Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 48, No 2, Summer 2017 (507-516)
DOI: 10.22059/ijfcs.2017.217314.654197

علوم گیاهان زراعی ایران
دورۀ ۴۸، شمارۀ ۲، تابستان ۱۳۹۶ (ص ۵۱۶-۵۰۷)

بررسی سطح بیان ژن های *lim*، *mdeh* و تغییرات مورفو-فیزیولوژیکی *Mentha piperita* L. در واکنش به تنش خشکی

یوسف رحیمی[۱]، علیرضا طالعی[۲*] و مجتبی رنجبر[۳]
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و استاد، گروه زراعت واصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. استادیار، دانشگاه تکنولوژی‌های ویژه مدرن آمل
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲)

چکیده

نعناع فلفلی یکی از گیاهان دارویی با ارزش در جهان به‌شمار می‌رود که در صنایع غذایی، بهداشتی، داروسازی، و ... کاربرد دارد. در این پژوهش اثر تنش خشکی در چهار سطح: شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه)، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه بروی بیان ژن‌های لیمونن سنتاز (*lim*) و منتول دهیدروژناز (*mdeh*) در مسیر بیوسنتز منتول و پاسخ‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک نعناع فلفلی و عملکرد و نوع ترکیبات اسانس آن با استفاده از تجزیه GC-MS بررسی شد. براساس نتایج تجزیه واریانس، اثر تنش خشکی بروی صفات وزن تر و خشک اندام هوایی، سطح برگ، تعداد برگ، میزان پرولین و محتوی نسبی آب در سطح احتمال ۱ درصد ($P<۰/۰۱$) معنی‌دار بود. تنش خشکی باعث کاهش معنی‌داری در صفات مورفولوژیک شد. میزان پرولین و محتوی نسبی آب با افزایش شدت تنش خشکی به‌ترتیب افزایش و کاهش یافت. عملکرد اسانس با افزایش تنش خشکی، افزایش یافت هرچند که این افزایش معنی‌دار نبود. میزان بیان نسبی ژن لیمونن سنتاز ابتدا افزایش و در سطح ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه کاهش معنی‌داری یافت همچنین میزان بیان نسبی ژن منتول دهیدروژناز در سطوح مختلف تنش خشکی کاهش نشان داد. به‌طور کلی تنش خشکی باعث افزایش عملکرد اسانس ولی کاهش کیفیت آن شد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، نعناع فلفلی، ژن *lim*، ژن *mdeh* و صفات مورفو-فیزیولوژیک.

Investigation of *lim*, *medh* gene expression level and morpho-physiological changes of *Mentha piperiat* L. in response to drought

Yousef Rahimi[1], Alireza Taleei[2*] and Mojtaba Ranjbar[3]
1, 2. Ph.D. Candidate and Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Assistant Professor in the Special Modern Thechnologies of Amol University, Iran
(Received: Oct. 19, 2016 - Accepted: Feb. 20, 2017)

ABSTRACT

Peppermint known as important medicinal plants that used in the food, medical and pharmaceutical industry. In present study the effect of drought stress at four levels: 100 (as control), 75, 50 and 25% field capacity (FC) were investigated on expression of limonene synthase (*lim*) and menthol dehydrogenase (*mdeh*) genes in menthol pathway as well as morpho-physiological responses and performance of peppermint essential oil was evaluated using GC-MS analysis. Results showed that drought stress effect on fresh and dry weight of shoot, leaf area, leaf number, proline content and relative water content (RWC) significantly (P<0.01) differences. Drought stress caused a significant decrease in the morphological traits also the proline content and relative water content increased and declined respectively. Essential oil yield increased under drought stress condition, although the increase was not significant. The relative expression of *lim* gene increase at 75 and 50% FC, while showed a significant decreased at 25% FC. The relative expression of *mdeh* gene decreased at three regime of irrigation compared to control, significantly. In general, drought stress increased oil yield but its quality was declined.

Keywords: Drought stress, *lim* gene, *mdeh* gene, morpho-physiological traits, peppermint.

* Corresponding author E-mail: ataleei@ut.ac.ir

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از منابع مهم تولید دارو هستند که بشر سالیان طولانی از آنها استفاده کرده و روز به روز بر اهمیت آنها افزوده می‌گردد. از زمان‌های گذشته گیاهان دارویی در اکثر فرهنگ‌ها به عنوان منبع دارویی استفاده می‌شدند (Gedif & Hahn, 2002; Muzemil, 2008). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت میزان تجارت گیاهان دارویی تا سال ۲۰۵۰ میلادی بالغ بر پنج تریلیون دلار خواهد بود (Bin Zakaria & Mohd, 2010; Baser, 1997). متابولیت‌های ثانویه طیف وسیعی از ترکیبات اقتصادی همچون آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، اسانس‌ها، استروئیدها و ... را شامل می‌شوند (Liu *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2007). در سال‌های اخیر استفاده از مواد طبیعی گیاهان دارویی به جای افزودنی‌های مصنوعی که دارای اثرات جانبی می‌باشد مورد توجه قرار گرفته است (Des Calzo & Sancho, 2008). گیاهان تیره نعنائیان (*Lamiaceae*) از جمله گیاهان دارویی مهم، هستندکه دارای۱۶۰ جنس و بیش از ۳۰۰۰ گونه می‌باشند و در ایران ۴۷ جنس و حدود ۳۷۰ گونه از گیاهان این خانواده وجود دارد. یکی از مهمترین گونه‌های این خانواده، گونه *Mentha piperita* L. (نعناع فلفلی) با نام رایج Peppermint می‌باشد که مصارف گسترده ای در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی دارد (Croteau *et al.*, 2005). امروزه در کشورهای مختلف جهان، متجاوز از یک میلیون کیلوگرم اسانس در سال از این گیاه استخراج می‌شود، و این خود بیانگر اهمیت توسعه کشت این گیاه درنقاط مختلف کره زمین است (Croteau *et al.*, 2005). براساس مطالعات انجام شده، ماده مؤثره اصلی گونه *Mentha piperita*، منتول[1] (۵۵-۳۰ درصد) می‌باشد، از سایرترکیبات، می‌توان به متیل استات[2] (۱۷/۴ درصد) و منتون[3] (۱۲/۷ درصد) پلی‌گن[4]، منتوفوران[5]، لیمونن[6] و لیمون[7] اشاره کرد، در بین متابولیت‌های ثانویه تولید شده در این گیاه، ترپن‌ها سهم عمده‌ای را به خود اختصاص می‌دهند (Croteau *et al.*, 2005). برای تولید ترپن‌ها در گیاهان دو مسیر سیتوزولی (مسیر موالونات) و پلاستیدی (مسیر ۲-متیل-اریتریتول-۴-فسفات) وجود دارد. در مسیر موالونات سزکوئی ترپن‌ها[8]، تری ترپن‌ها[9] و پلی ترپن‌ها[10]، و در مسیر پلاستیدی مونوترپن‌ها[11]، دی ترپن‌ها[12] و تتراترپن‌ها[13] تولید می‌شوند (Rohdich *et al.*, 2005; Rohmer, 2003). ترکیبی از مونوترپن‌ها و سزکوئی ترپن‌ها اسانس را تشکیل می‌دهد. پیش‌ماده تمام مونوترپن‌ها گرانیل دی فسفات می‌باشد، که از مسیر MEP به‌دست می‌آید. برای بیوسنتز منتول هشت مرحله وجود دارد. به دنبال انباشته شدن IPP[14] و DMAPP[15] نخستین واکنش که تبدیل گرانیل دی فسفات حاصل از ترکیب دو ماده مذکور به لیمونن است انجام می‌شود. اولین واکنش بعد از تولید گرانیل دی فسفات، تولید لیمونن می‌باشد که در اثر حلقوی شدن گرانیل دی فسفات ایجاد می‌شود و این واکنش توسط لیمونن سنتاز صورت می‌گیرد (Croteau *et al.*, 2005). آخرین گام در مسیر تولید منتول احیای گروه کربونیل منتون و تبدیل آن به منتول توسط آنزیم منتون ردکتاز است. مهندسی متابولیت‌های گیاهی جهت تولید ترکیباتی مفید با مقادیر بالاتر یکی از راهکارهای غلبه بر مشکلات مربوط به برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی است، که باعث از بین رفتن تنوع زیستی و کاهش تنوع در کیفیت آنها شده است، (Gomez-Galera *et al.*, 2007). بنابراین شناسایی مراحل تعیین کننده تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش تولید آنها در شرایط کنترل شده یکی از اهداف مهندسی متابولیت می‌باشد. میزان متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر بافت‌های مختلف یک گیاه، مراحل مختلف رشدی، پایه ژنتیکی (کموتایپ)، فصل برداشت، حاصلخیزی و pH خاک، شرایط خشک

1 . Menthol
2 . Methyl acetate
3. Menthon
4 . Pulegone
5 . Menthofuran
6 . Limonene
7 . Limone
8 . Sesquiterpenes
9 . Triterpenes
10 . Polyterpenes
11 . Monoterpenes
12 . Diterpenes
13 . Tetraterpenes
14 . Isopentenyl diphosphate
15. Dimethyl allyl diphosphate

کردن، روش استخراج و شرایط آب و هوایی مثل انواع تنش ها و ... می‌باشد (Cornu *et al.*, 2001; Goren *et al.*, 2001; Aziz *et al.*, 2008; Tateo & Riva, 1991). تنش خشکی از جمله مهمترین عواملی محیطی تأثیرگذار بر روی میزان اسانس گیاهان دارویی است. عملکرد و مواد مؤثره گیاهان دارویی در اثر کمبود رطوبت دارای تغییرات خاصی است که باید مورد ارزیابی قرار گیرند (Sangwan *et al.*, 2001; Rebey *et al.*, 2012). در مطالعات قبلی نشان داده شده است که تنش خشکی باعث تغییر در صفات موفولوژیکی از قبیل ارتفاع، وزن تر و خشک کل گیاه *Satureja hortensis* L. می‌شود (Baher *et al.*, 2002). همچنین کاهش معنی‌داری در ارتفاع، تعداد شاخه های فرعی و گل، طول پدانکل، وزن تر و خشک گل و محتوی اسانس *Matricaria chamomila* L. مشاهده شد (Razmjoo *et al.*, 2008). در حالی‌که برخی مطالعات نشان داده‌اند تنش خشکی باعث افزایش اسانس گیاهان می‌شود (Ozturk *et al.*, 2004; Farahani *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای، بیشترین مقدار منتول در نعناع فلفلی در سطح ۷۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه مشاهده شد (Khorasaninejad *et al.*, 2011). در گیاهان تراریخت شده *Mentha spicata* با ژن *lim*[1] تعداد بیشتری ترکیبات ترپنوئیدی نسبت به گیاهان وحشی مشاهده شد (Kang *et al.*, 2015). همچنین Lange *et al.* (2011) نشان دادند که افزایش بیان ژن *dxp*[2] و کاهش بیان ژن *mfs*[3] باعث افزایش کمیت و کیفیت اسانس نعناع فلفلی می‌شود. تراریخت کردن گیاهان نعناع فلفلی با ژن *lim* نیز موجب تغییرات۱/۲درصدی لیمونن در اسانس نعناع فلفلی شد (Krasnyanski *et al.*, 1999). با توجه به موارد مذکور این پژوهش به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر بیان ژن‌های لیمونن سنتاز و منتول دهیدروژناز که ژن های ابتدا و انتها مسیر تولید منتول هستند، بررسی میزان منتول موجود در اسانس نعناع فلفلی، عملکرد اسانس و برخی از صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه نعناع فلفلی انجام شد.

1. Limonene synthase
2. 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
3. Menthofuran synthase

مواد و روش‌ها

کاشت گیاهان

این پژوهش در سال ۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران انجام شد. نشاها از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی (ACECR)[4] تهیه شدند. خاک مورد نظر براساس تحقیقات قبلی لومی-شنی (sandy-loam) بود. FC (ظرفیت زراعی) خاک مورد نظر برای اعمال سطوح مختلف تنش با استفاده از دستگاه محفظه فشار[5] در آزمایشگاه خاک‌شناسی گروه خاک‌شناسی پردیس کشاورزی تعیین شد که برابر با ۲۴ درصد بود. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار (چهار سطح آبیاری شامل ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه) در سه تکرار اجرا شد، به طوری‌که در هر گلدان سه نشا کشت گردید. اعمال تیمارها دو هفته بعد از کاشت و استقرار نشاها انجام شد و تا اوایل گلدهی به مدت دو ماه ادامه یافت و در این زمان نمونه گیری از برگ انجام شد.

اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک

سنجش میزان پرولین در دمای ۲۵ ±۱°C با استفاده از روش Bates (1973) و همچنین محتوی نسبی آب با استفاده از روش Sanchez (1998) و طریق از فرمول زیر تعیین شد:

$$RWC = \frac{Wf - Wd}{Wt - Wd} \times 100 \qquad (۱)$$

Wf: وزن تر برگ

Wt: وزن بافت آماس یافته گیاه

Wd: وزن خشک برگ

استخراج اسانس

برای استخراج اسانس نعناع فلفلی از دستگاه کلونجر استفاده شد. اسانس به‌دست آمده قبل از آنالیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، سپس از دستگاه گازکروماتوگرافی GC/MS به منظور شناسایی و تعیین میزان ترکیبات موجود استفاده شد.

4 . Academic Center for Education, Culture and Research
5. Pressure chamber

طراحی آغازگرها

برای طراحی آغازگرها از دو برنامه آنلاین Primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/) و DNA Integrate Technology (https://eu.idtdna.com/calc/analyzer) استفاده شد. تمامی نکات مربوط به طراحی آغازگر از قبیل درصد GC بالای ۵۰ درصد و حضور G و یا C در انتهای '3 پرایمرها، دمای اتصال ۶۰ درجه و طراحی آغازگر از ناحیه '3 ژن مورد توجه قرار گرفت. بر این اساس دو جفت پرایمر برای ژن‌های مورد نظر طراحی و از ژن مرجع actin به منظور نرمال‌سازی داده استفاده شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

از بافت برگ با سه تکرار زیستی نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها به ازت مایع منتقل و در ادامه استخراج RNA با استفاده از بافر ترایزول و دستور شرکت سازنده انجام شد. برای ساخت cDNA از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis K1622 شرکت فرمنتاز و بر اساسدستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. بعد از ساخت cDNA، به منظور نگهداری، نمونه‌ها به فریزر ۲۰- منتقل و برای اطمینان از ساخت cDNAها با استفاده از ژن مرجع اکتین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی همه cDNAهای ساخته شده انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل دادها از نرم‌افزار SAS 9.2 و به منظور انجام مقایسات میانگین از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. داده‌های مربوط به دستگاه PCR در زمان واقعی با استفاده از نرم‌افزار Rest© (version 2) (Pfaffl *et al*., 2002) ارزیابی و اطلاعات مربوط به بیان ژن‌ها با نتایج GC-MS مقایسه و تفسیر شد.

نتایج

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول۲)، اثر سطوح مختلف آبیاری شامل شاهد، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه (FC) بر روی صفات وزن تر و خشک اندام هوایی، سطح برگ، تعداد برگ، پرولین و محتوی نسبی آب در سطح احتمال ۱ درصد (P<۰/۰۱) معنی‌دار و بر روی عملکرد اسانس اثر معنی‌داری نداشت. براساس نتایج مقایسه میانگین برای صفات مورفولوژیکی در نعناع فلفلی، بیشترین مقدار این صفات در سطح آبیاری نرمال (Control) مشاهده شد (جدول ۳). با افزایش تنش خشکی، تفاوت معنی‌داری در هر یک از سطوح آبیاری برای صفات سطح برگ و تعداد برگ مشاهده شد. وزن تر و خشک اندام هوایی در سطوح نرمال و ۷۵ ظرفیت زراعی مزرعه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. همچنین کمترین مقدار این صفات در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه مشاهده شد.

تنش خشکی باعث کاهش پتانسیل آب و آسیب به غشا سلول‌ها و تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود که این مساله باعث اختلال در فرایندهای حیاتی گیاه همانند فتوسنتز و تولید پروتئین‌ها می‌شود. در نتیجه در این شرایط رشد گیاهان کاهش یافته و در سطوح شدیدتر تنش خشکی گیاهان از بین می‌روند (Jaleel *et al*., 2009; Todaka *et al*., 2015). در واقع، کاهش آب در دسترس گیاهان باعث تغییر در فشار تورژسانس سلول‌های گیاهی شده و این امر به نوبه خود باعث کاهش رشد و گسترش سلول‌های برگ می‌شود (Alishah *et al*., 2006; Sequera *et al*., 2016). نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش معنی‌داری در پارامترهای رشدی گیاه ریحان (Khalil *et al*., 2010)، ریحان بنفش (Ali-shah *et al*., 2006) و جعفری (Petropoulous *et al*., 2008) می‌شود. کاهش وزن تر و خشک اندام های هوایی گیاه می‌تواند به دلیل کاهش فتوسنتز، فشار تورژسانس سلولی و فعالیت کینازهای وابسته به سایکلین باشد (Sankar *et al*., 2007). در این پژوهش بیشترین مقدار محتوی نسبی آب در سطح آبیاری نرمال و کمترین آن در سطح ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه مشاهده شد و افزایش تنش خشکی باعث کاهش معنی‌داری در محتوی آن شد. کمبود آب با افت محتوای رطوبت نسبی و پتانسیل آب برگ زمینه کاهش فتوسنتز در واحد سطح برگ را فراهم می‌آورد (Siddique *et al*., 2000;

Sadeghian *et al*., 2015). محتوای آب نسبی به صورت معنی‌داری با افزایش شدت تنش خشکی، کاهش می‌یابد. کاهش محتوای آب در بافت‌های گیاهی تحت شرایط خشکی باعث محدود شدن رشد و برخی تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌گردد (Pirzad *et al*., 2011; Hassanpour *et al*., 2012).

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای رفت و برگشت طراحی‌شده به همراه طول قطعات تکثیر شده

Table 1. Sequences of forward and reverse primers of evaluated genes and their corresponding amplified length

Gene and accession number	Primers	Fragment size (bp)	TM
lim (EU108697)	Forward: TGGCTGATAGCAGAGGTGTG Revers: TTGCGGTCATTTGTTGATGT	178	60
mdeh (EU108702)	Forward: GGTAAATTGCAACAAAACAACTGG Revers: TTCAGCACCTTCAGCTTCAC	192	60
actin (KM044035.1)	Forward: CTACGAAGGCTACGCACTCC Revers: GCAATGTAGGCCAGCTTCTC	165	60

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری‌شده در گیاه نعناع فلفلی تحت تنش خشکی

Table 2. Analysis of variance in peppermint plants under drought stress

S.O.V	df	Mean Squares						
		Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Leaf area (cm^2)	Leaf number	Proline (μmol g^{-1} FM)	Relative water content (%)	Essential oil yield (%)
Treat	3	7803.03**	2641.04 **	1.31 **	181550.56 **	1.16 **	0.067 **	0.027 ns
Error	8	137.45	39.35	0.02	5406.67	0.008	0.0011	0.016
C.V	-	12.79	13.39	4.32	15.97	3.8	6.63	12.82

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ns غیر معنی دار است.

**, *, ns: Significantly difference at 1 and 5% probability levels, and non-significantly difference, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین تیمارهای بررسی شده برای صفات موفولوژیکی اندازه‌گیری شده‌و محتوی نسبی آب

Table 3. Comparison of means tested for measured morphological characteristics and relative water content

Treatment	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Leaf area (cm^2)	Leaf number	Relative water content (%)	Proline content (μmol g^{-1} FM)
Control	136.6±1.3 a	73.1±1.1 a	20.22±0.062 a	759.35±43.6 a	0.68±0.02 a	1.74±0.085 d
75 % FC	131.6±2.7 b	70.2±2.5 b	15.01±0.16 b	564±50.58 b	0.55±0.02 b	2.03±0.075 c
50 % FC	66.3±1.8 c	31.2±1.3 c	5.68±0.091 c	276±35.87 c	0.43±0.015 c	2.63±0.081 b
25 % FC	32.2±2.2 d	12.8±0.94 d	5.57±0.037 c	242±38.39 d	0.33±0.015 d	3.13±0.11 a

در هر ستون دست‌کم یک حرف مشترک نشان‌دهندهٔ عدم وجود تفاوت آماری معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Similar letters in each column shows non- significant difference according to Duncan multiple range test at 5% level.

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش تنش خشکی میزان پرولین به صورت معنی داری افزایش می‌یابد، به طوری که بیشترین مقدار آن در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه و کمترین میزان آن در سطح آبیاری نرمال مشاهده شد (جدول۳). مولکول‌های پرولین شامل قسمت‌های آب‌دوست و آب‌گریز می‌باشند. پرولین محلول، می‌تواند حلالیت پروتئین‌های مختلف را تحت تأثیر قرار داده و از غیرطبیعی شدن آلبومین جلوگیری می‌کند. این ویژگی پرولین بدان جهت است که برهمکنش بین پرولین و سطح پروتئین‌های آب‌گریز برقرار شده و به علت افزایش سطح کل مولکول‌های پروتئین آبدوست، پایداری پروتئین‌ها افزایش یافته و از تغییر ماهیت آنها جلوگیری می‌شود. همچنین پرولین آنزیم‌ها را نیز تحت تأثیر قرار داده و باعث پایداری ساختار آنها می‌شود. احتمالاً گیاهان به دلایل فوق پرولین خود را افزایش می‌دهند. Rai *et al*. (2004) نشان دادند که تنش خشکی باعث افزایش محتوی پرولین برگ‌ها در *Ocimum tenuiflorum* L. می‌شود. افزایش پرولین تحت تنش خشکی در گیاهان ذرت، ریحان، علف لیمو و پروانش نیز مشاهده شده است (Serraj *et al*., 2002; Fatima *et al*., 2002; Baher *et al*., 2002;

Abdalla *et al*., 2007). نتایج تجزیه GC-MS بافت برگ در گونه *M. piperita* در جدول ۴ ارائه شده است. در مجموع ۹، ۱۱، ۱۰ و ۱۰ ترکیب از بافت برگ در هر تیمار به ترتیب در حالت شاهد، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه به‌دست آمد این ترکیبات به ترتیب بیانگر ۹۸، ۹۷، ۹۹ و ۹۸ درصد از کل اسانس بودند. ترکیبات عمده شناسایی شده در بافت برگ برای چهار تیمار اعمال شده به همان ترتیبی‌که ذکر شد شامل منتول[1] (۳۰/۱۳ درصد)، منتوفوران[2] (۲۱/۱۰ درصد)، ال-منتون[3] (۱۵/۱۳ درصد) و پلی گن۴ (۱۰/۰۹ درصد) برای حالت نرمال، منتول (۲۲/۶۷ درصد)، منتوفوران (۳۲/۵۱ درصد)، پلی گن (۱۱/۵۳ درصد) و ال- منتون (۶/۹۷ درصد) برای ۷۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه، منتول (۱۷/۵۹ درصد)، منتوفوران (۳۳/۳۸ درصد)، پلی‌گن (۱۲/۹۵ درصد)، ترانس کاران[5] (۱۲/۹۵ درصد) و ژرماکرین- د[6] (۶/۰۴ درصد) برای ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، منتول (۱۳/۲۲)، منتوفوران (۴۰/۱۱)، پلی‌گن (۱۵/۹۱ درصد) ترانس-کاران (۷/۱۸ درصد) برای ۲۵ درصد طرفیت زراعی مزرعه بود. براساس نتایج حاصل از آنالیز اسانس می‌توان گفت که در سطح نرمال، چهار ترکیب منتول، منتوفوران، ال-منتون و پلی گن به ترتیب دارای بیشترین مقدار بودند، در سطح ۷۵ درصد ظرفیت زراعی چهار ترکیب منتوفوران، منتول، پلی گن و ال- منتون به‌ترتیب بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند. در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی چهار ترکیب منتوفوران، منتول، پلی گن و ترانس-کاران و در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی چهار ترکیب منتوفوران، پلی گن، منتول و ترانس-کاران به ترتیب دارای بیشترین مقدار بودند. در مطالعه‌ای ترکیبات موجود در اسانس نعناع فلفلی به ترتیب شامل منتول (۴۰/۵۳)، منتون (۱۴/۶۳)، منتوفوران (۴/۳۲)، متیل استات (۴/۰۷)، پلی‌گن (۰/۸)، نئومنتول[7] (۲/۰۲)، ۱و۸ سینئول[8] (۶/۵۳) و لیمونن (۲/۵۷) شناسایی شدند (Mafei *et al*., 2001). آنالیز اسانس نعناع فلفلی در شش کموتایپ موجود در مزارع اسلواکی غربی نشان داد که ترکیبات عمده موجود در اسانس شامل: منتول (۶۹/۱ درصد)، منتون (۳/۵ درصد)، متیل استات (۴/۵ درصد)، ایزومنتون[9] (۰/۸ درصد)، لینالول[10] ۰/۶ درصد) و فاقد لیمونن بود (Sustrikov & Salamon, 2004). در مطالعه‌ای دیگر اسانس نعناع فلفلی به‌طور عمده حاوی ترکیبات: α-terpinen، پیپریت نون اکسید، ایزومنتون، ترانس کاروول[11]، β-caryophyllen و منتول بود (Yadegarinia *et al*., 2006). نتایج این پژوهش و سایر مطالعات نشان داد که، میزان و نوع ترکیبات موجود در اسانس نعناع فلفلی بسیار متغییر و تابع شرایط محیطی، پایه ژنتیکی، اندام موردنظر و ... می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مقدار منتول با افزایش شدت تنش کاهش، اما مقدار منتوفوران با افزایش شدت تنش افزایش یافت، این مساله می‌تواند ناشی از وجود نواحی cis-acting حساس به خشکی در راه‌انداز ژن منتوفوران سنتاز باشد.

براساس نتایج به‌دست آمده میزان بیان ژن لیمونن سنتاز (*lim*) در سطح ۷۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه ۱۱/۵۱ برابر افزایش، در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه ۱/۲۸ برابر افزایش و در سطح ۲۵ درصد میزان بیان ۳۱/۱۲ برابر حالت نرمال کاهش یافت (شکل۲). لیمونن سنتاز در بیوسنتز منتول دارای نقشی مهمی است و این نقش به‌وسیله حلقوی کردن پیش‌ماده‌های گرانیل دی فسفات به لیمونن مشخص می‌شود. این مونوترپن حلقوی پیش ماده تولید کاروون در Spearmint هم می‌باشد (Kjonaas & Croteau, 1983). میزان بیان ژن لیمونن سنتاز در گیاه نعناع فلفلی تحت تیمار متیل جاسمونات در غلظت‌های صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار با استفاده از روش بررسی بیان نیمه کمی ژن‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان این ژن تحت تأثیر تیمار متیل جاسمونات قرار می‌گیرد طوریکه میزان رونوشت این ژن در ۴ تا ۱۲ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات

1. Menthol
2. Menthofuran
3. L-menthone
4. Pulegone
5. Trans-carane
6. Germacrene-d
7. Neomenthol
8. 1,8-cineole
9. Isomenthone
10. Linalool
11. Trans-carveol

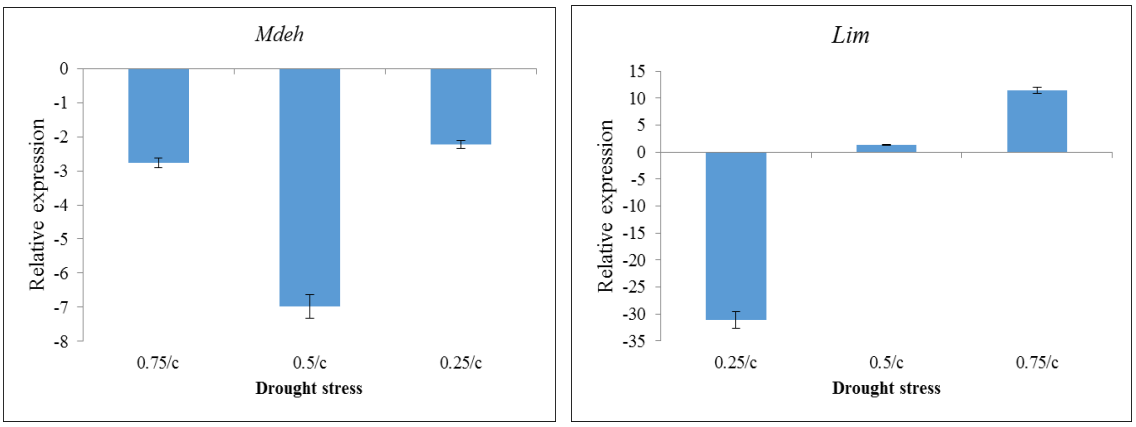
افزایش و بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت کاهش می‌یابد (Afkar *et al.*, 2013). در یک تحقیق افزایش بیان ژن *lim* در *Mentha spicata* و تأثیر آن بر متابولیسم ترپنوئیدها بررسی شد. نتایج نشان داد که تعداد زیادی از ترپنوئیدهایی که در تیپ وحشی وجود ندارند در گیاهان تراریخت تولید می‌شوند (Kang *et al.*, 2015).

میزان بیان ژن *mdeh* در سطح ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه به‌ترتیب ۲/۷۶، ۶/۹۸ و ۲/۲۳ برابر حالت نرمال یافت (شکل۲). این نتایج با نتایج حاصل از GC/MS مطابقت داشت، چرا که بر اساس نتایج تجزیه اسانس میزان منتول اسانس با افزایش تنش خشکی کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که میزان منتول در گیاه نعناع فلفلی در سطح رونویسی کنترل می‌شود، و این نکته مشخص می‌کند که مهندسی متابولیک از طریق افزایش بیان این ژن راهکاری مناسب جهت افزایش میزان منتول خواهد بود. نتایج مطالعات گذشته نشان داد که کاربرد کالی ترپن باعث افزایش بیان ژن‌های منتوفوران سنتاز و منتول دهیدروژناز به طور همزمان می‌شود. همچنین این ماده باعث کاهش بیان در ژن‌های گرانیل دی فسفات سنتاز، لیمونن سنتاز، لیمونن-۳- هیدروکسیلاز و پلی‌گن ردکتاز می‌شود (Bose *et al.*, 2013).

جدول ۴. ترکیبات موجود در اسانس *M. piperita* در بافت برگ تحت اعمال تیمار تنش خشکی

Table 3. Chemical composition of peppermint oil in four treatments

Essential oil constituents	RI	Control	75 % FC	50 % FC	25 % FC
1,8-cineole	1026	3.93 ± 0.065	3.96 ± 0.015	3/32 ± 0/089	2/79 ± 0/036
cis-sabinene hydrate	1067	-	1.62 ± 0.011	-	-
l-menthone	1150	15.13 ± 0.085	6.97 ± 0.024	3.39 ± 0.041	2.94 ± 0.064
menthofuran	1161	21.10 ± 0.098	32.51 ± 0.064	33.38 ± 0.064	40.11 ± 0.15
menthol	1170	30.13 ± 0.05	22.67 ± 0.046	17.59 ± 0.043	13.22 ± 0.74
pulegone	1222	10.09 ± 0.078	11.53 ± 0.044	12.95 ± 0.16	15.91 ± 0.06
trans-carane	1238	-	5.15 ± 0.016	12.95 ± 0.068	7.18 ± 0.045
trans-caryophyllene	1409	3.911 ± 0.048	3.26 ± 0.035	3.98 ± 0.19	3.24 ± 0.36
germacrene-d	1486	7.19 ± 0.84	6.13 ± 0.075	6.04 ± 0.37	4.99 ± 0.45
squalene	2800	3.92 ± 0.78	-	-	-
eicosane	2000	2.23 ± 0.49	1.65 ± 0.036	1.38 ± 0.02	2.67 ± 0.038
alpha-tocopherol	3160	-	1.9 ± 0.045	3.49 ± 0.064	4.88 ± 0.33
Essential oil (%)		0.9	0.9	1	1.1



شکل ۲. بیان نسبی ژن‌های لیمونن سنتاز و منتول دهیدروژناز تحت شرایط تنش خشکی

Figure 2. The relative expression of limonene synthase and menthol dehydrogenase genes under drought stress

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان داشت که تنظیم در سطح رونویسی سهم عمده‌ای در تنظیم بیان ژن‌های مورد بررسی دارد. به نظر می‌رسد افزایش بیان ژن‌های کلیدی ابتدای مسیر بیوسنتز منتول و حتی مسیر MEP و همچنین خاموش سازی ژن‌هایی همچون منتوفوران سنتاز سبب افزایش کمیت و کیفیت اسانس نعناع فلفلی گردد.

REFERENCES

1. Abdalla, M. M. & El-Khoshiban, N. H. (2007). The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticium aestivum* cultivars. *Journal of Applied Sciences Research*, *3*(12), 2062-2074.
2. Afkar, S., Karimzadeh, G., Jalali-Javaran, M., Sharifi, M. & Behmanesh, M. (2013). Influence of methyl jasmonate on menthol production and gene expression in peppermint (*Mentha X piperita* L.). *Journal of medicinal plants and by-products*, 1, 75-82.
3. Alishah, H. M., Heidari, R., Hassani, A. & Dizaji, A. A. (2006). Effect of water stress on some morphological and biochemical characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum*). *Biological Sciences*, *6*(4), 763-767.
4. Alishah, H. M., Heidari, R., Hassani, A. & Dizaji, A. A. (2006). Effect of water stress on some morphological and biochemical characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum*). *Biological Sciences*, *6*(4), 763-767.
5. Alonso, W. R., Rajaonarivony, J. I., Gershenzon, J. & Croteau, R. (1992). Purification of 4S-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*). *Journal of Biological Chemistry*, *267*(11), 7582-7587.
6. Aziz EA Hendawi, T., Azza, EED. & Omer, EA. (2008). Effect of Soil Type and Irrigation Intervals on Plant Growth, Essential Oil and Constituents of *Thymus vulgaris* Plant. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 4(4), 443-450.
7. Aziz, E. E., Al-Amier, H. & Craker, L. E. (2008). Influence of salt stress on growth and essential oil production in peppermint, pennyroyal, and apple mint. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, *14*(1-2), 77-87.
8. Baher, F., Mirza, M., Ghorbanli, M. & Bagher Rezaii, M. (2002). The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(4), 275-277.
9. Baher, Z. F., Mirza, M., Ghorbanli, M. & Bagher Rezaii, M. (2002). The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour and Fragrance Journal*, *17*(4), 275-277.
10. Baser, K.H.C. (1997). Industrial utilization of medicinal and aromatic plants. *Acta Horticulturae*, 503, 177-192.
11. Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-208.
12. Bin Zakaria, M. & Mohd, M. A. (2010). *Traditional Malay medicinal plants*. ITBM.
13. Bose, S. K., Yadav, R. K., Mishra, S., Sangwan, R. S., Singh, A. K., Mishra, B. & Sangwan, N. S. (2013). Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, *66*, 150-158.
14. Croteau, R. B., Davis, E. M., Ringer, K. L. & Wildung, M. R. (2005). (−)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften*, *92*(12), 562-577.
15. Croteau, R. & Gershenzon, J. (1994). Genetic control of monoterpene biosynthesis in mints (*Mentha: Lamiaceae*). In *Genetic engineering of plant secondary metabolism* (pp. 193-229). Springer US.
16. Davis, E. M. & Croteau, R. (2000). Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In *Biosynthesis* (pp. 53-95). *Springer Berlin Heidelberg*.
17. Descalzo, AM. & Sancho, AM. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentine. *Meat Science*, 79, 423-436.
18. Fan, J., Ding, X. & Gu, W. (2007). Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, 102, 168-177.
19. Farahani, HA., Valadabadi, SA., Daneshian, J. & Khalvati, MA. (2009). Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5): 329-333.
20. Fatima, S., Farooqi, A. A. & Sharma, S. (2002). Physiological and metabolic responses of different genotypes of *Cymbopogon martinii* and *C. winterianus* to water stress. *Plant Growth Regulation*, *37*(2), 143-149.
21. Gedif, T. & Hahn, H. J. (2002). Herbalists in Addis Ababa and Butajira, Central Ethiopia: Mode of service delivery and traditional pharmaceutical practice. *Ethiopian Journal of Health Development*, *16*(2), 183-189.
22. Gershenzon, J. (1984). Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In *Phytochemical adaptations to stress* (pp. 273-320). *Springer* USA.

23. Gómez-Galera, S., Pelacho, A. M., Gené, A., Capell, T. & Christou, P. (2007). The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Reports*, 26, 1689-715.
24. Goren, N., Demirci, B. & Baser, K. H. C. (2001). Composition of the essential oils of anacetum spp. from Turkey. *Flavour and fragrance journal*, 16: 191-194.
25. Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam, V., Najafi, F. & Razavi, K. (2012). Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, *34*(4), 1537-1549.
26. Irrigoyen, J. H., Emerich, D. W. & Sanchez, D. M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in modulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84, 55-60.
27. Jaleel, C. A., Manivannan, P. A., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R. A. & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11(1), 100-5.
28. Kang, Y. M., Park, D. J., Lee, D. G., Song, H. J., Kang, S. M., MIN, J., ... & Choi, M. S. (2015). Over expression of IPP isomerase and limonene synthase enzymes in *Mentha spicata* and their influence on the terpenoid metabolism. *Romanian Biotechnological Letters*, *20*(2), 10358-10368.
29. Khalil, S. E., Nahed, G., Azizi, A. & Bedour, L. A. H. (2010). Effect of water stress and ascorbic acid on some morphological and biochemical composition of *Ocimum basilicum* plant. *Journal of American Science*, *6*, 33-44.
30. Khorasaninejad, S., Mousavi, A., Soltanloo, H., Hemmati, K. & Khalighi, A. (2011). The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5360-5365.
31. Kjonaas, R. & Croteau, R. (1983). Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other *Mentha* species. *Archives of biochemistry and biophysics*, *220*(1), 79-89.
32. Krasnyanski, S., May, R. A., Loskutov, A., Ball, T. M. & Sink, K. C. (1999). Transformation of the limonene synthase gene into peppermint (*Mentha piperita* L.) and preliminary studies on the essential oil profiles of single transgenic plants. *Theoretical and Applied Genetics*, *99*(3-4), 676-682.
33. Lange, B. M., Mahmoud, S. S., Wildung, M. R., Turner, G. W., Davis, E. M., Lange, I., ... & Croteau, R. B. (2011). Improving peppermint essential oil yield and composition by metabolic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(41), 16944-16949.
34. Liu, H., Qiu, N., Ding, H. & Yao, R. (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medicinal or food uses. *Food Reseach International*, 41(4), 363-370.
35. Maffei, M., Camusso, W. & Sacco, S. (2001). Effect of *Mentha piperita* essential oil and monoterpenes on cucumber root membrane potential. *Phytochemistry*, *58*(5), 703-707.
36. Muzemil, A. (2008). Determination of artemisinin and essential oil contents of Artemisia annua L. grown in Ethiopia and in vivo antimalarial activity of its crude extracts against *Plasmodium berghei* in mice (Doctoral dissertation, Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Addis Ababa University).
37. Ozturk, A. H. M. E. T., Unlukara, A., Ipek, A. R. İ. F. & Gurbuz, B. İ. L. A. L. (2004). Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Pakistan Journal of Botany*, *36*(4), 787-792.
38. Petropoulos, S. A., Daferera, D., Polissiou, M. G. & Passam, H. C. (2008). The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Scientia Horticulturae*, *115*(4), 393-397.
39. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36-e36.
40. Pirzad, A., Shakiba, M. R., Zehtab-Salmasi, S., Mohammadi, S. A., Darvishzadeh, R. & Samadi, A. (2011). Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(12), 2483-2488.
41. Pirzad, A., Shakiba, M. R., Zehtab-Salmasi, S., Mohammadi, S. A., Darvishzadeh, R. & Samadi, A. (2011). Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates *in Matricaria chamomilla* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(12), 2483-2488.
42. Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S. N. & Mehrotra, S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant science*, *167*(5), 1159-1169.
43. Razmjoo, K. H., Heydarizadeh, P. & Sabzalian, M. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 10(4), 451-454.

44. Rebey, I. B., Jabri-Karoui, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F. & Marzouk, B. (2012). Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, *36*(1), 238-245.
45. Rohdich, F., Bacher, A. & Eisenreich, W. (2005). Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochemical Society Transactions*, 33, 785-791.
46. Rohmer, M. (2003). Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure and Applied Chemistry*, 75, 375-387.
47. Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F. & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth regulation*, *34*(1), 3-21.
48. Sankar, B., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R. & Panneerselvam, R. (2007). Drought-induced biochemical modifications and proline metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. *Acta Botanica Croatica*, *66*(1), 43-56.
49. Sanchez, S. R. (1998). Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field crops research*, 59, 225-235.
50. Sadeghian, M., Hakimi, M. H. & Sodaeizadeh, H. (2015). Effect of drought stress on some physiological and morphological characteristics of *Hymenocrater yazdianus*. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, *7*, 110-119.
51. Sequera-Mutiozabal, M., Tiburcio, A. F. & Alcázar, R. (2016). Drought Stress Tolerance in Relation to Polyamine Metabolism in Plants. In: *Drought Stress Tolerance in Plants, 1*, 267-286. Springer International Publishing.
52. Serraj, R. & Sinclair, T. R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell & Environment*, *25*(2), 333-341.
53. Siddique, M. R. B., Hamid, A. & Islam, M. S. (2000). Drought stress effects on water relations of wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41.
54. Sustrikova, A. & Salamon, I. (2004). Essential oil of peppermint (*Mentha× piperita* L.) from fields in Eastern Slovakia. *Horticutural Science*, *31*, 31-6.
55. Todaka, D., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 84.
56. Tateo, F. & Riva, G. (1991). Influence of the drying process on the quality of essential oils in *Artemisia absinthium*. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 82, 607-614.
57. Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A. & Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, *67*(12), 1249-1255.