مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۹، شماره ۲، صفحه ۲۰۶-۱۹۶ (۱۴۰۰)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2021.127816.1354
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350891.1400.29.2.3.2

ارزیابی بیان ژن منتون منتول ردوکتاز تحت تأثیر تنش خشکی، شوری و دما در گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)

یوسف محمدی[1*] و زهرا خورسندنیا[2]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، بخش تحقیقات زیست فن آوری، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
پست‌الکترونیک: y.mohamadi@rifr-ac.ir

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۹

چکیده

نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) یکی از مهمترین گیاهان دارویی تولید کننده متابولیت‌های ثانویه است. منتول یک جزء مهم از منوترپن‌های اسانس نعناع فلفلی است که کاربرد گسترده‌ای در صنایع داروسازی و مصارف صنعتی دارد. این منوترپن ارزشمند توسط آنزیم منتون منتول ردوکتاز (MMR) تولید می‌شود. رشد گیاه و همچنین بیان این ژن تحت تأثیر عوامل تنش‌زای محیطی دستخوش تغییر می‌شود. در این تحقیق ریزوم‌های گیاه نعناع فلفلی پس از ضدعفونی سطحی، در ظروف حاوی محیط کشت MS با مقادیر ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار مانیتول کاشته شدند و بعد در اتاقک‌های رشد با دماهای ۲۳، ۲۶ و ۲۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سه هفته پس از اعمال تنش‌ها، بیان ژن برگ گیاهان کشت شده با روش Real Time PCR اندازه‌گیری شد و اطلاعات حاصل آنالیز شد. نتایج بیانگر این بود که بیان ژن منتون منتول ردوکتاز در غلظت‌های پایین کلرید سدیم کاهش یافته ولی در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به گیاه شاهد ۹۷ درصد افزایش داشته است. ولی بیان این ژن در غلظت‌های بالای مانیتول و همچنین دمای بالا به حداقل سطح خود رسیده است. با توجه به اهمیت نعناع فلفلی در صنایع داروسازی و صنعتی، افزایش تولید منتول با اعمال تیمارهای مختلف حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل، ترکیب‌های تیماری با صفر میلی‌مولار مانیتول، ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش ۹۳ درصدی بیان ژن منتون منتول ردوکتاز نسبت به گیاه شاهد شد و پیش‌بینی می‌شود که تولید منتول به حداکثر میزان خود برسد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، منتول، منتون منتول ردوکتاز، نعناع فلفلی، Real Time PCR.

مقدمه

داروهای گیاهی دارای خواص متعدد و عوارض کمتر بوده و در برخی موارد به‌عنوان تنها درمان مؤثر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Shamsi-Fard *et al*., 2014). نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* کاربردهای دارویی بسیار فراوانی دارد (Gobert *et al*., 2002). نعناع فلفلی منبع اصلی متابولیت ثانویه منتول است که به‌صورت گسترده برای اهداف دارویی و بهداشتی استفاده می‌شود (Zhang & Barritt, 2004). بیوسنتز منوترپن‌ها ازجمله منتول از سلول-های ترشحی غیر فتوسنتزی تخصص یافته به نام کرک‌های

غده‌ای سپری که از لایه اپی‌درمی مشتق شده‌اند انجام می‌شود (Wang *et al.*, 2016). این محصول ارزشمند طبیعی با توجه به کاربردهای صنعتی و بهداشتی، اهمیت اقتصادی بسیاری دارد (Mucciarelli *et al.*, 2001).

برای تولید منتول، ابتدا ایزوپنتینیل دی فسفات و دی متیل‌آلیل دی‌فسفات به وسیله آنزیم ژرانیل دی‌فسفات سنتاز با هم ترکیب شده و ژرانیل‌دی فسفات تولید می‌شود. این ترکیب توسط آنزیم لیمونن سنتاز به صورت حلقوی در می‌آید و لیمونن را تولید می‌کند. این ترکیب نیز طی چند مرحله واکنش منتون را پدید می‌آورد. در نهایت، آنزیم منتون منتول ردوکتاز باعث تبدیل منتون به منتول می‌شود (Croteau & Gershenzon 1994). البته، تاکنون مطالعات کمی بر روی تأثیر مواد مختلف و عوامل محیطی گوناگون بر بیان ژن کدکننده آنزیم منتون منتول ردوکتاز انجام شده است.

در مطالعه‌ای که در مورد تأثیر نور و دما بر میزان تولید منوترپن‌های گیاه نعناع فلفلی انجام شد، نتایج نشان داد که سرمای شب‌ها باعث افزایش کیفیت اسانس و افزایش سطح منتول این گیاه شده است (Burbott & Loomis 1967). همین‌طور مشاهده شده است که در شرایط کم آبی و خشکی، میزان منتول و منتون در این گیاهان افزایش می‌یابد (Charles *et al.*, 1990). در آزمایشی که بر نقش دوره نوری بر مقدار و ترکیب اسانس در گونه‌های *Mentha arvensis*، *Mentha citrata* و *Mentha cardiac* انجام شد مشخص گردید که محتوای اسانس در دوره نوری روز کوتاه مقدار بیشینه دارد (Farooqi *et al.*, 1999).

Faure و همکاران (۱۹۹۸) در ارتباط با اثر مانیتول بر بیوسنتز ترکیبات منوترپنی مطالعاتی در این گیاه انجام دادند و مشاهده کردند که با قرار دادن گیاهان در مقادیر ۳۰۰ میلی‌مولار مانیتول و بعد انتقال آن به محیط بدون مانیتول، علاوه بر زیاد شدن میزان رشد گیاه، باعث افزایش محتوای منوترپنی در نعناع فلفلی می‌شود (Faure *et al.*, 1998). همچنین آبیاری با آب شور باعث کاهش رشد و کاهش ۲۰ درصدی متابولیت‌های گیاه نعناع فلفلی می‌شود (Dow *et al.*, 1981; El-keltawi & Croteau, 1987). در تحقیق دیگری نیز بیان ژن منتون منتول ردوکتاز و نئومنتول-دهیدروژناز تحت تأثیر کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این تیمار باعث افزایش بیان این ژن و میزان متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (Naderi *et al.* 2015).

با توجه به اینکه ژن منتون منتول ردوکتاز به صورت کلیدی در مسیر بیوسنتز ترکیبات مونوترپنی در گیاه نعناع نقش اساسی دارد و بیان آن حضور فراورده نهایی موجود در اسانس گیاه نعناع فلفلی را تغییر می‌دهد. استفاده از تیمارهای مختلف فیزیکی و شیمیایی می‌تواند بیان یک ژن یا مجموعه‌ای از ژن‌ها را در یک سیستم گیاهی تغییر دهد. ازاین‌رو، با بررسی بیان این ژن و همچنین مقایسه نتایج حاصل از بیان ژن نامبرده در شرایط مختلف، می‌توان اطلاعات کاملی در ارتباط با میزان تولید ترکیبات ثانویه در گیاهان مورد بررسی بدست آورد. بنابراین با در نظر گرفتن این پیش‌فرض، هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن منتون منتول ردوکتاز دخیل در سنتز مونوترپن‌ها تحت تیمارهای مختلف کلریدسدیم، مانیتول و دما در گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) است و اطلاعات بدست آمده از این پژوهش می‌تواند به صورت مؤثری در ارزیابی کمیت و کیفیت اسانس حاصل از گیاه نعناع فلفلی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ریزوم‌های مورد نیاز برای این تحقیق از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان‌شرقی تهیه شد. محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) با مقادیر کلرید سدیم ۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌مولار و مانیتول ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار به صورت جداگانه تهیه و در ظروف کشت ریخته شد. در این آزمایش ۳۶ ترکیب تیماری با ۲ تکرار تهیه گردید. سپس ریزوم‌های مناسب پس از ضدعفونی شدن سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد، در ظروف کشت و به اتاقک‌های رشد با دماهای ۲۳، ۲۶ و ۲۹ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

پس از سه هفته، استخراج RNA کل از برگ‌ها و با استفاده از کیت RNaX-Plus تهیه شده از شرکت سیناکلون و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس کنترل کمی و کیفی RNA استخراجی با روش اسپکتروفتومتری دستگاه نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific, USA) و ژل آگارز یک درصد انجام گردید. سنتز رشته اول cDNA با کیت سنتز cDNA سیناکلون و آغازگرهای تصادفی و هگزامر برای ژن منتون منتول ردوکتاز و ژن بتااکتین (به‌عنوان ژن کنترل داخلی) انجام شد. برای طراحی آغازگرهای مستقیم و معکوس دو ژن مورد نظر، توالی‌های این دو ژن از داده پایگاه NCBI، دانلود و طراحی آغازگرها با نرم‌افزار Oligo 7 انجام گردید. همچنین برای حصول اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده، بلاست آغازگرهای طراحی شده توسط نرم‌افزار پرایمر بلاست (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) انجام (جدول ۱) و برای سنتز به شرکت سیناکلون ارسال شد (جدول ۲).

جدول ۱- پرایمر بلاست برای ژن منتون منتول ردوکتاز

Table 1. Primer Blast of the *mmr* gene

مشخصات Features	توالی Sequence	طول Length	دمای ذوب Tm	محتوای GC GC%	خود مکملی Self complementarity
Forward primer	TCGGATCATAGCGCGAAAG	19	57.82	52.63	0
Reverse primer	AGCACCTTCAGCTTCACTTAG	21	57.95	47.62	3
Products on target templates KU174203 *Mentha arvensis mmr* gene					
Product length	112				
Forward primer	TCGGATCATAGCGCGAAAG				
Template	TCGGATCATAGCGCGAAAG				
Reverse primer	AGCACCTTCAGCTTCACTTAG				
Template	AGCACCTTCAGCTTCACTTAG				

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای ژن منتون منتول ردوکتاز و ژن کنترل داخلی بتا اکتین

Table 2. Features of primers designed for the *mmr* gene and the *betaactin* internal control gene

نام آغازگر Primer name	توالی Sequence	دمای اتصال آغازگر Primer Ta	طول محصول PCR PCR product size
*mmr*F	TCGGATCATAGCGCGAAAG	55	112
*mmr*R	AGCACCTTCAGCTTCACTTAG	55	112
*Betaactin*F	TCCTGAGAGGAAGTACAGTGTC	55	108
*Betaactin*R	GACGGCCCAGATTCATCATAC	55	108

F: مستقیم و R: معکوس

برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن منتون منتول ردوکتاز، واکنش RealTime PCR با استفاده از کیت Sina SYBR Blue HS-qPCRMix و با حجم ۲۰ میکرولیتر در دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus انجام شد. شرایط انجام واکنش در جدول ۳ ذکر شده است. داده‌های حاصل از نمودارهای بدست آمده ابتدا توسط ژن کنترل داخلی نرمال

شد و با توجه به اینکه تمامی نمونه‌ها در یکبار در دستگاه ترموسایکلر ران شده‌اند، بنابراین برای هر دو ژن کارایی PCR، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است. همچنین برای محاسبه مقدار بیان، از روش Pfaffl (Pfaffi et al., 2002) استفاده و به‌وسیله نرم‌افزار REST 2009 میزان بیان ژن محاسبه شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های بیان ژن نیز با روش دانکن و نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد.

جدول ۳- شرایط دمایی و زمان مورد استفاده در چرخه‌های Real Time PCR

Table 3. Temperature and time conditions used in Real Time PCR cycles

مرحله Step	اسم مرحله Step name	دما Temp	زمان Time	تعداد چرخه Number of cycles
Step1	Initial denaturation	95°C	5min	1
Step2	Denaturation	95°C	45s	35
	Annealing	55°C	45s	
	Extension	72°C	1min	
Step3	Final extension	72°C	7min	1

نتایج

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن منتون منتول ردوکتاز در گیاه نعناع فلفلی پس از اعمال تنش‌های شوری (سه سطح)، خشکی (چهار سطح) و دما (سه سطح) به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان دادند که بین سه سطح شوری، چهار سطح خشکی و سه سطح دما از نظر بیان ژن منتون منتول ردوکتاز در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین اثرهای متقابل دوگانه خشکی در شوری، خشکی در دما، شوری در دما و اثرهای متقابل سه‌گانه نیز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشانگر این بود که افزایش مقدار سطوح کلرید سدیم، باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن منتون منتول ردوکتاز شده ولی با افزایش دما و مانیتول، میزان بیان ژن کاهش می‌یابد.

جدول ۴- تجزیه واریانس بیان ژن مورد مطالعه در نعناع فلفلی بین سطوح مختلف شوری، خشکی و دما

Table 4. Variance analysis of gene expression studied in peppermint between different levels of salinity, drought and temperature

منبع تغییرات Source	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square
Drought	3	3.251**
Salinity	2	1.096**
Temperature	2	0.855**
Drought× Salinity	6	0.270**
Drought× Temperature	6	0.082**
Salinity × Temperature	4	0.262**
Drought× Temperature× Salinity	12	0.154**
Error	36	0.008

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

نقش تنش شوری بر بیان ژن منتون منتول ردوکتاز

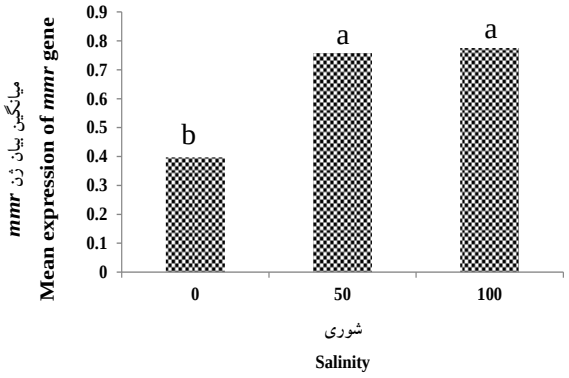
مشاهدات حاصل از بیان ژن تحت تنش شوری نشان داد که با افزایش سطح این تنش از صفر (نمونه شاهد تا مقدار ۱۰۰ میلی‌مولار) میزان بیان ژن نسبت به نمونه شاهد ۱/۹۳ برابر افزایش یافته است (شکل ۱– A).

تأثیر تنش خشکی بر بیان نسبی ژن منتون منتول ردوکتاز

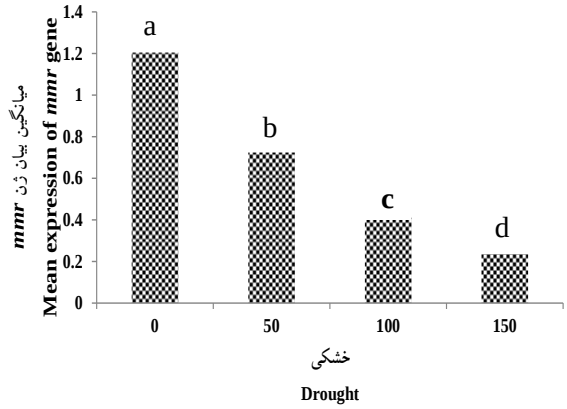
طبق شواهد بدست آمده از تجزیه داده‌های حاصل از بیان ژن منتون منتول ردوکتاز در سطوح مختلف مانیتول، با مقادیر ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار بیانگر این است که هرچه میزان مانیتول افزایش یابد بیان ژن روند کاهشی خواهد داشت. به صورتی که کاهش بیان ژن در مقدار مانیتول ۱۵۰ میلی‌مولار در مقایسه با صفر (گیاه شاهد) ۵/۱۴ برابر است (شکل ۱– B).

نقش تغییرات دمایی بر بیان ژن منتون منتول ردوکتاز

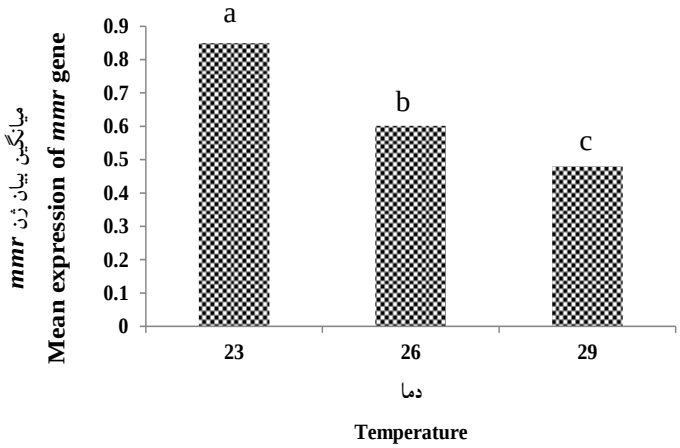
نتایج حاصل از تأثیر دما بر میزان بیان ژن منتون منتول ردوکتاز نشان داد که در دمای ۲۳ درجه (گیاه شاهد) میزان بیان بالا بوده و رفته رفته با افزایش دما به سطوح ۲۶ و ۲۹ درجه سانتی‌گراد بیان این ژن نسبت به گیاه شاهد ۱/۷ برابر کاهش یافته است (شکل ۱– C).



A



B



C

شکل ۱– اثرهای اصلی شوری، خشکی و دما بر بیان نسبی ژن منتون منتول ردوکتاز

Figure 1. The main effects of salinity, drought and temperature on the relative expression of *mmr* gene

اثرهای متقابل دوجانبه

اثرهای متقابل دوجانبه خشکی در شوری نشان داد که بیشترین افزایش بیان ژن در ترکیب صفر میلی‌مولار مانیتول و ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم با افزایش ۶۱ درصدی نسبت به گیاه شاهد مشاهده گردید (جدول ۵). برای اثر متقابل دوجانبه خشکی در دما نیز بیشترین افزایش بیان ژن با ۲۹ درصد افزایش نسبت به گیاه شاهد در ترکیب صفر میلی‌مولار مانیتول و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد (جدول ۶). همچنین برای اثر متقابل شوری در دما، ۱۶ درصد افزایش بیان ژن منتون منتول ردوکتاز در ترکیب ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید (جدول ۷).

جدول ۵- اثر متقابل دوجانبه خشکی در شوری بر بیان ژن منتون منتول ردوکتاز

Table 5. Interaction of drought and salinity on *mmr* gene expression

مانیتول Mannitol (mM)	کلرید سدیم Sodium chloride (mM)	میانگین بیان ژن *mmr* Mean expression of *mmr* gene
0	0	0/66[d]
0	50	1/61[a]
0	100	1/33[b]
50	0	0/50[ef]
50	50	0/75[d]
50	100	0/91[c]
100	0	0/22[h]
100	50	0/38[eg]
100	100	0/61[de]
150	0	0/18[h]
150	50	0/27[gh]
150	100	0/23[h]

حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

The same letters in each column are not significantly different based on Duncan's test

جدول ۶- اثر متقابل دوجانبه خشکی در دما بر بیان ژن منتون منتول ردوکتاز

Table 6. Interaction of drought and temperature on *mmr* gene expression

مانیتول Mannitol (mM)	دما Temperature (C)	میانگین بیان ژن *mmr* Mean expression of *mmr* gene
0	23	1/29[a]
0	26	1/16[b]
0	29	1/15[b]
50	23	1/08[b]
50	26	0/64[c]
50	29	0/44[d]
100	23	0/66[c]
100	26	0/39[d]
100	29	0/17[e]
150	23	0/35[d]
150	26	0/20[e]
150	29	0/14[e]

حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

The same letters in each column are not significantly different based on Duncan's test

جدول ۷- اثر متقابل دوجانبه شوری در دما بر بیان ژن منتون منتول ردوکتاز

Table 7. Interaction of salinity and temperature on *mmr* gene expression

کلرید سدیم Sodium chloride (mM)	دما Temperature (C)	میانگین بیان ژن *mmr* Mean expression of *mmr* gene
0	23	0/63[d]
0	26	0/31[f]
0	29	0/23[g]
50	23	0/74[c]
50	26	0/87[b]
50	29	0/65[d]
100	23	1/16[a]
100	26	0/61[de]
100	29	0/54[e]

حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

The same letters in each column are not significantly different based on Duncan's test

اثر متقابل هر سه تنش بر بیان ژن منتون منتول ردوکتاز

اثرهای متقابل سه جانبه نشان داد که بالاترین میزان بیان ژن به‌ترتیب در ترکیب‌های تیماری با صفر میلی‌مولار مانیتول، ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، همچنین مقادیر صفر میلی‌مولار مانیتول، شوری ۵۰ میلی‌مولار، دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و مانیتول صفر میلی‌مولار، کلرید سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد با ۹۳ درصد افزایش نسبت به گیاه شاهد قرار داشتند. کمترین میزان بیان ژن نیز در تیمار ۲۱ با ۱۰۰ میلی‌مولار مانیتول، شوری صفر و دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد در حدود ۹۰ درصد کاهش نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد (جدول ۸).

جدول ۸- اثر متقابل سه جانبه بر بیان ژن منتون منتول ردوکتاز

Table 8. Interaction of salinity and temperature on *mmr* gene expression

	مانیتول Mannitol (mM)	کلرید سدیم Sodium chloride (mM)	دما Temperature (C)	میانگین بیان ژن *mmr* Mean expression of *mmr* gene
1	0	0	23	1[c]
2	0	0	26	0/51[eg]
3	0	0	29	0/48[fh]
4	0	50	23	0/96[c]
5	0	50	26	1/93[a]
6	0	50	29	1/93[a]
7	0	100	23	1/93[a]
8	0	100	26	1/03[c]
9	0	100	29	1/03[c]
10	50	0	23	0/84[cd]
11	50	0	26	0/41[fi]
12	50	0	29	0/25[il]
13	50	50	23	1/03[c]
14	50	50	26	0/84[dc]

	مانیتول Mannitol (mM)	کلرید سدیم Sodium chloride (mM)	دما Temperature (C)	میانگین بیان ژن *mmr* Mean expression of *mmr* gene
15	50	50	29	0/39[fj]
16	50	100	23	1/36[b]
17	50	100	26	0/68[de]
18	50	100	29	0/68[de]
19	100	0	23	0/39[fj]
20	100	0	26	0/19[jl]
21	100	0	29	0/09[l]
22	100	50	23	0/55[ef]
23	100	50	26	0/43[fi]
24	100	50	29	0/18[kl]
25	100	100	23	1/03[c]
26	100	100	26	0/55[ef]
27	100	100	29	0/25[il]
28	150	0	23	0/29[hl]
29	150	0	26	0/14[kl]
30	150	0	29	0/12[l]
31	150	50	23	0/43[fi]
32	150	50	26	0/27[il]
33	150	50	29	0/12[l]
34	150	100	23	0/34[gk]
35	150	100	26	0/17[kl]
36	150	100	29	0/19[jl]

حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

The same letters in each column are not significantly different based on Duncan's test

بحث

منتول مونوترپن اصلی تولید شده در اسانس نعناع فلفلی است که در غدد اپیدرمی و در طی هشت مرحله آنزیمی در مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) پلاستیدی و در مراحل پایانی تولید مونوترپن‌ها به وسیله آنزیم منتون منتول ردوکتاز از سوبسترای منتون تولید می‌شود (Croteau *et al.*, 2005). منتون منتول ردوکتاز و منتون نئومنتول ردوکتاز جزء آنزیم‌های وابسته به NADPH بوده و مطالعات نشان می‌دهد که آنزیم نوترکیب منتون منتول ردوکتاز بیان شده در *E. coli* سبب تولید ۹۵ درصد منتول و ۵ درصد نئومنتول از سوبسترای منتون و ۸۷ درصد نئوایزومنتول و ۱۳ درصد ایزومنتول از سوبسترای ایزومنتون می‌شود (Davis *et al.*, 2005). با توجه به اهمیت این آنزیم در تولید منتول، مطالعه جنبه‌های مختلف ژنتیکی ژن منتون منتول ردوکتاز در شرایط مختلف محیطی و زیستی حائز اهمیت است.

مطالعات اندکی در مورد تأثیر عوامل محیطی و مطالعه روی تغییر بیان ژن انجام شده است و این تحقیق اولین مطالعه انجام شده در حوزه نقش شوری، خشکی، دما و همچنین تأثیر متقابل این سه عامل در کشت درون شیشه‌ای بر بیان ژن منتون منتول ردوکتاز است. این مطالعه نشان داد که مقادیر بالای کلرید سدیم با بیان ژن منتون منتول ردوکتاز رابطه مستقیم دارد و با افزایش میزان کلرید سدیم، بیان ژن مذکور نیز افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که حداکثر بیان این ژن به‌ترتیب در ترکیب‌های تیماری با صفر میلی‌مولار مانیتول، ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد با ۹۳ درصد افزایش نسبت به گیاه شاهد، همچنین مقادیر صفر

میلی‌مولار مانیتول، شوری ۵۰ میلی‌مولار، دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و مانیتول ۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد با ۹۳ درصد افزایش نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد.

بنابراین به نظر می‌رسد افزایش سطح رونویسی ژن MMR در ۷۲ ساعت پس از تیمار با کیتوزان نقش مثبتی در افزایش میزان منتول داشته است و با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (Soleymani *et al.*, 2017). Naderi و همکاران (2015) در مطالعه‌ای نقش کیتوزان در بیان ژن منتون منتول ردوکتاز را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که کیتوزان در سطوح تیماری ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام، موجب افزایش بیان ژن مذکور و میزان تولید منتول، نئومنتول و منتون شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. Ghobadi و همکاران (2017) به بررسی نقش الیسیتورهای غیرزیستی در بیان ژن‌های *gts* و *dxr* در مسیر بیوسنتز تیمول در گیاه دارویی مرزه تابستانه (*Satureja hortensis*) پرداختند و به این نتیجه رسیدند که اعمال متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک موجب افزایش بیان ژن‌های مذکور در ساعات اولیه پس از اعمال تیمار می‌شود. Elyasi و همکاران (2016) در بررسی خود بر روی نقش متیل جاسمونات بر روی بیان ژن‌های دخیل در سنتز ترپن‌ها به این نتیجه رسیدند که متیل جاسمونات باعث افزایش بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز می‌شود. Seyed Rahmani و همکاران (2014) در بررسی رابطه بیان ژن‌های اصلی مسیر MEP و میزان تولید مونوترپن‌ها در *Artemisia annua*، به این نتیجه رسیدند که بیان سه ژن اصلی این مسیر (*hdr, dxr, dxs*) و شش ترکیب مونوترپن α-pinene، Camphene، β-Myrcene، Artemisia ketone، 1,8-Cineole و Camphor در سه بافت برگ، غنچه و گل تفاوت معنی‌داری با هم دارند. با افزایش میزان مانیتول در محیط کشت و بالا رفتن دما، میزان بیان ژن MMR به شکل معنی‌داری کاهش پیدا می‌کند که با تحقیق Soleymani و همکاران (2017) مطابقت دارد. به‌طوری‌که میزان بیان ژن مورد نظر پس از ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت از اعمال جیبرلیک اسید به شکل چشمگیری کاهش یافته است.

با توجه به کاربرد متابولیت‌های ثانویه و ارزش اقتصادی و دارویی آنها و اهمیت اجتناب از روش‌های پرهزینه مهندسی ژنتیک برای بالا بردن سطح محتوای فراورده‌های ارزشمند، پیش‌بینی می‌شود با اعمال مقادیر کمی از تنش‌های غیر زیستی که شامل عوامل مورد نیاز گیاه برای رشد می‌باشد بتوان تولید منتول و بقیه متابولیت‌های ثانویه ارزشمند را افزایش داد. با توجه به اهمیت نعناع فلفلی در صنایع داروسازی و صنعتی، افزایش تولید منتول با اعمال تیمارهای مختلف حائز اهمیت است. با توجه به نتایج حاصل، ترکیب‌های تیماری با صفر میلی‌مولار مانیتول، ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش ۹۳ درصدی بیان ژن منتون منتول ردوکتاز نسبت به گیاه شاهد شده و پیش‌بینی می‌شود که تولید منتول به حداکثر میزان خود برسد.

سپاسگزاری

از زحمات جناب آقای دکتر محمدرضا مشایخی و مهندس احمد بابازاده قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

– Burbott, A. J. and Loomis, W. D., 1967. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. Plant physiology, 42(1): 20-28.
– Charles, D. J., Joly, R. J. and Simon, J. E., 1990. Effects of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. Phytochemistry, 29(9): 2837-2840.
– Croteau, R. and Gershenzon, J., 1994. Genetic control of monoterpene biosynthesis in mints (*Mentha*: Lamiaceae). Genetic engineering of plant secondary metabolism, (New York: Plenum Press), pp. 193-229.
– Croteau, R. B., Davis, E. M., Ringer, K. L. and Wildung, M. R., 2005. Menthol biosynthesis and molecular genetics. Naturwissenschaften, 92(12): 562.
– Davazdahemami, S., 2003. Applications of Medicinal

S. and Maffei, M., 2001. Effect of (+)-pulegone and other oil components of *Mentha×piperita* on cucumber respiration. Phytochemistry, 57(1): 91-98.
– Naderi, S., Fakheri, B. and Khaje, H., 2015. The effect of chitosan on menthol dehydrogenase gene expression and menthol content in peppermint (*Mentha piperita* L.) by Real time PCR. Journal of Medicinal Plants Biotechnology. 1(1): 23-32.
– Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 30: 1-10.
– Seyed Rahmani1, R., Naghavi, M.R., Mohammadi, V. and Ranjbar, M., 2014. Relationship between expression of main MEP pathway genes and monoterpenes contents in *Artemisia annua*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22(2): 192-200. (In Persian).
– Shamsi-Fard, M.H., Mirzaghaderi, G. and Majdi, M. 2014. Transcript expression analysis of geranyl diphosphate synthase gene in different tissues of black cumin (*Nigella sativa* L.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22(2): 143-155. (In Persian).
– Soleymani, F., Taheri, H. and Shafeinia, A. 2017. Relative expression of genes of menthol biosynthesis pathway in peppermint (Mentha piperita L.) after chitosan, gibberellic acid and methyl jasmonate treatments. Russian Journal of Plant Physiology, 64(1): 59-66.
– Wang, Q., Reddy, V. A., Panicker, D., Mao, H. Z., Kumar, N., Rajan, C., Venkatesh, P. N., Chua, N. H. and Sarojam, R., 2016. Metabolic engineering of terpene biosynthesis in plants using a trichome-specific transcription factor Ms YABBY 5 from spearmint (*Mentha spicata*). Plant biotechnology Journal, 14(7): 1619-1632.
– Zhang, L. and Barritt, G. J., 2004. Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca2+ channel required for the survival of prostate cancer cells. Cancer research, 64(22): 8365-8373.
Plants (translation). Nosuh 113p. (In Persian), Isfahan, Iran
– Davis, EM., Ringer, KL., McConkey, ME. and Croteau, R., 2005. Monoterpene metabolism: cloning, expression and characterization of menthone reductases from peppermint. Plant Physiology, 137:873–881.
– Dow, A., Horning, E. and Cline, T. A., 1981. Salt tolerance studies on irrigated mint, Washington State University Agricultural Research Center, USA.
– El-Keltawi, N. E. and Croteau, R., 1987. Salinity depression of growth and essential oil formation in spearmint and marjoram and its reversal by foliar applied cytokinin. Phytochemistry, 26(5): 1333-1334.
– Elyasi, R., Majdi, M., Bahramnejad, B. and Mirzaghaderi, Gh., 2016. Expression analysis of genes involved in terpenes biosynthesis in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with methyl jasmonate. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(1): 54-65. (In Persian)
– Farooqi, A., Samgwan, N. and Sangwan, R., 1999. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in Mentha species. Plant Growth Regulation, 29(3): 181-187.
– Faure, O., Diemer, F., Moja, S. and Jullien, F., 1998. Mannitol and thidiazuron improve in vitro shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 52(3): 209-212.
– Ghobadi, S., Maroufi, A. and Majd, M., 2017. Differential expression of the key genes involved in the biosynthesis of monoterpenes in different tissues and in response to abiotic elicitors in Summer savory (*Satureja hortensis*). Journal of Cell and Tissue, 7(3): 275-292.
– Gobert, V., Moja, S., Colson, M. and Taberlet, P., 2002. Hybridization in the section Mentha (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. American Journal of Botany, 89(12): 2017-23.
– Mucciarelli, M., Camusso, W., Bertea, C. M., Bossi,

The effects of drought, salinity, and temperature stresses on the expression of menthone menthol reductase gene in Peppermint (*Mentha piperita* L.)

Y. Mohammadi[1*] and Z. Khorsandnia[2]

[1*] Corresponding author, Assist. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran, Email: y.mohamadi@rifr-ac.ir
[2] M.Sc. Graduated, Department of Biology, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, I.R. Iran

Received: 21.09.2019 Accepted: 09.05.2021

Abstract

Peppermint (*Mentha piperita*) is one of the most important medicinal plants producing secondary metabolites. Menthol is an important component of peppermint essential oil monoterpenes, which is widely used in pharmaceutical and industrial applications. This monoterpene is produced by the Menthone Menthol Reductase (MMR) enzyme. Plant growth as well as the expression of this gene are affected by environmental stresses. In this study, peppermint rhizomes were first surface-sterilized and cultured in MS medium supplemented with sodium chloride (zero, 50, and 100 mM) and mannitol (zero, 50, 100, and 150 mM). Then they were placed in growth chambers at 23, 26, and 29°C. Three weeks after applying stresses, the expression of this gene in the leaves of the plants was measured using Real-Time PCR, and the obtained data were analyzed. According to the results, the expression of the MMR gene decreased at low concentrations of sodium chloride but increased by 97% at high concentration of 100 mM compared to the control. However, the expression of this gene has reached a minimum level of expression at high concentrations of mannitol as well as at high temperatures. Due to the importance of peppermint in the pharmaceutical industry, increasing the production of menthol through applying different treatments is important. Based on the obtained results, the treatment with mannitol (zero mM) and sodium chloride (50 mM) at 23°C increased the expression of the MMR gene by 93% compared to the control and it seems that the menthol production has reached its maximum level.

Keywords: Gene expression, Menthol, Menthone menthol reductase, Peppermint, Real-Time PCR.