

## اثر منگنز و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن منتون ردوکتاز و میزان منتول در گیاه دارویی نعناع فلفلی

### The effect of manganese and salicylic acid on gene expression of Menthone reductase and menthol content in *Mentha piperita*

دیاکو رسولی<sup>۱\*</sup>، محمود سلوکی<sup>۲</sup>، براتعلی فاخری<sup>۲</sup>، صدیقه اسمعیل زاده بهابادی<sup>۳</sup>  
Diako Rasouli<sup>1\*</sup>, Mahmood Solouki<sup>2</sup>, Barat Ali Fakheri<sup>2</sup>, Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل

1- M.S.c of Agriculture Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol.

2- Associated Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol.

3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: diakorasouli@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۵)

#### چکیده

به منظور بررسی اثر منگنز و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن منتون ردوکتاز (MR) و میزان منتول در گیاه نعناع فلفلی آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل زمان (۱، ۳ و ۵ روز بعد از اعمال تیمار) و تیمار (منگنز با غلظت ۵۰۰ میکرومولار و اسید سالیسیلیک با غلظت یک میلی مولار) انتخاب شدند. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد اثر منگنز و اسید سالیسیلیک در طول سه زمان تأثیر معنی داری بر بیان ژن MR و میزان منتول داشتند. کمترین میزان بیان ژن MR و میزان منتول تحت تأثیر منگنز در روز پنج بعد از اعمال تیمار بود که اختلاف معنی داری با شاهد داشت. بیشترین میزان بیان ژن MR و میزان منتول نیز تحت تأثیر اسید سالیسیلیک در پنج روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد. نتایج اثر متقابل منگنز و اسید سالیسیلیک نشان داد که اسید سالیسیلیک تا حدودی باعث کاهش سمیت ناشی از منگنز هم در بیان ژن MR و هم در میزان منتول شد. نتایج کلی این آزمایش بیانگر آن بود که ارتباط مستقیمی بین ژن MR و میزان منتول در گیاه نعناع فلفلی وجود داشت، به طوری که با گذشت زمان با افزایش بیان ژن MR تحت تأثیر اسید سالیسیلیک میزان منتول نیز افزایش یافت در حالی که تحت تأثیر منگنز هم بیان ژن MR و هم میزان منتول کاهش نشان داد. از طرفی مشاهده شد که اسید سالیسیلیک به عنوان یک هورمون قوی عمل کرده و باعث تعدیل اثر منگنز در بیان ژن MR و میزان منتول در گیاه نعناع فلفلی شد.

#### واژه‌های کلیدی

بیان ژن  
منتول ردوکتاز  
منتون  
*Mentha piperita*

## مقدمه

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L. متعلق به خانواده Lamiaceae است. این گیاه گونه‌ای هیبرید است و از تلاقی بین گونه‌های *M. aquatica* و *M. spicata* حاصل شده است. بومی مناطق معتدله دنیا به ویژه اروپا، آمریکای شمالی و شمال آفریقا است، اما امروزه در سراسر دنیا کشت می‌شود (Singh *et al.*, 2011). نعناع فلفلی محتوی 1/2 تا 1/5 درصد روغن‌های فرار است که ترکیب‌های اصلی آن را منتول، منتون متوفوران، متیل استات و غیره تشکیل می‌دهد. (Klayman, 1985).

منتول جزء اصلی اسانس نعناع فلفلی است و شناخته شده‌ترین مونوترپن است که هم به‌عنوان یک ترکیب خالص از مواد تشکیل دهنده و هم یک جزء از روغن‌های ضروری گیاهان گونه *Mentha* از خانواده Lamiaceae است (Bauer *et al.*, 1997). منتول دارای خاصیت تسکین دهنده است و برای دردهای موضعی مفید و ضد عفونی کننده است (Macro and Barbera, 1990).

در مسیر بیوسنتز ترپن‌ها موسوم به مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) منتول طی هشت مرحله تولید می‌شود که ابتدا ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) و دی متیل الیل دی فسفات (DMAPP) بوسیله آنزیم ژرانیل دی فسفات سنتاز (GPPS) به ژرانیل دی فسفات (GDP) تبدیل می‌شود و سپس بوسیله آنزیم لیمون سنتاز (LS) حلقوی شده و به لیمون تبدیل می‌شود، لیمون هم طی یک سری واکنش‌های اکسید و احیاء و ایزومریزاسیون به منتون تبدیل می‌شود. منتون هم تحت تأثیر آنزیم منتون ردوکتاز (MR) یا منتول دهیدروژناز که وابسته به NADPH است به منتول تبدیل می‌شود (Croteau *et al.*, 2005). مسیر بیوسنتز اجزاء تشکیل دهنده اسانس در گیاه مورد پژوهش مسیری چند آنزیمی است که فعالیت هر یک از این آنزیم‌ها می‌تواند مقدار هر یک از مواد موجود در اسانس به خصوص ترکیبات اصلی را تحت تأثیر قرار

دهد. عوامل مؤثر بر کیفیت اسانس گیاهان نیز ممکن است با تأثیر بر آنزیم‌های ذکر شده وارد عمل شوند. Kjonaas و همکاران (1982) در پژوهشی به بررسی متابولیسم مونوترپن‌ها و تشکیل منتول و نئومنتول از منتون توسط آنزیم‌های دهیدروژناز در برگ نعناع فلفلی پرداختند و عنوان کردند که منتول اصلی‌ترین ترکیب اسانس نعناع فلفلی بوده که توسط آنزیم منتون ردوکتاز از منتون تولید می‌شود. چگونگی تنظیم روند انباشته شدن مونوترپن‌ها در برگ نعناع نیز از نظر فیزیولوژیک مشخص شده است (Gershenzon *et al.*, 1989). از طرفی مشخصات ملکولی، توالی آمینواسیدی و نقش آنزیم منتون ردوکتاز نعناع فلفلی در تشکیل منتول برگ مشخص شده است (Davis *et al.*, 2005).

تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی تحت کنترل عوامل ژنتیکی است از طرفی عوامل محیطی به‌ویژه شرایط تنش‌زا مانند فلزات سنگین نقش عمده‌ای در کمیت و کیفیت این مواد به عهده دارند (Bupesh *et al.*, 2007). منگنز یکی از عناصر ضروری و کم‌مصرف در تغذیه گیاهان محسوب شده که فراوانی آن در گیاه به‌صورت فلز سنگین عمل کرده و باعث ایجاد مسمومیت می‌شود (Haji boland and Khosropanah, 2005). از جمله مهم‌ترین علائم مسمومیت منگنز در اندام هوایی توقف رشد، کلروز بین رگبرگی، کاهش کلروفیل و در نتیجه کاهش مواد مؤثره گیاه است (Blamey *et al.*, 1999).

در پژوهش‌های صورت گرفته توسط Grattan و Grieve (1999) مشخص شد که تنش فلزات سنگین باعث برهم‌زدن تعادل تغذیه‌ای و کاهش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود. آن‌ها بیان کردند با تکمیل عناصر مورد نیاز از طریق خاک یا محلول‌پاشی می‌توان وضعیت رشد و در نتیجه مواد مؤثره گیاه را تا حدی بهبود بخشید. امروزه با توجه به ملاحظات زیست محیطی استفاده از اسید سالیسیلیک برای بهبود خصوصیات کمی، کیفی و شیمیایی محصول‌های زراعی، دارویی و باغی رواج پیدا کرده

فلغلی در سه زمان مختلف بصورت یک، سه و پنج روز بعد از محلول‌پاشی با منگنز و اسید سالیسیلیک برداشت شد و تیمار نیز شامل منگنز به صورت سولفات منگنز ( $MnSO_4$ ) در غلظت ۵۰۰ میکرومولار (hashemi et al., 2012) و اسید سالیسیلیک در غلظت یک میلی مولار (sayyari et al., 2009) بود. همچنین به منظور بررسی اثر متقابل منگنز و اسید سالیسیلیک ابتدا منگنز و به فاصله یک روز بعد، اسید سالیسیلیک اعمال و در سه زمان مختلف برداشت شد. آب مقطر نیز به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

#### استخراج منتول

برای استخراج و اندازه‌گیری منتول، بوته‌ها در دمای اتاق (حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و در سایه خشک شوند و سپس با استفاده از دستگاه کلونجر و روش تقطیر با آب، اسانس‌گیری شدند. تعیین منتول با استفاده از دستگاه GC/Mass انجام شد. از هر نمونه خشک شده ۱۰۰ گرم آسیاب شد و به مدت دو ساعت با استفاده از روش تقطیر با آب، اسانس‌گیری (Gerhart) و درصد آن تعیین شد. ترکیب‌های تشکیل‌دهنده فرجه تجاری توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف سنج جرمی (GC/MS) (کروماتوگرافی گازی (GC) مدل Agilent 7890 متصل شده با طیف سنج جرمی (Mass) مدل Agilent 5975) ستون HP-5MS و نیمه قطبی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میکرون، دتکتور MS، گاز حامل هلیوم (He)، سرعت جریان گاز حامل یک میلی‌لیتر بر دقیقه، برنامه حرارتی ۶۰-۲۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد) در مؤسسه دانش پژوهان تهران تجزیه شد. پس از تزریق اسانس به دستگاه‌های نامبرده، با استفاده از زمان بازداری ترکیب‌ها (tR)، اندیس بازداری (RT) طیف جرمی و مقایسه این پارامترها با ترکیب‌های استاندارد و یا با اطلاعات موجود در کتابخانه نسبت به شناسایی منتول اقدام شد.

است. اسید سالیسیلیک به خاطر نقش‌های متنوع تنظیم‌کنندگی در سوخت‌وساز گیاه و القاء بیان ژن یک هورمون گیاهی قوی شناخته شده است که به‌عنوان یک مولکول سیگنالی نقش کلیدی مهمی را در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی، متابولیت‌های ثانویه و مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارد (He et al., 2005). بنابراین در این تحقیق اثر منگنز به عنوان یک قلمز سنگین و اسید سالیسیلیک به عنوان یک القاء‌کننده گیاهی، بر بیان ژن متون ردوکتاز که در مسیر بیوسنتز منتول دخالت دارد مورد پژوهش قرار گرفت. به‌طور کلی هدف از این تحقیق بررسی رابطه مقدار منتول با بیان ژن متون ردوکتاز تحت تأثیر منگنز و اسید سالیسیلیک است.

#### مواد و روش‌ها

##### کشت ریزوم

جهت بررسی اثر منگنز و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن متون ردوکتاز و میزان منتول در گیاه دارویی نعنای فلغلی آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در پاییز ۱۳۹۲ در پژوهشکده زیست فناوری (بیوسنتز) دانشگاه زابل انجام شد. ریزوم‌های نعنای فلغلی از کلکسیون گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه شد. ریزوم‌های جوان در گلدان‌هایی به ابعاد ۲۰×۲۵ در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده زیست فناوری کشت شوند. کشت ریزوم‌ها در عمق یک سانتی‌متری از سطح خاک صورت گرفت. هر گلدان حاوی سه تا چهار ریزوم بوده و خاک گلدان‌ها نیز مخلوط مساوی از خاک برگ و خاک هوموس بود. گلدان‌ها در شرایط یکسان در دمای روزانه ۲۵ تا ۳۰ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. آبیاری بصورت روزانه طوری که خاک گلدان‌ها مرطوب باشد صورت گرفت. پس از دو تا سه ماه گیاه نعنای فلغلی آماده محلول‌پاشی و برداشت شد (soltani et al., 2008).

فاکتورهای آزمایش شامل زمان و تیمار بود که بخش هوایی نعنای

نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo, Wilmington, USA) به روش طیفسنجی انجام شد. پس از طیفسنجی به منظور همسانسازی غلظت cDNAهای تولید شده، رقیق سازی cDNAها با آب مقطر فاقد DNase به غلظت تقریبی ۳۰۰ ng/μl صورت گرفت و غلظت نهایی توسط نانودراپ تایید شد.

توالی ژن MR و ژن B-actin به عنوان ژن مرجع (Housekeeping gene) از NCBI دانلود شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی ژنهای MR و B-actin با استفاده از نرم افزار Oligo Therapeutics و سایت Oligonucleotide Properties Calculator انجام گرفت.

درصد کمی این ترکیب نیز با محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرافها محاسبه شد (Ozturk et al., 2004).

مطالعه بیان ژن منتون ردوکتاز

استخراج RNA از برگهای نعناع فلفلی بر اساس دستورالعمل پیشنهادی از کیت CinnaPure RNA (شرکت سیناژن، ایران) صورت گرفت. کمیت RNA کل به وسیله اسپکتوفتومتر و کیفیت آن توسط الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. سنتز cDNA (دی.ان.ا. معکوس) با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit شرکت ویوانتیس انجام گرفت.

کمیت سنجی cDNAهای ساخته شده با استفاده از دستگاه

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژنهای منتون ردوکتاز و بتا اکتین

Table 1- Specific primers designed genes of menthone reductase and beta-actin

کد دسترسی Accession number	طول قطعه پی.سی.آر. Length of PCR product	دمای اتصال Annealing temperature	توالی آغازگرها Primer sequence	ژن Gene
AY288138.1	204	58	F: 5' CGGGTTTCGAGATATGCAGGCAG 3' (22mer) R: 5' GCAACAGCGCTAGCAGGGTCAG 3' (22mer)	منتون ردوکتاز MR
AW255057.1	138	58	F: 5' GACCACCTCATGAAGATCTTAACC 3' (24mer) R: 5' ATTCTCGTAGTCCAAAGC3' (18mer)	بتا اکتین B-actin

بسط ترکیبی بود. الگویابی منحنی ذوب از ۵۰ تا ۹۹ درجه در پایان واکنش برای هر PCR جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش انجام شد. برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی و دو تکرار بیولوژیکی وجود داشت که اغلب تفاوت آنها کمتر از ۰/۵ بود. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Real time PCR داده‌های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و از روش  $\Delta\Delta Ct$  برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها با سه تکرار و سه نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

تکثیر ژنهای MR و B-actin به منظور اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR بر اساس دستورالعمل پیشنهادی کیت HotTaq EvaGreen qPCR Mix (شرکت سیناژن، ایران) صورت گرفت. تعیین کمیت نسبی در Real time PCR به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسینس در نتیجه اتصال رنگ (Eva Green) با استفاده از دستگاه (RG-3000 Corbett Research) انجام شد.

برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از Real time PCR یکسان و شامل: ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه جهت فعال سازی ابتدایی آنزیم طی ۴۰ دوره، سپس ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه به منظور واسرشت شدن، ۵۸ درجه به مدت ۴۵ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و در نهایت ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه جهت

## نتایج

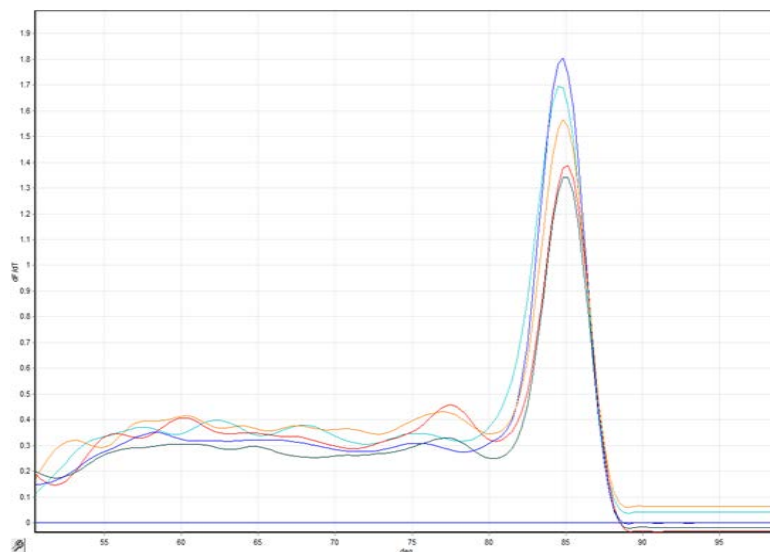
## نتایج تجزیه و تحلیل در Real Time PCR

تغییرهای بیان ژن منتون ردوکتاز در سه زمان مختلف تحت تأثیر منگنز و اسید سالیسیلیک اندازه‌گیری شد. منحنی تکثیر ژن‌های MR و B-actin با استفاده از Real Time PCR نشان دادند که تکثیر به خوبی و با عملکرد مناسب و بدون هیچگونه آلودگی صورت گرفته است (شکل ۱).

اثر اسید سالیسیلیک و منگنز بر بیان ژن MR در طول سه زمان نشان داد بیشترین میزان بیان ژن تحت تأثیر اسید سالیسیلیک در پنج روز بعد از اعمال تیمار بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. کمترین بیان ژن نیز تحت تأثیر منگنز در پنج روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد که منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن MR نسبت به شاهد شد (شکل ۲).

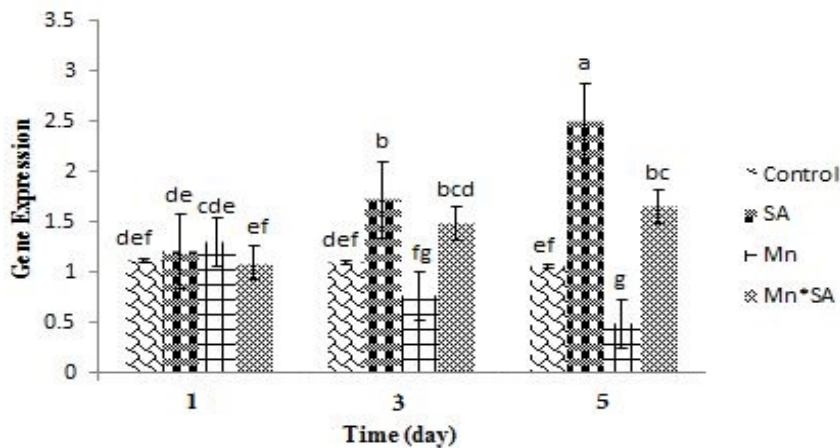
## اثر منگنز و اسید سالیسیلیک بر میزان منتول

ترکیب غالب اسانس بخش هوایی نعناع فلفلی در تحقیق حاضر در گروه شاهد و گروه تحت تیمار منتول بود. بررسی مقدار منتول تحت تأثیر منگنز و اسید سالیسیلیک نشان داد که بیشترین میزان منتول در پنج روز بعد از اعمال تیمار و تحت تأثیر اسید سالیسیلیک بود در حالی که کمترین میزان آن تحت تأثیر منگنز مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت. همچنین در سه روز بعد از اعمال تیمار اختلاف معنی‌داری بین منگنز و اسید سالیسیلیک با شاهد وجود داشت. از طرفی در پنج روز بعد از محلول‌پاشی نشان داده شد که اسید سالیسیلیک در اثر متقابل با منگنز تا حدودی باعث افزایش منتول شد اما این افزایش به اندازه اسید سالیسیلیک نبود.



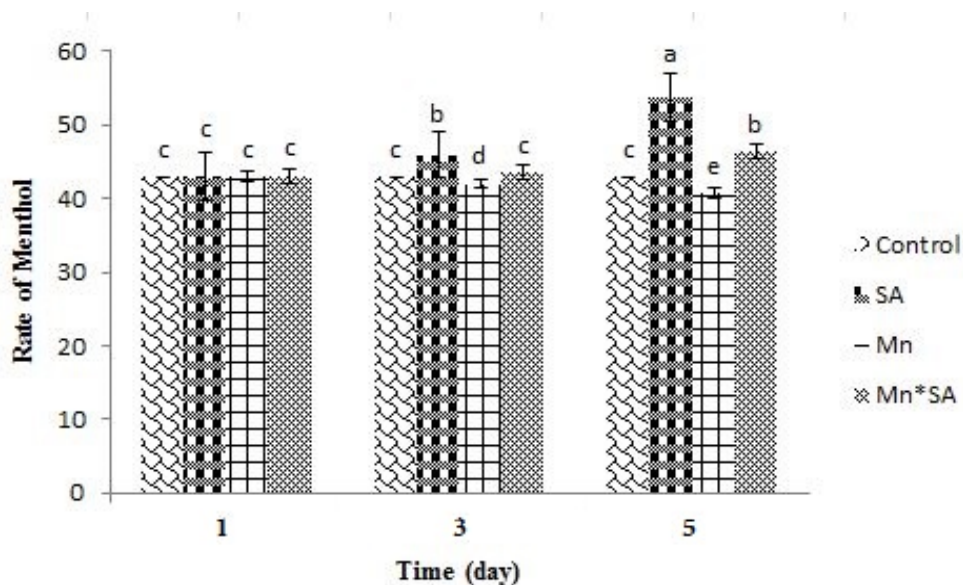
شکل ۱- منحنی ذوب ژن MR. هر Peak نمایانگر یک محصول PCR است که اختصاصی بودن محصول را نشان می‌دهد.

Figure 1- The melting curve of MR gene. Each Peak represents a PCR product that indicates specificity of the product.



شکل ۲- بیان ژن MR تحت تأثیر منگنز و اسید سالیسیلیک در زمان‌های مختلف. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد است.

**Figure 2-** Gene expression of menthone reductase under manganese and salicylic acid at different times. Similar letters are not significantly different at 5% probability.



شکل ۳- مقدار منتول تحت تأثیر منگنز و اسید سالیسیلیک در زمان‌های مختلف. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح پنج درصد است.

**Figure 3-** Rate of menthol under manganese and salicylic acid at different times. Similar letters are not significantly different at 5% probability.

### بحث و نتیجه گیری

همان‌طور که در شکل دو مشاهده شد اسید سالیسیلیک به‌عنوان الفاء‌کننده بیان ژن عمل کرده و باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن MR در پنج روز بعد از اعمال تیمار نسبت به شاهد شد، درحالی‌که منگنز به‌عنوان فلز سنگین کاهش معنی‌دار بیان ژن MR در

همان‌طور که در شکل دو مشاهده شد اسید سالیسیلیک به‌عنوان الفاء‌کننده بیان ژن عمل کرده و باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن MR در پنج روز بعد از اعمال تیمار نسبت به شاهد شد، درحالی‌که منگنز به‌عنوان فلز سنگین کاهش معنی‌دار بیان ژن MR در

مشاهده شد که اسید سالیسیلیک باعث افزایش بیان ژن MR شد. مقایسه بیان این ژن با میزان منتول نشان داد که با افزایش بیان این ژن تحت تأثیر اسید سالیسیلیک در سه و پنج روز بعد از اعمال تیمار، میزان منتول هم افزایش یافت. در اثر متقابل منگنز و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن MR در سه و پنج روز بعد از اعمال تیمار مشاهده شد که اسید سالیسیلیک تا حدودی از اثر منفی منگنز بر بیان ژن MR کاسته و باعث تعدیل سمیت ناشی از منگنز شد به طوری که در میزان منتول نیز این افزایش مشاهده شد که با پژوهش Hashemi و همکاران (2012) مطابقت دارد.

پژوهش‌ها نشان داده است که عوامل محیطی و استرس‌زا همواره ترکیب شیمیایی و اسانس گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Zheljzkov and Warman, 2003). در تحقیق حاضر هر چند منگنز باعث افزایش کلی اسانس شد اما این تنش باعث کاهش میزان منتول (بیشترین ترکیب اسانس نعنای فلفلی) اسانس شد که می‌توان دلیل آن را کاهش بیان ژن منتون ردوکتاز تحت تأثیر غلظت بالای منگنز دانست. غلظت بالای منگنز ممکن است با کاهش محتوای کلروفیل و یا فتوستتوز همراه شده (Chatterjee et al., 2006) و بدین ترتیب از یک سو به کاهش رشد و از سوی دیگر به کاهش میزان فراهم شدن برخی پیش‌سازهای ترکیب‌های فنلی مورد نیاز مانند منتول برای سنتز اسانس‌ها، منتهی شود.

در این تحقیق مشخص شد بیان ژن MR تأثیر مستقیمی با تولید منتول در گیاه نعنای فلفلی دارد به طوری که با افزایش بیان ژن MR میزان منتول نیز افزایش یافت در حالی که با کاهش بیان این ژن درصد منتول نیز کاهش نشان داد. همچنین با توجه به این که تنش ناشی از فلزات سنگین به خصوص منگنز به عنوان یک عامل سمی و محدودکننده در بیان ژن و تولید اسانس است بنابراین مقابله با این تنش‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده که در این تحقیق با توجه به خواص القاء‌کنندگی و هورمونی اسید سالیسیلیک، نقش این ترکیب بر تعدیل تنش حاصل و همچنین افزایش بیان ژن و تولید منتول ضروری بوده و توانسته اثرات مخرب منگنز را مهار

بیان ژن MR تأثیر مستقیمی در تولید منتول داشته است، مطابقت دارد. Zarinkamar و همکاران (2012) پژوهشی را با عنوان بیان ژن لیمونن سنتاز تحت غلظت‌های مختلف منگنز در گیاه زیره انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که منگنز در غلظت‌های پایین (۲۰ و ۴۰ ppm) باعث افزایش بیان ژن لیمونن سنتاز می‌شود در حالی که در غلظت بالا (۱۶۰ ppm) باعث کاهش معنی‌دار بیان آن ژن می‌شود. در این بررسی نیز با توجه به بالا بودن غلظت منگنز و در نتیجه سمی بودن آن به عنوان فلز سنگین، مشاهده شد که این عنصر باعث کاهش بیان ژن MR و در نتیجه میزان منتول گیاه نعنای فلفلی شد. در توجیه این نتیجه این گونه می‌توان بیان کرد که با توجه به این که منگنز (در غلظت‌های بسیار پایین) به عنوان یک ریزمغذی بر بیوستتوز لیمونن که ابتدایی‌ترین مونوترپن حلقوی در مسیر بیوستتوزی مونوترپن‌ها بوده و نقش پیش‌ساز جهت تولید بخش عمده‌ای از ترکیب‌های ترپنی دارد، به اثبات رسیده است (Maruyama et al., 2001)، اما در این بررسی احتمالاً به دلیل غلظت بالای منگنز و در نتیجه سمی بودن آن به عنوان فلز سنگین در ترکیب بیوستتوزی مونوترپن‌ها و به طبع آن کاهش میزان منتول نقش عکس را بر بیوستتوز مونوترپن‌ها داشته و در نتیجه باعث کاهش بیان ژن MR و میزان منتول شده است.

همچنین بررسی نتایج بیان ژن MR در گیاه *M. Piperita* تحت تأثیر اسید سالیسیلیک نشان داد که این هورمون در پنج روز بعد از اعمال تیمار، نقش القاء‌کننده داشته و باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن MR نسبت به شاهد شد. بیان ژن MR تحت تأثیر اسید سالیسیلیک به عنوان یک ماده علامت‌رسان کلیدی که در فعال-سازی پاسخ‌های دفاعی گیاهان شرکت می‌کند، افزایش یافت (Durner et al., 1997). اسید سالیسیلیک در تنظیم و ایجاد علامت‌هایی برای تجلی ژن‌ها در زمان پیری در گیاه *Arabidopsis thaliana* (Morris et al., 2000) و همکاران (2001) در پژوهشی نشان دادند اسید سالیسیلیک موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به بیوستتوز و تولید گروهی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شود. با توجه به نقش اسید سالیسیلیک در القاء بیان ژن در این تحقیق نیز

افزایش تولید آن را از طریق افزایش بیان ژن متون ردوکتاز تحت تأثیر الیستورهای دیگر در پژوهش‌های آینده پیشنهاد نمود.

کند. بنابراین با در نظر گرفتن خواص دارویی متول و ارزش اقتصادی آن در صنایع داروسازی، بهداشتی و آرایشی می‌توان

### منابع

- Bauer K, Garbe D and Surburg H. 1997.** Common fragrance and flavor materials. Wiley-VCH, New York, NY, pp 50-54.
- Blamey FPC, Joyce DC, Edwards DG and Asher CJ. 1999.** Role of trichomes in sunflower tolerance to manganese toxicity. *Journal of Plant and Soil Science* 91(2): 171-180.
- Bupesh G, Amutha C, Nandagopal S, Ganeshumar A, Sureshkumar P and Murali K.S. 2007.** Antibacterial activity of *Mentha piperita L.* (Peppermint) from leaf extracts – a medicinal plant. *Acta Agriculturae Slovenica* 89(1): 62-73.
- Chatterjee C, Gopal R and Dube BK. 2006.** Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum L.*). *Science Horticulturae* 108: 1-6.
- Croteau RB, Davis EM, Ringer KL and Wildung MR. 2005.** (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften* 92(12): 562-577.
- Davis EM, Ringer KL, McConkey ME and Croteau R. 2005.** Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. *Plant physiology* 137(3): 873-881.
- Durner J, Shah J, Klessig DF. 1997.** Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Science* 7: 266-274.
- Gershenzon J, Maffei M and Croteau K. 1989.** Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichome of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant physiology* 89: 1351-1357.
- Grattan SR and Grieve CM. 1999.** Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Science Horticulturae* 78: 127-157.
- Haji boland R and Khosropanah MK. 2005.** Manganese toxicity tolerance in plants, sunflower, rice and maize in hydroponic conditions. *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 9(4): 91-108. [In Farsi with English abstract]
- Hashemi SH, Asrar Z and Pourseydi SH. 2012.** Effect of Pretreatment of seeds with salicylic acid on manganese toxicity in *Lepidium sativum L.* *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28(2): 248-259. [In Farsi with English abstract]
- He Y, Liu Y, Cao W, Huai M, Xu B and Huang B. 2005.** Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. *Journal of Crop Science* 45(3): 988-995.
- Kjonaas R, Martinkus-Taylor C and Croteau R. 1982.** Metabolism of monoterpenes: Conversion of l-menthone to l-menthone and neomenthol by stereospecific dehydrogenases from peppermint (*Mentha piperita*) leaves. *Plant physiology* 69: 1013-1017.
- Klayman DL. 1985.** Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science* 228(4703): 1049-1055.
- Maruyama T, Ito M, Kiuchi F and Honda G. 2001.** Molecular cloning, functional expression and characterization of d- Limonene synthase from *Schizonepeta tenuifolia*. *Biological & pharmaceutical bulletin* 24(4): 373-377.
- Macro J.A. and Barbera O. 1990.** Natural products from the genus *Artemisia L.* *Stud. Nat. Prod. Chem.* 7: 201-264.
- Morris K and Mackerness SAH. 2000.** Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* 23(5):677-685.
- Ozturk A, Unlukara A, Ipek A and Gurbuz B. 2004.** Effects of Salt Stress and Water Deficit on Plant Growth and Essential oil Content of Lemon Balm (*Melissa officinalis L.*). *Pak. J. Bot* 36(4): 787-792.
- Sayyari M, Babalar M, Kalantari, S, Serrando M and Valero D. 2009.** Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology Technology*, 53: 152-154.
- Singh R, Shushni AM, Belkheir A. 2011.** Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita L.* *Arabian Journal of Chemistry* 1: 1-5.
- Soltani F, Sharifi M, Khajeh K, Yousefzadi M. 2008.** Study of essential oil composition, menthone reductase activity and antimicrobial activity of *Mentha piperita* in two stages of growth. *Iranian Journal of Biology* 21 (5): 62-70. [In Farsi with English abstract]
- Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M. 2001.** Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *European. Journal of Biochemistry* 268(14): 4086-4094.
- Zarinkamar F, Ghannadnia M, Haddad R. 2012.** Limonene synthase gene expression under different concentrations of manganese in *Cuminum cyminum L.* *African Journal of Plant Science* 6(6): 203-212.
- Zheljazkov VR, Warman PH. 2003.** Application of high Cu compost to Swiss chard and basil. *The Science of the Total Environment* 302(1): 13-26.