

## The Study on Gene Expression of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coa Reductase (*HMGR*) and $\gamma$ -Terpinene Synthesis in *Thymus Vulgaris* L. Under Water Deficit Stress

Fatemeh Mirzaei<sup>1</sup>, Ahmad Ismaili<sup>2\*</sup>, Foad Fatehi<sup>3</sup>, Ardeshir Ghaderi<sup>4</sup> and Soheila Afkar<sup>5</sup>

- 1- M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
- 2- **\*Corresponding Author:** Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (ismaili.a@lu.ac.ir)
- 3- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Institute of Medicinal Plant Research, Jahad Daneshgahi, Karaj, Iran
- 5- Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

Received: 26 April, 2017

Accepted: 11 October, 2017

### Abstract

#### Background and Objectives

Drought is a major abiotic stress that limits agricultural crop production. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) is an aromatic and medicinal plant which is very important for the herbal industry. This study was aimed to investigate the variation some of the secondary metabolites and morphological traits as well as changes in expression of genes involved in the biosynthesis of thymol (including *HMGR* and *TPS2*) by real-time PCR. One of the main goals of the present study was to find out the relationship between the transcript of these genes and related metabolites in thyme.

#### Materials and Methods

This study was conducted in the greenhouse of Iranian Institute of Medicinal Plants of Jahad Daneshgahi (Karaj, Iran) in 2016. The experimental design was a randomized complete block design with 5 replication and 4 water deficit stress treatments, including 100% ( $T_1$ , control), 70% ( $T_2$ , mild stress), 40% ( $T_3$ , moderate stress), and 20% ( $T_4$ , severe stress) of field capacity (FC). Total RNA was extracted from leaves using TRIzol reagent following the manufacturer's instructions. First strand synthesis of cDNA was performed immediately using 1  $\mu$ g of total RNA with simultaneous use of oligo-dT (50  $\mu$ M) primers and random hexamer and reverse transcriptase enzyme following the manufacturer protocol. In order to examine gene expression by real-time PCR, the method of fluorescence dye SYBR green (Fermentase, USA) was used. The amount of thymol and carvacrol were measured by HPLC.

#### Results

Results of morphological traits showed that increasing the water deficit stress caused a decrease in root biomass, shoot fresh weight, plant height, root length, and the number of



side branches. Results of gene expression profiling showed that the highest expression of *TPS2* and *HMGR* genes and the highest amount of thymol and carvacrol was obtained in treatment T<sub>2</sub> (70% FC).

### **Discussion**

*TPS2* and *HMGR* gene expression changes were similar to the changes of monoterpenes thymol and carvacrol in all treatments and the highest number of monoterpenes and gene expression were obtained in mild water deficit stress treatment in comparison with control, moderate, and severe stresses. Altogether, according to the results of this study, mild stress had a significant effect on increasing the expression of *HMGR* and *TPS2* and led to a higher production of monoterpenes.

**Keywords:** Carvacrol, Morphological traits, Thymol

## بررسی بیان ژن ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMGR) و گاماترپین سینتاز (TPS2) تحت تنش کم آبی در آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.)

فاطمه میرزایی<sup>۱</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۲\*</sup>، فواد فاتحی<sup>۳</sup>، اردشیر قادری<sup>۴</sup> و سهیلا افکار<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

۲- \*نویسنده مسئول: استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران (ismaili.a@lu.ac.ir)

۳- استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

۵- استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۶

### چکیده

این آزمایش با هدف بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها و برخی صفات مورفولوژی (شامل وزن تر ریشه و اندام هوایی، ارتفاع بوته، طول ریشه و تعداد ساقه جانبی) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تیمار شامل شرایط ۱۰۰ درصد (T<sub>1</sub>، شاهد)، ۷۰ درصد (T<sub>2</sub>، تنش ملایم)، ۴۰ درصد (T<sub>3</sub>، تنش متوسط) و ۲۰ درصد (T<sub>4</sub>، تنش شدید) ظرفیت مزرعه‌ای در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج در سال ۱۳۹۴ اجرا گردید. نتایج حاصل از صفات مورفولوژی نشان داد که با افزایش تنش کم آبی وزن تر ریشه، وزن تر اندام هوایی، ارتفاع بوته، طول ریشه و تعداد ساقه‌های جانبی کاهش یافت. نتایج بررسی بیان ژن‌ها نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن‌های *TPS2* و *HMGR* و بیشترین میزان تیمول و کارواکرول در تیمار T<sub>2</sub> حاصل شد. روند تغییرات بیان ژن‌های *TPS2* و *HMGR* با روند تغییرات میزان مونوترپن تیمول و کارواکرول در همه تیمارها مشابه بود؛ به طوری که بیشترین میزان مونوترپن‌ها و بیان ژن‌های *TPS2* و *HMGR* در تیمار T<sub>2</sub> و سپس در تیمار T<sub>1</sub> مشاهده شد و کمترین نیز در تیمارهای T<sub>3</sub> و T<sub>4</sub> حاصل شد. در مجموع با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، تنش ملایم بر افزایش بیان ژن‌های *TPS2* و *HMGR* مؤثر بود و منجر به تولید بیشتر مونوترپن‌ها گردید.

کلیدواژه‌ها: تیمول، صفات مورفولوژی، کارواکرول

### مقدمه

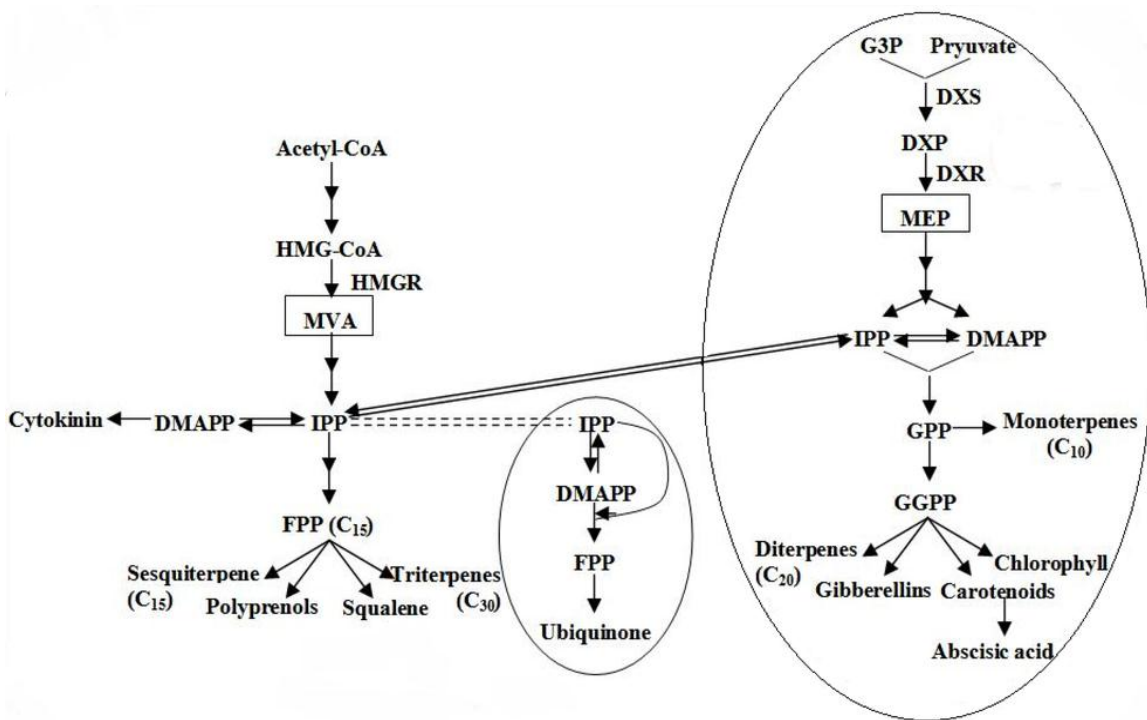
زایشی ذخیره می‌کنند (Baghallian and Naghdibady, 2000). گیاه آویشن یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که با دارا بودن بیش از ۲۰ نوع ترکیب شیمیایی شناخته شده و مؤثر، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی به شمار می‌رود (Horwath et al., 2008). مهم‌ترین ماده مؤثر موجود در آویشن تیمول است که به دلیل خواص ضد گیاه‌خوار، ضد میکروبی، دارویی و آنتی‌اکسیدان آن می‌باشد (Braga et al., 2008).

خانواده نعناعیان Lamiaceae یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی است که دارای پراکنش جهانی (به غیر از مناطقی قطب شمال و جنوب) می‌باشند. این خانواده دارای حدود ۲۰۰ جنس و دو تا پنج هزار گونه از بوته‌های معطر و درختچه‌های کوتاه است. اغلب نعناعیان تولیدکننده ترپن‌ها و انواع ترکیبات دیگر هستند که این ترکیبات را (به‌طور عمده) در غدد اپیدرمی برگ‌ها، ساقه‌ها و اندام‌های

برای ساخت ترکیبات سزکویی و تری-ترینها تبدیل می‌شود، درحالی که مسیر پلاستییدی MEP، ترکیبات IPI و DMAPP را برای مونو، دی و تتراترینها فراهم می‌کند (Lane et al., 2010).

برای تشکیل IPP از مسیر موالونات در سیتوسول، در ابتدا دو مولکول استیل کوآنزیم A (AC-CoA) با هم ترکیب شده و استواستیل کوآنزیم A (ACAC)-COA را به وجود می‌آورند. در ادامه ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم A (HMG-CoA) تشکیل می‌شود. واکنش تبدیل HMG-CoA به موالونیک اسید (MVA) توسط ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMGR; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A)، کاتالیز می‌شود (Zhang et al., 2011) (شکل ۱).

ترینوئیدها ترکیبات گیاهی با گروه‌های متنوع ساختاری بوده که با وجود داشتن ساختار و عملکرد پیچیده، از واحدهای ایزوپرن پنج کربنه و ایزوپنتینیل دی فسفات (IPP; isopentenyl diphosphate) به وجود آمدند (Sauret-Güeto et al., 2006). دو مسیر بیوسنتزی جهت تشکیل ترینوئیدها وجود دارد (Schillmiller et al., 2009)؛ مسیر کلاسیک موالونات (MVA; Mevalonate) و مسیر ۲-C-متیل-D-اریتریتول ۴-فسفات (MEP; Methyl-erythritol-4-phosphate) (Lichtenthaler, 1999). مسیر MVA با منابع IPP سیتوسولی آغاز می‌شود و به وسیله آنزیم ایزوپنتینیل دی فسفات ایزومراز (IDI; isopentenyl-diphosphate Disomerase) به دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP; dimethylallyl diphosphate) تبدیل می‌شود.



شکل ۱- مسیر بیوسنتز متیل اریتریتول (MEP) و موالونات (MVA)

DXP: ۱-دئوکسی-۵-زیلوز-۵-فسفات؛ DXR: ۱-دئوکسی گزیلوز ۵-فسفات؛ DMAPP: دی متیل آلیل دی فسفات؛ FPP: فARNسیل دی فسفات؛ GPP: ژرانیل دی فسفات؛ GGPP: ژرانیل ژرانیل دی فسفات؛ HMGR: ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز؛ MVA: موالونیک اسید

Figure 1. Methyl-erythritol-phosphate (MEP) and Mevalonic acid (MVA) biosynthesis pathway.

DXP: 1- deoxy-D-xylulose5- phosphate; DXR: 1- deoxy-D-xylulose5- phosphate reductoisomerase;

DMAPP: dimethylallyl diphosphate; FPP: farnesyl diphosphate; GPP: greanyl diphosphate;

GGPP: geranyl geranyl diphosphate; HMR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A;

IPP: isopentenyl diphosphate; MEP: Methyl- erythritol-4- phosphate;

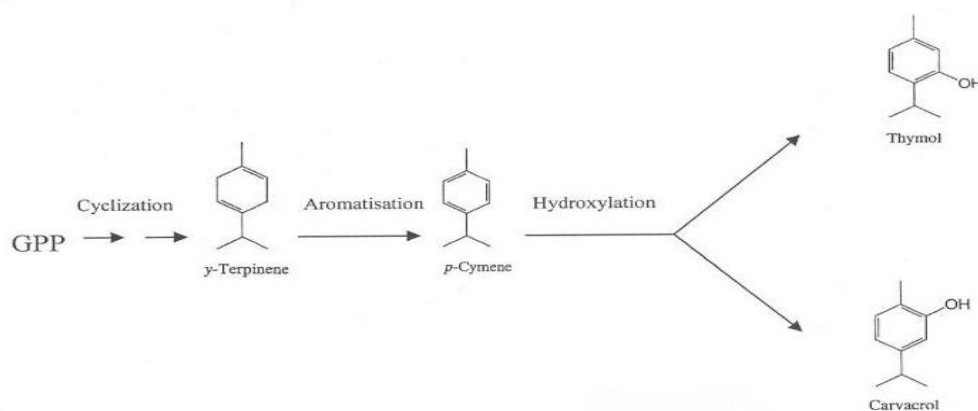
MVA: Mevalonate

(2003). این آنزیم ماده ۳-هیدروکسی و ۳-متیل گلو تاریل کو آنزیم A را با استفاده از ۲ مولکول NADPH به موالونیک اسید تبدیل می کند که اولین ماده حد واسط اختصاصی مسیر بیوسنتزی MVA می باشد. با توجه به این که ژن *HMGR* در تولید مونوترپن ها نقش ندارد، اما در برخی مقالات گزارش شده که این ژن در سنتز مونوترپن ها نقش داشته است (Hampel *et al.*, 2007). مطالعات (Schuhr *et al.*, 2003) روی گیاه گل پریش (Catharanthus rosea) شواهدی دال بر مشارکت دو مسیر MVA سیتوسولی و MEP کلروپلاستی در تأمین پیش سازهای IPP و DMAPP برای تولید مونوترپن ها ارائه می دهد. تاکنون تعدادی از ژن های ترپن سینتازها (TPS) در چندین گونه مهم از نواعیان شناسایی و بررسی شدند. ژن TPS2 یکی از ژن های کلیدی در پایین دست مسیر بیوسنتز تیمول است که منجر به سنتز گاماترپین به پی سیمن و سپس تیمول و کارواکرول می شود (Lane *et al.*, 2010).

کمبود آب از مهم ترین عوامل محیطی کاهش رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان زراعی، باغی و دارویی به خصوص در مناطق خشک و نیمه خشک دنیا است گزارش شده است که تنش خشکی سبب کاهش عملکرد صفات مورفولوژی در گیاه آویشن شد (Babae *et al.*, 2010).

مونوترپن ها از مسیر MEP سنتز می شوند. اولین مرحله در این مسیر تراکم شدن پیرووات و گلسیرآلدئید ۳- فسفات (G3P) توسط آنزیم DXP سینتاز (DXS) به منظور ایجاد ۱- دئوکسی-D- زایلوز ۵- فسفات (DXP) است. سپس DXP توسط DXP ردوکتاز ایزومراز (DXP) به MEP تبدیل می شود (Carretero-Paulet *et al.*, 2002). در آخرین مرحله نیز ۱-هیدروکسی ۲-متیل ۲-(E)- بوتیل ۴- دی فسفات (HMBPP) به پیش ماده های مورد نیاز ترپن ها یعنی IPP و DMAPP تبدیل می شود (Rohdich *et al.*, 2003). فعالیت آنزیمی IDI می تواند به یکدیگر تبدیل شوند. در ادامه با ترکیب شدن این دو ماده و تحت تأثیر ژرانیل دی فسفات سینتاز (GPPs)، ژرانیل دی فسفات (GPP) که پیش ماده مونوترپن هاست، به وجود می آید (شکل ۱). GPP نیز تحت تأثیر آنزیم مونوترپن سینتاز به مونوترپن ها تبدیل می شود (Davis *et al.*, 2005). گاماترپین سینتاز یک مونوترپن سینتاز است که ژرانیل دی فسفات را به گاماترپین تبدیل می کند. مسیر تشکیل تیمول در آویشن با مونوترپن گاماترپین شروع و از طریق پی سیمن آروماتیک در مسیر به تیمول و کارواکرول تبدیل می شود (Poulose and Croteau, 1978) (شکل ۲).

در گیاهان آنزیم *HMGR* به عنوان آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتزی MVA شناخته شده است (Hemmerlin *et al.*, )



شکل ۲- مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول (Mikio and Taeko, 1962): GPP: ژرانیل دی فسفات

Figure 2. Thymol and carvacrol biosynthesis pathway (Mikio and Taeko, 1962)

GPP: greanyl diphosphate

جهت سازگاری در اتاق رشد با دمای  $25 \pm 2$  سانتی گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۷۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. گلدان‌های مورد استفاده از نوع پلاستیکی با قطر حدود ۱۵ سانتی متر و ارتفاع ۲۵ سانتی متر بودند و در همه گلدان‌ها ۱۲۰۰ گرم خاک ریخته شد. قبل از شروع آزمایش، ظرفیت زراعی خاک اندازه‌گیری شد و حدود ۱۰ درصد تعیین شد. خاک، گلدان و گیاه همگی جداگانه وزن شد و پس از نشاکاری، گلدان‌ها به مقدار مساوی آبیاری شدند تا نشاها در محل جدید استقرار یابند. گیاهان پس از استقرار نشاها (۳ ماه پس از نشاکاری) به مدت ۲۱ روز تحت تنش قرار گرفتند و هر دو روز یک بار با توجه به درصد ظرفیت زراعی آن‌ها (۱۲۰، ۸۴، ۴۸ و ۲۴ میلی لیتر) آبیاری شدند. تیمارهای آبیاری مورد استفاده جهت اعمال تنش کم آبی شامل  $T_1$ : ۱۰۰ درصد (شاهد)،  $T_2$ : ۷۰ درصد (تنش ملایم)،  $T_3$ : ۴۰ درصد (تنش متوسط) و  $T_4$ : ۲۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) بودند. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۵ تکرار اجرا شد و هر گلدان حاوی ۲ گیاه به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. برای بررسی بیان ژن‌ها از دو تکرار بیولوژیکی استفاده شد. به طوری که چند برگ یک گیاه با هم ادغام و به عنوان یک تکرار بیولوژیک در نظر گرفته شد و سپس از آن‌ها RNA استخراج شد. برای صفات فیتوشیمیایی به علت بالا بودن هزینه از تمامی گلدان‌های هر تیمار نمونه برگی جدا و پس از ادغام به عنوان یک تکرار ادغام شده (Pooled) استفاده شد. پس از پایان تنش، نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری صفات مورفولوژی و فیتوشیمیایی برداشت شدند و نمونه‌های دیگری جهت استخراج RNA، در ازت مایع فرو برده شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال  $80^-$  سانتی گراد نگهداری شد.

#### اندازه‌گیری صفات مورفولوژی

پس از پایان تنش، صفات مورفولوژی نظیر وزن تر اندام هوایی (گرم در بوته)، ارتفاع بوته (سانتی متر) و تعداد ساقه‌های جانبی اندازه‌گیری شد. همچنین ریشه

در مطالعه‌ای مشاهده شد که تنش آبی سبب افزایش اسانس در پونه کوهی (Dunford and Vazquez, 2005)، مرزه (Seyyedan et al., 2014) و آویشن دناپی (Aziz et al., 2008) شد. تنش خشکی زیاد باعث کاهش فتوسنتز، اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی و سرانجام خشک شدن و مرگ گیاه می‌شود (Jaleel et al., 2009). تخریب غشاهای سلول یکی از پیامدهای مستقیم کمبود آب می‌باشد. تنش خشکی بعد از مرحله گرده‌افشانی باعث افت معنی‌دار عملکرد دانه می‌شود (Sharifi et al., 2017). مطالعات (Rahimi 2013) روی گیاه نعنای فلفلی نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن لیمونین سینتاز در تنش آبی ۷۵ درصد اتفاق افتاد.

با توجه به این که تاکنون مطالعات کمی در رابطه با تأثیر کم آبی بر میزان تغییرات ژن‌های آویشن انجام شده است، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر تنش کم آبی بر تغییرات برخی از ترکیبات اسانس، صفات مورفولوژی و همچنین میزان تغییرات بیان برخی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز تیمول در گیاه آویشن باغی انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی و اعمال تنش

این آزمایش در سال ۱۳۹۴ در گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی کرج اجرا شد. بذره‌های آویشن باغی رقم واریکو ۳ (*Thymus vulgaris* L. CV. Varico 3) از مؤسسه تحقیقات اصلاح، تهیه نهال و بذر سوئیس توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج تهیه شدند.

بذور استریل در محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار کشت شدند و شیشه‌های حاوی نمونه در اتاق کشت با دمای  $25 \pm 2$  سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بین مرحله چهار تا هشت برگی، گیاهچه‌های درون شیشه‌ای یک اندازه و مشابه از نظر رویشی انتخاب و به گلدان‌های کوچک با ترکیبی از کوکوپیت و پیت موس استریل با نسبت ۳:۱ منتقل شدند و

گیاه بعد از قطع قسمت هوایی از گلدان بیرون آورده شد، شسته و عاری از خاک گردید و وزن تر (گرم در بوته) و طول آن (سانتی متر) اندازه گیری شد.

**سنجش میزان تیمول و کارواکروئل**

جهت سنجش میزان تیمول و کارواکروئل بخش های مختلف گیاه به مدت یک هفته در هوای اتاق خشک شدند. بعد از آسیاب شدن، مقدار ۱۰g از پودر ماده گیاهی در ارلن ریخته و به آن ۱۰۰ میلی متر متانول اضافه شد، سپس به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه اولتراسونیک عصاره گیری شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۵ سانتی گراد) در محیط تاریک ماند. سپس عصاره صاف شده تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد قرار داده شد (Ghaedi, 2015). دستگاه HPLC مدل PLATIN blue به همراه پمپ L7100 مجهز به آشکارساز آرایه فوتونی (PDA) در طول موج ۲۷۴ نانومتر، سیستم تزریق اتوماتیک و رابط نرم افزاری EZchrom استفاده شد. ستون مورد استفاده Nucleodur MACHERY-NAGEL ساخت شرکت 100-5, C18 کشور آلمان با طول ۲۵۰ میلی متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی متر بود. فاز متحرک مورد استفاده شامل فاز A آب ۴۵ درصد در فاز B استونیتریل به صورت ایزوکراتیک و سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بود. استونیتریل و آب با خلوص کروماتوگرافی و سایر موارد مورد استفاده از شرکت مرک تهیه گردید.

### طراحی آغازگر

از آنجایی که در پایگاه بین المللی NCBI، گزارشی از توالی ژن *HMGR* در گیاه آویشن باغی موجود نبود، از این رو با الگو قرار دادن توالی این ژن در گیاهان نزدیک به گونه آویشن باغی با شماره های دسترسی JX630155.1، AY739957.1، AB758241.1 در نرم افزار Bioedit (Hall, 1999) هم ردیف سازی توالی ها صورت گرفت. نواحی محافظت شده این ژن شناسایی و برای طراحی آغازگر در نرم افزار Oligo7 مورد استفاده قرار گرفت. برای ژن *TPS2* از شماره دسترسی JX997981.1 برای طراحی آغازگر استفاده شد. در نهایت آغازگرهای طراحی شده برای ارزیابی اختصاصی بودن در نرم افزار primer-BLAST سایت NCBI مورد آزمون قرار گرفتند. لیست آغازگرهای طراحی شده برای دستیابی به توالی ژن های مورد مطالعه در جدول (۱) آورده شده است.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

جهت استخراج RNA از برگ از روش ترایزول استفاده شد (Chomczynski and Sacchi, 1987). برای از بین بردن ناخالصی ناشی از DNA در RNA استخراج شده، از تیمار با آنزیم DNase I RNase-free شرکت فرمنتاز استفاده گردید. برای حذف و غیرفعال کردن آنزیم DNase I مقدار ۲ میکرولیتر EDTA با غلظت ۵۰ میلی مولار اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز، نانودرآپ NanoDrop

## جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده برای بررسی بیان ژن‌های هدف از طریق واکنش PCR در زمان واقعی

Table 1. Primers used for gene expression analysis of target genes via real time PCR

نام آغازگر	توالی	دمای ذوب (سانتی‌گراد)
Primer name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
HMGR-F	CCCTCTCTACCTCACCAACGGAGTC	63
HMGR-R	CGAAGAAGCCGAGGAGATAGATGAAGG	63
TPS2-F	GCTGAAGAGAGGGGACGTG	59
TPS2-R	CTCCCGCAGCAGATACTTCAC	60
18srRNA-F	ATGTTTAGAAGGGTGAGTGAGCAGTTTAC	59
18srRNA-R	GCCTCATCATCACTCTTCCTCATCATC	60

## واکنش PCR در زمان واقعی

برای انجام بررسی بیان ژن به روش Real Time PCR از روش مبتنی بر رنگ فلورسینس SYBR green (Fermentase, USA) طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت. در این روش ابتدا در دستگاه ترموسایکلر معمولی شرایط انجام واکنش PCR شامل حجم واکنش، غلظت پرایمر، دمای اتصال پرایمرها، مدت زمان لازم برای بسط قطعه، غلظت  $MgCl_2$  و سایر عوامل مؤثر بر تکثیر بهینه شد و شرایط بهینه به دست آمده در دستگاه Step One Real Time PCR (ABI, USA) اجرا شد. همچنین صحت و درستی cDNA سنتز شده با استفاده از PCR ژن کنترل داخلی (*18srRNA*) در همه نمونه‌های مورد مطالعه انجام گرفت. در واکنش کنترل منفی (بدون cDNA الگو یا (Not template control (NTC)، به جای cDNA، ddH<sub>2</sub>O اضافه شد. میزان نسبی بیان ژن‌ها با استفاده از ۲ تکرار بیولوژیکی و ۲ تکرار تکنیکی (RNA) محاسبه شد.

برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن‌ها از روش  $\Delta\Delta Ct$  استفاده شد (Schmittgen and Livak, 2008).

واکنش تکثیر تصادفی این ژن‌ها به صورت ۱۰ دقیقه واسرشته سازی اولیه و ۴۰ چرخه (با دمای واسرشته سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای بهینه آورده شده در جدول (۱) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آنزیمی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه) صورت گرفت. همچنین برای اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده، در تکثیر ژن مورد نظر از منحنی ذوب (Melting curve) استفاده شد.

داده‌های مورفولوژی با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (با استفاده از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵) قرار گرفتند. مقایسه آماری نتایج بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از محاسبه خطای استاندارد و آزمون t استیودنت (مقایسه با تیمار شاهد) صورت گرفت.

## نتایج و بحث

## صفات مورفولوژی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد تنش کم آبی اثر معنی داری بر وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه، طول ریشه و تعداد ساقه‌های جانبی داشت ( $p \leq 0/05$ )، اما بر ارتفاع بوته بی تأثیر بود (جدول ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین با افزایش سطوح تنش کم آبی، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه، طول ریشه، ارتفاع بوته و تعداد ساقه‌های جانبی کاهش یافت. در این مطالعه بیشترین وزن تر اندام هوایی مربوط به تیمار T<sub>1</sub> و کمترین مربوط به تیمار T<sub>4</sub> بود. با افزایش سطوح تنش کم آبی، وزن تر ریشه نیز کاهش معنی داری نشان داد (جدول ۳). محققین گزارش کردند خشکی بر ساقه‌های مریم گلی سبب نازک تر و خشک تر شدن آن و همچنین موجب کوچک تر شدن برگ‌های گیاه تنش دیده نسبت به شاهد می‌شود (Bettaieb et al., 2009).

با اعمال تنش، ارتفاع بوته نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول ۳). در تحقیق حاضر ارتفاع بوته و وزن تر اندام هوایی با افزایش سطوح تنش کم آبی کاهش یافتند؛ زیرا تنش خشکی از طریق نقصان در آماس سلول، کاهش سطح برگ و کاهش جذب مواد غذایی منجر به



خشک و وزن تر اندام رویشی، حجم ریشه، وزن تر و خشک ریشه و طول ریشه کاهش نشان داد. نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات انجام شده فوق مطابقت دارد. کمبود آب در گیاهان می تواند سبب اختلالات فیزیولوژیکی، همچون کاهش فتوسنتز و تنفس شود (Schuhly, 2004). کمبود آب همچنین موجب کاهش تورژسانس سلولی شده و در نهایت کاهش رشد و توسعه سلول به خصوص در ساقه و برگ ها را به دنبال خواهد داشت. با کاهش رشد سلول اندازه اندام محدود می شود و به همین دلیل است که اولین اثر محسوس خشکی روی گیاه را می توان از روی کاهش ارتفاع یا اندازه کوچک تر برگ ها تشخیص داد (Babae et al., 2010).

کاهش ارتفاع و وزن تر اندام هوایی می شود. با افزایش تنش کم آبی، وزن تر ریشه نسبت به شاهد کاهش نشان داد. این کاهش می تواند تحت تأثیر تخصیص بیشتر بیوماس تولیدی گیاه به سمت ریشه ها (Albouchi et al., 2003) و یا در اثر کاهش میزان کلروفیل و یا بازدهی فتوسنتز (Viera et al., 1991) باشد. بررسی شاخص های رشدی بومادران تحت تنش خشکی نیز کاهش معنی داری در طول ریشه نشان داد، به طوری که طول ریشه در شرایط آبیاری افزایش و در شرایط تنش در گلدان کاهش یافت (Lebaschy and SharifiAshourabadi, 2004). مطالعات (Babae et al., 2010) بر گیاه آویشن نشان داد که با افزایش تنش خشکی ارتفاع بوته، تعداد ساقه جانبی، وزن

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورفولوژی در آویشن باغی رقم واریکو ۳ تحت تنش کم آبی

Table 2. Analysis of variance of morphological traits in *Thymus vulgaris* (var. Varico 3) under water deficit stress

تعداد ساقه جانبی Number of side branch	طول ریشه Root length	میانگین مربعات Mean square			درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of Variation
		ارتفاع بوته Shoot length	وزن تر ریشه Fresh Weight root	وزن تر اندام هوایی Fresh weight stem		
0.44	2.04	8.24	9.83	0.02	4	تکرار Replication
2.21*	5.90*	4.52 <sup>ns</sup>	7.67*	1.08*	3	تیمار Treatment
0.43	0.32	9.20	1.76	0.04	12	خطا Error
20.07	6.65	21.86	18.01	21.10		ضریب تغییرات (درصد) C.V (%)

ns, \* و \*\* به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی دار، معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد را نشان می دهند.

ns, \* and \*\* show no significant differences, significant at the 5 and 1% respectively.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش کم آبی بر صفات مورفولوژیکی در آویشن باغی رقم واریکو ۳

Table 3. Mean comparisons of the effects of different levels of water deficit stress on morphological traits in *Thymus vulgaris* (var. Varico 3)

تعداد ساقه جانبی Number of side branch	طول ریشه (سانتی متر) Root length (cm)	ارتفاع بوته (سانتی متر) Shoot length (cm)	وزن تر ریشه (گرم در بوته) Fresh weight root (g/plant)	وزن تر اندام هوایی (گرم در بوته) Fresh weight stem (g/plant)	سطوح کم آبی (ظرفیت زراعی) Level of water deficit (%FC)
4.00 <sup>a</sup>	10.10 <sup>a</sup>	15.30 a	0.089 <sup>a</sup>	1.63 <sup>a</sup>	T <sub>1</sub> (100)
3.46 <sup>a</sup>	8.70 <sup>b</sup>	13.52 a	0.077 <sup>ab</sup>	0.84 <sup>b</sup>	T <sub>2</sub> (70)
3.25 <sup>ab</sup>	7.80 <sup>c</sup>	13.40 a	0.065 <sup>b</sup>	0.79 <sup>b</sup>	T <sub>3</sub> (40)
2.40 <sup>b</sup>	7.80 <sup>c</sup>	13.30 a	0.062 <sup>b</sup>	0.56 <sup>b</sup>	T <sub>4</sub> (20)

در هر ستون میانگین های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی دار هستند.

Means followed by similar letters in each column are not significantly different.

### میزان تیمول و کارواکروول

در نتایج حاصل از سنجش میزان تیمول و کارواکروول مشاهده شد تیمار  $T_2$  بیشترین تأثیر را بر افزایش میزان تیمول و کارواکروول داشت و تیمارهای  $T_3$  و  $T_4$  کمترین میزان تیمول و کارواکروول را به خود اختصاص دادند (شکل ۳).

در بررسی اثر چهار سطح خشکی (فواصل آبیاری ۳، ۵، ۷ و ۱۰ روز) بر گیاه آویشن مشاهده شد که بالاترین درصد نسبی تیمول در فاصله آبیاری ۱۰ روز به دست آمد (Azza et al., 2009). همچنین در بررسی تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی (۱۰۰، ۸۵، ۷۰، ۵۵ درصد ظرفیت زراعی) بر گیاه بابونه آلمانی، بالاترین درصد اسانس مربوط به تیمار ۸۵ درصد ظرفیت زراعی بود (Pirzad et al., 2006).

در این تحقیق نیز بیشترین درصد اسانس مربوط به تنش ملایم ( $T_2$ ) بود و با افزایش سطوح کم آبی از میزان تیمول و کارواکروول کاسته شد. اثر نامناسب تنش خشکی در کاهش عملکرد اسانس توسط محققین در ریحان گزارش گردیده است و نتیجه گرفتند که بیشترین درصد اسانس در رژیم آبی متوسط (۷۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) و بیشترین تجمع ماده خشک در ۹۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد. همچنین تنش خشکی در ریحان باعث کاهش عملکرد اسانس ولی افزایش درصد اسانس گردید (Omidbygy, 2005).

### بیان ژن‌های بیوسنتز تیمول و کارواکروول

نتایج آزمون t حاصل از اثر تنش کم آبی بر بیان ژن *HMGR* در شکل (۴) آمده است. نتایج بیان ژن *HMGR* نشان داد که با افزایش تنش میزان بیان ژن روند یکسانی نداشته است. میزان بیان این ژن در تیمارهای  $T_3$  و  $T_4$  به ترتیب ۰/۳۵- و ۲/۲۶- برابر نسبت به شاهد کاهش و تیمار  $T_2$ ، ۹/۹۱ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. در مجموع دیده شد که با افزایش تنش تا سطح  $T_2$  بیان ژن افزایش یافت ولی با ادامه افزایش سطح تنش، روند افزایش بیان کاهش نشان داد.

آنزیم *HMGR* به عنوان آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز

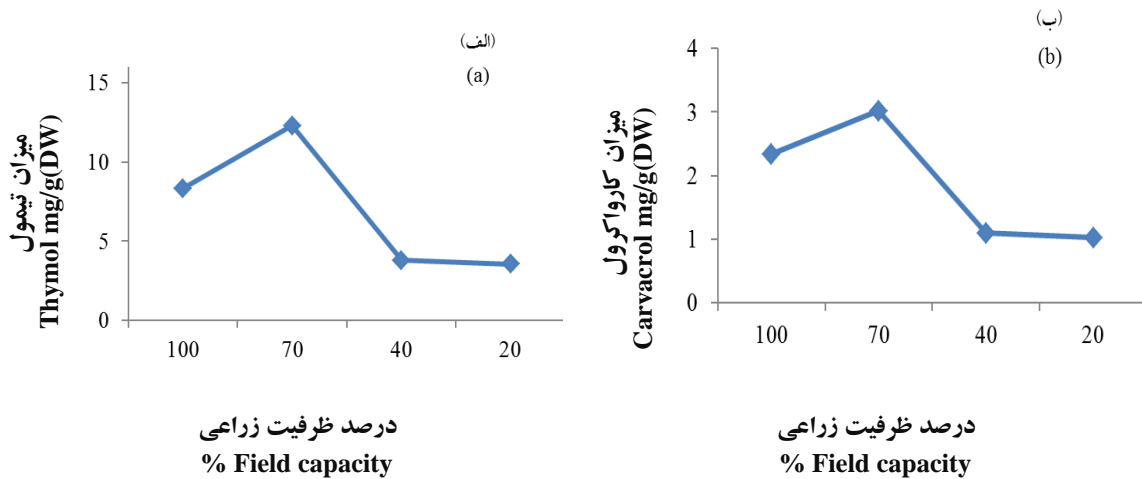
*MVA* شناخته شده است که ماده ۳-هیدروکسی متیل و ۳-متیل گلو تاریل کوآنزیم A را به موالونیک اسید تبدیل می‌کند (Ramak et al., 2014). (Hampel et al., 2007). روی گیاه توت فرنگی (*Fragaria × ananassa*) نشان داد که مسیر MEP کلروپلاستی هیچ نقشی در بیوسنتز مونوترپن‌های آلفاپینن ( $\alpha$ -pinene)، لینالول (linalool)، آلفا و بتا ایونون ( $\alpha$ -and  $\beta$ -ionone) ندارد و مسیر *MVA* سیتوسولی بیوسنتز مونوترپن‌های ذکر شده را عهده‌دار می‌باشد. همچنین مشخص شده است که فراهمی پیش‌سازهای IPP و DMADP یک عامل تعیین‌کننده در بیوسنتز مونوترپن‌ها می‌باشد (Mahmoud and Croteau, 2002). مطالعات محققین روی گیاه گل‌پریوش (*Catharanthus roseua*) شواهدی دال بر مشارکت دو مسیر *MVA* سیتوسولی و MEP کلروپلاستی در تأمین پیش‌سازهای IPP و DMAPP برای تولید مونوترپن‌ها ارائه می‌دهد (Schuhr et al., 2003). در تحقیق حاضر مشاهده شد که میزان بیان ژن *HMGR* در تیمار  $T_2$  نسبت به شاهد افزایش یافت ولی در تیمار  $T_3$  اندکی کاهش نسبت به شاهد نشان داد در مجموع روند بیان این ژن با روند تغییرات میزان مونوترپن تیمول و کارواکروول همخوانی داشت. به عبارت دیگر می‌توان گفت ژن *HMGR* در بیوسنتز مونوترپن تیمول و کارواکروول نقش مؤثری دارد. این ژن از ژن‌های کلیدی و بالا دست در مسیر بیوسنتز *MVA* در تولید تری‌ترین‌ها و سسکویی‌ترین‌هاست (Hemmerlin et al., 2012) و با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که در بیوسنتز مونوترپن‌های فنولی تیمول و کارواکروول در گیاه آویشن باغی نقش پررنگی داشته باشد.

نتایج آزمون t حاصل از اثر تنش کم آبی بر بیان ژن *TPS2* در شکل (۵) آمده است. میزان بیان این ژن در تیمارهای  $T_3$  و  $T_4$  به ترتیب ۱۱/۴- و ۱۹/۸- برابر نسبت به شاهد کاهش یافت. بیان این ژن در تیمار  $T_2$ ، ۴/۸ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۵).

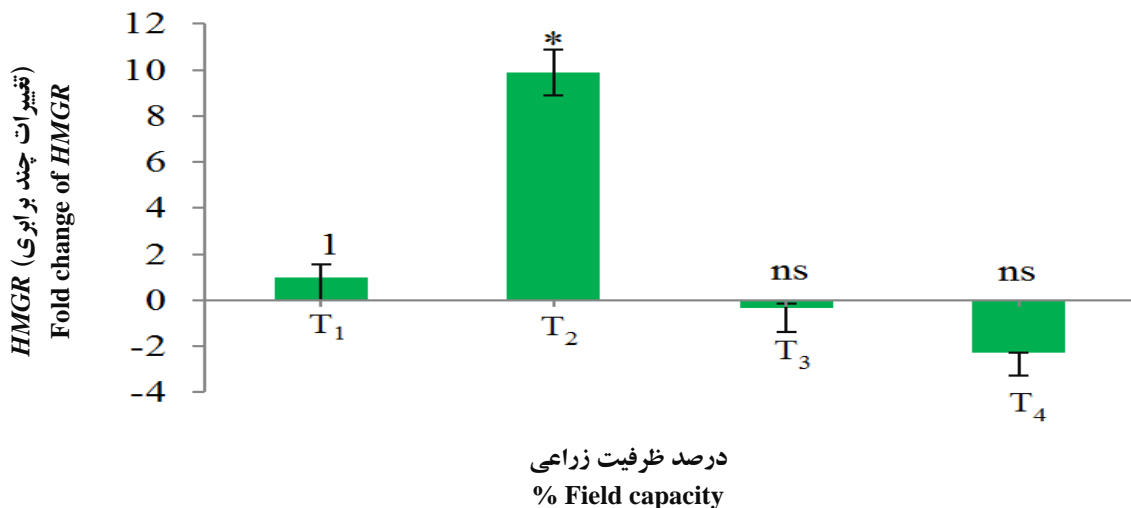
محققین الگوی بیان ژن‌های *TPS2*، *DXR* و سیتوکروم P450های دخیل در بیوسنتز تیمول در گیاه دارویی

ترکیب این مونوترپن‌ها تنظیم رونوشت ژن گاماترپین سینتاز است (Crocchi *et al.*, 2010). ژن گاماترپین سینتاز اصطلاحاً محدودکننده سرعت واکنش است یعنی با بیان متابولیت‌های ذکر شده ارتباط مستقیمی دارد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و موقعیت این ژن در این مسیر می‌توان گفت تنظیم بیوسنتز مونوترپن‌ها در سطح بیان ژن *TPS2* کنترل می‌شود.

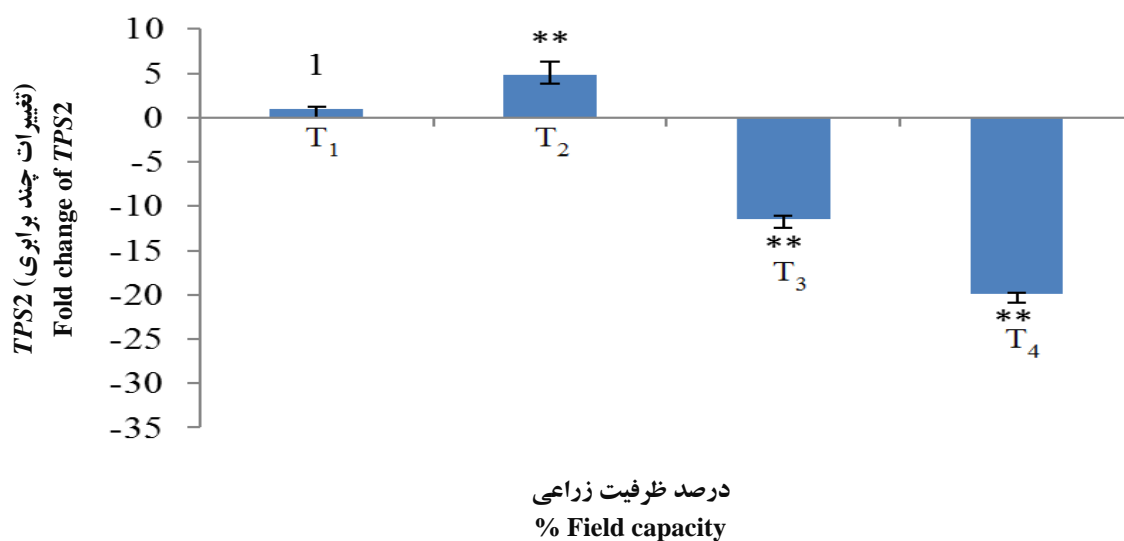
آویشن (*Thymus vulgaris* L.) را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که بیان ژن‌های *TPS2*، *DXR*، *CYP71D180* و *CYP71D178* در بافت گل بیشتر از بافت برگ می‌باشد (Malekzadeh *et al.*, 2014). ژن گاماترپین از جمله ژن‌های اصلی در مسیر بیوسنتز تیمول می‌باشد. این ژن از ژن‌های پایین دست در مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول است. مهم‌ترین مکانیزم کنترل



شکل ۳- میزان تیمول (الف) و میزان کارواکرول (ب) در آویشن باغی رقم واریکو ۳ تحت تنش کم‌آبی  
 Figure 3. Quantity of thymol (a) and quantity of carvacrol (b) in *Thymus vulgaris* (var. Varico 3) under water deficit stress



شکل ۴- میزان بیان نسبی ژن *HMGR* در آویشن باغی رقم واریکو ۳ (*Varico 3*) تحت تنش کم‌آبی  
 (خطوط روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای معیار میانگین می‌باشد)  
 T<sub>1</sub>: ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد); T<sub>2</sub>: ۷۰ درصد ظرفیت زراعی; T<sub>3</sub>: ۴۰ درصد ظرفیت زراعی; T<sub>4</sub>: ۲۰ درصد ظرفیت زراعی  
 Figure 4. Relative gene expression of *HMGR* in *Thymus vulgaris* (*Varico 3*) under water deficit stress  
 The bars on (above) the columns indicate the standard error of mean. T<sub>1</sub>: 100% FC (Control); T<sub>2</sub>: 70% FC; T<sub>3</sub>: 40%FC; T<sub>4</sub>: 20% Fc



شکل ۵- میزان بیان نسبی ژن TPS2 در آویشن باغی رقم واریکو ۳ (Varico 3) تحت تنش کم آبی (خطوط روی منحنی نشان دهنده خطای معیار میانگین می باشد)

T<sub>1</sub>: ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد); T<sub>2</sub>: ۷۰ درصد ظرفیت زراعی; T<sub>3</sub>: ۴۰ درصد ظرفیت زراعی; T<sub>4</sub>: ۲۰ درصد ظرفیت زراعی

Figure 5. Relative gene expression of TPS2 in *Thymus vulgaris* (Varico 3) under water deficit stress  
The bars on (above) the columns indicate the standard error of mean. T<sub>1</sub>: 100% FC (Control); T<sub>2</sub>: 70% FC; T<sub>3</sub>: 40%FC; T<sub>4</sub>: 20% Fc

شرایط بی هوایی، پاسخ به الیستورهای قارچی و در بیان آندوسپرم نقش دارند. مطالعات (Liao et al. 2015) بر پروموتور ژن HMGR در گیاه دارویی *Ginkgo biloba* نشان داد که عناصر این پروموتور در پاسخ به سالیسیلیک اسید، پاسخ به جیبرلین، پاسخ به اکسین نقش دارند. همچنین مطالعات در گیاه سیب (*Malus domestica*)، روی پروموتور ژن HMGR نشان داد موتیف‌های این پروموتور در پاسخ به جیبرلین، پاسخ به اکسین، پاسخ به آبسزیک اسید، پاسخ به اتیلن، پاسخ به سالیسیلیک اسید، پاسخ به جاسمونات و در پاسخ به دمای پایین نقش دارند (Lv and Zhang, 2017).

### نتیجه گیری

در تیمار T<sub>2</sub> بیشترین مقدار تیمول در گیاه مشاهده شد که افزایش تیمول در واقع سازوکار دفاعی گیاه با شرایط تنش است. میزان بیان ژن‌های مورد بررسی تحت تأثیر تنش، در تیمار T<sub>2</sub> افزایش بیان نشان دادند که نشان دهنده تأثیر تنش بر مسیرهای بیان این ژن‌ها در گیاه

بیان ژن‌ها ناشی از عناصر تنظیمی موجود در پروموتور آن‌هاست. از آنجا که پروموتور ژن TPS2 در گیاه آویشن باغی و خانواده نعناعیان هنوز شناسایی نشده است، ۱۵۰۰ جفت باز از بالا دست ژن TPS2 (ناحیه پروموتوری ژن در پایگاه اطلاعاتی ژن ncbi) در گیاه مدل آراییدوپسیس، بررسی شد. آنالیز پروموتورها با استفاده از سایت PlantCARE صورت پذیرفت و عناصر سیس و موتیف‌های موجود در هر پروموتور و کارکرد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این پروموتور دارای عناصر سیس پاسخ به خشکی، پاسخ به آبسزیک اسید، پاسخ به نور، پاسخ به الیستور، پاسخ به استرس گرمایی، پاسخ به جیبرلین و سالیسیلیک اسید، پاسخ به شرایط بی‌هوایی و در بیان آندوسپرم نقش دارند. نتایج آنالیز پروموتور ژن HMGR در گیاه آراییدوپسیس نشان داد cis-elementهای این پروموتور در پاسخ به نور، پاسخ به تنش‌های دفاعی و گرمایی، پاسخ به سالیسیلیک اسید، جیبرلین، متیل جاسمونات، پاسخ به

آویشن باغی است. با توجه به شرایط این تحقیق، گیاه آویشن باغی رقم واریکو ۳ بهترین واکنش از لحاظ مورفولوژی، شیمیایی و مولکولی را در کم آبی ملایم نشان داد. بر اساس نتایج این مطالعه، کاشت رقم واریکو ۳ در زمین‌های با خشکی کم و متوسط قابل توصیه می‌باشد زیرا در خشکی کم و متوسط علاوه بر رشد و نمو، از مقدار تیمول قابل ملاحظه‌ای نیز برخوردار است.

## References

- Albouchi, A., Bejaoui, Z. and El Aouni, M. H. (2003). Influence of moderate or severe water stress on the growth of *Casuarina glauca* sieb. *Science et Changements Planétaires/Secheresse*, 14(3), 137-142.
- Aziz, E. E., Hendawy, S. T., Azza, E. E. and Omer, E. A. (2008). Effect of soil type and irrigation intervals on plant growth, essential oil yield and constituents of *Thymus vulgaris* plant. *Journal of Agriculture and Environment Sciences*, 4(4), 443-450.
- Azza, A., Ezz, E., Eman, E., Aziz, S. F., Hendawy, S. T. and Omer, E. A. (2009). Response of *Thymus vulgaris* L. to salt stress and Alar (B<sub>9</sub>) in newly Reclaimed Soil. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(12), 2165-2170.
- Babae, K., Amini Dehaghi, M., Modares Sanavi, S. A. M. and Jabbari, R. (2010). Water deficit effect on morphology, prolin content and thymol percentage of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 26(2), 239-251. [In Farsi]
- Baghallian, K. and Naghdibady, H. (2000). *Essential oil plants*. Iran: Andarz Publication. [In Farsi]
- Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannes, W. A., Kchouk, M. and Marzouk, B. (2009). Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae*, 120(2), 271-275.
- Braga, P. C., Culici, M., Alfieri, M. and Dal Sasso, M. (2008). Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(5), 472-477.
- Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodriguez-Concepción, M., Ferrer, A., Boronat, A. and Campos, N. (2002). Expression and molecular analysis of the Arabidopsis *DXR* gene encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiology*, 129(4), 1581-1591.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenson, J. and Degenhardt, J. (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 73(6), 587-603.
- Davis, E. M., Ringer, K. L., Croteau, R. B. and Wildung, M. R. (2005). Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften*, 92(12), 562-577.
- Dunford, N. T. and Vazquez, R. S. (2005). Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*, 7(1), 20-22.
- Ghaedi, M. (2015). Application of optimized vortex-assisted surfactant-enhanced DLLME for pre-concentration of thymol and carvacrol, and their determination by HPLC-UV: Response surface methodology. *Journal of Chromatographic Science*, 53(7), 1222-1231.

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(1), 95-98.
- Hampel, D., Swatski, A., Mosandl, A. and Wüst, M. (2007). Biosynthesis of monoterpenes and norisoprenoids in raspberry fruits (*Rubus idaeus* L.): The role of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9296-9304.
- Hemmerlin, A., Harwood, J. L. and Bach, T. J. (2012). A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 95-148.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J. F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I. A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M. and Bach, T. J. (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26666-26676.
- Horwath, A. B., Grayer, R. J., Keith-Lucas, D. M. and Simmonds, M. S. (2008). Chemical characterisation of wild populations of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(2), 117-133.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Jasim al-juburi, H., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(1), 100-105.
- Lane, A., Boecklemann, A., Woronuk, G. N., Sarker, L. and Mahmoud, S. S. (2010). A genomics resource for investigating regulation of essential oil production in *Lavandula angustifolia*. *Planta*, 231(4), 835-845.
- Lebaschy, M. H. and Sharifi Ashourabadi, E. (2004). Growth indices of some medicinal plants under different water stresses. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 20(3), 249-261. [In Farsi]
- Liao, Y., Xu, F., Huang, X., Zhang, W., Cheng, H., Li, L., Cheng, S. and Shen, Y. (2015). Promoter analysis and transcriptional profiling of *Ginkgo biloba* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (*GbHMGR*) gene in abiotic stress responses. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 43(1), 25-34.
- Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 47-65.
- Lv, D. and Zhang, Y. (2017). Isolation and functional analysis of apple MdHMGR1 and MdHMGR4 gene promoters in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 129(1), 133-143.
- Mahmoud, S. S. and Croteau, R. B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7(8), 366-373.
- Malekzadeh, A., Majidi, M. and Maroufi, A. (2014). *Gene expression analysis of  $\gamma$ -terpinene synthesis under salicylic acid, methyl jasmonate and Trans-cinnamic acid treatments in *Thymus vulgaris* L.* 1<sup>st</sup> International and 13<sup>th</sup> Iranian Genetics Congress, Isfahan. [In Farsi]
- Mikio, Y. and Taeko, U. (1962). Biosynthesis of thymol. *Chem Pharmaceu Bull*, 10(1), 71-72.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(1), 473-497.
- Omidbygy, R. (2005). *Production and processing of medicinal plants (volume 3)*. Tehran: Astan Quds

Razavi Press. [In Farsi]

- Pirzad, A., Alyari, H., Shakiba, M., Zehtab-Salmasi, S. and Mohammadi, A. (2006). Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. *Journal of Agronomy*, 5(3), 451-455.
- Poulose, A. and Croteau, R. (1978). Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of  $\gamma$ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187(2), 307-314.
- Rahimi, Y. (2013). *Effects of water deficit stress on genes expression menthol biosynthesis pathway in Mentha piperita*. Master Thesis of Science In Breeding Plant, Tehran university, Iran.
- Ramak, P., Kazempour Osaloo, S., Ebrahimzadeh, H., Sharifi, M. and Behmanesh, M. (2014). Expression of gene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and its relation to monoterpene carvacrol biosynthesis in *Satureja Khuzestanica*. *Iranian Journal of Biology*, 27(4), 622-634. [In Farsi]
- Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Grawert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W. and Bacher, A. (2003). The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1586-1591.
- Sauret-Gueto, S., Botella-Pavia, P., Flores-Perez, U., Martinez-Garcia, J. F., San Roman, C., Leon, P., Boronat, A. and Rodriguez-Concepcion, M. (2006). Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(1), 75-84.
- Schillmiller, A. L., Schauvinhold, I., Larson, M., Xu, R., Charbonneau, A. L., Schmidt, A., Wilkerson, C., Last, R. L. and Pichersky, E. (2009). Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(26), 10865-10870.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schuhly, W. (2004). Pharmacognosy: Phytochemistry, medicinal plants. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 11(1), 90-91.
- Schuhr, C. A., Radykewicz, T., Sagner, S., Latzel, C., Zenk, M.H., Arigoni, D., Bacher, A., Rohdich, F. and Eisenreich, W. (2003). Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochemistry Reviews*, 2(1), 3-16.
- Seyyedani, P., Daneshian, J., Mirza, M., Maleki, A. and Alireza, S. (2014). The effect of nitrogen chemical fertilizer and zinc sulfate application on yield and its components of *nigella sativa* L. under different humidity conditions. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 3(2), 92-99.
- Sharifi, P. and Mohammadkhani, N. (2017). Effects of drought stress on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in flag leaf and spikes of tolerant and sensitive wheat genotypes. *Plant Productions*, 41(3), 37-50.
- Viera, H., Bergamaschi, H., Angelocci, L. and Libardi, P. (1991). Performance of two bean cultivars under two water availability regimes. II. stomatal resistance to vapour diffusion, transpiration flux density and water potential in the plant. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 24(9), 1045-1053.
- Zhang, L., Yan, X., Wang, J., Li, S., Liao, P. and Kai, G. (2011). Molecular cloning and expression analysis

of a new putative gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase from *Salvia miltiorrhiza*.  
*Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 953-961.