

The Expression of Limonene Biosynthesis Pathway Key Genes under Drought Stress in *Dracocephalum kotschyi* at Vegetative and Flowering Stages

Soghra Kiani

Ph.D. Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Email: so_kiani@yahoo.com

Jafar Ahmadi

* Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Email: njahmadi910@yahoo.com

Behroz Shiran

Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: beshiran45@gmail.com

Sedegheh Fabriki-Ourang

Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Email: s.ourang910@gmail.com

Hossein Fallahi

Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, Razi University, Bagh-e-Abrisham Kermanshah, Iran. Email: h.fallahi@razi.ac.ir

Abstract

Objective

Dracocephalum kotschyi is an endemic medicinal plant in Iran belonging to the Lamiaceae family. One of the most important monoterpenes identified in this plant is limonene. Drought stress is one of the factors affecting the content of monoterpene in medicinal plants. In this study, the effect of different levels of drought stress was investigated on the expression of some genes involved in limonene biosynthetic pathway in *D. kotschyi* at two growth stages.

Materials and Methods

This experiment was conducted as a factorial experiment with two factor included drought stress and growth stages in a completely randomized design with three replications. Drought stress consisted of severe (25% FC), moderate (50% FC), low (75% FC) stress and non-stress or control (100% FC) and growth stages consisted of vegetative and flowering. Secondary metabolites were analyzed and the amount of limonene was measured by GC / MS using Head-space method and the relative expression of key genes involved in limonene biosynthesis was measured using Real Time PCR.

Results

Analysis of secondary metabolites showed, one of the main monoterpenes was limonene whose amounts was 20.57 % and 13.41% during vegetative and flowering stages, respectively. Drought stress significantly increased *HMGR* and *DXS* gene expression during flowering stage, while during vegetative stage no significant change was observed on expression of both genes. In both growth stages, low drought stress increased *HDR* gene expression, although at flowering stage this increase was not significant but severe drought decreased *HDR* gene expression, although this decrease was not significant at vegetative stage. Drought stress decreased *LS* gene expression during flowering stage and increased it during vegetative stage.

Conclusion

The results indicated that limonene content and expression of limonene biosynthesis key genes in *D. kotschyi* under drought stress are growth stage-specific.

Keywords: *Dracocephalum kotschyi*, Drought stress, *DXS*, *HMGR*, *LS*

Citation: Kiani S, Ahmadi J, Shiran B, Fabriki-Ourang S, Fallahi H (2019) The expression of limonene biosynthesis pathway key genes under drought stress in *Dracocephalum kotschyi* at vegetative and flowering stages. *Agricultural Biotechnology Journal* 11(3), 1-18.

Agricultural Biotechnology Journal 11(3), 1-18.

DOI: 10.22103/jab.2019.14706.1170

Received: September 15, 2019; Accepted: October 15, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز لیمونن تحت تأثیر تنش خشکی در

زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy*) در دو مرحله رویشی و گلدهی

صغری کیانی

دانش‌آموخته‌ی دکترای اصلاح نباتات، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران. so_kiani@yahoo.com

جعفر احمدی

* نویسنده مسئول. استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران. njahmadi910@yahoo.com

بهروز شیران

استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. beshiran45@gmail.com

صدیقه فابریکی اورنگ

دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران. s.ourang910@gmail.com

حسین فلاحی

استادیار، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. h.fallahi@razi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۳

چکیده

هدف: زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschy* یکی از گیاهان دارویی بومی ایران، متعلق به خانواده لامیاسه می‌باشد. از جمله مهم‌ترین مونوترپن‌های شناسایی شده در این گیاه لیمونن است. یکی از عوامل مؤثر بر میزان ترکیبات مونوترپنی

در گیاهان دارویی تنش خشکی می‌باشد. هدف از این بررسی تأثیر تنش خشکی در مراحل مختلف رشدی بر بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز لیمونن در زرین گیاه بود.

مواد و روش‌ها: این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل تنش خشکی شامل تنش شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی)، متوسط (۵۰٪ ظرفیت زراعی) و کم (۷۵٪ ظرفیت زراعی) و عدم اعمال تنش (۱۰۰٪ ظرفیت زراعی) و مراحل رشدی شامل دوره رویشی و گلدهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. آنالیز متابولیت‌های ثانویه و اندازه‌گیری میزان لیمونن با استفاده از دستگاه GC/MS به روش فضای فوقانی و اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌های کلیدی مؤثر در بیوسنتز لیمونن با استفاده از Real Time PCR صورت گرفت.

نتایج: آنالیز متابولیت‌های ثانویه مقدار لیمونن را در دوره رویشی ۲۰/۵۷ درصد و در دوره گلدهی ۱۳/۴۱ درصد نشان داد. تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *HMGR* و *DXS* در مرحله گلدهی شد، در حالی که در مرحله رویشی تغییر معنی‌داری بر بیان این دو ژن مشاهده نشد. در هر دو دوره رشدی تنش خشکی کم باعث افزایش بیان ژن *HDR* شد، هرچند که در دوره گلدهی این افزایش بیان معنی‌دار نبود، اما تنش خشکی شدید بیان ژن *HDR* را کاهش داد، هرچند که این کاهش بیان در دوره رویشی معنی‌دار نبود. تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن *LS* در مرحله گلدهی و افزایش معنی‌دار بیان آن در مرحله رشد رویشی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق، میزان لیمونن و بیان ژن‌های مؤثر در بیوسنتز آن را تحت تأثیر تنش خشکی وابسته به مرحله رشدی گیاه نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، زرین گیاه، *DXS*، *HMGR*، *LS*

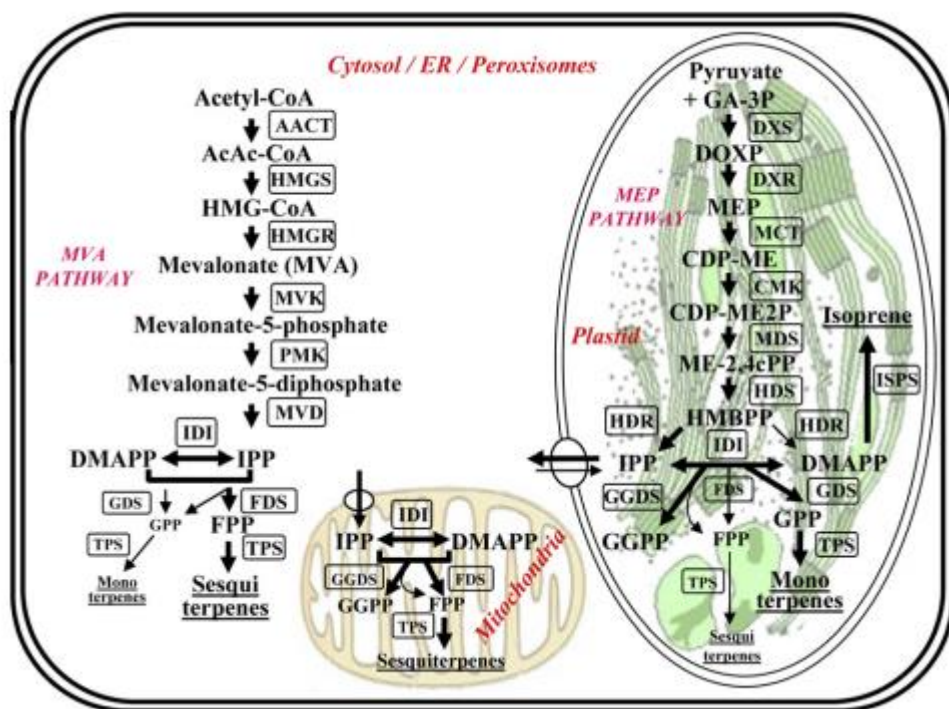
مقدمه

زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschy Boiss* یکی از گیاهان خانواده لامیاسه (Lamiace)، با $2n=2x=20$ $x=10$ ، کروموزوم، یک گیاه دارویی علفی چند ساله و معطر است که بومی ایران بوده و در رویشگاه‌های طبیعی در نواحی کوهستانی، ارتفاعات ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ متری کوه‌های البرز یافت می‌شود (Salehi et al. 2015). این گیاه به علت دارا بودن اسانس زیاد به عنوان یک گیاه دارویی مورد توجه می‌باشد. انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه شامل روغن‌های ضروری، مونوترپن‌ها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها همراه با ترکیبات فنلی و رزمارینیک اسید از اندام‌های هوایی زرین گیاه استخراج شده است (Fattahi et al. 2016; Fattahi et al. 2013). اگرچه متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی و معطر به طور معمول تحت تأثیر ژنوتیپ آنها می‌باشند، ولی بیوسنتز این ترکیبات به شدت تحت تأثیر فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرند و تنش‌های زیستی و غیرزیستی پارامترهای رشد، میزان روغن‌های ضروری و ترکیبات آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در میان تنش‌های غیر زیستی،

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌ها می‌باشد که به طور دوره‌ای در بعضی از مراحل رشد یا به طور دائمی در تمامی مراحل رشد گیاه اتفاق افتاده، رشد و تولید گیاهان را محدود می‌کند (Khorasaninejad et al. 2011).

با وجود این که تنش خشکی عموماً به عنوان یک فاکتور منفی مسئول کاهش شدید محصولات کشاورزی می‌باشد، در گیاهان دارویی و ادویه‌ای وضعیت متفاوت می‌باشد. در این گیاهان تنش خشکی می‌تواند موجب افزایش غلظت انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه از قبیل ترکیبات فنلی و انواع مختلف ترپن‌ها و در نتیجه افزایش کیفیت این محصولات شده (Kleinwachter et al. 2015) و در مواردی نیز باعث کاهش تولید متابولیت‌های ثانویه (Khorasaninejad et al. 2011) شود.

ترپنوئیدهای گیاهی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند که از یک واحد ایزوپرون پنج کربنه مشتق شده‌اند که با روش‌های مختلف بوجود آمده، تغییر شکل یافته و تحت عنوان ایزوپروپنوئیدها شناسایی می‌شوند. ترپنوئیدها مانند سایر متابولیت‌های ثانویه به دلیل اثرات متقابل گیاهان با محیط تغییرات زیادی نشان می‌دهند و نقش‌های بیولوژیکی مهمی در گیاهان دارند. سنتز ایزوپروپنوئیدها در گیاهان در قسمت‌های مختلف سلول از قبیل سیتوزول، پلاستیدها، میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی صورت می‌گیرد. دو مسیر اصلی و مجزا برای تولید پیش ماده‌های اصلی (IPP و DMAP) تولید ایزوپروپنوئیدها وجود دارد که عبارتند از مسیر موالاتات (MVA) که درون سیتوزول و پراکسیسوم می‌گیرد و مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) که درون کلروپلاست اتفاق می‌افتد (شکل ۱).



شکل ۱. مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها در دو مسیر MEP و MVA در گیاهان

Figure 1. The biosynthetic pathway of terpenes in the MEP and MVA pathway in plants

در گیاهان آنزیم ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMGR) به عنوان آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز سیتوپلاسمی MVA شناخته شده است. این آنزیم ماده ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم A را با دو واکنش کاهش متوالی و با مصرف دو مولکول از کوفاکتور NADPH به موالونیک اسید تبدیل می‌کند که این ترکیب اولین ماده حد واسط اختصاصی در مسیر بیوسنتزی MVA است (Hemmerlin et al. 2003). نحوه فعالیت و پاسخ این آنزیم به تغییرات محیطی مثل نور، تنظیم کننده‌های رشد، زخم‌ها، حمله پاتوژن‌ها و آلودگی‌های خارجی در میان بافت‌ها و مراحل مختلف رشدی بطور شگفت‌انگیزی متفاوت است (Weissenborn et al. 1995). مسیر پلاستییدی MEP توسط آنزیم ۱-دئوکسی زایلولوز ۵-فسفات سنتتاز (DXS) آغاز می‌شود. این آنزیم ماده ۱-دئوکسی زایلولوز ۵-فسفات (DXP: 1-Deoxyxylulose 5-phosphate) را با انجام یک واکنش تراکمی بین دو پیش ساز گلیسرآلدئید ۳-فسفات و پیروات سنتز می‌کند (Rohmer et al. 2003). سپس آنزیم DXP ردوکتاز ایزومراز (DXR) با عمل بر روی DXP تولید ۲-سی-۲-متیل اریتریتول-۴-فسفات (MEP: 2-C-Methylerythritol 4-phosphate) می‌نماید. پس از تولید MEP چندین واکنش پیاپی انجام می‌شود تا با سنتز IPP و ایزومر آن DMAPP این مرحله تکمیل شود. آنزیم HDR آخرین آنزیم در مسیر MEP می‌باشد و نقش کلیدی در تهیه پیش‌ماده ترپنوئیدهای پلاستییدی (IPP و DMAPP) به عهده دارد. این آنزیم‌ها، نقش کلیدی در این مسیر دارا می‌باشند و مشخص شده که در سطوح رونویسی و ترجمه تنظیم می‌شوند (Radwan, 2014). اسکلت اصلی ترپنوئیدها بوسیله آنزیم‌های ترپن سنتتاز (TPSSs) ساخته می‌شود که بدنبال آن در اثر هیدروکسیله شدن، دهیدروژنیزاسیون، آسیله شدن و گلوکوزیده شدن انواع مختلفی از ترپنوئیدها را بوجود می‌آورند (Yazaki et al. 2017). ترپن سنتتازها رنج وسیعی از ترپن‌ها را با استفاده از پیش‌ماده‌هایی که از دو مسیر سیتوزولی MVA و مسیر پلاستییدی MEP فراهم می‌شوند، سنتز می‌کنند. در ابتداء IPP و DMAP سنتز شده از مسیرهای MEP و MVA بوسیله آنزیم‌هایی از گروه پری‌نیل ترانسفراز متراکم شده و گروهی از ترکیبات حد واسط با طول زنجیره‌های مختلف شامل ژرانیل دی‌فسفات (GPP)، فارنسیل دی‌فسفات (FPP) و ژرانیل ژرانیل دی-فسفات (GGPP) را بوجود می‌آورند این ترکیبات حد واسط در مرحله بعد توسط خانواده بزرگ آنزیمی به نام ترپن سنتتازها منجر به تولید ترکیبات حلقوی و غیر حلقوی مونوترپنی و سزکوئی‌ترپنی می‌شوند (Radwan, 2014). یکی از مهم‌ترین مونوترپن‌های حلقوی شناسایی شده در زرین‌گیاه لیمون می‌باشد که دارای خاصیت آلوپاتی بوده، علف‌کش و حشره‌کش قوی می‌باشد (Jalal et al. 2005). همچنین این ترکیب ضددرد و مسکن (Heydari et al. 2019) و ضد تشنج (Golshani et al. 2004) می‌باشد. لیمون توسط یکی از ترپن سنتتازها (TPS) به نام لیمون سنتتاز (LS) از پیش ماده ژرانیل دی‌فسفات (GPP) ساخته می‌شود. این ترکیب در تعداد زیادی از گیاهان مانند نعنا، پرتقال و لیمو شناسایی شده و حتی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک در میکروارگانیسم‌ها نیز این ترکیب مهم به دلیل استفاده‌های صنعتی زیادی که دارد تولید می‌شود (Jongedijk et al. 2016).

از طرفی، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad, 2017). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد. بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چند بعدی می باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی، مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari et al. 2016). از این ژن‌های مهم می‌توان به ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز لیمون در زرین گیاه اشاره کرد. با توجه به این که زرین گیاه یکی از گیاهان دارویی بومی ایران بوده، حاوی مقدار قابل توجهی لیمون می‌باشد و تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با تأثیر تنش خشکی و بررسی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز لیمون در این گیاه صورت نگرفته، این تحقیق به منظور بررسی تأثیر تنش خشکی در مراحل مختلف رشدی بر میزان بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز لیمون به منظور استفاده بهینه از شرایط تنش خشکی و کمبود آب و بهره‌برداری از ترکیب مهم لیمون در زرین گیاه صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش تحت شرایط کنترل شده در گلخانه دانشگاه شهرکرد به صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور سطوح مختلف تنش خشکی و مراحل مختلف رشدی گیاه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. بذرهای گیاه *D. kotschy* از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری و درون سینی نشاء پلاستیکی حاوی پیت ماس: کوکوپیت: ماسه به نسبت ۱:۱:۱ کشت شدند. نشاءها بعد از ده هفته و پس از رشد کافی به گلدان‌های پلاستیکی چهار کیلوگرمی حاوی خاک رس: کود دامی: شن به نسبت ۱:۱:۲ انتقال یافتند. بعد از استقرار کامل گیاهچه‌ها و رشد کافی گیاهان، تیمارهای تنش خشکی شامل تنش شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی)، تنش متوسط (۵۰ درصد ظرفیت زراعی)، تنش کم (۷۵ درصد ظرفیت زراعی) و بدون تنش یا تیمار شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) در دو مرحله رشدی (رویشی و گلدهی) به مدت زمان یک هفته اعمال شدند. جهت اعمال تنش خشکی ابتدا ظرفیت زراعی خاک گلدان‌ها به روش حجمی تعیین و سپس بر مبنای ظرفیت زراعی خاک، تیمارهای تنش خشکی اعمال شدند. نمونه‌گیری به منظور استخراج RNA، بررسی بیان ژن‌های مورد بررسی و اندازه‌گیری میزان لیمون از برگ‌های جوان یک هفته

بعد از اعمال تنش خشکی در هر دو دوره رویشی و گلدهی صورت گرفت. نمونه‌های برگ تهیه شده تا زمان بررسی‌های فیتوشیمیایی و مولکولی درون فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری میزان لیمونن در زرین گیاه، به روش فضای فوقانی توسط دستگاه GC/MS با استفاده از نمونه‌های نگهداری شده درون فریزر ۸۰- برای کلیه تیمارهای آزمایش انجام شد. استخراج RNA کل با استفاده از محلول تریزول از نمونه‌های برگ طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد تعیین شد. نمونه‌های RNA که دارای نسبت OD ۲۶۰ به ۲۸۰ نزدیک به ۲ بوده، بر روی ژل آگارز ۲ درصد فاقد اسمیر و دارای دو باند قوی یکی مربوط به 28S rRNA و دیگری 18S rRNA بودند دارای کیفیت مطلوب بوده، جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA یکتا تجهیز آزما (YTA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. طراحی آغازگرهای مورد نیاز بر اساس داده‌های آنالیز ترنسکرپتوم (RNA-Seq) این گیاه در شرایط کنترل و تنش انجام شد. به منظور طراحی آغازگرها از نرم‌افزار آنالیز Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) استفاده و ویژگی‌های جفت آغازگرها از لحاظ تشکیل ساختارهای ثانویه، هتروداایمر، همودایمر و غیره با استفاده از نرم افزار آنالیز Oligo analyzer (<https://eu.idtdna.com>) همچنین توسط NCBI primer blast بررسی و تأیید شدند. جهت اطمینان از صحت آغازگرهای طراحی شده، این آغازگرها مجدداً بر روی توالی کانتینگ‌های حاصل از RNA-Seq بلاست شدند. جدول ۱ نام ژن و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد.

جدول ۱. نام ژن و توالی آغازگرها

Figure 1. Gene name and primer sequence

Gen Name	نام ژن	Primer sequence	توالی آغازگر (5'-3')
<i>HMGR</i>		L: GACGGAGGGCTGCTTGGTG R: AGTTGAATCTGACGACGGGAGC	
<i>DXS</i>		L: TCCTTACGAGTGCGGGATTA R: GGATAGCGAAAGCAAACCTGG	
<i>HDR</i>		L: ATGGGGAGTTGGTGCAGAA R: TTGATCGCAAACACCTTCAGA	
<i>LS</i>		L: TGCAGAAAGTTTGGTGGCGAAT R: CCCTTGCTTTCAGACTCCTCC	
<i>EF1-α</i>		L: TCCTTTGGGTCGTTTTGCTG R: GGTAACCTTGGCACCTGTTG	
<i>ACTIN-7</i>		L: CGAGACGACCTACAACCTCCA	

R: AGCCGTAATCTCCTTGCTCA

به منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های مورد بررسی در شرایط تنش و عدم تنش در دو مرحله رویشی و گلدهی واکنش Real Time-PCR با استفاده از مخلوط واکنش RealQ Plus 2× Master Mix Green شرکت Ampliqon حاوی ترکیب سایبرگرین و استفاده از آغازگرهای اختصاصی توسط دستگاه (Mini Opticon, USA) Bio Rad با سه تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی برای تمام نمونه‌ها انجام شد. جهت اطمینان از سنتز صحیح cDNA و همچنین بررسی آغازگرهای طراحی شده و تأیید حضور ژن‌ها واکنش end-point PCR برای هر نمونه انجام شد. جدول ۲ لیست ژن‌های مورد بررسی و ویژگی‌های آنها را نشان می‌دهد.

جدول ۲. نام، علامت اختصاری و مسیر فعالیت ژن‌ها

Figure 2. Name, code and path way of genes

Gene name	نام ژن	علامت اختصاری Code	مسیر فعالیت Pathway	KO	EC
Hydroxyl methyl glutaryl-CoA reductase		<i>HMGR</i>	Mevalonate pathway (MVA)	K00021	1.1.1.34
1-deoxy-D-xylulose- 5-phosphate synthase		<i>DXS</i>	non-Mevalonate pathway(MEP)	K01662	2.2.1.7
4-hydroxy-3- methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase		<i>HDR</i>	non-Mevalonate pathway (MEP)	K03527	1.17.7.4
(4S)-limonene synthase (-)-alpha/(-)-beta- pinene Synthase		<i>LS</i>	Monoterpenoid biosynthesis	K15088	4.2.3.16

مخلوط واکنش qRT-PCR شامل ۵ μl از 2x Real Q Plus Master Mix Green (Ampliqon) ۲ μl نمونه cDNA و ۱ μl از هریک از آغازگرهای پیشرو و پسرو با ۱ μl آب مقطر استریل به حجم نهایی ۱۰ μl تهیه شدند. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ °C برای واسرشت‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه شامل ۲۰ ثانیه در دمای ۲۰ °C

۹۴ (واسرشته سازی)، ۲۰ ثانیه در دمای °C ۵۸ (اتصال آغازگرها)، ۲۰ ثانیه در دمای °C ۷۲ (بسط) و در نهایت افزایش دما برای ترسیم منحنی ذوب از ۶۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس انجام گرفت. میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش (Schmittgen 2008) and Livak محاسبه شدند. دو ژن $EF1-\alpha$ و $Actin-7$ به عنوان کنترل داخلی مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت با توجه به پایداری بیشتر ژن $EF1-\alpha$ در شرایط کنترل و تنش این ژن به عنوان ژن مرجع برای نرمال کردن داده‌های بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی و سپس مقایسه میانگین آن‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 و رسم نمودارها با استفاده از Excel ver., 2010 انجام شد.

نتایج و بحث

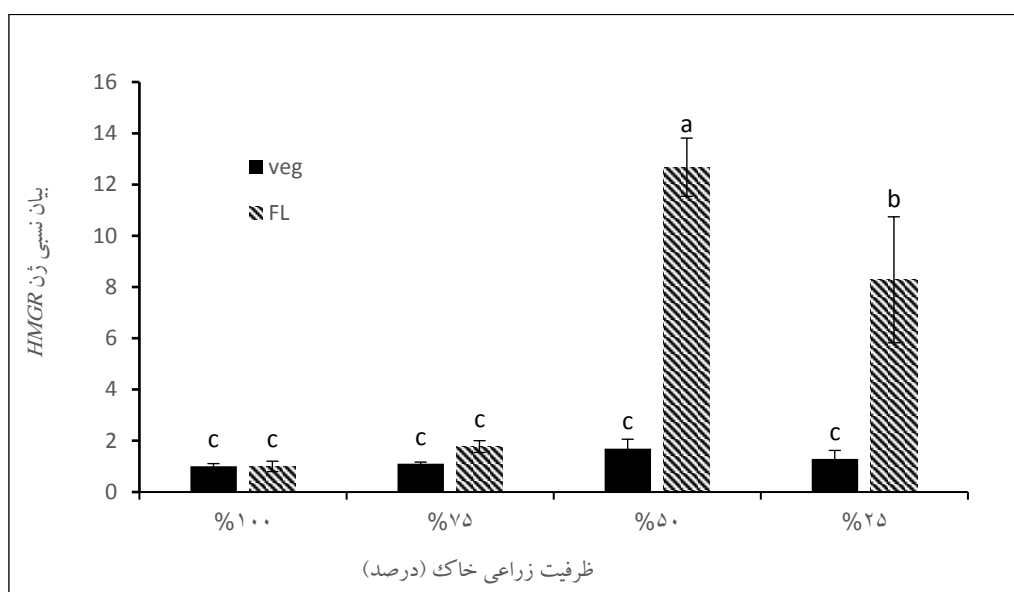
یکی از مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در زرین‌گیاه در هر دو دوره رشدی لیمونن (Limonene) با ۲۰/۵۷ درصد در دوره رشد رویشی و ۱۳/۴۱ درصد در دوره گلدهی بود، مقدار لیمونن در دوره رشد رویشی بیشتر از دوره گلدهی بود. میزان ترکیب لیمونن تحت تأثیر شرایط تنش خشکی شدید نسبت به گیاهان شاهد در مرحله رویشی به میزان ۱/۸ برابر افزایش و در دوره گلدهی به میزان ۲/۶ برابر کاهش نشان داد. تجزیه واریانس داده‌های مربوط بیان ژن‌های LS ، HDR ، DXS ، $HMGR$ تفاوت معنی‌داری در مراحل رشدی مختلف، سطوح مختلف تنش خشکی و اثرات متقابل دوره رشدی و تنش خشکی در سطوح احتمال پنج درصد و یک درصد نشان داد (جدول ۳). معنی‌دار بودن اثرات متقابل دوره رشدی و تنش خشکی دلالت بر عدم پاسخ یکسان و بیان متفاوت ژن‌های مورد بررسی مسیر بیوسنتز لیمونن در سطوح مختلف تنش خشکی و مراحل رشدی متفاوت دارد.

جدول ۳. تجزیه واریانس بیان نسبی برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز لیمونن در دو مرحله رویشی و گلدهی در زرین‌گیاه تحت تأثیر تنش خشکی

Figure 3. Analysis of variance of relative expression of some limonene biosynthetic pathway genes in two vegetative and flowering stages in *D. kotschy* under drought stress

Mean Square		میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
<i>LS</i>	<i>HDR</i>	<i>DXS</i>	<i>HMGR</i>	Degree of freedom	Source of variance
21.381**	5.879**	115.700**	260.624**	1	Growth stage مرحله رشدی
0.633**	5.697**	20.162**	102.761**	3	Drought stress تنش خشکی
3.554**	2.709**	30.058**	83.044**	3	Interaction effect اثرات متقابل
0.106	0.111	3.704	5.765	16	Error خطای آزمایشی

شکل ۲ مقایسه میانگین و بیان نسبی ژن *HMGR* را در گیاه *D.kotschy* تحت شرایط رطوبتی شاهد و سطوح مختلف تنش خشکی در دو مرحله رشدی نشان داده است. در دوره گلدهی، تنش خشکی متوسط و شدید باعث افزایش معنی دار بیان این ژن نسبت به گیاهان شاهد شد. با افزایش شدت تنش خشکی از میزان بیان این ژن کاسته شد اما نسبت به گیاهان شاهد افزایش بیان معنی داری داشت. میزان بیان این ژن در دوره گلدهی تحت شرایط تنش خشکی متوسط و شدید به ترتیب ۱۲/۷ و ۸/۳ برابر افزایش معنی داری نشان داد.

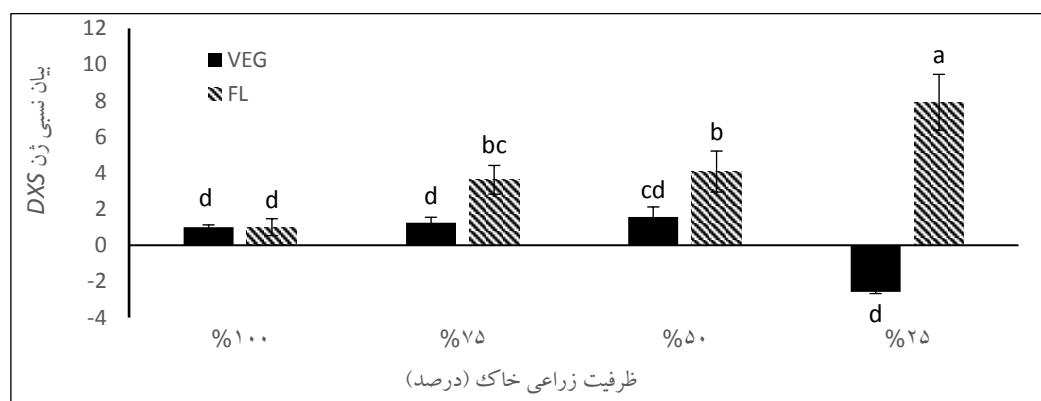


شکل ۲. مقایسه میانگین و بیان نسبی ژن *HMGR* در زیرین گیاه در دو مرحله رویشی و گلدهی تحت تأثیر تنش خشکی

Figure 2. Relative expression of *HMGR* gene under control and water stress in *D.kotschy* during vegetative and flowering stages.

کلیه ترپنوئیدها از نظر ساختمانی از اسکلت‌های ۵ کربنه به نام‌های ایزوپنتیل پیروفسفات (IPP) و دی‌متیل آلیل پیروفسفات (DMAPP) تشکیل شده‌اند که این دو ترکیب از دو مسیر جداگانه‌ای درون سلول به نام‌های مسیر موالانات (MVA) و مسیر (MEP) ساخته می‌شوند. مسیر موالانات درون سیتوزول سلولی می‌باشد و با ترکیبی به نام استیل‌کوآنزیم A شروع و در نهایت منجر به تولید ایزوپنتیل پیروفسفات (IPP) و ایزومر آن دی‌متیل آلیل پیروفسفات (DMAPP) می‌شود. موالونیک اسید یک ترکیب واسط در مسیر موالانات می‌باشد که از اضافه شدن ترکیبی به نام ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلوئوتاریل‌کوآنزیم A به استیل‌کوآنزیم A (HMG-CoA) تشکیل می‌شود. آنزیم کلیدی برای تبدیل HMG-CoA به MVA در مسیر موالانات آنزیم *HMGR* می‌باشد. این آنزیم باعث تلفیق استیل‌کوآنزیم A به ۳-هیدروکسی ۳-متیل گلوئوتاریل‌کوآنزیم A و تشکیل موالانات

(MVA) می‌شود. بنابراین ژن *HMGR* اهمیت ویژه‌ای در نخستین مرحله سنتز ترپن‌ها دارا می‌باشد. افزایش بیان ژن *HMGR* در اثر القاء تنش خشکی نشان می‌دهد که مسیر MVA در سیتوزول در تولید ترپنوئیدها در زرین گیاه نقش مهمی دارد. نتایج حاصل از بررسی این ژن در شرایط تنش با نتایج Shariat et al. (2018) در مرزه، Ghasemi et al. (2018) در زیره سبز، Morshedloo et al. (2017) در پونه کوهی، Ma et al. (2012) در مریم گلی و Pateraki et al. (2010) در *Cistus creticus* مطابقت داشت. بررسی‌های Shariat et al. (2018) در گیاه مرزه افزایش بیان ژن *HMGR* را تحت تأثیر تیمارهای مختلف تنش خشکی نشان داد. بررسی‌های Ghasemi et al. (2018) افزایش معنی دار بیان ژن *HMGR* را تحت تأثیر اشعه UV-B در گیاه زیره سبز نشان داد. مطالعه Morshedloo et al. (2017) نشان داد که تنش خشکی ملایم و متوسط در گیاه پونه کوهی باعث افزایش معنی دار بیان این ژن شد. در این مطالعه نیز با افزایش شدت تنش خشکی از میزان بیان این ژن کاسته شد اما نسبت به گیاهان کنترل افزایش بیان معنی دار بود. همچنین Ma et al. (2012) نشان دادند که در گیاه مریم گلی القاء تنش بوسیله متیل جاسمونات باعث افزایش بیان ژن‌های *HMGR1*، *HMGR2*، *HMGR3* در این گیاه شد. بررسی‌های Pateraki et al. (2010) نشان داد که تنش خشکی در گیاه *Cistus creticus* در روزهای اول القاء تنش باعث افزایش بیان این ژن و سپس با افزایش طول دوره تنش میزان بیان آن کاهش یافت. شکل ۳ مقایسه میانگین و بیان نسبی ژن *DXS* در گیاه *D. kotschy* را تحت تأثیر شرایط رطوبتی شاهد و سطوح مختلف تنش خشکی در دو مرحله رشدی نشان داده شده است. تنش خشکی کم و متوسط در دوره رویشی باعث افزایش بیان این ژن نسبت به گیاهان شاهد شد اما تنش خشکی شدید میزان بیان این ژن را کاهش داد ولی تغییر در میزان بیان این ژن در دوره رویشی معنی دار نبود. در دوره گلدهی میزان بیان این ژن با افزایش شدت تنش خشکی افزایش یافت و این افزایش بسیار معنی دار بود به طوری که در این دوره در شرایط تنش خشکی شدید میزان بیان این ژن به بیشترین مقدار خود رسید. البته میزان بیان این ژن در تنش خشکی کم و متوسط در دوره گلدهی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند.



شکل ۳. مقایسه میانگین و بیان نسبی ژن *DXS* در زرین گیاه در دو مرحله رویشی و گلدهی تحت تأثیر تنش

خشکی

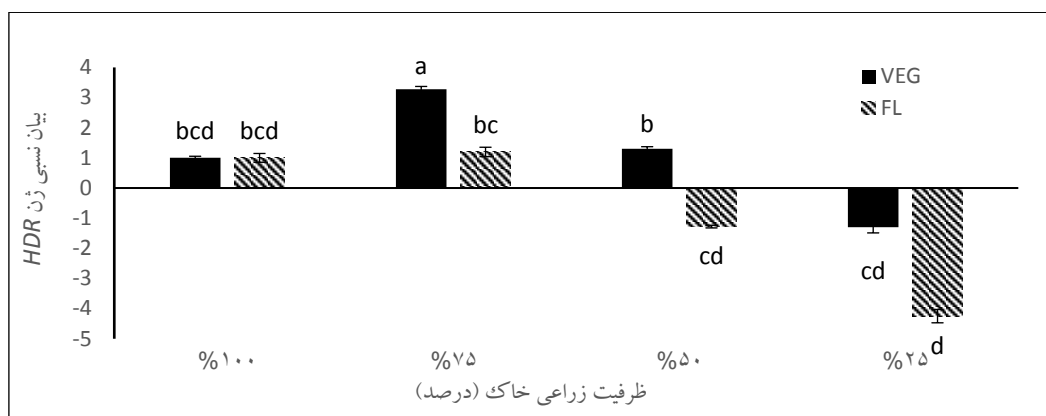
Figure 3. Relative expression of *DXS* gene under control and water stress in *D.kotschy* during vegetative and flowering stages.

اولین آنزیم در مسیر MEP آنزیم *DXS* می باشد که پیروات و گلیسرآلدئیدتری فسفات را به ۱-دی-اکسی-دی-زایلوز ۵-فسفات (*DXP*) تبدیل می کند و نقش بسیار مهم و کلیدی در مراحل ابتدایی سنتز *IPP* و *DMAPP* و در نتیجه شروع مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها دارد. این آنزیم توسط ژن *DXS* کد می شود. افزایش بیان ژن *DXS* در اثر القاء تنش خشکی نشان می دهد که مسیر *MEP* در پلاستیدها در تولید ترپنوئیدها در زرین گیاه نقش مهمی دارد. افزایش بیان ژن *DXS* که یکی از ژن های اصلی تنظیم کننده مسیر *MEP* می باشد باعث تجمع محصولات نهایی این مسیر می شود. نشان داده شده است که افزایش فعالیت *DXS* تولید ایزوپرنوئیدهای پلاستییدی را در همه سیستم ها افزایش داده است. همبستگی مثبت بین رونوشت های *DXS* و ایزوپرنوئیدهای پلاستییدی در آراییدوبسیس مشاهده شده است (Paulet et al., 2006).

نتایج حاصل از این مطالعه در دوره گلدهی با نتایج Fan et al. (2018)، Ghasemi et al. (2019)، Wei et al. (2019) و Pateraki et al. (2010) مطابقت داشت. در پژوهشی Wei et al. (2019) نشان دادند که بیان این ژن مربوط به دوره گلدهی و تولید میوه می باشد و تنش های غیرزیستی مانند آبسزیک اسید، پلی اتیلن گلیکول و پراکسید هیدروژن باعث افزایش بیان این ژن شدند. بررسی های Ghasemi et al. (2018) افزایش معنی دار بیان ژن *DXS* را تحت تأثیر اشعه UV-B در گیاه زیره سبز نشان داد. در بررسی های انجام شده توسط Fan et al. (2016) الیستورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید باعث افزایش تعداد رونوشت های ژن *DXS* در گیاه دارویی *Dendrobium officinale* شدند. بررسی های Pateraki et al. (2010) نشان داد که تنش خشکی در گیاه *Cistus creticus* در روزهای اول القاء تنش باعث افزایش بیان این ژن و سپس با افزایش طول دوره تنش میزان بیان آن کاهش یافت. تنش خشکی الگوی بیان مشابهی را در هر دو ژن *DXS* و *HMGR* در زرین گیاه باعث شد. در مرحله رشد رویشی تنش خشکی تأثیر معنی داری بر بیان این دو ژن نداشت. اما در مرحله گلدهی تنش خشکی باعث افزایش معنی دار تجمع رونوشت های هر دو ژن شد که این افزایش نشان دهنده تنظیم بیان آنها در سطح رونویسی (Transcriptional) یا پس از رونویسی (Post transcriptional) می باشد. این احتمال وجود دارد که افزایش بیان ژن های *DXS* و *HMGR* تحت تأثیر تنش خشکی در دوره گلدهی همراه با فرآیندهای دخیل در سازگاری به شرایط تنش همانند تولید ایزوپرنوئیدها و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در زرین گیاه در مرحله گلدهی باشد که به گیاه اجازه غلبه بر شرایط تنش را می دهند.

شکل ۴ مقایسه میانگین و بیان نسبی ژن *HDR* در گیاه *D. kotschy* را تحت تأثیر شرایط رطوبتی شاهد و سطوح مختلف تنش خشکی در دو مرحله رشدی نشان داده است. در دوره رویشی تنش خشکی کم باعث افزایش بسیار معنی دار بیان این ژن شد، به طوری که میزان بیان این ژن به مقدار ۳/۲۸ برابر گیاهان شاهد رسید. با افزایش شدت تنش خشکی از میزان بیان این ژن کاسته شد، تنش خشکی متوسط باعث افزایش میزان بیان این ژن به مقدار ۱/۲۹ برابر نسبت به گیاهان شاهد شد ولی این

افزایش معنی‌دار نبود. تنش خشکی شدید در این دوره رشدی باعث کاهش بیان این ژن به میزان ۱/۲۹ برابر شد. در دوره گلدهی، تنش خشکی کم باعث افزایش بیان این ژن شد هر چند این افزایش بیان معنی‌دار نبود اما با افزایش شدت تنش خشکی از میزان بیان این ژن کاسته شد به طوری که تنش خشکی شدید باعث کاهش بیان این ژن به میزان ۴/۲۵ برابر نسبت به گیاهان شاهد شد. کاهش میزان بیان این ژن با افزایش شدت تنش خشکی را می‌توان بدلیل عدم توانایی گیاه به غلبه بر کاهش شدید آب دانست. آنزیم HDR آخرین آنزیم در مسیر MEP می‌باشد و نقش کلیدی در تهیه پیش‌ماده ترپنوئیدهای پلاستییدی به عهده دارد. در مطالعه انجام شده توسط Ma et al. (2012) در گیاه مریم‌گلی دو ژن *smHDR1* و *smHDR2* شناسایی شده است. در این بررسی ژن *smHDR1* در همه بافتها بیان شده و در اثر القاء تنش توسط متیل جاسمونات افزایش بیان نشان داد در صورتی که ژن *smHDR2* در بعضی از بافتهای گیاه بیان شده و بیان آن تحت تأثیر متیل جاسمونات قرار نگرفت.

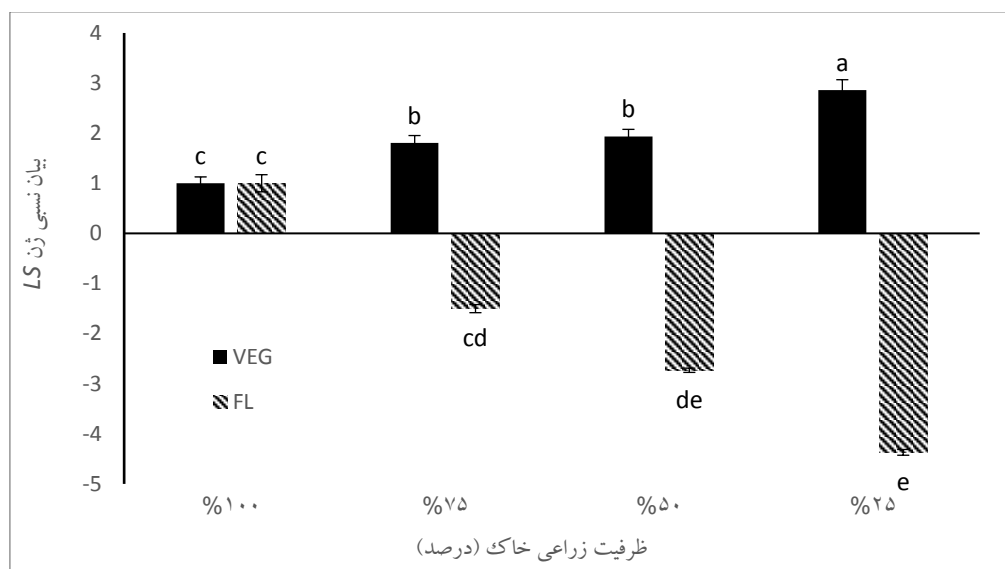


شکل ۴. مقایسه میانگین و بیان نسبی ژن HDR در زیرین گیاه در دو مرحله رویشی و گلدهی تحت تأثیر تنش خشکی

Figure 4. Relative expression of HDR gene under control and water stress in *D.kotschy* during vegetative and flowering stages.

شکل ۵ مقایسه میانگین و بیان نسبی ژن LS را در گیاه *D. kotschy* را تحت تأثیر شرایط رطوبتی شاهد و سطوح مختلف تنش خشکی در دو مرحله رشدی نشان داده است. در دوره رویشی با افزایش شدت تنش خشکی بر میزان بیان این ژن به طور معنی‌داری افزوده شد به طوری که تحت تأثیر تنش خشکی شدید میزان بیان این ژن به میزان ۲/۸۶ برابر نسبت به گیاهان شاهد رسید. اما در دوره گلدهی تنش خشکی بیان این ژن را کاهش داد اما این کاهش بیان در شرایط رطوبتی تنش خشکی کم معنی‌دار نبود اما تنش خشکی متوسط و شدید باعث کاهش بسیار معنی‌دار بیان ژن در این دوره رشدی شدند به طوری که بیان این ژن در این دوره رشدی تحت تنش خشکی شدید به میزان ۴/۳۷ برابر نسبت به گیاهان شاهد کاهش نشان داد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر در مرحله گلدهی در توافق با نتایج Rahimi et al. (2017)، Soleymani et al. (2017) می‌باشد. Rahimi et al.

al (2017) گزارش کردند که در گیاه نعناء رونوشت‌های لیمون سنتاز تحت تأثیر تنش شدید خشکی (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) نسبت به گیاهان شاهد ۵ برابر کاهش داشته است. در مطالعه Soleymani et al. (2017) تیمار کیتوزان در گیاه نعناء باعث کاهش میزان بیان ژن لیمون سنتاز گردید.



شکل ۵. مقایسه میانگین و بیان نسبی ژن *LS* در زیرین گیاه در دو مرحله رویشی و گلدهی تحت تأثیر تنش خشکی

Figure 5. Relative expression of *LS* gene under control and water stress in *D.kotshyi* during vegetative and flowering stages

لیمون یکی از مونوترپن‌های حلقوی می باشد که توسط لیمون سنتاز از پیش ماده ژرانیل دی فسفات ساخته می شود (Anand 2016). نتایج آنالیز بیان ژن لیمون سنتاز در دو مرحله رشدی تحت تنش خشکی همبستگی مثبتی با میزان ترکیب لیمون در آنالیز ترکیبات روغن‌های ضروری با استفاده از GC/MS به روش فضای فوقانی داشت. آنالیز بیان ژن *LS* در مرحله رشد رویشی نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش میزان بیان این ژن شد، همچنین نتایج آنالیز GC/MS نیز افزایش میزان ترکیب لیمون را در شرایط تنش خشکی در این مرحله رشدی نشان داد. در مرحله گلدهی تنش خشکی باعث کاهش میزان بیان این ژن شد همچنین نتایج آنالیز GC/MS نیز کاهش میزان ترکیب لیمون را در شرایط تنش خشکی در این مرحله رشدی نشان داد. افزایش رونوشت‌های *LS* در مرحله رویشی در شرایط تنش خشکی شدید احتمالاً با افزایش میزان لیمون در شرایط تنش خشکی شدید در این دوره رشدی و کاهش رونوشت‌های *LS* در مرحله گلدهی در شرایط تنش خشکی شدید احتمالاً با کاهش میزان لیمون در شرایط تنش خشکی شدید در این دوره رشدی مرتبط می‌باشد.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد سطوح مختلف تنش خشکی می تواند بیان دو ژن *DXS* و *HMGR* را که ژن های کلیدی سنتز ترپین ها از طریق هر دو مسیر *MVA* و *MEP* می باشند در مرحله گلدھی افزایش دهد اما بیان ژن *HDR* در هر دو مرحله رشدی تحت تأثیر تنش خشکی کم افزایش اما تنش خشکی شدید باعث کاهش بیان این ژن شد. تنش خشکی در مرحله رویشی باعث افزایش بیان ژن *LS* و میزان لیمونن و در مرحله گلدھی موجب کاهش بیان ژن *LS* و میزان لیمونن در زرین گیاه شد. بنابراین امید است اطلاعات بدست آمده بتواند در زمینه تلاش برای افزایش ترکیب مهم لیمونن در این گیاه مفید واقع شود. البته با توجه به پیچیده بودن مسیرهای بیوسنتز ترپین ها و چند محصولی بودن تعدادی از ترپین سنتازها، بررسی بیان ژن های سایر ترپین ها و نیز اثرات متقابل آنها می تواند مورد توجه قرار گیرد.

منابع

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن *Rheb* در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۳۵-۵۰.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن *CIB4* در بافت های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از *Real Time qPCR*. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

References

- Anand A (2016) Major secondary metabolites and their biosynthesis in selected *Ocimum* sp. PhD thesis, Biochemical Sciences Division CSIR-National Chemical Laboratory. pp. 2-69.
- Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavía P et al. (2006) Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* 62, 683-695.
- Fan H, Wu Q, Wang X et al. (2016) Molecular cloning and expression of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase and 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in *Dendrobium officinale*. *Plant Cell Tiss Org* 125, 381-385.
- Fattahi M, Bonfill M, Fattahi B et al. (2016) Secondary metabolites profiling of *Dracocephalum kotschy* Boiss at three phenological stages using uni-and multivariate methods. *J Appl Res Med Aroma* 3, 177-185.

- Fattahi M, Nazeri V, Torras-Claveria L et al. (2013) Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC–DAD–ESI-MS. *Food Chem* 141, 139-146.
- Ghasemi S, Kumleh HH, Kordrostami M (2018) Changes in the expression of some genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites in *Cuminum cyminum* L. under UV stress. *Protoplasma* 256, 279-290.
- Golshani S, Karamkhani F, Monsef-Esfehani HR, Abdollahi M (2004) Antinociceptive effects of the essential oil of *Dracocephalum kotschyi* in the mouse writhing test. *J pharm pharm Sci* 7, 76-79.
- Hemmerlin A, Hoeffler JF, Meyer O et al. (2003) Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J Biol Chem* 278, 26666-26676.
- Heydari P, Yavari M, Adibi P et al. (2019) Medicinal Properties and Active Constituents of *Dracocephalum kotschyi* and Its Significance in Iran: A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2019/9465309>
- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. *J Rumin Res* 4, 119-132 (In Persian).
- Jalaei Z, Fattahi M, Aramideh S, (2015) Allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. from Iran: A new chemotype with highest limonene-10-al and limonene. *Industrial Crops and Products* 73, 109-117.
- Jongedijk E, Cankar K, Buchhaupt M et al. (2016) Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 2927-2938.
- Khorasaninejad, S, Mousavi A, Soltanloo H et al. (2011) The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). *J Med Plant Res* 5, 5360-5365.
- Kleinwächter M, Selmar D (2015) New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. *Agron Sustain Dev* 35, 121-131.
- Ma Y, Yuan L, Wu B et al. (2012) Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *J Exp Bot* 63, 2809-2823.
- Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. *Brazil J Med Biol Res* 50, e6177.
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F 2017. Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 7 (2), 289-295

- Morshedloo MR, Craker LE, Salami A et al. (2017) Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono-and sesquiterpene synthesis in two Oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiol Biochem* 111, 119-128.
- Pateraki I, Kanellis AK (2010) Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *Creticus*. *Plant Cell Rep* 29, 629-641.
- Radwan AM. The impact of drought stress on monoterpene biosynthesis in sage (*Salvia officinalis*): Dehydrins and monoterpene synthases as molecular markers. PhD thesis, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. pp. 2-29
- Rahimi Y, Taleei A, Ranjbar M (2017) Changes in the expression of key genes involved in the biosynthesis of menthol and menthofuran in *Mentha piperita* L. under drought stress. *Acta Physiol Plant* 39, 203.
- Rohmer M, (2003) Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure and Applied Chemistry* 75, 375-388.
- Salehi M, Hejazi SMH, Tabaei R (2015) Genetic Differentiation of two *Dracocephalum* (Lamiaceae) species and populations in Iran by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Biological Forum – An international journal* 7, 300.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols* 3, 1101.
- Shariat A, Karimzadeh G, Assareh MH, Hadian J (2018) Metabolite profiling and molecular responses in a drought-tolerant savory, *Satureja rechingeri* exposed to water deficit. *3 Biotech* 8, 477.
- Soleymani F, Taheri H, Shafeinia AR (2017) Relative expression of genes of menthol biosynthesis pathway in peppermint (*Mentha piperita* L.) after chitosan, gibberellic acid and methyl jasmonate treatments. *Russ J Plant physiol* 64, 59-66.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50 (in Persian).
- Wei H, Movahedi A, Xu C et al. (2019) Overexpression of PtDXS Enhances Stress Resistance in Poplars. *Int J Mol Sci* 20, 1669.
- Weissenborn DL, Denbow CJ, Laine M et al. (1995) HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization with in a complex pathway. *Physiol Plant* 93, 393-400.
- Yazaki K, Arimura GI, Ohnishi T (2017) Hidden terpenoids in plants: their biosynthesis, localization and ecological roles. *Plant Cell Physiol* 58, 1615-1621.