پاسخ رونویسی ژن‌های ساختاری و تنظیمی مؤثر در بیوسنتز ایزوپرن‌ها و ارتباط آن با بیوسنتز اسانس به الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و آبسیزیک 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، صندوق‌پستی: ۶۳۴۱۷۷۳۶۳۷

تلفن: ۰۹۱۶۳۱۵۸۱۵۹، نمابر: ۲۳۲۲۲۴۲۵ (۰۶۱)

پست الکترونیک: Taheri@asnrukh.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۵ **تاریخ تصویب:** ۹۷/۹/۲۰ doi: 10.29252/jmp.4.72.S12.153

چکیده

مقدمه: پیش‌سازهای مونوترپنی جهت بیوسنتز منتول از مسیر پلاستیدی متیل اِریتریتول فسفات (MEP) تأمین می‌شوند.

هدف: به منظور درک بهتر متابولسیم ترپن‌ها در گیاه نعنا فلفلی، اثر سالیسیلیک اسید و آبسیزیک اسید در تغییر الگوی بیان ژن‌های مؤثر در بیوسنتز 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 الیسیتورهای سالیسیلیک و آبسیزیک 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 کمّی و کیفی اسانس توسط دستگاه GC/MS انجام شد.

نتایج: بازده اسانس و محتوای منتول تحت اثر هر دوی الیسیتورها افزایش یافت. همچنین بیان ژن‌های *MCT* و *CMK* در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید تقویت شد و تیمار آبسیزیک 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.

گل‌واژگان: *Mentha piperita* L.، پروتئین انتقال‌دهنده لیپید، فاکتورهای رونویسی، متیل اِریتریتول فسفات، منتول

مقدمه

منتول به عنوان جزء اصلی مونوترپنی موجود در اسانس نعنا فلفلی (*Mentha piperita* L.) از اتصال واحدهای ایزوپرنی ۵ کربنه ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP) و دای متیل آلیل دای فسفات (DMAPP) حاصل می‌شود. بیوسنتز این واحدهای ایزوپرنی در این گیاه تماما در پلاستید و از طریق مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) صورت می‌گیرد. در دسترس بودن این پیش‌سازهای ایزوپرنی که بلوک‌های ساختاری بیوسنتز انواع ترپنوئیدها را تشکیل می‌دهند، در افزایش بازده اسانس بسیار مؤثر می‌باشند. لذا هر گونه تغییر در میزان رونوشت ژن‌های مسیر بیوسنتزی پیش‌سازهای ایزوپرنی، میزان بیوسنتز ترپن‌ها را تحت تأثیر قرار خواهد داد [۳-۱]. همچنین بازده اسانس تولیدی به تعداد و اندازه تریکوم‌های غده‌ای سپروار که محل اصلی بیوسنتز و ذخیره ترکیبات ترپنی می‌باشند نیز بستگی دارد [۴]. از طرف دیگر از آنجا که بیوسنتز ترکیبات واسط در مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها 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 درنهایت ترشح ترکیبات ترپنوئیدی 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 بیوسنتزی منتول صورت گرفته است، چگونگی تنظیم رونویسی این مسیر بیوسنتزی 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 داده و به صورت دقیقی میزان و زمان بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی 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، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را از طریق تنظیم فعالیت طیف وسیعی از فاکتورهای رونویسی پائین دست خود تحت تأثیر قرار دهد [۹]. هورمون گیاهی آبسیزیک اسید نیز علاوه بر تنظیم جنبه‌های متفاوت رشد و نمو گیاهی و پاسخ به استرس‌های محیطی، نقش کلیدی در تنظیم متابولیزم ترکیبات ثانویه دارد [۱۱، ۱۰]. لذا در این پژوهش به منظور مطالعه اثر تنظیمی این دو هورمون گیاهی در بیوسنتز پیش‌سازهای ایزوپرنی و ذخیره اسانس در گیاه نعنا فلفلی، تغییرات سطح رونوشت ژن‌های موثر در بیوسنتز پیش‌سازهای ایزوپرنی ژن‌های *DXS* (۱-دئوکسی D-اگزالولوس ۵-فسفات سنتتاز)، *DXR* (۱-دئوکسی D-اگزالولوس ۵-فسفات ردوکتوایزومراز)، *MCT* (۴-دی فسفوسیتیدیل-۲-C-متیل اریترول سینتاز)، *CMK* (سیتیدین-'۵-دی فسفو-۲-C-متیل-D-اریترول کیناز)، *MDS* (۲-C-متیل-D-اریترول-۲و۴-سیکلودی فسفات سینتاز)، *HDS* (۴-هیدروکسی-۳-متیل بوت-۲-انیل دی فسفات سنتاز)، *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 آبسیزیک اسید بوسیله آزمون PCR در زمان واقعی (qRT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با توجه به منابع محدود اطلاعات درخصوص عوامل تنظیمی مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها 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

ژن‌های بالادستی مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها و همچنین محتوای ترپنوئیدهای استحصالی بتوان درک بهتری از چگونگی تنظیم مسیر MEP (به عنوان مسیر بیوسنتز پیش‌سازهای ایزوپرنوئیدی) ارائه داد.

مواد و روش‌ها

نشاءهای گیاه نعنا فلفلی به صورت استولن از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. هر نشاء به طول ۲۰-۱۵ سانتی‌متر 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 استولن‌ها و در مرحله رویشی، محرک‌های اسید سالیسیلیک (حل شده در میزان مناسبی آب مقطر) در سطوح صفر و نیم میلی‌مولار و آبسیزیک 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 گیاهچه‌ها محلول‌پاشی شدند. گیاهان شاهد مربوط به هر تیمار نیز با حلال‌های ذکر شده محلول‌پاشی شدند. نمونه‌برداری از برگ‌های دوم تا پنجم بالایی هر ساقه در ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت بعد از محلول‌پاشی انجام گرفت. استخراج RNA بوسیله کیت InnuPREP Plant RNA (ساخت شرکت Analytik Jena آلمان) طبق پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت. برای بررسی کمّیت 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 ژن‌های مسیر MEP، فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های انتقال‌دهنده لیپید بر اساس توالی‌های EST و توالی‌های 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 شده، واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad 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 مبنا طب انجام شد. برای آنالیز داده های به دست آمده، از روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه (ΔΔCT) استفاده شد. بدین‌ترتیب 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 روش شرح داده شده توسط لیواک و اشمیتگن [۱۲] و نرم‌افزار REST® تهیه شده توسط فافل [۱۳] محاسبه شد. در این روش، همه‌ی داده‌ها با ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی، نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن‌ها در پاسخ به محرک‌های مورد استفاده نسبت به شرایط کنترل سنجیده شد.

تهیه و اندازه‌گیری اسانس

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

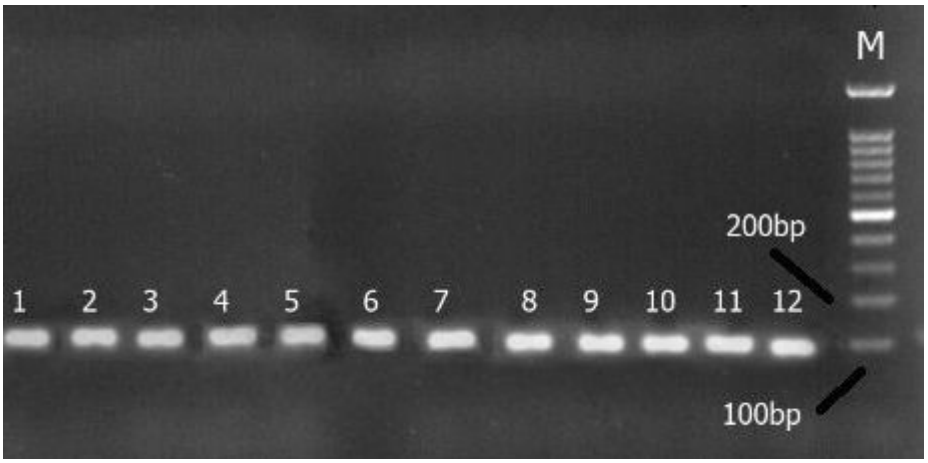
جداسازی و شناسایی ترکیبات ترپنوئیدی اسانس

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 میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن برابر با ۰/۲۵ میکرون می‌باشد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از دمای اولیه ۵۰ درجه سانتی‌گراد شروع شده و به تدریج با سرعت ۱۵

درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافته تا به ۲۸۰ درجه سانتی گراد 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 (C_8-C_{20}) 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 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 ± انحراف معیار نشان داده شده و آنالیز آماری آنها به روش *t*-tast (مقایسه میزان ترکیبات موجود در اسانس با میزان متناظر آنها در نمونه شاهد) و با نرم افزار Excel انجام شد.

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

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

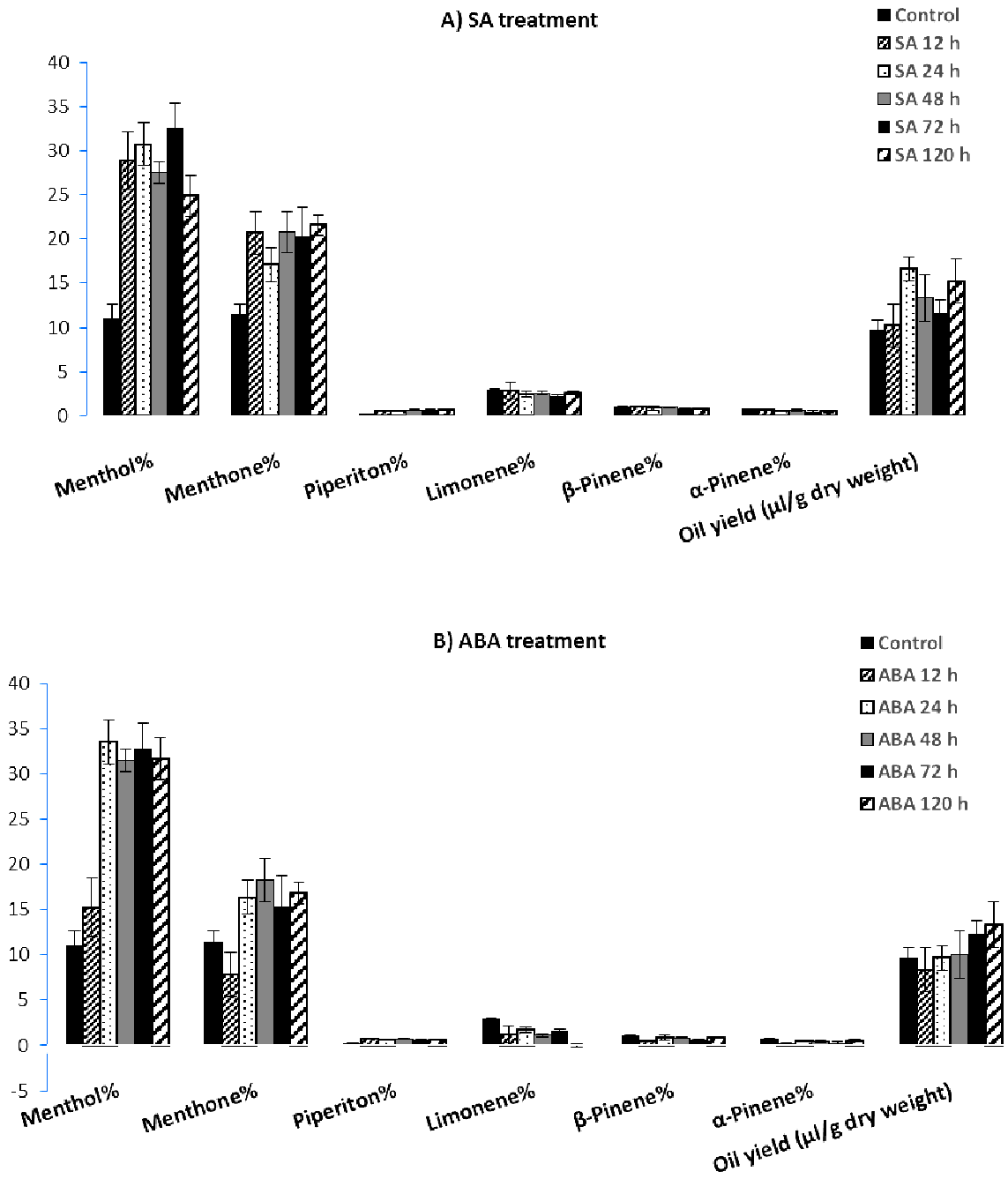
نتایج

اثر سالیسیلیک اسید و آبسیزیک اسید در کمّیت و کیفیت اسانس استحصالی

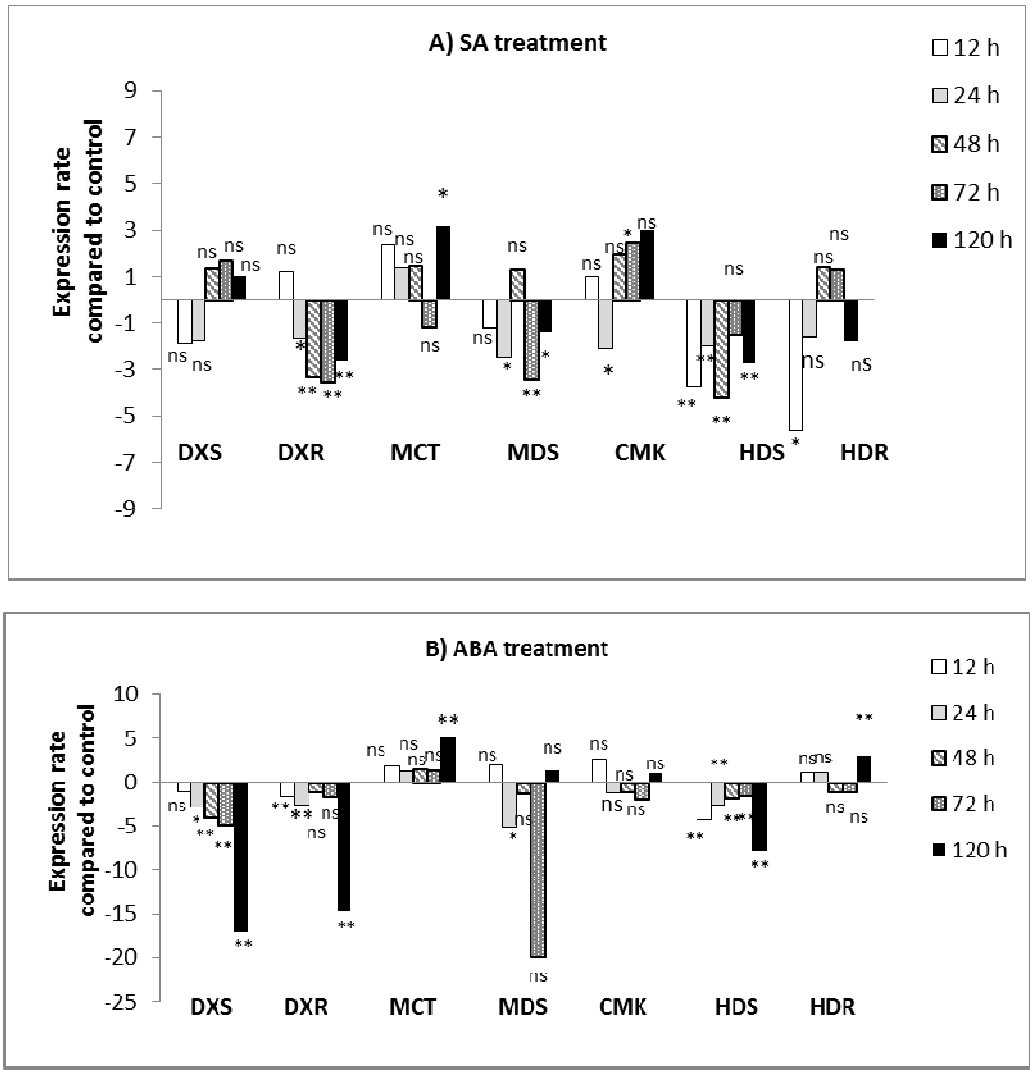
جهت ارزیابی اثرات و پیامدهای تغییر میزان پیش‌سازها در تولید نهایی مونوترپن‌ها، بازده و ترکیب اسانس توسط دستگاه GC/MS در گیاهان نعنا فلفلی تحت تیمار سالیسیلیک اسید و آبسیزیک اسید در طی ۱۲۰ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد (شکل شماره ۲) که بیشترین میزان تجمع اسانس در تیمارهای سالیسیلیک و آبسیزیک اسید به ترتیب ۲۴ و ۱۲۰ ساعت پس از اعمال تیمار بوده است. ترکیب اجزا اسانس نیز تحت تأثیر تیمارهای فوق‌الذکر قرار گرفت. میزان منتول 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 آبسیزیک 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.

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

به منظور بررسی اثر محرک سالیسیلیک اسید و آبسیزیک اسید در تغییر سطح رونوشت ژن‌های بالادست مسیر بیوسنتزی 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 آبسیزیک 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



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.



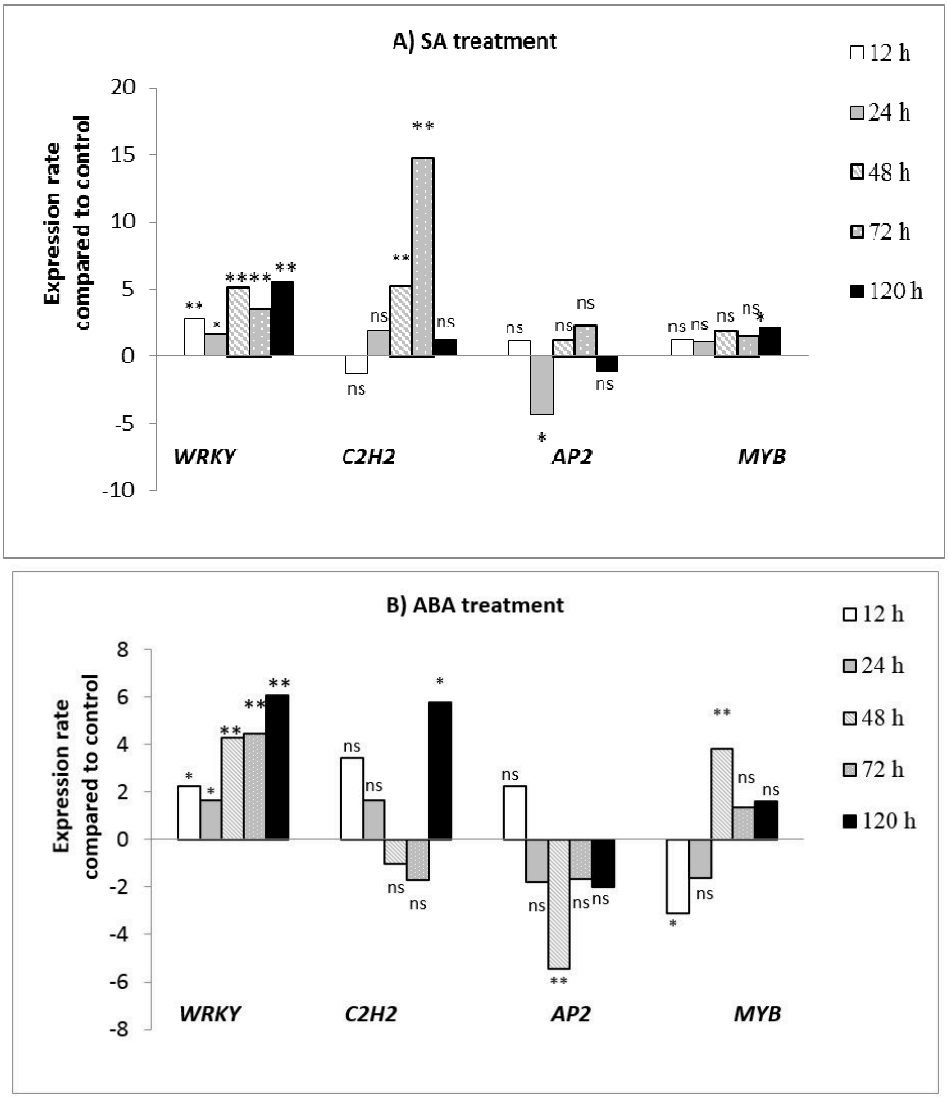
شکل شماره ۳- میزان بیان نسبی ژن‌های *DXS*، *DXR*، *MCT*، *CMK*، *MDS*، *HDS* و *HDR* در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمار سالیسیلیک (A) و آبسیزیک اسید (B) در *M. piperita*. علائم **، * و ns به ترتیب، معنی‌داری در سطح احتمال ۱، ۵ درصد و عدم معنی‌داری بین گیاهان شاهد و تحت تیمار را نشان می‌دهند.

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 *HDS* تحت تأثیر هر دو تیمار کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد متناظرش نشان داد. سطح رونوشت ژن *HDR* نیز تحت تأثیر هردو 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.

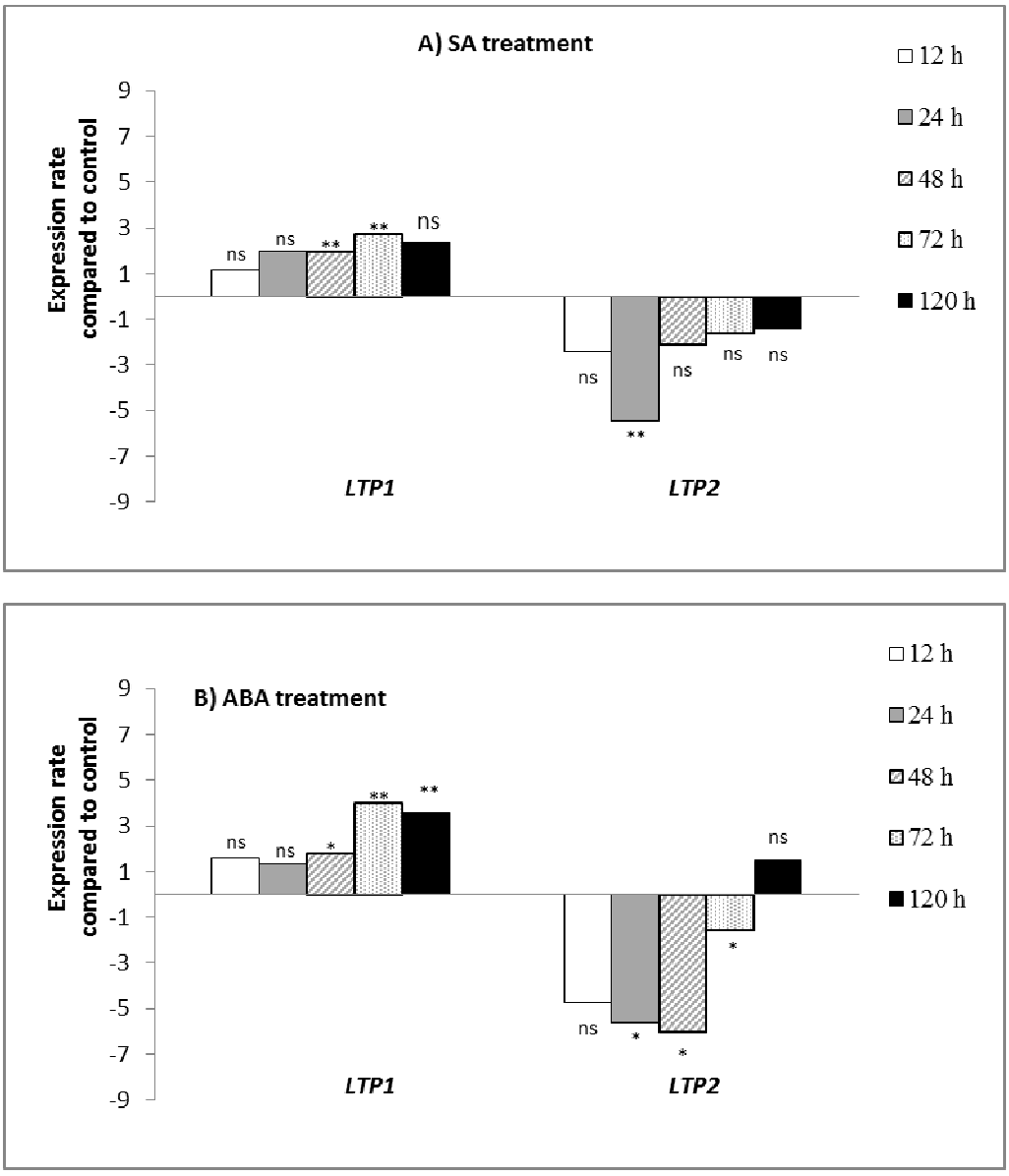
به طوری که به بیشترین مقدار خود در ۷۲ ساعت رسید. بالعکس آبسیزیک اسید نتوانست بیان این ژن را در ساعات اولیه اعمال تیمار به میزان قابل توجهی تغییر دهد و افزایش بیان این ژن در ۱۲۰ ساعت بعد از اعمال تیمار گزارش شد. بررسی رونوشت ژن کدکننده فاکتور رونویسی *WRKY* نشان داد که بیان این ژن در هر دو تیمار به طور 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 آبسیزیک اسید مشاهد شد حال آنکه در ساعات 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 آبسیزیک اسید کاهش یافت آنگاه بتدریج افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود در ۴۸ ساعت رسید (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴- میزان بیان نسبی ژن‌های *C2H2*، *WRKY*، *MYB* و *AP2* 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.

تغییرات بیان برخی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده لیپید در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید و آبسیزیک 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 کاهش در تیمار سالیسیلیک و آبسیزیک اسید به ترتیب در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها مشاهد 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).



شکل شماره ۵- میزان بیان نسبی ژن‌های *LTP1* و *LTP2* 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.

بحث

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 بیوسنتز 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 بیوسنتزی 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 از طریق کاهش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی 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 بیوسنتزی 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 بیوسنتزی پیش‌سازهای ایزوپرنی کاهش داده است.

با وجود مطالعات گسترده‌ای که درخصوص شناسایی اجزای مسیر بیوسنتز 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 آرتمیزیا، سطح رونوشت ژن‌های مسیر بیوسنتزی آرتمیزینین و محتوای این ترکیب سزکوئی‌ترپنی افزایش چشمگیری نشان داد. مطالعه ناحیه پروموتری 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 بیوسنتزی MEP و ژن منتسب به خانواده *C2H2* در این مطالعه نقش تنظیم‌کنندگی منفی این فاکتور رونویسی را در بیوسنتز پیش‌سازهای ایزوپرنی قوّت بخشید. در مطالعات قبلی نیز اثر بازدارندگی این فاکتور تنظیمی در فعالیت پروموتری 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* کاملا 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 نیمار شده است که با مطالعات سوتیپانتا و همکاران [۲۴] در شناسایی عوامل تنظیمی مسیر بیوسنتزی TIA در *Catharanthus roseus* مطابقت دارد.

علیرغم عدم پاسخ مثبت ژن‌های مسیر بیوسنتزی پیش‌سازهای ایزوپرنی 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 آرتمیزیا 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 بدین‌ترتیب 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 آرتمیزنین 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 ایزوپرنی قابل توجیه 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 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 انتقال دهنده 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 انتقال دهنده 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 نداند.

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 داده اند. 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 داشته است. 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.

منابع

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. Ouwerkerk 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 *CrWRKY1* 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, Bihamta M.R, Omidi 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.