

تأثیر تلقیح دو گونه قارچ میکوریز آربوسکولار بر بیان ژن لیمون سنتاز در ژنوتیپ‌های نعنا سبز (*Mentha spicata* L.)

معصومه احمدی خویی و لیلا شبانی *

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

نعنا سبز (*Mentha spicata* L.) گیاهی با اهمیت اقتصادی و خاصیت دارویی زیاد از تیره Lamiaceae است که به علت سنتز مقادیر زیادی مونوترپن (اسانس) به عنوان مدلی برای متابولیسم این ترکیبات مورد توجه پژوهشگران مختلف قرار دارد. لیمونن یک مونوترپن ساده است که بیوسنتز آن توسط لیمونن سنتاز که یک آنزیم تنظیمی کلیدی در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها در *M. spicata* است، کاتالیز می‌شود. در مطالعه حاضر، تأثیر کلونیزاسیون ریشه با قارچ‌های *Funneliformis etunicatum* و *F. mosseae* بر شاخص‌های رشد، غلظت اسانس و تغییرات بیان ژن لیمونن سنتاز (*LS*) در سه ژنوتیپ (کاشان، بجنورد و مید) نعنا سبز بررسی شده است. استفاده از ژن *GADPH* به عنوان استاندارد داخلی برای اندازه‌گیری بیان کمی ژن لیمونن سنتاز در بررسی حاضر توضیح داده می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد که محتوای اسانس در برگ‌های *M. spicata* ژنوتیپ مید تلقیح شده با قارچ *F. etunicatum* بیشتر از ژنوتیپ‌های گرفته شده از جمعیت‌های کاشان و بجنورد است و در مقایسه با شاهد ۱۳۰ درصد افزایش را نشان داد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، افزایش تجمع رونوشت‌های ژن لیمونن سنتاز در برگ‌های *M. spicata* تحت تأثیر تلقیح با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، هماهنگ با افزایش محتوای اسانس و تحت تأثیر ژنوتیپ گیاه است.

واژه‌های کلیدی: روغن فرار، لیمونن سنتاز، میکوریز آربوسکولار، نعنا سبز (*Mentha spicata* L.)، RT-PCR

مقدمه

منظور استخراج اسانس‌های آن در سطح وسیع کشت می‌شود (Zare Dehabadi and Asrar, 2009). تمامی ویژگی‌های درمانی و دارویی نعنا را می‌توان به ترکیبات ثانویه این گیاه نسبت داد، این ترکیبات از جمله مواد شیمیایی مهم گیاهی محسوب می‌شوند و خط دفاعی

نعنا سبز (*Mentha spicata* L.) با نام عمومی spearmint یکی از ۲۵ گونه جنس *Mentha* و متعلق به تیره Lamiaceae است که اهمیت دارویی آن از زمان‌های بسیار قدیم شناخته شده است و امروزه به

خشکی اطلاق می‌شود که عوامل ایجاد این وابستگی با تشکیل همزیستی دو طرفه از این رابطه سود می‌برند. اهمیت همزیستی برای گیاه شامل بهبود وضعیت تغذیه، حفظ و استفاده بهینه از مواد مغذی و کاهش خسارات زیستی (هجوم پاتوژن و انواع بیماری‌ها) و غیرزیستی (عدم تعادل در تغذیه و کمبود آب) است که به رشد سریع‌تر گیاه منجر می‌شود. این نوع همزیستی به واسطه کاهش هزینه مصرفی و کاهش در آلودگی زیستی با کودهای شیمیایی، از دیدگاه کشاورزی نیز دارای اهمیت است (Silveria et al., 2006). مشخص شده است که قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در بسیاری از سیستم‌های کشاورزی بر پایه تولید، نقش مهمی در رشد گیاهان ایفا می‌کنند، اما درباره تأثیر بالقوه آنها بر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی و معطر اطلاعات اندکی وجود دارد. Ahmadi-Khoei و همکاران (۲۰۱۲) افزایش محتوای ترکیبات فنولیک کل در شش ژنوتیپ از *M. spicata* تلقیح شده با قارچ میکوریز آربوسکولار را نشان دادند. تاکنون مطالعه‌ای درباره تأثیر قارچ‌های میکوریز بر بیان ژن لیمون سنتاز در ژنوتیپ‌های *M. spicata* انجام نشده است. مطالعات گذشته روی بیان ژن لیمون سنتاز در گیاهان مختلف نشان داده است که بیان این ژن تحت تأثیر شرایط مختلف تغییر کرده است که این تغییر ممکن است با تغییر در محتوای اسانس گیاه همراه باشد. پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر دو گونه قارچ میکوریز *F. etunicatum* و *Funneliformis mosseae* بر شاخص‌های رشد، بیان ژن لیمون سنتاز و مطالعه رابطه بین مقدار اسانس و میزان بیان ژن در شرایط گلخانه‌ای در گیاه *M. spicata* انجام شده است.

اولیه گیاه علیه پاتوژن‌ها را تشکیل می‌دهند (Khan et al., 2005). مهم‌ترین مواد مؤثره نعنا سبز اسانس‌ها هستند که محصولات مهم اقتصادی به شمار می‌آیند. ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس نعنا مخلوطی از ترکیبات آروماتیک شامل ترپین‌ها، ترپنوئیدها و ترکیبات آلیفاتیک شامل هیدروکربن‌ها، الکل‌ها، استرها، آلدئیدها، کتون‌ها و فنل‌ها هستند (Li et al., 1999؛ Bakkali et al., 2008). ترپن‌های موجود در اسانس *M. spicata* به دو دسته تقسیم‌بندی می‌شوند: الف) مونوترپن‌های شامل آنتول، پولیگون، کاروون، لیمونن، منتون و S-کاروون و ب) سزکویی ترپن‌ها (Almeida et al., 2012). مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها در *M. spicata* به خوبی شناسایی شده است. مراحل آنزیمی این مسیر به سه مرحله اصلی تقسیم می‌شود: مرحله نخست شامل افزودن ایزوپنتیل دی فسفات به دی متیل آلایل دی فسفات به کمک آنزیم ژرانیل دی فسفات سنتاز است که به ایجاد ژرانیل دی فسفات منجر می‌شود؛ در مرحله دوم، ترکیب حد واسط حاصله به واسطه مونوترپن سنتازهای مختلف مانند 4s-لیمون سنتاز (4S-4L) تغییر می‌یابد؛ مرحله آخر بیوسنتز مونوترپن شامل چندین تغییر ثانویه است که با لیمون آغاز شده و به ایجاد تنوع زیاد در تولید محصولات نهایی منجر می‌گردد. لیمون سنتاز (به عنوان یک مونوترپن سنتاز) مرحله سنتز لیمونن از ژرانیل دی فسفات را کاتالیز می‌کند.

از مهم‌ترین روابط همزیستی موجود در سطح زمین رابطه میکوریزی است (Strack et al., 2003). اصطلاح میکوریزی به نوعی وابستگی بین قارچ و ریشه گیاهان

مواد و روش‌ها

کشت گیاه: ابتدا ریزوم‌های *M. spicata* از سه منطقه مختلف میید، کاشان و بجنورد جمع‌آوری و در شرایط گلخانه‌ای، در گلدان‌های حاوی ماسه و خاک رس کشت داده شدند. آبیاری گلدان‌ها یک روز در میان انجام شد. پس از گذشت سه ماه رشد و زمانی که گیاهچه‌ها وارد مرحله زایشی شدند، ساقه‌های آنها با داشتن سه میانگره جهت تلقیح جمع‌آوری و در محیطی کاملاً مرطوب قرار داده شدند. ساقه‌ها پس از مدت یک هفته جوانه زده، سپس ریزوم‌دار شدند. از قارچ‌های همزیست (تهیه شده از شرکت زیست فناوران توران) برای تلقیح ساقه‌های ریزوم‌دار شده *M. spicata* استفاده شد. برای انجام تلقیح با قارچ میکوریزی (*F. mosseae*) و (*F. etunicatum*)، حدود ۲۵ گرم از مایه تلقیح هر قارچ به طور جداگانه در خاک هر گلدان ریخته شد و تعداد سه عدد از ساقه‌های ریزوم‌دار روی سطح خاک قرار داده شد. گلدان‌ها تا پیش از جوانه‌زنی به صورت یک روز در میان آبیاری شدند و پس از جوانه‌زنی علاوه بر آبیاری یک روز در میان، هفته‌ای یک بار با محلول هوگلند (۵۰ درصد فسفر) آبیاری شدند. پس از گذشت یک دوره رشد سه ماهه و با ورود گیاهچه‌ها به مرحله گل‌دهی نمونه‌گیری از برگ‌های کاملاً رشد یافته گیاه (واقع در میانگره سوم) برای انجام تحقیقات مولکولی صورت گرفت و نمونه‌ها با نیتروژن مایع تثبیت و در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. سایر برگ‌های گیاه نیز برای تهیه اسانس در سایه خشک شدند.

تعیین شاخص‌های رشد: برای اندازه‌گیری میزان وزن خشک ریشه و اندام هوایی ابتدا قسمت‌های هوایی گیاهچه‌ها جدا شد و پس از شستشو، آب اضافی آنها

توسط کاغذ صافی گرفته شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، ریشه‌ها و ساقه‌ها درون پاکت‌های مقوایی قرار داده شد و پس از گذشت ۳ تا ۴ روز نمونه‌ها به دور از نور آفتاب خشک شدند و وزن خشک آنها تعیین گردید.

استخراج اسانس: برای تهیه اسانس، برگ‌های خشک شده *M. spicata* با آسیاب دستی خرد شد. در هر نوبت اسانس‌گیری ۳۰ گرم از گیاه خرد شده، همراه با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه کلونجر در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد با روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. مدت زمان اسانس‌گیری سه ساعت به طور انجامید. اسانس‌های به دست آمده توسط سولفات سدیم آبگیری شد. اندازه‌گیری اسانس با روش حجمی صورت گرفت. پس از خارج نمودن اسانس از مایع درصد اسانس تعیین گردید.

بررسی الگوی بیان ژن: الگوی بیان ژن لیمون سنتاز در برگ‌های کاملاً رشد یافته *M. spicata* بررسی شد. ژن *GAPDH* (گلیسر آلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز) به عنوان ژن خانه‌دار و ژن *LS* لیمون سنتاز به عنوان ژن دخیل در پاسخ به تلقیح گیاه با قارچ میکوریز آربوسکولار با مرور منابع انتخاب و توالی آنها با جستجو در بانک‌های اطلاعاتی یافت شد (جدول ۱). توالی DNA مربوط به هر ژن از پایگاه NCBI با شماره‌های دستیابی JN587699.1 (برای ژن *GAPDH*) و L13459.1 (برای ژن *LS*) به دست آمد. RNA کل با استفاده از بافر (QIAGEN) QIAzol Lysis Reagent از بافت برگ استخراج گردید. برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم DNaseI تیمار شدند. مقادیر مختلف RNA پس از اندازه‌گیری

شده، سپس میزان تغییرات بیان ژن در تمام تیمارها نسبت به نمونه‌های شاهد (بدون تلقیح) سنجیده شد.

تحلیل آماری: آزمایش حاضر به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا گردید. در این حالت سه ژنوتیپ (بجنورد، کاشان و میبد)، سه حالت قارچ (شاهد، قارچ *F. mosseae* و قارچ *F. etunicatum*) به عنوان فاکتورها در نظر گرفته شد. تحلیل آماری با نرم‌افزار SAS و MSTATC انجام و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD ($P < 0.05$) مشخص شد.

کم‌ی، همگی به غلظت ۷۵ نانوگرم در میکرولیتر با افزودن مقادیر مناسب آب عاری از RNase، یکسان‌سازی شدند. پس از همسان‌سازی غلظت RNAهای مختلف، واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت QuantiTect Reverse Transcription انجام شد. الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از PCR زمان واقعی (iCycler iQ real-time PCR, Bio-Rad) بررسی شد. میزان بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید (Livak and Schmittgen, 2001). در این روش، میزان بیان ژن لیمون سنتاز بر اساس ژن استاندارد با بیان ثابت نرمال

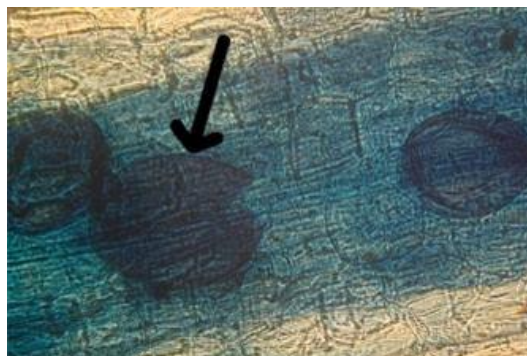
جدول ۱- توالی پرایمر ژن‌های *LS* و *GADPH*

Target	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'→3')	Product size (bp)
<i>LS</i>	TGGAAGAGGTGAGCAGAGGG	ACACCTCCGCTATCAGCCAT	171
<i>GADPH</i>	CTCAGAGAGGAGTCGGTGGG	CTACACAACAGAGCGCGGAA	114

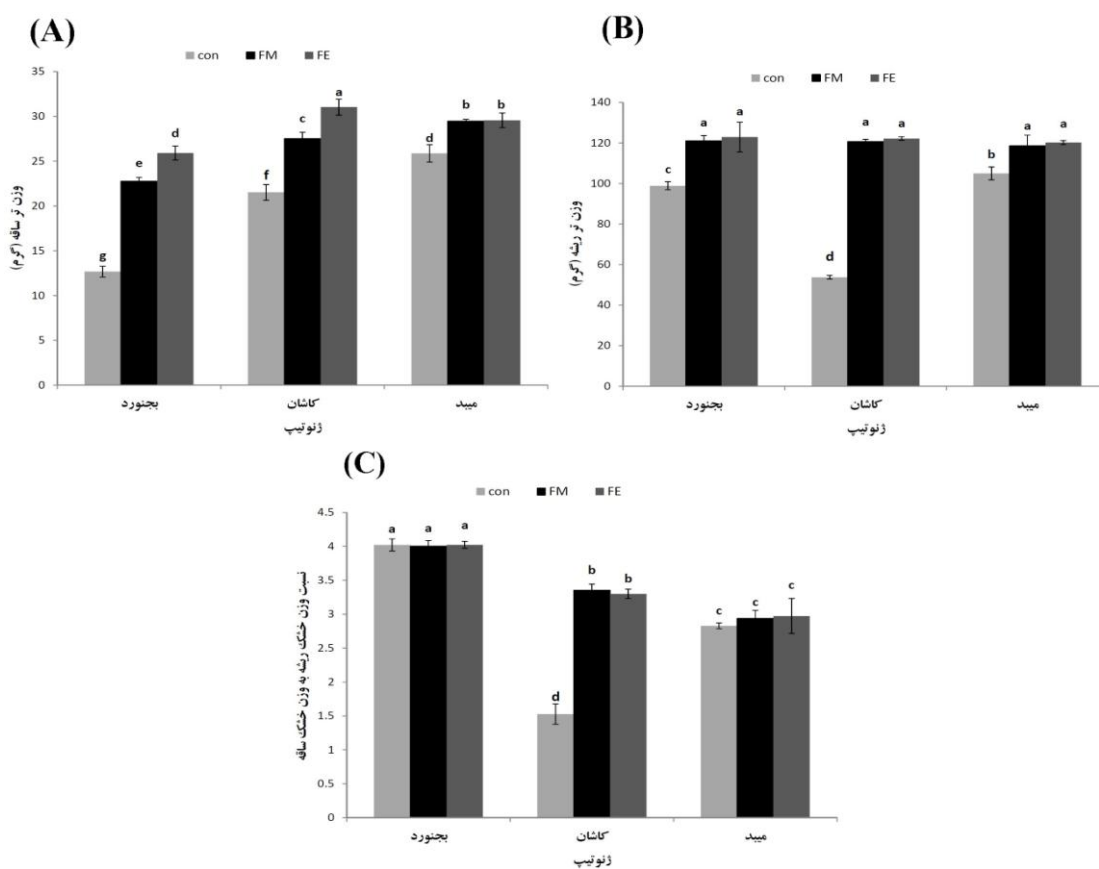
(شکل ۲-۲B). در گیاهچه‌های سه ماهه نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک ساقه (R/S) در دو ژنوتیپ بجنورد و میبد در مورد هیچ کدام از تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداده است (شکل ۲-۲C). به نظر می‌رسد که تلقیح توسط دو گونه قارچ میکوریز در این دو ژنوتیپ به همان نسبت که باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه شد، باعث افزایش وزن خشک اندام زیرزمینی گیاه *M. spicata* نیز شد. در مورد ژنوتیپ کاشان تلقیح با هر دو گونه قارچ نسبت ریشه به ساقه را افزایش داد و به نظر می‌رسد که تلقیح توسط دو گونه قارچ میکوریز باعث افزایش بیشتری در وزن اندام زیرزمینی گیاه نسبت به افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه *M. spicata* شده است (شکل ۲).

نتایج

پس از اطمینان از آلودگی ریشه‌های هر سه ژنوتیپ *M. spicata* توسط دو گونه قارچ *F. mosseae* و *F. etunicatum* (شکل ۱) و پس از تعیین وزن خشک ریشه و اندام هوایی از نمونه‌ها اسانس تهیه شد و سپس درصد اسانس تعیین شد. همچنین، بیان ژن لیمون سنتاز در برگ گیاهچه‌های *M. spicata* بررسی شد. افزایش وزن تر اندام هوایی در اثر تلقیح میکوریزی در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. همزیستی موجب افزایش وزن تر اندام هوایی در گیاهچه‌های تیمار شده با هر دو گونه قارچ *Funneliformis* در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد شده است (شکل ۲-۲A). وزن تر ریشه گیاه نیز به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر قارچ میکوریز قرار گرفت



شکل ۱- تصویر میکروسکوپی از وزیکول‌های موجود در ریشه نعنا تلقیح شده با قارچ میکوریز آربوسکولار

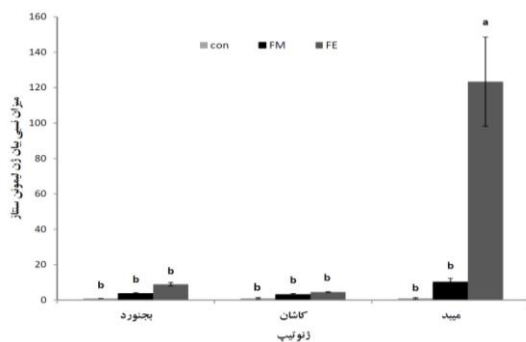


شکل ۲- تأثیر تلقیح قارچی بر میزان وزن تر ساقه (A)؛ وزن تر ریشه (B)؛ نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک ساقه (C). سه ژنوتیپ از *M. spicata*: گیاهچه‌های شاهد (con)، گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *F. mosseae* (FM)، گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *F. etunicatum* (FE). مقادیر میانگین \pm تکرار \pm خطای استاندارد (SE) است. حروف غیر مشابه روی هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی داری بر اساس آزمون LSD است.

تیمار شده با هر دو گونه قارچ *Funneliformis* در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد شد. نتایج مقدار کل اسانس موجود در ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه در شکل ۳ نشان

تأثیر متقابل بین ژنوتیپ و قارچ برای شاخص‌های میزان اسانس و بیان ژن لیمون سنتاز معنی دار بود. همزیستی موجب افزایش میزان اسانس در گیاهچه‌های

تلقیح شده با قارچ *F. etunicatum* نسبت به گیاهچه‌های شاهد و گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *F. mosseae* افزایش نشان داد (شکل ۴). بررسی روند تغییرات در غلظت اسانس و بیان ژن لیمون سنتاز در برگ‌های ژنوتیپ میبد نشان داد که گیاهان با میزان اسانس بالا، بیان بالایی از ژن لیمون سنتاز را نیز نشان می‌دهند. این ارتباط در دو ژنوتیپ دیگر معنی‌دار نبود به طوری که علیرغم افزایش غلظت اسانس در گیاهچه‌های تلقیح شده با هر دو قارچ، بیان ژن در برگ‌های این گیاهچه‌ها افزایشی نشان نداد.

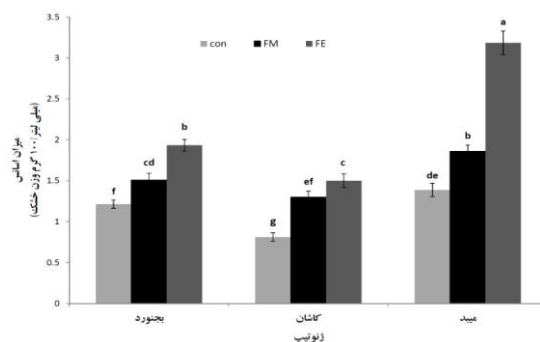


شکل ۴- تأثیر تلقیح قارچی بر بیان ژن لیمون سنتاز سه ژنوتیپ از *M. spicata* گیاهچه‌های شاهد (con)، گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *F. mosseae* (FM)، گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *F. etunicatum* (FE). مقادیر میانگین \pm تکرار خطای استاندارد (SE) است. حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD است.

تلقیح اندومیکوریزی علاوه بر افزایش رشد اندام هوایی سبب افزایش معنی‌دار در شاخص‌های رشد ریشه نیز شده است که با اندازه‌گیری وزن تر ریشه *M. spicata* تلقیح شده با قارچ میکوریز آربوسکولار و افزایش معنی‌داری آن نسبت به گیاهچه‌های شاهد همخوانی داشته است. Panwar (۱۹۹۱) در تحقیقی روی گندم تلقیح شده با قارچ میکوریز گزارش کرد که قارچ

داده شده است. نتایج نشان داد که در هر سه ژنوتیپ بیشترین میزان اسانس در گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *F. etunicatum* حاصل شده است، این در حالی است که بالاترین میزان اسانس *M. spicata* در ژنوتیپ میبد به میزان ۱۳۰ درصد بیشتر از شاهد به دست آمد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری بیان ژن لیمون سنتاز در برگ‌های سه ژنوتیپ *M. spicata* نشان داد که تفاوت آشکاری در میزان بیان ژن دو ژنوتیپ کاشان و پجنورد در تلقیح با هر دو گونه قارچ *F. etunicatum* و *F. mosseae* وجود ندارد. اما بیان ژن در ژنوتیپ میبد



شکل ۳- تأثیر تلقیح قارچ بر میزان اسانس سه ژنوتیپ از *M. spicata* گیاهچه‌های شاهد (con)، گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *F. mosseae* (FM)، گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *F. etunicatum* (FE). مقادیر میانگین \pm تکرار خطای استاندارد (SE) است. حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD است.

بحث

در پژوهش حاضر، تلقیح دو گونه قارچ موجب افزایش شاخص‌های رشد در ریشه و اندام هوایی سه ژنوتیپ *M. spicata* شد. این افزایش رشد در گیاهان میکوریزی در مقایسه با انواع غیرمیکوریزی در گونه‌های متعددی گزارش شده است. پژوهش Turjaman و همکاران (۲۰۰۶) و Liu و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که

میکوریزی سبب افزایش چشمگیر میزان اسانس در مقایسه با شاهد می‌شود که با نتایج بررسی حاضر که تلقیح قارچ‌های *F. etunicatum* و *F. mosseae* تأثیرات مثبتی بر میزان اسانس در هر سه ژنوتیپ گیاه *M. spicata* داشته است، همخوانی دارد.

پژوهشگران نشان داده‌اند که وزن ریشه‌ها و ساقه‌ها و تولید ترپن‌وئید در *Euphorbia pekinensis* پس از آغشتگی با قارچ‌های میکوریز افزایش یافته است (Yuan et al., 2010). الیستورهایی از برخی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار جدا شده است که موجب افزایش زیست توده و القای ترپن‌وئیدها می‌شوند. به نظر می‌رسد آغشتگی گیاهان با قارچ‌های میکوریز و اندوفیت افزایش شارش متابولیک مسیر MEP (متیل اریتریتول فسفات) را به دنبال دارد (Wang et al., 1995). مطالعات Peipp و همکاران (۱۹۹۷) نشان داد که تلقیح قارچ‌های *F. intraradices* در جو می‌تواند تجمع متابولیت‌های ثانویه نظیر مشتقات سزکویی ترپن‌وئید را در ریشه‌ها القا کند. بررسی داده‌های حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر ژنوتیپ و قارچ و نیز تأثیر متقابل آن دو بر بیان نسبی ژن لیمون سنتاز معنی دار بود. لیمون از ساده‌ترین مونوترپن‌های حلقوی است که در اسانس بسیاری از گیاهان وجود دارد. تولید نخستین حد واسط مسیر بیوسنتز اسانس‌ها یعنی لیمون واکنشی است که مرحله محدود کننده سرعت این مسیر را کاتالیز می‌کند. مونوترپن سنتازها در مراحل تنظیمی مسیر بیوسنتزی، به دلیل مشخص نمودن نقاط انشعاب مسیر متابولیکی و کاتالیز نخستین مرحله منتهی به تشکیل تیره‌های مونوترپنی متفاوت، مهم هستند. بنابراین، هر گونه دست‌ورزی در بیان ژن‌های آنها

میکوریز، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی را افزایش داده است. Miransari و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که یکی از علت‌های اصلی تأثیر افزایشی قارچ میکوریز بر رشد گیاهان ذرت، افزایش جذب مواد غذایی در گیاهان تلقیح شده است که این امر به دلیل شبکه گسترده هیف و افزایش حجم خاک احاطه شده توسط گیاه و در نتیجه افزایش جذب آب و مواد غذایی در آنها است. بهبود جذب عناصر معدنی به ویژه فسفر در گیاهان میزبان قارچ میکوریز آربوسکولار اغلب به پاسخ‌های رشدی مثبت در این گیاهان منجر می‌شود (Podila and Douds, 2000).

تشکیل اسانس و ترکیبات آن تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله: شرایط اقلیمی، هورمون‌های رشد، فتوسنتز، تنوع فصول، تنش‌های زیستی و غیرزیستی، تعداد تریکوم و ... قرار دارد (Sajjadi, 2006). قارچ‌های اندومیکوریز با افزایش فعالیت‌های آنزیمی متفاوت سبب تغییرات فیزیولوژیک در گیاهان و متابولیت‌های ثانویه آنها می‌شوند (Mathur and Vyas, 1995). در سال‌های اخیر، مطالعاتی در زمینه سنتز متابولیت‌های ثانویه به واسطه تلقیح قارچ‌های میکوریز در گیاهان انجام شده است. برخی از این تحقیقات به سازوکار ترپن‌وئیدها در گیاهان میکوریزی اختصاص یافته است، برای نمونه، می‌توان به افزایش تولید روغن‌های فرار در گشنیز و شوید کلونیزه شده با قارچ *F. fasciculatum* (Kapoor et al., 2002) و نعنا کلونیزه شده با همین قارچ (Freitas et al., 2004) اشاره کرد. همچنین، در مطالعات Gupta و همکاران (۲۰۰۲) روی *M. spicata* و Khaosaad و همکاران (۲۰۰۶) در مرزنجوش (*Origanum vulgare*) مشخص شد که کاربرد قارچ

DXS2 (۱-داکسی دی گزیلولوز ۵-فسفات سنتاز) در مسیر سنتز ایزوپروپونوئیدها بیان کردند که بیان ژن *DXS2* در ریشه‌های تلقیح شده با قارچ میکوریز آربوسکولار به شدت تحریک می‌شود که با تجمع کارتنوئیدها و اپوکارتنوئیدها در ریشه این گیاه مرتبط است. مشخص شده است که در گیاهان میکوریزی القا شدیدی در سطح رونویسی cDNA دو آنزیم کد کننده *DXS2* (۱-داکسی-دی گزیلولوز ۵-فسفات سنتاز) و *DXR* (۱-داکسی-دی گزیلولوز ۵-فسفات رداکتوایزومراز اتفاق می‌افتد (Walter et al., 2000). در پژوهش Blilou و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند که بیان دو ژن *PAL* (فیل آلانین آمونیاکاز) و *Lpt* (lipid protein transfer) در ریشه برنج تلقیح شده با قارچ *F. mosseae* افزایش داشته است و این دو ژن در سیستم دفاعی گیاه نقش دارند. در تحقیق حاضر نیز بین روند تغییرات بیان ژن و روند افزایش میزان اسانس در ژنوتیپ میبد همخوانی وجود داشت، به طوری که ژنوتیپ میبد تلقیح شده با *F. etunicatum* که بالاترین بیان ژن را دارد، بیشترین میزان اسانس را داشت. بنابراین، می‌توان گفت که علاوه بر عوامل متعدد مؤثر بر میزان اسانس نظیر افزایش جذب عناصر غذایی در ریشه گیاهان میکوریزی احتمالاً بیان بالای ژن لیمون سنتاز در این ژنوتیپ نیز در تنظیم مقدار اسانس گیاه *M. spicata* نقش داشته است. در دو گیاه *M. piperita* و *M. arvensis* تراویخت شده با ژن لیمون سنتاز، در ترکیباتی که به طور مستقیم از ژرانیل دی فسفات شکل می‌گیرند نظیر cineole و همچنین محصولات نهایی سنتز مونوترپن‌ها مانند پولیگون‌ها تغییراتی مشاهده شده است که دلیلی بر قابلیت تغییر

می‌تواند موجب تغییر ترکیبات موجود در روغن‌های فرار گیاهی (نظیر عطر و اسانس) یا تولید مونوترپن‌ها در اندام‌هایی از گیاه که آنها را تولید نمی‌کنند یا حتی تولید در گونه‌هایی که فاقد آنها هستند، شوند. تاکنون در این زمینه تحقیقات اندکی در مورد گونه‌های معطر انجام گرفته است. لیمون سنتاز (به عنوان یک مونوترپن سنتاز) یک آنزیم سیکلاز در مسیر بیوسنتزی برخی ترکیب‌های روغن فرار به شمار می‌رود که واکنش تبدیل ژرانیل دی فسفات به لیمون را کاتالیز می‌کند (Munoz-Bertomeu et al., 2008). بررسی‌های اندکی در مورد ژن لیمون سنتاز (*LS*) در گیاهان مختلف صورت گرفته است و تأثیر برخی تیمارها بر بیان این ژن بررسی شده است. برای نمونه، بیان ژن لیمون سنتاز در گیاه *Cuminum cyminum* L. در تیمار غلظت‌های مختلف منگنز در غلظت ۸۰ قسمت در میلیون آن افزایش یافته است (Zarinkamar et al., 2012). همچنین، گزارش شده است که عوامل مختلف بر بیان این ژن مؤثر هستند از جمله Ghannadnia و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که بیان ژن لیمون سنتاز در اندام‌ها و مراحل نموی مختلف گیاه زیره سبز متفاوت است. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن لیمون سنتاز در برگ سه ژنوتیپ مطالعه شده در شرایط بدون تلقیح و تلقیح با قارچ‌های *F. etunicatum* و *F. mosseae* نشان داد که لیمون سنتاز در ژنوتیپ‌های بررسی شده در شرایط شاهد و تلقیح با *F. mosseae*، بیان در خور توجهی نداشت. این ژن در تلقیح با قارچ *F. etunicatum* نیز در مقایسه با شرایط شاهد، فقط در ژنوتیپ میبد افزایش معنی‌دار داشت. Walter و همکاران در سال ۲۰۰۲ در تحقیقی روی بیان ژن

مبهم بسیاری در ارتباط با سازوکار بیان ژن لیمون سنتاز تحت تأثیر عوامل مختلف و شناخت عوامل مختلف در تنظیم بیان ژن و به دنبال آن اسانس و محتوای اسانس حاصل از گیاه وجود دارد که این مسأله بر لزوم انجام تحقیقات بیشتر تأکید دارد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تلقیح گیاه *M. spicata* با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار دارای آثار مثبتی بر میزان اسانس و بیان ژن در سه ژنوتیپ این گیاه است و این افزایش عملکرد در ژنوتیپ‌های تلقیح شده با قارچ *F. etunicatum* به ویژه در ژنوتیپ میبد کارآیی بالاتری داشته است.

سپاسگزاری

نگارندگان از حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه شهر کرد قدردانی می‌نمایند.

محتوای اسانس در گیاهان تراریخت شده با لیمون سنتاز است (Demir *et al.*, 2001). در پژوهش دیگری روی گیاه نعنا فلفلی مشخص شد که بیان ژن لیمون سنتاز تحت تأثیر اشعه UV-B تغییر می‌کند، آنها همچنین بیان کردند که بین بیان ژن و محتوای اسانس رابطه‌ای وجود ندارد (Dolzhenko *et al.*, 2010). Mahmoud و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که در گیاه نعنا فلفلی تراریخت شده با لیمون سنتاز هیچ تغییری در میزان اسانس تریکوم‌های غده‌ای و همچنین مونوترپن‌های موجود در اسانس وجود ندارد. فقدان ارتباط بین بیان ژن لیمون سنتاز و محتوای اسانس در سایر ژنوتیپ‌های گیاه *M. spicata* را می‌توان به سرعت‌های مختلف انتشار اسانس از ساختارهای ترشچی نسبت داد، بنابراین می‌توان استنباط کرد بیان ژن هم در مرحله رونوشت‌برداری و هم پس از آن (ترجمه و پس از آن) قابل تنظیم است (Gershenzon *et al.*, 2000). بر اساس پژوهش حاضر و پژوهش‌های پیشین همچنان نکات

منابع

- Ahmadi-Khoei, M., Shabani, L. and Bagheri, S. (2012) Assay of phenolic compounds and essential oils in mycorrhizal mint genotypes. Iranian Journal of Plant Biology 5(18): 81-94 (in Persian).
- Almeida, P. P., Mezzomo N. and Ferreira, S. R. S. (2012) Extraction of *Mentha spicata* L. volatile compounds: evaluation of process parameters and extract composition. Food and Bioprocess Technology 5(2): 548-559.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology 46(2): 446-475.
- Blilou, I., Ocampo, A. J. and Garcia-Garrido, M. J. (2000) Induction of Ltp (transfer protein lipid) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice root colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Journal of Experimental Botany 51(353): 1969-1977.
- Demir, S. (2004) Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. Turkish Journal of Biology 28: 85-90.
- Dolzhenko, Y., Berteau, C. M., Occhipinti, A., Bossi, S. and Maffei, M. E. J. (2010) UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha x piperita* L.). Photochemistry and

- Photobiology B 100: 67-75.
- Freitas, M. S. M., Martins, M. A. and Vieira, E. (2004) Yield and quality of essential oils of *Mentha arvensis* in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 887-894.
- 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).
- Gupta, M., Prasad, A., Ram, M. and Kumar, S. (2002) Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology* 81(1): 77-79.
- Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K. G. (2002) Effect of the vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology* 81: 77-79.
- Khan, N. I., Tisserat, B., Berhow, M. and Vaughn, S. F. (2005) Influence of autoclaved fungal materials on spearmint (*Mentha spicata* L.) growth, morphogenesis and secondary metabolism. *Journal of Chemical Ecology* 31(7) 1579-1593.
- Khaosaad, T., Vierheilig, H., Nell, M., Zitterl-Eglseer, K. and Novak, J. (2006) Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16(6): 443-446.
- Li, X., Niu, X., Bressan, R. A., Weller, S. C. and Hasegawa, P. M. (1999) Efficient plant regeneration of native spearmint (*Mentha spicata* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 35(4): 333-338.
- Liu, J., Wu, L., Wei, S., Xiao, X., Su, C., Jiang, P., Song, Z., Wang, T. and Yu, Z. (2007) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, nutrient uptake and glycyrrhizin production of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Journal of Plant Growth Regulation* 52(1): 29-39.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- 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.
- Mathur, N. and Vyas, A. (1995) Changes in isozyme patterns of peroxidase and polyphenol oxidase by VAM fungi in roots of *Ziziphus* species. *Plant Physiology* 4: 498-500.
- McConkey, M. E., Gershenzon, J. and Croteau, R. B. (2000) Developmental Regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology* 122: 215-223.
- Miransari, M., Bahrami, H., Rejali, F. and Malakouti, M. (2009) Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. *Soil and Tillage Research* 103(2): 282-290.
- Munoz-Bertomeu, J., Ros, R., Arrillaga, I. and Segura, J. (2008) Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. *Metabolic Engineering* 10(3): 166-177.
- Panwar, J. (1991) Effect of VAM and *Azospirillum brasilense* on photosynthesis, nitrogen metabolism and grain yield in wheat. *Indian Journal of Plant Physiology* 34(4): 357-361.

- Peipp, H., Maier, W., Schmidt, J., Wray, V. and Strack, D. (1997) Arbuscular mycorrhizal fungus- induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochemistry* 44: 581-587.
- Podila, G. K. and Douds, D. D. (2000) Current advances in mycorrhizae research. APS Press, Saint Paul.
- Sajjadi, S. E. (2006) Analysis of the essential oils of two cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 14(3):128-130.
- Silveria, S. V., Lorscheiter, R., Barros, I. B. I., Schwraz, S. F. and Souza, P. V. D. (2006) *Mentha piperita* as a multiplying of arbuscular mycorrhizal fungi. *Botucatu* 8: 91-97.
- Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W. and Walter, M. H. (2003) Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology* 29(9):1955-1979.
- Turjaman, M., Tamai, Y., Santoso, E., Osaki, M. and Tawaraya, K. (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi increased early growth of two nontimber forest product species *Dyera polyphylla* and *Aquilaria filaria* under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 16(7): 459-464.
- Walter, M. H., Hans, J. and Strack, D. (2002) Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D- xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *The Plant Journal* 31(3): 243-254.
- Wang, Zh., Nishioka, M., Kurosaki, Y., Nakayama, T. and Kimura, T. (1995) Gastrointestinal absorption characteristics of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza* extract. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 18: 1238-1241.
- Yuan, Z. L., Dai, C. and Chen, L. (2010) Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *African Journal of Biotechnology* 6: 1266-1271.
- Zare Dehabadi, S. and Asrar, Z. (2009) Study on the effects of zinc stress on induction of oxidative stress and concentration of mineral element in spearmint (*Mentha spicata* L.). *Iranian Journal of Biology* 22(2): 218-228 (in Persian).
- Zarinkamar, F., Ghannadnia, M. and 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.

The effect of inoculation with mycorrhizal arbuscular fungi on expression of limonene synthase in *Mentha spicata* L. genotypes

Masoumeh Ahmadi-Khoei and Leila Shabani *

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

Abstract

Spearmint (*Mentha spicata* L.) is an important economical and medicinal plant from Lamiaceae family, which has gained research attraction as a model for biosynthesis of essential oils due to its high capability for synthesis of monoterpenes. Limonene is a simple monoterpene and its biosynthesis is catalyzed by limonene synthase; a key regulatory enzyme in the biosynthesis pathway of monoterpenes in spearmint plant. This study was concerned with the effect of colonization of roots with *Funneliformis mosseae* and *F. etunicatum* fungi on spearmint plant growth indices, leaf essential oils and changes in the expression of limonene synthase (*LS*) gene. This study also explained the application of GADPH gene as the internal standard for real-time quantitative PCR (RTqPCR) analysis of *LS* in spearmints. Our results showed that essential oil content of leaf in spearmint genotype Meybod inoculated with *F. etunicatum* was higher than that of genotypes from populations Kashan and Bojnourd and was 130% higher than the control. According to the results of this study, increase in transcript accumulation of the *LS* gene in leaves of spearmint plants inoculated with *F. etunicatum* was concordant with the increased essential oil contents and was dependent on the plant genotype.

Key words: Essential oils, Limonene synthase, Arbuscular mycorrhiza, *Mentha spicata*, RT-PCR