



Shahid Bahonar
University of Kerman



Iranian
Biotechnology Society

Expression analysis of the key genes involved in Biosynthesis Pathway of Carvacrol in *Satureja mutica* fisch & CA mey under Drought Stress

Fatemeh Davari Shalamzari

MSc Student in Production Engineering and Plant Genetics , Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
E-mail: f.davari1995@gmail.com

Lila NejadSadeghi

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir

Khosro Mehdikhanlou

Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail: kh.mehdikhanloo@scu.ac.ir

Qing-Yan Shu

Key Laboratory of Plant Resources/Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China. E-mail: shuqy@ibcas.ac.cn

Abstract

Objective

Medicinal plants have long been recognized as a rich source of essential oils and have been cultivated for a variety of uses since ancient times. White savory (*Satureja mutica* fisch & CA mey) is one of the medicinal plants belonging to the mint family with high content of carvacrol in its essential oil. A large body of literature has suggested that abiotic stresses, especially drought stress, could considerably boost the production of essential oils in plants. The aim of this study was to evaluate the effect of drought stress on the expression of genes affecting the biosynthesis of the main component of white savory essential oil carvacrol.

Materials and methods

For this goal, a number of 20 pot-planted seedlings of white savory at the 6-8 leaf stage were subjected in a greenhouse to two conditions of control and drought stress (10 pots for each condition) with irrigation regimes of 100% and 30% of field capacity, respectively. In order to

ensure the implementation of stress on plants and to determine the appropriate time for sampling, leaf proline and relative water content of plants were measured.

Results

The results of both proline and relative water content tests revealed a significant statistical difference between the control and stress conditions in white savory at 30% of field capacity. The KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database was used to obtain information on carvacrol biosynthesis pathway. The three key genes geranyl diphosphate synthase (gpps), terpene synthase (tps), and limonene hydroxylase (lh) were chosen for gene expression analysis. Due to the lack of genomic information on white savory, the sequence information of the genes in the closest genera within the family mint was used to design primers. The result of melting curve analysis from the real-time quantitative PCR (qPCR) assay confirmed the accuracy of the primer design. The raw qPCR data normalized to the housekeeping gene Actin, then differential expression analysis was performed using the delta delta Ct method. qPCR result showed that expression of the genes gpps, tps, and lh were increased in stressed plants proximately 20, 18, 50 times, compared to those in control, respectively.

Conclusions

The conclusion that must be drawn from the data available is that water stress leads to the process of plant response to stress and changes the expression of genes involved in the biosynthesis pathway of the active substance carvacrol.

Keywords: Secondary metabolite, Plant molecular response, Prolin, *Lamiaceae*, Real time-PCR.

Paper Type: Research Article

Citation: Davari Shalamzari F, NejadSadeghi L, Mehdikhanlou KH, Shu QY (2022). Expression analysis of the key genes involved in biosynthesis pathway of carvacrol in *Satureja mutica* fisch & CA mey under drought stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 14(3), 151-170.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (3), 151-170. DOI: 10.22103/jab.2022.19327.1396

Received: May 16, 2022.

Received in revised form: July 10, 2022.

Accepted: July 11, 2022.

Published online: August 10, 2022



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

© the authors

بررسی بیان ژن های کلیدی در مسیر بیوسنتز کارواکرول در گیاه مرزه سفید (*Satureja mutica fisch & CA mey*) تحت تنش خشکی

فاطمه داوری شلمزاری

دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه: f.davari1995@gmail.com

لیلا نژادصادقی

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir

خسرو مهدی خانلو

استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه: kh.mehdikhanloo@scu.ac.ir

کینگیان شو

آزمایشگاه مرکزی منابع گیاهی انجمن باغبانی، اکادمی علوم چین، پکن، چین. رایانامه: shuqy@ibcas.ac.cn

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۶ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۴/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۰

چکیده

هدف: از دیرباز تاکنون، گیاهان دارویی به عنوان منبعی غنی از اسانس ها شناخته شده و به جهت مصارف گوناگون کشت و توسعه یافته اند. مرزه سفید (*CA mey & Satureja mutica fisch*) یکی از گیاهان دارویی از خانواده نعناع است که اسانس آن حاوی مقدار زیادی کارواکرول است. حجم وسیعی از مطالعات نشان داده است که تنش های غیرزنده، به ویژه تنش خشکی، می تواند به طور قابل توجهی تولید اسانس در گیاهان را افزایش دهد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تنش خشکی بر بیان ژن های مؤثر بر بیوسنتز جزء اصلی اسانس مرزه سفید، کارواکرول، بود.

مواد و روش‌ها: برای این منظور، تعداد ۲۰ گیاهچه مرزه سفید در گلدان در مرحله ۸-۶ برگی در دو شرایط شاهد و تنش خشکی (۱۰ گلدان برای هر شرایط) با رژیم‌های آبیاری به‌ترتیب با ۱۰۰ درصد و ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور اطمینان از اعمال تنش بر روی گیاهان و همچنین تعیین زمان مناسب برای نمونه‌برداری، پرولین برگ و میزان آب نسبی گیاهان اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج هر دو آزمون پرولین و محتوای نسبی آب تفاوت آماری معنی‌داری را بین شرایط کنترل و تنش در مرزه سفید در ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه نشان داد. پایگاه داده (KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes برای به دست آوردن اطلاعات در مورد مسیر بیوسنتز کارواکرول استفاده شد. سه ژن کلیدی ژرانیل دی فسفات سنتاز (gpps)، تریپ سنتاز (tps)، و لیمونن هیدروکسیلاز (lh) برای تجزیه و تحلیل بیان ژن انتخاب شدند. به دلیل عدم وجود اطلاعات ژنومی در مرزه سفید، از اطلاعات توالی ژن‌ها در نزدیک‌ترین جنس در خانواده نعنای برای طراحی پرایمرها استفاده شد. نتیجه تجزیه و تحلیل منحنی ذوب در روش PCR کمی (qPCR) در زمان واقعی، صحت طراحی پرایمر را تایید کرد. نتایج qPCR نشان داد که بیان ژن‌های tps، gpps و lh در گیاهان تحت تنش به ترتیب ۲۰، ۱۸، ۵۰ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. داده‌های خام qPCR با ژن خانه دار اکتین (Actin) نرمال شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تنش آبی منجر به فرآیند پاسخ گیاه به تنش شده و بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز ماده فعال کارواکرول را تغییر می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: متابولیت‌های ثانویه، پاسخ مولکولی گیاهان، پرولین، نعنایان، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی
نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: داوری شلمزاری فاطمه، نژاد صادقی لیلا، مهدی خانلو خسرو، شو کینگ‌یان (۱۴۰۱) بررسی بیان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز کارواکرول در گیاه مرزه سفید (*Satureja mutica fisch & CA mey*) تحت تنش خشکی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۴(۳)، ۱۵۱-۱۷۰.



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

© the authors

مقدمه

خانواده نعنایان با بیش از ۷۰۰۰ گونه و بیش از ۲۳۰ جنس از متنوع‌ترین خانواده‌های گیاهی هستند (Zarshenas & Krenn 2015). این خانواده جز گیاهان دو لپه‌ای به شمار می‌رود و به علت وجود ساختارهای گرانولار که تولیدکننده اسانس فراوان هستند، جز گیاهان دارویی و آرایشی به حساب می‌آید (Usano-Aleman et al. 2014). جنس مرزه یک گونه گیاهی

شناخته شده است که از خانواده نعنایان و زیرخانواده Nepetoideae می‌باشد و به‌طور معمول در نواحی مدیترانه رویش دارد. به طور تقریبی ۱۵ گونه وحشی مرزه در مناطق مختلف ایران پراکنده شده است (Saharkhiz et al. 2016). گونه مرزه سفید، بوته‌ای و نسبتاً چوبی با ارتفاعی حدوداً ۴۵ سانتی‌متر است و دارای شاخه‌هایی با قدرت گل‌دهی بالا است. این گونه از نظر رشدی وضعیت خوبی داشته یعنی سرعت رشد بالایی دارد. مرزه سفید در برگ‌های خود نیز دارای کرک‌های کوتاه و خاکستری می‌باشد. این گیاه به‌طور طبیعی در ترکمنستان و عمدتاً شمال ایران در خاک‌های نسبتاً آهکی و در آب و هوای معتدل می‌روید (Hadian et al. 2012). مرزه سفید یک گونه بسیار معطر است که دارای ترکیبات فوتوشیمیایی مانند فنل‌ها، تیمول، کارواکرول و فلاونوئیدها است (Saei-Dehkordi et al. 2012). این گیاه بصورت سنتی در درمان سوءهاضمه، دردهای عضلانی و اسهال و حالت تهوع مصرف می‌شود (Karimi et al. 2016). در تحقیقات و پژوهش‌های گذشته مشخص گردید که مرزه سفید دارای دو مونوترپن کارواکرول و تیمول به عنوان اجزای اصلی ماده موثره خود است (Jamzad 2009). بر اساس اطلاعات بدست آمده از پایگاه اطلاعاتی KEGG سه ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز، ترین سنتاز و لیمون هیدروکسیلاز در مسیر بیوسنتزی کارواکرول در گیاه مرزه سفید دخیل هستند (شکل ۱). عموماً ترپنوئیدها و از جمله مونوترپن‌ها در گیاهان علاوه بر مسیر موالونات^۱ که منتهی به تولید ایزوپنتیل پیرو فسفات^۲ می‌شود از راه دیگری که مسیر غیرموالونات یا مسیر متیل اریتریتول فسفات^۳ نام‌گذاری می‌شود، ساخته می‌شوند (Dubey et al. 2003). مسیر MEP در پلاستیدها رخ می‌دهد و شامل هفت واکنش آنزیمی تأثیرگذار برای ساخت ایزوپنتیل دی فسفات^۴ و دی متیل آلیل دی فسفات^۵ از پیرووات^۶ و دی گلیسرآلدهید^۳-فسفات^۷ می‌باشد. واکنشی که توسط آنزیم ۱-دی اکسی دی زایلولز-۵-فسفات ردوکتوایزومراز^۸ کاتالیز می‌شود یک واکنش کلیدی است و دارای نقش بسیار مهم در کنترل بیوسنتز ایزوپرنوئیدها در پلاستیدها است (Carretero-Paulet et al. 2002). بیوسنتز ترپنوئیدها با اتصال سر به دم ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) به ایزومر دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) ادامه پیدا می‌کند که با این اتصال ژرانیل دی فسفات^۹ ساخته می‌شود. علاوه بر این، از اتصال GPP با واحدهای IPP، پرنیل دی فسفات‌های^{۱۰} بزرگتر مانند فارنسیل دی فسفات^{۱۱} و ژرانیل ژرانیل دی فسفات^{۱۲} تولید می‌شود (Dubey et al. 2003). محصول GPP و FPP طی فرآیندهای حلقوی شدن به ترتیب سازه‌های مونوترپن و سزکویی ترپنی را ایجاد می‌کنند. ایجاد تیمول و کارواکرول با مونوترپن گاماترپین^{۱۳} آغاز شده و در

¹ mevalonate

² Isopentenyl pyrophosphate (IPP)

³ 2-C-methyl-d-erythritol-4-phosphate

⁴ Isopentenyl diphosphate (IDP)

⁵ Dimethylallyl diphosphate (DMAPP)

⁶ Pyruvate

⁷ D-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP)

⁸ 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR)

⁹ Geranyl diphosphate (GPP)

¹⁰ Prenyl diphosphates

¹¹ Farnesyl diphosphate (FPP)

¹² Geranylgeranyl diphosphate (GGPP)

¹³ γ -terpinen (GT)

ادامه، سایر واکنش‌ها به سمت سنتز آن‌ها هدایت می‌شود (Poulose & Croteau 1978b). گام‌اترپین که با کمک آنزیم گام‌اترپین سنتاز^۱ ساخته می‌شود، پیش‌ماده مونوترپن‌های آروماتیک در م‌سیر بوده و بنابراین نقشی کلیدی را در این مسیر ایفا می‌کند (Poulose & Croteau 1978a). هر چند که این گونه در کشور ما به صورت خودرو مشاهده شده است، اما سطح زیرکشت این گیاه به علت مواد موثره آن رو به افزایش است. از آنجا که ایران در ناحیه خشک و نیمه‌خشک جهان قرار دارد با خشکسالی‌های طولانی سال‌های اخیر، کشت گیاهانی همچون مرزه سفید با چالش‌هایی مواجه بوده است. تنش خشکی به عنوان یکی از عوامل محدودکننده رشد و عملکرد گیاه در جهان شناخته می‌شود (Hassan & Al 2014). در تنش خشکی پتانسیل آبی نواحی اطراف ریشه منفی شده که در نتیجه باعث کمبود دسترسی ریشه به آب می‌شود. در این حالت رشد و نمو گیاه به‌طور کامل دستخوش تغییر قرار می‌گیرد (Chai et al. 2016). این وضعیت باعث تغییر در ویژگی‌های فیزیولوژیکی (بسته شدن روزنه‌ها) و تغییرات متابولیکی در گیاه می‌گردد (Khorasaninejad et al. 2011). از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر تنش خشکی می‌توان به لوله‌ای شدن برگ‌ها به منظور کاهش تبخیر آب، کرکی شدن سطح گیاه برای کاهش هدر رفت آب، ایجاد ریشه‌های عمیق به منظور جبران آب از لایه‌های زیرین خاک و غیره اشاره کرد. گیاه برای مواجهه با تنش خشکی اسمولیت‌هایی مانند گلاسیسین، پرولین، بتائین و ... که جز آمینواسیدهایی با وزن مولکولی پایین هستند، از خود ترشح می‌کند تا در مقابل تنش خشکی عملکرد قابل قبولی از خود ارائه دهد (Farooq et al. 2012). در گیاهان این مواد محلول دارای غلظت بالایی هستند که باعث کاهش پتانسیل اسمزی شده و به حرکت بهتر آب درون سلول کمک می‌کنند که این عمل باعث افزایش پتانسیل سلولی شده و گیاه را برای مقابله با تنش مقاوم می‌سازد (Haileselassie & Teferii 2012). متابولیت‌های ثانویه گیاهان نه تنها نقش دارویی برای انسان‌ها دارند بلکه دارای عملکرد دفاعی در برابر تنش‌ها نیز هستند (Yang et al. 2018). با وجود این که تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی تحت تاثیر عوامل ژنتیکی است اما عوامل محیطی همچون تنش نیز بر میزان تولید و کیفیت ماده موثره تولیدی تأثیر گذارند (Farzaneh et al. 2010). فاکتورهای گوناگونی در تعیین اندازه مقاومت گیاه نسبت به تنش آبی وجود دارد که از جمله آن‌ها ژنوتیپ گیاه و میزان بارندگی و وضعیت خاک و میزان و شدت تنش است (Rahaei et al. 2010). در گیاه، برخی متابولیت‌های ثانویه در شرایط تنش آبی به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا می‌کند. اما طبق مطالعات گذشته، این افزایش همیشگی نیست و در شرایط مختلف، گاهی برخی ترکیبات متابولیت‌های ثانویه در گیاه در تنش خشکی کاهش می‌یابند (Salehi Arjmand 2005). گیاهان به سه روش مختلف مانند تنظیم فشار اسمزی، تولید اسمولیت‌هایی مانند پرولین و همچنین انتقال مواد پرورده در مقابل تنش خشکی مقاومت می‌کنند. به منظور بررسی هر گونه تغییر در تولید اسانس در شرایط تنش، می‌توان بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی را در زمان واقعی مورد سنجش قرار داد یا این که می‌توان مقدار محصول

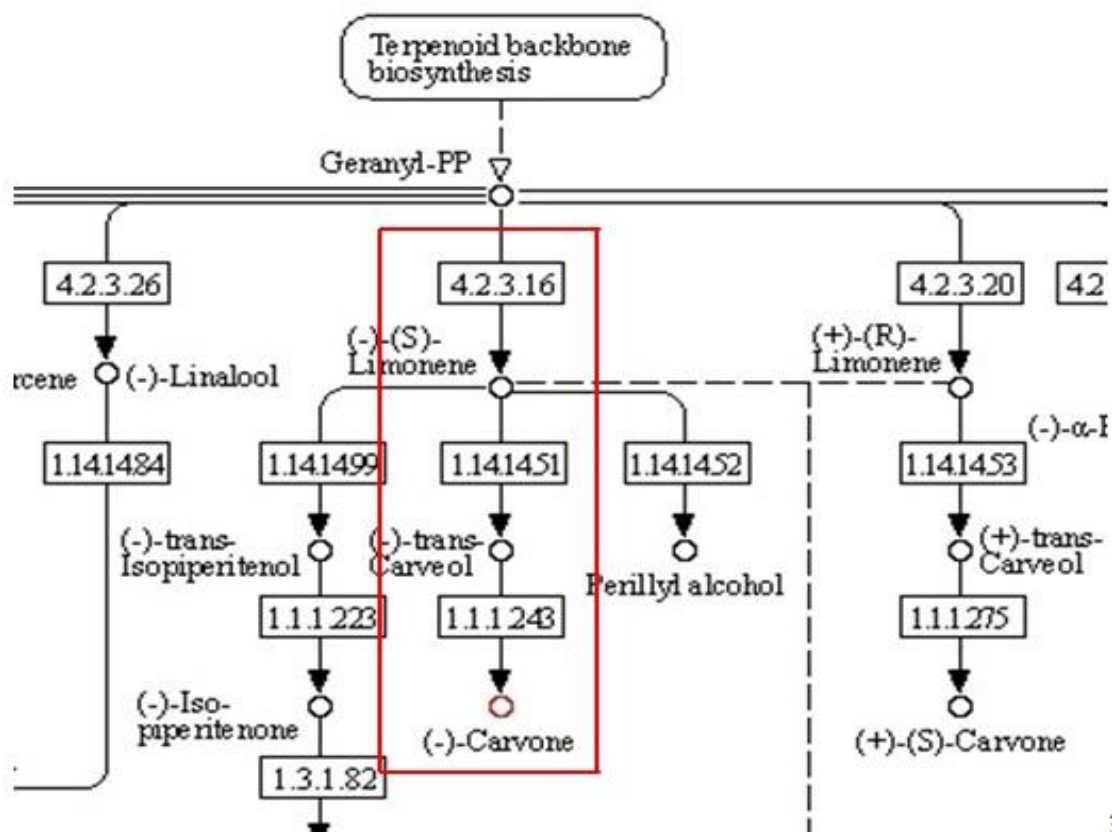
¹ γ -terpinen synthase (GTS)

نهایی را با روش‌های تجزیه شیمیایی مثل جی‌سی-مس^۱ اندازه‌گیری کرد. در این تحقیق اثر تنش بر میزان بیان ژن‌های متناظر در مسیر بیوسنتزی اسانس مرزه سفید بر اساس تغییر در میزان بیان ژن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت (Habibi et al. 2017).

طبق مطالعات انجام گرفته روی گیاه مرزه تابستانه در شرایط تنش خشکی، درصد اسانس *Satureja Hortensis* افزایش یافته است (Miranshahi & Sayyari 2016). در پژوهش دیگری که روی گیاه آویشن انجام شد، مشخص شد که میزان گاما ترپین که از ژن‌های اصلی در مسیر بیوسنتز کارواکرول می‌باشد، تحت تنش خشکی به میزان قابل توجه افزایش یافته است (Nemeth-Zambori et al. 2016). در پژوهشی دیگر که روی گیاه نعنا فلفلی تحت شرایط تنش خشکی صورت گرفت، مشخص شد که میزان بیان ژن لیمونن سنتاز در حالت ۷۵ درصد و ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه، افزایش چشمگیر و در حالت ۲۵ درصد ظرفیت زراعی، کاهش قابل توجهی داشته است (Rahimi et al. 2017a). تنش آبی هم‌چنین باعث افزایش معنادار سنتز هیستون داستیلاز، در دو گونه آویشن شد (Ashrafi et al. 2022). به علاوه، 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^۲ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به‌طور 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 (Arabpour et al. 2021). 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 (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Mohammadabadi et al. 2021). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد (Masoudzadeh et al. 2020). 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 (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Shahsavari et al. 2021). 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 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). با توجه به موارد اشاره شده، هدف از انجام این تحقیق مطالعه تأثیر تنش خشکی بر میزان بیان ژن‌های لیمونن هیدروکسیلاز و ترپن سنتاز و ژرانیل دی فسفات سنتاز در مسیر بیوسنتزی کارواکرول در شرایط تنش خشکی می‌باشد.

¹ GC-MS

² DNA



شکل ۱. مسیر بیوسنتزی کارواکرول (پایگاه اطلاعاتی KEGG)

Figure 1. Carvacrol biosynthesis pathway (KEGG)

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار: با هدف بررسی میزان بیان ژن‌های لیمون هیدروکسیلاز، ژرانیل دی فسفات سنتاز و ترپین

سنتاز گیاه مرزه سفید آزمایشی تحت شرایط کنترل شده به شیوه گلدانی در سال ۱۳۹۹ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. بذر گیاه مرزه سفید در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد درون گلدان‌های کوچک به صورت جداگانه مورد کشت قرار گرفت. خاک مورد استفاده طبق پژوهش‌های پیشین لومی-سنی بود. نور مستقیم خورشید به مدت ۱۰ ساعت در طول روز به بذور تابیده شد. از نور مستقیم لامپ (۱۰ هزار لوکس) به مدت ۱۰ ساعت در روز استفاده شد (Rahimi et al. 2017b).

گیاه مرزه سفید در مرحله گیاهچه‌ای دارای سرعت رشد کند بود بنابراین، پس از مهیاسازی گلدان‌ها، تا رسیدن به مرحله ۶-۸ برگی و رشد کافی بوته‌ها، به طور برابر آبیاری شدند. پس از استقرار گیاهچه‌ها، با هدف ایجاد تنش خشکی، ظرفیت زراعی خاک مورد بررسی با کمک دستگاه محفظه فشار^۱ در آزمایشگاه خاک‌شناسی گروه خاک‌شناسی دانشکده کشاورزی مشخص گردید که این عدد

¹ Pressure chamber

برابر با ۳۰ درصد بود. سپس بر اساس ظرفیت زراعی خاک، تنش خشکی با ۳۰ و ۱۰۰ (شاهد) درصد ظرفیت زراعی روی گلدان‌ها در مرحله ۸-۶ برگی گیاهچه‌ها اجرا شد (نیمی از گلدان‌ها (۱۰ عدد) تحت تنش کم‌آبی در حد ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه قرار گرفتند). مرحله نمونه‌برداری از گلدان‌های شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه) و گلدان‌های تحت تنش (۳۰ درصد ظرفیت مزرعه) به شیوه تصادفی صورت گرفت و نمونه‌ها در محفظه نیتروژن مایع منتقل و جهت نگهداری طولانی مدت در دمای ۸۰- ذخیره شدند. کیفیت اعمال تنش با اندازه‌گیری پرولین برگ و محتوی نسبی آب اندازه‌گیری شد. سنجش میزان پرولین با استفاده از روش (1973) Bates و همچنین محتوی نسبی آب با استفاده از روش (1998) Sanchez از طریق فرمول زیر اندازه‌گیری شد.

$$RWC = \frac{WF - Wd}{Wt - Wd} \times 100$$

WF = وزن تر برگ

Wt = وزن بافت آماس یافته گیاه

Wd = وزن خشک برگ

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از اندام برگ گیاهچه‌های تحت تیمار و شاهد در دو تکرار از بافت

تازه برگ طبق روش (Christo et al. 2014) با تغییرات کوچکی، انجام پذیرفت. برای سنجش کیفیت و کمیت RNA استخراجی از دو روش الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و نانودراپ استفاده شد. وضوح باندهای 18s rRNA و 28s rRNA نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA استخراج شده بود (شکل ۲). دو باند واضح در این تصویر نشان‌دهنده کیفیت RNA استخراج شده است. باند بالا مربوط به 28s و باند پایین مربوط به 18s است. قبل از سنتز cDNA نمونه‌ها با آنزیم DNase تیمار شدند تا از عدم وجود هر گونه آلودگی از نوع DNA اطمینان حاصل شود. ساخت cDNA طبق راهنمای کیت ساخت شرکت NEB^۱ صورت گرفت. که توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس PrimeScriptTM RTas و (Reverse Transcriptase) و پرایمر Oligo-dT در حجم ۱۰ میکرولیتر و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد.

طراحی آغازگر و انجام PCR: به دلیل عدم وجود اطلاعات ژنومی از گیاه مرزه سفید، اطلاعات توالی‌های نوکلئوتیدی

مربوط به ژن‌های ترپن سنتتاز، لیمونن هیدروکسیلاز و ژرانیل دی فسفات سنتاز در سایر گیاهان هم خانواده یعنی پونه^۲ و نعنا فلفلی^۳ که قبلاً شناسایی و در بانک داده‌های توالی‌های ژنی^۴ (NCBI) ثبت شده‌اند، جمع‌آوری و دسته‌بندی شدند. سپس طراحی پرایمر از بخش‌های حفاظت شده ژن‌های ترپن سنتتاز، لیمونن هیدروکسیلاز و ژرانیل دی فسفات سنتاز (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزار

¹ New England Biolabs

² Mentha logifolia

³ Mentha piperita

⁴ National Center of Biotechnology Information

AlleleID 7.5 که توانایی هم ردیف کردن همه توالی‌های هم خانواده هریک از ژن‌ها و تشخیص بخش‌های حفاظت شده^۱ را دارد، صورت گرفت. ژن بتا اکتین به عنوان ژن مرجع انتخاب گردید (جدول ۱).

واکنش‌های PCR در زمان واقعی: با هدف بررسی بیان ژن‌ها در مسیر سنتز کارواکرول در زمان تنش خشکی از واکنش

qRT-PCR بر روی دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR System (شرکت ABI) و با استفاده از مسترمیکس 2X Real-time PCR Master Mix (SBYR Green) استفاده گردید که با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه در ادامه ۳۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و سیکل نهایی و یک سیکل، ۷۲ سانتی‌گراد، مجموعاً برای ۱۱ و نیم دقیقه صورت گرفت (جدول ۲). واکنش Real Time PCR در حجم ۱۰ میکرو لیتر و در دو تکرار تکنیکی برای هر تکرار بیولوژیک، انجام شد. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده گردید و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد. آزمون معنی‌داری مقایسه بین دو گروه به وسیله نرم‌افزار R به کمک محاسبه P-value انجام گرفت و برای کنترل داخلی در نرمال سازی نتایج، ژن خانه‌دار که دارای بیان ثابت و پایداری بالاتریست، استفاده شد. پس از انجام واکنش منحنی ذوب برای هر کدام از ژن‌ها (شکل ۳) رسم و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب مربوط به آن ژن و هم‌چنین آنالیز ژل تأیید شد.

نتایج و بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که با بروز تنش خشکی میزان پرولین در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p < 0.001$) (جدول ۳). مولکول‌های پرولین شامل قسمت‌های آبدوست و آب‌گریز می‌باشند. پرولین محلول می‌تواند حلالیت پروتئین‌های مختلف را تحت تأثیر قرار داده و از غیرطبیعی شدن آلبومین جلوگیری کند. این ویژگی پرولین به این دلیل است که برهمکنش بین پرولین و سطح پروتئین آب‌گریز برقرار شده و به علت افزایش سطح مولکول‌های پروتئین آبدوست، پایداری پروتئین‌ها افزایش یافته و در نتیجه از تغییر ماهیت آن‌ها جلوگیری می‌شود. به علاوه پرولین آنزیم‌ها را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد یعنی باعث پایداری ساختار آن‌ها می‌شود پس گیاه به دلایل ذکر شده به منظور فعال کردن مسیر سیگنالینگ تحمل به تنش، میزان پرولین خود را افزایش می‌دهد (Baher et al. 2002). Rai et al. (2004) نشان دادند که تنش خشکی باعث افزایش محتوای پرولین برگ‌ها در *Ocimum tenuiflorum* L. می‌شود. افزایش پرولین تحت تنش خشکی در گیاهان علف لیمو، ذرت، ریحان و پروانش گزارش شده است (Abdalla & El-Khoshiban 2007; Baher et al. 2002). در این پژوهش برای اطمینان از ایجاد تنش در گیاه، علاوه بر اندازه گیری مقدار پرولین، مقدار محتوای نسبی آب برگ در سطح آبیاری (کنترل) و در

¹ Conserved sequences

سطح ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Sadeghian et al. 2015) و مشاهده شد که محتوای نسبی آب در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش ($p < 0.001$) نشان می‌دهد (جدول ۳). کمبود آب با افت محتوای رطوبت نسبی و پتانسیل آب برگ زمینه کاهش فتوسنتز در واحد سطح برگ را فراهم می‌آورد. کاهش محتوای آب در بافت‌های گیاهی تحت شرایط تنش کم‌آبی باعث محدود شدن رشد و برخی تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌گردد (Pirzad et al. 2011; Hassanpour et al. 2014).

جدول ۱. ویژگی پرایمرهای استفاده شده در مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز واقعی

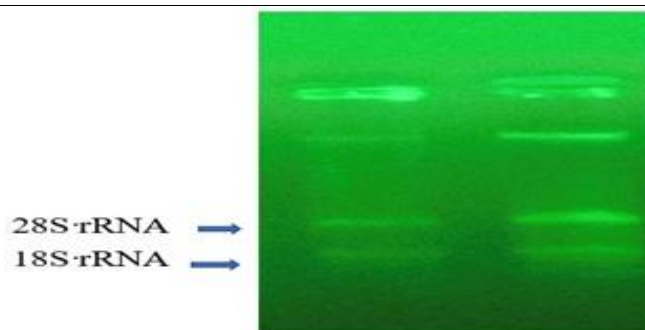
Table 1. Characteristics of the used primers in Real time PCR reaction

نام ژن	آغازگر رفت (۵-۳)	آغازگر برگشت (۳-۵)
Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
اکتین Actin	GATCTGGCACCACACCTTCT	TCTTCTCCCTGTTGGCCTTA
ژرانیل دی فسفات سنتاز Geranyl di phosphate synthase	ATCTCAGCCGTTCTTCTTCC	TTCAGGTATCTCTATGTCGG
لیمونن هیدروکسیلاز Limonene 6-hydroxylase	AAGAGCAAGCTGTGGAGGAT	AGGGTGGTGGTTGATGATGT
ترین سنتاز Terpene synthase	GAGGGAAGGCGAAAACACAC	TCCAGTAAGAGGGAGATCC

جدول ۲. چرخه دمایی استفاده شده در مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Table 2. Thermal cycling conditions used for PCR

مرحله Step	دما Temperature	زمان Time
واسرشت اولیه Initial Denaturation	95 سانتی‌گراد	2 دقیقه
واسرشت Denaturation	95 °c	30 ثانیه
اتصال Annealing	63 سانتی‌گراد	30 ثانیه
بسط Extension	72 سانتی‌گراد	1.5 دقیقه
بسط نهایی Final Extension	72 °c	10 دقیقه
	72 °c	10 minutes



شکل ۲. نمونه RNA استخراجی در الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد قبل از تیمار آنزیم DNase
Figure 2. RNA samples in 1 Percent agarose gel electrophoresis before DNase treatment

جدول ۳. نتایج آزمون T test محتوای نسبی آب و پرولین تحت شرایط کنترل و خشکی

Table 3. T test results for relative water content and proline under control and drought stress

مقدار t	میزان احتمال P-value	میزان پرولین	محتوای نسبی آب	Relative water content
t Stat		-36.76	41.61	
		2.18E-18	2.40E-19	

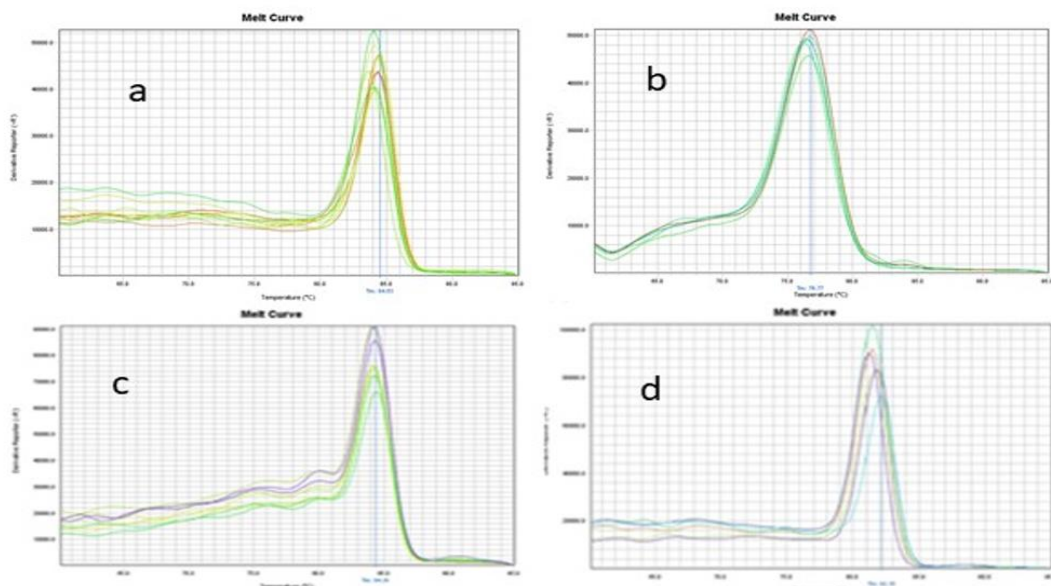
اثر تنش خشکی روی ژن‌های مورد مطالعه: قبل از بررسی تغییرات بیان ژن‌های مدنظر، با استفاده از منحنی ذوب^۱

میزان صحت پرایمرهای طراحی شده در تکثیر صحیح محصول مربوط به هر ژن، مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). نمودارها اختصاصیت و کم خطا بودن توالی‌هایی پرایمرهای طراحی شده را جهت تکثیر توالی‌های مدنظر نشان می‌دهد. نتایج حاصل از بلاست دمای پرایمرها که در پایگاه NCBI انجام گرفت با نتایج دمایی که در پایان واکنش از منحنی‌های ذوب به دست آمد کاملاً برابری داشت. مقایسه بیان ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل نشان داد که بیان ژن مذکور در شرایط تنش کم‌آبی ۲۰/۷۱ برابر افزایش معنی‌دار با $p < 0.001$ معادل 8.32×10^{-11} (جدول ۴) می‌یابد.

ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز به عنوان ژن اصلی در بیوسنتز ایزوپرنوئیدها شناخته می‌شود و در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و زیستی مانند تنش خشکی القا می‌شود (Bouvier et al. 2000). پژوهش‌های صورت گرفته در سال ۹۴ توسط الیاسی و همکاران روی گیاه سیاهدانه تحت تیمار سالیسیلیک اسید آشکار نمود که بیان ژن‌های ژرانیل دی فسفات سنتاز، مونوترپن سنتاز، بتا آمیرین سنتاز تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید در برگ‌های این گیاه به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابند (Elyasi et al. 2015). در تحقیق حاضر مشخص شد که تنش خشکی (۳۰ درصد ظرفیت مزرعه) بیان ژن لیمونن هیدروکسیلاز را نسبت به شرایط کنترل ۵۰/۱۶ برابر افزایش معنی‌دار با $p < 0.001$ (جدول ۴) می‌یابد. در مطالعه‌ای تأثیر تنش خشکی بر سطح بیان ژن لیمونن هیدروکسیلاز (Limh) در سطوح مختلف تنش خشکی (۷۵ و ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه) در مسیر بیوسنتز فنولی در گیاه نعنا فلفلی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد با افزایش میزان تنش خشکی سطح بیان این ژن افزایش می‌یابد (Rahimi et al. 2017a). در تحقیق دیگر اثر تیمارهای دمایی بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی کارواکرول در گیاه آویشن باغی بررسی شد. نتایج نشان داد که تحت تنش گرما و سرما، بیان ژن لیمونن هیدروکسیلاز در گیاه آویشن باغی به‌ترتیب کاهش و افزایش می‌یابد. اگرچه میزان افزایش بیان در شرایط گرما، بیش از تیمار سرما بود (Mohammadi et al. 2020). در تحقیق دیگری که روی گیاه *Mentha arvensis* L. صورت گرفت، شش ژن اصلی مسیر بیوسنتزی ماده موثره از قبیل ژرانیل دی فسفات سنتاز، لیمونن سنتاز، لیمونن ۳- هیدروکسیلاز، پولگن رداکتاز، منتوفوران سینتاز و متون رداکتاز تحت تیمار ژیرلیک

¹ Melt curve

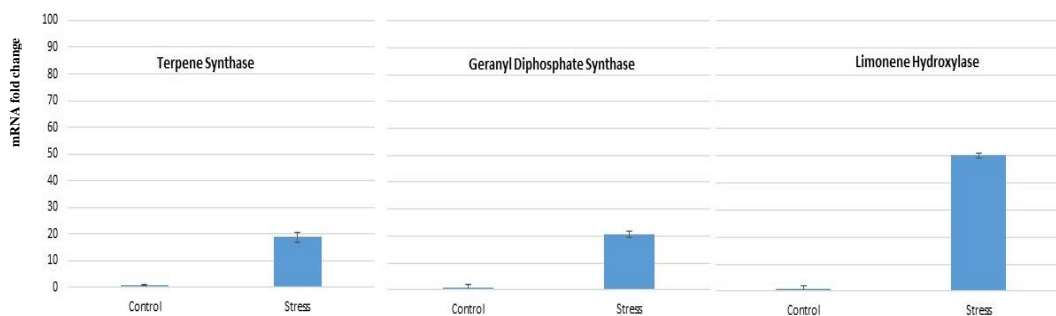
اسید و کالی ترپنون قرار گرفتند. نتایج تجزیه و تحلیل کمی و کیفی Real Time PCR نشان داد که سه ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز و لیمونن ۳- هیدروکسیلاز و لیمونن سنتاز که سه ژن اصلی در مراحل اولیه تولید ماده موثره در این گیاه هستند، تغییر قابل ملاحظه‌ای رخ نداده است (Bose et al. 2013). مقایسه بیان ژن ترپن سنتاز در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل نشان داد که بیان ژن مذکور در شرایط تنش خشکی ۱۸/۸۳ برابر افزایش معنی دار با $p < 0.001$ (جدول ۴) می‌یابد. در پژوهشی، نتایج بیان ژن ترپن سنتاز در گیاه آویشن باغی تحت تنش شوری نشان داد که این ژن در اثر تنش شوری کاهش معناداری در سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار نمک در بیان خود داشته است (Hosseini et al. 2016). ترپن سنتازها به‌عنوان ژن کلیدی در بیوسنتز مونوترپن‌ها هستند که دارای نقش‌های متفاوتی باشند. در پژوهش صورت گرفته مشخص شد که میزان ترپن سنتازها در شرایط تنش خشکی در گیاهانی مانند ارزن مرواریدی و درخت چای افزایش یافته است (Karunanithi et al. 2020; Zhou et al. 2020).



شکل ۳. منحنی ذوب (آ) ترپن سنتاز (ب) لیمونن هیدروکسیلاز (پ) ژرانیل دی فسفات سنتاز (د) بتا‌کتین
 Figure 3. The melt curve of a) terpene synthase, b) limonene hydroxylase, c) geranyl diphosphate synthase, d) Beta actin

جدول ۴. نتایج آزمون Ttest (آ) ترپن سنتاز (ب) لیمونن هیدروکسیلاز (ج) ژرانیل دی فسفات سنتاز
 Table 4. T test results for the studied genes terpene synthase (tps), limonene hydroxylase (lh), geranyl diphosphate synthase(gpps)

ژن	ژرانیل دی فسفات سنتاز gpps	ترپن سنتاز tps	لیمونن هیدروکسیلاز lh
مقدار t Stat	8.88018	13.58934	5.57115
میزان احتمال P-value	8.32E-11	3.61E-16	2.21E-06



شکل ۴. اثر تنش خشکی بر روی بیان ژن‌های (آ)ژرانیل دی فسفات سنتاز (ب) ترپین سنتاز (پ) لیمونن هیدروکسیلاز/ محور y نشان دهنده میزان تغییر در بیان هر ژن در هر تیمار می‌باشد. نوارهای خطا نشان دهنده خطای معیار (SE) هستند

Figure 4. The effect of drought stress on the expression levels of geranyl diphosphate synthase (a), terpene synthase (b), limonene hydroxylase (c). Y-axis shows fold change of gene expression. Error bars represent standard error (SE)

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان انباشت پرولین در شرایط تنش کم‌آبی افزایش یافته که نوعی سازگاری گیاه مرزه سفید به شرایط تنش محسوب می‌شود. عمده‌ترین راهکار تحمل به تنش در گیاهان تولید یک سری اصلاح آلی سازگار می‌باشد. این اصلاح با وزن مولکولی کم، ترکیبات بسیار مهمی هستند که حتی در غلظت‌های بالای سیتوزولی هم برای گیاهان غیر سمی هستند. در شرایط تنش کم‌آبی و در نتیجه تجمع مواد محلول، پتانسیل اسمزی سلول‌ها کاهش می‌یابد که این حالت آب را به داخل سلول جذب و به حفظ حالت تورژسانس کمک می‌کند. با تدبیر تعدیل اسمزی، فعالیت‌های سیتوپلاسمی و اندامک‌ها، به گیاه کمک می‌کند تا به صورت کارآمدتری بتواند دوره رشد، فتوسنتز و تسهیم اسمولیت‌ها را در طول حیات گیاه به انجام برساند افزایش غلظت و محتوای پرولین تحت شرایط تنش کم‌آبی ممکن است نشان‌دهنده نقش احتمالی این اسید آمینه در تنظیم اسمزی در گیاه مرزه سفید باشد. هم‌چنین مرزه سفید مانند بیشتر گیاهان در سطح بیان ژن به تنش کم‌آبی واکنش نشان می‌دهد، میزان بیان ژن‌ها با تغییر شرایط محیطی، تغییر می‌کند فرآیندهایی که منجر به افزایش تحمل نسبت به تنش و در نهایت سازگاری گیاه می‌شوند، به وسیله چندین مسیر پیام‌رسان تنظیم می‌شوند. نتیجه فعال شدن این مسیرها تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تنش است، که می‌تواند شامل فعال شدن و یا غیرفعال شدن آن‌ها باشد. از طرف دیگر تنظیم بیان ژن، به وسیله مکانیسم‌های مولکولی مختلفی اعمال می‌شود، پس می‌توان نتیجه گرفت که تنظیم در سطح رونویسی سهم عمده‌ای در تنظیم بیان ژن‌های مورد بررسی دارد. به نظر می‌رسد افزایش بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز کارواکرول تحت شرایط خشکی، از عواملی است که در زمینه افزایش اسانس این گیاه بسیار حائز اهمیت می‌باشد و در ضمن کارواکرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت از گیاه در برابر صدمات ناشی از تنش‌ها محافظت می‌کند (Peltzer et al. 2007). شناخت واکنش‌های متفاوت گیاهان دارویی به کمبود آب از اهمیت خاصی برخوردار است. و این نکته در مهندسی متابولیک بسیار مفید خواهد

بود زیرا می‌توان از طریق افزایش بیان این ژن‌ها راهکاری مناسب برای افزایش ماده مؤثره پیدا کرد. شاید بتوان در شرایط مدیریتی در مقطعی از رشد گیاه از این راهبرد برای افزایش ماده مؤثره استفاده کرد.

نتیجه‌گیری: تیمار خشکی به افزایش سطح بیان ژن‌های مسیر بیوستنتزی کارواکرول در گیاه مرزه سفید منجر می‌شود و به تبع آن احتمالاً افزایش میزان ماده مؤثره کارواکرول در سلول را خواهیم داشت البته لازم است در مطالعات آینده میزان ترکیبات تولیدی توسط این ژن‌ها نیز اندازه‌گیری شود و ارتباط آن‌ها با میزان بیان ژن‌ها مطالعه شود. این موضوع سبب می‌شود با اطمینان بیشتری ژن‌های کلیدی جهت دستکاری‌های ژنتیکی به منظور تولید وارته‌های مرزه سفید که دارای میزان بالاتری از ترکیبات با ارزش هستند، شناسایی شوند.

سپا سگزاری: این پژوهش توسط دانشگاه شهید چمران اهواز مورد حمایت مالی (شماره پژوهانه: SCU.AA99.37199) قرار گرفته است.

منابع

- الیاسی ریزان، مجدی محمد، بهرام‌نژاد بهمن، میرزا قادری قادر. (۱۳۹۴). بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنتزی مونوترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها تحت تأثیر تیمار اسیدسالیسیلیک در گیاه دارویی سیاه‌دانه. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۳(۲)، ۱۷۴-۱۶۴.
- حبیبی شکوفه، قادری اردشیر، فاتحی فواد (۱۳۹۶). بررسی بیان نسبی ژن‌های کلیدی مسیر بیوستنتزی تیمول تحت تنش سرمایی در گیاه آویشن باغی رقم 'واریکو ۳' (*Thymus vulgaris cv. Varico 3'*) با استفاده از PCR در زمان واقعی. فصلنامه گیاهان دارویی، ۴(۱۱)، ۵۸-۵۰.
- حسینی حسیه، موسوی فرد صادق، فاتحی فواد، قادری اردشیر (۱۳۹۵). تغییرات فیتوشیمیایی و صفات مرفو- فیزیولوژیکی گیاه دارویی آویشن باغی (*Thymus vulgaris cv. Varico 3'*) تحت تنش شوری. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۶(۶۱)، ۳۳-۲۲.
- رهایی مهدی، نقوی محمدرضا، علیزاده هوش‌نگ، و همکاران (۱۳۸۹). بررسی الگوی بیان ژن‌های MYB در گندم (*Triticum aestivum L.*) تحت دو تنش کوتاه‌مدت شوری و سرما با استفاده از راهکار RT-PCR کمی. علوم گیاهان زراعی ایران، ۴۱(۳)، ۳۴۶-۴۳۳.
- صالحی ارجمند حسین (۱۳۸۴). تأثیر تنش‌های محیطی در افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان. همایش ملی توسعه پایدار گیاهان دارویی. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، کرج، ص. ۳۰۷-۳۰۵.

فرزانه اکرم، غنی عسکر، عزیزی مجید (۱۳۹۱) تأثیر تنش آبی بر ویژگی‌های ظاهری، عملکرد و درصد اسانس در گیاه ریحان (رقم کشکنی لو لو) (keshkeni luvelou). پژوهش‌های تولید گیاهی، ۱۷(۱)، ۱۱۱-۱۰۳.

محمدی ولی‌اله، مندک بهنام، هادیان جواد، زینالی خانقاه حسن (۱۳۹۹). اثر دما بر متابولیت‌ها و بیان برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول در آویشن باغی (*Thymus vulgaris*). علوم گیاهان زراعی ایران، ۵۱(۱)، ۲۰۵-۱۹۵.
محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی رایینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.

محمدآبادی محمدرضا، سفلی، محمد (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافتهای مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

References

- Abdalla MM, El-Khoshiban NH (2007) The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticum aestivum* cultivars. *J Appl Sci Res* 3(12), 2062-2074.
- Ashrafi M, Azimi-Moqadam MR, MohseniFard E et al. (2022). Physiological and molecular aspects of two thymus species differently sensitive to drought stress. *BioTech* 11(8), 1-11.
- Baher ZF, Mirza M, Ghorbanli M, Bagher Rezaii M (2002). The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour Fragr J* 17(4), 275-277.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of proline for water stress studies. *Plant Soil* 39, 205-208.
- Bose SK, Yadav RK, Mishra S et al. (2013) Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. *Plant Physiol Biochem* 66, 150-158.
- Bouvier F, Suire C, d'Harlingue A et al. (2000) Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *Plant J* 24(2), 241-252.
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N et al. (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 Physiol* 129(4), 1581-1591.

- Chai Q, Gan Y, Zhao C et al. (2016) Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress: A review. *Agron Sustain Dev* 36, 1-21.
- Dubey VS, Bhalla R, Luthra R (2003) An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J Biosci* 28, 637-646.
- Elyasi R, Majdi M, Bahramnejad B, Mirzaghaderi GH (2015) Expression pattern analysis of genes involved in the biosynthetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with salicylic acid. *Iran J Rangeland Forest Plant Breed Genet Res* 23(2), 164-174. (In Persian)
- Farooq M, Hussain M, Wahid A, Siddique KHM (2012). Drought Stress in Plants: An Overview. In: Aroca, R. (eds) *Plant Responses to Drought Stress*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Farzaneh A, Ghani A, Azizi M (2010) The effect of water stress on morphological characteristic and essential oil content of improved sweet basil (*Ocimum basilicum* L). *J Plant Production* 17(1), 103-111. (In Persian)
- Habibi Sh, Qaderi A, Fatehi F (2017) The study of relative expression of key genes of thymol biosynthesis pathway in thymus vulgaris cv. 'Varico 3' under cold stress using real-time PCR. *J Med Plants* 4(11), 50-58. (In Persian)
- Hadian J, Akramian M, Heydari H et al. (2012) Composition and in vitro antibacterial activity of essential oils from four Satureja species growing in Iran. *Nat Prod Res* 26(2), 98-108.
- Haileselasie TH, Teferii G (2012) The effect of salinity stress on germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.) land race of Tigray. *Curr Res J Biol Sci* 4, 578-583.
- Hassan FA, Ali EF (2014) Impact of different water regimes based on class-A pan on growth, yield and oil content of *Coriandrum sativum* L. plant. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 13, 155-161.
- Hassanpour S, Heppler GR. (2014). Step-by-step simplification of the micropolar elasticity theory to the couple-stress and classical elasticity theories. *Proceedings of the ASME 2014 International Mechanical Engineering Congress and Exposition IMECE2014*. November 14-20, 2014, Montreal, Quebec, Canada.
- Hosseini H, Mousavi-Fard S, Fatehi F, Qaderi A. (2017) Changes in phytochemical and morpho-physiological traits of thyme (*Thymus vulgaris* CV Varico 3) under different salinity levels. *J Med Plants* 16(61), 22-33. (In Persian)
- Jamzad Z (2009) *Thymus and Satureja species of Iran*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. (In Persian)
- Karimi E, Ghasemnezhad A, Hadian J, Ghorbanpour M (2016) Assessment of essential oil constituents and main agro-morphological variability in *Satureja mutica* populations. *Braz J Bot* 39, 77-85.

- Karunanithi PS, Berrios DI, Wang S et al. (2020) The foxtail millet (*Setaria italica*) terpene synthase gene family. *Plant J* 103(2), 781-800.
- 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 Plants Res* 5(22), 5360-5365.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Miranshahi B, Sayyari M (2016) Methyl jasmonate mitigates drought stress injuries and affects essential oil of summer savory. *J Agr Sci Tech* 18(6), 1635-1645.
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7(12), e08542.
- Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. *Agricultural Biotechnology Journal* 12(3), 191-208. (In Persian)
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal* 12(1), 177-192. (In Persian)
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10(3), 111-122 (In Persian)
- 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.
- Mohammadi V, Mondak B, Hadian J, Zeinali Khanghah H (2020) The impact of temperature on metabolites and the expression of genes involved in thymol and carvacrol biosynthesis pathway in *Thymus vulgaris*. *Iran J Field Crop Sci* 51(1), 195-205. (In Persian)
- Nemeth-Zambori E, Szabo K, Pluhar Z et al. (2016) Changes in biomass and essential oil profile of four Lamiaceae species due to different soil water levels. *Journal of Essential Oil Research* 28(5), 1-9.
- Peltzer M, Wagner JR, Jimenez A (2007) Thermal characterization of uhmwpe stabilized with natural antioxidants. *J Therm Anal Calorim* 87, 493-497.
- Pirzad A, Shakiba MR, Zehtab-Salmasi S, et al. (2011) Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *J Med Plant Res* 5(12), 2483-2488.
- Poulose AJ, Croteau R (1978a) Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Arch Biochem Biophys* 187(2), 307-314.

- Poulouse AJ, Croteau R (1978b) γ -Terpinene synthetase: A key enzyme in the biosynthesis of aromatic monoterpenes. Arch Biochem Biophys 191, 400-411.
- Rahaei M, Naghavi M, Alizadeh H et al. (2010) The gene expression analysis of MYB transcription factors in wheat (*Triticum aestivum* L.) during short term salinity and cold stresses through quantitative RT-PCR. Iran J Field Crop Sci 41(3), 433-346. (In Persian)
- Rahimi Y, Taleei A, Ranjbar M (2017a) 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, 1-9.
- Rahimi Y, Taleei A, Ranjbar M (2017b) Investigation of lim, medh gene expression level and morpho-physiological changes of *Mentha piperiat* L. in response to drought. Iran J Field Crop Sci 48(2), 507-516.
- Rai V, Vajpayee P, Singh SN, Mehrotra S (2004) Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. Plant Science 167(5), 1159-1169.
- Saei-Dehkordi S, Fallah AA, Heidari-Nasirabadi M, Moradi M (2012) Chemical composition, antioxidative capacity and interactive antimicrobial potency of Satureja khuzestanica Jamzad essential oil and antimicrobial agents against selected food-related microorganisms. Int J Food Sci Technol 47(8), 1579-1585.
- Saharkhiz MJ, Zomorodian K, Taban A et al. (2016) Chemical composition and antimicrobial activities of three Satureja Species against food-borne pathogens. J Essential Oil Bearing Plants 19, 1984-1992.
- Salehi Arjomand H (2005) The effect of environmental stresses on the increase of secondary metabolites in plants. National Conference on Sustainable Development of Medicinal Plants. Publications of Forests and Rangelands Research Institute, Karaj, p. 307-305. (In Persian)
- Sanchez SR (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. Field Crops Res 59, 225-235.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. Anim Biotechnol 33, 1-11.
- Usano-Aleman J, Pala-Paul J, Herraiz-Penalver D (2014) Temperature stress causes different profiles of volatile compounds in two chemotypes of *Salvia lavandulifolia* Vahl. Biochem Syst Ecol 54, 166-171.
- Yang WC, Bao HY, Liu YY et al. (2018) Depsidone derivatives and a cyclopeptide produced by marine fungus *Aspergillus unguis* under chemical induction and by its plasma induced mutant. Molecules 23(9), 2245.

Zarshenas MM, Krenn L (2015) A critical overview on *Thymus daenensis* Celak. phytochemical and pharmacological investigations. *J Integr Med* 13(2), 91-98.

Zhou HC, Shamala LF, Yi XK et al. (2020) Analysis of terpene synthase family genes in *Camellia sinensis* with an emphasis on abiotic stress conditions. *Sci Rep* 10, 933.