۳۹۷) بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زیرهٔ سبز خراسان با استفاده

از نشانگرهای پروتئینی. دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۲۶، شماره ۲، ص ۳۰۱-۲۹۲.

- کاظم زاده بنه ، ه. کرامتی، م. مهنا، ن. عابدی، ح. تیزفهم، پ. (۱۳۹۳) ژنتیک و بیوشیمی بیوسنتز آنتوسیانین در گیاهان. اولین کنگرهٔ زیست شناسی و علوم طبیعی ایران، ص ۸-۱.
- کرمانی، م. مرعشی، ح. صفرنژاد، ع. (۱۳۸۷) مطالعهٔ تنوع ژنتیکی درون و بین دو گونه از جنس Cuminum با استفاده از نشانگرهای مولکولیAFLP. دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۱۶، شماره ۲، ص۲۰۶-۱۹۸.
- Alqethami, A., and A.Y. Aldhebiani. 2021. Saudi Journal of Biological Sciences Medicinal plants used in Jeddah , Saudi Arabia : Phytochemical screening. Saudi J. Biol. Sci. 28(1): 805–812. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.013.
- Amer, A. 2018. BIOTECHNOLOGY APPROACHES FOR IN VITRO PRODUCTION OF FLAVONOIDS. : 457–468. doi: 10.15414/jmbfs.2018.7.5.457-468.
- Bahmankar, M., S.M.M. Mortazavian, M. Tohidfar, S.A. Sadat Noori, A. Izadi Darbandi, et al. 2019. Chemotypes and morpho-physiological characters affecting essential oil yield in Iranian cumin landraces. Ind. Crops Prod. 128(July 2018): 256–269. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.10.080.
- Bhatt, J., S. Kumar, S. Patel, and R. Solanki. 2017. Annals of Agrarian Science Sequence-related ampli fi ed polymorphism (SRAP) markers based genetic diversity analysis of cumin genotypes. Ann. Agrar. Sci. 15(4): 434–438. doi: 10.1016/j.aasci.2017.09.001.
- Bogs, J., C. Kappel, S. Delrot, and V. Lauvergeat. 2011. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. 62(8): 2465–2483. doi: 10.1093/jxb/erq442.
- Casati, P. 2012. Flavonoids : biosynthesis , biological functions , and biotechnological

and Q. Chen. 2021. Metabolic Engineering of Microbial Cell Factories for Biosynthesis of Flavonoids : A Review.
- Silva, A.M.S. 2021. Plant Flavonoids : Chemical Characteristics and Biological Activity. : 1–16.
- Singh, S., I. Kaur, and R. Kariyat. 2021. The Multifunctional Roles of Polyphenols in Plant-Herbivore Interactions.
- Siow, H.L., and C.Y. Gan. 2014. Functional protein from cumin seed (Cuminum cyminum): Optimization and characterization studies. Food Hydrocoll. 41: 178–187. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.04.017.
- Sybiya Vasantha Packiavathy, I.A., P. Agilandeswari, K.S. Musthafa, S. Karutha Pandian, and A. Veera Ravi. 2012. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of Cuminum cyminum and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. Food Res. Int. 45(1): 85–92. doi: 10.1016/j.foodres.2011.10.02

applications. 3(September): 1–15. doi: 10.3389/fpls.2012.00222.
- Franco, R.R., D. da Silva Carvalho, F.B.R. de Moura, A.B. Justino, H.C.G. Silva, et al. 2018. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. J. Ethnopharmacol. 215(December 2017): 140–146. doi: 10.1016/j.jep.2017.12.032.
- Jan, R., S. Asaf, M. Numan, and K. Kim. 2021. Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. : 1–31.
- Kaur, R., L. Aslam, S. Hussain, N. Kapoor, and R. Mahajan. 2021. Flavonoid Biosynthetic Pathway : Genetics and Biochemistry. 18(June): 271–286.
- Liu, W., Y. Feng, S. Yu, Z. Fan, X. Li, et al. 2021. The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. : 1–18.
- Lou, H., L. Hu, H. Lu, T. Wei,

2.
- Yonekura-sakakibara, K. 2019. The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism. 10(August): 1–16. doi: 10.3389/fpls.2019.00943.

(2021). Biological and catalytic activities of green synthesized silver nanoparticles from the leaf infusion of Dracocephalum kotschyi Bois. Glob. Challenges 5, 2000018.
- Lee, C.-R., Lee, J.H., Park, M., Park, K.S., Bae, I.K., Kim, Y.B., Cha, C.-J., Jeong, B.C., Lee, S.H., (2017). Biology of Acinetobacter baumannii: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7, 55.
- Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, C., Liu, Q., Cheng, Z., Dai, G., Wu, G., Wang, L., (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. Int. J. Nanomedicine 14, 1469.
- Pelgrift, R.Y., Friedman, A.J., (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. Adv. Drug Deliv. Rev. 65, 1803–1815.
- Vazquez-Muñoz, R., Meza-Villezcas, A., Fournier,
- Abootalebi, S.N., Mousavi, S.M., Hashemi, S.A., Shorafa, E., Omidifar, N., Gholami, A., (2021). Antibacterial effects of green-synthesized silver nanoparticles using Ferula asafoetida against Acinetobacter baumannii isolated from the hospital environment and assessment of their cytotoxicity on the human cell lines. J. Nanomater. 2021.
- Asif, M., Alvi, I.A., Rehman, S.U., (2018). Insight into Acinetobacter baumannii: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. Infect. Drug Resist. 11, 1249.
- Chahardoli, A., Karimi, N., Fattahi, A., (2018). Nigella arvensis leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Their characteristic properties and biological efficacy. Adv. Powder Technol. 29, 202–210. https://doi.org/10.1016/j.apt.2017.11.003
- Chahardoli, A., Qalekhani, F., Shokoohinia, Y., Fattahi, A.,

P.G.J., Soria-Castro, E., Juarez-Moreno, K., Gallego-Hernández, A.L., Bogdanchikova, N., Vazquez-Duhalt, R., Huerta-Saquero, A., (2019). Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. PLoS One 14, e0224904.

- Yassin, M.T., Mostafa, A.A.-F., Al-Askar, A.A., Al-Otibi, F.O., (2022). Facile green synthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of Origanum majorana with potential bioactivity against multidrug resistant bacterial strains. Crystals 12, 603.