

اثر پاکلوبوترازول و براسینواستروئید بر بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز و ارتباط آن با بیوسنتز مونوترپن کارواکرول و تیمول در گیاه آویشن دناپی (*Thymus daenensis* Celak) تحت تنش خشکی

مریم محمدی فارسانی\*<sup>۱</sup>، عبدالله قاسمی پیربلوطی<sup>۲</sup>، غلامرضا بخشی خانیکی<sup>۳</sup>، حسن ممتاز<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران شرق، ایران

<sup>۲</sup>مرکز پژوهش‌های گیاهان دارویی و دام پزشکی سنتی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

<sup>۳</sup>گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران، ایران

<sup>۴</sup>گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۶

### چکیده

آویشن دناپی یک گیاه دارویی بومی ایران است که متعلق به نعنائیان (Labiatae) می‌باشد. این گیاه به‌طور گسترده در طب گیاهی و صنایع غذایی استفاده می‌شود و حاوی متابولیت‌های ثانویه (کارواکرول و تیمول) می‌باشد. تنش خشکی، رشد و متابولیسم این گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این تحقیق اثر سطوح مختلف تنش خشکی شامل شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای)، تنش ملایم (۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) و تنش شدید خشکی (۲۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) به همراه ۰/۵ و ۱ میکرومول بر لیتر پاکلوبوترازول و نیز کاربرد غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میکرومول بر لیتر ۲۸-هموبراسینواستروئید به صورت محلول در اتانول بر میزان کارواکرول و تیمول و اسانس آویشن دناپی در شرایط گلدانی و در محیط باز مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز در سطوح مختلف آبیاری با روش quantitative RT-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز در آبیاری کامل در بالاترین مقدار بوده و با ایجاد تنش خشکی تا سطح ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای از میزان بیان این ژن به صورت معنی داری کاسته شد. با رسیدن میزان خشکی به سطح ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای میزان بیان ژن افزایش یافت. از سوی دیگر میزان کارواکرول در شرایط تنش شدید خشکی نسبت به حالت شاهد کاهش یافت و با اضافه شدن غلظت ۲۸-هموبراسینواستروئید از سطح ۲/۵ به ۵  $\mu\text{mol/l}$  افزایش معنی دار در مقدار آن مشاهده شد. به علاوه در تنش خشکی شدید میزان تیمول در حضور حلال ۲۸-هموبراسینواستروئید (اتانول) در مقایسه با حالت شاهد افزایش معنادار داشت.

**واژه‌های کلیدی:** آویشن دناپی، اسانس، براسینواستروئید، پاکلوبوترازول، تیمول، کارواکرول

### مقدمه

پراکندگی گسترده‌ای می‌باشد و در همه ی شرایط اکولوژیکی و ارتفاعات مختلف نیز می‌رویند (Charkh chian et al., 2009). گیاه آویشن متعلق به خانواده نعناع، Lamiaceae همانند دیگر جنس‌های این خانواده دارای ترکیبات بیولوژیک متعدد در اسانس و عصاره می‌باشد (Khoshsookhan et al., 2014). نام

گیاهان معطر یا آروماتیک گیاهانی هستند که به دلیل وجود ترکیب‌های معطر کاربرد وسیعی در صنایع، مواد غذایی و حتی درمان دارند و دارای

\*نویسنده مسئول: log1988@yahoo.com

به‌خصوص زونا می‌باشد (Mozaffarian, 2013). تیمول و کارواکرول از نظر شیمیایی ایزومر هستند. کارواکرول از رشد برخی باکتری‌ها همچون باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی پیشگیری می‌کند (Mehran et al., 2016).

تحقیقات نشان داده که یکی از مهمترین عوامل تأثیرگذار در میزان متابولیک‌های ثانویه موجود در گیاهان، تنش‌های محیطی اعمال شده بر آن‌ها است. خشکی برجسته‌های مختلف رشد گیاه تأثیر گذاشته و موجب کاهش و به تأخیر انداختن جوانه‌زنی، کاهش رشد اندام‌های هوایی و کاهش تولید ماده خشک می‌گردد (Singh and Patel, 1996). تنش خشکی به‌عنوان یک عامل بالقوه سبب تغییر در غلظت ترکیبات مهم ثانویه در گیاهان دارویی می‌شود (Fohseca et al., 2006).

در بررسی اثر تنش خشکی بر آویشن دنیایی بیان شد که سطح آبیاری بر بسیاری از شاخصه‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مانند وزن خشک، ارتفاع گیاه، شاخص مساحت برگ تأثیر معنی‌دار دارد (Alavi et al., 2013). پاکلو بوترازول (PBZ) یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی است که تأثیر آن به‌عنوان یک ماده ضدتغرق بر روابط آبی و تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه ثابت شده است. اثرات مفیدی روی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گونه‌های آویشن دنیایی دارد. بارزترین ویژگی مورفولوژیکی کاربرد آن، کاهش رشد رویشی است (Lever, 1986).

براسینواستروئیدها نیز به‌عنوان یکی از هورمون‌های استروئیدی نقش بسزائی در کنترل فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان به‌ویژه پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند. استفاده از مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی همچون براسینواستروئیدها یکی از راهکارهای عملی برای کاهش این خسارات‌ها می‌باشد (Bajguz and Hayat, 2009). مونوترپن‌ها

علمی این گیاه از ریشه یونانی کلمه *Thyme* به معنای بوی ملایم و خوش‌اقتباس شده است (Kaveh et al., 2013). جنس آویشن در دنیا حدوداً ۲۰۵ گونه گزارش شده است که ۱۴ گونه از این جنس در نقاط مختلف ایران پراکنش دارند و ۸ گونه از آن‌ها بومی هستند. در بسیاری موارد خواص اسانس انواع آویشن مربوط به دو ترکیب کارواکرول و تیمول است. از اسانس گل و برگ آویشن در جهان به‌عنوان چاشنی معطرکننده غذا استفاده زیادی می‌شود و با توجه به خصوصیات فیتوشیمیایی آن در داروسازی صابون‌ها و عطرها نیز به کار می‌رود. از این گیاه به‌دلیل اثرات ضد میکروبی، ضدسیاتیک، ضدروماتیسم و ضداسپاسم برای مصارف دارویی استفاده می‌شود (Khoshsokhan et al., 2014). دو گونه *T. Hohen* & *Boiss* *daenensis* *kotschyanus* بیشترین مصرف را به عنوان دارو، در میان گونه‌های آویشن ایران دارند، گیاه آویشن دنیایی با نام علمی *Thymus daenensis* Celak می‌باشد. این گونه شامل دو زیر گونه *Thymus daenensis* *daenensis* subsp *daenensis* *ancifoliusl* subsp می‌باشد. این گیاه علفی چندساله، پایا و بوته‌ای بدون انشعابات ساقه، تقریباً بدون کرک و بدون دم‌برگ می‌باشد گل‌هایی به رنگ سفید مایل به ارغوانی دارد که در مناطق سرد و نیمه خشک پراکنش دارد و در مناطق وسیعی از ایران از جمله ارتفاعات مناطق شمال غربی، غربی، جنوبی و مرکزی کشور رشد می‌کند (Mehran et al., 2016). سر شاخه‌های این گونه حاوی اسانس، ساپونین‌ها و تانن‌ها است. این گیاه سرشار از پلی متوکسی فلاوون‌ها، پلی ساکاریدها و مونوترپن‌ها می‌باشد. مهم‌ترین ترپن موجود در اسانس آویشن تیمول و کارواکرول هستند. تیمول یک مونوترپن با حلقه فنلی و به شکل بلوری بوده و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد فرار می‌باشد، کاربرد آن در ساخت لوسیون‌ها، پمادها، کرم‌ها و در رفع بیماری‌های پوستی

تولید IPP وجود دارد (Ramak et al., 2014). هر چند نقش تنظیمی آنزیم DXR بستگی به نوع گیاه، مرحله نمو و بافت دارد، اما تحقیقاتی در خصوص تنظیم بیان این ژن و همبستگی مثبت بین تولید مونوترپن‌های مشتق از مسیر MEP کلروپلاستی و میزان بیان ژن DXR موجود می‌باشد (Mahmoud and Croteau., 2001). با توجه به مطلب فوق هدف از انجام این مطالعه اثر پاکلوبوترازول و براسینواستروئید بر بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز/ایزومراز و ارتباط آن با بیوسنتز کارواکرول و تیمول در گیاه آویشن دناپی تحت تنش خشکی بود.

#### مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش بذره‌های آویشن دناپی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و درخرداد سال ۱۳۹۴ در گلدان‌هایی حاوی خاک مزرعه با کود حیوانی پوسیده با نسبت ۳/۱ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد (اقلیم سرد و نیمه خشک بر اساس روش آمبرژه) کشت شدند (جدول ۱).

گروه بزرگی از ترپنوئیدها هستند که از سلول‌های گیاهان تک لپه، دو لپه، قارچ‌ها و جلبک‌ها ترشح می‌شوند ترپنوئیدها با وجود داشتن ساختار و عملکرد پیچیده، پلیمر ساده‌ای از واحدهای ایزوپرون پنج کربنه و ایزوپنتیل دی‌فسفات (IPP) می‌باشند (Aharoni et al., 2006). پیش ساز (IPP) در گیاهان از دو مسیر کاملاً مجزا یعنی مسیر موالونات (MVA) سیتوسولی و متیل اریتریتول فسفات (MEP) کلروپلاستی قابل تأمین است. مسیر MEP کلروپلاستی با عمل یک آنزیم هم چگالشی از نوع ترانس کتولاز تحت عنوان ۱-دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات سنتاز آغاز می‌گردد. این آنزیم ماده ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات (DXP) را با یک واکنش بین دو پیش ساز گلیسرآلدئید فسفات و پیروات، سنتز می‌کند (Rohmer, 2003). آنزیم بعدی که با عمل بر روی DXP تولید ۲- c- متیل اریتریتول ۴- فسفات (MEP) می‌کند، آنزیم DXP ردوکتاز/ایزومراز (DXR) است که آخرین آنزیم در مسیر تولید MEP می‌باشد؛ پس از تولید MEP چند مرحله آنزیمی پیاپی دیگر تا

جدول ۱: مشخصات خاک

B mg/kg	Cu mg/kg	Fe mg/kg	Mn mg/kg	Zn mg/kg	%N	K ava ppm	P ava ppm	%TNV	%OC	pH	EC dS/m
۱/۴۷	۰/۹۵	۴/۹۶	۸/۱۹	۰/۵۵	۰/۰۷۴	۲۴۷	۲/۳	۲۲	۰/۷۰۲	۸/۰۴	۰/۴۶۸

،Domain Reflectometry) TDR (TIMER, IMKO) استفاده شد. دستگاه TDR مورد استفاده در آزمایش‌ها از نوع TRIME ساخت شرکت (IMKO) آلمان بود. طول منطق ای که حساسه ی دستگاه امواج را ارسال می‌کند ۲۰ سانتی متر است. امواج تولید شده توسط دستگاه در محدوده ای در نیمرخ خاک منتشر می‌شود. عدد بدست آمده به‌عنوان رطوبت خاک ثبت می‌گردد. در تاریخ ۹۴/۴/۱۴ گیاهان در ۳ سطح آبیاری، چهار سطح براسینواستروئید و ۴ سطح پاکلوبوترازول و سه تکرار در مجموع با ۱۴۴ گلدان تیمار بندی شده به مدت سه ماه در شرایط مزرعه در وضعیت نوری،

تا یک ماه پس از کاشت بذور گلدان‌ها به‌طور مساوی آبیاری می‌شدند و از این مرحله به بعد، تیمارهای آبیاری اعمال شد که شامل آبیاری در شرایط نرمال یعنی ۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای (شاهد یا بدون تنش)، ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای (تنش ملایم خشکی) و ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای (تنش شدید خشکی) بود.

زمان اعمال تیمارهای آبیاری پس از استقرار نشاها دو هفته پس از نشا کاری تا زمان تشکیل ۵۰ درصد گل دهی بود. برای اعمال سطوح تنش خشکی از روش انعکاس سنجی زمانی و دستگاه (Time

دفعات آبیاری و محلول پاشی روزی دو بار صبح و عصر انجام شد (جدول ۲). سپس نمونه برداری از سر شاخه‌های هوایی گلدار از مزرعه انجام شد. تیمارهای آبیاری مورد استفاده جهت اعمال تنش آبی عبارتند از (S0): شرایط ۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای (شاهد یا بدون تنش)، (S1): ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای (تنش ملایم خشکی) و (S2): ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای (تنش شدید خشکی).

دمایی و خاک یکسان، انجام شد. ماده ۲۸- هموبراسینوئید با غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میکرو مول بر لیتر به صورت محلول در اتانول ۱۰ درصد و پاکلوبوترازول با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکرو مول بر لیتر به صورت محلول در آب یونیزه شده مقطر به روش محلول پاشی به خاک تیمارهای مورد نظر پاشیده شد. به منظور جلوگیری از خطای ناشی از تاثیر حلال یک سطح حلال نیز به تیمارها اضافه شد.

جدول ۲: تیمارهای مربوط به سطوح مختلف تنش خشکی، براسینواستروئید و پاکلوبوترازول

تنش خشکی (s)	براسینواستروئید (B)	پاکلوبوترازول (P)
	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$
آبیاری طبیعی ۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه (S0)	شاهد (Bc)	شاهد (Pc)
تنش ۲۵٪ ظرفیت مزرعه (S1)	حلال (Be)	حلال (P0)
تنش ۵۰٪ ظرفیت مزرعه (S2)	سطح ۲/۵ میکرو مول بر لیتر (B2.5)	سطح ۰/۵ میکرو مول بر لیتر (P0.5)
	سطح ۵ میکرو مول بر لیتر (B.5)	سطح ۱ میکرو مول بر لیتر (P1)

۰/۲۵ میکرومتر برای جداسازی استفاده شد. دمای آن ۳ دقیقه توقف در ۴۰ درجه سانتی گراد، تا ۷۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۳ درجه سانتی گراد در دقیقه با ۵ دقیقه توقف، تا ۲۱۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۷ درجه سانتی گراد در دقیقه و در نهایت تا ۲۹۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۴۰ درجه سانتی گراد در دقیقه با ده دقیقه توقف برنامه‌ریزی گردید. دمای دتکتور دستگاه ۳۰۰ درجه سانتی گراد و از گاز هلیوم با سرعت جریان ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. ولتاژ منبع یونیزاسیون طیف سنج جرمی ۷۰ الکترون ولت، دمای منبع یونیزاسیون ۲۳۰ درجه سانتی گراد و دمای چهار قطبی ۱۵۰ درجه سانتی گراد تنظیم و روش یونیزاسیون EI انتخاب شد. محدوده اسکن طیف‌ها از ۵۰ تا ۵۵۰ دالتون تنظیم شد. جهت شناسایی و تایید طیف‌ها، شاخص بازداری (RI) آن‌ها با استفاده از طیف‌های جرمی مخلوط آلکان‌های نرمال محاسبه (Kovats, 1958) و شاخص‌های موجود در کتب مرجع (Adams et al., 2001) و اطلاعات موجود در کتابخانه‌های Weilly و NIST مورد استفاده

روش اسانس‌گیری آویشن: سرشاخه‌های گلدار در مرحله گلدهی برداشت شد و وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. پس از خشک شدن در سایه در حرارت حدود ۳۵ درجه سانتی گراد، وزن خشک آن‌ها نیز تعیین شد. از هر نمونه خشک شده ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم از هر تکرار را پس از آسیاب شدن با الک شماره ۱ با ترازوی دیجیتال وزن نموده داخل بالن ریخته و با استفاده از آب مقطر دیونیزه شده به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده و به مدت ۳ ساعت با دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. بازده اسانس‌های بدست آمده پس از رطوبت زدایی با سولفات سدیم بر اساس وزن خشک سر شاخه گلدار محاسبه شد. ترکیب‌های اسانس‌های بدست آمده با دستگاه‌های کروماتوگراف گازی (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) مورد استفاده ساخت شرکت Agilent آمریکا شناسایی شدند.

ستون HP-5MS (پنج درصد قطبی) به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ساکن

آگارز، نانو درآپ و اسپکتروفنومتر (WPA (Biowave) II ارزیابی گردید. برای ساختن cDNA با استفاده از کیت PrimeScript™ RT Reagent محصولات شرکت بیوتکنولوژی تاکارا، ژاپن مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. هدف از این مرحله ابتدا تهیه کپی DNA از RNA (cDNA) به صورت DNA است که تحت عنوان رونوشت برداری معکوس (RT) نامیده می‌شود. سپس این DNA با روش Real-Time Quantitative PCR افزوده‌سازی می‌گردد.

**واکنش زنجیره‌ای ترنس کریپتاز معکوس (-Real-Time Quantitative PCR):** به منظور بررسی بیان ژن ۱-دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز (DXR) دو دسته آغازگر استفاده شد. پرایمرهای مورد نظر با استفاده از نرم افزار Primer-Blast قابل دسترس در شبکه اینترنت طراحی شد (جدول ۳).

قرار گرفت. درصد هر یک از ترکیب‌ها نیز با توجه به سطح زیر منحنی طیف کروماتوگرام دستگاه GC/MS بدست آمد.

تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزارهای آماری و مقایسه میانگین تیمارها انجام شد و از آنجا که اسانس‌ها با سه بار تکرار به دستگاه تزریق شدند از روش آزمون چند دامنه‌ای Duncan در نرم افزار آماری SPSS بررسی شد و سنجش میزان تغییر بیان ژن‌های تیمول و کارواکول با روش RT-PCR در تیمارهای مختلف انجام شد.

**استخراج RNA و تهیه cDNA:** جهت استخراج و خالص سازی RNA از بافت تازه برگ گیاه، نمونه‌ها از فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد خارج شد. RNA کل از برگ‌ها با استفاده از کیت (RNA extraction PLUS (solution) و مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده سیناکلون استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل

جدول ۳: توالی پرایمرهای طراحی شده

شماره ثبت	اندازه محصول	توالی پرایمر (۵' به ۳')	ژن هدف
NM_103889.3	۱۱۰ جفت باز	5'-GGGACTGGATCTGGTCTTGG-3' 5'-GAGGTGGAGACCTGTGGAGA-3'	توبولین
NM_001203671.1	۱۰۱ جفت باز	5'-GTGCGGGACTAAAGCCTACG-3' 5'-CGGAAGCACGAAAGGACCAC-3'	DXR

به توالی هدف و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت طولیل شدن انجام شد. در پایان محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برمایند مشاهده و با استفاده از اشعه UV عکسبرداری شد. برای تعیین ماهیت و صحت عملکرد آغازگرهای DXR، قطعات حاصل از PCR برای تعیین توالی به شرکت سینا ژن ارسال شد. بیان ژن DXR در تیمارهای براسینواستروئید و پاکلوبوترازول با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار سنجیده شد.

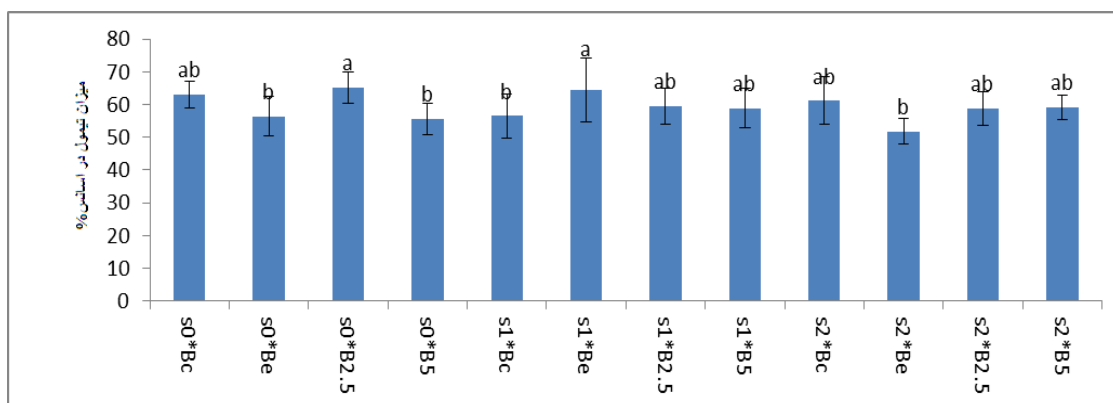
در طرح حاضر ژن DXR به عنوان ژن هدف و ژن  $\beta$ -tubulin به عنوان ژن مرجع انتخاب گردیدند. ژن‌های مرجع همواره بیان ثابت دارند تا بتوان تغییر بیان ژن‌های هدف را با آن سنجید. پرایمرها در Real-Time Quantitative PCR استفاده شد. برای بررسی بیان ژن DXR به صورت نیمه کمی در مقایسه با کنترل داخلی، در آزمایش‌های مقدماتی غلظت بهینه پرایمرها و cDNA مشخص شد. برنامه دمایی PCR بدین صورت است که ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد جهت واسرشت شدن ابتدایی DNA و ۳۰ ثانیه در ۶۶ درجه سانتی گراد جهت اتصال پرایمرها

استاندارد، (SD) ضریب تعیین داده‌ها ( $R^2$ ) و نمودارها با نرم‌افزار SPSS (V.16, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) انجام شد. میزان p نیز با استفاده از (Student's t test) جهت تعیین اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه مورد مطالعه محاسبه گردید.

### نتایج

میزان تیمول در شرایط آبیاری عادی در گیاه آویشن با اضافه شدن  $2/5 \mu\text{mol/l}$  و  $5 \mu\text{mol/l}$  از ۲۸ - هموبراسینواستروئید گیاه تغییر معنی‌داری نداشت، اما در غلظت  $5 \mu\text{mol/l}$  میزان این ترکیب در مقایسه با حالت  $2/5 \mu\text{mol/l}$  کاهش یافت. در تنش خشکی ۲۵ درصد، میزان تیمول در حضور حلال براسینواستروئید (اتانول) در مقایسه با حالت شاهد ( $S1*Bc$ ) افزایش معنادار داشت. در تنش خشکی ۵۰ درصد نیز تفاوت معناداری در میزان تیمول در تیمارهای مختلف مشاهده نشد ( $P \leq 0.05$ ) (شکل ۱).

ابتدا جهت تعیین غلظت مناسب و عملکرد پرایمرها، از آن‌ها رقت‌های متوالی (Serial Dilution) به صورت ۱۰، ۱۳، ۷، ۵، ۳ پیکو مول در میکرو لیتر تهیه و واکنش Real-Time PCR انجام گردید. همچنین جهت ترسیم منحنی استاندارد (Standard Curve) برای هر ژن از رقت‌های متوالی DNA استاندارد (نرمال کنترل) به صورت ۳/۱۳، ۶/۲۵، ۱۲/۳، ۲۵ و ۵۰ نانوگرم در میکرو لیتر استفاده گردید. از منحنی استاندارد، دامنه ی غلظت بهینه DNA الگو و میزان راندمان PCR برای هر ژن، تعیین می‌گردد. ارزیابی و آنالیز داده‌های حاصل از Real-Time PCR در سیستم ABI PRISM 7300 Sequence Detection System و بسته نرم‌افزاری Sequence Detection System V.1.2.3 (SDS) Applied و Biosystems, Foster City CA, USA انجام گردید. ارزیابی و سنجش آماری داده‌های حاصل از Real-Time PCR شامل میانگین، انحراف از

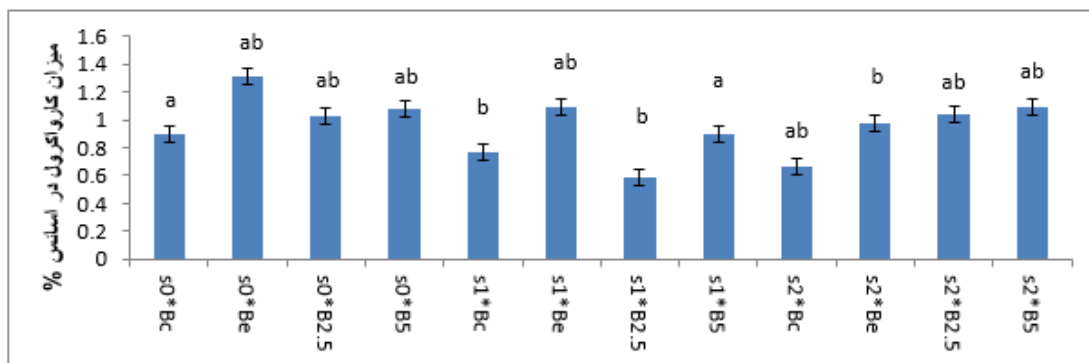


شکل ۱: تأثیرات متقابل تنش خشکی و ۲۸-هموبراسینولید بر میزان تیمول  $\pm$  خطای استاندارد

(S0\*Bc): آبیاری طبیعی همراه با =شاهد (S0\*Be): آبیاری طبیعی همراه با محلول پاشی با حلال اتانول (S0\* B2.5): آبیاری طبیعی همراه با تیمار ۲/۵  $\mu\text{mol/l}$  ۲۸-هموبراسینولید (S0\* B.5): آبیاری طبیعی همراه با تیمار ۵  $\mu\text{mol/l}$  ۲۸-هموبراسینولید (S1\*Bc): تنش ملایم خشکی (S1\* Be): تنش ملایم خشکی همراه با محلول پاشی با حلال اتانول (S1\* B2.5): تنش ملایم خشکی همراه با تیمار ۲/۵  $\mu\text{mol/l}$  ۲۸-هموبراسینولید (S1\* B.5): تنش ملایم خشکی همراه با تیمار ۵  $\mu\text{mol/l}$  ۲۸-هموبراسینولید (S2\*Bc): تنش شدید خشکی (S2\* Be): تنش شدید خشکی همراه با محلول پاشی با حلال اتانول (S2\* B2.5): تنش شدید خشکی همراه با تیمار ۲/۵  $\mu\text{mol/l}$  ۲۸-هموبراسینولید (S2\* B.5): تنش شدید خشکی همراه با تیمار ۵  $\mu\text{mol/l}$  ۲۸-هموبراسینولید

کارواکرل شد ( $P < 0.05$ ). همچنین با افزایش تنش خشکی میزان کارواکرول به صورت معنی‌دار نسبت به شاهد ( $S0*Bc$ ) افزایش یافت (شکل ۲)

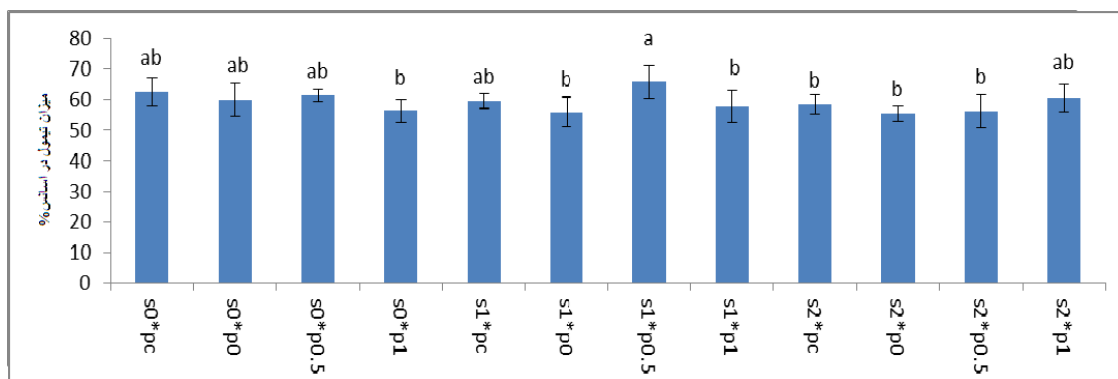
میزان کارواکرول در شرایط تنش ۲۵ درصد نسبت به حالت شاهد کاهش یافت. با اضافه شدن غلظت ۲۸- هموبراسینواستروئید از سطح ۲/۵ به ۵  $\mu\text{mol/l}$  ( $S1*Bc$ ) در این تنش باعث افزایش معنی‌دار



شکل ۲: تاثیر متقابل تنش خشکی و ۲۸- هموبراسینولید بر میزان کارواکرول آویشن دناپی  $\pm$  خطای استاندارد

سطح پاکلوبوترازول  $0.5 \mu\text{mol/l}$  را تجربه کرده ( $S1*P0.5$ )، به صورت معنی‌داری نسبت به تیمار بدون پاکلوبوترازول تیمول بیشتری را دارا بود اما نسبت به گروه شاهد تغییری در آن مشاهده نشد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳).

تاثیر متقابل تنش خشکی و پاکلوبوترازول بر میزان تیمول و کارواکرول گیاه آویشن: در تاثیر متقابل تنش خشکی و پاکلوبوترازول بر میزان تیمول و کارواکرول گیاه آویشن مطابق نتایج بدست آمده، تیماری که تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه و

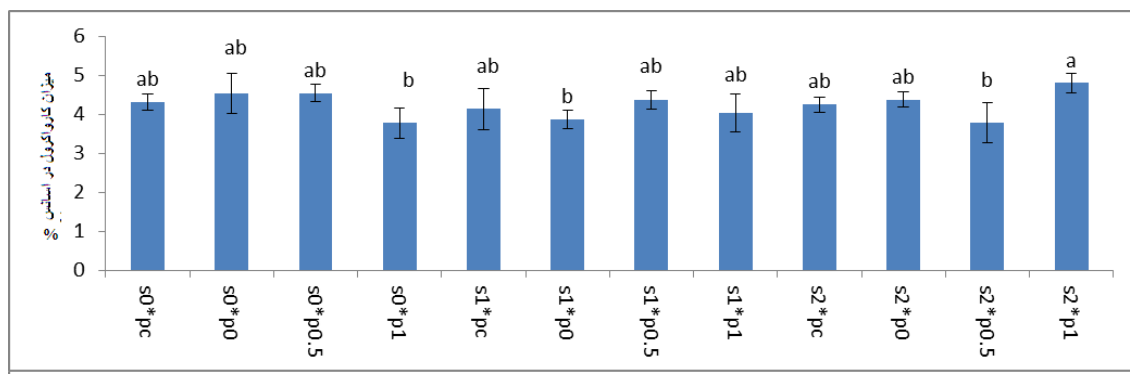


شکل ۳: تاثیر متقابل تنش خشکی و پاکلوبوترازول بر میزان تیمول  $\pm$  خطای استاندارد

( $S0*Pc$ : آبیاری طبیعی = شاهد) ( $S0*P0$ : آبیاری طبیعی همراه با محلول پاشی با حلال اتانول) ( $S0*P0.5$ : آبیاری طبیعی همراه با تیمار  $0.5 \mu\text{mol/l}$  پاکلوبوترازول) ( $S0*P1$ : آبیاری طبیعی همراه با تیمار  $1 \mu\text{mol/l}$  پاکلوبوترازول) ( $S1*Pc$ : تنش ملایم خشکی) ( $S1*P0$ : تنش ملایم خشکی همراه با همراه با محلول پاشی با حلال اتانول) ( $S1*P0.5$ : تنش ملایم خشکی همراه با تیمار  $0.5 \mu\text{mol/l}$  پاکلوبوترازول) ( $S1*P1$ : تنش ملایم خشکی همراه با تیمار  $1 \mu\text{mol/l}$  پاکلوبوترازول) ( $S2*Pc$ : تنش شدید خشکی همراه) ( $S2*P0$ : تنش شدید خشکی همراه با همراه با محلول پاشی با حلال اتانول) ( $S2*P0.5$ : تنش شدید خشکی همراه با تیمار  $0.5 \mu\text{mol/l}$  پاکلوبوترازول) ( $S2*P1$ : تنش شدید خشکی همراه با تیمار  $1 \mu\text{mol/l}$  پاکلوبوترازول)

شرایط تنش خشکی ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه با افزایش میزان پاکلوبوترازول به سطح ۱  $\mu\text{mol/l}$  میزان سنتز کارواکرول به صورت معنی داری بیشتر شد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۴).

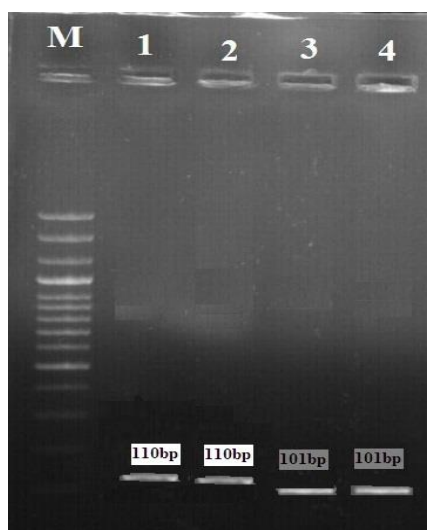
مانند تیمول در تنش‌های خشکی کمتر از ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه بیشترین میزان کارواکرول در تیمارهایی سنتز شده اند که سطح ۰/۵ میکرو مول بر لیتر را پاکلوبوترازول دریافت کرده بودند اما در



شکل ۴: تاثیر متقابل تنش خشکی و پاکلوبوترازول بر میزان کارواکرول  $\pm$  خطای استاندارد

درصد بررسی شد. از RNA استخراج شده، با استفاده از پرایمرها و آنزیم DNA پلیمراز وابسته به RNA ساخته شد. از cDNA ساخته شده در حضور پرایمرهای اختصاصی دو ژن *DXR* و توپولین تکثیر شد (شکل ۵).

نتایج واکنش زنجیره‌ای ترنس کریپتاز معکوس (**Real-Time Quantitative PCR**): استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب از بافت برگ گیاه دارویی آویشن دنایی با استفاده از روش تک مرحله‌ای مبتنی بر گوانیدیوم انجام شد. کیفیت RNA استخراج شده با تفکیک باندهای RNA بر روی ژل آگارز یک

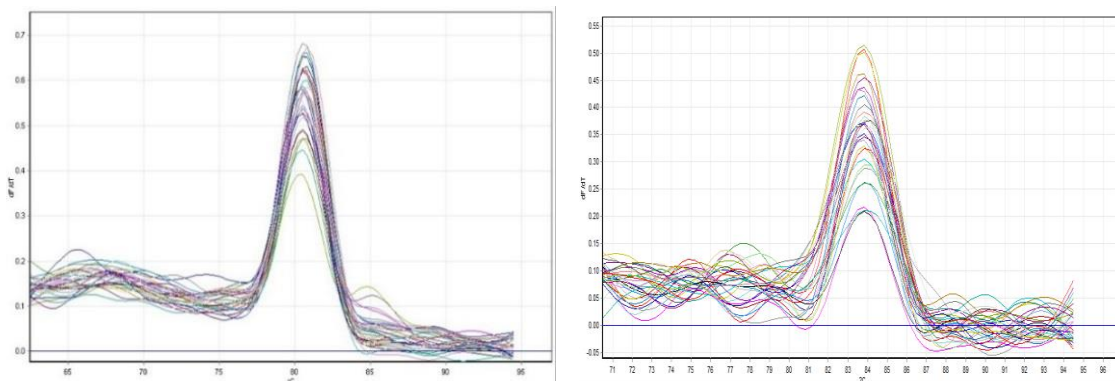


شکل ۵: الکتروفورز محصولات تکثیری ژن‌های *DXR* و توپولین طی برنامه Real-Time PCR ذکر شده در بخش روش‌ها روی ژل آگارز یک درصد. باندهای چاهک ۱ و ۲ محصولات تکثیری ژن مرجع توپولین را نشان می‌دهد و طول قطعه تکثیری ۱۱۰ جفت باز است و باند چاهک‌های ۳ و ۴ بیانگر محصولات تکثیری ژن هدف *DXR* را نشان می‌دهد. طول قطعه تکثیری ۱۰۱ جفت باز است. چاهک M مارکرهای نشانگر (Size Markers) با اندازه ۱۰۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.



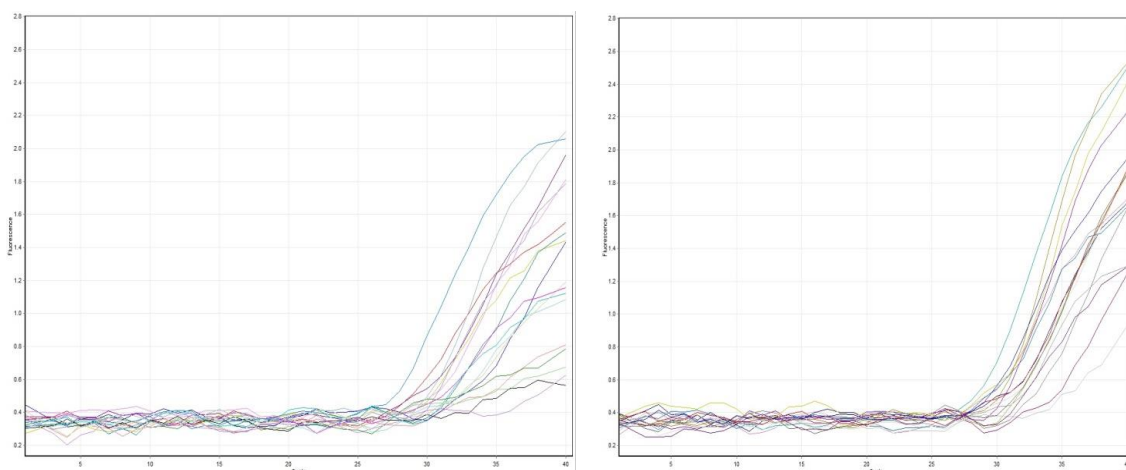
تکثیری مربوط، به واکنش‌های هر ژن (هدف و مرجع) به‌طور کامل با یکدیگر هم پوشانی داشتند (شکل ۶ و ۷).

سپس سنتز صورت گرفت و برای مقایسه الگوی بیان ژن‌های cDNA مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت. در واکنش Real-Time PCR منحنی‌های



شکل ۶: منحنی ذوب ژن‌های طرح مورد آزمایش را نشان می‌دهد.

سمت راست: ذوب ژن DXR و سمت چپ: ژن توبولین



شکل ۷: منحنی محصولات فازهای تکثیر. سمت راست: ژن DXR و سمت چپ: ژن توبولین

صورت است که در آبیاری کامل در بیشترین میزان خود  $28/25 \pm 11/24$  قرار دارد و با ایجاد تنش خشکی تا سطح ۲۵ درصد از میزان بیان این ژن به صورت معنی داری کاسته شده ( $17/06 \pm 5/07$ ) و با رسیدن میزان خشکی به سطح ۵۰ درصد گیاه توانسته است تا حدودی ( $20/33 \pm 3/91$ ) میزان بیان ژن را افزایش دهد. این نتایج با نتایج بدست آمده از تاثیر تنش خشکی بر میزان کارواکرول مطابقت دارد.

داده‌های به‌دست آمده در برنامه آماری SigmaStat با استفاده از روش Student-t-test در دو گروه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مواردی که احتمال کمتر از  $0/05$  ( $P < 0/05$ ) شد، اختلاف از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید. کلیه نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین درج گردید. همانطور که در (جدول ۴) مشاهده می‌شود میزان بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز بدین

جدول ۴: تاثیر تنش خشکی بر میزان بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز

ژن هدف	s0	s1	s2	p value
۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز	۲۸/۲۵±۱۱/۲۴ <sup>a</sup>	۱۷/۰۶±۵/۰۷ <sup>b</sup>	۲۰/۳۳±۳/۹۱ <sup>a</sup>	۰/۰۸۳

## بحث

امروزه محققان در زمینه کشاورزی در پی راهی برای کاهش هزینه‌های تولید و افزایش بازده گیاهان داروئی هستند. یکی از جنبه‌هایی که در این راستا همواره مورد توجه واقع شده افزایش توانایی گیاه برای مقابله در برابر انواع تنش‌ها است. ویژگی‌های منحصر به فرد ترپن‌ها آن‌ها را به‌عنوان عاملی برای افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های خشکی معرفی می‌کند. دریافت و فهم تنش خشکی منجر به ایجاد پیام‌هایی می‌شود که باعث فعال کردن کانال‌های یونی، فعالیت کینازها، تولید انواع اکسیژن فعال<sup>۱</sup> می‌گردد. در نهایت پیام‌ها منجر به بیان گروه‌های خاصی از ژن‌های *DXR* می‌شود که سبب افزایش معنی دار مونوترپن‌های موجود در گیاه آویشن می‌شود (Elyasi et al., 2015). شواهد زیادی نشان می‌دهد که تحت شرایط تنش تولید برخی از این ترکیبات تا چندین برابر افزایش می‌یابد، در موارد زیادی نیز کاهش میزان متابولیت‌های ثانویه در شرایط تنش دیده می‌شود (Vaičiulytė et al., 2016). Mehran و همکارانش (۲۰۱۶) گزارش کردند که ترکیبات عمده در اسانس (*Thymus daenensis*) دارای تیمول (۴۳ درصد)، پاراسیمن (۱۱/۹) درصد و گاماترپین (۴/۸ درصد) می‌باشد که تقریباً مشابه ترکیبات آویشن باغی است. گروهی دیگر از بین ۴۳ ترکیب آویشن دناپی به تیمول، پاراسیمن و کارواکرول اشاره نمودند (Sajjadi and Khatamsaz, 2003).

از طرف دیگر کارواکرول ۴ درصد و تیمول ۵۱/۲ درصد نیز ب عنوان مونوترپن‌های شاخص در اسانس

آویشن باغی معرفی شد اند و به‌طورکلی بیان شده است که ترکیب اصلی در اسانس آویشن دناپی، آویشن شیرازی و آویشن باغی کارواکرول و تیمولاست (Hudaib et al., 2002).

Dunford و Vazquez (۲۰۰۵) با بررسی تاثیر استرس آبی بر رشد گیاه و غلظت‌های کارواکرول و تیمول در پونه مکزیکی دریافتند که میزان این اسانس با افزایش میزان رطوبت و سن گیاه افزایش می‌یابد در حالی که در میانگین، گیاهان مسن تر نسبت به گیاهان جوان تر میزان اسانس کمتری داشتند اما تفاوت آن از نظر آماری معنی دار نبود.

همچنین در تحقیقی اثر ۲۸- هوموبراسینولید در کاهش تأثیرات تنش خشکی در مرزه *Satureja bachtiarica* که سهم عمده مواد آن را اسانس کارواکرول در بر می‌گیرد، مشخص شد کاهش میزان آبیاری در طول و وزن خشک ریشه، قطر ساقه، تعداد شاخه، ارتفاع گیاه، ساقه و کل محصول عاملی تاثير گذار است (Eskandari, 2011). گروهی از محققین با بررسی تأثیر ۲۴-پی براسینو استروئید بر رشد، فتوسنتز و میزان اسانس گیاه *Pelargonium graveolens* به این نتیجه رسیدند که استفاده از این ماده باعث افزایش ژرانیول و کاهش سیترونلول در اسانس می‌شود (Swamy and Rao, 2009).

Yousefzadeh و همکاران (۲۰۱۵) نیز اثر تنش خشکی بلندمدت بر کمیت و کیفیت اسانس گونه‌های مختلف جنس *Thymus spp* را بررسی کردند با این تفاوت که آن‌ها اثر تنش را به غیر از آویشن دناپی بر ۷ گونه دیگر بررسی کردند و بدین نتیجه رسیدند که تنش خشکی شدید تأثیری بر مقدار تیمول در سه

1- Reactive Oxygen Species, ROS

کاربرد غلظت ۱۰۰ میکرومول جاسمونیک اسید در مقایسه با سایر تیمارهای مورد مطالعه شد. هر چند نقش تنظیمی آنزیم *DXR* بستگی به نوع گیاه، بافت و مرحله نمو دارد، اما گزارش‌هایی در خصوص تنظیم در سطح بیان این ژن و همبستگی بین میزان بیان ژن *DXR* و تولید مونوترپن‌های مشتق از مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) کلروپلاستی بیان شده است. در گیاه تراریخت نعناع<sup>۱</sup> بیان ژن، *DXR* باعث افزایش معنی‌دار مونوترپن‌های موجود در اسانس این گیاه شد و در مقابل، خاموش کردن جرنی<sup>۲</sup> این ژن در گیاه مذکور کاهش شدید مونوترپن‌ها را در پی داشت (Ramak et al., 2014). در تحقیقات دیگری نیز همبستگی بین میزان فعالیت و بیان ژن آنزیم‌های مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) و بیوستز مونوترپن‌ها را در نعناع تأیید می‌کند، در صورتی که این همبستگی در گیاه ریحان<sup>۳</sup> بسیار ناچیز گزارش شده است (McConkey et al., 2000). البته گزارش‌هایی، تنظیم بیوستز مونوترپن‌ها را در سطح بیان ژن *DXR* تایید نمی‌کنند و مکانیسم‌های پس از رونوشت برداری<sup>۴</sup> را بر بیوستز مونوترپن‌ها مؤثر می‌دانند (Schmiderer et al., 2010; Besser et al., 2009). در گزارشی اعلام شد که بیوستز مونوترپن کارواکول در گیاه مرزه خوزستانی به‌طور عمده از مسیر MEP صورت می‌گیرد و آنزیم *DXR* در تنظیم بیوستز مونوترپن کارواکول نقش داشته و یک همبستگی مثبت بین افزایش بیان ژن *DXR* و بیوستز کارواکول را در گیاه مرزه خوزستانی مشاهده شد. اگرچه در بافت‌های مختلف نقش این ژن متفاوت است، اما به نظر می‌رسد که *DXR* نقش مهمتری را در این مسیر بر عهده داشته باشد. در این راستا به نظر

گونه *T. migricus* و *T. kotschyanus* *T. vulgaris* نشان نداد و مقدار کارواکول نیز تحت تاثیر تنش شدید قرار نگرفت که نتایج تحقیق حاضر مغایرت داشت.

در پژوهشی مشخص شد بکار بردن پاکلوبوترازول تحت استرس شوری می‌تواند تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و واکنش‌های دفاعی آنزیمی در انبه را با افزایش محتوای اسانس، پرولین و ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد تغییر داد (Srivastav et al., 2010). همچنین در تحقیق پاکلوبوترازول بر در نهال‌های گوجه فرنگی بررسی شد با این تفاوت که در این تحقیق به جای تنش خشکی، افزایش مقاومت به سرما را بررسی گردید. نتایج تحقیق فوق نشان داد که علائم تنش و آسیب‌ها در نهال‌های تیمار شده توسط *PBZ* دو غلظت ۳۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر، توانایی پاسخ گیاه به تنش سرما را بهبود می‌بخشد (Javadi, 2016; Jafari et al., 2006). اثر پاکلوبوترازول بر خصوصیات رویشی و فیزیولوژیکی در گلابی رقم "شاه میوه" تحت رژیم‌های مختلف آبیاری را در شرایط رژیم‌های مختلف آبیاری بررسی شد. در این پژوهش ذکر شد، گیاهان تیمار شده با پاکلوبوترازول محتوای آب نسبی بیشتری نسبت به گیاهان شاهد داشتند. آبیاری مجدد در گیاهان تحت تنش دو روز بعد منجر به برگشت تمامی صفات به حالت اول شد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که پاکلوبوترازول به گیاه اجازه می‌دهد تا از طریق تغییرات موفولوژیکی و فیزیولوژیکی تنش آبی را تحمل کند (Javadi, 2016).

Ashrafi و همکاران (۲۰۱۲) مطالعه‌ای روی واکنش فیتوشیمایی گیاه آویش دناپی به محلول پاشی جاسمونیک اسید انجام دادند که با توجه به نتایج این مطالعه استفاده از محلول پاشی اسید جاسمونیک سبب اختلاف معنی‌داری بین مقدار تیمول و کارواکول با

- 1- *Mentha piperita*
- 2- partial gene silencing
- 3- *Ocimum basilicum*
- 4- posttranscriptional regulatory mechanisms

- Adams, W.J., Banks, M.S. and van Ee, R. (2001).** Adaptation to three-dimensional distortions in human vision. *Nature Neuroscience*. 4(11): 1063-1064.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.Y., Ri, M.B., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. and Bouwmeester, H.J. (2006).** Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry*. 5(1): 49-58.
- Alavi Samani, S.M., Ghasemi Pirbalouti, A., Ataei Kachouei, M. and Hamedi, B. (2013).** The influence of reduced irrigation on herbage, essential oil yield and quality of *Thymus vulgaris* and *Thymus daenensis*. *Journal of Herbal Drugs*. 4(3): 109-113.
- Ashrafi, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Rahimmalek, M. and Hamedi, B. (2012).** Effect of foliar application of Jasmonic Acid (JA) on essential oil yield and its compositions of *Thymus daenensis* Celak. *Journal of Herbal Drugs*. 3(2): 75-80.
- Bajguz, A. and Hayat, S. (2009).** Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47(1): 1-8.
- Besser, K., Harper, A., Welsby, N., Schauvinhold, I., Slocombe, S., Li, Y., Dixon, R.A. and Broun, P. (2009).** Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant Physiology*. 149(1): 499-514.
- Dunford, N.T. and Vazquez, R.S. (2005).** Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*. 7(1): 20-22.
- Charkh chian, M.M., Akbari niya, A. and Jam zad, Z. (2009).** Study of Floristic of plants Lamiaceae in Qazvin province. *Acoustical Society of Japan*. 21(4): 106-110.
- Elyasi, R., Majdi, M., Bahramnejad, B. and Mirzaghaderi, G.H. (2015).** Expression pattern analysis of genes involved in the biosynthetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cummin (*Nigella sativa*) plants treated

می‌رسد می‌توان از ژن به عنوان یک کاندیدا برای دست کاری‌های ژنتیکی، برای افزایش تولید مونوترپن‌ها استفاده کرد (Ramak et al., 2014).

نتایج تأکید می‌کنند عمده‌ترین تأثیر تنش خشکی، جلوگیری از رشد گیاه و اثر بر مواد مؤثره گیاه دارویی می‌باشد. محققین با بررسی اثر کاهش آبیاری بر میزان محصول، تولید اسانس و کیفیت دو گونه آویشن *Thymus vulgaris* و *Thymus daenensis* بیان داشتند که کارواکرول، گاما ترپینن و پی سیمن در اسانس به صورت معنی‌دار تحت شرایط تنش‌زا افزایش می‌یابند درحالی که میزان تیمول در شرایط تنش به صورت معنی‌داری روند نزولی را طی می‌کند (Alavi Samani et al., 2013).

#### نتیجه‌گیری نهایی

نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که متابولیت‌های ثانویه گیاه آویشن دناپی به شدت تحت تأثیر هورمون تحریک کننده براسینواستروئید و پاکلوبوترازول و شرایط آبیاری قرار گرفت. مطابق نتایج مشروحه در این مطالعه براسینواستروئید و پاکلوبوترازول به صورت برجسته‌ای نقش تعدیل کننده پیامدهای ناشی از تنش‌های خشکی را در گیاه ایفا کرد. بیان ژن 1- دئوکسی گزیلولوز 5- فسفات ردوکتاز/ایزومراز نیز کاهش بیان کارواکرول را در تیمار تنش خشکی شدید نشان داد. تنش خشکی و براسینواستروئید تأثیر معنی‌داری بر تیمول و کارواکرول گذاشته و تأثیر مخرب تنش خشکی شدید را به خوبی برطرف نموده و تا حدی میزان کارواکرول را افزایش داد. همچنین تنش خشکی شدید و سطح 0/5 میکرو مول بر لیتر پاکلوبوترازول سبب افزایش تیمول در اسانس گشت

#### References

- populations of *Thymus kotschyanus* Boiss. and Hohen. with *Thymus vulgaris* L. genotypes. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 29(1): 116-129.
- Khoshokhan, F., Babalar, M., Poormeidani, A. and Fatahi, M.R. (2014).** Antioxidant activity, total phenolics and oil content of some *Thymus kotschyanus* and *Thymus daenensis* populations. International Journal of Plant Production. 15(3): 153-162.
- Kovats, E. (1958).** Gaz-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. Helvetica Chimica Acta. 41(7): 1915-1932.
- Lever, B.G. (1986).** Cultar-A technical overview. Acta Horticulturae. 179: 459-466.
- Mahmoud, S.S. and Croteau, R.B. (2001).** 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. 98(15): 8915-8920.
- Mehran, M., Hoseini, H., Hatami, A., Taghizade, M. and Safaie, A. (2016).** Investigation of components of seven species of thyme essential oils and comparison of their antioxidant properties. Joint Monitoring Programme. 2(58): 134-140.
- McConkey, M.E., Gershenzon, J. and Croteau, R.B. (2000).** Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. Plant Physiology. 122 (1): 215-224.
- Mozaffarian, V. (2013).** Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. Farhang Moaser. Tehran. 579-589.
- Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorrami, M. and Sayed Tabatabaei, B.E. (2009).** Genetic variability and geographical differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Cleak, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) with salicylic acid. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding. 23(1): 164-174.
- Eskandari, M. (2011).** The effect of 28-Homobrassinolide in reducing the effects of drought in savory herbs. International Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 3(11): 183-187.
- Swamy, K.N. and Rao, S.S.R. (2009).** Effect of 24-epibrassinolide on growth, photosynthesis, and essential oil content of *Pelargonium graveolens* (L.). Russian Journal of Plant Physiology. 56: 616-620.
- Fohseca, J.M., Rushing, J.W., Rajapakse, N.C., Thomas, R.L. and Riley, M.B. (2006).** Potential implication of medicinal plant production in controlled environment: The case of fever few (*Tanacetum parthenium*). Horticulture Science. 41(3): 531-535.
- Ghasemi Pirbaloti, A., Golparvar, A.R., Reyahi Dehkordi, M. and Navid, A. (2007).** The effect of different treatments on seeds dormancy and germination of five species of medicinal plants of Chahar Mahal and Bakhteyari province. Journal of Research and Construction. 20(74): 185-192.
- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M. and Cavrini, V. (2002).** GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. Journal Pharmaceutical Biomedical. 29(4): 691-700.
- Jafari, S.R., Manuchehri Kalantari, Kh. and Turkzadeh M. (2006).** The evaluation of paclobutrazol effects on increase cold hardiness in tomato seedlings (*lycopersicum esculentum* L.). Iranian Journal of Biology. 19(3): 290-298.
- Javadi, T. (2016).** Effect of Paclobutrazol on morphological, physiological and gas exchange pear Under different irrigation regimes. Journal of Horticultural Science. 30(2): 336-347.
- Kaveh, Sh., Zeinali, H., Safaei, L., Madah Arefi, H. and Aflakian, S. (2013).** Comparison of morphological and phytochemical traits in different

- Singh, J. and Patel, A.L. (1996).** Water status, gaseous exchange, proline accumulation and yield of wheat in response to water stress. *Annual of Biology Ludhiana*. 12(1): 77-81.
- Srivastav, M., Kishor, A., Dahuja, A. and Sharma, R.R. (2010).** Effect of paclobutrazol and salinity on ion leakage, proline content and activities of antioxidant enzymes in mango (*Mangifera indica* L.). *Scientia Horticulturae*. 125(4): 785-788.
- Yousefzadeh, K., Houshmand, S., Shiran, B., Zeynali, H., Hadiyan, J. and Gheysari, M.M. (2015).** Effects of long-term stress on the quality and quantity of essential oil of different species *Thymus spp.* *Ecophytochemical Journal of Medical Plants*. 12(4): 1-14
- Vaičiulytė, V., Butkienė, R. and Ložienė, K. (2016).** Effects of meteorological conditions and plant growth stage on the accumulation of carvacrol and its precursors in *Thymus pulegioides*. *Phytochemistry*. 128(1): 20-26.
- markers. *Biochemical Genetics*. 47(11): 831-842.
- Ramak, P., Kazempour Osaloo, S., Ebrahimzadeh, H., Sharifi, M. and Behmanesh, M. (2014).** Expression of gene *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase* and its relation to monoterpene carvacrol biosynthesis in *Satureja khuzestanica*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 27(4): 622-634.
- Rohmer, M. (2003).** Mevalonate-independent methyl erythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis: elucidation and distribution. *Pure and Applied Chemistry*. 75(2): 375-388.
- Sajjadi, S.E. and Khatamsaz, M. (2003).** Composition of the Essential Oil of *Thymus daenensis* Celak. ssp. *lancifolius* (Celak.) Jalas. *Journal of Essential Oil Research*. 15(1): 34-35.
- Schmiderer, C., Grausgruber Gröger, S., Grassi, P., Steinborn, R. and Novak, J. (2010).** Influence of gibberellin and daminozide on the expression of terpene synthases in common sage (*Salvia officinalis*). *Journal Plant Physiology*. 167(10): 779-786.