بررسی بیان نسبی ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی تیمول تحت تنش سرمایی در گیاه آویشن باغی رقم 'واریکو۳' (*Thymus vulgaris* cv. '*Varico 3*') با استفاده از PCR در زمان واقعی

شکوفه حبیبی[۱]، اردشیر قادری[۲]، فواد فاتحی[۳]*

۱- کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران
۲- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
۳- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران
* آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه پیام‌نور، گروه کشاورزی
تلفن: ۰۹۱۸۸۷۲۴۷۵۸
پست الکترونیک: Fatehi.foad@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۴/۷

چکیده

مقدمه: آویشن باغی با نام علمی ***Thymus vulgaris* L.**، گیاه دارویی ارزشمندی است که حاوی متابولیت‌های دارویی مهمی از جمله تیمول و کارواکرول می‌باشد.

هدف: این تحقیق جهت بررسی تأثیر تنش سرمایی بر بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول شامل **DXR**، **HMGR** و **TPS1** در گیاه آویشن باغی انجام شد.

روش بررسی: تأثیر تنش دمای پایین بر بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول شامل **DXR**، **HMGR** و **TPS1** در زمان‌های صفر، ۳، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش با استفاده از روش **RT-PCR** مورد ارزیابی قرار گرفت. این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که تنش سرمایی بر بیان ژن‌های مورد مطالعه اثر معنی‌داری داشته است. بیشترین میزان بیان در ژن **HMGR** در بازه زمانی سه ساعت پس از اعمال تنش (۱/۵۷ برابر نسبت به شاهد) مشاهده شد. بیان نسبی ژن‌های **TPS1** و **DXR** در بازه‌های متفاوت زمانی تنش سرمایی کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: به طور کلی بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول شامل **DXR**، **HMGR** و **TPS1** در اثر تنش سرمایی به طور معنی‌داری تغییر یافته است.

گل‌واژگان: آویشن باغی، بیان ژن، تنش سرمایی، تیمول

مقدمه

آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.)، گیاهی دیپلوئید (۲n= ۳۰) از تیره نعناعیان (Lamiaceae) است [۱] که دارای ترکیبات فیتوشیمیایی ارزشمندی از جمله تیمول و کارواکرول با خواص ضدقارچی، ضدباکتریایی و ... می‌باشد [۴- ۲]. رقم زراعی واریکو ۳' ('Varico 3') از گیاه آویشن باغی توسط کارلن و همکاران (۲۰۰۹) به منظور بهینه کردن کیفیت و عملکرد محصول آویشن باغی در یک برنامه اصلاحی معرفی شد که از نظر عملکرد ماده خشک، اسانس، مقاومت به سرما ارزیابی دارای ویژگی‌های برتری بود [۵]. سرما به عنوان یکی از تنش‌های محیطی است که بر متابولیسم و ویژگی‌های رشدی گیاهان تأثیر بسزایی دارد. گیاهان از مکانیسم‌های متعدد فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی جهت پاسخ و سازگاری به سرما استفاده می‌کنند [۶]. برای تولید ترپن‌ها در گیاهان دو مسیر سیتوزولی (مسیر موالونات) و پلاستیدی (مسیر ۲- سی- متیل- اریتریتول-۴- فسفات) وجود دارد. در مسیر بیوشیمیایی موالونات، سزکوئی‌ترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها و پلی‌ترپن‌ها و در مسیر بیوسنتزی پلاستیدی مونوترپن‌ها، دی‌ترپن‌ها و تتراترپن‌ها تولید می‌شوند [۷،۸]. در مسیر ۲- سی متیل - اریتریتول ۴- فسفات (MEP) ابتدا پیروات (Pyruvate) و دی گلیسرآلدهید ۳- فسفات (G3P) با یکدیگر ترکیب شده و دی اکسی زایلو ۵- فسفات (DXP) را تولید می‌کنند که این ماده توسط آنزیم ۱- دی‌اکسی دی زایلوز ۵- فسفات ردوکتوایزومراز (DXR) به ۲- سی متیل اریتریتول ۴- فسفات (MEP) تبدیل می‌شود [۹]. در این مسیر ژن DXR به عنوان یک نقطه کنترلی مهم عمل می‌کند، زیرا فعالیت این آنزیم اولین مرحله اصلی و متمایزکننده مسیر MEP از مسیر موالونات می‌باشد. در پایان این مسیر بیوسنتزی، ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) و دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) به وجود می‌آیند، این دو ماده قابلیت تبدیل به یکدیگر را دارند. در ادامه با ترکیب شدن این دو ماده و تحت تأثیر ژرانیل دی فسفات سنتاز (GPPS)، ژرانیل دی فسفات (GPP) پیش‌ماده ساخت مونوترپن‌ها تولید می‌شود. این ماده تحت تاثیر آنزیم‌های مونوترپن سنتازها به مونوترپن‌های مختلف تبدیل می‌شود [۱۰]. HMGR که آنزیمی به شدت حفاظت شده در یوکاریوت‌ها است، در سنتز حد واسطهای ترپنوئیدی دارای اهمیت است. در مسیر موالونات سه واحد استیل کوآنزیم آ به منظور تشکیل ۳- هیدروکسی ۳- متیل – گلوتاریل کوآنزیم آ (HMG-COA) با هم ترکیب می‌شوند که در نهایت به موالونات تبدیل می‌شود. احیای HMG-COA به موالونات بوسیله آنزیم HMG-COA ردوکتاز (TvHMGR) انجام می‌شود [۱۱].

در این تحقیق، الگوی بیان ژن کلیدی مسیر MVA یعنی *HMGR* و دو ژن کلیدی مسیر MEP یعنی *DXR* و *TPS1* تحت تنش سرمایی در مرحله رویشی گیاهچه‌های آویشن باغی رقم واریکو۳ انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ابتدا بذرهای آویشن باغی رقم واریکو ۳ برای جوانه‌زنی در محیط کشت MS کشت شدند و گیاهچه‌های حاصل به گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پیت موس استریل (۳:۱) منتقل شدند. گیاهچه‌ها جهت سازگاری به اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۵۰۰۰ لوکس انتقال داده شدند. جهت اعمال تیمار سرما، گیاهچه‌ها به سردخانه با دمای چهار درجه سانتی‌گراد منتقل شدند سپس نمونه‌برداری از گیاهچه‌ها در زمان‌های صفر، ۳، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش سرمایی انجام شد. بسته‌های آلومینیومی حاوی گیاهچه‌های آویشن در ازت مایع منجمد و سپس تا زمان استخراج RNA کل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج RNA کل، بافت گیاهی از روش مبتنی بر ترایزول و رسوب الکلی (روش بهبود یافته پروتکل) چومسینسکی و ساچی استفاده شد [۱۲]. برای حذف آلودگی احتمالی DNA موجود در نمونه‌ها از آنزیم DNase I استفاده شد. در این روش مقدار ۳ میکروگرم نمونه RNA با ۱/۵ میکرولیتر آنزیم DNase I (Fermentase, USA) و ۱/۵ میکرولیتر بافر مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (جدول شماره ۱).

سپس 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. برای غلظت سنجی RNA کل، نمونه‌ها توسط دستگاه Nanodrop مورد سنجش قرار گرفتند. برای تبدیل RNA کل به DNA مکمل یا cDNA از روش استفاده همزمان OligodT و آغازگرهای تصادفی در حضور آنزیم Reverse Transcriptase و با به کار بردن مقدار ۱ میکروگرم RNA به عنوان الگو برای انجام واکنش استفاده شد.

واکنش Real Time PCR: مراحل آماده سازی واکنش PCR در زیر هود مطابق جدول شماره ۱ انجام و حجم نهایی واکنش ۱۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

واکنش RT PCR با استفاده از دستگاه StepOne Real Time PCR (ABI, USA) انجام شد. برای یافتن دمای بهینه اتصال آغازگرها از روش Gradient PCR استفاده گردید. همچنین صحت و درستی cDNA سنتز شده با استفاده از PCR ژن کنترل در همه نمونه‌های مورد مطالعه انجام گرفت. لیست آغازگرهای استفاده شده برای Real time PCR در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

عصاره‌گیری: ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول به ۱۰ گرم برگ فریز شده اضافه و سپس به مدت ۲ ساعت در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و تاریکی قرار داده شد. عصاره صاف شده با روتاری در دمای زیر ۵۰ درجه تغلیظ و سپس توزین شد. عصاره حاصل تا زمان مصرف در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. با استفاده از متانول غلظت عصاره به ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رسانده شد. از دستگاه PLATIN blue به همراه پمپ L7100 مجهز به آشکارساز آرایه فوتونی (Photodiode Array Detector) جهت تعیین غلظت تیمول و کارواکرول به شرح ذیل استفاده شد. خوانش در طول موج ۲۷۴ نانومتر انجام شد و ستون مورد استفاده Nucleodur 100-5, C18 ساخت شرکت MACHEREY-NAGEL کشور آلمان با طول ۲۵۰ میلی‌متری و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر بود. فاز متحرک، شامل فاز A (آب ۴۵ درصد) و فاز B (استونیتریل) به صورت ایزوکراتیک و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود.

تحلیل آماری: برای آنالیز داده‌های حاصل از بیان ژن از مدل دلتا Ct (ΔΔCt) تصحیح شده با بازدهی تکثیر [۱۳] و آزمون Ttest استفاده شد، همچنین برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

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

ماده شیمیایی	مقدار استفاده شده	غلظت نهایی
cDNA	۲ میکرولیتر	۵۰ نانوگرم در میکرولیتر
SYBR premix 5x	۳ میکرولیتر	۱X
Primer F	۰/۸ میکرولیتر	۰/۵ میکرومول
Primer R	۰/۸ میکرولیتر	۰/۵ میکرومول
ddH2O	تا حجم ۱۵ میکرولیتر	-

جدول شماره ۲- تجزیه واریانس مقادیر تیمول و کارواکرول در بازه‌های زمانی پس از اعمال تنش سرمایی

منابع تغییرات	کارواکرول	تیمول
تیمار	۰/۰۴**	۳/۰۳۶**
خطا	۰/۰۰۴	۰/۰۰۶
ضریب تغییرات	۱۶/۹۲۷	۲/۲۸

جدول شماره ۳- اطلاعات مربوط به آغازگرهای هر ژن جهت واکنش Real Time PCR

Primer name	Sequence (5' - 3')	Tm	Amplicon size (bp)
DXr-F	TATGACTTCGAGGCCCTTGTTAAAGAG	62	195
DXr-R	TGTATCCAAGGCTTGCCAGAAGG	62	
HMGR-F	CCCTCTCTACCTCACCAACGGAGTC	63	179
HMGR-R	CGAAGAAGCCGAGGAGATAGATGAAGG	63	
TPS1-F	GAGGGAAGGCGAAAACACAC	56	140
TPS1-R	TCCAGTGAAGAGGGAGATCC	55	
18s-F	ATGTTTAGAAGGGTGAGTGAGCAGTTTAC	59	191
18s-R	GCCTCATCATCATACTCTTCCTCATCATC	60	

نتایج

میزان تیمول و کارواکرول

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر بازه‌های زمانی مختلف بر مقادیر تیمول و کارواکرول در گیاه آویشن باغی رقم واریکو ۳ در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار می‌باشد (جدول شماره ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد (شکل شماره ۱) که قرارگیری نمونه‌ها به مدت سه ساعت در شرایط تنش سرمایی، سبب افزایش میزان کارواکرول در نمونه‌ها شده‌است که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر زمان‌های مورد بررسی به جز ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش داشت.

همچنین مقایسه میانگین تیمول (شکل شماره ۲) نشان داد که قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تنش سرمایی سبب افزایش محتوی تیمول نسبت به سایر زمان‌های مورد بررسی شد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با سایر زمان‌های مورد بررسی داشت.

نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن HMGR در شرایط تنش صفر، ۳، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که بیشترین بیان این ژن در شرایط تنش به مدت سه ساعت (۱/۵۷) و کمترین میزان بیان در بازه زمانی ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل شماره ۳).

نتایج بیان نسبی ژن DXR نشان داد که بیان این ژن در بازه سه ساعت تغییر معنی‌داری نشان نداده است و تنش سرمایی در بازه ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن DXR نسبت به شاهد شده است (شکل شماره ۴).

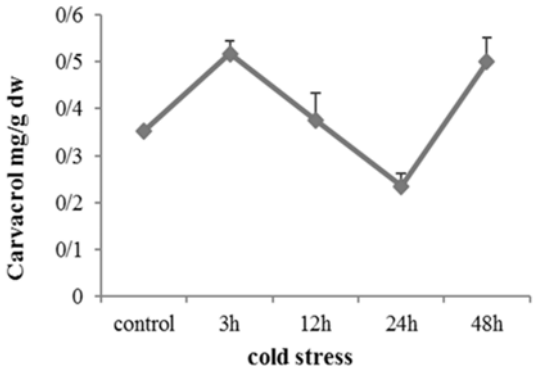
نتایج بیان ژن TPS1 نشان داد که بیان این ژن در تمام بازه‌های زمانی نسبت به شاهد به طور قابل توجه و معنی‌داری کاهش یافته است (شکل شماره ۵).

مقایسه میانگین‌ها (شکل شماره ۴) نشان داد که قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تنش سرمایی سبب افزایش محتوی تیمول در نمونه‌ها نسبت به سایر زمان‌های مورد بررسی می‌شود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با محتوی تیمول در نمونه‌ها در سایر زمان‌های مورد بررسی داشت.

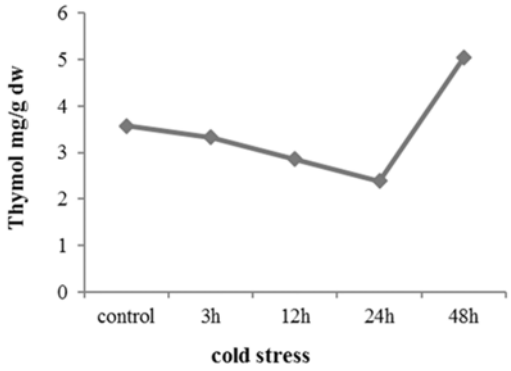
نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن HMGR در شرایط تنش سه، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که بیان این ژن در شرایط تنش سه به بیشترین میزان (۱/۵۷) و کمترین میزان در بازه زمانی ۴۸ ساعت مشاهده شد.

نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن DXR در شرایط تنش سه، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که بیان این ژن در بازه سه ساعت تغییر معنی‌داری نشان نداده است و دمای چهار درجه در بازه ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن DXR نسبت به شاهد شده است.

نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن TPS1 در شرایط تنش سه، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که بیان این ژن در تمام بازه‌های زمانی نسبت به شاهد به طور قابل توجه و معنی‌دار کاهش می‌یابد.

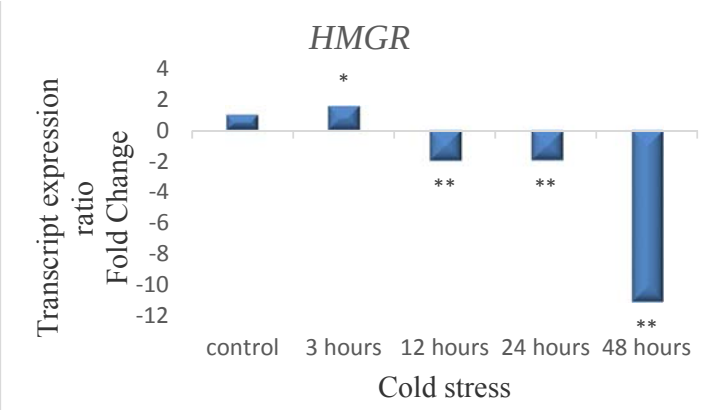


شکل شماره ۱- اثر بازه‌های زمانی تنش سرمایی بر میزان کارواکرول

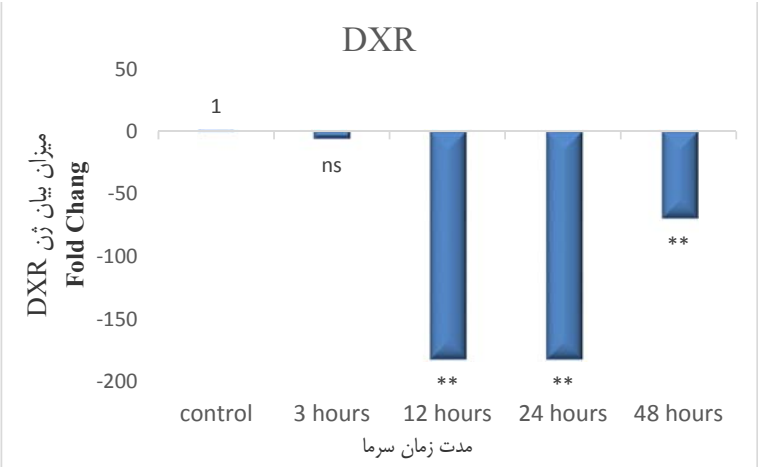


شکل شماره .Error! No text of specified style in document- اثر بازه‌های زمانی تنش سرمایی بر میزان تیمول

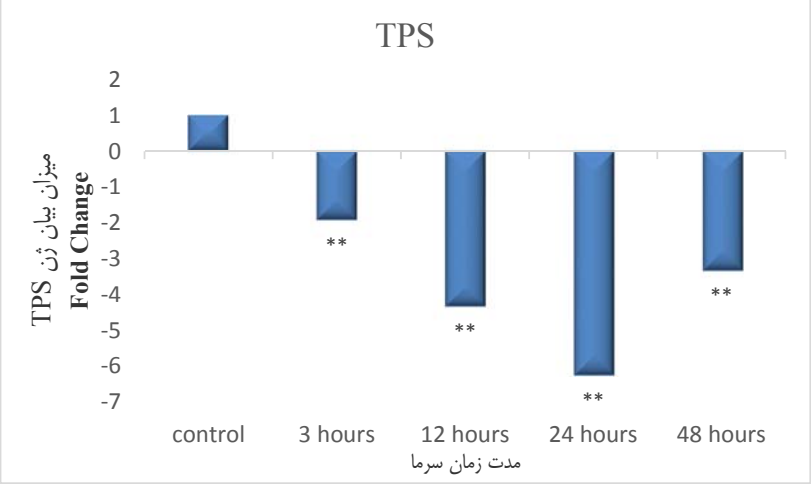
حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.



شکل شماره ۳- بیان نسبی ژن HMGR در گیاه آویشن تحت تنش سرمایی



شکل شماره ۴- بیان نسبی ژن DXR در گیاه آویشن تحت تنش سرمایی



شکل شماره ۵- بیان نسبی ژن TPS در گیاه آویشن تحت تنش سرمایی

بحث

بررسی میزان بیان ژن‌های مهم مسیر MVA و MEP در گیاهچه آویشن باغی نشان داد که تنش سرمایی بر میزان بیان ژن‌ها اثر معنی‌داری داشته است. بیشترین میزان بیان مربوط به ژن HMGR در بازه زمانی سه ساعت (۱/۵۷ برابر نسبت به شاهد) بود. بیان نسبی ژن‌های TPS و DXR در طی تنش سرمایی کاهش یافت. نتایج نشان داد که بیان تمام ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق در اثر تیمار سرما تغییر یافت که می‌تواند ناشی از نقش ترپن‌ها در مسیرهای دفاعی و انتقال پیام در آویشن باشد. از آنجاکه بیان ژن‌ها در سطح رونوشت‌برداری با میزان تولید متابولیت‌های مربوطه ارتباط مستقیم دارد زمانی‌که هدف افزایش تولید متابولیتی خاص باشد با اعمال تیمارهایی مانند سرما با زمان مناسب می‌توان در شرایط کنترل شده می‌توان به آن دست یافت.

شناخت مسیر بیوسنتز تیمول در گیاه آویشن باغی نیازمند شواهد مستدل بیشتری است، اما می‌توان گفت که بیوسنتز مونوترپن تیمول در گیاه آویشن باغی رقم واریکو۳ به طور عمده از مسیر MEP صورت می‌گیرد. تحقیقات مک کانکی و

همکاران (۲۰۰۰) همبستگی بین میزان بیان ژن آنزیم‌های مسیر MEP و بیوسنتز مونوترپن‌ها را در نعناع (*Mentha* × *piperita*) تأیید کرد، اما این همبستگی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) بسیار ضعیف گزارش شده است [۱۴]. البته گزارش‌های بیس و همکاران (۲۰۰۹)، سای و همکاران (۲۰۰۸) و واسچ و همکاران (۲۰۱۰) تنظیم بیوسنتز مونوترپن‌ها با سطح بیان ژن DXR را تأیید نمی‌کنند و مکانیسم‌های پس از نسخه‌برداری (post-transcriptional regulatory mechanisms) را بر بیوسنتز مونوترپن‌ها مؤثر می‌دانند [۱۷-۱۵].

تحقیق بر روی الگوی بیان ژن DXR در گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.) نشان داد بیان ژن DXR در بافت گل بیشتر از بافت برگ است، همچنین بیان این ژن با تیمار اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات، ترانس سینامیک و اشعه UV پس از ۲۴ ساعت افزایش یافته است [۱۸]. در مطالعات انجام شده روی گیاه بارهنگ چینی (*Salvia miltiorrhiza*) نشان داد که تیمار متیل جاسمونات بیان ژن DXR را حدود ۱۴ برابرافزایش داده است [۱۹]. استفاده از تیمار متیل جاسمونات گیاه *Withania somnifera* بیان ژن DXR در بافت برگ پس از اعمال این تیمار افزایش یافته است [۲۰]. در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) استفاده از تیمار متیل جاسمونات باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه با تاثیر بر ژن‌های ابتدای مسیرMEP شده است [۲۱]. هرچند نقش تنظیمی آنزیم DXR در بیوسنتز مونوترپن‌ها بستگی به نوع گیاه، بافت و مرحله نمو دارد، اما گزارش‌هایی درخصوص تنظیم در سطح بیان این ژن و همبستگی مثبت میان بیان ژن DXR و تولید مونوترپن‌ها از مسیر MEP موجود دارد. در گیاه نعنا فلفلی، افزایش بیان ژن DXR سبب افزایش معنی‌دار بیوسنتز مونوترپن‌های موجود در اسانس شد و در مقابل، خاموش کردن جزئی (partial gene silencing) ژن DXR در این گیاه سبب کاهش شدید مونوترپن‌ها شد [۲۴].

نتیجه‌گیری

بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق در اثر تیمار سرمایی القا شدند که می‌تواند به دلیل نقش ترپن‌ها در مکانسیم دفاعی و انتقال پیام باشد. این ژن‌ها با داشتن نقش کلیدی در بیوسنتز ترپن‌ها با تنظیم سرعت مسیر بیوسنتزی بر تولید تیمول و کارواکرول تأثیر دارند. از آنجایی‌که مسیرهای بیوسنتز ترکیبات ثانویه بسیار پیچیده است و توسط مجموعه ای از آنزیم‌های مختلف کاتالیز می‌شود به طور قطع نمی‌توان عنوان کرد که بیان ژن‌های کدکننده بیوسنتز یک آنزیم بر کاهش یا افزایش تولید ترکیب نهایی مؤثر است. بهرحال پیشنهاد می‌شود که اثر متقابل چند آنزیم کدکننده در مسیرهای مختلف بیوسنتز یک ترکیب خاص در مطالعات آینده مورد ارزیابی قرار گیرد تا نتایج دقیق‌تری به دست آید.

منابع

1. Horwath A.B., Grayer R.J., Keith-Lucas D.M. and Simmonds M.S. Chemical characterization of wild populations of Thymus from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology* 2008; 36: 117-33.

2. Braga P.C., Culici M., Alfieri M. and Dal Sasso M. Thymol inhibitis *Candidae albicans* biofilm formation and msature biofilm. *Intl. J. Antimicrob. Agents* 2008; 31: 472-77.

3. Gershenzon J. and Kreis W., Biochemistry of terpenoids: monoterpens, sesquiterpens, diterpens, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins. In: Wink M (ed.) Biochemistry of plant secondary metabolism , annual plant reviews, vol 2, Sheffield Academic Press, Sheffield, 1999, pp: 222-99.

4. Numpaque M.A., Oviedo L.A., Gil J.H., Garcia C.M. and Durango D.L., Thymol and Carvacrol: biotransformation and antifungal activity against

the plant pathogenic fungi Colletotrichum acutatumand Botryodiplodia theobromae. *Tropical Plant Pathology* 2011; 36 (1): 3-13.

5. Carlen C., Schaller M., Carron C.A., Vouillamoz J.F. and Baroffio C.A., June. The new *Thymus vulgaris* L. hybrid cultivar'Varico 3'compared to five established cultivars from Germany, France and Switzerland. In IV International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants-ISBMAP. 2009 860 (pp: 161-6).

6. Rahaii M., Naghavi M., Alizade H., Malbobi M.A., Abdmishani S., Shang P. Assessment of the MYB gens exprtion modle in wheat (*Triticum aestivum* L.) in short time stress of salinity and cold using quantitative RT- PCR approach. *Iranian Journal of Field Crop Science* 2010; 41: 433-46 (In Farsi).

7. Rohdich F., Bacher A. and Eisenreich, W., Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochemical Society Transactions* 2005; 33 (4): 785-91.

8. Rohmer M. Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure and Applied Chemistry* 2003; 75 (2-3): 375-88.

9. Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B. and Sahm H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemistry J.* 1993; 295: 517-24.

10. Banerjee A., Sharkey T.D. Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Natural Product Reports* 2014; 31.8: 1043-55.

11. Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthesis pathway in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1995; 46: 521-47.

12. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 1987; 162 (1): 156-9.

13. Livak K.J. and Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. *Methods* 2001; 25 (4): 402-8.

14. McConkey M.E., Gershenzon J., Croteau R.B. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology* 2000; 122: 215 - 24.

15. Besser K., Harper A., Welsby N., Schauvinhold I., Slocombe S., Li Y., Dixon R.A. and Broun P. Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant Physiology* 2009; 149 (1): 499-514.

16. Besser K., Harper, A., Welsby, N., Schauvinhold I., Slocombe S., Li Y., Dixon R.A. and Broun P. Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant Physiology* 2009; 149 (1): 499-514.

17. Schmiderer C., Grausgruber-Gröger S., Grassi P., Steinborn R. and Novak J. Influence of gibberellin and daminozide on the expression of terpene synthases and on monoterpenes in common sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Plant Physiol.* 2010; 167 (10): 779-86.

18. Malek Zadeh A., Magdi M, Aka A. Gene expression analysis of γ-Terpinene synthesis under salicylic acid, methyl jasmonate and Trans-cinnamic acid treatments in *Thymus vulgaris* L. 2015. Agricultural research findings.

19. Yang D., Ma P., Liang X., Wei Z., Liang Z., Liu Y. and Liu F. PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in Salvia miltiorrhiza hairy roots. *Physiologia Plantarum* 2012; 146 (2): 173-83.

20. Gupta P., Agarwal A.V., Akhtar N., Sangwan R.S., Singh S.P. and Trivedi P.K., Cloning and characterization of 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway genes for isoprenoid

biosynthesis from Indian ginseng, Withania somnifera. *Protoplasma* 2013; 250 (1): 285-95.

21. Ruiz-May E., Galaz-Ávalos R.M. and Loyola-Vargas V.M., Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of Catharanthus roseus treated with methyl jasmonate. *Molecular Biotechnol.* 2009; 41 (3): 278-85.

22. Mahmoud S.S. and Croteau R.B. 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 (15): 8915-20.

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

Habibi Sh (M.Sc.)[1] , Qaderi A (Ph.D.)[2], Fatehi F (Ph.D.)[3*]

1- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran
2- Medicinal Plants Research center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
3- Faculty of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran
*Corresponding author: Faculty of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran
Tel: +98-918-8724758
E-mail: Fatehi.foad@gmail.com

Abstract

Background: Thyme (*Thymus vulgaris* L.) is a valuable medicinal plant which has many secondary metabolites such as thymol and carvacrol.

Objective: This study was done to evaluation of cold stress effect on gene expression in thymol biosynthesis pathway including DXR ،HMGR and TPS1.

Methods: The effect of cold stress in the time period of 0, 3, 12, 24 and 48 hours on gene expression in thymol biosynthesis pathway including DXR, HMGR and TPS1 was evaluated by RT-PCR. This study was done on base of complete randomized design (CRD) in Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran.

Results: Results showed that the cold stress had significantly effect on expression of studied genes. The highest expression of HMGR gene was observed within 3 hours after cold treatment (1.57 times more than control treatment). The expression of *DXR* and *TPS1* genes were reduced in different periods of cold stress.

Conclusion: In general, the genes expression of thymol and carvacrol biosynthesis pathway including DXR, HMGR and TPS1 were significantly changed by cold stress.

Keywords: ***Thymus vulgaris* L., Cold stress, Gene expression, Thymol**