

بررسی بیان ژن‌های ۱- دئوکسی- دی- گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز (*DXR*)، ساینین سینتاز (*Tctps1*) و آلفاترپینئول سینتاز (*Tctps5*) در ارتباط با بیوسنتز تیمول و کارواکربول در گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) تحت تنش کم‌آبی

فاطمه میرزایی^۱، فواد فاتحی^۲، احمد اسماعیلی^۳، آنیتا یاقوتی پور^۴، اردشیر قادری^{۵*}

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران
 - ۲- استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران
 - ۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران
 - ۴- دکترای اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
 - ۵- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
- * آدرس مکاتبه: کرج، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی صندوق پستی: ۱۳۶۹ - ۳۱۳۷۵، تلفن: ۰۲۶-۳۴۷۶۴۰۱۰، نمابر: ۰۲۶-۳۴۷۶۴۰۲۱
پست الکترونیک: Ardeshir582008@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۸

تاریخ تصویب: ۹۶/۴/۱۰

چکیده

مقدمه: تیمول و کارواکربول دو متابولیت ثانویه ارزشمند گیاه دارویی آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) است که تولید آن در گیاه به شدت تحت تأثیر فاکتورهای ژنتیکی و محیطی است.

هدف: بررسی تأثیر تنش کم‌آبی بر بیان ۳ ژن مهم مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکربول، صفات فیتوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه آویشن باغی بود. روش بررسی: این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی انجام شد. تیمارها شامل شرایط ۱۰۰ درصد (شاهد)، ۷۰ درصد (تنش ملایم)، ۴۰ درصد (تنش متوسط) و ۲۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) بود. بررسی بیان ژن‌ها با روش qRT-PCR بررسی شد و آنالیز اسانس توسط روش HPLC انجام شد. همچنین صفات فیزیولوژیک محتوای کلروفیل، محتوای نسبی آب برگ، درصد نشت الکترولیت و محتوای کاروتنوئید مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد تنش کم‌آبی اثر معنی‌داری ($P \leq 0/05$) بر بیان ژن‌های مورد مطالعه داشت. بیش‌ترین میزان بیان ژن‌های (*DXR*) و (*Tctps5*) در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و بیشترین میزان بیان ژن (*Tctps1*) در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان تیمول و کارواکربول در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. از سوی دیگر بیشترین میزان کلروفیل در تیمار شاهد و بیشترین میزان کاروتنوئید در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد. همچنین در صفات محتوای نسبی آب و نشت الکترولیت تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای اعمال شده مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: سطح رطوبت ۷۰ درصد ظرفیت زراعی از طریق افزایش بیان ژن‌های ابتدا و انتهای مسیر بیوسنتزی MEP باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تیمول و کارواکربول شده است.

کل واژگان: *Thymus vulgaris*، بیان ژن، تنش کم‌آبی، تیمول، رنگیزه‌های فستونی، کارواکربول

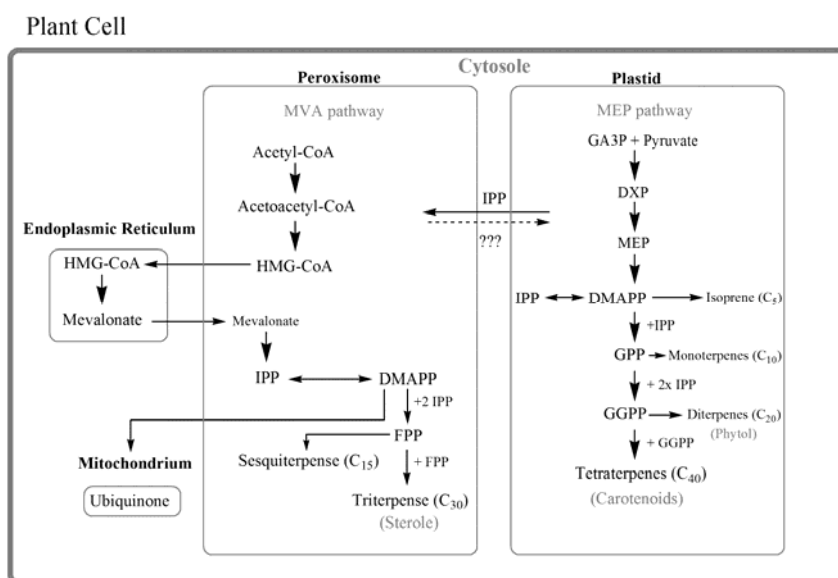


مقدمه

کم‌آبی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد گیاهان در سرتاسر جهان و شایع‌ترین تنش محیطی است، به خوبی مشخص شده که اثر تنش آبی بر رشد و عملکرد بستگی به ژنوتیپ گیاه دارد [۱].

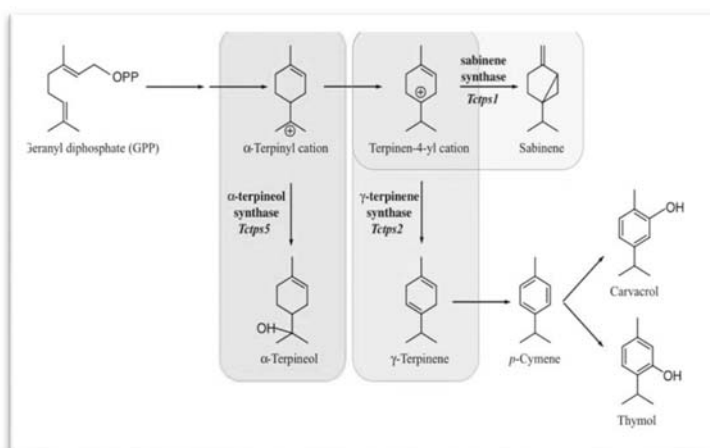
گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) با دارا بودن بیش از ۲۰ نوع ترکیب شیمیایی شناخته شده و مؤثر از مهم‌ترین گیاهان دارویی به شمار می‌رود [۲]. تیمول، کارواکرول، پاراسیمین و تی کاربوفیلین از مهم‌ترین ترکیبات این گیاه می‌باشند [۳]. دو مسیر بیوسنتزی برای تولید ترپنوئیدها وجود دارد [۴، ۵، ۶]؛ مسیر کلاسیک موالونیک اسید (MVA) و مسیر ۲-C-متیل-D-اریتریتول-۴-فسفات (MEP) [۷]. مونوترپن‌ها از مسیر بیوسنتزی MEP که در پلاستیدها قرار دارد ساخته می‌شوند که شامل هفت مرحله آنزیمی درگیر در تشکیل Isopentenyl diphosphate (IPP) و Dimethylallyl diphosphate (DMAPP) از پیروات و گلیسرآلدهید ۳-فسفات (D-glyceraldehyde-3-phosphate) است. اولین مرحله در این مسیر متراکم شدن پیروات و گلیسرآلدهید ۳-فسفات توسط آنزیم DXP سینتاز (DXS) به ۱-دئوکسی-D-زایلوز-۵-فسفات (DXP) است. سپس

DXP توسط DXP ردوکتاز ایزومراز (DXR) به MEP تبدیل می‌شود. پس از آن MEP توسط چندین مرحله فعالیت آنزیمی به ۲-سی-D-اریتریتول-۴-فسفات سیتیدیل ترنسفراز (MCT)، ۴-دی فسفوسیتیدیل-۲-سی-D-اریتریتول کیناز (CMK)، ۲-سی-متیل-D-اریتریتول ۲ و ۴ سیکلو دی فسفات سینتاز (MDS) و ۱-هیدروکسی-۲-متیل-۲-(E)-بوتنیل-۴-دی فسفات سینتاز (HDS) و ۱-هیدروکسی-۲-متیل-۲-(E) بوتنیل-۴-دی فسفات تبدیل می‌شود. آخرین مرحله نیز توسط فعالیت آنزیمی ۱-هیدروکسی-۲-متیل-۲-(E)-بوتنیل-۴-دی فسفات ردوکتاز (HDR)، HMBPP به پیش ماده‌های مورد نیاز ترپن‌ها یعنی IPP و DMAPP تبدیل می‌شود [۸]. IPP و DMAPP توسط فعالیت آنزیمی ایزوپنتنیل دی فسفات ایزومراز (IDI) می‌توانند به یکدیگر تبدیل شوند (شکل شماره ۱). در ادامه با ترکیب این دو ماده تحت تأثیر ژرانیل دی فسفات سینتاز (GPPs)، پیش ماده مونوترپن‌هاست یعنی ژرانیل دی فسفات (GPP) سنتز می‌شود. ژرانیل دی فسفات نیز توسط آنزیم مونوترپن سینتاز به مونوترپن‌ها تبدیل می‌شود [۹، ۱۰] (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۱- مسیر بیوسنتز متیل اریتریتول (MEP) و موالونات (MVA) [۱۲، ۱۱].





شکل شماره ۲- ژن‌های پایین دست دخیل در تشکیل تیمول و کارواکرول [۱۵،۱۶].

سازگار شدن به گلدان‌های حاوی خاک آزمایش شده (خاک با ۱۰ درصد ظرفیت زراعی) به گلخانه منتقل و به مقدار مساوی آبیاری شدند. ۸ هفته پس از استقرار، گیاهان به مدت ۲۱ روز تحت تنش کم‌آبی قرار گرفتند. تیمارهای آبیاری مورد استفاده جهت اعمال تنش کم‌آبی عبارت‌اند از: T₁: (شرایط ۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه، شاهد یا بدون تنش)، T₂: (شرایط ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه، تنش ملایم)، T₃: (شرایط ۴۰ درصد ظرفیت مزرعه، تنش متوسط) و T₄: (شرایط ۲۰ درصد ظرفیت مزرعه، تنش شدید) بودند [۱۵]. این تحقیق به صورت کاشت در گلدان در قالب طرح بلوک کامل تصادفی اجرا شد. پس از پایان تنش، نمونه‌های مربوطه جهت استخراج RNA، در ازت مایع فرو برده شدند و تا زمان آزمایش در یخچال ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کاروتنوئید

برای سنجش مقدار کلروفیل از روش لیچ تنتالر [۱۶] استفاده شد. بدین صورت که ۰/۱ گرم از برگ‌های تازه گیاه در هاون چینی حاوی ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد و پس از صاف کردن، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳/۳ (کلروفیل a)، ۶۴۶/۸ (کلروفیل b) و ۴۷۰ (کاروتنوئیدها) نانومتر خوانده شد. مقدار کلروفیل و کاروتنوئید بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت تر از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شد:

تیمول یک مونوترپن فنولی است که با سه گروه متیل، یک حلقه بنزنی و یک گروه هیدروکسیل است. با توجه به تقاضای بالای ماده تیمول در صنعت داروسازی تولید بیشتر این ماده، از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعات نشان داده است که ژن *DXR* نقش مهمی را در مسیر بیوسنتز MEP دارد که با افزایش بیان ژن *DXR* میزان مونوترپن‌ها نیز افزایش می‌یابد [۱۱-۱۳]. از سوی دیگر متیل جاسمونات باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه با تأثیر بر ژن‌های ابتدای مسیر MEP از طریق فرآیندهای سیگنالی باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه این مسیر شده است [۱۴].

این تحقیق با هدف بررسی میزان تغییرات بیان سه ژن (*DXR*)، (*Tcps1*) و (*Tcps5*) درگیر در مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول با روش PCR در زمان واقعی و همچنین بررسی تغییر در ترکیبات اسانس، صفات فیزیولوژیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، شرایط رشد: گیاهچه‌های آویشن باغی رقم واریکو ۳ (تهیه شده از مؤسسه Agro SCOPE سویس) پس از کشت بذور روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) جهت نگهداری به گلدان‌های پلاستیکی با ترکیبی از کوکوپیت و پیت موس با نسبت‌های ۳:۱ به اتاق رشد با دمای ۲۵±۲ سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۷۰۰۰ لوکس منتقل شدند. سپس گیاهان به منظور



$$\begin{aligned} \text{Chl a } (\mu\text{g/ml}) &= 12.25A663 - 2.79A646 \\ \text{Chl b } (\mu\text{g/ml}) &= 21.50A646 - 5.10A663 \\ \text{Chl Total } (\mu\text{g/ml}) &= \text{Chl a} + \text{Chl b} \\ \text{Car } (\mu\text{g/ml}) &= (1000470 - 1.82 \text{ Chl a} - 85.02 \text{ Chl b}) / 198 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Chl a } (\text{mg/g}) &= \text{Chl a } (\mu\text{g/ml})(v) / 1000 \\ \text{Chl b } (\text{mg/g}) &= \text{Chl b } (\mu\text{g/ml})(v) / 1000 \\ \text{Car } (\text{mg/g}) &= \text{Car } (\mu\text{g/ml})(v) / 1000 \end{aligned}$$

۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در محیط تاریک ماند [۱۹]. عصاره استخراج شده بوسیله دستگاه HPLC مدل PLATIN blue به همراه پمپ L7100 مجهز به آشکارساز آرایه فوتونی (PDA) در طول موج 274nm، سیستم تزریق اتوماتیک و رابط نرم‌افزاری EZchrom استفاده شد. ستون مورد استفاده Nucleodur 100-5, C18 ساخت شرکت MACHEREY-NAGEL کشور آلمان با طول ۲۵۰ mm و قطر داخلی ۴/۶ mm بود. فاز متحرک مورد استفاده شامل فاز A آب ۴۵ درصد در فاز B استونیتریل به صورت ایزوکراتیک و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. استونیتریل و آب با خلوص کروماتوگرافی و سایر موارد مورد استفاده از شرکت مرک تهیه شد. جهت سنجش صفت فیتوشیمیایی از یک تکرار ادغام شده استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (qRT-PCR)

استخراج RNA با روش ترایزول از بافت برگ شاهد و تیمارها صورت گرفت [۲۰]. به منظور حذف آلودگی DNA موجود در نمونه‌ها از تیمار با آنزیم DNase I استفاده شد. بر این اساس مقدار ۱ میکرولیتر از ۵ میکروگرم در میکرولیتر نمونه RNA، ۱/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰ X DNase I، ۱/۵ میکرولیتر آنزیم DNase I (1U/μl) (Fermentase, USA) با هم مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در نهایت برای حذف و غیرفعال کردن آنزیم DNase I مقدار ۲ میکرولیتر EDTA با غلظت ۵۰ میلی‌مولار اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و خوانش اسپکتروفوتومتری NanoDrop ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتری در دستگاه NanoDrop (ThermoScientific 2000c, USA) مورد بررسی قرار گرفت. جهت تهیه cDNA مقدار ۱ میکروگرم از RNA تیمار

محتوای نسبی آب برگ (RWC)

به منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ پس از آنکه برگ‌های تازه وزن شدند، در داخل آب به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند تا به حالت متورم درآیند. پس از ۲۴ ساعت برگ‌های متورم شده با کاغذ صافی خشک شد و وزن متورم شده برگ‌ها اندازه‌گیری شد. پس از توزین، برگ‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. سپس وزن برگ‌ها نیز اندازه‌گیری و مقدار محتوای نسبی آب برگ از معادله زیر محاسبه شد [۱۷].

$$\text{RWC} = \left(\frac{\text{Wf} - \text{Wd}}{\text{Wt} - \text{Wd}} \right) \times 100 (\%)$$

اندازه‌گیری درصد نشت الکترولیت (ELP)

به منظور سنجش درصد نشت الکترولیت، با استفاده از پانچ از هر برگ دیسک‌های دایره‌ای تهیه شد. قطعات حاصل در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت دو ساعت در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. سپس هدایت الکتریکی اولیه (EC_1)، با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و پس از سرد شدن در دمای اتاق، هدایت الکتریکی ثانویه (EC_2) اندازه‌گیری شد. در نهایت درصد نشت الکترولیت برگ (ELP) برحسب درصد از طریق فرمول زیر محاسبه شد [۱۸]. به منظور سنجش صفات فیزیولوژیک از هر تیمار ۳ تکرار استفاده شد و از میانگین آنها در هر تیمار برای ارزیابی نهایی استفاده شد.

$$\text{ELP} = (EC_1 / EC_2) \times 100$$

استخراج عصاره و سنجش تیمول و کارواکرول

به منظور استخراج تیمول و کارواکرول به ۱۰ گرم از پودر ماده گیاهی ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد، سپس به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه اولتراسونیک عصاره‌گیری شد و به مدت



آغازگر (آغازگرها براساس توالی ژن‌های ثبت شده در سایت <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> طراحی و توسط نرم‌افزار Oligo3 مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند) در دمای بهینه آورده شده در جدول 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 موردنظر از منحنی ذوب (Melting curve) استفاده شد. لیست آغازگرهای طراحی شده برای دستیابی به توالی ژن‌های مورد مطالعه در جدول شماره ۲ آورده شده است.

محاسبه میزان نسبی بیان ژن

برای نرمال سازی از ژن کنترل داخلی *18srRNA* استفاده شد. میزان نسبی بیان ژن با استفاده از ۲ تکرار بیولوژیکی و ۲ تکرار تکنیکی (RNA) محاسبه شد. برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن از روش $\Delta\Delta Ct$ استفاده شد که بر اساس فرمول زیر است [۲۱].

$$\Delta Ct = (\text{ژن کنترل داخلی}) - \Delta Ct (\text{ژن مورد نظر}) = \Delta\Delta Ct$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = ?$$

تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز اثر تیمارها بر متغیرهای مورد سنجش، داده‌ها با نرم‌افزار SAS آنالیز واریانس شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

شده با DNase I و خالص‌سازی شده به کار گرفته شد و از روش استفاده همزمان OligodT و پرایمرهای هگزامر تصادفی در حضور آنزیم Reverse transcriptase استفاده شد. به منظور انجام این واکنش ابتدا مخلوط پرایمرها، RNA و آب DEPC مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بلافاصله به سطح یخ منتقل شدند. سپس به نمونه‌ها مخلوط آنزیم و بافر اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه به منظور غیرفعال کردن آنزیم RT، در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

مراحل تهیه واکنش PCR در زیر هود انجام شد و با استفاده از پیت‌ها و تیپ‌های عاری از DNA، مواد بر اساس جدول شماره ۱ با هم مخلوط شدند و حجم نهایی واکنش ۱۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برای بهینه کردن دمای اتصال پرایمرها از روش Gradient PCR استفاده شد. همچنین صحت و درستی cDNA سنتز شده با استفاده از PCR ژن کنترل (*18srRNA*) در همه نمونه‌های مورد مطالعه انجام گرفت. برای واکنش کنترل از بدون الگو (NTC) بجای cDNA، آب میلی‌کیو (mili-q) اضافه شد. در نهایت به پلیت ۴۸ چاهکی با توجه به نقشه ۱۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش اضافه شد. 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

جدول شماره ۱- مواد شیمیایی و مقادیر مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

مواد شیمیایی	حجم (μl)
cDNA (1 μg/μl)	۲
SYBR premix 5X	۳
Primer F (10 pmol/μl)	۰/۸
Primer R (10 pmol/μl)	۰/۸
ddH2O	۱۵

جدول شماره ۲- لیست آغازگرهای مورد استفاده

Primer name	Sequence
<i>DXR-F</i>	TATGACTTCGAGGCCCTTGTTAAAGAG
<i>DXR-R</i>	TGTATCCAAGGCTTGCCAGAAGG
<i>Tctps1-F</i>	GAGGGAAGGCGAAAACACAC
<i>Tctps1-R</i>	TCCAGTGAAGAGGGGAGATCC
<i>Tctps5-F</i>	GATACAAATGCGTCGGAGGAGG
<i>Tctps5-R</i>	CTGTAGCCTCCACCACTTGTTT
<i>18srRNA-F</i>	ATGTTTAGAAGGGTGAGTGAGCAGTTTAC
<i>18srRNA-R</i>	GCCTCATCATCATACTCTTCCTCATCATC

نتایج

میزان تیمول داشت و تیمارهای ۲۰ و ۴۰ FC درصد ظرفیت زراعی کمترین میزان تیمول را به ترتیب با مقدار ۳/۵ و ۳/۸ (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) به خود اختصاص دادند. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان کارواکرول در تیمار ۷۰ FC درصد ظرفیت زراعی با مقدار ۳/۰۲ (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) حاصل شد و کمترین میزان کارواکرول را تیمار ۲۰ FC درصد با مقدار ۱/۰۳ (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) به خود اختصاص داد (شکل شماره ۳).

نتایج تجزیه واریانس به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های *DXR*، *Tctps1* و *Tctps5* در آویشن باغی در مرحله رویشی در جدول شماره ۶ آورده شده است. نتایج حاصل نشان داد که تنش کم‌آبی اثر معنی‌داری بر بیان ژن‌های *DXR*، *Tctps1* و *Tctps5* داشت ($P \leq 0/05$). بیشترین میزان بیان ژن‌های *DXR* و *Tctps5* در تیمار ۷۰ FC درصد و کمترین میزان بیان این ژن‌ها در تیمار ۲۰ FC درصد مشاهده شد. ژن *DXR* با مقدار ۳۲/۹ بیشترین میزان بیان را در تیمار ۷۰ FC درصد به خود اختصاص داد و نسبت به شاهد ۳۲/۸ برابر افزایش بیان نشان داد. سپس با افزایش سطوح تنش بیان این ژن روند کاهشی به خود گرفت و تیمار ۴۰ FC درصد با مقدار ۰/۱۰ نسبت به شاهد ۰/۱۰ برابر کاهش بیان نشان داد و تیمار ۲۰ FC درصد نیز نسبت به شاهد کاهش یافت و با مقدار ۰/۰۹ کمترین میزان بیان را به خود اختصاص داد (شکل شماره ۴-الف). مقایسه میانگین حاصل از بررسی بیان ژن آلفاتریپینول (*Tctps5*) نیز نشان داد که با افزایش تنش میزان بیان ژن روند یکسانی نداشته است. میزان بیان ژن

نتایج تجزیه واریانس نشان داد تنش کم‌آبی اثر معنی‌داری ($P \leq 0/05$) بر مقدار کلروفیل a و کلروفیل کل داشت (جدول شماره ۳). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین با افزایش سطوح تنش کم‌آبی، میزان کلروفیل a و کلروفیل کل کاهش یافت (جدول شماره ۴). بیشترین میزان کلروفیل a با مقدار ۲/۳ (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) در تیمار ۱۰۰ FC درصد (شاهد) و کمترین میزان آن در تیمار ۲۰ FC درصد با ۰/۸۲ کاهش نسبت به شاهد مشاهده شد. بیشترین میزان کلروفیل کل نیز در تیمار شاهد و کمترین میزان آن در تیمار ۲۰ FC درصد با ۰/۸۶ کاهش نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. نتایج تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که تنش کم‌آبی بر میزان کلروفیل b، کاروتنوئید، محتوای نسبی آب برگ و نشت الکترولیت تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول شماره ۳). با افزایش سطوح تنش کم‌آبی، میزان کلروفیل b، کاروتنوئید و نشت الکترولیت افزایش یافت اما محتوای نسبی آب برگ کاهش یافت. بیشترین میزان کلروفیل b و کاروتنوئید به ترتیب با مقدار ۰/۷۱ و ۱/۰۲ (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) در تیمار ۷۰ FC درصد و بیشترین میزان محتوای نسبی آب برگ در تیمار شاهد با مقدار ۷۴/۳ درصد و بیشترین میزان نشت الکترولیت در تیمار ۲۰ FC درصد با مقدار ۰/۶۳ درصد مشاهده شد (جدول شماره ۴).

نتایج حاصل از فیتوشیمی نشان داد که بین تیمارها از لحاظ میزان تولید متابولیت‌های تیمول و کارواکرول تفاوت وجود دارد (جدول شماره ۵). تیمار ۷۰ FC درصد با مقدار ۱۲/۲ (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) بیشترین تأثیر را بر افزایش



جدول شماره ۳- تجزیه واریانس مربوط به صفات فیزیولوژیکی در آویشن باغی رقم واریکو ۳ (Varico 3) تحت تنش کم آبی

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (Mean Square (MS)				
		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	محتوای نسبی آب برگ
تکرار	۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۲	۰/۰۱۰	۷۶/۳۳۳
تیمار	۳	۰/۱۰۰*	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۸۷*	۰/۰۰۴ ^{ns}	۱۰۴/۵۵۶ ^{ns}
اشتباه آزمایشی	۶	۰/۰۱۵	۰/۰۰۱	۰/۰۱۶	۰/۰۰۲	۲۷/۸۸۹
ضرب تغییرات (درصد)	-	۵/۷۰	۴/۹۹	۴/۴۷	۴/۷۳	۱۰/۰۱

^{ns} * * * به ترتیب غیر معنی دار بودن و معنی دار بودن در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

جدول شماره ۴- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش کم آبی بر صفات فیزیولوژیکی در آویشن باغی رقم واریکو ۳ (Varico 3)

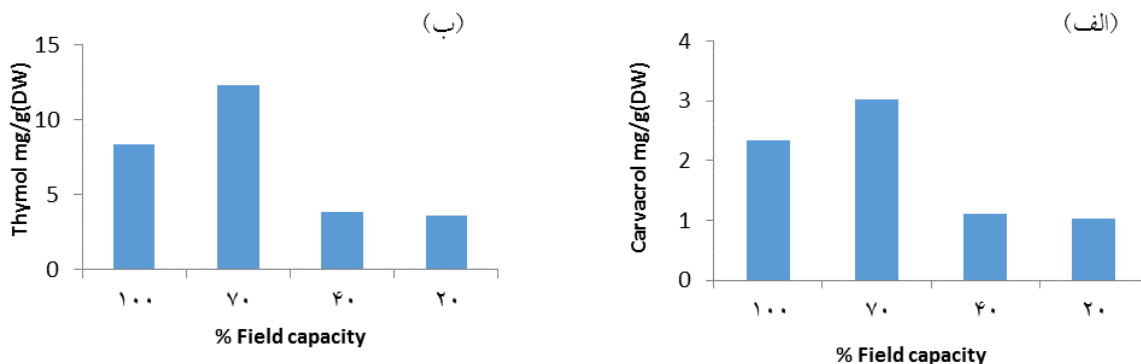
سطوح رطوبت (FC درصد)	کلروفیل a (mg/g)	کلروفیل b (mg/g)	کلروفیل کل (mg/g)	کارتنوئید (mg/g)	محتوای نسبی آب (درصد)	نشت الکترولیت (درصد)
۱۰۰ (شاهد)	۲/۳۹ a	۰/۶۶ a	۳/۰۶ a	۰/۹۲ b	۷۴/۳۰ a	۰/۴۱ a
۷۰	۲/۱۷ ab	۰/۷۱ a	۲/۸۹ ab	۱/۰۲ a	۷۳/۶۰ a	۰/۴۹ a
۴۰	۲/۰۷ b	۰/۶۸ a	۲/۷۶ b	۰/۹۷ ab	۶۶/۶۶ a	۰/۵۲ a
۲۰	۱/۹۶ b	۰/۶۹ a	۲/۶۶ b	۰/۹۸ ab	۶۲/۰۰ a	۰/۶۳ a

میانگین دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد هستند.

جدول شماره ۵- تجزیه واریانس صفات فیتوشیمیایی در آویشن باغی رقم واریکو ۳ (Varico 3) تحت تنش کم آبی

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (Mean Square (MS)	
		Thymol	Carvacrol
تکرار	۲	۰/۰۲۱	۰/۰۰۴
تیمار	۳	۵۲/۶۷*	۲/۶۶*
اشتباه آزمایشی	۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵
ضرب تغییرات (درصد)	-	۱/۰۱	۳/۸۱

^{ns} * * * به ترتیب غیر معنی دار بودن و معنی دار بودن در سطح احتمال ۰/۰۵



شکل شماره ۳- (الف) میزان کارواکرول، (ب) میزان تیمول در آویشن باغی رقم واریکو ۳ (Varico 3) تحت تنش کم آبی

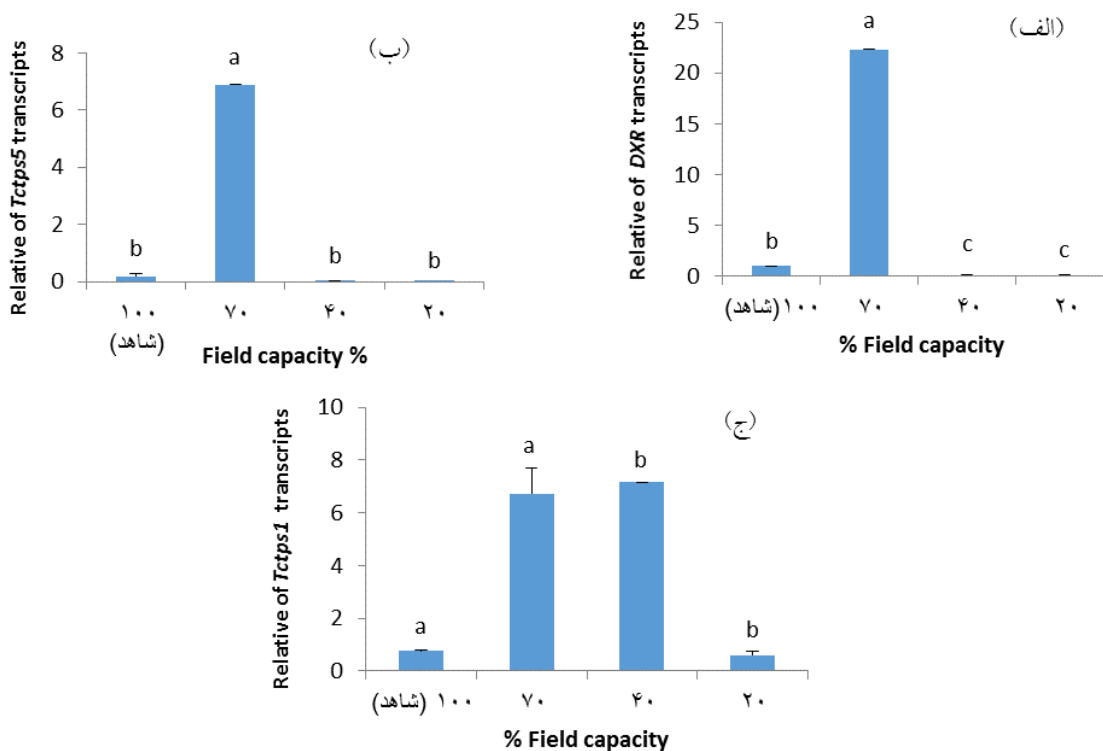
میانگین حاصل از بیان ژن ساینین سیتاز (*Tctps1*) نیز نشان داد که با افزایش تنش نیز میزان بیان ژن روند یکسانی نداشته است. میزان بیان ژن ساینین سیتاز در تیمارهای ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب با مقدار ۶/۳۳ و ۷/۸۵ نسبت به شاهد ۲۰ FC ۸/۹۱ و ۱۰/۳۸ برابر افزایش بیان نشان داد و تیمار ۲۰ FC درصد با مقدار ۰/۵۹ نسبت به شاهد ۰/۷۸ برابر کاهش بیان نشان داد (شکل شماره ۴-ج).

آلفاتریپتول در تیمار FC ۷۰ درصد با مقدار ۶/۸۹ بیش از ۳۶ برابر نسبت به شاهد افزایش بیان نشان داد و تیمار FC ۴۰ درصد، با مقدار ۰/۰۲ نسبت به شاهد کاهش بیان نشان داد که این کاهش برابر با ۰/۱ بود. تیمار FC ۲۰ درصد، نیز با مقدار ۰/۰۰۴ نسبت به شاهد ۰/۰۲ برابر کاهش بیان نشان داد. با افزایش تنش تا سطح FC ۷۰ درصد کم‌آبی باعث افزایش و ادامه تنش، روند افزایش بیان را کاهش داده است (شکل شماره ۴-ب). نتایج مقایسه

جدول شماره ۶- تجزیه واریانس مربوط به میزان بیان ژن‌های مسیر بیوستز تیمول در آویشن باغی رقم واریکو ۳ (*Varico 3*) تحت تنش کم‌آبی

میانگین مربعات (Mean Square (MS)			درجه آزادی (df)	منابع تغییرات (S.O.V)
بیان ژن <i>Tctps1</i>	بیان ژن <i>Tctps5</i>	بیان ژن <i>DXR</i>		
۰/۸۶۴	۰/۰۱۰	۰/۰۰۸	۳	تکرار
۵۲/۵۶*	۴۶/۶۲*	۴۸۰/۵۴*	۳	تیمار
۰/۹۹	۰/۰۱۳	۰/۰۱۵	۹	اشتباه آزمایشی

*،^{ns} به ترتیب غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۰/۰۵



شکل شماره ۴- الف) میزان بیان نسبی ژن *DXR*، ب) میزان بیان نسبی ژن *Tctps5*، ج) میزان بیان نسبی ژن *Tctps1* در آویشن باغی رقم واریکو ۳ (*Varico 3*) تحت تنش کم‌آبی. خطوط روی منحنی نشان دهنده خطای معیار میانگین می‌باشند.



بحث

در سنجش میزان مونوترپن‌های تیمول و کارواکرون بوسیله HPLC مشاهده شد که بیشترین میزان این مونوترپن‌ها در تنش ملایم حاصل شد و با افزایش سطوح تنش مقدار تیمول و کارواکرون کاهش یافت. گزارش‌هایی مبنی بر افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در اثر القای تنش خشکی در گیاهان وجود دارد. ذکر شده است که بیوستنز این متابولیت‌ها تنها تحت تأثیر عوامل ژنتیکی نیست بلکه با توجه به الگوهای محیطی نیز تغییر می‌کند [۳۸]. از سوی دیگر عنوان شده است به دلیل کاهش رشد در اثر القای تنش خشکی، تثبیت کربن در طی فتوسنتز صرف تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود و تولید بیشتر متابولیت‌ها در گیاهان تحت تنش در جهت جلوگیری از اکسیداسیون سلولی است [۳۲]. در بررسی تأثیر سطوح مختلف تنش کم‌آبی (۱۰۰، ۸۵، ۷۰ و ۵۵ درصد ظرفیت زراعی) بر گیاه بابونه آلمانی، بالاترین درصد اسانس مربوط به تیمار ۸۵ درصد ظرفیت زراعی بود [۳۳] که در تحقیق حاضر نیز بیشترین میزان اسانس در تنش ملایم حاصل شد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مولکولی نشان داد تنش کم‌آبی اثر معنی‌داری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه داشت به طوری که بیان ژن‌های *DXR* و *Tcpts5* با افزایش تنش ابتدا افزایش یافت و سپس با ادامه تنش از میزان بیان آنها به شدت کاسته شد. ژن *DXR* به‌عنوان عامل کنترلی مهم عمل می‌کند، زیرا اولین مرحله اصلی و متمایز کننده مسیر MEP می‌باشد [۳۴، ۳۵]. ژن *DXR* نقش تعیین‌کننده‌ای در هدایت میان واسطه‌ها به سمت مسیرهای IPP و DMAPP دارد [۱۳]. بررسی بیان ژن *DXR* و ارتباط آن با بیوستنز مونوترپن کارواکرون در گیاه مرزه خوزستانی نشان داد که سنتز کارواکرون به طور عمده از مسیر بیوستنزی MEP صورت می‌گیرد و آنزیم *DXR* در تنظیم بیوستنز مونوترپن کارواکرون نقش داشته و همچنین میزان فعالیت این آنزیم در سطح نسخه‌برداری (Transcriptional regulation) ژن کنترل می‌شود [۳۶].

با توجه به اینکه بیشترین میزان بیان ژن *DXR* و بیشترین میزان مونوترپن تیمول و کارواکرون در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی حاصل شد، به نظر می‌رسد میزان تیمول و کارواکرون با بیان این ژن وابستگی دارد. میزان بیان ژن *DXR*

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی محدودکننده فتوسنتز است. در این تحقیق مشاهده شد که میزان محتوای کلروفیل a و کلروفیل کل تحت تنش آبی روند کاهشی به خود گرفت اما کلروفیل b روند افزایشی از خود نشان داد. کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش خشکی در سایر بررسی‌ها نیز گزارش شده است [۲۲، ۲۳]. کاهش میزان محتوای کلروفیل در شرایط تنش آبی، احتمالاً به دلیل افزایش تخریب این رنگیزه‌ها و یا کاهش ساخت آنها و همچنین اختلال در فعالیت آنزیم‌های مسئول سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی است [۲۴]. همچنین مشاهده شد که محتوای کاروتنوئید گیاه روند مشابهی با میزان محتوای کلروفیل b داشت. از جمله نقش‌های مهم کاروتنوئیدها، محافظت از غشای تیلاکوئیدی و جلوگیری از فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها می‌باشد. مشاهده شده است تنش ملایم آب سبب افزایش کاروتنوئیدها می‌شود، درحالی‌که کمبود شدید آب موجب کم شدن کاروتنوئیدها علاوه بر کاهش کلروفیل می‌شود [۲۵]. کاهش محتوای کاروتنوئیدها در شرایط تنش خشکی در سایر بررسی‌ها نیز گزارش شده است [۲۲، ۲۶]. در این تحقیق تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش ملایم) بیشترین میزان کاروتنوئید و کلروفیل b را به خود اختصاص داد. نتایج این تحقیق در رابطه با کاهش کاروتنوئید در تنش شدید در مقایسه با تحقیقات انجام شده قبلی در تضاد است. محتوای نسبی آب، شاخص مناسبی از وضعیت آب در برگ‌ها می‌باشد به طوری که با افزایش تنش خشکی کاهش می‌یابد و سبب تغییراتی در غشای سلول و افزایش نشت الکترولیتی از سلول‌ها می‌شود [۲۷]. در این مطالعه نیز با افزایش تنش کم‌آبی میزان محتوای نسبی آب برگ، روند کاهشی و میزان نشت الکترولیت روند افزایشی از خود نشان دادند که با نتایج تحقیقات انجام شده مطابقت دارد [۸، ۲۷، ۲۸، ۲۹]. با بسته شدن روزنه‌ها و کاهش تعرق، جذب آب و انتقال آن به سمت برگ کاهش می‌یابد. علت کاهش محتوای نسبی آب، کاهش پتانسیل آب برگ و کاهش جذب آب از ریشه‌ها در شرایط خشکی می‌باشد [۳۰].

مشخص شد که میزان بیان این ژن با سایر ژن‌های مورد مطالعه و با میزان سنتز مونوترپن‌های تیمول و کارواکرول مطابقت ندارد. ژن سابینن سینتاز از جمله ژن‌های پایین دست در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌های تیمول و کارواکرول است اما به نظر می‌رسد به دلیل انحراف از این مسیر و عدم شرکت در تولید محصول نهایی (تیمول و کارواکرول) تأثیر چندانی بر میزان تیمول و کارواکرول ندارد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن *DXR* و *Tctps5* مربوط به تیمار FC ۷۰ درصد بود و با افزایش تنش میزان بیان این ژن‌ها کاهش یافت. ژن‌های *TPSS* و *DXR* روند مشابهی را در طول تنش از خود نشان دادند. همچنین این روند برای مونوترپن تیمول و کارواکرول مشاهده شد به طوری که بیشترین میزان مونوترپن‌ها و بیان ژن‌های *DXR* و *Tctps5* ابتدا در تیمار ۷۰ درصد، سپس در تیمار شاهد و کمترین نیز در تیمارهای ۴۰ و ۲۰ درصد ظرفیت زراعی اتفاق افتاد. بنابراین طبق شواهد به نظر می‌رسد دو ژن *DXR* و *Tctps5* بیشترین همبستگی را با هم و میزان تیمول و کارواکرول دارند، اما روند تغییرات بیان ژن *Tctps1* متفاوت از دو ژن دیگر و میزان تیمول و کارواکرول بود. با توجه به افزایش بیان بیشتر دو ژن *DXR* و *Tctps5* نسبت به *Tctps1* و افزایش مقدار تیمول می‌توان نتیجه گرفت تنش کم‌آبی در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی باعث افزایش بسیار بالا در بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی تیمول شده و تأثیر زیادی بر مسیر انحرافی این مسیر بیوسنتزی نداشته است. به عبارت دیگر تنش ۷۰ درصد ظرفیت زراعی باعث افزایش مونوترپن‌های تیمول و کارواکرول با تأثیر بر ژن‌های ابتدای مسیر MEP و انتهای مسیر بیوسنتز تیمول از طریق فرآیندهای سیگنالی شده و باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در ساخت مونوترپن‌های این مسیر شد [۱۴].

ابتدا در تنش ملایم روند صعودی پیدا کرد و سپس با افزایش سطوح تنش در تیمار ۴۰ و ۲۰ درصد ظرفیت زراعی روند نزولی به خود گرفت و کمترین میزان بیان این ژن در تیمار ۲۰ درصد ظرفیت زراعی اتفاق افتاد. در نتایج حاصل از آنالیز فیتوشیمی نیز همین روند مشاهده شد. بنابراین طبق نتایج حاصل و مطالعات قبلی، به نظر می‌رسد در آویشن باغی، ژن *DXR* در بیوسنتز مونوترپن تیمول و کارواکرول نقش دارد.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن آلفاتریپنول سینتاز (*Tctps5*) نشان داد که بیش‌ترین بیان این ژن در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی حاصل شد و در ادامه افزایش سطح تنش از بیان این ژن کاسته شد. در مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول ابتدا ژرانیل دی‌فسفات که پیش ماده مونوترپن‌هاست به آلفا تریپنول تبدیل می‌شود و آلفا تریپنول به تریپن و سپس تحت تأثیر آنزیم گاماتریپین سینتاز به گاماتریپین تبدیل می‌شود گاماتریپین نیز از طریق پی‌سیمن آروماتیک و تحت تأثیر آنزیم سیتوکروم P450s در مسیر به تیمول و کارواکرول تبدیل می‌شود [۳۷-۳۹]، (شکل شماره ۲). بنابراین طبق نتایج حاصل از این تحقیق و از آنجاکه این ژن در پایین دست مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول قرار دارد و مستقیماً در بیوسنتز تیمول و کارواکرول نقش دارد، به نظر می‌رسد که میزان بیان این ژن با مونوترپن تیمول و کارواکرول مطابقت دارد و با آنچه که راجع به ژن *DXR* گفته شد، هم‌خوانی دارد.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *Tctps1* حاکی از آن بود که تنش کم‌آبی سبب افزایش بیان این ژن در تیمارهای ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد شده است. همچنین این ژن برخلاف ژن‌های دیگر مورد مطالعه بیشترین میزان بیان را در تیمار ۴۰ و سپس ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به خود اختصاص داد این در حالی است که سایر ژن‌ها بیشترین میزان بیان را در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به خود اختصاص دادند به طوری که در تیمارهای ۲۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان کمی بیان شدند. طبق نتایج حاصل از میزان بیان و موقعیت این ژن در شبکه ژنی مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها



1. Bannayan M, Nadjafi F, Azizi M, Tabrizi L and Rastgoo M. Yield and seed quality of *Plantago ovata* and *Nigella sativa* under different irrigation treatments. *Industrial Crops and Products* 2008; 27: 11-6.
2. Horwath AB, Grayer RJ, Keith-Lucas DM and Simmonds MS. Chemical characterisation of wild populations of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology* 2008; 36: 117-33.
3. Yadegari M and Mosadeghzad Z. Biofertilizers effects on quantitative and qualitative yield of Thyme (*Thymus vulgaris*). *African Journal of Agricultural Research* 2012; 7: 4716-23.
4. Gómez-Galera S, Pelacho A.M., Gené A, Capell T and Christou P. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Reports* 2007; 26: 1689-715.
5. Muñoz-Bertomeu J, Ros R, Arrillaga I and Segura J. Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. *Metabolic Engineering* 2008; 10: 166-77.
6. Schillmiller AL, Schauvinhold I, Larson M, Xu R, Charbonneau AL, Schmidt A, Wilkerson C, Last RL and Pichersky E. 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* 2009; 106: 10865-108706.
7. Lichtenthaler HK. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 1999; 50: 47-65.
8. Rohdich F, Bacher A and Eisenreich W. Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochemical Society Transactions* 2005; 33: 785-791.
9. Burke CC, Wildung MR and Croteau R. Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96: 13062-7.
10. Davis EM and Croteau R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes in *Biosynthesis* Springer pp. 2000; 209: 53-95.
11. Estévez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jiménez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y and León P. Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2000; 124: 95-104.
12. Mahmoud SS and Croteau RB. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98: 8915-20.
13. Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, Ferrer A, Boronat A and Campos N. 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 Physiol.* 2002; 129: 1581-91.
14. Ruiz-May E, Galaz-Ávalos RM and Loyola-Vargas VM. Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate. *Molecular Biotechnol.* 2009; 41: 278-85.
15. Babae K, Amini Dehaghi M, Modares Sanavi S.A.M and Jabbari R. Water deficit effect on morphology, prolin content and thymol percentage of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2010; 26 (2): 240-51.



16. Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol.* 1987; 148: 350-82.
17. Qasim M, Ashraf M, Ashraf M, Rehman S-U and Rha E. Salt-induced changes in two canola cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum.* 2003; 46: 629-32.
18. Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N and Boronat A. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal* 2000; 22: 503-13.
19. Ghaedi M, Roosta M, Khodadoust S and Daneshfar A. Application of Optimized Vortex-Assisted Surfactant-Enhanced DLLME for Preconcentration of Thymol and Carvacrol, and Their Determination by HPLC-UV: Response Surface Methodology. *Journal of Chromatographic Science* 2015; 53: 1222-1231.
20. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 1987; 162: 156-9.
21. Schmittgen TD and Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008; 3: 1101-8.
22. Piekielek W and Fox R. Use of a chlorophyll meter to predict sidedress nitrogen. *Agronomy Journal* 1992; 84: 59-65.
23. Finger FL, Puschmann R and Barros RS. Effects of water loss on respiration, ethylene production and ripening of banana fruit. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 1995; 23: 132-45
24. Erdem Y, Şehirali S, Erdem T and Kenar D. Determination of crop water stress index for irrigation scheduling of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 2006; 30: 195-202.
25. Westra H-J, Peters MJ, Esko T, Yaghootkar H, Schurmann C, Kettunen J, Christiansen MW, Fairfax BP, Schramm K and Powell JE. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nature Genetics* 2013; 45: 1238-43.
26. Silva MdA, Jifon JL, Da Silva JA and Sharma V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2007; 19: 193-201.
27. Fu J, Fry J and Huang B. Minimum water requirements of four turfgrasses in the transition zone. *Hort Science* 2004; 39: 1740-4.
28. Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park S-H, Ram PA, Waxman DJ and Davey HW. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; 94: 7239-44.
29. Singh M, Ramesh S, Kumar S, Kukreja A, Dwivedi S and Singh A. Effect of irrigation and nitrogen on herbage, oil yield and water-use efficiency in rosemary grown under semi-arid tropical conditions. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 2000; 22: 659-662.
30. Sinclair T and Ludlow M. Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled potential of plant water potential. *Functional Plant Biology* 1985; 12: 213-7.
31. Farahani HA, Valadabadi SA, Daneshian J and Khalvati MA. Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Medicinal Plants Research* 2009; 3: 329-33.
32. Turtola S, Manninen A-M, Rikala R and Kainulainen P. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. *Journal of chemical Ecology* 2003; 29: 1981-95.
33. Pirzad A, Alyari H, Shakiba M, Zehtab-Salmasi S and Mohammadi A. Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. *Journal of Agronomy* 2006; 5: 451-5.



- 34.** Berteau CM, Schalk M, Karp F, Maffei M and Croteau R. Demonstration that menthofuran synthase of mint (*Mentha*) is a cytochrome P450 monooxygenase: cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 39: 279-86.
- 35.** Besser K, Harper A, Welsby N, Schauvinhold I, Slocombe S, Li Y, Dixon RA and Broun P. Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant Physiol.* 2009; 149: 499-514.
- 36.** Ramak P, Kazempour Osaloo S, Ebrahimzadeh H, Sharifi M and Behmanesh M. Expression of gene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and its relation to monoterpene carvacrol biosynthesis in *Satureja khuzestanica*. *Journal of Agronomy* 2014; 27: 622-34.
- 37.** Poulou A and Croteau R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1978; 187: 307-14.
- 38.** Crocoll C, Asbach J, Novak J, Gershenzon J and Degenhardt J. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 2010; 73: 587-603.
- 39.** Grosso C, Figueiredo AC, Burillo J, Mainar AM, Urieta JS, Barroso JG, Coelho JA and Palavra AM. Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Journal of Separation Science* 2010; 33: 2211-8.



Expression of Genes 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase (*DXR*), Sabinen Synthase (*Tctps1*) and α - terpineol Synthase (*Tctps5*) and its Relation to Thymol and Carvacrol Biosynthesis in *Thymus vulgaris* under Water Deficit Stress

Mirzaei F (M.Sc. student)¹, Fatehi F (Ph.D.)², Ismaili A (Ph.D.)³, Yaghotipoor A (Ph.D.)⁴, Qaderi A (Ph.D.)^{5*}

1- Agronomy and Plant Breeding Dept, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran

2- Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

3- Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran

4- Department of Agronomy and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran

5- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

*Corresponding author: Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, P.O.Box: 31375/1369, Karaj, Iran

Tel: +98-26-34764010-18, Fax: +98-26-34764021

Email: Ardeshir582008@gmail.com

Abstract

Background: Thymol and Carvacrol are the two important secondary metabolites from *Thymus vulgaris* that productions of them are controlled by genetic and environmental factors.

Objective: Evaluation of Water stress effects on expression of three important genes of thymol and carvacrol biosynthetic pathway and also physiological and phytochemical properties of *Thymus vulgaris*.

Methods: The present study was conducted in a randomized complete block design with 4 treatments and 3 replications in Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj.

For this purpose, the treatments were selected as control (FC), 70% of FC, 40% of FC, and 20% of FC. Gene expression was studied using real-time PCR method, and HPLC was applied to essence analysis. Also physiological characteristic including chlorophyll content, relative water content, electrolyte leakage percentage and carotenoids content were analyzed.

Results: The results revealed that water stress significantly influenced the gene expression ($P \leq 0.05$). The highest gene expression of *DXR* and *Tctps5* was observed in 70% of FC, while the highest one of *TvTPS1* was recorded in 40% of FC. Moreover, the maximum thymol and carvacrol was found in 70% of FC. In other hand the highest chlorophyll content and corotenoids content were obtained in 100% and 70% of FC respectively. Also there were not significant differences between treatments for relative water content and electrolyte leakage percentage.

Conclusion: The 70% of FC through influencing of genes in the first and last of MEP pathway increased thymol and carvacrol production.

Keywords: *Thymus vulgaris*, Gene Expression, water deficit, Photosynthesis Pigments, thymol, carvacrol

