

پاسخ رونویسی ژنهای ساختاری و تنظیمی مؤثر در بیوستتز ایزوپرنها و ارتباط آن با بیوستتز اسانس به ایسیستورهای سالیسیلیک اسید و آبسزیک اسید در گیاه نعنا فلفلی

سکینه مالکی، هنگامه طاهری*

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران

*آدرس مکاتبه: خوزستان، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و

منابع طبیعی خوزستان، صندوق پستی: ۶۳۴۱۷۷۳۶۳۷

تلفن: ۰۹۱۶۳۱۵۸۱۵۹، نمابر: ۲۳۲۲۴۲۵ (۰۶۱)

پست الکترونیک: Taheri@asnrukh.ac.ir

doi: [10.29252/jmp.4.72.S12.153](https://doi.org/10.29252/jmp.4.72.S12.153)

تاریخ تصویب: ۹۷/۹/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۵

چکیده

مقدمه: پیش‌سازهای مونوترپنی جهت بیوستتز متول از مسیر پلاستیدی متیل اریتریتول فسفات (MEP) تأمین می‌شوند. هدف: به منظور درک بهتر متابولسیم ترپن‌ها در گیاه نعنا فلفلی، اثر سالیسیلیک اسید و آبسزیک اسید در تغییر الگوی بیان ژنهای مؤثر در بیوستتز و ترشح مونوترپن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: فراوانی رونوشت ژنهای مسیر MEP، برخی فاکتورهای رونویسی منتسب به خانواده‌های C2H2، WRKY، MYB و AP2 و همچنین دو نوع پروتئین انتقال‌دهنده لیپید (LTP1, LTP2) در پاسخ به ایسیستورهای سالیسیلیک و آبسزیک اسید توسط تکنیک PCR در زمان واقعی (qRT-PCR) در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت بعد از اعمال تیمار در مقایسه با شاهد مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ارزیابی کمی و کیفی اسانس توسط دستگاه GC/MS انجام شد.

نتایج: بازده اسانس و محتوای متول تحت اثر هر دوی ایسیستورها افزایش یافت. همچنین بیان ژنهای MCT و CMK در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید تقویت شد و تیمار آبسزیک اسید نیز توانست به طور مؤثری سطح mRNA ژنهای MCT و HDR را تقویت نماید اما بیان سایر ژنهای مسیر MEP به طور مثبتی تحت تأثیر این دو تیمار قرار نگرفت. از سوی دیگر بیان LTP1 و برخی عناصر تنظیمی القاء تریکوم نظیر C2H2 و MYB نیز در پاسخ به هر دو تیمار افزایش یافت. این یافته‌ها نشان می‌دهد علاوه بر سهم پیش‌سازهای ایزوپرنی، افزایش کمی و کیفی اسانس در پاسخ به هر دو تیمار بوسیله مکانیسم‌های دیگری کنترل شده است. نتیجه‌گیری: این مطالعه فرصت جدیدی را در آینده جهت بررسی مکانیسم تنظیم رونویسی ترپنوئیدها در راستای بهبود خواص دارویی نعنا فلفلی فراهم می‌آورد.

کل واژگان: *Mentha piperita* L. پروتئین انتقال‌دهنده لیپید، فاکتورهای رونویسی، متیل اریتریتول فسفات، متول



مقدمه

داده و به صورت دقیقی میزان و زمان بیان ژن‌های مسیر بیوستتزی متابولیت‌های ثانویه را در بافت خاص تنظیم کنند [۷]. سالیسیلیک اسید (SA) به عنوان یک ترکیب فنلی ساده نقش مهمی در تقویت مقاومت گیاه بر علیه طیف وسیعی از بیماری‌ها و تنش‌های محیطی ایفا می‌کند [۸]. این مولکول سیگنالی قادر است از طریق فعال‌سازی NPR1 (Non - expressor of pathogenesis- related protein 1) به عنوان یک تنظیم‌کننده اصلی، بیوستتزی متابولیت‌های ثانویه را از طریق تنظیم فعالیت طیف وسیعی از فاکتورهای رونویسی پائین دست خود تحت تأثیر قرار دهد [۹]. هورمون گیاهی آبسزیک اسید نیز علاوه بر تنظیم جنبه‌های متفاوت رشد و نمو گیاهی و پاسخ به استرس‌های محیطی، نقش کلیدی در تنظیم متابولیزم ترکیبات ثانویه دارد [۱۰، ۱۱]. لذا در این پژوهش به منظور مطالعه اثر تنظیمی این دو هورمون گیاهی در بیوستتزی پیش‌سازهای ایزوپرنی و ذخیره اسانس در گیاه نعنا فلفلی، تغییرات سطح رونوشت ژن‌های موثر در بیوستتزی پیش‌سازهای ایزوپرنی ژن‌های *DXS* (۱-دثوکسی D-اگزالولوس ۵-فسفات سنتتاز)، *DXR* (۱-دثوکسی D-اگزالولوس ۵-فسفات ردوکتوایزومراز)، *MCT* (۴-دی فسفسوسیتیدیل-۲-C-متیل اریترول سنتتاز)، *CMK* (سیتیدین-۵'-دی فسفو-۲-C-متیل-D-اریترول کیناز)، *MDS* (۲-C-متیل-D-اریترول-۴-سیکلودی فسفات سنتتاز)، *HDS* (۴-هیدروکسی-۳-متیل بوت-۲-انیل دی فسفات سنتتاز)، *HDR* (۴-هیدروکسی-۳-متیل بوت-۲-انیل دی فسفات ردوکتاز) و همچنین دو نوع پروتئین انتقال‌دهنده لیپید در تریکوم‌های غده‌ای سپروار (*LTP1* و *LTP2*) در پاسخ به تیمارهای سالیسیلیک و آبسزیک اسید بوسیله آزمون PCR در زمان واقعی (qRT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با توجه به منابع محدود اطلاعات درخصوص عوامل تنظیمی مسیر بیوستتزی تریپنوئیدها در گیاهان خانواده نعنائیان، تغییرات فراوانی نسخه‌های برخی فاکتورهای رونویسی‌های خانواده *WRKY*، *MYB*، *AP2* و *C2H2* موجود در تریکوم‌های غده‌ای نعنا فلفلی نیز مورد بررسی قرار گرفت تا با مقایسه تغییرات بیانی این عوامل رونویسی در ساعات مورد مطالعه با

متول به عنوان جزء اصلی مونوترپنی موجود در اسانس نعنا فلفلی (*Mentha piperita* L.) از اتصال واحدهای ایزوپرنی ۵ کربنه ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP) و دی متیل آلایل دی فسفات (DMAPP) حاصل می‌شود. بیوستتزی این واحدهای ایزوپرنی در این گیاه تماماً در پلاستید و از طریق مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) صورت می‌گیرد. در دسترس بودن این پیش‌سازهای ایزوپرنی که بلوک‌های ساختاری بیوستتزی انواع تریپنوئیدها را تشکیل می‌دهند، در افزایش بازده اسانس بسیار مؤثر می‌باشند. لذا هر گونه تغییر در میزان رونوشت ژن‌های مسیر بیوستتزی پیش‌سازهای ایزوپرنی، میزان بیوستتزی تریپن‌ها را تحت تأثیر قرار خواهد داد [۳-۱]. همچنین بازده اسانس تولیدی به تعداد و اندازه تریکوم‌های غده‌ای سپروار که محل اصلی بیوستتزی و ذخیره ترکیبات تریپنی می‌باشند نیز بستگی دارد [۴]. از طرف دیگر از آنجا که بیوستتزی ترکیبات واسط در مسیر بیوستتزی تریپنوئیدها در بخش‌های مختلف سلولی نظیر لوکوپلاست، شبکه آندوپلاسمی و سیتوپلاسم انجام می‌شود، لذا پروتئین‌های انتقال‌دهنده لیپید (Lipid transfer proteins) احتمالاً نقش اساسی در ترابری این ترکیبات بین اجزای مختلف سلولی و در نهایت ترشح ترکیبات تریپنوئیدی به حفره اصلی ذخیره اسانس در تریکوم‌های غده‌ای دارند [۲]. مطالعات نشان داده است فراوانی رونوشت این پروتئین‌ها در کتابخانه cDNA غده‌های تریکومی نعنا فلفلی بسیار زیاد است [۵]. داده‌های RNA-seq گیاه *M. spicata* نیز حضور چندین نسخه از ژن *LTP* را در تریکوم‌های غده‌ای تأیید کرد [۶].

علیرغم مطالعات گسترده‌ای که درخصوص شناسایی اجزاء مسیر بیوستتزی متول صورت گرفته است، چگونگی تنظیم رونویسی این مسیر بیوستتزی هنوز بخوبی مشخص نشده است. مطالعات نشان داده است که کمیت و کیفیت اسانس استحصالی تحت تأثیر محرک‌های خارجی نظیر عوامل محیطی و هورمون‌های گیاهی تغییر می‌یابد. هورمون‌های گیاهی قادرند از طریق راه‌اندازی یک شبکه تنظیمی دینامیکی فعال، بیان یک سری فعال‌کننده‌ها و بازدارنده‌های رونویسی را تحت تأثیر قرار



شده، واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر-BioRad و به صورت شیب دمایی انجام شد (شکل شماره ۱). واکنش qRT-PCR بر روی دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR System شرکت Applied Biosystem Incorporation (ABI) و با استفاده از کیت HiFi SYBR Mix Plus ساخت شرکت مینا طب انجام شد. برای آنالیز داده های به دست آمده، از روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه ($\Delta\Delta CT$) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا چرخه آستانه برای نمونه های مختلف با استفاده از ژن مرجع نرمال سازی شد و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن های هدف با استفاده از روش شرح داده شده توسط لیواک و اشمیتگن [۱۲] و نرم افزار $REST^{\circledR}$ تهیه شده توسط فافل [۱۳] محاسبه شد. در این روش، همی داده ها با ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی، نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن ها در پاسخ به محرک های مورد استفاده نسبت به شرایط کنترل سنجیده شد.

تهیه و اندازه گیری اسانس

پس از برداشت گیاهان و به منظور حفظ کمیت و کیفیت اسانس، گیاهان در سایه و در دمای محیط خشک شدند و اندازه گیری اسانس برگ و پیکره رویشی با روش تقطیر با آب بوسیله دستگاه کلونجر صورت گرفت. پس از اتمام اسانس گیری، جمع آوری اسانس از ستون کلونجر بوسیله پیست پاستور انجام شد. بازده اسانس نیز پس از آب گیری با سولفات سدیم خشک نسبت به وزن خشک گیاه محاسبه شد.

جداسازی و شناسایی ترکیبات ترپنوئیدی اسانس

پس از محاسبه میزان اسانس هر نمونه، به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه گاز کروماتوگرافی (Agilent Technologist 7890 series GC) مجهز به طیف سنج جرمی مدل 5975 (mass selective detector (MSD) series) استفاده شد. این دستگاه دارای ستونی به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت لایه فاز ساکن برابر با ۰/۲۵ میکرون می باشد. برنامه ریزی حرارتی ستون از دمای اولیه ۵۰ درجه سانتی گراد شروع شده و به تدریج با سرعت ۱۵

ژن های بالادستی مسیر بیوستزی ترپنوئیدها و همچنین محتوای ترپنوئیدهای استحصالی بتوان درک بهتری از چگونگی تنظیم مسیر MEP (به عنوان مسیر بیوستز پیش سازهای ایزوپرنوئیدی) ارائه داد.

مواد و روش ها

نشاءهای گیاه نعنا فلفلی به صورت استولن از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. هر نشاء به طول ۲۰-۱۵ سانتی متر برای کشت در گلدان در نظر گرفته شد. در هر گلدان حاوی خاک مزرعه دو نشاء سالم کاشته شد و آبیاری به صورت دو روز یکبار در شرایط یکسان در گلخانه انجام شد. دو ماه بعد از کشت استولن ها و در مرحله رویشی، محرک های اسید سالیسیلیک (حل شده در میزان مناسبی آب مقطر) در سطوح صفر و نیم میلی مولار و آبسزیک اسید (حل شده در میزان مناسبی اتانول ۷۰٪) در سطوح صفر و ۵۰ میکرومولار هر کدام به صورت جداگانه و به طور یکسان و با سه تکرار بر روی گیاهچه ها محلول پاشی شدند. گیاهان شاهد مربوط به هر تیمار نیز با حلال های ذکر شده محلول پاشی شدند. نمونه برداری از برگ های دوم تا پنجم بالای هر ساقه در ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت بعد از محلول پاشی انجام گرفت. استخراج RNA بوسیله کیت InnuPREP Plant RNA (ساخت شرکت Analytik Jena آلمان) طبق پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت. برای بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ مدل (Thermo scientific, NanoDrop,) (2000C, USA) استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت Primer Script RT Reagent (ساخت شرکت تاکارا ژاپن) صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی ژن های مسیر MEP، فاکتورهای رونویسی و پروتئین های انتقال دهنده لیپید بر اساس توالی های EST و توالی های رمزکننده پروتئین (CDS) ثبت شده در پایگاه اینترنتی www.planttrichome.org با استفاده از برنامه Primer Quest موجود در سایت IDT (Integrated DNA Technologies) طراحی شدند (جدول شماره ۱). برای اطمینان از طراحی صحیح و عملکرد اختصاصی آغازگرها و همچنین پیدا کردن بهترین دمای اتصال به cDNA سنتز

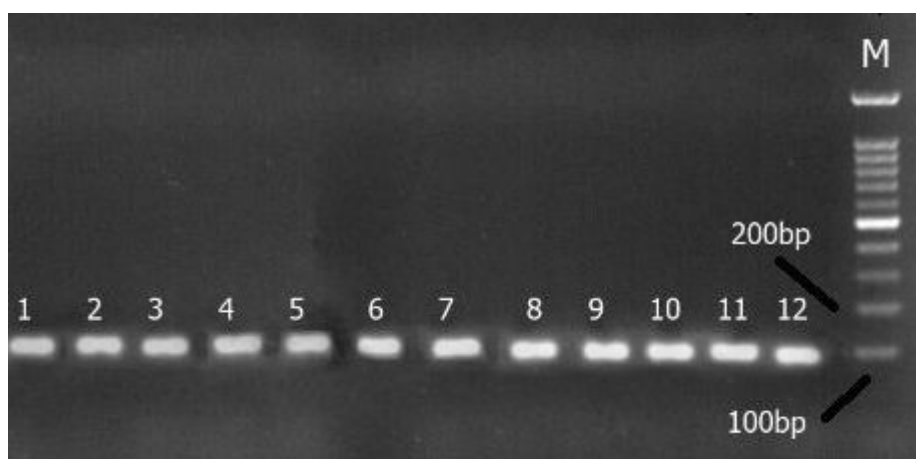


کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی انجام شد. محاسبه‌های تعیین درصد هر ترکیب به کمک نرم‌افزار دستگاه به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرائب پاسخ مربوط به طیف‌ها صورت گرفت [۱۴]. میزان ترکیبات بدست آمده به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده و آنالیز آماری آنها به روش *t*-*test* (مقایسه میزان ترکیبات موجود در اسانس با میزان متناظر آنها در نمونه شاهد) و با نرم افزار Excel انجام شد.

درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافته تا به ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۹۰ و ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود. شناسایی طیف‌ها با استفاده از شاخص‌های بازداری آنها که با تزریق هیدروکربن‌های نرمال (C₈-C₂₀) تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها و بوسیله برنامه رایانه‌ای محاسبه شدند و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیب‌های استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه ترپنوئیدها در رایانه‌ی دستگاه گاز

جدول شماره ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش qRT-PCR

ژن هدف	توالی آغازگر (5'-3')	دمای اتصال (°C)	طول قطعه تکثیر شده (bp)
<i>Act</i>	F: TCCTGAGAGGAAGTACAGTGTC R: GACGGCCAGATTCATCATA	52	108
<i>DXS</i>	F: CAAAGTTGCGATTCTGGGATTC R: TCTTGCATCGGCTACTGTTAC	55	103
<i>DXR</i>	F: CAAGGGTCTCGAAGTCATAGAAG R: GAATCCTGTGTCTCGACCATC	55	113
<i>MCT</i>	F: AGGATGGCAAGCGTATTGG R: TGCATTTCCAGAGTGTCTTC	55	121
<i>CMK</i>	F: CACCTGTACCTCGTGATCTTT R: GCAACACCAATGGATCAATGTC	55	120
<i>MDS</i>	F: TCCCGACACCAATCCTAAG R: TGGAGAATCAATGTGGCATC	55	121
<i>HDS</i>	F: CCATCAGAGGGAAGTCAACTG R: CGGATGCTCACTACCCAAAG	57	123
<i>HDR</i>	F: ATCAGAACTGGGAGATATGGG R: TCATCTAACAGGAGTCCGAATG	55	121
<i>C2H2</i>	F: AACAGAGTCGTCCGAGAAG R: GCCCTCTTCTGAACCTTAAAC	55	111
<i>WRKY</i>	F: TGGAGAAAGTATGGGCAGAAG R: TGCTCTCATCTTTTCGATAGGC	57	122
<i>MYB</i>	F: TGGACTGCTGAAGAAGATGAC R: TCTCAGTCTGCAACTCTTTCC	54	120
<i>AP2</i>	F: AGGACAAGGCTTTGGTTAGG R: GTGCTTCAGATGTGGGAAATTG	60	120
<i>LTP1</i>	F: GCTGGCTGTTGTAAGGTC R: CCTAATGGGAGGTCGAGAG	59	95
<i>LTP2</i>	F: CCAAGGCATGAGGTCTCTC R: TTGAGCAGTCTGAGAATTGAC	59	115



شکل شماره ۱- نتایج حاصل از واکنش PCR با آغازگرهای طراحی شده (ژن‌ها بترتیب از چپ به راست):

1: *DXS*, 2: *DXR*, 3: *MCT*, 4: *CMK*, 5: *MDS*, 6: *HDS*, 7: *HDR*, 8: *WRKY*, 9: *C2H2*, 10: *AP2*, 11: *LTP1*, 12: *LTP2*

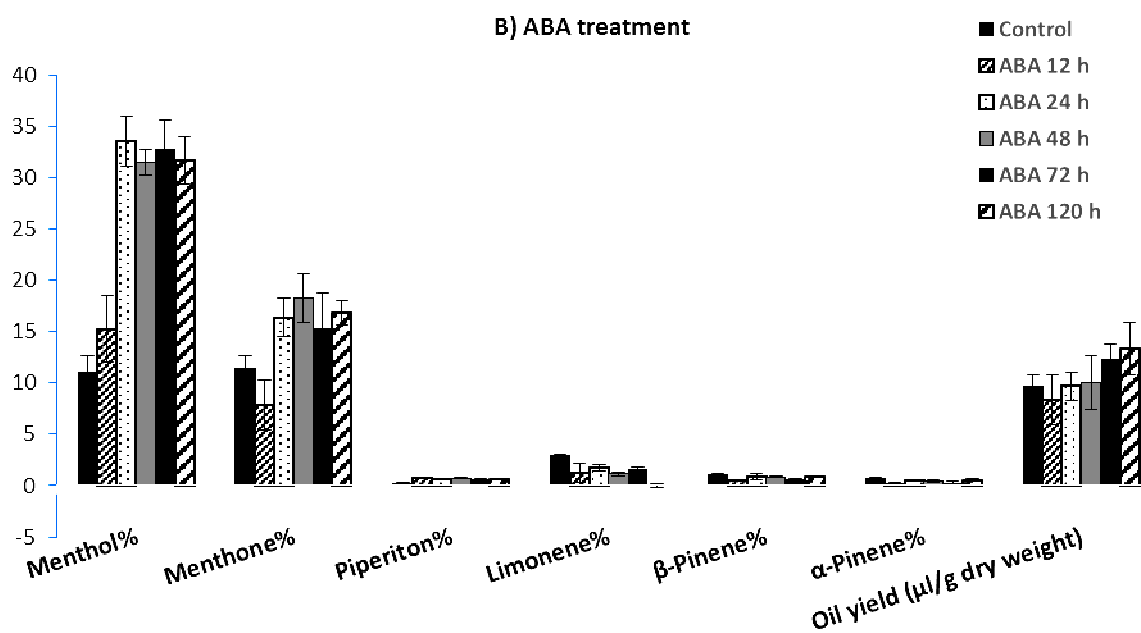
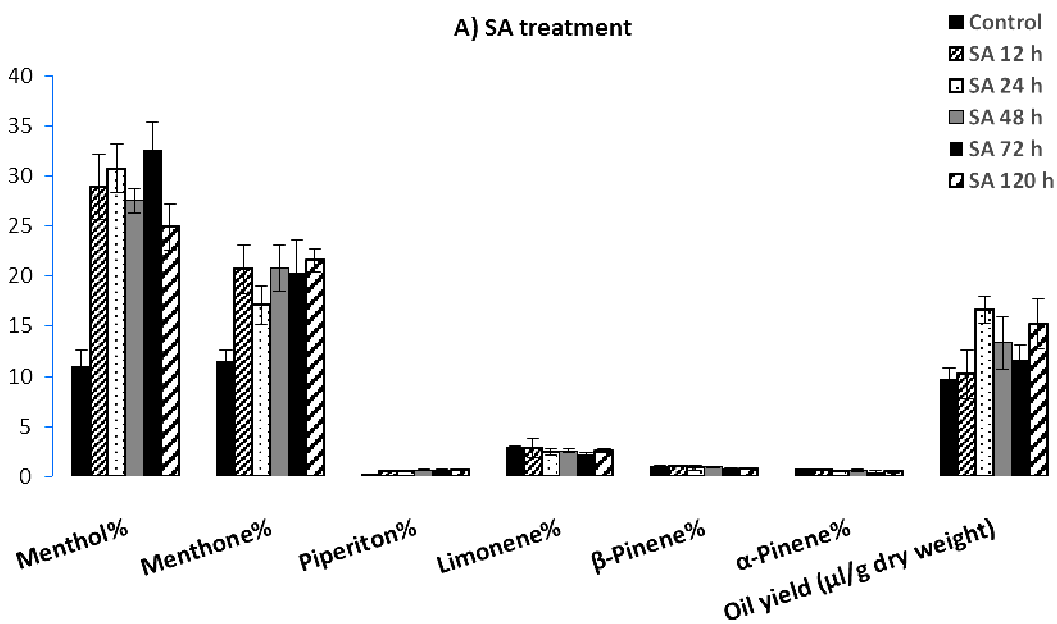
نتایج

اثر سالیسیلیک اسید و آبسزیک اسید در کمیت و کیفیت اسانس استحصالی

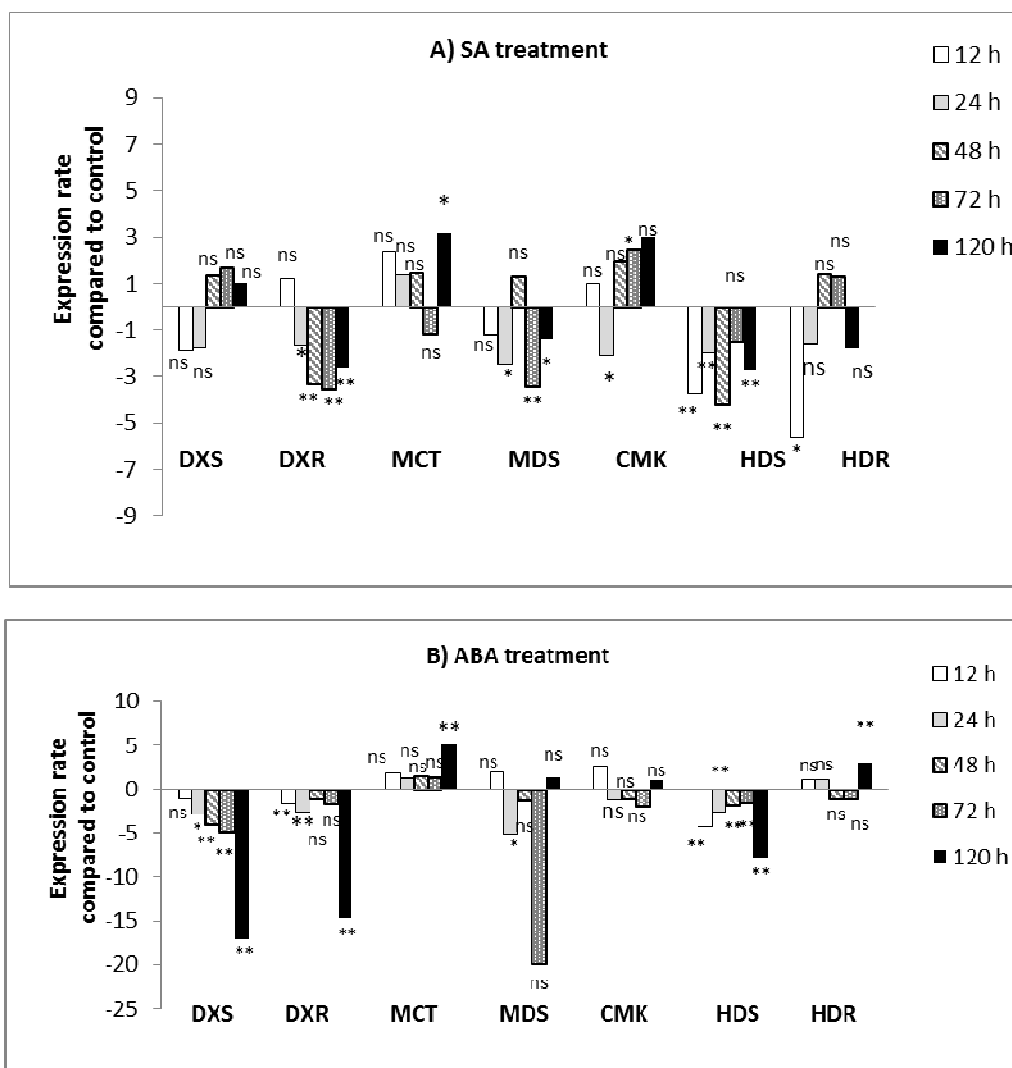
بررسی میزان رونوشت ژن‌های بالادست مسیر بیوستز ترپنوئیدها (مسیر MEP) در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید و آبسزیک اسید

به منظور بررسی اثر محرک سالیسیلیک اسید و آبسزیک اسید در تغییر سطح رونوشت ژن‌های بالادست مسیر بیوستزی ترپنوئیدها (مسیر MEP)، پاسخ دینامیکی ژن‌های مذکور طی ۱۲۰ ساعت با استفاده از تکنیک PCR در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۳). هیچ تغییر معنی‌داری در سطح رونوشت ژن *DXS* (کدکننده اولین آنزیم مسیر MEP) در ساعات مورد مطالعه تحت محرک سالیسیلیک اسید مشاهده نشد. حال آنکه در گیاهان تحت تیمار با آبسزیک اسید کاهش معنی‌داری در سطح رونوشت این ژن در طی زمان‌های اعمال تیمار مشاهده شد. به طوری که سطح mRNA این ژن در ۱۲۰ ساعت پس از اعمال تیمار به کمترین میزان خود نسبت به گیاهان شاهد رسید. روند تغییرات سطح رونوشت ژن *DXR* نیز نسبت به گیاهان شاهد متناظرش در هر دو تیمار منفی گزارش شد. تغییرات سطح رونوشت ژن *MCT* تا ۷۲ ساعت بعد از اعمال هر دو تیمار معنی‌دار نبود، حال آنکه پس از گذشت ۱۲۰ ساعت از اعمال تیمار، افزایش قابل توجهی در

جهت ارزیابی اثرات و پیامدهای تغییر میزان پیش‌سازها در تولید نهایی مونوترپن‌ها، بازده و ترکیب اسانس توسط دستگاه GC/MS در گیاهان نعنا فلفلی تحت تیمار سالیسیلیک اسید و آبسزیک اسید در طی ۱۲۰ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد (شکل شماره ۲) که بیشترین میزان تجمع اسانس در تیمارهای سالیسیلیک و آبسزیک اسید به ترتیب ۲۴ و ۱۲۰ ساعت پس از اعمال تیمار بوده است. ترکیب اجزا اسانس نیز تحت تأثیر تیمارهای فوق‌الذکر قرار گرفت. میزان متول در گیاهان تحت تیمار افزایش چشمگیری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد به گونه‌ای که به بیشینه مقدار خود در ۷۲ و ۲۴ ساعت به ترتیب در تیمارهای سالیسیلیک و آبسزیک اسید رسید (افزایش تقریباً ۳ برابری نسبت به گیاهان شاهد). حال آنکه محتوای سایر ترکیبات در اسانس نظیر α .pinene، β .pinene، limonene و piperiton در هر دو تیمار تغییر محسوسی نسبت به گیاهان شاهد نشان نداد.



شکل شماره ۲- میزان بازده و ترکیبات اصلی شناسایی شده در اسانس نعنا فلفلی در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمار سالیسیلیک (A) و آبسیزیک اسید (B) با استفاده از GC/MS.



شکل شماره ۳- میزان بیان نسبی ژن‌های *DXS*, *DXR*, *MCT*, *CMK*, *MDS*, *HDS* و *HDR* در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمار سالیسیلیک (A) و آبسیزیک اسید (B) در *M. piperita*. علائم **, *، و ns به ترتیب، معنی‌داری در سطح احتمال ۱، ۵ درصد و عدم معنی‌داری بین گیاهان شاهد و تحت تیمار را نشان می‌دهند.

HDS تحت تأثیر هر دو تیمار کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد متناظرش نشان داد. سطح رونوشت ژن *HDR* نیز تحت تأثیر هر دو تیمار نسبت به گیاهان شاهد متناظرشان نوسانات اندک و غالباً غیرمعنی‌داری را نشان داد.

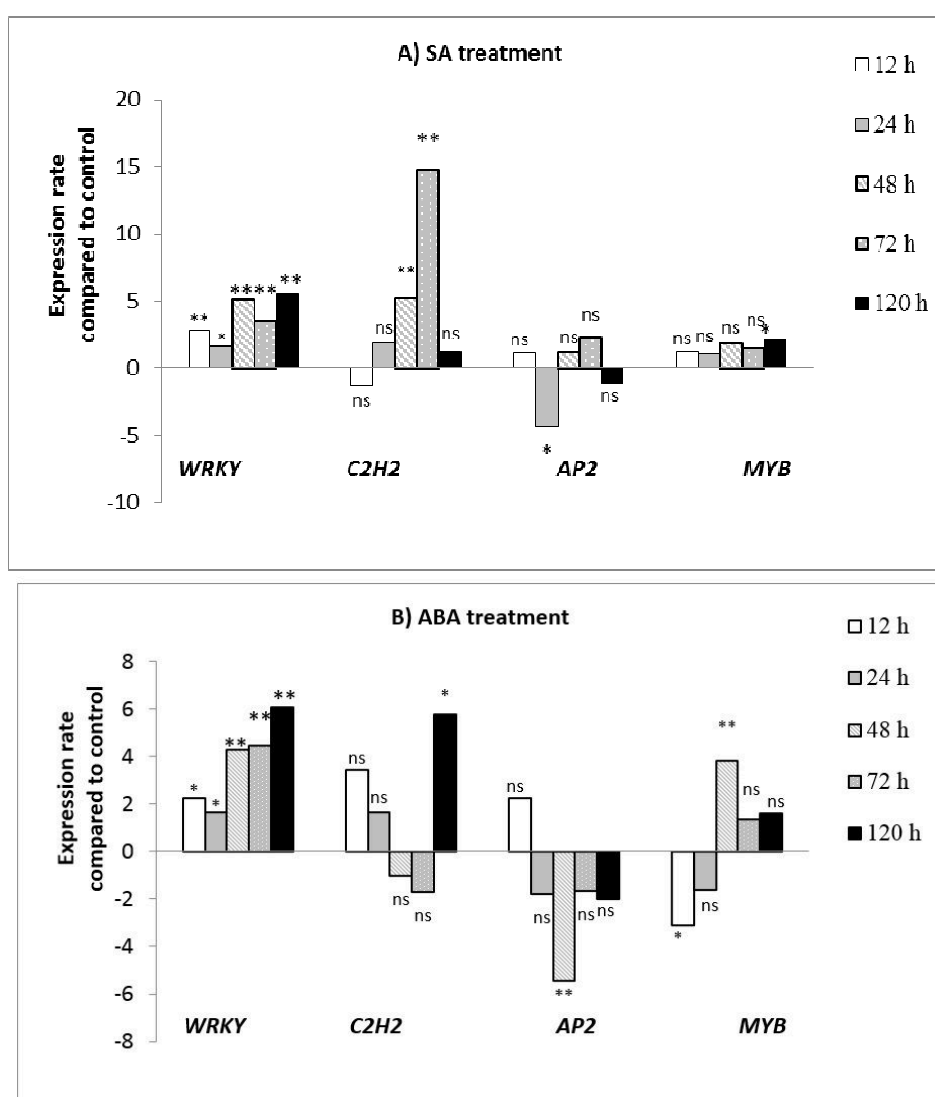
بررسی بیان برخی عوامل تنظیمی تحت محرک‌های سالیسیلیک و آبسیزیک اسید

بیان ژن *C2H2* تحت تأثیر محرک سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد متناظرش نشان داد.

میزان mRNA این ژن گزارش شد. میزان بیان ژن *CMK* تحت محرک سالیسیلیک اسید فقط در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد متناظرش نشان داد و در بقیه ساعات مورد مطالعه تغییر معنی‌داری در سطح رونوشت این ژن نسبت به گیاهان شاهد مشاهده نشد. تیمار آبسیزیک اسید نیز نتوانست تغییر معنی‌داری در میزان رونویسی این ژن نسبت به گیاهان شاهد ایجاد نماید و در تمام ساعات مورد مطالعه تغییر سطح رونوشت این ژن غیر معنی‌دار گزارش شد. بررسی میزان mRNA رونویسی شده از ژن

بعدی اعمال تیمار میزان تغییرات بیان معنی‌دار گزارش نشد. میزان رونویسی ژن *MYB* تا ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار سالیسیلیک اسید غیر معنی‌دار گزارش شد. اما یک افزایش قابل توجهی در سطح رونوشت این ژن در ۱۲۰ ساعت بعد از اعمال تیمار مشاهده شد. میزان بیان این ژن در ۱۲ ساعت اولیه اعمال تیمار آبسزیک اسید کاهش یافت آنگاه بتدریج افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود در ۴۸ ساعت رسید (شکل شماره ۴).

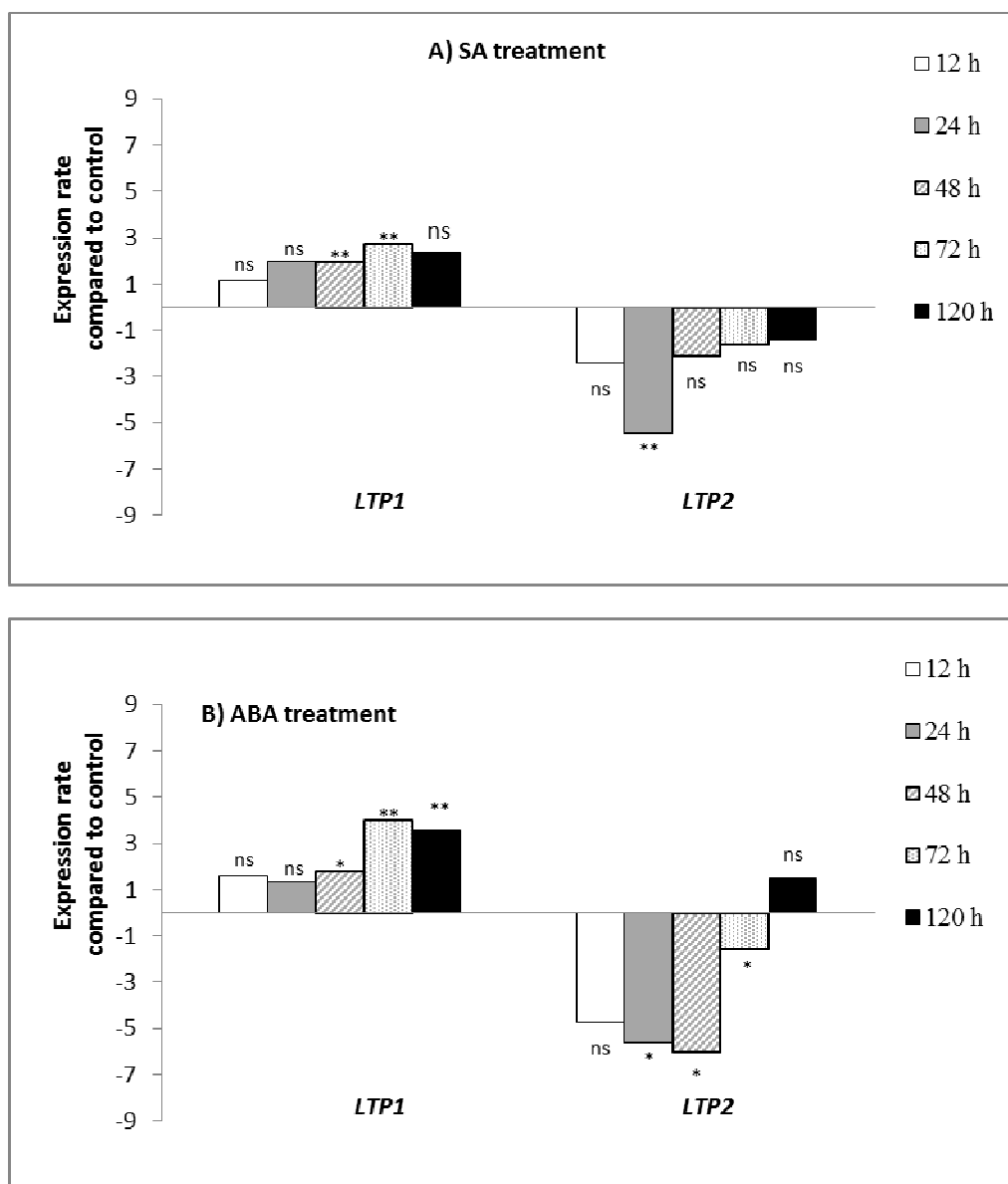
به طوری که به بیشترین مقدار خود در ۷۲ ساعت رسید. بالعکس آبسزیک اسید نتوانست بیان این ژن را در ساعات اولیه اعمال تیمار به میزان قابل توجهی تغییر دهد و افزایش بیان این ژن در ۱۲۰ ساعت بعد از اعمال تیمار گزارش شد. بررسی رونوشت ژن کدکننده فاکتور رونویسی *WRKY* نشان داد که بیان این ژن در هر دو تیمار به طور فزاینده‌ای با افزایش زمان افزایش یافته است. یک کاهش معنی‌دار در میزان بیان ژن *AP2* در ۲۴ و ۴۸ ساعت بترتیب بعد از اعمال تیمار سالیسیلیک و آبسزیک اسید مشاهده شد حال آنکه در ساعات



شکل شماره ۴- میزان بیان نسبی ژن‌های *WRKY*، *C2H2*، *MYB* و *AP2* در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمار سالیسیلیک (A) و آبسزیک اسید (B) در *M. piperita*. علائم **، * و ns به ترتیب، معنی‌داری در سطح احتمال ۰.۰۱، ۰.۰۵ درصد و عدم معنی‌داری بین گیاهان شاهد و تحت تیمار را نشان می‌دهند.

کاهش در تیمار سالیسیلیک و آبسزیک اسید به ترتیب در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها مشاهده شد و در بقیه ساعات تغییر معنی‌داری در میزان mRNA این ژن در هر دو تیمار نسبت به گیاهان شاهد متناظر گزارش نشد (شکل شماره ۵).

تغییرات بیان برخی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده لیپید در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید و آبسزیک اسید بیان ژن *LTP1* تحت تأثیر هر دو تیمار افزایش یافت و به بیشینه مقدار خود در ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار رسید. حال آنکه سطح mRNA ژن *LTP2* با گذشت زمان کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. بیشترین میزان این



شکل شماره ۵- میزان بیان نسبی ژن‌های *LTP2* و *LTP1* در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمار سالیسیلیک (A) و آبسزیک اسید (B) در *M. piperita*. علامت **, * و ns به ترتیب، معنی‌داری در سطح احتمال ۱، ۵ درصد و عدم معنی‌داری بین گیاهان شاهد و تحت تیمار را نشان می‌دهند.



بحث

با وجود مطالعات گسترده‌ای که درخصوص شناسایی اجزای مسیر بیوستتزی ترپن‌ها در گیاه نعنا فلفلی صورت گرفته است، تنظیم رونویسی این ترکیبات به خوبی مطالعه نشده است [۲۰]. در مطالعه اخیر الگوی تغییرات بیان ژن‌های مربوط به عوامل تنظیمی در پاسخ به هر دو تیمار تقریباً مشابه گزارش شد. نتایج نشان داد که هر دو تیمار در القاء بیان ژن *AP2* ناکارآمد هستند. از سوی دیگر به موازات عدم پاسخ مثبت ژن *AP2* به تیمار سالیسیلات و آبسیزیک اسید، این تیمارها نتوانستند نقش مؤثری در القاء بیان ژن‌های مسیر *MEP* داشته باشد و این موضوع نشان می‌دهد که احتمالاً این فاکتور رونویسی یکی از عوامل کلیدی تنظیم مسیر *MEP* باشد. یو و همکاران [۲۱] نیز نشان دادند با افزایش سطح بیان ژن‌های مربوط به دو فاکتور رونویسی خانواده *AP2* در گیاه آرتمیزیایا، سطح رونوشت ژن‌های مسیر بیوستتزی آرتمیزینین و محتوای این ترکیب سزکوئی‌ترپنی افزایش چشمگیری نشان داد. مطالعه ناحیه پروموتوری ژن منتسب به خانواده *AP2* در *Catharanthus roseus* یک منطقه ۷۴ جفت بازی موسوم به عنصر پاسخ‌دهنده به جاسمونات را مشخص کرد [۲۲]. لذا کاهش بیان این ژن در مطالعه اخیر می‌تواند ناشی از اثر بازدارندگی دو تیمار در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به جاسمونات باشد. از سوی دیگر مطالعه هم‌زمان تغییرات بیانی ژن‌های مسیر بیوستتزی *MEP* و ژن منتسب به خانواده *C2H2* در این مطالعه نقش تنظیم‌کنندگی منفی این فاکتور رونویسی را در بیوستتزی پیش‌سازهای ایزوپرنی قوت بخشید. در مطالعات قبلی نیز اثر بازدارندگی این فاکتور تنظیمی در فعالیت پروموتوری ژن‌های مسیر *TIA* در *Catharanthus* محرز شده بود [۲۳]. همچنین اثر تقویت‌کنندگی فاکتور *WRKY* در میزان بیان *C2H2* و نقش مانع‌شوندگی آن در میزان رونویسی از ژن منتسب به خانواده *AP2* کاملاً مشهود است. به گونه‌ای که افزایش میزان نسخه‌های ژن *WRKY* در ساعات اولیه اعمال تیمار منجر به افزایش بازده رونویسی ژن *C2H2* و بالعکس افت میزان رونوشت ژن *AP2* در هر دو تیمار شده است که با مطالعات سوتیاننا و همکاران [۲۴] در شناسایی عوامل تنظیمی مسیر بیوستتزی *TIA* در *Catharanthus roseus* مطابقت دارد.

در تحقیق کنونی هر چند که سطح رونوشت برخی ژن‌ها در پاسخ به هر دو تیمار افزایش یافت اما این تیمارها به طور کارآمدی نتوانستند در القاء بیان اکثر ژن‌های مسیر *MEP* مؤثر باشند. از آنجا که هورمون‌های گیاهی به طور مؤثری بیوستتزی سایر هورمون‌ها و مسیر انتقال سیگنالی آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۱۵]، چنین تصور می‌شود در گیاه نعنا فلفلی نیز کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید و آبسیزیک اسید مسیر سیگنالینگ سایر هورمون‌های گیاهی را تحت‌الشعاع خود قرار داده است. رابطه آنتاگونیستی بین سیگنالینگ سالیسیلات و جاسمونات در گیاهان متفاوت گزارش شده است. داده‌های RNA-seq گیاه *Salvia miltiorhiza* حاکی از کاهش بیان ژن‌های مسیر بیوستتزی جاسمونات در حضور سالیسیلات می‌باشد [۱۶]. از سوی دیگر مطالعات کینت و همکاران [۱۷] نیز نشان داد که کاربرد خارجی آبسیزیک اسید سبب کاهش میزان جاسمونات داخل سلولی در برنج می‌شود. به عبارت دیگر سالیسیلات و آبسیزیک اسید از طریق کاهش بیان ژن‌های مسیر بیوستتزی جاسمونات، مسیر سیگنالی آن را بلوکه کرده و مانع از بیان فاکتور *MYC2* می‌شوند. در مسیر سیگنالی جاسمونات، *MYC2* به عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت اصلی به عناصر *Cis-element* ژن‌های پاسخ‌دهنده به جاسمونات متصل می‌شود و سبب القاء بیان فاکتورهای تنظیمی پایین‌دست و تنظیم ژن‌های ساختاری مسیر بیوستتزی متابولیت‌های ثانویه می‌شود [۱۸]. از سوی دیگر مشخص شده است که در مسیر سیگنالینگ سالیسیلات، *At WRKY70* به عنوان یک فاکتور تنظیمی در پایین‌دست عنصر *NPR1*، بازدارنده ژن‌های القاء شده توسط جاسمونات می‌باشد [۱۹]. در تحقیق کنونی سطح بیان فاکتور منتسب به *WRKY* در تمام ساعات مورد مطالعه پس از اعمال تیمار سالیسیلات افزایش چشمگیری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. به این ترتیب احتمال می‌رود در مسیر سیگنالینگ سالیسیلات، بیان فاکتور منتسب به خانواده *WRKY* مانع رونویسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به جاسمونات شده و به این ترتیب نقش این مولکول سیگنالی را در تقویت رونویسی ژن‌های مسیر بیوستتزی پیش‌سازهای ایزوپرنی کاهش داده است.



مؤثر باشد. هر چند که پاسخ متفاوت ژن‌های کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده لیپید تحت تیمارهای فوق‌الذکر می‌تواند ناشی از عملکرد متفاوت این پروتئین‌ها در جایگاه‌های متفاوت سلولی باشد. به گونه‌ای که پروتئین انتقال‌دهنده لیپید نوع یک در پاسخ به هر دو تیمار القاء شد حال آنکه نوع دو پاسخ مثبتی به تیمارها نشان نداد. کیم و همکاران [۳۱] نیز با مطالعه کلاس‌های متفاوت پروتئین‌های انتقال‌دهنده لیپید نشان دادند که برخی از آنها به دلیل دخالت در پاسخ‌های دفاعی، تحت تیمار سالیسیلیک اسید القا شدند. در حالی که برخی انواع دیگر تغییر بیان محسوسی را نشان ندادند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد علیرغم افزایش کمی و کیفی اسانس، بازده رونویسی ژن‌های مسیر MEP به واسطه تیمارهای سالیسیلیک اسید و آبسیزیک اسید تقویت نشده است. به نظر می‌رسد این تیمارها از طریق مکانیسم‌های دیگری بازده اسانس و محتوای منتول را تحت تأثیر قرار داده‌اند. از سوی دیگر به واسطه القاء بیان ژن کدکننده پروتئین انتقال‌دهنده لیپید در پاسخ به تیمارهای فوق‌الذکر می‌توان انتظار داشت این پروتئین از طریق ترابری و ترشح ترپنوئیدها می‌تواند نقش مؤثری در افزایش بازده اسانس داشته‌اند. علاوه بر این تقویت بیان دو فاکتور تنظیمی مؤثر در تشکیل تریکوم (*C2H2* و *MYB*) در پاسخ به هر دو تیمار هورمونی می‌تواند در تقویت شکل‌گیری و نمو تریکوم‌های غده‌ای که محل اصلی انباشت اسانس نعنا فلفلی هستند، مؤثر باشد. مطالعه سطح رونوشت فاکتورهای رونویسی نیز تا حدودی اثر این دو هورمون گیاهی را در تنظیم بیان ژن‌های مؤثر در بیوسنتز پیش‌سازهای ایزورنی روشن کرد. هر چند که دستیابی به عملکرد دقیق این عوامل تنظیمی در کنترل بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها در راستای بهبود خواص دارویی این گیاه نیاز به مطالعات تکمیلی‌تر دارد.

علیرغم عدم پاسخ مثبت ژن‌های مسیر بیوسنتزی پیش‌سازهای ایزورنی به تیمار سالیسیلات و آبسیزیک اسید، بازده اسانس و محتوای منتول به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته بود. بنظر می‌رسد این دو تیمار از طریق مکانیسم‌(های) دیگری در بهبود کمیت و کیفیت اسانس استحصالی مشارکت دارد. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد کاربرد خارجی آبسیزیک و سالیسیلات در القاء تولید تریکوم‌های غده‌ای در گیاه آرتیمیزیا نقش اساسی دارد [۲۵]. همچنین به نقش فاکتورهای تنظیمی MYB و C2H2 به عنوان عوامل فعال‌کننده القا تریکوم نیز اشاره شده است [۲۶]. در تحقیق کنونی نیز تقویت بیان این عوامل تنظیمی در پاسخ به هر دو تیمار گزارش شد. از آنجا که افزایش تراکم و اندازه تریکوم‌های غده‌ای بازده اسانس را بشدت تحت تأثیر قرار می‌دهد لذا احتمال می‌رود این دو تیمار به واسطه سهم مثبتی که در القاء تریکوم‌های غده‌ای دارند توانسته‌اند بازده اسانس و محتوای منتول را افزایش دهند. از سوی دیگر سالیسیلات قادر است به واسطه اتصال به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی آنها را غیر فعال کرده و بدین ترتیب سبب افزایش تدریجی تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر (ROS) نظیر H_2O_2 شود. این ترکیبات به عنوان پیامبر ثانویه در القاء بیان ژن‌های دفاعی و مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) نقش ایفاء می‌کنند [۲۷]. مشخص شده است که اجزای سیگنالی ROS در فعال‌سازی آنزیم‌های بیوسنتز کننده مونوترپنوئیدها مؤثر می‌باشند [۲۸]. گزارشاتی نیز مبنی بر نقش ترکیبات ROS در افزایش محتوای آرتیمیزین بدون تغییرات اساسی در افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی وجود دارد [۳۰، ۲۹]. در مطالعه اخیر نیز افزایش بازده اسانس و محتوای منتول در پاسخ به تیمار سالیسیلات علیرغم تغییرات جزئی در بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز پیش‌سازهای ایزورنی قابل توجه است. از سوی دیگر احتمال می‌رود این دو تیمار از طریق تحت تأثیر قرار دادن بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده لیپید، بازده انتقال اسانس تولید شده از سلول‌های ترشحی به منبع ذخیره اصلی اسانس در تریکوم‌های غده‌ای را افزایش داده و به این ترتیب توانسته‌اند در افزایش بازده اسانس



1. Lawrence BM. Monoterpene interrelationships in the *Mentha* genus: a biosynthetic discussion. In: Mookherjee BD, Mussinan CJ (eds) Essential oils. Allured, Wheaton, IL, 1981, pp: 1–81.
2. Lange BM, Wildung MR, Stauber EJ, Sanchez C, Pouchnik D and Croteau R. Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97: 2934–2939.
3. McCaskill D and Croteau R. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta.* 1995; 197: 49–56.
4. Turner GW, Gershenzon J and Croteau RB. Distribution of Peltate Glandular Trichomes on Developing Leaves of Peppermint. *Plant Physiol.* 2000; 124 (2): 655-64.
5. Kader, JC. Lipid-transfer proteins: A puzzling family of plant proteins. *Trends Plant Sci.* 1997; 2: 66-70.
6. Jin J, Panicker D, Wang Q, Kim M.J, Liu J, Yin J.L, Wong L, Jang I.C, Chua N.H. and Sarojam R. Next generation sequencing unravels the biosynthetic ability of Spearmint (*Mentha spicata*) peltate glandular trichomes through comparative transcriptomics. *BMC Plant Biol.* 2013; 14: 292.
7. Patra B, Schluttenhofer C, Wu Y, Pattanaik S and Yuan L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1829 (11): 1236-1247.
8. Nazar R, Umar S and Khan NA. Exogenous salicylic acid improves photosynthesis and growth through increase in ascorbate-glutathione metabolism and S assimilation in mustard under salt stress. *Plant Signal. Behav.* 2015; 10: e1003751.
9. Canet JV, Dobon A, Roig A and Tornero P. Structure-function analysis of npr1 alleles in *Arabidopsis* reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid. *Plant Cell Environ.* 2010; 33: 1911–1922.
10. Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR and Abrams S.R. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010; 61: 651–679.
11. Akagi T, Katayama-Ikegami A, Kobayashi S, Sato A, Kono A and Yonemori K. Seasonal abscisic acid signal and a basic leucine zipper transcription factor, DkbZIP5, regulate proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit. *Plant Physiol.* 2012; 158: 1089–1102.
12. Livak KJ and Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
13. Pfaffl, M. A new mathematical for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: e45.
14. Adam RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry, 4th Edition. Allured Publ., Carol Stream, IL. 2007, pp: 1-50.
15. Yang YX, Ahammed GJ, Wu C, Fan SY and Zhou YH. Crosstalk among Jasmonate, Salicylate and Ethylene Signaling Pathways in Plant Disease and Immune Responses. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2015; 16: 450–461.
16. Zhang X, Dong J, Liu H, Wang J, Qi Y and Liang Z. Transcriptome Sequencing in Response to Salicylic Acid in *Salvia miltiorrhiza*. *PLoS One.* 2016; 11 (1): e0147849.
17. Kyndt T, Nahar K, Haeck A, Verbeek R, Demeestere K and Gheysen G. Interplay between Carotenoids, Abscisic Acid and Jasmonate Guides the Compatible Rice-*Meloidogyne graminicola* Interaction. *Front Plant Sci.* 2017; 8: 951.
18. Todd AT, Liu E, Polvi SL, Pammett RT and Page J.E. A functional genomics screen identifies



diverse transcription factors that regulate alkaloid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 2010; 62: 589–600

19. Li J, Brader G and Palva ET. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell.* 2004; 16: 319–331.

20. Wu S, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R and Chappell J. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24: 1441–1447.

21. Yu ZX, Li JX, Yang CQ, Hu WL, Wang LJ and Chen XY. The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Mol. Plant.* 2012; 5: 353–365.

22. VomEndt D, Soares e, Silva M, Kijne JW, Pasquali G and Memelink J. Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-Hook DNA-binding proteins. *Plant Physiol.* 2007; 144: 1680–1689.

23. Ouwkerk P.B.F, Trimborn T.O, Hilliou F and Memelink J. Nuclear factors GT-1 and 3AF1 interact with multiple sequences within the promoter of the *Tdc* gene from Madagascar periwinkle: GT-1 is involved in UV light-induced expression. *Mol. Gen. Genet. (MGG)*, 1999; 261: 610–622.

24. Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, Patra B, Singh SK and Yuan L. The transcription factor *CtWRKY1* positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus*

roseus. *Plant Physiol.* 2011; 157: 2081–2093.

25. Pulice G, Pelaz S and Matías-Hernández L. Molecular Farming in *Artemisia annua*, Promising Approach to Improve Anti-malarial Drug Production. *Front Plant Sci.* 2016; 7: 329.

26. Matias-Hernandez L, Aguilar-jaramillo AE, Cigliano RA, Sanseverino W and Pelaz S. Flowering and trichome development share hormonal and transcription factor regulation. *J. Exp. Bot.* 2016; 67: 1209-1219.

27. Dempsey DMA and Klessig DF. Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends Cell Biol.* 1994; 4: 334-338.

28. Zhao J, Matsunaga Y, Fujita K, Sakai K. Signal transduction and metabolic flux of β -thujaplicin and monoterpene biosynthesis in elicited *Cupressus lusitanica* cell cultures. *Metab. Eng.* 2006; 8: 14-29.

29. Mannan A, Liu CZ, Arsenault PR, Towler MJ, Vail DR, Lorence A and Weathers PJ. DMSO triggers the generation of ROS leading to an increase in artemisinin and dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* shoot cultures. *Plant Cell Rep.* 2010; 29: 143–152.

30. Zare Mehrjerdi M, Bihanta M.R, Omid M, Naghavi M.R, Soltanloo H & Ranjbar M. Effects of exogenous methyl jasmonate and 2-isopentenyladenine on artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua*, *TURK. J. Bot.* 2013; 37: 499-505.

31. Kim TH, Kim MC, Park JH, Han SS, Kim, BR, Moon BY, Cho SH. Differential expression of rice lipid transfer protein gene (LTP) classes in response to abscisic acid, salt, salicylic acid, and the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *J. Plant Biol.* 2006; 49 (5): 371-375.

