

تأثیر هورمون اسید آبسزیک و سیتوکینین بر بیان ژن فلاونول سنتاز (*FLS*) در گیاه علف مورچه (*Cressa cretica*)

Influence of abscisic acid and cytokinin hormones on flavonol synthase (*FLS*) gene expression in alkali weed (*Cressa cretica*)

داود نادری^{۱*}، محمود سلوکی^۱، براتعلی فاخری^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران، دانشگاه زابل، ایران

Naderi D^{1*}, Solouki M¹, Fakheri B¹

1- MSc Student, Associate Professors, University of Zabol, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: naderi.davoud02@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

در این مطالعه، بیان ژن فلاونول سنتاز (*FLS*) در نمونه‌های تیمار شده با کاربرد خارجی هورمون اسید آبسزیک با غلظت ۳۰۰ ppm در مرحله رویشی و پس از گذشت ۴ ماه از رشد گیاه اسپری در دو زمان به فاصله ۸ روز و غلظت ۵۰۰ ppm ABA و BAP با استفاده از روش Real Time PCR، بررسی شد. هدف از بررسی اثر هورمون اسید آبسزیک در دو زمان، بررسی اثر غلظت و مدت زمان ماندگاری هورمون اسید آبسزیک در گیاه علف مورچه بر روی بیان ژن *FLS* بود. تجزیه داده‌ها با روش «پافل و REST» انجام شد. ارزیابی داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و از طریق آزمون دانکن نشان داد که میانگین تغییرات بیان ژن فلاونول سنتاز برای تیمارها در مقایسه با شاهد ۲/۴ - ۱/۴ برابر شد. تیمار دوم که به کارگیری مرحله دوم هورمون اسید آبسزیک با غلظت ۳۰۰ ppm است، بیش‌ترین تأثیر را در بیان ژن فلاونول سنتاز داشت و در سطح یک درصد معنی‌دار شد ($p < 0.01$). مرحله اول به کارگیری هورمون اسید آبسزیک در بیان ژن فلاونول سنتاز نیز تأثیر داشت اما میزان بیان ژن ناچیز بود. تحلیل نتایج و مقایسه میزان بیان ژن *FLS* در دو زمان نشان داد که هر چه هورمون اسید آبسزیک در گیاه بیشتر باقی بماند میزان بیان ژن فلاونول سنتاز بیشتر خواهد بود. بیان ژن *FLS* طی به کارگیری ۵۰۰ ppm هورمون سیتوکینین افزایش می‌یابد. طی مقایسه دو روش پافل و نرم افزار REST، روش پافل به‌منظور تجزیه داده‌ها پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی

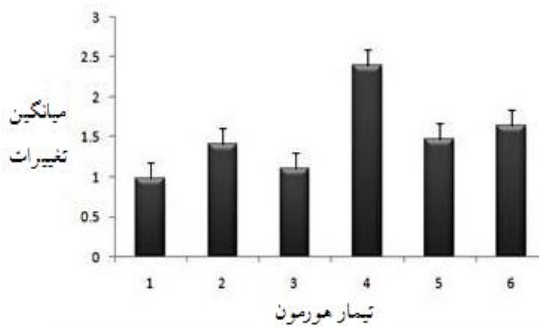
روش پافل
طب سنتی *Cressa cretica*
علف مورچه
REST

میزان ماده کوئرستین و مایریستین (Myricetin) تنها در مرحله اول به کارگیری هورمون افزایش یافت.

این تحقیق در پژوهشکده زیست فناوری (بیوستتر) دانشگاه زابل انجام شد. بذور گیاه علف مورچه (*Cressa cretica*) از طریق جمع‌آوری از محیط طبیعی آماده و در تعدادی گلدان کشت داده شد. پژوهش حاضر به صورت یک طرح کامل تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل اسپری هورمون اسید آبزیک در دو زمان و هر زمان با فاصله ۸ روز با غلظت ۳۰۰ ppm (Amandeep et al. 2011) و همچنین غلظت ۵۰۰ ppm از هورمون اسید آبزیک و سیتوکینین به صورت تک مرحله‌ای انجام شد (Waterland et al. 2010). استخراج RNA کل از برگ‌های تازه و فعال در مرحله رویشی و پس از گذشت ۴ ماه از رشد گیاه انجام شد. این عمل به تعداد ۳ تکرار برای هر یک از نمونه‌های شاهد و تیمار بر اساس دستورالعمل کیت *Cinna Pure RNA Kit* (سیناژن) صورت گرفت. درصد خلوص و میزان RNA استخراجی از طریق دستگاه بیوفتومتر تعیین و نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. نمونه‌هایی که دارای OD ۲۶۰/۲۸۰ در محدوده ۱/۷ تا ۲/۱ بودند، جهت سنتز cDNA به کار گرفته شد. به منظور اثبات عدم آلودگی نمونه‌ها به DNA ژنومی، از نمونه کنترل منفی استفاده شد. به منظور انجام واکنش رونویسی معکوس (سنتز cDNA)، از *Total RNA* و غلظت ۱۰ µg بر اساس دستورالعمل کیت سنتز cDNA 2- Step استفاده شد. این عمل با استفاده از کیت دو مرحله‌ای *RT-PCR kit* (Vivantis) و آغازگر *Random Hexamer* انجام گرفت. واکنش رونویسی معکوس در حضور *MuLV Reverse transcriptase* در دمای ۴۲°C به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. طراحی آغازگر برای تکثیر اختصاصی ژن فلاونول سنتاز از طریق PCR، از مناطق حفاظت شده (Conserved region annotated) در پایگاه‌های بانک ژن صورت گرفت. توالی آغازگر ژن فلاونول سنتاز و کنترل داخلی در جدول ۱ نشان داده شده است. به منظور بررسی سطح رونویسی ژن فلاونول سنتاز در گیاه علف مورچه، واکنش PCR برای ژن کنترل و ژن فلاونول سنتاز به تعداد ۳۵ چرخه به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه

علف مورچه (*Cressa cretica*)، گیاهی از خانواده پیچک با چرخه زندگی دائمی و همیشگی است و در فرهنگ عربی به نام "نوادا Nevada" (Tackholm 1974) و در گویش محلی زابل به عنوان "سَوَجْجُ Svajj" شناخته می‌شود. علف مورچه گیاه متحمل به شوری قابل توجهی است که در سخت‌ترین شرایط تابستان و خاک‌های شور با غلظت‌های بالای نمک به زندگی خود ادامه می‌دهد و شرایط طبیعی رشد و نمو را انجام می‌دهد (Satakopan and Karandiker 1961). تحقیقات انجام شده بر روی این گیاه نشان می‌دهد که بخش‌های هوایی آن دارای تعدادی ترکیب فلاونوئیدی می‌باشد (Abdelaaty et al. 2005) که از آن جمله می‌توان به کوئرستین (Tackholm 1974)، کائمپفول و روتین (Purushothaman and Kalyani 1974) اشاره کرد. کوئرستین (پنتا هیدروکسی فلاون) به رده بزرگ ترکیبات فلاونوئیدی پلی فنل تعلق دارد و یکی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی مهم است. ویژگی ضد سرطان بودن آن، از طریق آزمایش‌های *In vitro* و *In vivo* ثابت شده است (Baghel et al. 2012). ترکیب کوئرستین طی یک مسیر بیوسنتزی، از دی‌هیدروکسی کوئرستین توسط آنزیم فلاونول سنتاز به دست می‌آید (Abdelaaty 2005). آنزیم فلاونول سنتاز که واکنش تشکیل دی‌هیدروفلاونول را به فلاونول کاتالیز می‌کند، یکی از کلیدی‌ترین آنزیم‌های موثر در بیوسنتز فلاونوئیدها می‌باشد. فلاونول سنتاز به خانواده ۲-اگزوگلوکوتارات دی اکسیژناز تعلق دارد. ژن کدکننده این آنزیم، فلاونول سنتاز (*FLS*) می‌باشد (Forkmann 1991). (2004) Shahat et al. پنج نوع فلاونوئید از قسمت‌های هوایی گیاه *C. cretica* شناسایی کردند که یکی از آن‌ها کوئرستین می‌باشد. (Amandeep et al. 2011) اثر کاربرد خارجی هورمون اسید-آبزیک را از طریق دو بار اعمال در اولین مرحله رسیدگی و ۱۳ روز پس از مرحله اول، بر روی میزان و ظرفیت تولید محتویات فنولی در گونه‌ای از انگور به نام *Muscadonia grape* بررسی کردند. طبق این آزمایش مشخص شد که محتویات فنولی و ظرفیت تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی گونه مورد نظر در اثر به کار بردن هورمون اسید آبزیک افزایش یافت (یادآوری می‌شود که کوئرستین نوعی ترکیب فنولی است). همچنین مشخص شد که

واریانس و مشاهده این که بین تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار وجود دارد، مقایسه میانگین برای هر یک از نمونه‌ها انجام شد و مشاهده شد که میانگین تغییرات بیان ژن فلاونول سنتاز برای هر یک از تیمارها به ترتیب برای تیمار ۱، ۲، ۳ و ۴، به میزان ۱/۴۱، ۲/۳۹۷، ۱/۴۷۲ و ۱/۶۳۵ واحد به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱- تجزیه اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر بیان ژن فلاونول سنتاز با فرمول پافل. محور افقی مربوط به تیمارهای مختلف و محور عمودی میانگین تغییرات می‌باشد. (۱) نمونه شاهد برای زمان اول؛ (۲) نمونه تیمار آبسزیک اسید با غلظت ۳۰۰ ppm در زمان اول؛ (۳) نمونه شاهد برای زمان دوم؛ (۴) نمونه تیمار با هورمون آبسزیک اسید در زمان دوم؛ (۵) تیمار ABA با غلظت ۵۰۰ ppm؛ (۶) تیمار سیتوکینین با غلظت ۵۰۰ ppm.

نتایج نشان داد که تیمار دوم که به کارگیری مرحله دوم هورمون اسیدآبسیک با غلظت ۳۰۰ ppm است، بیشترین تاثیر را در بیان ژن فلاونول سنتاز داشته و در سطح یک درصد، معنی دار شده است ($p < 0.01$). مرحله اول بکارگیری هورمون اسیدآبسیک در بیان ژن فلاونول سنتاز نیز تاثیر داشته اما میزان بیان ناچیز است و با توجه به مشاهده افزایش بیان ژن فلاونول سنتاز در اثر تیمار با هورمون آبسزیک اسید با غلظت ۳۰۰ ppm در زمان دوم و به مدت ۸ روز، استنباط می‌شود که هر چه هورمون اسیدآبسیک درون بافت گیاهی بیش‌تر بماند، بیان ژن فلاونول سنتاز بیش‌تر می‌شود. همچنین با بررسی نتایج برای تیمار نمونه‌ها با هورمون سیتوکینین (تیمار شماره ۴)، مشاهده شد که این تیمار در بیان ژن فلاونول سنتاز تاثیر داشته و در سطح پنج درصد ($p < 0.05$)، معنی دار شده است. در روش پافل ($Pfaffl = Ratio$) سرعت تکثیر بیان نسبی بر اساس کارایی و بازده ژن هدف برای نمونه تیمار و کنترل در مقایسه با یک ژن استاندارد محاسبه می‌شود.

و با حجم ۲۵ میکرولیتر و دو میکرولیتر نمونه cDNA با غلظت ۱۲۵ بر اساس دستورالعمل انجام شد. به منظور بررسی کمی بیان ژن، از طریق به کارگیری دستگاه Real Time PCR (شرکت Corbett research - RG 3000)، تمام cDNAهای سنتز شده از طریق Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمایش از Hot Taq Eva Green qPCR Mix (شرکت سیناژن) استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل، نسبت بیان ژن هدف (ژن فلاونول سنتاز FLS) در مقایسه با ژن کنترل 18S rRNA برای تمام تیمارها از روش Pfaffle و REST استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد، یکی از cDNAهای تیمار با غلظت مناسب، انتخاب شد و متعاقب آن رقت‌های سریالی ۱۰ برابری (10-fold dilution) از cDNA مورد نظر تهیه شد. برای هر یک از رقت‌ها، چرخه آستانه (Ct) از طریق قرارگیری هریک از سریال‌ها در دستگاه Real Time PCR دست آمد و در نهایت دستگاه منحنی استاندارد را بر اساس لگاریتم غلظت cDNA و چرخه آستانه ترسیم کرد. میزان بازده PCR برای هر ژن به دلیل اینکه از روش پافل ($Pfaffle = Ratio = E^{(-1/slope)}$) جهت تجزیه داده‌ها استفاده شد، از فرمول $E = 10^{(-1/slope)}$ به دست آمد.

جهت مشخص نمودن ضریب همبستگی و تعیین بازدهی سیستم (Efficiency) از cDNA نمونه مناسب، رقت سریالی تهیه و استفاده شد. همچنین جهت بررسی و تایید عدم وجود آلودگی ژنومی از نمونه کنترل منفی (No RT Control) نیز استفاده شد. پس از تهیه رقت‌های سریالی و بررسی میزان تکثیر از طریق Real Time PCR، تجزیه توسط نرم‌افزار دستگاه (Corbett) RG-3000 محاسبه شد و پس از به دست آوردن بازده، ضریب همبستگی، چرخه آستانه و میزان دقیق غلظت، نتایج توسط نرم‌افزار اکسل به صورت زیر مورد تجزیه قرار گرفت و نشان داد که میزان پراکندگی بین نمونه‌ها ناچیز است. نتایج تجزیه واریانس و تاثیر هورمون اسید آبسزیک و سیتوکینین در غلظت‌های مختلف بر بیان ژن فلاونول سنتاز در گیاه علف مورچه، مشخص کرد که تفاوت معنی داری از لحاظ میزان بیان ژن FLS بین تیمارهای به کار گرفته شده وجود دارد. تجزیه داده‌ها از طریق روش پافل با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد محاسبه قرار گرفت. پس از بررسی تجزیه

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن فلاونول سنتاز و کنترل

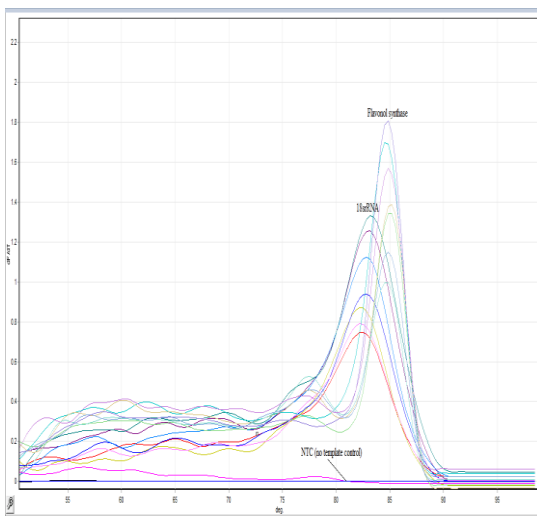
Gene name	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>FLS</i>	GAAATGATGGAGGCAGCAGG	ATTGGCCCAACTTCATGCTC
18S rRNA	GGACAGGATTGACAGATTGATAG	CTCGTTCGTTATCGGAATTAAC

و تایید آن از طریق بررسی با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، بیان بالای ژن *FLS* تحت تاثیر این تیمار، دور از انتظار نیست. به منظور تایید نتایج حاصل از RT-PCR و qPCR، اطمینان از بازده واکنش (Efficiency) امری ضروری است. روش موثر جهت اطمینان از انجام واکنش دقیق qPCR، تهیه رقت سریالی است. ابتدا رقت سریالی برای دو ژن *FLS* و 18S rRNA تهیه و پس از رسم منحنی استاندارد، بازده واکنش تعیین شد. نتایج صحت آزمایشات و بازده واکنش برای هر دو ژن *FLS* و 18S rRNA، در حد استاندارد قرار داشت. پس از رسم منحنی استاندارد برای هر یک از دو ژن هدف و استاندارد مشاهده شد که شیب خط هر یک از رقت‌های سریالی، مناسب بود. در نتیجه تکثیر نسخه‌ها توسط PCR درست صورت گرفته است. اطلاعات حاصل از بررسی بیان ژن فلاونول سنتاز نشان داد که تیمار دوم بیشترین تاثیر را بر بیان ژن فلاونول سنتاز داشته است. پیشرفت‌های تکنولوژیکی از قبیل توسعه سیستم حساس Real Time PCR، اندازه‌گیری کمی سریع و دقیق مقادیرهای اندکی از mRNA را فراهم می‌کند (Lu et al. 2011).

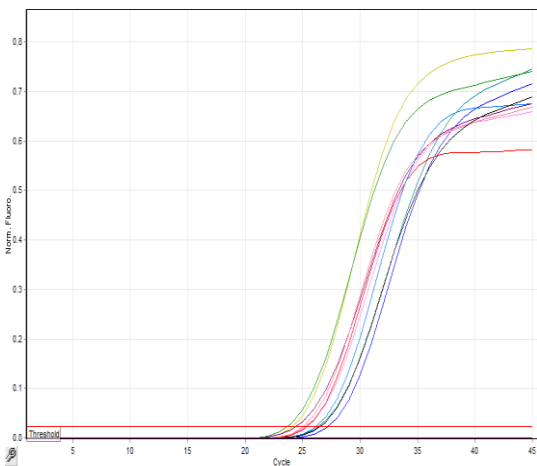
در نرم‌افزار REST ابتدا میزان چرخه آستانه برای هر یک از نمونه‌ها و میزان بازده PCR به برنامه وارد و پردازش داده‌ها بر اساس نمودار BOX Plot نمایش داده شد. همانند تجزیه با روش پافل، در این روش هم تیمار ۲ بیشترین میزان را داشته و در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). جهت تعیین این‌که کدام تیمار در مرحله اول بیشترین تاثیر را در بیان ژن فلاونول سنتاز دارد، تیمارهای ۱، ۳ و ۴ در کنار هم قرار گرفتند. یافته‌ها نشان داد که غلظت ۵۰۰ ppm هورمون سیتوکینین نسبت به دو تیمار دیگر که ۳۰۰ و ۵۰۰ ppm هورمون آبسزیک اسید هستند، تاثیر چشمگیری بر بیان ژن داشت ($p < 0/05$). پس از بررسی مستقل دو روش تجزیه آماری و به منظور دستیابی به بهترین روش جهت تجزیه آماری، مقایسه همزمان روش‌ها صورت گرفت. همان‌طور که مشاهده می‌شود هر دو روش الگوی مشابهی را برای بیان ژن نشان می‌دهند، هر چند از نظر نمودار بیان ژن دارای تغییراتی هستند (شکل ۲). در هر دو روش در مرحله دوم به کارگیری غلظت ۳۰۰ ppm هورمون اسیدآبسیزیک، ژن فلاونول سنتاز بیشترین بیان را از خود نشان می‌دهد که با توجه به تولید بیش‌تر ماده کوئرستین (پروتئین سازنده این آنزیم)

جدول ۲- مطالعه اثر تیمارهای هورمونی بر بیان ژن *FLS* از طریق به کارگیری نرم افزار REST جهت تجزیه داده‌ها

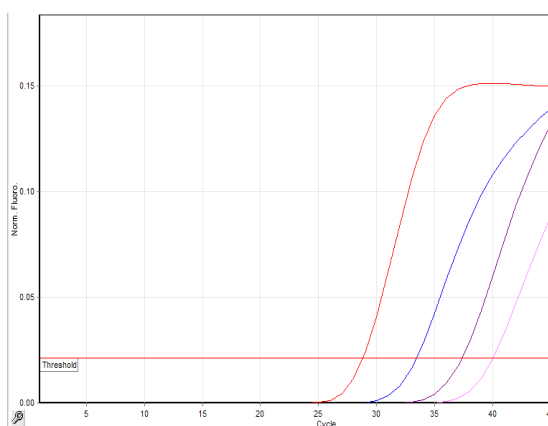
ژن	نوع	بازده واکنش	بیان ژن	خطای استاندارد	95% C.I	P (H1)	نتیجه
فلاونول سنتاز، تیمار ۱	هدف	۰/۹۹	۱/۹۵۹	۱/۰۹۹ - ۲/۸۱۹	۰/۹۸۱ - ۲/۸۱۹	۰/۱۲۵	
18S rRNA تیمار ۱	استاندارد	۰/۹۸	۰/۸۷۱				
فلاونول سنتاز، تیمار ۱	هدف	۰/۹۹	۳/۳۱۳	۱/۴۳۷ - ۳/۶۵۸	۱/۲۸۲ - ۴/۹۱۱	۰/۰۲۹	بالا
18S rRNA تیمار ۱	استاندارد	۰/۹۸	۰/۹۵۱				
فلاونول سنتاز، تیمار ۱	هدف	۰/۹۹	۲/۰۶۵	۱/۳۲۳ - ۳/۳۳۱	۱/۱۸۱ - ۳/۸۷۵	۰/۰۱۲	بالا
18S rRNA تیمار ۱	استاندارد	۰/۹۸	۱/۰۰۳				
فلاونول سنتاز، تیمار ۱	هدف	۰/۹۹	۲/۵۱۶	۲/۰۱۹ - ۳/۱۵۲	۱/۸۴۷ - ۳/۶۶۸	۰/۰۱۲	بالا
18S rRNA تیمار ۱	استاندارد	۰/۹۸	۱/۲۹۲				



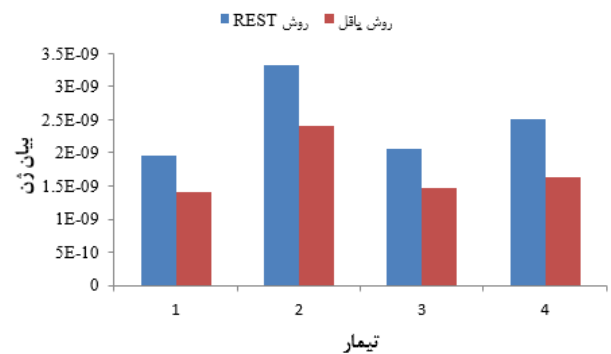
شکل ۳- منحنی ذوب ژن فلاونول سنتاز و ژن استاندارد 18s rRNA



شکل ۴- تکثیر تیمارها و نمونه شاهد از طریق Real Time PCR با ژن فلاونول سنتاز



شکل ۵- تکثیر رقت‌های سریالی برای ژن فلاونول سنتاز



شکل ۲- مقایسه دو روش REST و Pfaffl جهت بررسی میزان بیان ژن فلاونول سنتاز در گیاه *Cressa cretica*.

کاربرد خارجی هورمون آبسزیک اسید، نقش مهمی در رشد گیاه ایفا می‌کند. به عنوان مثال آبسزیک اسید باعث آغاز رسیدن سریع بذر و میوه می‌شود و سبب پیام‌رسانی و ایجاد پیام به بخش‌های مختلف گیاه در زمانی که در معرض تنش‌هایی از قبیل شوری، خشکی، سرما و آلودگی‌های میکروبی قرار می‌گیرد، می‌شود (Leung et al. 1998; Deytieu 2007; wheeler et al. 2009). بیان نسبی ژن بر اساس نسبت تکثیر ژن هدف به ژن استاندارد و رسیدگی به تغییرات فیزیولوژیکی در سطوح بیان ژن پایه‌ریزی شده‌است. برخی از مدل‌های آماری مطالعه بیان ژن جهت محاسبه نسبت بیان نسبی نمونه‌های منفرد با بررسی کارایی یا بدون آن گسترش یافته‌است (soong et al. 2000; Pfaffl 2001). ثابت شده که تفاوت‌های جزئی در تنظیم بیان برخی ژن‌ها از طریق راه‌کارهای تحمل به تنش، سبب ایجاد تنوع در رفتار به سازگاری به این شرایط از تحمل بالا تا کاملاً حساس شده‌است. از این‌رو بروز چنین تفاوت‌هایی در میزان بیان ژن‌ها منشا ایجاد واریته‌های متحمل و حساس می‌شود (Huang et al. 2008). به نظر می‌رسد.

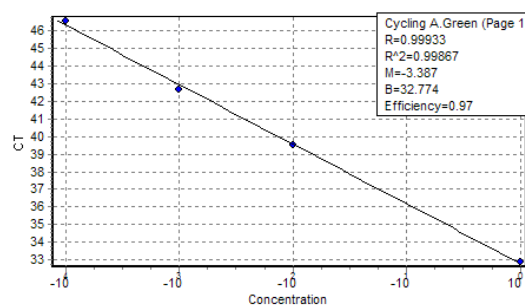
باقی ماندن بیشتر هورمون اسیدآبسیزیک در سطح سبب افزایش فعالیت مکانیسم تنظیم بیان ژن باشد. متعاقب آن هورمون زمان کافی را جهت ایجاد و صدور پیام های فیزیولوژیکی در گیاه داشته و سیگنال های ایجاد شده باعث تغییرات در میزان بیان ژن های مختلف از جمله فلاونول سنتاز شده است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از رئیس محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل و کارکنان محترم این واحد به دلیل پشتیبانی تجهیزاتی این تحقیق و همچنین همه دوستانی که در انجام این پژوهش همکاری داشتند، سپاسگزاری می شود.

منابع

- Abdelaaty A, Naglaa MN, Luc P, Arnold JV (2005) Flavonoids from *Cressa cretica*. *Pharmaceutical Biology. Information Healthcare* 25: 72- 77.
- Amandeep K.S, Dennis J, Jiang Lu (2011) Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins. *Journal of Food Chemistry* 126: 982- 988.
- Baghell SS, Shrivastava N, Baghel RS, Agrawal P, Rajput S (2012) A Review of quercetin: Antioxidant and anticancer properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 1: 146- 160.
- Deytieux-Belleau C, Gagne S, L'Hyvernay A, Doneche B, Geny L (2007) Possible roles of both abscisic acid and indoleacetic acid in controlling grapeberry ripening process. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 41:141-148.
- Forkmann G (1991) Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed* 106: 1- 26.
- Huang B, Yi B, Duan Y, Sun L, Yu X, Guo J, et al. (2008) Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway. *Molecular Biology Reports* 35: 601-612.
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 199-222.
- Lu X, Straaten T, Tiller M, Li X (2011) Evidence for Qualified Quantitative mRNA Analysis in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Colorectal Carcinoma



شکل ۶- منحنی استاندارد حاصل از رقت های سریالی برای ژن فلاونول سنتاز

در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس بیان ژن های دخیل در تحمل به تنش بیان می شوند ولی از نظر زمان و میزان بیان این ژن ها تفاوت وجود دارد (Rodrigues et al. 2009). ما در این تحقیق ثابت کردیم که مدت زمان قرارگیری گیاه در شرایط تنش با غلظت معین سبب تغییر و افزایش در بیان ژن شد. به نظر می رسد

- Cells and Tissue. *Clinical Laboratory Analysis* 25: 166-173.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002- 2007.
- Purushothaman K, Kalyani K (1974) The flavonoids of Rudanti (*Cressa cretica* Linn). *Indian Journal of Medical Research* 9: 109-110.
- Rodrigues FA, de Laia ML, Zingaretti SM (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Science* 176: 286-302
- Satakopan S, Karandikar G K (1961) Rudanti: A pharmacognostic study *Cressa cretica* linn. *Journal of Scientific and Industrial Research* 20: 156-160.
- Shahat AA, Abdel-Azim NS, Pieters L, Vlietinck AJ (2004) Flavonoids from *Cressa cretica*. *Pharmaceutical Biology* 42:349-52.
- Soong R, Ruschoff J, Tabiti K (2000) Detection of colorectal micrometastasis by quantitative RT-PCR of cytokeratin 20 mRNA. *Roche Molecular Biochemicals Internal Publication* 41: 391. XP002149389
- Waterland NL, Campbell CA, Finer JJ, Jone ML (2010) Abscisic Acid Application Enhances Drought Stress Tolerance in Bedding Plants. *Journal of HortScience* 45: 409- 413.
- Wheeler S, Loveys B, Ford C, Davies C (2009) The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 195-204.