Plant Prod., 2023, 45(4), 463-474
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/PPD.2022.39743.2007
Received: 13 January 2022
Accepted: 3 December 2022

Plant Productions
Research Article

Expression Analysis of the Key Genes Involved in Biosynthesis Pathway of Major Component of *Ziziphora persica Bunge* Essential Oil under Drought Stress

Mozhdeh Jalilifar[1], Khosro Mehdikhanlou[2], Lila Nejadsadeghi[3]*, Qing-Yan Shu[4]

1-PhD Student in Production Engineering and Plant Genetics, Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2-Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Key Laboratory of Plant Resources/Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Citation: Jalilifar, M., Mehdikhanlou, Kh., Nejadsadeghi, L., & Qing-Yan, Sh. (2022). Expression Analysis of the Key Genes Involved in Biosynthesis Pathway of Major Component of Ziziphora persica Bunge Essential Oil under Drought Stress. *Plant Productions,* 45(4), 463-474.

Abstract

Introduction

Iranian Kakoti (*Ziziphora persica* Bunge) which belongs to the mint genus is widely distributed in Iran. In some parts of Iran, it is used as a spice and condiment in food. Iranian Kakoti is also a medicinal plant with antioxidant and antimicrobial properties. Iranian Kakoti is used in traditional medicine as a stomach disinfectant and cold remedy. Since the effect of stresses on the increase of secondary metabolites of plants has been proven, the aim of this study was to investigate the effect of drought stress on the secondary metabolites of Iranian Kakoti in comparison with normal conditions by assessment of the expression of genes which are related to the most important secondary metabolites of the studied plant. In previous studies, it was found that pulegone has the largest share among the metabolites produced in this plant.

* **Corresponding Author:** Lila Nejadsadeghi
E-mail: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Materials and Methods

Using the KEGG database, the metabolic pathway and genes involved in the production of the pulegone include the four key genes Isopiperitenol dehydrogenase, Limonene synthase, limonene hydroxylase and Isopiperitenone reductase were identified. Due to the lack of genomic information of Iranian Kakoti, the sequence of the four studied genes was predicted by the sequences of these genes in families close to this plant. The predicted sequences were used for primer design. The plants were cultivated under drought stress and normal conditions. The stress condition was achieved by reaching 30% Field Capacity. After observing phenotypic changes due to stress, the amount of proline and also Leaf relative water content (RWC) measured for the plants in both control and stress condition to confirm the accruing of the stress. Then leaf samples were collected. RNA extraction and cDNA synthesis were performed according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of the obtained RNA were evaluated by Nanodrop and gel electrophoresis. The qualified RNA samples were used for cDNA synthesis according to the manufacturer's protocols. Then the comparing the genes expression under drought stress with the control sample was performed.

Results and Discussion

In response to drought stress, leaf RWC was decreased to 31% in the plants under stress condition and proline levels increased by 1.9-fold compared to control value. Analysis of real-time PCR data showed that. The expressions of limonene synthase, limonene hydroxylase, Isopiperitenon dehydrogenase, Isopiperitenon reductase were increased 115, 400, 50 and 120 folds compared to control respectively.

Conclusion

The measurement of leaf RWC and proline were found to be beneficial methods to detection of incidence of drought stress in plant. The expression of genes involved in pulegone synthesis compared to the control plants changes with drought stress. The implement of drought stress is a useful method to increase essential oil in Iranian Kakoti.

Keywords: Gene expression, Real time-PCR, Proline, Plant molecular response

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۱، ۴۵(۴)، ۴۶۳-۴۷۴
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/PPD.2022.39743.2007
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۲

تولیدات گیاهی

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز پولگن در گیاه کاکوتی ایرانی (*Ziziphora persica Bunge*) تحت تنش خشکی

مژده جلیلی‌فر[۱]، خسرو مهدی خانلو[۲]، لیلا نژاد صادقی[۳]*، کینگیان شو[۴]

۱- دانشجوی دکترا مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۴- آزمایشگاه مرکزی منابع گیاهی انجمن باغبانی، اکادمی علوم چین، پکن، چین

چکیده

امروزه مبحث گیاهان دارویی و متابولیت‌های ثانویه به‌طور قابل توجهی مورد استقبال پژوهشگران قرار گرفته است. کاکوتی ایرانی (*Ziziphora persica Bunge*) از جمله گیاهان دارویی مطرح متعلق به خانواده lamiaceae می‌باشد که دارای اسانسی با ماده مؤثره پولگن (pulegone) فراوان است. خشکی یکی از عوامل محدودکننده رشد در سرتاسر جهان و شایع‌ترین تنش محیطی می‌باشد و یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصولات کشاورزی در سراسر دنیاست. مطالعات انجام‌شده بیانگر وجود تأثیر عمده این تنش بر میزان رشد، مواد مؤثره و هم‌چنین تاثیر قابل توجه بر میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز ماده مؤثره گیاهان می‌باشد. این مطالعه برای ارزیابی اثر احتمالی تنش خشکی بر ماده مؤثره پولگن در کاکوتی ایرانی انجام گرفت. از آنجایی که تحمل به خشکی یک صفت ساده ژنتیکی نبوده بلکه صفتی کمی و پیچیده با جنبه‌های مختلف می‌باشد، به منظور بررسی اثر تنش خشکی (۳۰ درصد ظرفیت مزرعه) میزان پرولین و محتوای نسبی آب در شرایط تنش با شرایط کنترل مقایسه گردید. نتایج نشان داد سطح انباشت پرولین در شرایط تنش نسبت به شرایط کنترل به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که نشان از فعال شدن مکانیسم‌های تحمل در گیاه دارد. در این پژوهش اثر کمبود آب (۳۰ درصد ظرفیت مزرعه) بر میزان بیان ۴ ژن دخیل در مسیر بیوسنتز پولگن مورد مطالعه قرار گرفت. افزایش سطوح بیان ژن‌های لیمونن سنتتاز، لیمونن هیدروکسیلاز، ایزوپیپریتنول دهیدروژناز و ایزوپیپریتنول ریداکتاز نشان داد که تنش خشکی باعث ایجاد فرآیند مولکولی شده که منتج به پاسخ‌دهی گیاه با تغییر بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز ماده مؤثره پولگن می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، پاسخ مولکولی گیاهان، پرولین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

* **نویسنده مسئول:** لیلا نژاد صادقی
رایانامه: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقدمه

تیره نعناعیان (lamiaceae) یکی از بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهی است که تنوع زیادی در منطقه مدیترانه دارد (Zargari, 1990). این تیره در ایران ۴۶ جنس و ۴۱۰ گونه و زیرگونه دارد که *Ziziphora* یکی از جنس‌های ارزشمند این تیره است. این جنس با نام عمومی کاکوتی شامل گونه‌های علفی یکساله و چندساله است (Rechinger, 1982). *Z. persica* یا کاکوتی ایرانی یکی از گونه‌های مهم این جنس است که بر پایه برخی منابع، انحصاری ایران بوده و تحقیقات اخیر نشان از ارزش دارویی بالای آن دارد (Mozaffarian, 1996). کاکوتی ایرانی می‌تواند از رشد طیفی گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی جلوگیری کرده و هم‌چنین در کاهش تب، تقویت قلب و گوارش، درمان اسهال خونی، رفع نفخ و در درمان سرطان معده بسیار مؤثر است(Ozturk and Ercisli, 2006, Chitsaz et al., 2007). پژوهشگران طی مطالعات متعددی اسانس استحصالی از گونه کاکوتی ایرانی را مورد ارزیابی قرار دادند و مشخص شد که پولگن ماده اصلی اسانس بوده است (Negueruela and Mata, 1986). پولگن یک مونوترپن حلقوی با بویی مطبوع است (Zendehdel and Babapour, 2010). مسیر متابولیکی پولگن بیوسنتز اسکلتی ترپنوییدها (Terpenoid back bone biosynthesis) می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود ژن‌های درگیر در این مسیر لیمونن سنتتاز، لیمونن هیدروکسیلاز، ایزوپیپریتنول دهیدروژناز و ایزوپیپریتنول ریداکتاز می‌باشند (Duru et al., 2004).

اگرچه نوع متابولیت‌های ثانویه تولیدی در گیاهان دارویی و معطر به طور معمول تحت تأثیر ژنوتیپ آن‌ها می‌باشند ولی بیوسنتز این ترکیبات به شدت تحت تأثیر فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرد به‌طوری‌که تنش‌های زیستی و غیر زیستی، پارامترهای رشد، میزان اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Omidbaigi, 2008).

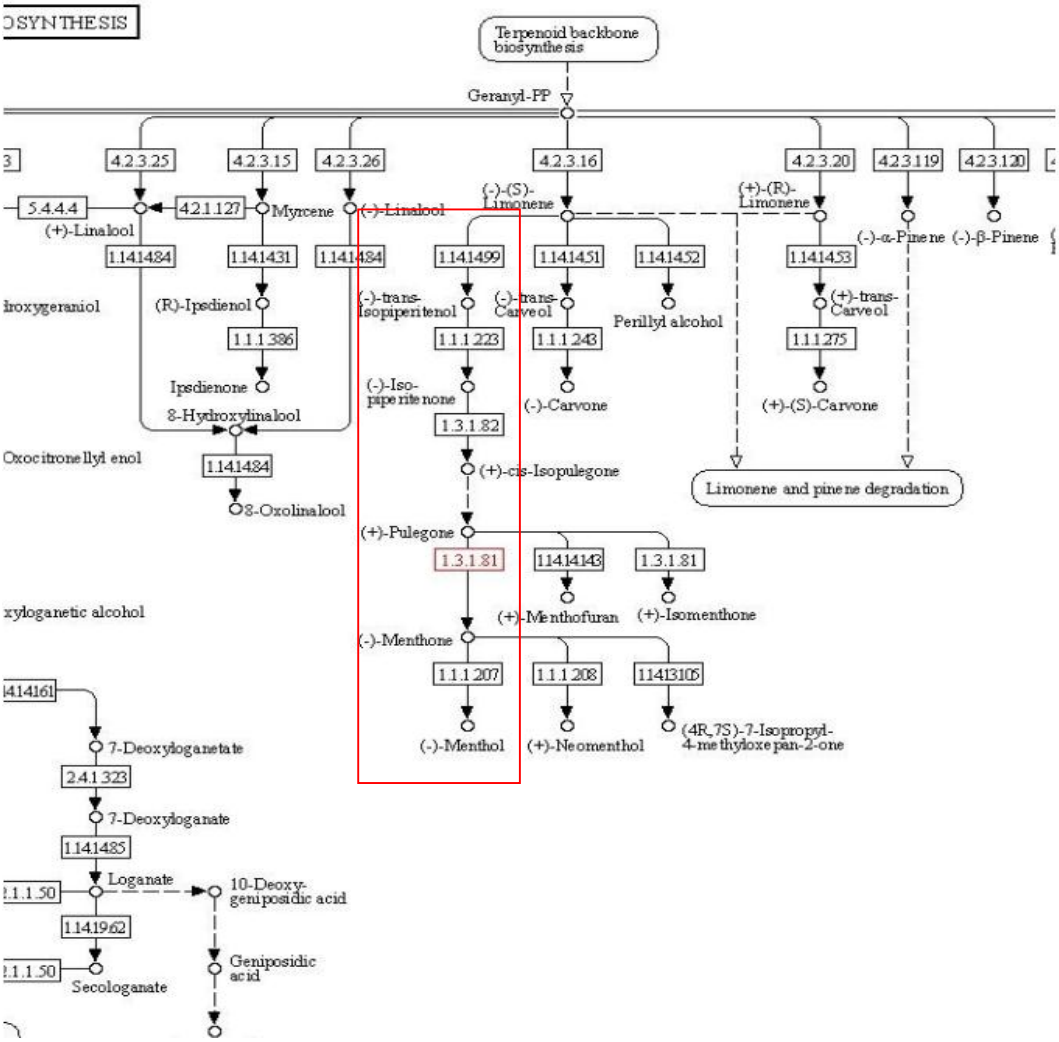


Figure 1. Pulegone biosynthesis pathway

در میان تنش‌های غیرزیستی، تنش خشکی از مهم‌ترین تنش‌ها می‌باشد که به‌طور دوره‌ای در بعضی از مراحل رشد یا به‌طور دائمی در تمامی مراحل رشد گیاه اتفاق افتاده، رشد و تولید گیاهان را محدود می‌کند (Khorasaninejad et al., 2011). با وجود این که تنش خشکی عموماً به‌عنوان یک فاکتور منفی عامل کاهش شدید محصولات کشاورزی می‌باشد در گیاهان دارویی و ادویه‌ای وضعیت متفاوت می‌باشد. در این گیاهان تنش خشکی می‌تواند موجب افزایش غلظت انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه و در نتیجه افزایش کیفیت این محصولات شود (Kleinwachter et al., 2015) و در مواردی نیز باعث کاهش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Khorasaninejad et al., 2011).

Mirzaei et al. (2019) در پژوهشی نشان دادند که تنش کم آبی باعث افزایش بیان ژن‌های TPS2 و HMGR شده که در نهایت باعث تولید بیشتر مونوترپن‌ها گردید. بنابراین هدف از انجام این پژوهش مطالعه تأثیر تنش خشکی بر میزان بیان ژن‌های لیمونن سنتتاز، لیمونن هیدروکسیلاز، ایزوپیپریتنول دهیدروژناز و ایزوپیپریتنول ریداکتاز در مسیر بیوسنتز پولگن در شرایط بدون تنش و تنش خشکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار

به منظور بررسی تأثیر تنش خشکی بر بیان ژن‌های لیمونن سنتتاز، لیمونن هیدروکسیلاز، ایزوپیپریتنول دهیدروژناز و ایزوپیپریتنول ریداکتاز در گیاه کاکوتی ایرانی، آزمایشی تحت شرایط کنترل‌شده به‌صورت گلدانی در سال ۱۳۹۹ در گلخانه تحقیقاتی اصفهان و گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز اجرا شد. بذر گیاه کاکوتی ایرانی در شرایط دمایی ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد درون گلدان‌های پلاستیکی کوچک به‌صورت جداگانه کشت شدند.خاک مورد نظر بر اساس تحقیقات قبلی لومی- شنی (sandy-loam) بود. از نور مستقیم به مدت ۱۰ ساعت در روز استفاده شد. با توجه به این نکته که رشد گیاه دارویی کاکوتی ایرانی بسیار کم است، پس از آمادهسازی گلدان‌ها، تا رسیدن به مرحله ۸-۶ برگی و رشد کافی بوته‌ها، به‌طور یکسان آبیاری شدند و در این مرحله به بعد به دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها، به منظور اعمال تنش خشکی، (FC ظرفیت زراعی) خاک مدنظر با استفاده از دستگاه محفظه فشار (Pressure chamber) در آزمایشگاه خاک‌شناسی گروه خاک‌شناسی دانشکده کشاورزی تعیین شد که برابر با ۲۵ درصد بود. سپس بر مبنای ظرفیت زراعی خاک، تنش خشکی با ۳۰ و ۱۰۰ (کنترل) درصد ظرفیت زراعی روی گلدان‌ها اعمال شد (نصف گلدان‌ها در معرض تنش کم آبی در حد ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه قرار گرفتند) پس از آن نمونه‌برداری از برگ گیاهان به‌صورت تصادفی صورت پذیرفت و به سرعت به نیتروژن مایع منتقل و جهت نگهداری طولانی مدت در دمای ۸۰- ذخیره گردید. کیفیت اعمال تنش با اندازه‌گیری پرولین برگ و محتوی نسبی آب سنجش شد. سنجش میزان پرولین با استفاده از روش Bates (1973) و هم‌چنین محتوی نسبی آب با استفاده از روش Sanchez (1998) از طریق فرمول زیر تعیین شد.

$$RWC = (WF-Wd)/(Wt-Wd)\times 100$$

WF= وزن تر برگ
Wt= وزن بافت آماس یافته گیاه
Wd= وزن خشک برگ

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از اندام برگ گیاهچه‌های تحت تیمار و نرمال در دو تکرار بیولوژیک به‌صورت تازه مطابق با روش (Christou et al., 2014). با تغییرات جزئی، انجام شد. جهت تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراجی از دو روش الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و نانودراپ استفاده شد. قبل ازسنتز cDNA نمونه‌ها با آنزیم DNase تیمار شدند تا از عدم وجود هرگونه آلودگی از نوع DNAاطمینان حاصل گردد. ساخت cDNA طبق دستورالعمل کیت ساخت شرکتBiolabs) New England (NEB) انجام پذیرفت که توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس Rtas) (PrimeScript^TM Reverse Transcriptase و پرایمر-Oligo dTدر حجم ۱۰ میکرولیتر و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد.

طراحی آغازگر و انجام PCR

به دلیل فقدان اطلاعات ژنومی از گیاه کاکوتی ایرانی،اطلاعات توالی‌های نوکلیوتیدی مربوط به ژن‌های لیمونن سنتتاز، لیمونن هیدروکسیلاز، ایزوپیپریتنول دهیدروژناز و ایزوپیپریتنول ریداکتاز در سایر گیاهان هم خانواده یعنی نعناپونه (*Mentha logifolia*) و نعنا فلفلی (*Mentha piperita*) که قبلاً شناسایی و در بانک داده‌های توالی‌های ژنی of National Center) (NCBI) (Biotechnology Information ثبت شده‌اند، جمع‌آوری و دسته‌بندی شدند. سپس طراحی پرایمر از بخش‌های حفاظت‌شده ژن‌های لیمونن سنتتاز، لیمونن هیدروکسیلاز، ایزوپیپریتنول دهیدروژناز و ایزوپیپریتنول ریداکتاز توسط نرم‌افزار AlleleID 7.5 که توانایی هم ردیف کردن همه توالی‌های هم خانواده هریک از ژن‌ها و تشخیص بخش‌های حفاظت‌شده Conserved)

(sequences)را دارد، انجام گرفت. ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن مرجع انتخاب گردید (جدول ۱).

واکنش‌های PCR در زمان واقعی

به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها در مسیر سنتز پولگن در پاسخ به تنش خشکی از واکنش qRT-PCR بر روی دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR System (شرکت ABI) و با استفاده از مسترمیکس Real-time 2X PCR Master Mix (SBYR Green) استفاده شد که با شرایط دمایی ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه در ادامه ۳۰ سیکل ۹۵ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۳ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد برای حدوداً ۱۱ دقیقه انجام شد (جدول ۲). واکنش Real Time PCR در حجم ۱۰ میکرو لیتر و در دو تکرار تکنیکال برای هر تکرار بیولوژیک، انجام شد. برای آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده از روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه ۲^(-CTΔΔ) استفاده شد که ابتدا چرخه آستانه برای نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع، نرمال‌سازی شد و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده از Excel محاسبه گردید. آزمون معنی‌داری مقایسه بین دو گروه به وسیله نرم‌افزار R به کمک محاسبه P-value انجام گرفت. برای کنترل داخلی در نرمال‌سازی نتایج، ژن خانه دارکه دارای بیان ثابت و پایداری بالاتری است، استفاده شد. پس از انجام واکنش منحنی ذوب (Melt curve) برای هر کدام از ژن‌ها رسم و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب مربوط به آن ژن و هم‌چنین آنالیز ژل تأیید شد.

نتایج و بحث

برای بررسی کمیت و خلوص آر ان ای استخراج شده از دستگاه الکتروفورز با ژل یک درصد استفاده شد. وضوح باندهای 18s rRNA و 28s rRNA نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA استخراج شده بود (شکل ۲).

Table 1. Characteristics of the used primers in Real time PCR reaction

Gene name	Amplicon Length (bp)	Forward Primer	Reverse Primer
limonene synthase	127	5′TCAAGTCGCACAAGAGGTATTC3′	5′TTCGCCTTCCGTCAACAG3′
limonene hydroxylase	133	5′TGTTCTCCGTCGTGCTCTC3′	5′CTGAAGATGATGTCGTCGTTGT3′
Isopiperitenol dehydrogenase	121	5′CAGTGGTGATCGCCGACAT3′	′5′ACGACGGACCTGACCTGTT3′
Isopiperitenone reductase	123	5′TCTCTTACAACTATCTCCTTCACC3	5′TCTTCTGTCAGCCTGTCCT3′
beta actin	182	5′GCTAGTGGTCGTACAACTGGTA3′	5′GCGGTGGTGGTGAATGAGT3′

Table 2. Thermal cycling conditions used for PCR

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	95˚c	2 minutes	1
Denaturation	95˚c	30 seconds	
Annealing	63˚c	30 seconds	30
Extension	72˚c	1.5 minutes	
Final Extension	72˚c	10 minutes	1

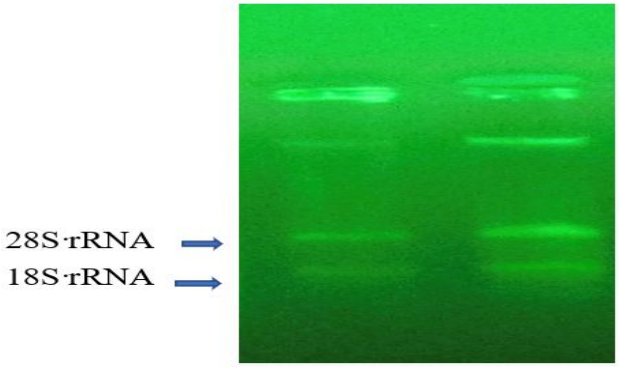


Figure 2. RNA samples in 1% agarose gel electrophoresis before DNase treatment

دو باند واضح در این تصویر نشان‌دهنده کیفیت RNA استخراج شده است. باند بالا مربوط به 28s و باند پایین مربوط به 18s است. هم‌چنین برای اطمینان بیشتراز کیفیت RNA استخراج‌شده از دستگاه نانودراپ مدل (Nanodrop, 2000 C, USA Thermo scientific) استفاده شد. نسبت جذب نوری (A260/A280) نانومتر نشان‌دهنده آلودگی‌های پروتئینی و نسبت (A260/A230)جهت بررسی میزان آلودگی‌های مواد معلق و قندها در محلول آر ان ای استخراج‌شده می‌باشد که توسط دستگاه محاسبه گردید. قبل از سنتز CDNA نمونه‌ها با آنزیم DNase تیمار شدند تا از عدم وجود هرگونه آلودگی از نوع DNA اطمینان حاصل گردد. ساخت CDNAطبق دستورالعمل کیت ساخت شرکت NEBانجام پذیرفت. به منظور تعیین دمای اختصاصی انیلینگ که منجر به تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر در این مطالعه می‌شود، از واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) با شیب گرادیانت استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که با بروز تنش خشکی میزان پرولین در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل افزایش قابل توجهی می‌یابد (جدول ۲). مولکول‌های پرولین شامل قسمت‌های آبدوست و آب گریز می‌باشند. پرولین محلول می‌تواند حلالیت پروتیئن‌های مختلف را تحت تأثیر قرار داده و از غیرطبیعی شدن آلبومین جلوگیری می‌کند. این ویژگی پرولین به این دلیل است که برهمکنش بین پرولین و سطح پروتیئن‌های آب گریز برقرار شده و به علت افزایش سطح مولکول‌های پروتیئن آبدوست، پایداری پروتیئن‌ها افزایش یافته و در نتیجه از تغییر ماهیت آن‌ها جلوگیری می‌شود. به علاوه پرولین آنزیم‌ها را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد یعنی باعث پایداری ساختار آن‌ها می‌شود پس گیاه به دلایل ذکر شده به منظور فعال کردن مسیر سیگنالینگ تحمل به تنش، میزان پرولین خود را افزایش می‌دهد. Rai et al., (2004) نشان دادند که تنش خشکی باعث افزایش محتوای پرولین برگ‌ها در *Ocimum tenuiflorum* L. می‌شود. افزایش پرولین تحت تنش خشکی در گیاهان علف لیمو، ذرت، ریحان و پروانش نیز مشاهده شده است (Abdalla and El-Khoshiban, 2007; Baher et al., 2002; Fatima et al., 2002).

در این پژوهش برای اطمینان از حادث شدن تنش در گیاه، علاوه بر اندازه گیری مقدار پرولین، مقدار محتوی نسبی آب در سطح آبیاری (کنترل) و در سطح ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه مورد اندازه گیری قرار گرفت (Sadeghian et al., 2015) و مشاهده شد که محتوی نسبی آب در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل کاهش قابل چشمگیری را نشان می‌دهد (جدول ۳). کمبود آب با افت محتوای رطوبت نسبی و پتانسیل آب برگ زمینه کاهش فتوسنتز در واحد سطح برگ را فراهم می‌آورد. کاهش محتوای آب در بافت‌های گیاهی تحت شرایط تنش کم آبی باعث محدود شدن رشد و برخی تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌گردد (Pirzad et al., 2011; Hassanpour et al., 2014).

اثر تنش خشکی بر بیان ژن‌های مورد مطالعه

قبل از بررسی تغییرات بیان ژن‌های مدنظر، با استفاده از منحنی ذوب (Melt curve) برای هر کدام از ژن‌ها (شکل ۳) میزان قدرت پرایمرهای طراحی‌شده در تکثیر صحیح محصول مربوط به هر ژن، مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودارها اختصاصیت و کم خطا بودن توالی این پرایمرها را جهت تکثیر توالی‌های مدنظر نشان می‌دهد. نتایج حاصل از بلاست دمای پرایمرها که در پایگاه NCBI انجام گرفت با نتایج دمایی که در پایان واکنش از منحنی‌های ذوب به‌دست آمد کاملاً برابری داشت. مقایسه بیان ژن لیمونن هیدروکسیلاز در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل نشان داد که بیان ژن مذکور در شرایط تنش کم‌آبی۴۰۰ برابر افزایش معنی دار با p-value معادل 14.2E-08 (جدول ۳) می‌یابد. مقایسه بیان ژن لیمونن سنتتاز در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل نشان داد که بیان ژن مذکور در شرایط تنش کم آبی ۱۱۵ برابر (جدول ۳) افزایش معنی‌دار (p-value=7.32E-14) می‌یابد.

در مطالعه‌ای تأثیر تنش خشکی بر سطح بیان ژن‌های لیمونن سنتتاز (Lims) و لیمونن هیدروکسیلاز (Limh) در سطوح مختلف تنش خشکی (۷۵و ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه) در مسیر بیوسنتز فنولی در گیاه نعنا فلفلی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد با افزایش میزان تنش خشکی سطح بیان این دو ژن افزایش می‌یابد. لیمونن سنتتاز در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارای نقش مهمی است و این نقش از طریق حلقوی کردن پیش ماده‌های گرانیل دی فسفات به لیمونن مشخص می‌شود. این مونوترپن حلقوی پیش ماده تولید کاروون در spearmint هم می‌باشد (Kjonaas and Croteau1983).

در مطالعه دیگر تأثیر تلقیح دو نوع قارچ میکروریزا آربوسکولا بر بیان ژن لیمونن سنتتاز در ژنوتیپ‌های نعنا فلفلی (*Mentha spicata* L.) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج پژوهش ذکرشده، افزایش تجمع رونوشت‌های ژن لیمونن سنتتاز در برگ‌های *M. spicata* تحت تأثیر تلقیح با قارچ‌های میکروریزا آربوسکولار، هماهنگ با افزایش محتوی اسانس، افزایش می‌یابد (Ahmadi khoei and Shabani 2015).

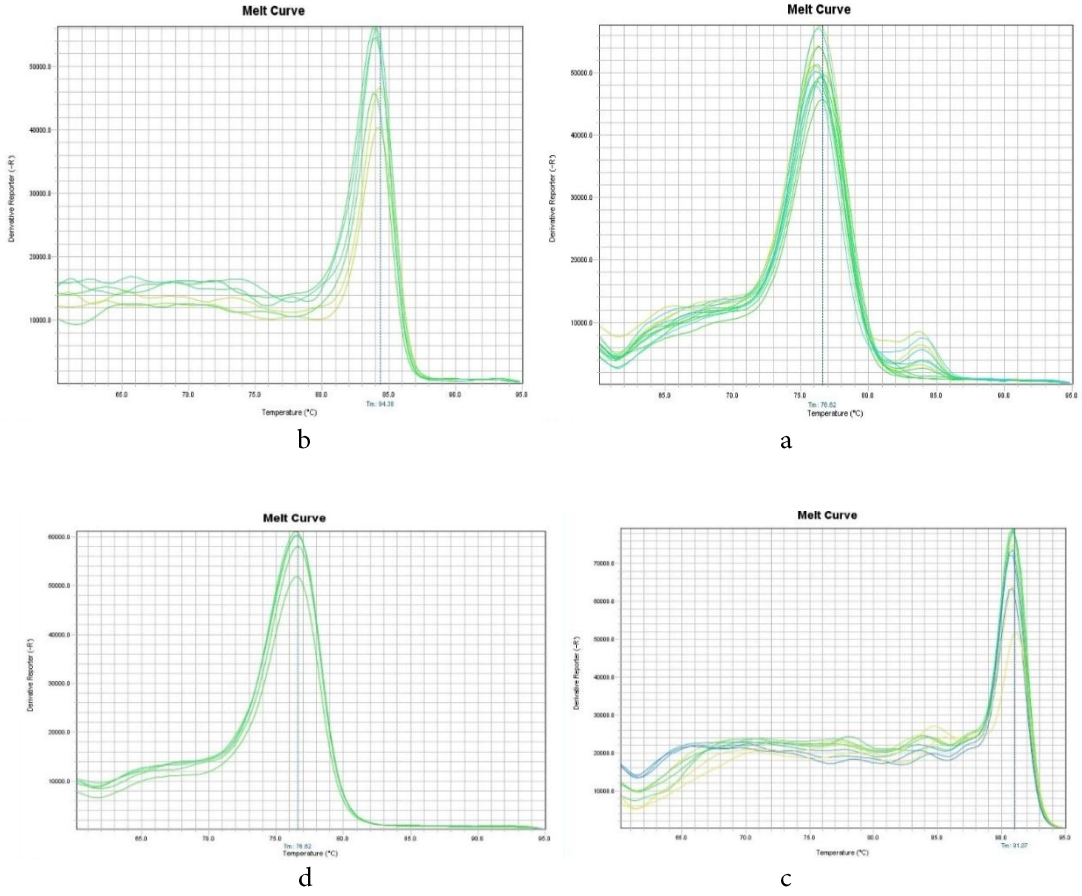


Figure 3. The melt curve of a) limonene synthase (lims), b) limonene hydroxylase (limh), c) Isopiperitenon dehydrogenase (Ipd), d)Isopiperitenon reductae (Ipr)

Table 3. The average content for relative water content and proline content under control and drought stress

Treatment	Relative water content (%)	Proline content (µmol g^{-1} FM)
CONTROL	0.02± 0.65	1.72 ± 0.085
30% FC	0.015 ±0.31	0.11±3.11

در تحقیق حاضر مشخص شد تنش خشکی (۳۰ درصد ظرفیت زراعی) بیان ژن ایزوپیپریتنول دهیدروژناز را نسبت به شرایط کنترل ۵۰ برابر افزایش معنی دار با p-value معادل 1.03E-10 (جدول ۴) می‌دهد و هم‌چنین قیاس میزان بیان ژن ایزوپیپریتنول ریداکتاز در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل نشان داد که بیان ژن مذکور در شرایط تنش کم آبی ۱۲۰ برابر (شکل ۴) افزایش معنی‌دار (p-value=1.03E-10) می‌یابد. احتمالاً تنش خشکی از طریق افزایش بیان این ژن‌ها که در بیوسنتز ماده مؤثره گیاه دخیل هستند، میزان ماده مؤثره را افزایش می‌دهند (Abdollahi Mandoulakani, 2017).در مطالعه‌ای تأثیر penconazole، یک قارچ کش از گروه تریازولی دارای خواص تنظیم‌کنندگی رشد گیاهی روی میزان بیان ژن ایزوپیپریتنول ریداکتاز در مسیر بیوسنتز منوترپن‌ها و ترکیبات اسانس تحت تنش خشکی در مرحله گلدهی پونه (*Mentha pulegium* L.) بررسی و گزارش شد تنش خشکی میزان بیان این ژن را افزایش می‌دهد (Hassanpour et al., 2014).

Table 4. T test results for the studied genes limonene synthase (lims), limonene hydroxylase (limh), Isopiperitenon dehydrogenase (Ipd), Isopiperitenon reductae (Ipr).

Gene	Lims	Limh	Isd	Isr
t value	19.10261	9.39793	19.0734	12.66875
P-value	7.32E-14	1.42E-08	7.53E-14	1.03E-10

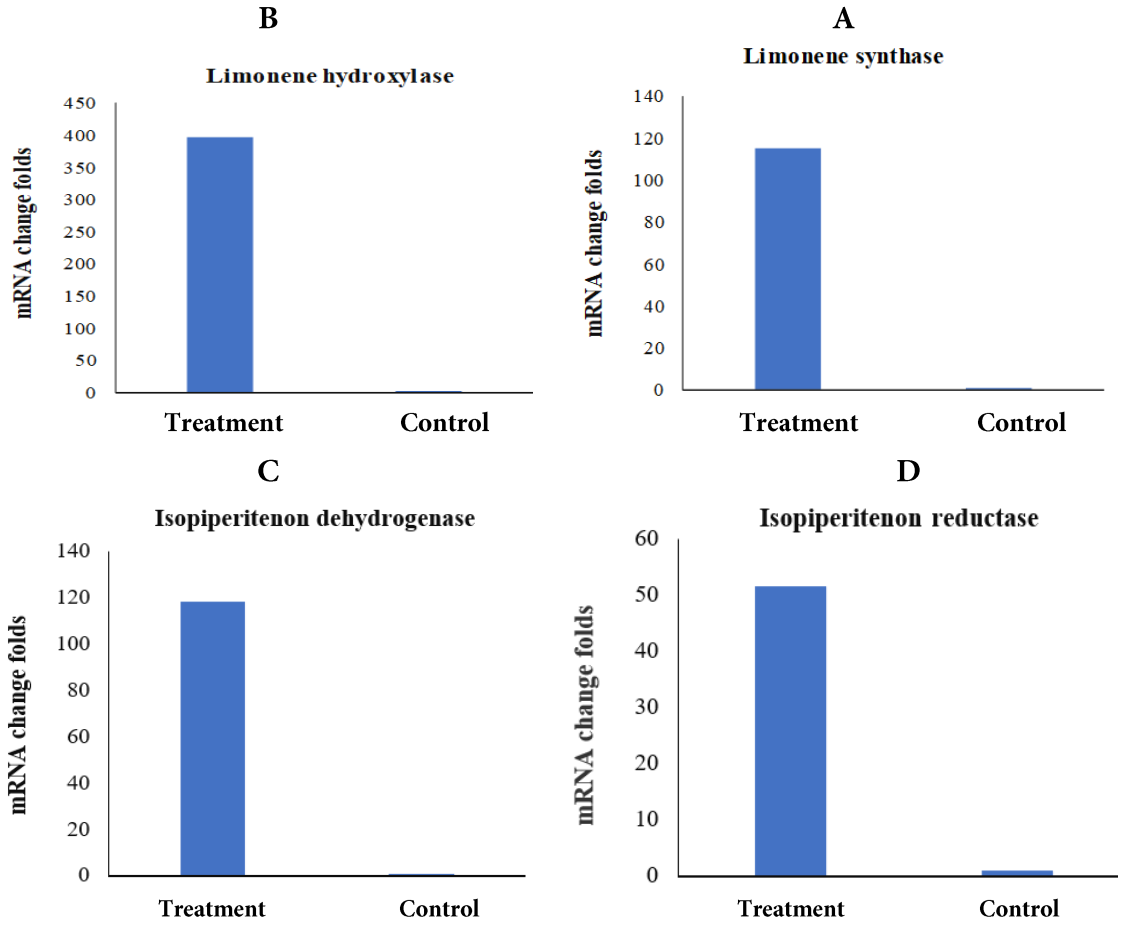


Figure 4. The effect of drought stress on the expression levels of of a) limonene synthase (lims), b) limonene hydroxylase (limh), c) Isopiperitenon dehydrogenase (Ipd), d)Isopiperitenon reductase (Ipr) vertical axis of graph shows the expression levels bases on change folds of the genes.

Rahimi et al., (2017) در بررسی میزان بیان ژن‌های ایزوپیپریتنول دهیدروژناز و ایزوپیپریتنول ریداکتاز در گیاه نعنا فلفلی (*Mentha piperita* L.) در واکنش به سطوح مختلف تنش خشکی گزارش کردند که میزان بیان ژن ایزوپیپریتنول دهیدروژناز در سطح اولیه تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) نست به کنترل افزایش یافت و با افزایش میزان سطح تنش خشکی به ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه میزان بیان ژن مذکور نسبت به کنترل به میزان بیشتری افزایش پیدا کرد. هم‌چنین میزان بیان ژن ایزوپیپریتنول ریداکتاز در سطوح مختلف تنش خشکی نسبت به نمونه کنترل افزایش قابل ملاحظه ای نشان داد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود ژن‌های درگیر، در یک مسیر پیوسته، بیوسنتز پولگن را موجب می‌شوند. لیمونن سنتتاز به وسیله هدایت چرخه ژرانیل دی فسفات

لیمونن را تشکیل می‌دهد (Croteau et al., 2005). در ادامه لیمونن به واسطه آنزیم L_3O به محصول ترانس ایزوپیپریتنول هیدروکسیله می‌شود (Karp et al., 1990). به دنبال هیدروکسیلاسیون آللیک، آنزیم ایزوپیپریتنول دهیدروژناز، ترانس ایزوپیریتنون را به (R۴) ایزوپیپریتنول اکسید می‌کند (Kjonaas et al., 1985). در مرحله بعد، آنزیم (-)- ایزوپیپریتنول ریداکتاز که توسط ایزوپیپریتنول ریداکتاز کدگذاری می‌شود با استفاده از NADPH، (-)-(4R)- ایزوپیپریتنول را به (+)- (1R, 4R)-سیس-ایزوپولگن تبدیل می‌کند. سپس ایزوپولگن ایزومراز، سیس ایزوپولگن را به پولگن کاتالیز می‌کند (Lange et al., 2000). در این مسیر هر آنزیم سوبسترای آنزیم بعدی محسوب می‌شود، به همین دلیل افزایش و نقصان آن‌ها بصورت هماهنگ صورت می‌پذیرد. در تحقیقی دیگر در *Mentha pulegium* تأثیر تنش خشکی بر میزان بیان ژن ایزوپیپریتنول ریداکتاز بررسی و گزارش شد که میزان بیان ژن مذکور در این شرایط به شدت افزایش می‌یابد (Hassanpour et al., 2014). Soleymani and Taheri, (2015) در بررسی تیمارهای مختلف جیبریک اسید GA_3 بر گیاه *Mentha pulegium*، افزایش سطح بیان ژن ایزوپیپریتنول ریداکتاز را نسبت به شرایط کنترل گزارش کردند.

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان انباشت پرولین در شرایط تنش کم آبی افزایش‌یافته که نوعی سازگاری گیاه به شرایط تنش محسوب می‌شود. عمده‌ترین راهکار تحمل به تنش در گیاهان تولید یک‌سری املاح آلی سازگار می‌باشد. این املاح با وزن مولکولی کم، ترکیبات بسیار مهمی هستند که حتی در غلظت‌های بالای سیتوزولی هم برای گیاهان غیرسمی هستند. در شرایط تنش کم آبی و در نتیجه تجمع مواد محلول، پتانسیل اسمزی سلول‌ها کاهش می‌یابد که این حالت آب را به داخل سلول جذب و به حفظ حالت تورگر کمک می‌کند. با تدبیر تعدیل اسمزی، فعالیت‌های سیتوپلاسمی و اندامک‌ها، به گیاه کمک می‌کند تا به‌صورت کارآمدتری بتواند دوره رشد، فتوسنتز و تسهیم آسمیلات را در طول حیات گیاه به انجام برساند. افزایش غلظت و محتوای پرولین تحت شرایط تنش کم آبی ممکن است نشان‌دهنده نقش احتمالی این اسید آمینه در تنظیم اسمزی باشد. همچنین کاکوتی ایرانی مانند بیشتر گیاهان در سطح بیان ژن به تنش کم آبی واکنش نشان می‌دهد، میزان بیان ژن‌ها با تغییر شرایط محیطی، تغییر می‌کند فرآیندهایی که منجر به افزایش تحمل نسبت به تنش و درنهایت سازگاری گیاه می‌شوند، به وسیله چندین مسیر پیام‌رسان تنظیم میشوند. نتیجه فعال شدن این مسیرها تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تنش است، که می‌تواند شامل فعال شدن و یا غیرفعال شدن آن‌ها باشد. از طرف دیگر تنظیم بیان ژن، به‌وسیله مکانیسم‌های مولکولی مختلفی اعمال می‌شود، پس می‌توان نتیجه گرفت که تنظیم در سطح رونویسی سهم عمده ای در تنظیم بیان ژن‌های مورد بررسی دارد. به نظر می‌رسد افزایش بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز پولگن تحت شرایط خشکی، از عواملی است که در زمینه افزایش اسانس این گیاه بسیار حائز اهمیت می‌باشد. شناخت واکنش‌های متفاوت گیاهان دارویی به کمبود آب از اهمیت خاصی برخوردار است و این نکته در مهندسی متابولیک بسیار مفید خواهد بود زیرا می‌توان از طریق افزایش بیان این ژن‌ها راهکاری مناسب برای افزایش ماده مؤثره پیدا کرد. شاید بتوان در شرایط مدیریتی در مقطعی از رشد گیاه از این راهبرد برای افزایش ماده مؤثره استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

تیمار خشکی به افزایش سطح بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی پولگن در گیاه کاکوتی ایرانی منجر می‌شود و به تبع آن احتمالاً افزایش میزان ماده مؤثره پولگن در سلول را خواهیم داشت البته لازم است در مطالعات آینده میزان ترکیبات تولیدی توسط این ژن‌ها نیز اندازه گیری شود و ارتباط آن‌ها با میزان بیان ژن‌ها مطالعه شود تا با اطمینان بیشتری ژن‌های کلیدی جهت دستکاری‌های ژنتیکی به منظور تولید واریته‌های کاکوتی دارای میزان بالایی از ترکیبات با ارزش شناسایی شود.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مقاله از گروه مهندسی تولید و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل مساعدت و فراهم‌سازی امکانات این تحقیق، قدردانی می‌نماید.

References

Abdalla, M., & El-Khoshiban, N. H. (2007). The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticium aestivum* cultivars. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(12), 2062-2074.

Abdollahi Mandoulakani, B., Alipoor, M., Darvishzadeh, R., & Majroomi Senji, B. (2017). The effect of drought stress on the expression of genes encoding phenylalanine ammonialyase (PAL), eugenol synthase 1 (EGS1) and caffeic acid O-methyltransferase (COMT) enzymes in Basil (*Ocimum basilicum*). *Scientific Information Database*, 9(4), 117-128. [In Persian]

Ahmadi Khoei, M., & Shabani, L. (2015). The effect of inoculation with mycorrhizal arbuscular fungion expression of limonene synthase in Mentha spicata L. genotypes. *Iranian Journal of Plant Biology*, 7(23), 51-62. [In Persian]

Baher, Z. F., Mirza, M., Ghorbanli, M., & Bagher Rezaii, M. (2002). The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(4), 275-277.

Chitsaz, M., Pargar, A., Naseri, M., Bazargan, M., & Ansari, M. (2007). Composition and anti- bacterial effects of hydro-alcoholic extract and essential oil of *Ziziphora clinopodioides* on selected bacteria. *Scientific Journal of Shahed University*, 68, 15-22.

Christou, A., Georgiadou, E. C., Filippou, P., Manganaris, G. A., & Fotopoulos, V. (2014). Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. *Gene*, 537(1), 169-173.

Croteau, R. B., Davis, E. M., Ringer, K. L., & Wildung, M. R. (2005). Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften*, 92(12), 562-577.

Duru, M. E., Ozturk, M., Ugur, A., & Ceylan, O. (2004). The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 43-48.

Fatima, S., Farooqi, A. A., & Sharma, S. (2002). Physiological and metabolic responses of different genotypes of *Cymbopogon martinii* and *C. winterianus* to water stress. *Plant Growth Regulation*, 37(2), 143-149.

Hassanpour, H., Khavari-Nejad, A., Niknam V, Razavi K., & Najafi F. (2014). Effect of penconazole and drought stress on the essential oil composition and gene expression of *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae) at flowering stage. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(5), 1167-1175.

Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam, V., Najafi, F., & Razavi, K. (2012). Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(4), 1537-1549.

Karp, F., Mihaliak A, Harris, L., & Croteau, R. (1990). Monoterpene biosynthesis specificity of the hydroxylations of -limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (Mentha spicata), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 276(1), 219-226.

Khorasaninejad, S., Mousavi, A., Soltanloo, H., Hemmati, K., & Khalighi, A. (2011). The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5360-5365.

Kjonaas, B., Venkatachalam, V., & Croteau, R. (1985). Metabolism of monoterpenes: Oxidation of isopiperitenol to isopiperitenone, and subsequent isomerization to piperitenone by soluble enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238(1), 49-60.

Kjonaas, R., & Croteau, R. (1983). Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other *Mentha* species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 220(1), 79-89.

Kleinwachter, M., & Selmar, D. (2015). New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 121-131.

Lange, M., Wildung, R., Stauber, J., Sanchez, C., Pouchnik, D., & Croteau, R. (2000). Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2934-2939.

Mirzaei, F., Ismaili, A., Fatehi, F., Ghaderi, A., & Afkar, S. (2019). The study on gene expression of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coa Reductase (HMGR) and γ-terpinene synthesis in thymus vulgaris L. Under Water Deficit Stress. *Plant Productions*, 42(2), 165-180. [In Persian]

Mozaffarian, V. (1996). A dictionary of Iranian plant names. Tehran: Farhang Moaser. [In Persian]

Negueruela, V. A., & Mata, R. M. (1986). The volatile oil of *Ziziphora hispanica* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 1(3), 111-113.

Omidbaigi, R. (2008). *Production and Processing of medicinal plants* (Vol 3). Mashhad: Astan'e Qods'e Razavi publication. [In Persian]

Ozturk, S., & Ercisli, S. (2006). The chemical composition of Essential oil and in vitro antibacterial of essenential oils and methanol extract of *Ziziphora persica* bunge. *Ehtanopharmacology*, 106(3), 327-376.

Pirzad, A., Shakiba, M. R., Zehtab-Salmasi, S., Mohammadi, S. A., Darvishzadeh, R., & Samadi, A. (2011). Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12), 2483-2488.

Rahimi, Y., Taleei, A., & Ranjbar, M. (2017). Changes in the expression of key genes involved in the biosynthesis of menthol and menthofuran in *Mentha piperita* L. under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9), 1-9.

Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S. N., & Mehrotra, S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science*, 167(5), 1159-1169.

Rechinger, K. H., Browicz, K., Persson, K., & Wendelbo, P. (1982). Flora iranica, akademische druck-U. *Verlagsanstalt, Graz*, *150*(2), 108-216.

Sadeghian, M., Hakimi, M. H., & Sodaeizadeh, H. (2015). Effect of drought stress on some physiological and morphological characteristics of *Hymenocrater yazdianus. Journal of Biological and Environmental Sciences*, 7, 110-119.

Soleymani, F., & Taheri, H. (2015). Effects of Gibberellic on gene expression of menthol biosynthesis pathway in Peppermint (*Mentha piperita* L.). *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences,* 2(2), 131-134.

Zendehdel, M., & Babapour, V. (2010). Study of antinociceptive effevts of *Ziziphora teniour* and its interference on opioidergic and serotoninergic systems. *Journal of Veterinary Research*, 65(1), 57-60.