زیست فناوری گیاهان دارویی
سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹٤

تاثیر کیتوزان بر بیان ژن منتول دهیدروژناز و میزان منتول در نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) به روش Real time PCR

صالحه نادری[۱*]، براتعلی فاخری[۲] و حمیده خواجه[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۰

چکیده

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L. از جمله گیاهان دارویی و معطر با ارزش است که به دلیل کاربردهای گوناگون آن در صنایع مختلف دارویی در سطح وسیعی از مزارع کشت می‌شود. در مسیر بیوسنتز ترپن‌ها موسوم به مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) منتول طی هشت مرحله بوجود می‌آید که در مسیر انتهایی آن منتون توسط آنزیم منتول دهیدروژناز (منتون ردوکتاز) به منتول تبدیل می‌شود. کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی است که به عنوان الیسیتور زیستی برای بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی استفاده می‌شود. در این مطالعه آزمایشی به صورت طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل اجرا گردید. تیمار کیتوزان در چهار سطح ppm ۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ اعمال گردید. نتایج نشان داد میزان بیان ژن منتول دهیدروژناژ، منتول، نئومنتول و منتون نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. بنابراین به نظر می‌رسد به عنوان الیسیتور زیستی این تیمار باعث افزایش بیان ژن منتول دهیدروژناژ، منتول، نئومنتول و منتون و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود.

واژگان کلیدی: بیان ژن، منتون دهیدروژناز، منتول، نعناع، Real time PCR

[۱] دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل Email: Salehe.naderi@gmail.com
[۲] دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران
[۳] کارشناس پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه زابل، ایران

مقدمه

نعناع فلفلی با نام علمی (*Mentha piperita* L.)که نام عمومی آن Peppermint است، متعلق به خانواده Lamiaceae می‌باشد (Leung and Foster, 1996; Bupesh et al., 2007). این گیاه بومی مناطق معتدله دنیا به ویژه اروپا، آمریکای شمالی و شمال آفریقا می‌باشد، اما امروزه در سراسر دنیا کشت می‌شود (Singh et al., 2011). این گونه‌ی نعناع از گیاهان دارویی بسیار مهم محسوب می‌شود و حاوی اسانس فراوانی می‌باشد. در طب سنتی از گیاه خشک شده نعناع فلفلی و اسانس آن برای کاهش اشتها، سرماخوردگی، سرفه، تب، تهوع، سردرد استفاده شده و همچنین دارای اثرات ضداسپاسم، ضدنفخ و سوءهاضمه می‌باشد (Leung and Foster, 1996; Sousa et al., 2010). همچنین اسانس نعناع فلفلی بسیار متنوع و با ارزش اقتصادی بالا است که به مقدار زیاد در طعم دهنده‌ها و یا افزودنی‌های غذایی، خمیر دندان و دیگر محصولات بهداشتی و فرمولاسیون دارویی به کار می رود (Valmorbida and boaro, 2007; Mucciarelli and Maffei, 2003). اسانس گیاه نعناع فلفلی با دارا بودن ترکیباتی از جمله سینئول، لیمونن، لینالول و منتول دارای فعالیت ضدباکتریایی و ضد ویروسی است (Duarte *et al*., 2005). عمده-ترین جزء اسانس نعناع منتول است که جزء مونوترپن-ها می‌باشد. در مسیر بیوسنتز ترپن‌ها در نعناع ابتدا ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP) و دی متیل الیل دی فسفات (DMAPP) بوسیله آنزیم ژرانیل دی فسفات سنتاز به ژرانیل دی فسفات (GDP) تبدیل می‌شود و سپس بوسیله آنزیم لیمونن سنتاز حلقوی شده و به لیمونن تبدیل می‌شود و لیمونن هم طی یک سری واکنش‌های اکسید و احیا و ایزومریزاسیون به منتون تبدیل می‌شود. منتون هم تحت تأثیر آنزیم منتون ردوکتاز یا منتول دهیدروژناز که وابسته به NADPH می‌باشد به منتول تبدیل می‌شود (Croteau and Gershenzon, 1994). روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیر زیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao et al., 2005). کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی است. کیتوزان یک پلی ساکارید پلی کاتیونی، به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد برای افزایش تولید متابولیت-های ثانویه گیاهان دارویی زیادی تأیید شده‌است (Cheng et al., 2006). مطالعات اندکی در زمینه استفاده از الیسیتورها به منظور تولید بیشتر متابولیت-های ثانویه گیاه نعناع فلفلی انجام شده‌است. افزایش تولید دو ترکیب فنلی اسید رزمارینیک (RA) و اسید کافئیک (CA) تحت تأثیر متیل جاسمونات گزارش شده‌است (Kim et al., 2006). تحقیقات نشان داده است الیگومرهای کیتوزان وکیتین فعالیت آنزیم های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) وتیروزین آمونیالیاز (TAL) را در برگ‌های سویا افزایش می‌دهد (Wajahatullah et al., 2003). افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر کیتوزان نیز گزارش شده است (Esmaeilzadeh et al., 1391). بررسی‌ها نشان داده کیتوزان باعث افزایش سریع و قابل توجهی در میزان مشتقات فنیل‌پروپانوئیدی در کشت تعلیقی نارگیل می‌شود (Chakraborty et al., 2009). از آنجائیکه نقش آنزیم منتول دهیدروژناز در ساخت منتول بسیار ضروری است، و با توجه به مصارف متعدد اسانس نعناع فلفلی در صنایع داروسازی، غذایی، آرایشی و بهداشتی و همچنین به لحاظ اهمیت آن در سلامت جامعه، بنابراین هدف از مطالعه حاضر بیان ژن منتول دهیدروژناز (منتون ردوکتاز) برای تولید منتول و میزان مواد موثره در گیاه دارویی نعناع فلفلی بوده-است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش ریزوم‌های نعناع فلفلی از محل چاه نیمه دانشگاه زابل تهیه و در گلدان‌ها در خاک تقریباً سبک از مخلوط مساوی ماسه الک شده، رس، گیاخاک و کود حیوانی کشت شد. پس از کشت، گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند و در در دمای روزانه ۲۵ تا ۳۰ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا انتهای مرحله گلدهی رشد کردند. گلدان‌ها روزانه آبیاری شدند و هفته ای دو بار به آنها مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon 1938) داده شد. اعمال محلول کیتوزان در مرحله پیش‌گلدهی با غلظت‌های ppm ۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ به صورت محلول‌پاشی روی سطح برگ و در طی سه مرحله انجام شد سپس اندام‌های هوایی گیاه پس از تیمار کیتوزان به منظور مطالعات بعدی، برداشت شدند. به این منظور بخش هوایی گیاهان از سطح خاک قطع گردید و بخشی از گیاهان برای آزمایش‌های مولکولی با نیتروژن مایع تثبیت شدند و در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بخشی دیگر به منظور استخراج اسانس درصدی از گیاه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳ هفته دور از نور مستقیم، گرما و سرما خشک شدند.

اسانس‌گیری

جهت استخراج اسانس گیاه نعناع فلفلی از روش تقطیر با آب (Hydrodistilation) و دستگاه اسانس-گیر طرح کلونجر (Clevenger apparatus) استفاده شد. بدین ترتیب که عمل اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت ادامه یافت و مایع روغنی بدست آمده به وسیله مواد جاذب رطوبت (سولفات سدیم) خشک شد. اسانس به دست آمده به دقت توزین شده و در ظرف-های تیره رنگ تا هنگام آنالیز در یخچال نگهداری شد (Shibamoto et al. 1987).

آنالیز اسانس با GC-MS

برای آنالیز اسانس‌ها، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی Thermoquest-Finnigan مدل (USA) Jas Chromatograph 5890 Hewlett- Packard مجهز به ستون DB-5 به طول ۵۰ متر و قطر داخلی ۰/۲ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای آون از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان یک میلی‌متر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد.

شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری (RI)، مطالعه طیف های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS صورت گرفت (Adams 2001). درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام GC به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد (Shibamoto et al. 1987).

مطالعه بیان ژن منتول دهیدروژناز

برای استخراج Total RNA از برگ ریحان، از کیت سیناژن محلول RNaX Plus همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵ درصد و آب DEPC (دی اتیل پیرو کربنات) طبق پروتکل شرکت سیناژن استفاده شد. پس از استخراج RNA کل، کیفیت آن به وسیله الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. مرحله بعد از استخراج RNA سنتز DNA معکوس با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit ساخت شرکت Vivantis بود. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های منتول دهیدروژناز و توبولین با استفاده از نرم افزار Oligo Therapeutics و سایت Oligonucleotid Properties Calculator انجام شد (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- آغازگر طراحی شده برای ژن منتول دهیدروژناز

Gene name	Primer sequence	GC (%)
Forward	TCGGGTTCGAGATATGAGCAG - 5'-3'	56.0
Reverse	ACCAGGACACTGAATTTATGC - 5'-3'	55.0

جدول ۲- آغازگر طراحی شده برای ژن توبولین

Gene name	Primer sequence	GC (%)
Forward	CTCCTTGAGCTAGTCGTCGC - 5'-3'	60.0
Reverse	ACAAGGCAAAAACATTCCG - 5'-3'	40.0

تکثیر ژن‌های منتول دهیدروژناز و توبولین برای اندازه گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت.کمیت نسبی در Real time PCR به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ (Eva Green) با استفاده از دستگاه (RG-3000 Corbett Research) انجام گرفت. استفاده از روش Real time PCR یکسان و طبق جدول ۲ بود. پس از انجام واکنش تکثیر به روش QReal time PCR داده‌های خام به صورت Ct (Thresholdcycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد و از روش ΔΔCt برای تجزیه داده‌ها استفاده شد.

جدول۳- شرایط دمایی و زمانی واکنش Real time PCR

مرحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال‌سازی ابتدایی آنزیم	۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه
۴۰ چرخه شامل مراحل زیر	
واسرشت شدن	۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه
اتصال آغازگرها	۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه
بسط ترکیبی	۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه
منحنی ذوب	افزایش دما از ۵۰ درجه تا ۹۹ درجه هر ۵ ثانیه یک درجه

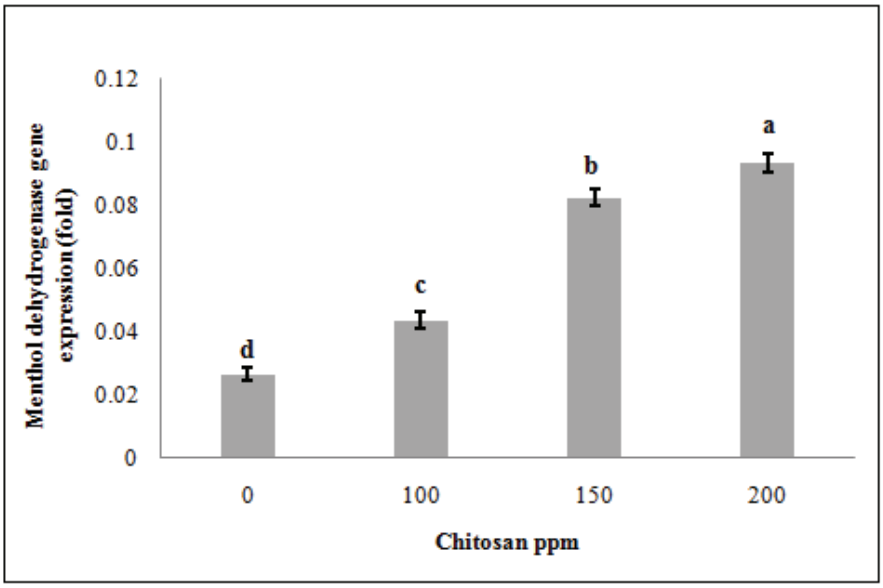
تجزیه وتحلیل آماری

آزمایش با ۳ تکرار و ۳ نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم افزار SASو آزمون چند دامنه‌ای درسطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

تاثیر کیتوزان بر بیان ژن منتول دهیدروژناز

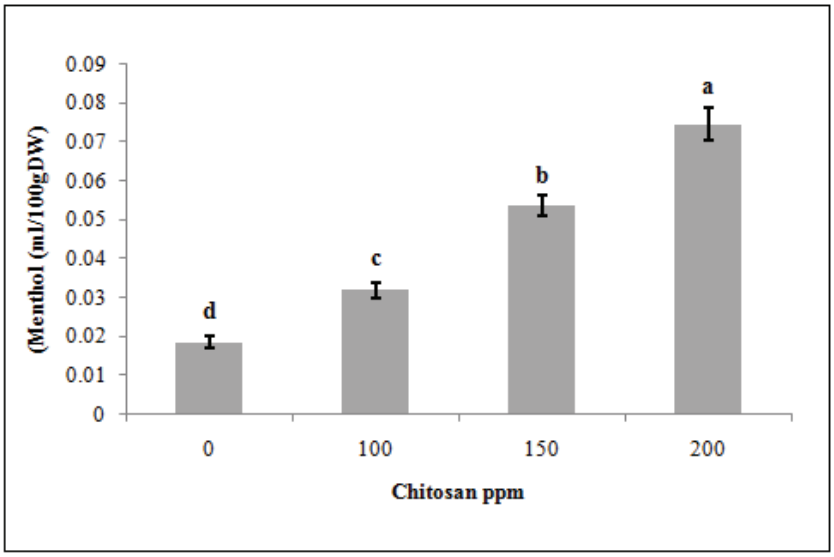
نتایج بررسی میزان بیان ژن منتول دهیدروژناز تحت تاثیر کیتوزان نشان داد با افزایش غلظت کیتوزان از صفر (نمونه شاهد) تا ppm ۲۰۰ میزان بیان ژن منتول دهیدروژناز افزایش یافت. به طوری که غلظت-های مختلف (ppm۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) کیتوزان نسبت به شاهد باعث افزایش معنی‌داری میزان بیان ژن منتول دهیدروژناز شد (شکل۱).



شکل ۱- میزان بیان ژن منتول دهیدروژناز تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

تاثیر کیتوزان بر میزان منتول

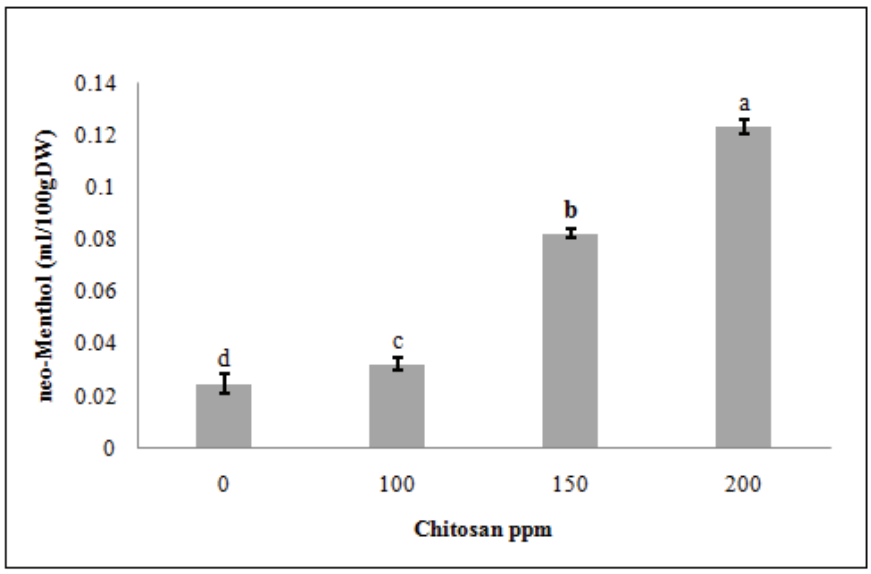
بررسی میزان منتول تحت تأثیر کیتوزان نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان از صفر (نمونه شاهد) تا ۲۰۰ ppm میزان منتول از یک روند افزایشی پیروی می‌کند. به طوری که غلظت‌های مختلف (۱۰۰ppm، ۱۵۰ و ۲۰۰) کیتوزان نسبت به شاهد باعث افزایش معنی‌داری میزان منتول شد (شکل ۲).



شکل۲- مقدار منتول تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری درسطح ۵ درصد می‌باشد.

تاثیر کیتوزان بر میزان نئومنتول

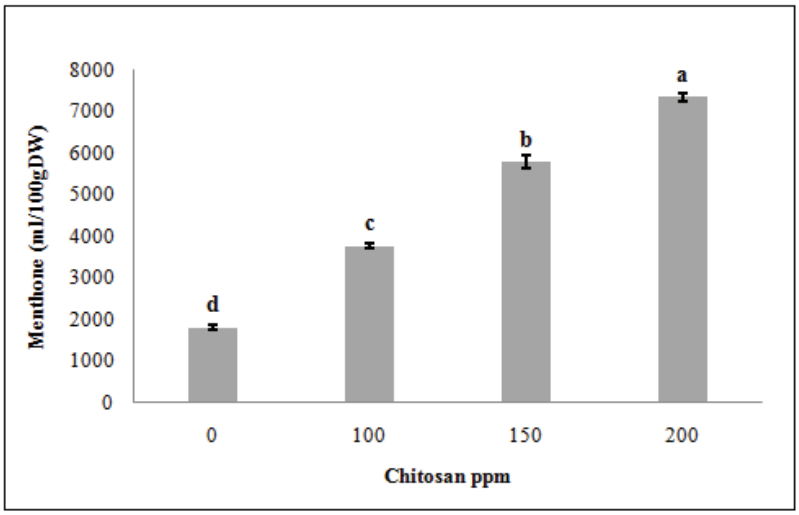
بررسی میزان نئومنتول تحت تأثیر کیتوزان نشان داد بیشترین میزان نئومنتول در غلظت ۲۰۰ ppm کیتوزان مشاهده شد و به همین ترتیب میزان نئومنتول نسبت به نمونه‌های شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۳).



شکل۳- مقدار نئومنتول تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری درسطح ۵ درصد می‌باشد.

تاثیر کیتوزان بر میزان منتون

نتایج بررسی میزان بیان ژن میـزان منتـون تحـت تاثیر کیتوزان نشان داد با افـزایش غلظـت کیتـوزان از صفر (نمونه شاهد) تا ppm ۲۰۰ میزان منتون افزایش یافت. به طوری که غلظـت‌هـای مختلـف (ppm۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) کیتوزان نسبت به شـاهد باعـث افـزایش معنی‌داری در میزان منتون شدند (شکل۴).



شکل۴- مقدار منتون تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری درسطح ۵ درصد می‌باشد.

بحث

گیاهان طیف وسیعی از ترپنوئیدها را می‌سازند کـه ممکن است مسئول بـرهمکنش‌هـای آللوپـاتی باشـند. مونوترپنوئیدها ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس‌ها بوده و بعنوان مـاده اصـلی آللوپـاتی در گیاهـان عـالی شناخته شده و بر جوانه‌زدن دانه، رشد بعضی از سـویه هـای بـاکتری، حشـرات و قـارچ‌هـای بیمـاریزا اثـرات

بازدارنده دارند. جنس نعناع منبع طبیعی و مهمی از مونوترپن‌ها است که در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی استفاده می‌شود و نعناع فلفلی از جمله گیاهانی است که اسانس آن از لحاظ اقتصادی مهم است (Mucciarelli et al., 2001). این گیاه حاوی ۱/۵-۲ درصد اسانس می‌باشد که ۲۵-۶۲ درصد منتول، ۱۳-۴۰ درصد منتون، ۱-۴ درصد منتوفوران و ۰- ۰/۲۵ درصد لیمونن و غیره در آن وجود دارد (Baser, 1993). تشکیل اسانس در این گیاهان تحت تأثیر عوامل خارجی مانند دما، رطوبت، طول دوره روشنایی و زمان برداشت و عوامل داخلی مانند رشد رویشی و سن گیاه می‌باشد که بر مقدار و ترکیب اسانس این گیاهان اثر می‌گذارند (Farooqi et al., 1999). مطالعات نشان داده است که عوامل محیطی و استرس‌زا همواره ترکیب شیمیایی و اسانس گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Zheljazkov and Warman, 2003). در تحقیق حاضر، نتایج بررسی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس نعناع فلفلی در مرحله پیش‌گلدهی نشان داد که مهمترین ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس منتول، نئومنتول و منتون می‌باشد. نعناع فلفلی محتوی ۱/۲ تا ۱/۵ درصد روغن‌های فرار است که ۳۰ تا ۷۰ درصد آن را منتول و استرهای منتول و بیش از ۴۰ ترکیب دیگر تشکیل می‌دهد. ترکیبات اصلی اسانس نعناع فلفلی را منتول (۴۰ تا ۵۰ درصد)، منتون (۲۰ تا ۳۰ درصد)، متیل استات (۱ تا ۳ درصد) و غیره تشکیل می‌دهد، سایر ترکیباتی که در اسانس این نوع نعناع یافت می‌شوند، شامل فلاونوییدها (۱۲ درصد)، پلی‌فنل‌های پلیمریزه شده (۱۹ درصد)، کاروتن، توکوفرول، بتایین (betain) و کولین (choline) می‌باشند (Murray, 1995). مونوترپن‌ها به عنوان گروهی از هیدروکربن‌های گیاهی با ساختار حلقوی و خواص ضد ویروسی و ضد التهابی شناخته می‌شوند (Chiang et al., 2005; Peana et al., 2002). منتول جزء اصلی اسانس نعناع فلفلی می‌باشد (Lawerence, 1981). منتول مسلماً شناخته شده ترین مونوترپن است که هم به عنوان یک ترکیب خالص از مواد تشکیل دهنده و هم یک جزء از روغن-های ضروری گیاهان گونه *Mentha* از خانواده Lamiaceae می‌باشد (Bauer et al., 1997). منتول دهیدروژناز یا منتون ردوکتاز آخرین مرحله از مسیر بیوسنتز منتول است که باعث تبدیل منتون به منتول می‌شود. در حقیقت، بر اساس استنباط ژنتیکی (Croteau and Gershenzon, 1994) و تظاهر مستقیم (Kjonaas et al., 1982) دو کتوردوکتاز وابسته به NADPH به صورت مجزا در منتون فعالیت می‌کنند که یکی از این کتوردوکتوزها برای تبدیل محصول از منتون به منتول است و دیگری تبدیل کتوردوکتوز به نئومنتول است. در گیاه نعناع فلفلی، منتول حدود۴۰ تا ۵۰ درصد محتوای اسانس را در مرحله بلوغ گیاه شامل می‌شود در حالی که سایر مواد تشکیل دهنده اسانس به کمتر از چند درصد می‌رسد (Lawerence, 1981). به این ترتیب، با توجه به موارد گفته شده تنها تبدیل منتون به منتول از بیشترین اهمیت برخوردار است. مطالعات اندکی در مورداثر الیسیتورها بر میزان بیان ژن منتول دهیدروژناز صورت گرفته‌است. تحقیق حاضر نخستین گزارش تأثیر کیتوزان بر بیان ژن منتول دهیدروژناز و اسانس گیاه نعناع فلفلی است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، مانند کتین و کیتوزان، باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Kang et al., 2004; Pu et al., 2009). مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز تحت تاثیر کیتوزان نیز افزایش می‌یابد (Chakraborty et al. 2009). در این تحقیق غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میزان بیان ژن منتول دهیدروژناز مورد بررسی قرار گرفت نتایج بررسی بیان ژن منتول دهیدروژناز در مرحله پیش‌گلدهی در غلظت‌های مختلف کیتوزان بیانگر این بود که بیان ژن در غلظت‌های مختلف (۱۰۰ppm، ۱۵۰ و ۲۰۰) سیر افزایشی داشت به طوری که بیشترین مقدار بیان ژن منتول دهیدروژناز در غلظت ppm ۲۰۰ کیتوزان حاصل گشت. به‌طور

کلی روند تغییرات میزان بیان ژن با روند تغییرات ترکیبات اسانس همچون منتول، نئو منتول و منتون در غلظت‌های مختلف کیتوزان مطابقت داشت به طوریکه با افزایش بیان ژن منتول دهیدروژناز مقدار منتول، نئو منتول و منتون اسانس گیاه افزایش می-یابد. بررسی فعالیت آنزیم منتول دهیدروژناز در گونه *M. Piperita* نشان داد که فعالیت آنزیم منتول دهیدروژناز تحت تیمار اسید سالیسیلیک به طور معنی داری افزایش نشان داد به طوری که تفاوت بسیار معنی‌داری با شاهد داشت (Durner et al., 1997). بیان ژن منتول دهیدروژناز تحت تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک به عنوان یک ماده علامت رسان کلیدی که در فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی گیاهان شرکت می-کند (Durner et al., 1997)، افزایش یافت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در مطالعه‌ای تحت تاثیر کیتوزان میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز افزایش یافته که حداکثر فعالیت پس از گذشت ۳ روز مشاهده شد (Esmaeilzadeh et al., 1391) . که با نتایج حاضر مطابقت داشت. Ziaei et al. (2012) گزارش کردند روند تغییرات میزان بیان ژن و فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز با روند تغییرات میزان متیل چاویکول اسانس در مراحل مختلف رشد ریحان مطابقت دارد که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر نزدیک می‌باشد. از آنجائیکه در این تحقیق نتایج حاصل از میزان بیان ژن منتول دهیدروژناز در مرحله پیش‌گلدهی با نتایج حاصل از بازده اسانس مطابقت دارد، بنابراین می‌توان از کیتوزان به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود در بسیاری از گیاهان دارویی استفاده کرد و به نظر می‌رسد این گامی با ارزش در جهت مهندسی متابولیت و تولید داروهای گیاهی باشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص شد بیان ژن منتول دهیدروژناز تأثیر مستقیمی با تولید منتول اسانس در گیاه نعناع فلفلی دارد به طوری که با افزایش فعالیت منتول دهیدروژناز میزان منتول اسانس نیز افزایش یافت در حالی که با کاهش فعالیت این ژن درصد منتول نیز کاهش نشان داد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و همکاری صمیمانه آقایان محسن نادری، مهدی نادری و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل (بیوسنتر) تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

Adams, R. P. (2001). Identification of essential oils components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Illinois, USA, 119-146.

Baser, K. H. C. (1993). Essential oils of *Anatolian Labiatae* A profile. Acta Horticulturae, 333, 217-238.

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), 9- 73.

Chakraborty, M. Karun, A. Mitra, A. (2009). Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of Cocosnucifera. Journal of Plant Physiology, 166, 63-71.

Cheng, X. Zhou, U. Cui, X. (2006). Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. Journal of Biotechnology, 121, 253-260.

Chiang, L. C. Ng, L. T. Cheng, P. W. Chiang, W. Lin, C. C. (2005). Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 32, 811-816.

Croteau, R. M. and Gershenzon, J. (1994). Genetic control of monoterpene biosynthesis in mints (*Mentha: Lamiaceae*). Genetic engineering of plant Secondary Metabolism, 193-229.

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

Durner, J. Shah, J. and Klessig, D. F. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends Plant Science, 7, 266-274.

Duarte, M. C. Figueira, G. M. Sartoratto, A. Rehder, V. L. and Delarmelina, C. (2005). Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 97, 305- 311.

Esmaeilzadeh Bahabadi, S, Sharifi M, Safaie N, Behmanesh M (2012) Enhancement of lignin and phenylpropanoid compounds production by chitosan in Linum album cell culthure. Journal of Plant Biology 11:13-26.

Farooqi, A. H. A. Sangwan, N. S. and Sangwan, R. S. (1999). Effect of different PHotoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in Mentha species. Plant growth regulation, 29, 181-18.

Hoagland, D. R. Arnon, D. I (1938). The water-method for growing plants without soil. Berkeley: University of California.

Kang, S. M. Jung, H. Y. Kang, Y. M. Yun, D. J. Bahk, J. D. Yang, J. K. Choi, M.S. (2004) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of Scopoliaparviflora. Plant Science, 166, 745-751.

Kim, H. Y. Chen, F. Wang, Z. Rajapakse, N. (2006). Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 2327-2332.

Kjonaas, R. Martinkus-Taylor, C. and Croteau, R. (1982). Metabolism of monoterpens: Conversion of l-menthone to l-menthone and neomenthol by sterospecific dehydrogenases from peppermint (*Mentha piperta*) leaves. Plant physiolology, 69, 1013- 1017.

Lawrence, B. M. (1981). Monoterpene interrelationships in the Mentha genus: a biosynthetic discussion. In: Mookherjee BD, Mussinan CJ (eds) Essential oils. Allured, Wheaton, IL, pp1-81.

Leung, A. Y. and Foster, S. (1996). Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetic. John Wiley and Sons, 355-369.

Mucciarelli, C. Camusso, W. Bertea, C. M. Bossi, S. Maffei, M. (2001). Effect of pulegone and other oil componets of *Mentha piperita* on cucumber respiration. Phytochemistry, 57, 91-98.

Murray, M. T. (1995). The healing power of herbs: the enlightened persons guide to the wonders of medicinal plants. Rocklin, CA:Prima Puub, xiv. 410.

Peana, A. T. D'Aquila, P. S. Panin, F. Serra, G. Pippia, P. Moretti M. D. L. (2002). Antiinflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. Phytomedicine, 9, 721-726.

Pu, G. B. Dong-Ming, M. Chen, J. L. Ma, L. Q. Wang, H. Li, G. F. (2009). Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in Artemisia annuaL. Plant Cell Report, 28, 1127-1135.

Shibamoto, T. Sandra, P. Bicchi, C. (1987). Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Plant Science, 135, 921- 927.

Singh, R. Shushni, A. M. and Belkheir, A. (2011). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arabian Journal of Chemistry,1,1-5.

Sousa, A. A. S. Soares, P. M. G. de Almeida, A. N. S. Maia, A. R. de Souza, E. P. and Assreuy, A. M. S. (2010). Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. Journal of Ethnopharmacol, 130, 433-446.

Wajahatullah, K. h. Balakrishnan, P. Donald, S. (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. Journal of Plant Physiology, 160, 859- 863.

Zhao, J. Davis, L. C. Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23, 283-333.

Zheljazkov, V. R. and Warman, P. H. (2003). Application of high Cu compost to Swiss chard and basil .The Science of the Total Environment, 302, 13-26.

Ziaei, M. Sharifi, M. Behmanes, M. Razavi, K. (2012). Gene expression and activity of phenyl alanine ammonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stage. Journal of Biotechnology, 10, 32-39.