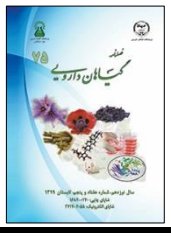
فصلنامه گیاهان دارویی ۱۳۹۹؛ ۱۹(۷۵): ۲۰۴-۲۱۲

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی



مقاله تحقیقاتی

بررسی اثر تنش خشکی بر بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز مونوترپن و سزکوئی‌ترپن‌ها و ترکیبات اسانس در ریحان

حمیده پالش، بابک عبدالهی مندولکانی*

گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
بتامیرسن
بیان ژن
تنش خشکی
ریحان
ژرانیول

چکیده

مقدمه: ریحان (*Ocimum basillicum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده Lamiaceae است که اسانس آن حاوی ترکیبات ترپنوئیدی مهمی مانند مونوترپن و سزکوئی‌ترپن‌ها می‌باشد. این ترکیبات به طور وسیعی به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. **هدف:** هدف از این تحقیق، بررسی اثر تنش خشکی بر بیان برخی ژن‌های دخیل در بیوسنتز مونوترپن و سزکوئی‌ترپن‌ها و ترکیبات اسانس ریحان بود. **روش بررسی:** تنش خشکی در سه سطح ۱۰۰ (شاهد)، ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی در مرحله ۸-۶ برگی اعمال شد. بیان ژن‌هایی از جمله سلینن سنتاز (*SES*)، بتا- میرسن سنتاز (*MES*)، گاما- کادینن سنتاز (*CDS*)، آلفا- زینجبرن سنتاز (*ZIS*) و ژرانیول سنتاز (*GES*) و ترکیبات تولید شده توسط این ژن‌ها در رقم کشکنی لولوی گیاه ریحان، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و سه تکرار ارزیابی شد. **نتایج:** تجزیه داده‌های مربوط به مطالعه بیان ژن‌ها نشان داد که تنش خشکی ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بیان ژن *GES* را به ترتیب ۲ و ۳/۸ برابر، بیان ژن *MYS* را به ترتیب ۱۶ و ۱۷/۴ برابر و بیان ژن *ZIS* را به ترتیب ۱/۳۱ و ۱/۴۱ برابر نسبت به کنترل افزایش می‌دهد در حالی که بیان ژن *SES* تقریباً ثابت و بیان ژن *CDS* کاهش یافت. **نتیجه‌گیری:** نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها برای ترکیبات ژرانیول، بتا- میرسین و گاما- کادینن نشان داد تنش خشکی میزان ژرانیول را کاهش، ولی میزان ترکیبات بتا- میرسین و گاما- کادینن را افزایش می‌دهد همچنین نتایج نشان داد که تغییرات بیان ژن *MYS* با روند تغییرات بتا- میرسن مطابقت دارد.

۱. مقدمه

ریحان (*Ocimum basillicum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده Lamiaceae است که اسانس آن حاوی ترکیبات ترپنوئیدی مهمی ازجمله مونوترپن و سزکوئی‌ترپن‌ها می‌باشد [۱۶]. مطالعات نشان می‌دهد که ریحان دارای اثر ضددرد، ضدالتهاب، ضدمیکروب و محرک

مخففها: SES، سلینن سنتاز؛ MES، بتا- میرسن سنتاز؛ CDS، گاما- کادینن سنتاز؛ ZIS، آلفا- زینجبرن سنتاز؛ GES ژرانیول سنتاز

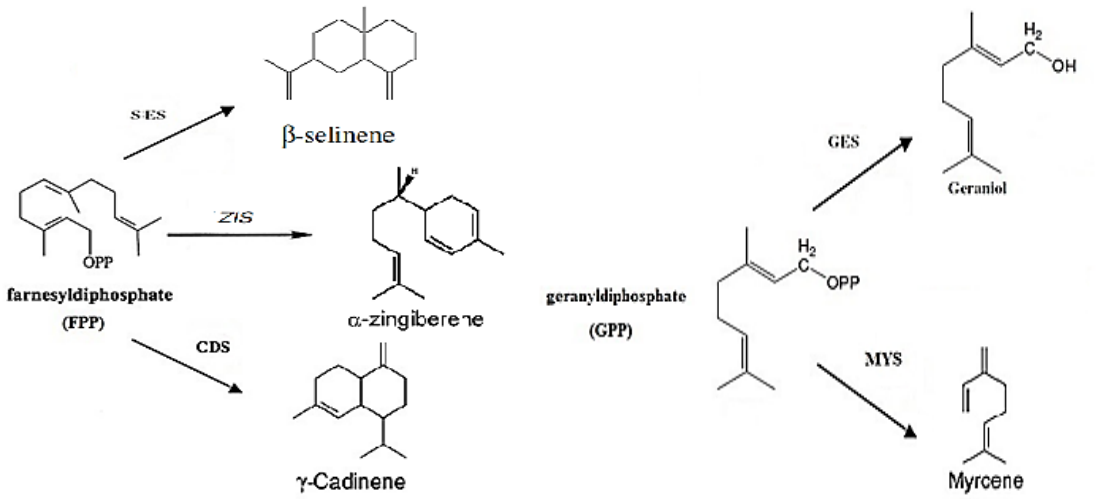
* نویسنده مسؤول: b.abdollahi@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۹ اسفند ۱۳۹۷؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۱۶ اسفند ۱۳۹۸؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۰ اردیبهشت ۱۳۹۹

doi: 10.29252/jmp.19.75.204

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

قلب است [۸]. ترپنوئیدها بزرگ‌ترین و وسیع‌ترین گروه از متابولیت‌های ثانویه با بیش از ۲۰ هزار ترکیب شناخته شده می‌باشند و نقش‌های اکولوژیکی مختلفی را در گیاهان ایفا می‌کنند [۹]. این ترکیبات به طور وسیعی به عنوان دارو، طعم‌دهنده، عطر و رنگ مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۸]. گیاهان دارای دو مسیر بیوسنتز ترپنوئید هستند که در چگونگی تولید واحدهای پنج کربنه با هم اختلاف دارند (شکل ۱)؛ مسیر کلاسیک Mevalonic acid (MVA) و مسیر Methyl erythritol phosphate (MEP) [۱۲]. این دو مسیر نه تنها در محل انجام و مواد اولیه، بلکه در محصولات نهایی نیز با هم اختلاف دارند. مسیر MVA با منابع Isopentenyl diphosphate) IPP) سیتو سولی آغاز می‌شود و بوسیله آنزیم Isopentenyl Diphosphate Isomerase به Dimethylallyl diphosphate DMAPP برای ساخت ترکیبات سزکوئی‌ترپن‌ها تبدیل می‌شود، در حالی‌که مسیر پلاستیدی MEP، ترکیبات IPP و DMAPP را برای مونوترپن‌ها فراهم می‌کند [۱۴].



شکل ۱. نحوه بیوسنتز بتا-میرسین، ژرانیول و گاما-کادینن در ریحان، Selinene synthase (*SES*)، *beta-myrcene synthase* (*MES*)، *gamma-cadinene synthase* (*CDS*)، *alpha-zingeberene synthase* (*ZIS*) و *Geraniol synthase* (*GES*)

در سال‌های اخیر، ارزش بازارهای جهانی داروهای گیاهی که شامل گیاهان دارویی و فرآورده‌های آنهاست، همواره با رشد قابل توجهی رو به افزایش بوده است. با توجه به اینکه بخش اعظم بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود، لذا متابولیت‌های ثانویه گیاهی از ارزش اقتصادی و همچنین ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند و سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها معمولاً پیچیده و پرهزینه می‌باشد. بنابراین تولید متابولیت‌ها با استفاده از روش‌های مختلف زیست فناوری راه جایگزین سودمندی است [۱]. اسانس‌ها و دیگر مواد مؤثر گیاهان دارویی زمینه بسیار مناسب برای صادرات دارند و در ارتقاء ارزش افزوده حاصله از کشت گیاهان دارویی دارای اهمیت به سزایی می‌باشند. اسانس‌ها از جمله مواد لازم در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی و بهداشتی هستند. کشورهای مصرف‌کننده مانند ایران دارای گیاهانی هستند که اسانس‌ها بر بنیاد آنها شکل می‌گیرد و با توجه به قابلیت‌های گسترده گونه‌های گیاهی، می‌توان علاوه بر جلوگیری از خروج مبالغ زیادی ارز از کشور، در زمره‌ی صادرکنندگان اسانس قرار گرفت [۱۷].

اسانس ریحان (حدود یک درصد) شامل ترکیبات متنوع و پیچیده می‌باشد که به دو گروه ترپنوئیدها (مونوترپن و سزکوئی‌ترپن) و فنیل پروپانوئیدها تقسیم می‌شوند. تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی تحت کنترل ژنتیکی است ولی عوامل محیطی بویژه شرایط تنش‌زا نقش عمده‌ای در کمیت و کیفیت این مواد به عهده دارند [۵]. اثر تنش خشکی بر متابولیت‌های ثانویه در برخی گیاهان دارویی اغلب موجب افزایش بعضی از ترکیبات یا ثابت ماندن آنها می‌شود [۶]. تأثیر تنش خشکی بر محصولات زراعی در ایران به طور مفصل مورد بررسی قرار گرفته است ولی متأسفانه در مورد گیاهان دارویی که حتی ممکن است تأثیر مثبتی نیز بر خواص دارویی آنها داشته باشد، تحقیق جامع و مفصل کمتر صورت گرفته است. همچنین با توجه به اینکه هر چه مقدار مواد مؤثره یک گیاه دارویی بیشتر باشد استحصال آن در صنایع داروئی مقرون به صرفه می‌باشد، شناخت عوامل مؤثر بر کیفیت و کمیت مواد مؤثره گیاهان داروئی مورد توجه محققین قرار گرفته است [۲]. در ریحان گزارش شده که تنش خشکی میزان بیان ژن‌های سینامات ۴-هیدروکسیلاز (*C4H*) و ۴-کومارات کوآنزیم A لیگاز (*CL4*) را کاهش می‌دهد [۷]. در گزارش دیگری در ریحان مشخص شد که تنش خشکی کنترل شده، بیان ژن لینالول سنتاز و میزان لینالول را افزایش می‌دهد [۱۳]. در گزارشی تأثیر تنش آبی با تیمارهای ۵۵، ۷۰، ۸۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای بر اسانس و اجزای تشکیل‌دهنده آن در گیاه ریحان بررسی شد. حداکثر میزان اسانس با آبیاری ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای به دست آمد و پایین‌ترین میزان آن مربوط به تیمار ۵۵ درصد بود. تعداد ترکیبات اسانس، با افزایش تنش آبی افزایش یافت و مقدار ترکیبات اصلی اسانس مثل لینالول، متیل چاویکول و ۱،۸-سینئول به طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش آبی قرار گرفت. در تنش آبی ۵۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای، اجزای متشکله اسانس به حداکثر مقدار خود رسیدند [۱۹]. با توجه به اینکه تاکنون تأثیر تنش خشکی بر بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز مونو و سزکوئی‌ترپن‌ها و ترکیبات تولید شده بوسیله آنها در ریحان مطالعه نشده است. بنابراین هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تنش خشکی بر بیان ژن‌های *Selinene synthase* (*SES*)، *beta-myrcene synthase* (*MES*)، *gamma-cadinene synthase* (*CDS*)، *alpha-Geraniol synthase* (*GES*) و *zingeberene synthase* (*ZIS*) و ترکیبات تولید شده بوسیله این ژن‌ها (بتا-میرسین، ژرانیول و گاما-کادینن) بود.

۲. مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر تنش خشکی بر بر بیان ژن‌های *ZIS*، *MYS*، *CDS*، *SES* و *GES* در رقم کشکنی لولوی ریحان، آزمایشی به صورت گلدانی در سال ۱۳۹۵ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و سه تکرار اجرا شد. پس از آماده‌سازی گلدان‌ها، تعدادی بذر داخل آنها کاشته و تا رسیدن به مرحله ۸-۶ برگی بوته‌ها، به طور یکسان آبیاری شدند و از این مرحله به بعد تنش خشکی با ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ (کنترل) درصد ظرفیت زراعی اعمال شد. در مرحله گلدهی کامل، برای مطالعه بیان ژن‌های *ZIS*، *MYS*، *CDS*، *SES* و *GES*، نمونه‌های برگی از ده بوته در هر تکرار برداشت و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. توالی ژن‌های مذکور از پایگاه‌های اطلاعاتی ذخیره و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزارهای Fast PCR و Gene Runner طراحی شد (جدول ۱).

استخراج RNA از نمونه‌های برگی با استفاده از محلول RNX-plusTM (سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد. جهت سنتز cDNA از کیت Revert Aid First Strand cDNA Synthesis (فرمنتاز، آلمان) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. برای بررسی صحت ساخت

cDNA از از واکنش‌های کنترل منفی RT (عدم استفاده از آنزیم Reverse transcriptase در مرحله سنتز cDNA) و NTC (عدم استفاده از RNA در مرحله سنتز cDNA) و همچنین از واکنش کنترل مثبت مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA استفاده شد. میزان بیان ژن‌ها با استفاده از Real time PCR (Rotor gene Q–Pure Detection– Qiagen) مدل ۶۰۰۰ (کیاژن– آمریکا) در گیاهان تیمار شده نسبت به کنترل بررسی شد. در این فرآیند از ژن‌های 18SrRNA و Actin به عنوان ژن مرجع جهت نرمال‌سازی استفاده شد. برای انجام واکنش Real time PCR از کیت Maxima SYBR Green/Fluoresence qPCR Master Mix (2x)(فرمنتاز، آلمان) استفاده شد. الگوی دمایی جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر با توجه به توالی آغازگرها و محصول حاصل از تکثیر ژن تعیین 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 تایید شد. پس از به دست آوردن Ct مقدار بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با روش ΔΔCt محاسبه شد. برای بررسی اختلاف بین تیمارهای تنش از لحاظ میزان نسبی بیان ژن‌های مورد مطالعه، آزمون t جفت نشده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گرفت.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورداستفاده در روش Real time PCR

نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)	دمای اتصال
ZIS	AY693646	F: 5´-GGCTTACGAGATTTTGCGAGACC-3´ R: 5´-CGTGGTTTCACAATGGATACACC-3´	۱۱۸	۶۰
GES	AY362553	F: 5´-GAGGCAAGAAGTCGCATTTTGG-3´ R: 5´-GTTGTAGACCAGTTCCCCATTCAG-3´	۷۲	۵۷
MYS	AY693649	F: 5´-AGGAGGCACGTGAGCACATCAG-3´ R: 5´-CACTCTCAAATGGACAGTCGTCG-3´	۹۳	۵۹
CDS	AY693645	F: 5´-TGGAAGGAAGTGAACGAGGGATGG-3´ R: 5´-TGTAACTCGCATCGCACATTCG-3´	۱۰۰	۵۹
SES	AY693643	F: 5´-ACAAGGTGGTGGGAAGAT-3´ R: 5´-GTTCGGTATTGTGGTTGGA-3´	۱۱۳	۶۰
ACTIN	AF282624	F: 5´-GCAGGGATCCACGAGACCC-3´ R: 5´-CCCACCATGAGCACCAC-3´	۹۵	۵۷
18S rRNA	AK059783	F: 5´-CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA-3´ R: 5´-ACACTTCACCGGACCATTCAA-3´	۶۵	۶۰

ZIS: *alpha-zingeberene synthase*, *GES*: *Geraniol synthase*, *MYS*: *beta-Myrcene synthase*, *CDS* :*gamma-cadinene synthase*, *SES*: Selinene synthase

۱.۲. *استخراج اسانس*

اسانس در مرحله گلدهی کامل با روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد. جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام شد. به طور کلی در اسانس ریحان رقم کشکنی لولو، ۴۰ ترکیب شناسایی شد که در تحقیق حاضر سه ترکیب (ترکیبات تولیدی توسط ژن‌های مطالعه شده) مورد مطالعه قرار گرفت. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری (RI)، مطالعه طیف های جرمی و مقایسه این طیف ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه های کامپیوتری و مراجع معتبر صورت گرفت. تجزیه آماری داده‌های مربوط به این ترکیبات به صورت طرح کاملاً تصادفی

با بهره‌گیری از نرم‌افزار SAS انجام شـــد. مقایســـه میانگین تیمارها نیز با استفاده آزمون دانکن انجام شد.

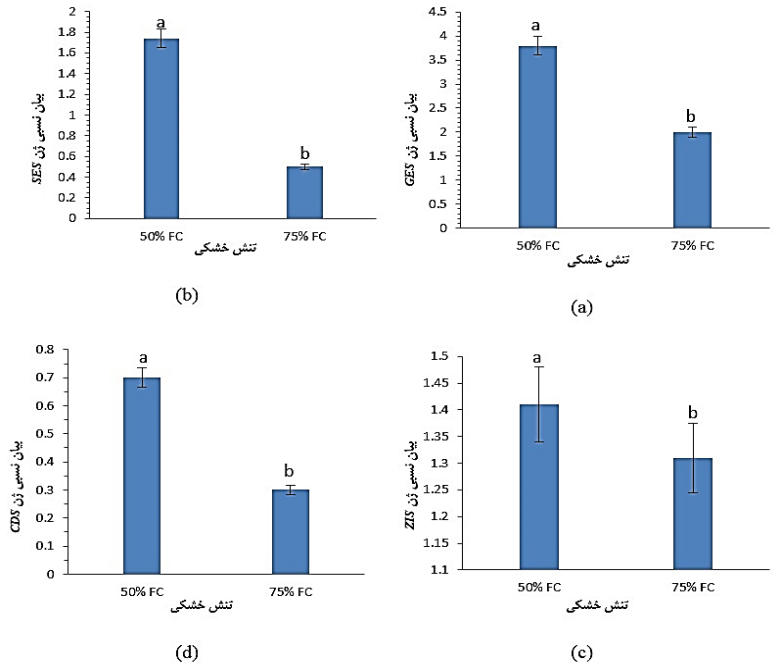
۳. نتایج

۱.۳. *اثر تنش خشکی بر بیان ژن‌های مورد مطالعه*

مقایسه میزان بیان ژن *GES* در تیمار ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد نشان داد که بعد از اعمال تنش خشکی، میزان بیان ژن *GES* در همه سطوح تنش خشکی افزایش یافت. میزان بیان این ژن در تیمار ۷۵ درصد ظرفیت زراعی ۲ برابر کنترل و در تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، ۳/۸ برابر کنترل افزایش یافت (جدول ۲ و شکل ۲a). مقایسه میزان بیان ژن *MYS* در تیمار ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد نشان داد میزان بیان این ژن در تیمار ۷۵ درصد ظرفیت زراعی ۱۶ برابر کنترل و در تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، ۱۷/۴ برابر کنترل افزایش یافت و نیز میزان بیان ژن *SES* در تیمار ۷۵ درصد ظرفیت به نصف کاهش یافت و در تیمار ۵۰ درصد به ۱/۷۴ برابر کنترل افزایش یافت (شکل ۲b). میزان بیان ژن *ZIS* در هر دو تیمار تنش خشکی نسبت به شاهد تغییر چندانی نکرد (شکل ۲c). همچنین بیان ژن *CDS* در هر دو تیمار نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد (شکل ۲d).

جدول ۲. نتایج آزمون *t* برای ژن‌های مورد مطالعه

	ژن				
	GES	***MYS***	***CDS***	***SES***	***ZIS***
مقدار *t*	−۳۲/۱۲۵	−۵/۳۶۷	۲۹/۷	۱۰/۳۸۳	−۱۵/۵۵۶
میزان احتمال	۰/۰۰۷	۰/۰۶۱	۰/۰۰۱	۰/۰۲	۰/۰۰۴



شکل ۲. مقایسه میانگین سطوح مختلف تنش خشکی بر بیان نسبی ژن‌های a) *GES*، b) *SES*، c) *ZIS* و d) *CDS* در گیاه ریحان، 50% FC: تنش خشکی در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، 75% FC: تنش خشکی در سطح ۷۵ درصد ظرفیت زراعی، (حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار تنش می‌باشد) *ZIS*: *alpha-zingeberene synthase*، *GES*: *Geraniol synthase*، *MYS*: *beta-Myrcene synthas*، *CDS*: *gamma-cadinene synthase*، *SES*: Selinene synthase

۲.۳. اثر تنش خشکی بر میزان ترکیبات بتامیرسین، گاماکادینن و ژرانیول

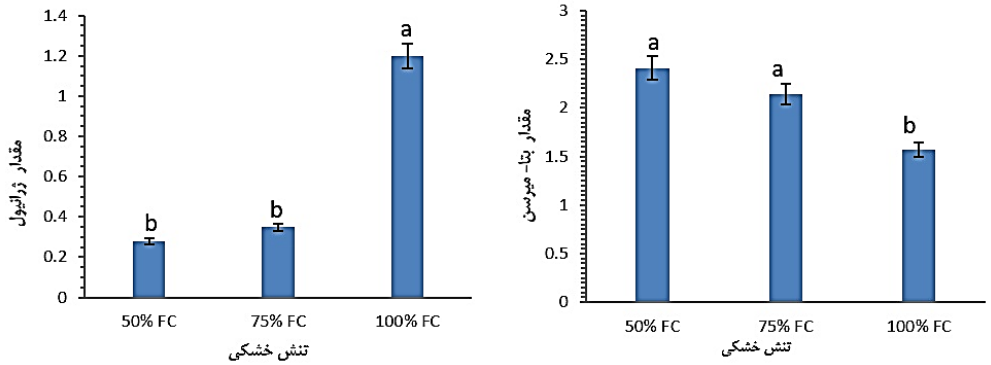
نتایج تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی بر ترکیبات بتامیرسین، گاماکادینن و ژرانیول (جدول ۳) نشان داد که میزان بتا-میرسن و ژرانیول در اسانس ریحان به طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرند ولی میزان گاما- کادینن تحت تأثیر تنش خشکی قرار نمی‌گیرند.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اعمال تنش خشکی در سطح ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی میزان بتا- میرسن را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش می‌دهد به طوری که بیشترین مقدار آن در تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده می‌شود (شکل ۳a). به نظر می‌رسد این افزایش به دلیل تأثیر تنش خشکی بر ژن *MYS* و افزایش میزان بیان این ژن می‌باشد. همچنین اعمال تنش شدید (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش متوسط (۷۵ درصد ظرفیت زراعی) مقدار ژرانیول را به طور معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) کاهش می‌دهد به طوری که بیشترین مقدار آن در تیمار شاهد (بدون اعمال تنش) مشاهده می‌شود (شکل ۳b).

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف تنش خشکی بر میزان ترکیبات مورد مطالعه در اسانس ریحان

	میانگین مربعات		
	بتا-میرسن	ژرانیول	گاما-کادینن
تنش خشکی	۰/۴*	۰/۸۶**	۰/۰۵۳ns
اشتباه آزمایشی	۰/۰۳۶	۰/۰۰۸	۰/۰۳۰
ضریب تغییرات	۹/۵۸	۱۴/۶۶	۱۰/۳۱

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۳. مقایسه میانگین مقدار بتا-میرسن (a) و ژرانیول (b) تحت تنش خشکی در ریحان، 50% FC: تنش خشکی در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، 75% FC: تنش خشکی در سطح ۷۵ درصد ظرفیت زراعی، 100% FC: بدون تنش ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی. حروف متفاوت روی نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها می‌باشد.

۴. بحث

یکی از تنش‌هایی که فیزیولوژی و رشد و توسعه گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد کمبود آب ناشی از خشکسالی (تنش خشکی) می‌باشد [۱۰]. در گیاهان دارویی تنش‌های محیطی مانند خشکی مقدار ترکیبات اسانس و کیفیت آن را تغییر می‌دهد [۳]. احتمالاً تاثیر تنش‌های محیطی بر کیفیت

و کمیت ترکیبات تشکیل دهنده اسانس از طریق تغییر بیان ژن‌ها یا فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز این ترکیبات باشد. در تحقیق حاضر تنش خشکی ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، بیان ژن *MYS* را به طور قابل توجهی نسبت به کنترل (به ترتیب ۱۶ و ۱۷/۴ برابر کنترل) افزایش داد هر چند بین دو تیمار تنش خشکی به لحاظ میزان بیان این ژن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. میزان بتا-میرسین نیز تحت تأثیر تنش خشکی ۷۵ و ۵۰ درصد به طور معنی‌داری افزایش یافت به طوری که بیشترین مقدار این ترکیب در تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) مشاهده شد. بنابراین با توجه به روند مشابه افزایش بتا-میرسین و ژن دخیل در بیوسنتز آن (*MYS*) تحت تنش خشکی در ریحان، احتمالاً تنش خشکی از طریق افزایش بیان ژن دخیل در بیوسنتز بتا-میرسین باعث افزایش مقدار این ترکیب شده است. عبدالهی مندولکانی و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کردند که تغییرات در بیان ژن های چاویکول O- متیل ترانسفراز (*CVOMT*) و اوژنول O- متیل ترانسفراز (*EOMT*) تحت تنش خشکی در ریحان با میزان متیل چاویکول و متیل اوژنول به طور معنی‌داری همبستگی دارد [۷]. در تحقیق دیگری نیز در ریحان گزارش شد که تنش خشکی بیان ژن لینالول سنتاز را افزایش می‌دهد و تحت تنش خشکی کنترل شده، بیان ژن لینالول سنتاز همبستگی مثبتی با انباشت لینالول دارد [۱۰].

در تحقیق حاضر هر دو سطح تنش خشکی بیان ژن *GES* را به ترتیب ۲ و ۳/۸ برابر کنترل افزایش داد ولی میزان ترکیب ژرانیول (ترکیب تولید شده بوسیله ژن *GES*) در هر دو تیمار خشکی به طور معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل کاهش یافت. کاهش مقدار ژرانیول علیرغم افزایش بیان ژن ژرانیول سنتاز، احتمالاً بخاطر کاهش فعالیت یا تخریب آنزیم *GES* در اثر تنش خشکی باشد. همچنین ممکن است تنش خشکی اثرات مخربی بر آنزیم‌ها و پروتئین‌های دخیل در تغییرات پس از ترجمه آنزیم *GES* گذاشته باشد و از این طریق مانع فعالیت این آنزیم شود. در مطالعه‌ای تأثیر Penconazole (یک قارچ‌کش از گروه تریازولی دارای خواص تنظیم‌کنندگی رشد گیاهی) روی میزان بیان دو ژن Pulegone reductase و Isopiperitenone reductase 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 دو ژن را افزایش می‌دهد. همچنین مقدار ترکیب پلیگون در این مطالعه افزایش ولی مقدار منتون کاهش یافت. در این مطالعه کاهش فعالیت یا تخریب آنزیم دخیل در بیوسنتز منتون در اثر تنش خشکی به عنوان دلیل کاهش مقدار ترکیب تولید شده گزارش شد [۱۱]. در مطالعه حاضر میزان بیان ژن *SES* در تیمار ۷۵ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافت ولی در تیمار ۵۰ درصد به میزان کمتری افزایش یافت. میزان بیان ژن *ZIS* در هر دو تیمار تنش خشکی نسبت به شاهد تغییر چندانی نکرد. همچنین بیان ژن *CDS* در هر دو تیمار نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد البته میزان ترکیب گاما-کادینن (ترکیب تولید شده بوسیله ژن CDS) نیز به طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش خشکی قرار نگرفت. عبدالهی مندولکانی و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند تنش خشکی در ریحان میزان بیان ژن‌های سینامات ۴-هیدروکسیلاز (*C4H*) و ۴-کومارات کوآنزیم A لیگاز (*4CL*) را کاهش می‌دهد [۷]. در تحقیق دیگری در ریحان تأثیر تنش خشکی بر بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها بررسی و گزارش شد که میزان بیان ژن ژرماکرین دی‌سنتاز در سطوح تنشی ۲۵ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی کاهش می‌یابد در حالی که در تیمار ۵۰ درصد سطح بیان ژن نسبت به کنترل افزایش یافت [۱۰]. در مطالعه دیگری در ریحان گزارش شد که بیان ژن اوژنول سنتاز ۱ (*EGS1*) در تیمار خشکی ۵۰ درصد ظرفیت زراعی تغییر چندانی نسبت به کنترل نداشته ولی در تیمار ۷۵ درصد ۹/۷۴

برابر کنترل افزایش یافت. در این مطالعه میزان بیان ژن *COMT* در هر دو تیمار نسبت به تنش خشکی تغییر چندانی نداشت ولی میزان بیان ژن *PAL* در هر دو تیمار تنش خشکی نسبت به کنترل ۱/۵ تا ۲ برابر افزایش یافت [۴]. بنابراین بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر و سایر گزارشات احتمال می‌رود بتوان از طریق اعمال تنش خشکی و افزایش بیان برخی ژن‌های دخیل در بیوسنتز ترپن‌ها مانند *MYS* محتوای ترکیبات ترپنی ریحان را افزایش داد.

مشارکت نویسندگان

اجرا و انجام آزمایشات بر عهده هر دو نویسنده بود. تعریف و طراحی موضوع و همچنین تحلیل داده‌ها بر عهده نویسنده دوم بود. هر دو نویسنده در نوشتن مقاله مشارکت داشتند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی و همچنین دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه بخاطر تامین هزینه و امکانات این پژوهش قدردانی می‌نماید.

منابع

1. Esmaeilzadeh Bahabadi S and Sharifi Mozaffar. Increasing the production of secondary metabolites using biotic elicitors. *J. Cell and Tissue* 2013; 4: 119-128.

2. Omid Beigi R and Mahmoudi Sourestani M. Effect of water stress on morphological traits, essential oil content and yield of Anise hyssop (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze). *Iranian J. Horticultural Science* 2010; 41: 153-161.

3. Salehi Arjmand H. Effect of environmental stresses on accumulation of secondary metabolites in plants. Proceeding of national congress in sustainable development of medicinal plants. Research Institute of Forests and Rangelands Publications. 2005: 305-307.

4. Abdolahi Mandoulakani B, Alipour M, Darvishzadeh R, Majroomi B. The effect of drought stress on the expression of genes encoding phenylalanine ammonia lyase (PAL), eugenol synthase 1 (EGS1) and caffeic acid O-methyltransferase (COMT) enzymes in Basil (*Ocimum basilicum*). *J. Agricultral Biotechnol*. 2017; 9: 117-128.

5. Farzaneh A, Ghani A and Azizi M. The effect of water stress on morphological characteristic and essential oil content of improved sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Plant Producton*. 2010; 17: 103-111.

6. Norzad S, Ahmadian A, Moghaddam M and Daneshfar E. Effect of drought stress on yield, yield components and essential oil in coriander treated with organic and inorganic fertilizers. *J. Crops Improvement*. 2014; 16: 289-302.

7. Abdollahi Mnadoulakani B, Eyvazpour E and Ghadimzadeh M. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochem*. 2017; 139: 1-7.

8. Bilal A, Jahan N, Ahmed A, Bilal SN, Habib Sh. and Hajra S. Phytochemical andpharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn-review. *International J. Current Res. and Rev*. 2012; 4(23): 73-83.

9. Davis EM and Croteau R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes, Biosynthesis: Aromatic polyketids, isoprenoids, alkaloids

(Vol. 29). *Berlin: Springer-Verlag Berlin*. 2000; pp. 53-95.

10. Gueta-Dahan Y, Yaniv Z, Zilinskas BA and Ben-Hayyim G. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta*. 1997; 203(4): 460-469.

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

12. Jain R, Sharma R and Kumar S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science* 2001; 80: 1-10.

13. Khakdan F, Alizadeh H, Ranjbar M and Shahriari Ahmadi F. The effect of water deficit stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of monoterpene and sesquiterpene in basil (*Ocimum basilicum*). *Biotechnology congress.* 2015; Tehran. Iran.

14. Lange BM, Rujan T, Martin W and Croteau R. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A*. 2000; 97: 13172-13177.

15. Lewinsohn E, Ziv-Raz I, Dudai N, Tadmor Y, Lastochkin E, Larkov O and Shoham Y. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. *Plant Sci*. 2000; 160(1): 27-35.

16. Makri O and Kintzios S. Ocimum sp. (basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. *J. Herbs, Spices & Medicinal Plants* 2008; 13(3): 123-150.

17. Marotti M, Piccaglia R and Giovanelli E. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *J. Agricultural and Food Chem*. 1996; 44(12): 3926-3929.

18. Misawa N. Pathway engineering for functional isoprenoids. *Current Opinion in Biotechnol*. 2011; 22: 627-633.

19. Omidbaigi R, Hassani A and Sefidkon F. Essential oil content and composition of sweet basil (*Ocimum basilicum*) at different irrigation regimes. *J. Essential Oil Bearing Plants* 2003; 6(2): 104-108.

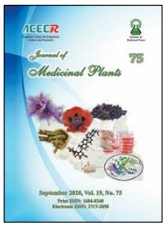
How to cite this article: Palesh H, Abdollahi Mandoulakani B. The effect of drought stress on the expression of some genes involved in monoterpene and sesquiterpanes biosynthesis and essential oil compounds in basil. ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(75): 204-212. doi: 10.29252/jmp.19.75.204

J. Med. Plants 2020; 19(75): 204-212

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

The effect of drought stress on the expression of some genes involved in monoterpene and sesquiterpanes biosynthesis and essential oil compounds in basil

Hamideh Palesh, Babak Abdollahi Mandoulakani*

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia Universiy

ARTICLE INFO

Keywords:
Basil
β-Myrcene
Drought stress
Gene expression
Geraniol

ABSTRACT

Background: Basil (*Ocimum basillicum* L.) is one of the most important medicinal plants belong to Lamiaceae family. Basil essential oil contains important terpenoid compounds, including monoterpanes and sesquiterpanes widely used in drug industries. **Objective:** In the current investigation, a completely randomized design-based experiment was conducted in greenhouse with three replications and treatments to study the effect of drought stress on the expression of some genes involved in monoterpanes and sesquiterpenes biosynthesis including selinene synthase (*SES*), beta-myrcene synthase (*MYS*), gamma-cadinene synthase (*CDS*), alpha-zingeberene synthase (*ZIS*) and geraniol synthase (*GES*), and the compounds produced by these genes in *O. basilicum* c.v. Keshkeni luvelou. **Methods:** Drought stress was applied at three levels of 100, 75 and 50% of field capacity (FC) at 6-8 leaf stages. **Results:** Analysis of gene expression data revealed that treatments 75% and 50% of FC increase the *GES* expression two and 3.8 times, *MYS* expression 16 and 17.4 times, and expression of the *ZIS* 1.31 and 1.41 times, respectively. The expression of *SES* gene was almost constant and the *CDS* expression was declined. **Conclusion:** the results of essential oil analysis showed that drought stress reduced the geraniol content, but increased beta-myrcene and gamma-cadinene contents. The results also showed that changes in *MYS* expression was consistent with the beta-myrcene content under drought stress conditions.

Abbreviations: SES, Selinene synthase; MES, beta-myrcene synthase; CDS, gamma cadinene synthase, ZIS, alpha-zingeberene synthase, GES, geraniol synthase

* Corresponding author: b.abdollahi@urmia.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.19.75.204
Received 10 March 2019; Received in revised form 6 March 2020; Accepted 29 April 2020

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)