

الگوی بیان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز منتول در اندام‌های مختلف نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)

سهیلا افکار^{۱*}، قاسم کریم‌زاده^۲ و مختار جلالی جواران^۲

۱- استادیار، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور لرستان، خرم‌آباد

۲- دانشیار، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۲)

چکیده

نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و معطر است. منتول ترکیب اصلی و ویژه اسانس نعناع فلفلی است که در صنایع داروسازی، آرایشی و غذایی استفاده می‌شود. این کار با هدف مطالعه بیان ژن‌های پولگان‌ردوکتاز (*Pr*)، منتوفوران‌سینتاز (*Mfs*) و لیمون‌سینتاز (*Ls*) مسیر بیوسنتز منتول در اندام‌های مختلف (گل، برگ و ساقه) در زمان شروع گلدهی انجام شد. برای انجام این پژوهش، گیاهان نعناع فلفلی از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه و به گلدان‌ها در گلخانه منتقل شدند. با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها مشخص شد که بین اندام‌های برگ، ساقه و گل از نظر میزان رونوشت ژن‌های مورد مطالعه تفاوت بسیار معنی‌داری وجود دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های مورد مطالعه در اندام‌های مختلف متفاوت بوده و ارتباط مستقیمی بین مقدار منتون و منتوفوران با بیان ژن‌های *Pr* و *Mfs* در گل و برگ وجود دارد. بنابراین، می‌توان استنباط کرد که احتمالاً بیان ژن‌های *Pr* و *Mfs* در این اندام‌ها در سطح نسخه‌برداری کنترل می‌شود.

واژگان کلیدی: پولگان‌ردوکتاز، لیمون‌سینتاز، منتوفوران‌سینتاز، منتول، نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: s.afkar@pnu.ac.ir

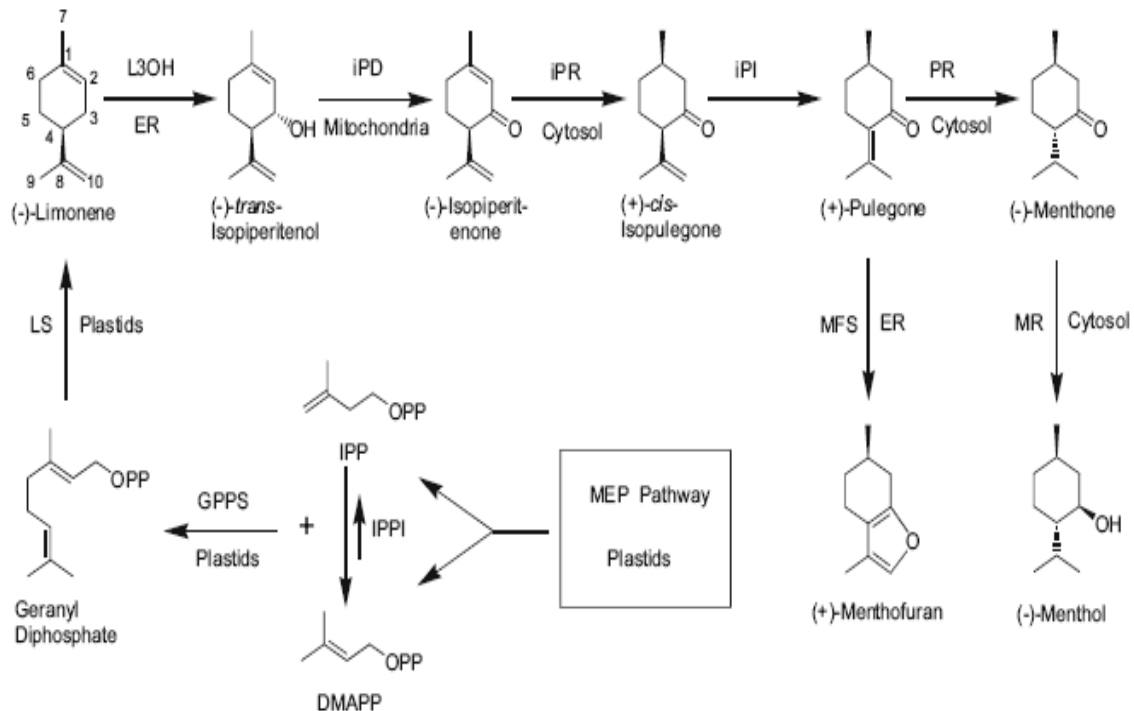
مقدمه

استفاده از گیاهان به‌عنوان دارو سابقه‌ای برابر با تاریخ زندگی بشر دارد و انسان از گذشته‌های دور به منظور درمان بیماری‌ها و امراض خود از گیاهان استفاده کرده است. بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی، گیاهان دارویی همه ساله توسط جمعیت کثیری از مردم به ویژه در کشورهای در حال توسعه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حال حاضر ۸۰ درصد مردم این کشورها به منظور تأمین نیازهای دارویی خویش از فرآورده‌هایی که مواد مؤثره گیاهان دارویی است استفاده می‌کنند (Anonymous, 2003). مطابق گزارش سازمان بهداشت جهانی میزان تجارت گیاهان دارویی تا سال ۲۰۵۰ میلادی بالغ بر ۵ تریلیون دلار خواهد گردید (Huns, 1997). گیاهان دارویی و عطری با سلامتی انسان در ارتباط هستند. امروزه در کشورهای صنعتی همانند کشورهای در حال توسعه داروهای گیاهی رکن اصلی سیستم بهداشت و درمان انسان را تشکیل می‌دهند. آن‌ها محصولاتی از متابولیت‌های ثانویه هستند (Gomez-Galera et al., 2007). گیاهان خانواده نعنائیان شامل یک گروه از گونه‌های از جنس *Mentha* متعلق به خانواده Lamiaceae می‌باشند (Verma et al., 2010). گیاهانی عموماً علفی از رده دولپه‌ای‌ها، زیررده پیوسته گلبرگان، راسته Lamiales، پایا و دارای ساقه چهارگوش، برگ‌ها متقابل، دنداندار و پوشیده از کرک می‌باشند. این گیاه تتراپلوئید $(2n = 4x = 72)$ با اندازه ژنوم برابر با $2/28 \text{ pg DNA}$ و یک هیبرید طبیعی عقیم از *M. spicata* و *M. aquatica* می‌باشد (Gobert et al., 2002). اسانس نعناع فلفلی بیشترین تولید و مصرف را در بین اسانس‌ها دارد (Foster, 1990). علاوه بر استفاده آن در مواد غذایی و قنادی‌ها، استفاده دارویی از نعناع فلفلی به دوران خیلی دور بر می‌گردد که شامل داروی ضد نفخ، ضدالتهاب، ضد حالت تهوع، عرق‌آور، ضد درد، درمان بی‌نظمی‌های قاعدگی می‌باشد. اسانس نعناع عموماً برای بهبود سریع زخم، درمان دردهای عصبی، عضلانی، سردرد و میگرن کاربرد دارد و

خاصیت ضد خارش، ضد عفونی‌کنندگی و ضد میکروبی دارد (Foster, 1990; Brown, 1995; Hendriks, 1998; Baytop, 1999; Cowan, 1999). منتول ($C_{10}H_{20}O$) عمدتاً بهترین ترکیب خالص شناخته شده که جزء ترکیبی اسانس جنس *Mentha* از خانواده Lamiaceae است. منتول و منوترین‌های مرتبط نماینده کوچک‌ترین عضو از کلاس بسیار بزرگ ترپنوئیدها هستند. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که منتول فعالیت ضدتوموری و پتانسیل شیمی‌درمانی دارد (Zhang and Barritt, 2004; McKay and Blumberg, 2006). منتول به‌طور گسترده در محصولاتی از داروهای سرماخوردگی معمولی، صنایع شیرینی‌پزی، صنایع آرایشی-بهداشتی، طعم دادن به چای و توتون و حشره‌کش‌ها استفاده می‌شود (Croteau et al., 2005; Clark and Menary, 1980). اسانس نعناع فلفلی به‌طور عمده حاوی مونوترین منتول می‌باشد که مراحل ساخت آن به این شرح است (شکل ۱): ابتدا ایزوپنتیل دی‌فسفات^۱ و دی‌متیل الیل دی‌فسفات^۲ به وسیله آنزیم ژرانیل دی‌فسفات‌سیتاز در پلاستیدها به ژرانیل دی‌فسفات^۳ و ژرانیل دی‌فسفات توسط آنزیم لیمون‌سیتاز حلقوی شده و به لیمون تبدیل می‌شود، لیمون هم طی یک سری واکنش‌های اکسید و احیاء و ایزومریزاسیون به منتون، در پایان مسیر منتون هم تحت تأثیر آنزیم منتون-ردوکتاز در سیتوسول به منتول تبدیل می‌شود (Croteau and Gershenzon, 1994).

لیمون‌سیتاز مسئول اولین مرحله اختصاصی در بیوسنتز منوترین در گونه نعناع می‌باشد که در لکوپلاست سلول‌های ترشحی غدد اسانس در طول دوره تولید اسانس وجود دارد. لیمون به‌عنوان پیش‌ماده عمومی منوترین‌های اختصاصی در نعناع شامل منتول در نعناع فلفلی و کاروون در نعناع زیتتی می‌باشد. لیمون از ساده‌ترین مونوترین‌های حلقوی است که در روغن فرار بسیاری از گیاهان مانند خانواده‌های Apiaceae،

1- IPP
2- DMAPP
3- GDP



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی منتول در نعنای فلفلی و موقعیت ژن‌های *Ls*، *Mfs* و *Pr*

Figure 1. The biosynthetic pathway of menthol and the location of *Ls*, *Mfs* and *Pr* genes

منحرف می‌کند. هدف از انجام این تحقیق، بررسی الگوی بیان ژن‌های مهم مسیر بیوسنتزی منتول (*Ls* و *Pr*، *Mfs*) در اندام‌های مختلف برگ، گل و ساقه در شروع گلدهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی و استخراج RNA کل: برای انجام این پژوهش ریزوم‌های نعنای فلفلی از مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه و در گلدان‌های حاوی ماسه، خاک و پیت‌ماس (۱:۱:۱) در گلخانه در فروردین ماه در شرایط یکسان در دمای روزانه °C ۲۵-۳۰ و شبانه °C ۱۸-۲۰، در معرض روشنایی محیط ۳۵-۴۰۰۰۰ lux کشت شدند. گلدان‌ها روزانه آبیاری شدند و کوددهی آن‌ها دو مرتبه در ماه انجام شد. استخراج RNA کل از اندام‌های برگ، گل و ساقه در زمان گلدهی، توسط کیت Nucleo spin RNA plant (Macherey Nagel, Germany) بر اساس روش ارائه شده توسط شرکت سازنده کیت انجام شد و پس از تیمار

Rutaceae، Pinnaceae و Lamiaceae وجود دارد (Mahmoud *et al.*, 2004). پولگان نقش مرکزی در متابولیسم منورپین در نعنای فلفلی را به‌عنوان پیش‌ماده برای منتوفوران و منتون به‌عهده دارد (McCaskill *et al.*, 1992). محصول میانی مسیر، پولگان^۱ است که در سیتوسول رخ می‌دهد. پولگان‌ردوکتاز سیتوسولی منتون تولید کرده و محصول جانبی منتوفوران^۲ می‌تواند از پولگان توسط واکنش منتوفوران سینتاز که در شبکه آندوپلاسمی قرار دارد تسریع شود (Rios-Esteva *et al.*, 2008). علت انتخاب ژن *Ls* این بود که ژن *Ls* در ابتدای مسیر تولید منتول قرار داشته و نقش مهمی در تولید پیش‌ماده برای تولید منتول دارد. وقتی مسیر به ماده پولگان می‌رسد دو شاخه شده که ژن *Pr* مسیر را به سمت منتول هدایت می‌کند. از طرف دیگر ژن *Mfs* در شاخه انشعابی مسیر بیوسنتز منتول قرار داشته و مسیر بیوسنتز منتول را به سمت تولید منتوفوران که یک منورپین نامطلوب است

1- Pulegone
2- Menthofuran

اختصاصی بودن آغازگرها از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد و اختصاصی بودن آن‌ها با بررسی نتایج PCR بر روی ژل آگارز (۱/۵٪) تعیین گردید و بررسی صحت اتصال آغازگرها و تکثیر ژن‌های مورد بررسی با استفاده از Syber green در Real time PCR با رسم منحنی ذوب تأیید گردید.

تعیین کارایی و انجام واکنش Real Time PCR:

به‌منظور تعیین کارایی واکنش از چهار غلظت مختلف cDNA ساخته شده از RNA نمونه‌های کنترل استفاده گردید. غلظت اولیه cDNA سنتز شده به‌عنوان غلظت ۱۰۰ در نظر گرفته شد و بقیه غلظت‌ها با اضافه کردن آب مقطر استریل به‌صورت ۱:۱۰ تهیه شدند. بعد از انجام واکنش Real Time PCR در شرایط یکسان نمودار منحنی استاندارد بر اساس Ct در مقابل غلظت رسم شد که شیب این نمودار برای محاسبه کارایی واکنش استفاده شد. آزمایش‌های qRT-PCR بر روی نمونه‌ها در دستگاه ABI PRISM 7000 Sequence Detection System SYBER PCR Mastermix (Takara، استفاده از کیت Japan) و طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده کیت انجام شد.

RNA استخراج شده با آنزیم DNase I RNase-free (Fermentase, Canada) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، نمونه RNA در فریزر °C -۸۰ نگهداری شد و برای آزمون عدم آلودگی ژنومی از روش NO RT استفاده شد. از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific,) (NANODROP, 2000C, USA) و الکتروفورز ژل آگارز (۱/۵٪) به ترتیب برای سنجش کمیت و کیفیت RNA استخراج شده استفاده گردید. تبدیل RNA به cDNA با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuLV (Fermentase, Canada) و طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت.

طراحی آغازگر و تعیین اختصاصی بودن آن‌ها: برای

انجام واکنش qRT-PCR آغازگرهایی برای ژن‌های مورد مطالعه شامل *Act* و *Ls*، *Mfs*، *Pr* (اکتین به‌عنوان کنترل داخلی) بر اساس نتایج توالی‌یابی این ژن‌ها (Afkar, 2013) با استفاده از نرم‌افزار AlleleID طراحی شد که توالی آن‌ها در جدول (۱) آمده است. این آغازگرها در نرم‌افزار Oligo بررسی و تأیید شدند و در نهایت آغازگرهای طراحی شده Blast شده و اختصاصی بودن جایگاه اتصال آن‌ها در گیاه تأیید گردید. برای تعیین

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در qRT-PCR

Table 1. The primers sequences used for qRT-PCR

ژن	آغازگر	توالی	دمای اتصال	طول محصول
Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
<i>Act</i>	Forward	GACCACCTCATGAAGATCTTAACC	60	138
	Reverse	ATTCTCGTAGTCCAAAGC		
<i>Pr</i>	Forward	ATCCGAGTTACGAGAAAAGG	60	137
	Reverse	TAGAATCCCAACATAGTAGG		
<i>Mfs</i>	Forward	AGTTGGATGGATCAATGGAGG	60	217
	Reverse	ACTGAAGCAATGTGTCTACG		
<i>Ls</i>	Forward	TAAGGTGCCGTAGACATC	60	134
	Reverse	GGATAGATTGGTGGAATGC		

در گل بیان ژن‌های *Mfs* و *Ls* نسبت به *Pr* به ترتیب ۱۰/۵ و ۹/۲ بود که نشان می‌دهد بیان دو ژن *Mfs* و *Ls* در گل بسیار بیشتر از ژن *Pr* می‌باشد (شکل ۲). متوفوران یک ترکیب منوترپنوئید نامطلوب در اسانس نعناع فلفلی است و در مطالعات قبلی مشخص شد ترکیبات پولگان و متوفوران معمولاً در گل‌ها به مقدار بالایی یافت می‌شوند. منتون، متول و ایزومنتون عمدتاً در برگ‌ها تولید می‌شوند، به طوری که بیشترین مقدار منتول در برگ‌های جوان وجود دارد. در مرحله گلدهی مقدار متوفوران در برگ‌ها کاهش یافته و در گل‌ها به سرعت زیاد می‌شود و اسانس گل‌ها مقدار کمی منتول دارد (Omidbaigi, 2005). در شروع گلدهی، ترکیبات پولگان و متوفوران در اسانس گل‌ها نسبت به برگ‌ها خیلی بیشتر بوده و بالاتر از ۵۰٪ اسانس گل‌ها را پولگان و متوفوران با مقدار کمتر از نصف منتون و متول تشکیل می‌دهد (Aflatuni, 2005). تحقیقات نشان می‌دهد که لیمون و منتون منوترپن‌های اصلی هستند که در جوان‌ترین برگ‌ها مشاهده می‌شوند. نسبت لیمون با رشد برگ به سرعت کاهش یافته در حالی که منتون افزایش می‌یابد و فقط در مراحل آخر به شکل منتون به‌عنوان منوترپن غالب کاهش می‌یابد (Gershenzon., 2000). همچنین تجزیه علیت ضرایب همبستگی در نعناع فلفلی نشان داد که لیمون بزرگ‌ترین اثر مثبت مستقیم و منتول بزرگ‌ترین اثر منفی مستقیم روی مقدار متوفوران دارد (Kumar et al., 2014).

جدول ۳- تجزیه واریانس بیان ژن در اندام‌های مختلف

نعناع فلفلی

Table 3. Analysis of variance of gene expression in different organs of *Mentha piperit*

منابع تغییرات	SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS
ژن	Gene	2	3.635***
اندام	Organ	2	3.446***
ژن × اندام	Gene × organ	4	2.134***
خطا	Error	18	0.099

***: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد
***: Significant at 0.1% probability levels

طراحی پلیت به گونه‌ای انجام شد که واکنش PCR برای هر تیمار و کنترل آن در یک پلیت صورت گیرد. آماده‌سازی نمونه‌ها طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده و برنامه qRT-PCR طبق جدول (۲) انجام شد و چرخه به تعداد ۴۰ سیکل تکرار شد. لازم به ذکر است در بررسی کمی بیان ژن‌های مورد نظر، از ژن اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

جدول ۲- برنامه qRT-PCR برای ژن‌های مختلف

Table 2. qRT-PCR program amplification for different genes

مرحله Step	دما (°C) Temperature (°C)	زمان (ثانیه) Time (s)
Pre-denaturation واسرشت‌سازی اولیه	95	10
Denaturation واسرشت‌سازی	95	5
Annealing اتصال آغازگر	60	31
Extention بسط	72	10

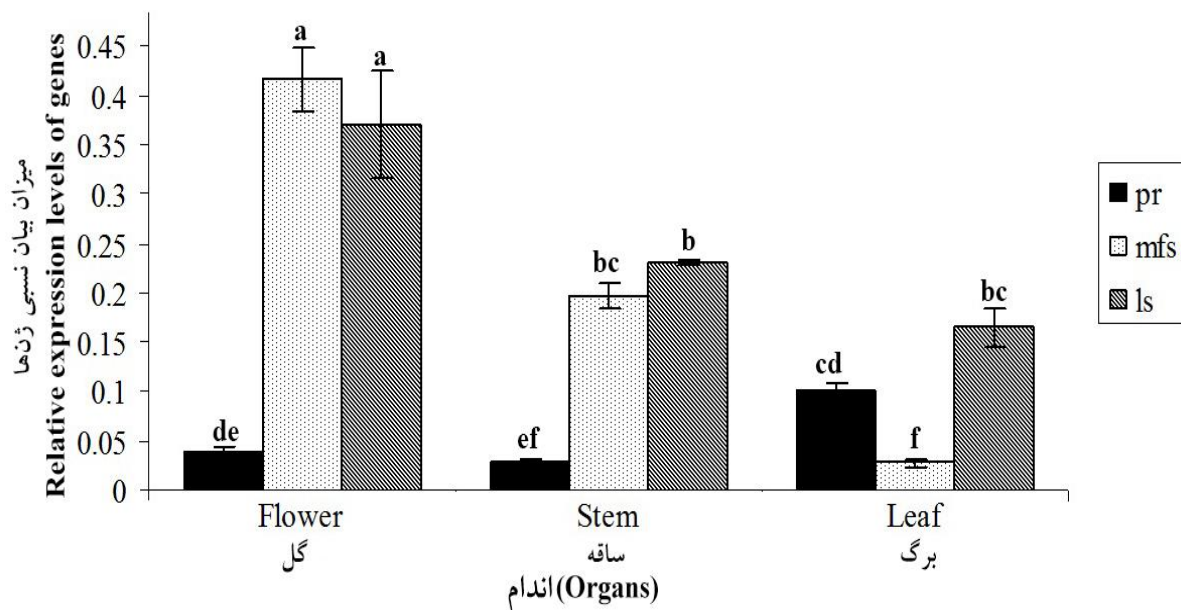
آنالیز Ct و داده‌های qRT-PCR: محاسبه میزان نسبی بیان ژن بر اساس مطالعه قبلی (Livak and Schmittgen, 2001) انجام شد. در اینجا از ΔCt برای مقایسه بیان ژن‌ها در اندام‌های مختلف استفاده شد. تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین با روش آزمون دانکن با استفاده از نرم‌افزارهای Minitab 16 و MSTATC انجام شد.

نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که بین اندام‌های برگ، ساقه و گل از نظر میزان رونوشت ژن‌های مورد مطالعه تفاوت بسیار معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.001$). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین و پایین‌ترین میزان رونوشت‌های مربوط به ژن‌های *Ls* و *Mfs* به ترتیب در گل و برگ مشاهده شد، اما مقدار رونوشت‌های ژن *Pr* در برگ بیشتر از گل و ساقه بود. نسبت رونوشت‌های ژن‌های *Pr*، *Mfs* و *Ls* در گل به ساقه به ترتیب ۱/۳، ۲/۱ و ۱/۶ می‌باشد.

نتایج آنالیز بیان ژن‌های مورد مطالعه در اندام‌های مختلف نشان داد که بیان ژن *Mfs* و *Pr* در گل‌ها به ترتیب حداکثر و حداقل می‌باشد که مشخص کننده ارتباط معکوس بین مقدار رونوشت‌های ژن‌های *Pr* و *Mfs* در برگ و گل است. مطالعات گذشته مشخص کرده افزایش بیان جزئی متوفوران سینتاز که موجب تولید سطح بالایی از متوفوران می‌شود با کاهش قابل توجه نسخه‌های ژن *Pr* و کاهش در فعالیت ردوکتازها همراه است (Mahmoud and Croteau, 2003) که تأییدی بر نتایج این آزمایش است. از طرف دیگر تحقیقات سایر محققین (Aflatuni, 2005; Omidbaigi, 2005) مشخص کردند که در زمان شروع گلدهی، مقدار ترکیب متوفوران در گل حداکثر و در برگ حداقل، اما مقدار متون در گل حداکثر و در برگ حداکثر است. در این تحقیق نمونه‌برداری در زمان گلدهی انجام شد، با توجه به بالا بودن مقدار رونوشت‌های ژن *Pr* و مقدار متون در برگ (تبدیل پیش- ماده پولگان به متون توسط ژن *Pr*) و از طرف دیگر بالا بودن مقدار رونوشت‌های ژن *Mfs* و مقدار متوفوران در گل (تبدیل پیش ماده پولگان به متوفوران توسط ژن *Mfs*) می‌توان نتیجه‌گیری کرد که رونوشت‌های این ژن‌ها در برگ و گل می‌تواند مستقیماً با بیوسنتز متون و متوفوران پیوسته باشند. به عبارتی دیگر احتمالاً بیان این ژن‌ها در گل و برگ در سطح نسخه‌برداری کنترل می‌شود. نتایج تحقیقات قبلی با شناسایی مقدار بالا mRNA ژن *Cabas* در گیاه آب بشقابی (*Centella asiatica*) و محتوی قابل توجه ترکیب Asiaticoside ثابت می‌کند که رونوشت‌های این ژن در برگ می‌تواند مستقیماً با بیوسنتز Asiaticoside پیوسته باشند (Kim et al., 2007). بررسی میزان رونوشت‌های ژن *EOMT* (اورژنول 0- متیل ترانسفراز) در ریحان (*Ocimum basilicum* L.) نشان داد که روند تغییرات میزان بیان این ژن با روند تغییرات مقدار کل اسانس و نیز مقدار متیل اورژنول به طور نسبی شباهت دارد به طوری که در مرحله پیش گل‌دهی از یک طرف مقدار رونوشت‌های ژن *EOMT* به بیشترین میزان می‌رسد و از

طرف دیگر بیشترین میزان اسانس در این مرحله است. بنابراین به احتمالی می‌توان گفت که آنزیم اورژنول 0- متیل ترانسفراز در تنظیم مقدار اسانس ریحان نقش داشته و میزان فعالیت آنزیم مذکور در سطح نسخه‌برداری ژن کنترل می‌شود (Tahsili et al., 2010). در بررسی بیان ژن لیمون سینتاز در اندام مختلف زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) مشخص شد که ژن لیمون سینتاز در اندام- های ریشه، برگ و گل‌هایی با اندازه متوسط و بزرگ بیان نمی‌گردد. حداکثر بیان ژن لیمون سینتاز در ساقه مشاهده شده و پس از آن گل‌هایی با اندازه بسیار کوچک بیشترین مقدار بیان را نشان دادند (Ghanadnia et al., 2011). با توجه به بالا بودن سطح بیان ژن‌های *Pnses*، *Pnfs*، *Pns* و *Pnds* در گل‌ها در بین اندام‌های مورد مطالعه در گیاه *Panax notoginseng* پیشنهاد گردید که بیوسنتز ساپونین در گل‌ها فعال است (Niu et al., 2014). بنابراین می‌توان گفت تحقیقات ذکر شده با نتایج به دست آمده در این مطالعه همخوانی داشته و نشان دهنده ارتباط مستقیم رونوشت ژن‌ها با ترکیبات مرتبط با آن‌ها است. با توجه اینکه لیمون سینتاز ژنی است که در ابتدای مسیر بیوسنتزی متول قرار دارد و وجود آن برای تولید پیش- ماده لیمون برای بیوسنتز متول یا متوفوران لازم است، در این تحقیق هم مشاهده می‌شود که بیان این ژن در ساقه و برگ نسبت به دو ژن دیگر بیشتر بود که در گل‌ها و ساقه این پیش ماده بیشتر به سمت شاخه منشعب مسیر، یعنی تولید متوفوران (با توجه به بالا بودن سطح رونوشت‌های *Mfs* و همچنین بالا بودن مقدار متوفوران در گل‌ها) هدایت می‌شود (Aflatuni, 2005)؛ اما در برگ‌ها این ترکیب به سمت تولید متون (با توجه به بالا بودن بیان ژن *Pr* و مقدار متون در برگ‌ها) هدایت می‌شود. نتیجه‌گیری کلی که از این آزمایش می‌شود بین مقدار رونوشت‌های ژن‌های مورد مطالعه و ترکیبات مرتبط با آن‌ها در اندام مختلف ارتباط مستقیمی وجود دارد. همچنین مقدار رونوشت‌های دو ژن *Pr* و *Mfs* در برگ و گل به طور معکوسی با هم مرتبط هستند.



شکل ۲- میزان نسبی بیان ژن‌های *Ls*, *Mfs* و *Pr* در اندام‌های مختلف (برگ، ساقه، گل) نعناع فلفلی با فن PCR در زمان واقعی

Figure 2. Relative gene expressions of *Ls*, *Mfs* and *Pr* genes in different *Mentha piperita* organs (Leaf, Stem and Flower), using Real time PCR technique

References

- Aflatuni, A.** (2005). *The yield and essential oil content of mint (Mentha ssp.) in northern ostrobothnia*. University of Oulu, Finland.
- Afkar, S.** (2013). Study of important genes (*Pr*, *Mfs*, *Ls*) in menthol biosynthesis pathway in response to methyl jasmonate in peppermint (*Mentha piperita*). Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (In Persian).
- Anonymous** (2003). WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants, p.1. Geneva. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4928e>
- Baytop, T.** (1999). *Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present)*, 2nd edn, Nobel Tıp Basımevi: Istanbul, Turkey.
- Brown, D.** (1995). *Encyclopaedia of herbs and their uses*. Dorling Kindersley, London, UK.
- Clark, R.J. and Menary, R.C.** (1980). Environmental effects on peppermint (*Mentha piperita* L.). I. Effect of day length, photon flux density, night temperature and day temperature on the yield and composition of peppermint oil. *Australian Journal of Plant Physiology*, **7**: 685-692.
- Cowan, M.M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**: 564-582.
- Croteau, R. and Gershenzon, J.** (1994). Genetic control of monoterpen biosynthesis in mint (*Mentha*: Lamiaceae). *Recent Advances in Phytochemistry*, **28**: 193-229.
- Croteau, R.B., Davis, E.M., Ringer, K.L. and Wildung, M.R.** (2005). Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften*, **92**: 562-577.
- Foster, S.** (1996). Peppermint, *Mentha piperita*. *American Botanical Council - Botanical Series*, **306**: 3-8.
- Gershenzon, J., McConkey, M.E. and Croteau, R.B.** (2000). Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology*, **122**(1): 205-214.

- Ghannadnia, M., Haddad, R., Zarinkamar, F. and Sharifi, M.** (2011). Different expression of limonene synthase gene in organs and developmental stages of cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, **27(3)**: 495-508 (In Persian).
- Gobert, V., Moja, S., Colson, M. and Taberlet, P.** (2002). Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *American Journal of Botany*, **89 (12)**: 2017-2023.
- Gomez-Galera, S., Pelacho, A.M., Capell, T. and Christou, P.** (2007). The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Report*, **26(10)**: 1689-1715.
- Hendriks, H.** (1998). Pharmaceutical aspects of some *Mentha* herbs and their essential oils. *Perfum Flavor*, **23**: 15-23.
- Huns, K.** (1997). Industrial utilization of medicinal and aromatic plants. *Acta Horticulture*, **503**: 177-192.
- Kim, O.T., Bang, K.H., Shin, Y.S., Lee, M.J., Jung, S.J., Hyun, D.Y., Kim, Y.C., Seong, N.S., Cha, S.W. and Hwang, B.** (2007). Enhanced production of asiaticoside from hairy root cultures of *Centella asiatica* L. urben elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Report*, **26**: 1941-1949.
- Kumar, B., Mali, H. and Gupta, E.** (2014). Genetic variability, character association, and path analysis for economic traits in menthofuran rich half-sib seed progeny of *Mentha piperita* L. *BioMed Research International*, **2014**: 1-7.
- Livak, K.J. and Schmittgrn, T.D.** (2001). Analysis of relative gene epression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Mahmoud, S. S. and Croteau, R. B.** (2003). Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100(24)**: 14481-14486.
- Mahmoud, S.S., Williams, M. and Croteau, R.** (2004). Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. *Phytochemistry*, **65(5)**: 547-554.
- McCaskill, D. G., Gershezon, J. and Croteau, R. B.** (1992). Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secondary cell vlusters isolated from glanular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta*, **187(4)**: 445-454.
- McKay, D.L. and Blumberg, J.B.** (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, **20**: 619-633.
- Niu, Y., Luo, H., Sun, C., Yang, T.J., Dong, L., Huang, L. and Chen, S.** (2014). Expression profiling of the triterpene saponin biosynthesis genes *FPS*, *SS*, *SE*, and *DS* in the medicinal plant *Panax notoginseng*. *Gene*, **533(1)**: 295-303.
- Omidbaigi, R.** (2005). *Production and processing of medicinal plants*, Astan Qouds Razavi, Mashahd, Khorasane Razavi, IR (In Persian).
- Rajeswara Rao, B.R., Syamasundar, K.V., Rajput, D.K., Nagaraju, G. and Adinarayana, G.** (2012). Biodiversity, conservation and cultivation of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **3(2)**: 59-62.
- Rios-Estepa, R., Turner, G., Lee, J.M., Croteau, R.B. and Lange, B.M.** (2008). A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpene essential oil composition in peppermint. *Biochemistry*, **105(8)**: 2818-2823.
- Tahsili, J., Sharifi, M., Behmanesh, M. and Ziaei, M.** (2010). Gene expression of eugenol O - methyl transferase and components of essential oils in (*Ocimum basilicum* L.) at different stages of growth. *Iranian Journal of Biology*, **23(1)**: 18-25 (In Persian).
- Velikova, V., Loreto, F., Tsonev, T., Brilli, F. and Edreva, A.** (2006). Isoprene prevents the negative consequences of high temperature stress in *Platanus orientalis* leaves. *Functional Plant Biology*, **33**: 1-10.
- Verma, R.S., Rahman, L., Verma, R.K., Chauhan, A., Yadav, A.K. and Singh, A.** (2010). Essential oil composition of menthol mint (*Mentha arvensis*) and peppermint (*Mentha piperita*)

cultivars at different stages of plant growth from Kumaon region of Western Himalaya. *Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, **1(1)**: 13-18.

Zhang, L. and Barritt, G.J. (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells, *Cancer Research*, **64**: 8365-8373.

Gene Expression Pattern of Key Genes in Menthol Biosynthesis Pathway in Different Organs of Peppermint (*Mentha piperita*)

Soheila Afkar^{1,*}, Ghasem Karimzadeh², Mokhtar Jalali Javaran²

1- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Payame Noor University of Lorestan, Khoramabad, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: December 08, 2014 – Accepted: March 03, 2015)

Abstract

Peppermint (*Mentha piperita* L., Lamiaceae) is one of the most important medicinal and aromatic plants. Menthol is the major monoterpene constituent of peppermint's essential oil, which is used for pharmaceuticals, cosmetics and food industries. This work was aimed to study the expression pattern of important genes (*Pr*, *Mfs*, *Ls*) in menthol biosynthesis pathway in different plant's organs (leaf, flower and stem) at the beginning of flowering stage. The peppermint plants were supplied from Iranian Institute of Medicinal Plants and were transferred into a greenhouse in pots. Analysis of variance showed that there is a significant difference between leaf, flower and stem, with respect to mRNA transcript level. The results of this study indicated that the level of gene expression of *Pr*, *Mfs* and *Ls* were altered in the different organs. There are direct relationship between the content of menthone and menthofuran and level of gene expressions of *Pr* and *Mfs* genes in flower and leaf respectively. It can be concluded that probably the expression of *Mfs* and *Pr* genes in these organs may be regulated at transcriptional level.

Keywords: Pulegone reductase, Limonene synthase, Menthofuran synthase, menthol, *Mentha piperita*

* Corresponding Author, E-mail: s.afkar@pnu.ac.ir