

Study the Quantitative Expression Pattern of Some Involved Genes on Monoterpenoid Biosynthesis Pathway and Identification of Essential Compounds Affected by Methyl jasmonate in Ajowan Plant

Mahsa Jamshidi

M.Sc. Student of Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran. Tel: +989125803191. Email: Mahsa.jamshidi72@ut.ac.ir.

Seyed Ahmad Sadat Nori

* Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran. Tel: +989123847551. Email: noori@ut.ac.ir.

Seyed Mohammad Mahdi Mortazavian

Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran. Tel: +989126788738. Email: mortazavian@ut.ac.ir.

Abstract

Objective

Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) is an annual plant in Apiaceae family which is used in traditional medicine and medical science. This study was carried out to determine the quantitative expression pattern of some genes on monoterpenoid biosynthesis pathway and essential quality in Ajowan treated by methyl jasmonate. Ajowan essential oil compounds and the amount of *MECPS*, *DXR*, and *GDS* genes expression as main genes related to Thymol biosynthesis pathway in response to methyl jasmonate in 4 different times were analyzed.

Materials and methods

After flowering, the 0.1 mM methyl jasmonate hormone was sprayed onto the plants. Samples were taken in 4 times (after 8, 24, and 48 treatment and control treatment). RNA

extraction, cDNA synthesis, and Real-Time PCR have done from flowers and the date from these gene expressions were analyzed. Essential chemical compounds were studied by GC-GC/MS. Generally, in 4 samples (samples were taken after 8, 24, and 48 treatment and control treatment), 10 different compounds were distinguished.

Results

Based on results, the study of the essential oils of Ajowan showed that the changes of the amount of secondary compounds in the essential oil, the amount of γ -Terpinene (precursor of monoterpenoids like Thymol) went up after 24 hours methyl jasmonate treatment. Due to Real-Time PCR dates, the quantity of all 3 studied genes increased after 24 hours methyl jasmonate treatment. The increasing of these genes expression can be causes the incline level of γ -Terpinene in essential oil.

Conclusions

Increasing the amount of 3 mentioned genes expression and also a high amount of γ -Terpinene in essential oils after 24 hours in flowers show that this hormone can affect the gene expression in MEP pathway which causes monoterpenoids production increase after one day of using the hormone.

Keywords: Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.), Essential oil, Gene expression, methyl jasmonate, Secondary metabolites

Citation: Jamshidi M, Sadat-Noori SA, Mortazavian SMM (2019) Study the quantitative expression pattern of some involved genes on monoterpenoid biosynthesis pathway and identification of essential compounds affected by methyl jasmonate in Ajowan plant. *Agricultural Biotechnology Journal* 11 (3), 133-152.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (3), 133-152.

DOI: 10.22103/jab.2019.14239.1141

Received: June 23, 2019; Accepted: September 5, 2019

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

بررسی الگوی بیان ژن‌های ساختاری در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها و بررسی کیفیت اسانس گیاه دارویی زنیان تحت تأثیر هورمون متیل‌جاسمونات

مهسا جمشیدی

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان - دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران. تلفن:

۰۹۱۲۵۸۰۳۱۹۱. ایمیل: Mahsa.jamshidi72@ut.ac.ir

سید احمد سادات نوری

* نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان - دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران. تلفن:

۰۹۱۲۳۸۴۷۵۵۱. ایمیل: noori@ut.ac.ir

سید محمد مهدی مرتضویان

دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان - دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران. تلفن: ۰۹۱۲۶۷۸۸۷۳۸. ایمیل:

mortazavian@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۴

چکیده

هدف: زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) گیاهی است علفی، یکساله از خانواده چتریان (Apiaceae) که در طب سنتی و علوم پزشکی کاربردهای فراوانی دارد. این تحقیق با هدف بررسی الگوی بیان ژن‌های ساختاری در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها و بررسی کیفیت اسانس گیاه دارویی زنیان تحت تأثیر هورمون متیل‌جاسمونات انجام شد. ترکیبات شیمیایی اسانس و میزان بیان ژن‌های *DXR*، *MECPS* و *GDS* به عنوان ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتز تیمول پس از اعمال تیمار هورمونی متیل‌جاسمونات در ۴ زمان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش: پس از گلدهی، هورمون متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار به صورت محلول‌پاشی روی گیاهان اسپری شد. نمونه‌گیری در ۴ زمان (۸، ۲۴، ۴۸ ساعت پس از هورمون‌پاشی و نمونه شاهد اسپری شده با آب مقطر) صورت گرفت. استخراج RNA از بافت گل‌آذین گیاه زنیان انجام شد و پس از سنتز cDNA و انجام Real-Time PCR داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن‌های مذکور

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جدا سازی و شناسایی ترکیبات اسانس نیز با استفاده از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) صورت گرفت. در مجموع، ۱۰ ترکیب در ۴ نمونه شناسایی گردید.

نتایج: نتایج حاصل از بررسی ترکیبات اسانس گیاه زنیان نشان داد که با توجه به تغییر مقدار ترکیبات ثانویه موجود در اسانس، میزان تولید آلفاترپین که پیش‌ساز مونوترپن‌ها (نظیر تیمول) است، پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال هورمون متیل‌جاسمونات افزایش یافت. همچنین نتایج حاصل از داده‌های Real-Time PCR، افزایش بیان هر ۳ ژن مذکور پس از ۲۴ ساعت از اعمال هورمون را نشان می‌دهد. افزایش بیان ژن‌های ذکر شده در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها می‌تواند عاملی برای بالا بودن میزان آلفاترپین در اسانس گل‌ها بعد از گذشت ۲۴ ساعت پس از اعمال هورمون باشد.

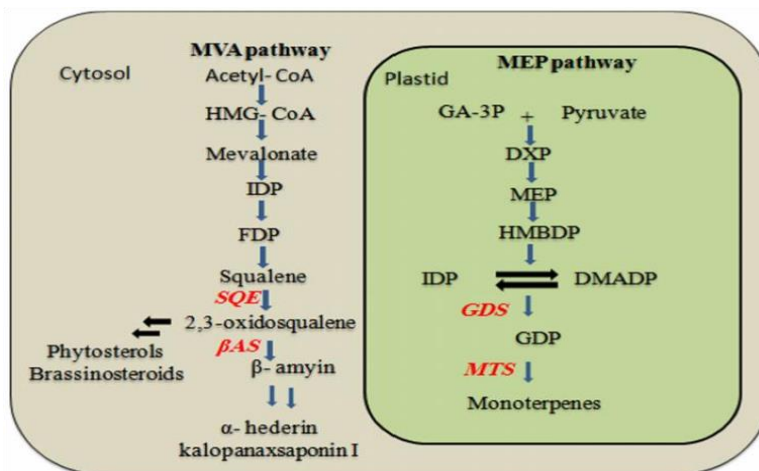
نتیجه‌گیری: هورمون متیل‌جاسمونات با تحریک مسیر بیوسنتز ترکیب‌های ثانویه و همچنین تأثیر بر میزان بیان ژن‌های مسیر MEP باعث افزایش تولید مونوترپن‌ها یک روز پس از اعمال هورمون می‌گردد.

کلمات کلیدی: اسانس، بیان ژن، ترکیب ثانویه، زنیان (*Trachyspermum ammi* L.)، متیل‌جاسمونات

مقدمه

مطابق گزارش سازمان جهانی بهداشت، گیاهان دارویی می‌توانند بهترین منبع برای به‌دست آوردن انواع مختلفی از داروها باشند. در حال حاضر هزاران ترکیب ثانویه گیاهی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند. زنیان ($n=2x=18$) گیاهی است علفی، یکساله که ارتفاع آن به ۹۰ سانتی‌متر می‌رسد (Sadat-Noori et al. 2017). منشأ زنیان مصر است که توسط یونانی‌ها به هند وارد شد و ایران، پاکستان و افغانستان از رویشگاه‌های طبیعی این گیاه می‌باشند (Lawrence BM, 2000; Sadat-Noori et al. 2017). میوه آن قهوه‌ای مایل به زرد و بیضوی شکل است. سیستم تولید مثلی گیاه، دگرگشن بوده که میزان دگرگرفته‌افشانی تصادفی در آن به حدود ۷۰ درصد می‌رسد (Ramanujam et al. 1964). محصولات مختلفی در زنیان از قبیل: تیمول، روغن حاوی تیمول و فاقد تیمول تولید می‌شود که در صنایع پزشکی، دارویی و تولید اسیدهای چرب استفاده می‌شود (Ashraf & Orooj, 2006). همچنین، تحقیقات انجام شده وجود ترکیبات مختلف فیتوشیمیایی را در این گیاه نشان می‌دهد که عبارتند از: کربوهیدرات‌ها، گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، ترکیبات فنولی، روغن فرار، پروتئین، چربی، فیبر و مواد معدنی می‌باشند. تیمول، اصلی‌ترین ترکیب ثانویه در گیاه دارویی زنیان است که علاوه بر مصارف دارویی در خمیر دندان، عطر و لوازم آرایشی نیز استفاده می‌شود. اسانس زنیان حاوی حدود ۵۰ درصد تیمول می‌باشد که یک میکروب‌کش قوی، ضد اسپا سم و قارچ‌کش است (Krishnamoorthy & Ferreria, 1999). بذر زنیان مهم‌ترین منبع تولید و ذخیره‌سازی تیمول است. درحالی‌که پیش‌سازهای آن در اندام‌های هوایی نظیر

برگ و گل تولید می‌شوند. در نتیجه؛ هرگونه تغییر در میزان تولید این پیش‌سازها، موجب افزایش تیمول خواهد شد. هورمون متیل جاسمونات یک تنظیم کننده رشد درون گیاهی است که باعث القاء فعالیت آنزیم‌هایی می‌شود که واکنش‌های بیوسنتزی مربوط به تولید ترکیبات دفاعی مانند پلی فنل‌ها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها را کاتالیز می‌کنند. ترپن‌ها یکی از بزرگترین خانواده‌های ترکیبات ثانویه هستند که معمولاً در حفاظت گیاهان از آفات و بیماری‌ها نقش داشته و همچنین باعث جلب حشرات گرده‌افشان و پراکننده بذر می‌شوند (Ferreria et al. 2010). به علاوه، نقش مهمی در ساختار غشاء (استرول و هاپانوئید)، واکنش اکسایشی (زنجیره جانبی یوبی کوئینین، مناکوئین، پلاستوکوئینین و فلاکوئینون)، حفاظت نوری و بازدارنده نوری (کاراتینوئید و زنجیره جانبی کلروفیل‌ها) و تنظیم رشد و نمو (هورمون‌ها) را نیز برعهده دارد (Phillipson, 2007). در گیاهان دو مسیر سیتوزولی یا اسیدموالونیک (MVA) و مسیر پلاستیدی (MEP) برای تولید ترپن‌ها وجود دارد (شکل ۱). این دو مسیر نه تنها در چگونگی تولید واحد پنج کربنه با یکدیگر تفاوت دارند، بلکه در محل و محصول نهایی نیز متفاوت‌اند. تولید ترکیبات سزکویی‌ترین و تری‌ترین در مسیر MVA و تولید ترکیباتی نظیر مونوترپن، دی‌ترین و تترترین از مسیر MEP انجام می‌شود (Aharoni et al. 2006).

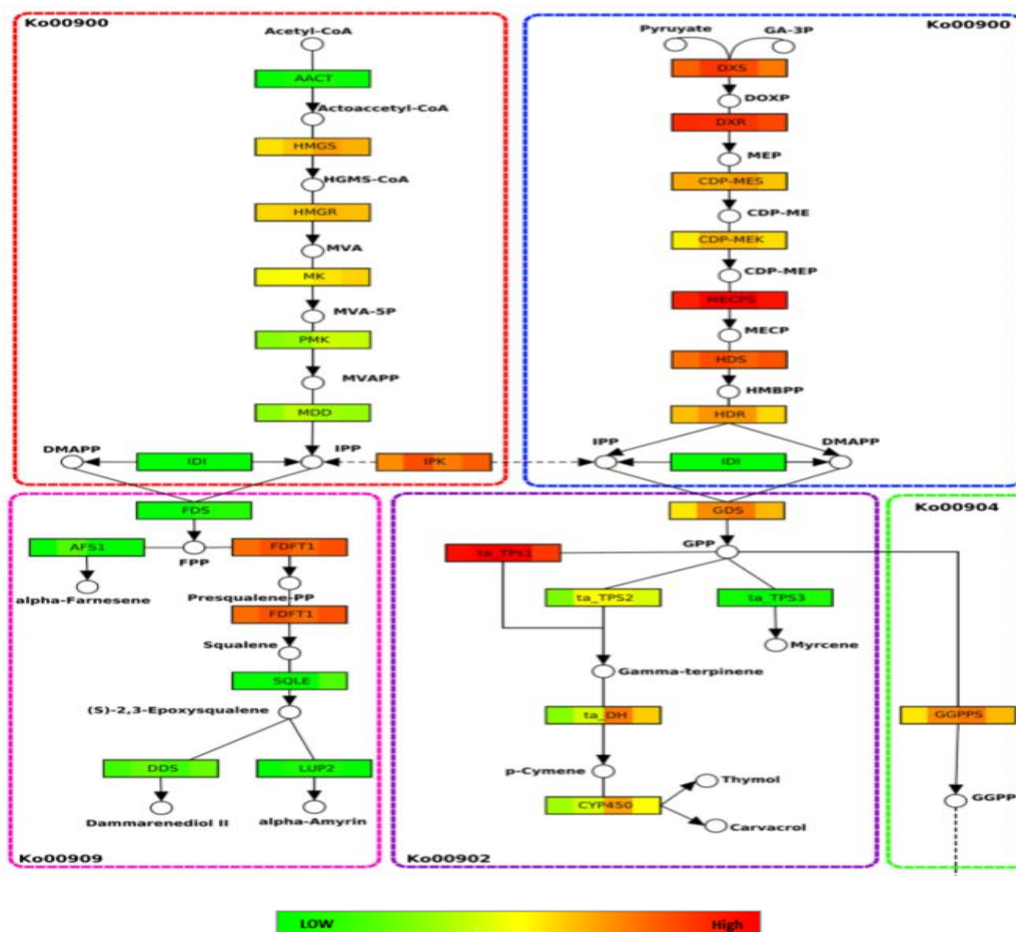


شکل ۱. مسیر سیتوزولی و پلاستیدی بیوسنتز ترپن‌ها (Aharoni et al. 2006).

Figure 1. The MVM and MEP pathways of Terpene biosynthesis (Aharoni et al. 2006).

براساس نتایج به‌دست‌آمده از داده‌های حاصل از RNA-seq در گیاه دارویی زنبان (شکل ۲)، ژن‌های *DXR*، *MECPS* و *GDS* به عنوان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌هایی نظیر تیمول و کارواکرول معرفی شده‌اند (Soltani Howyzeh et al. 2018). بالا بودن میزان بیان ژن‌های مذکور حاصل از تجزیه داده‌های حاصل از RNA-seq اهمیت بررسی دقیق‌تر بیان آن‌ها را

در شرایط مختلف نظیر تأثیر شرایط تنش و یا اعمال تیمارها مختلف برای بررسی و شناسایی ژن‌های کلیدی و محدود کننده تولید مونوترپن‌ها در مسیر بیوسنتز آن را افزایش می‌دهد.



شکل ۲. الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها در گیاه دارویی زنبان (Soltani Howyzeh et al. 2018).

Figure 2. Gene expression involving in Terpenoids biosynthesis pathway in Ajowan (Soltani Howyzeh et al. 2018).

بررسی مسیر بیوسنتزی تیمول و کارواکرول در گیاه دارویی آویشن در بافت‌های مختلف و در پاسخ به الیستورهای مختلف غیرزنده (در زست‌شناسی گیاهی، مولکول‌های خارجی که اغلب مرتبط با آفات، بیماری‌ها یا ارگانوسم‌های همزیست با گیاه می‌باشند را الیستور می‌نامند) شامل هورمون متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید و اشعه UV-C نشان می‌دهد که بیان ژن‌های دخیل در این مسیر از

جمله ژن های *DXR*، *TvTPS1*، *CYP71D178* و *CYP71D180* در اندام های هوایی گیاه مانند برگ و گل از الگوی بیان مشخصی پیروی نمی کند و در بافت های مختلف، میزان بیان متفاوت است. بیان این ژن ها در گل ها و به ویژه در گل های نارس، بیش از برگ ها است، در حالی که در ساقه و ریشه بیان نمی شوند. همچنین بیان این ژن ها در پا سخ به هر ۳ تیمار به صورت چ شمگیری افزایش یافته است (Majdi et al. 2017). در بررسی تأثیر متیل جاسمونات بر ترکیبات ثانویه گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis L.*)، محتوای کل فنل های متصل به دیواره، در ریشه در مقایسه با گیاهان شاهد، افزایش و در بخش هوایی، کاهش نشان می دهد. محتوای آنتوسیانین های ریشه، تنها با اعمال ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات، کاهش یافته ولی در بخش هوایی کاهش معنی دار محتوای آنتوسیانین در هر دو غلظت (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار)، در مقایسه با گیاهان شاهد، مشاهده شده است. همچنین، محتوای کل فلاونوئید در اندام هوایی گیاهان تیمار شده، کمتر از گیاهان شاهد بوده است (Ghanati et al. 2010). در میان ترکیبات موجود، تیمول و یا پیش ساز آن (آلفاترپین) از اهمیت بیش تری برخوردار است و انتظار بر این است که متیل جاسمونات با تحریک مسیر بیوسنتز ترکیبات ثانویه باعث افزایش تیمول و یا پیش سازهای آن که در صنعت دارو سازی از اهمیت ویژه ای برخوردار است، شود. لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی میزان تغییر بیان برخی ژن های کلیدی دخیل در مسیر پلاستیدی تولید پیش سازهای تیمول تحت تأثیر هورمون متیل جاسمونات است. برای اطمینان از اینکه، تغییر در میزان بیان ژن ها چگونه باعث تغییر در مقدار ترکیبات اسانس می شود، بررسی ترکیبات اسانس گل در گیاه دارویی زنیان تحت تأثیر هورمون متیل جاسمونات نیز انجام گرفت.

مواد و روش ها

بذور اکوتیپ استان اردبیل (اکوتیپ اردبیل در میان اکوتیپ های بررسی شده بالاترین عملکرد در میزان تولید تیمول و همچنین درصد بالایی در مقدار اسانس دارد (Mirzahosseini et al. 2017) به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۰/۲ درصد ضد عفونی شد (Ghanadnia et al. 2011) و سپس پنج مرتبه با آب مقطر شست و شو گردید. به منظور حذف اثرات بازدارنده جوانه زنی، بذور به روی کاغذ صافی مرطوب خیسانده شدند. پس از ۴۸ ساعت، بذور در سینی های ۲۱۶ خانه محتوی ۷۵ درصد پیت ماس و ۲۵ درصد پرلیت به منظور تهیه نشاء کشت شدند. در ادامه انتقال نشاء به گلدان های اصلی در ۳ تکرار زیستی در محیط گلخانه های تحقیقاتی پردیس ابوریحان - دانشگاه تهران با میانگین دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۸ درصد واقع در شهرستان پاکدشت صورت گرفت. هورمون متیل جاسمونات با غلظت ۰/۱ میکرومولار (Brouki milan et al. 2016; Saydpour & Sayyari, 2016) روی سطح گیاهان (مرحله ۵ رشد گل آذین) (Soltani Howyzeh et al. 2018) اسپری شد (شکل ۳).



شکل ۳. گل‌های گیاه دارویی زنیان در مرحله هورمون پاشی و نمونه‌گیری جهت بررسی بیان ژن و شناسایی ترکیبات اسانس.

Figure 3. Ajowan's flowers in growth stage of hormone spraying and sampling to study gene expression and identification of essential oil.

بررسی بیان ژن با استفاده از Real Time PCR

جهت بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز مونوترپن‌ها، نمونه‌گیری از بافت گل تک‌بوته‌ها در مرحله پنجم رشدی گل‌آذین (Soltani Howyzeh et al. 2018) تحت چهار زمان مختلف هورمون پاشی با متیل‌جاسمونات، در ۳ تکرار زیستی انجام شد. نمونه‌ها از طریق نیتروژن مایع به فریزر -۷۰ درجه سانتیگراد منتقل شدند. علاوه، به منظور بررسی دقیق‌تر ارتباط میان بیان ژن‌ها و میزان ترکیبات اسانس، همزمان نمونه‌ها مورد اسانس‌گیری نیز قرار گرفتند.

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های *DXR*، *MECPS* و *GDS* آغازگرهایی بر اساس توالی‌های اختصاصی شناسایی شده در مطالعه سلطانی و همکاران (۲۰۱۸) طراحی شد. از ژن *SAND* که در مطالعات قبلی مرتبط با گیاه زنیان شناسایی و توالی‌یابی شد و در مطالعات RNA-seq نیز مورد استفاده قرار گرفت، به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد (Soltani Howyzeh et al. 2018). میزان بیان ژن‌های کنترل داخلی در تمامی اندام‌ها یکسان است و میزان بیان ژن‌های مورد نظر نسبت به آن سنجیده می‌شود (Soltani Howyzeh et al. 2018). آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 طراحی شدند (جدول ۱). استخراج RNA از بافت گل از طریق کیت استخراج شرکت Thermo Scientific (GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز و پیکودراپ بررسی شد. به منظور سنتز کتابخانه cDNA، RNAها با استفاده از آب عاری از نوکلئاز، هم‌غلظت شدند. سنتز کتابخانه cDNA از طریق دستورالعمل کیت تجاری

SuPrimeScript cDNA شرکت *GeNet Bio* انجام شد. جهت اطمینان از سنتز cDNAها، واکنش PCR با کمک آغازگر اختصاصی طراحی شده برای ژن *SAND* انجام شد.

جدول ۱. مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن.

Table 1. Primers information used in gene expression.

نام ژن	توالی آغازگر	دمای اتصال
Gene name	Primer sequence	Annealing
ژن MECPS MECPS gene	آغازگر رفت Sense primer 5'- TGCCGCAATGTCTTTACAATC -3'	56.6
	آغازگر برگشت Antisense primer 5'- AATCATCAGCACCTTCAGTTTG -3'	56.3
ژن DXR DXR gene	آغازگر رفت Sense primer 5'- GATAATGGCCAACCAAGCAC -3'	56.5
	آغازگر برگشت Antisense primer 5'- CTGATGTTAGTGTGCCAAGAGG -3'	58
ژن GDs GDs gene	آغازگر رفت Sense primer 5'- CTATGTTCTTCGGTGTTCATTC -3'	58.7
	آغازگر برگشت Antisense primer 5'- GGCTAAGATGAATGTGGCAAAGC -3'	59.8
ژن SAND SAND gene	آغازگر رفت Sense primer 5'- TTGTAAGCTGAGTCTGTAATCCATC -3'	57.7
	آغازگر برگشت Reverse primer 5'- CCTAAAGTGACCAGAAACACAAG -3'	56.6

بررسی بیان کمی ژنهای *MECPS*، *DXR* و *GDs* که از جمله ژنهای اصلی در مسیر MEP هستند به همراه ژن خانه‌دار *SAND* با کمک دستگاه Real Time PCR مدل 96 Light Cycler انجام شد. برای این منظور، از کیت qPCR GreenMaster LowROX حاوی EvaGreen محصول شرکت Jena Bioscience براساس دستورالعمل دمایی پیشنهادی و با

توجه به دمای اتصال آغازگر اختصاصی استفاده شد (جدول ۲). مقدار Ct برای هر نمونه از نمودار میزان بیان ژن گرفته شد و سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد. همچنین تجزیه و تحلیل کمی داده‌های حاصل از بیان ژن‌های هدف، بر مبنای میزان بیان ژن خانه‌دار SAND صورت گرفت. تجزیه داده‌ها به صورت زیر انجام شد:

انجام واکنش qRT-PCR برای تمامی نمونه‌ها در ۳ تکرار انجام گرفت و مقدار Ct هر نمونه بدست آمد. پس از وارد کردن مقدار Ct هر نمونه در نرم‌افزار Excel میزان بیان هر ژن به صورت جداگانه بررسی شد. ابتدا برای نرمال‌سازی داده‌ها، مقدار Ct هر نمونه از Ct نمونه ژن خانه‌دار SAND کم شد. سپس میزان ΔCt برای هر نمونه محاسبه شد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان تغییر بیان هر نمونه بدست آمد:

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

در آخر میانگین و خطای استاندارد میانگین‌ها (Standard errors) محاسبه شد و تمامی نمودارها با استفاده از میانگین رسم شد و مقدار error bar روی نمودارها نشان داده شد.

جدول ۲. دستورالعمل دمایی مناسب برای انجام واکنش Real-Time PCR کمی.

Table 2. Recommended cycling conditions for quantitative Real-Time PCR.

مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
Step	Temperature (°C)	Time	Cycles
واسرشت اولیه و آغاز فعالیت آنزیم پلیمرز	95	2 min	1x
Initial denaturation and polymerase activation			
واسرشت Denaturation	95	15 sec	45x
اتصال Annealing	60	1 min	
طویل شدن Elongation	65	1 min	

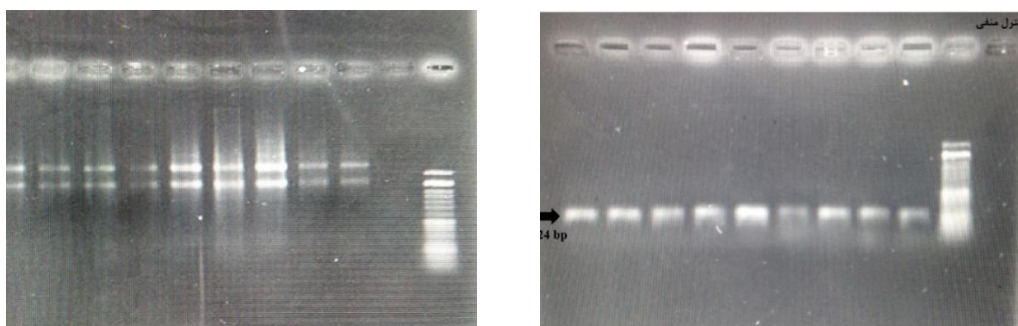
بررسی ترکیبات اسانس: نمونه‌گیری از بافت گل سه نمونه مخلوط شده از هر تیمار (شاهد آب مقطر، ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات) انجام گرفت. پس از خشک شدن نمونه‌ها در دمای اتاق، عملیات اسانس‌گیری از طریق کلونجر با کاربرد روش تقطیر با بخار آب صورت پذیرفت. در دستگاه کلونجر ابتدا عمل تبخیر و سپس عمل میعان انجام می‌شود. عمل میعان به

کمک کندانسور انجام می‌شود که برای خنک کردن آن از جریان آب سرد معمولی استفاده می‌شود. آب در اطراف لوله حاوی بخار جریان می‌یابد و آن را خنک می‌کند. لوله حاوی اسانس مانند یک پیپت است و یک شیر تخلیه برای خروج مواد دارد. برای استخراج اسانس ابتدا مقدار ۲۰ گرم بافت پودر شده گل را در بالن تقطیر ریخته و به آن ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. بالن در قسمت هیتز قرار می‌گیرد تا محلول داخل آن به دما جوش برسد. عملیات اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت به طول انجامید. در خلال عملیات، اسانس گیاه به علت فرار بودن همراه با بخار آب تقطیر و در لوله کلونجر جمع‌آوری شد. اسانس قرار گرفته به روی فاز روئی، توسط شیر تخلیه جداسازی شد. در نهایت، اسانس بدست آمده در ظروف شیشه‌ای تیره به دور از نور خورشید در یخچال (۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) نگهداری گردید (Eblagh et al. 2014). در ادامه، جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس از طریق دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) در آزمایشگاه فیتوشیمی دانشگاه شهید بهشتی (کروماتوگرافی نوع MS TRACE دارای ستون DB-5، طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر) انجام شد. در طول آزمایش، دمای اون از ۶۰ درجه سلسیوس به ۲۵۰ درجه سلسیوس (در هر دقیقه ۵ درجه سلسیوس) افزایش یافت و به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. به منظور دستیابی به مناسب‌ترین برنامه دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیبات اسانس، ۰/۲ میکرولیتر از نمونه‌ی آماده شده اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. همچنین، در صد ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و شاخص بازداری هر ترکیب محاسبه شد. سپس اسانس به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی تزریق شد و طیف‌جرمی ترکیبات نیز بدست آمد. شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از شاخص بازداری (KI) و بررسی طیف‌های جرمی هر یک از اجزای اسانس و مقایسه‌ی آن‌ها با طیف‌های مرجع انجام شد. برای محاسبه شاخص بازداری ترکیب‌ها، آلکان‌های نرمال متوالی کربن به دستگاه GC تزریق گردید. با مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه آن با طیف جرمی ترکیبات استاندارد و با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه تریپنوئیدها در کامپیوتر، شاخص بازداری محاسبه شد.

نتایج و بحث

استخراج RNA و سپس سنتز کتابخانه cDNA با کمیت و کیفیت مناسب انجام شد و جهت مقایسه الگوی بیان ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفت. پس از سنتز cDNA، واکنش PCR با کمک آغازگر ژن SAND انجام و صحت سنتز آن‌ها بررسی شد. طول محصول نهایی برای آغازگر طراحی شده ژن SAND برابر با 224 bp می‌باشد. بررسی‌ها نشان داد، بیان ژن DXR در بافت‌های مختلف گونه‌های گیاهی روند متفاوتی را نشان می‌دهد. میزان بیان این ژن در برخی گونه‌های گیاهی در کلیه بافت‌ها ثابت است. در

حالی که در برخی دیگر از گونه‌ها بیان متفاوتی در بافت‌ها مشاهده می‌شود. نتایج تحقیقات در گیاه پریوش (*Catharanthus*) نشان داد، بیان ژن *DXR* در بافت‌ها متفاوت است و بیان این ژن در گل و جوانه گل نسبت به برگ‌ها بیشتر می‌باشد (Burlat et al. 2004). در بابونه (*Matricaria chamomilla*) نیز نتیجه مشابهی برای بیان این ژن گزارش شده است (Majidi et al. 2014).



(الف)

(ب)

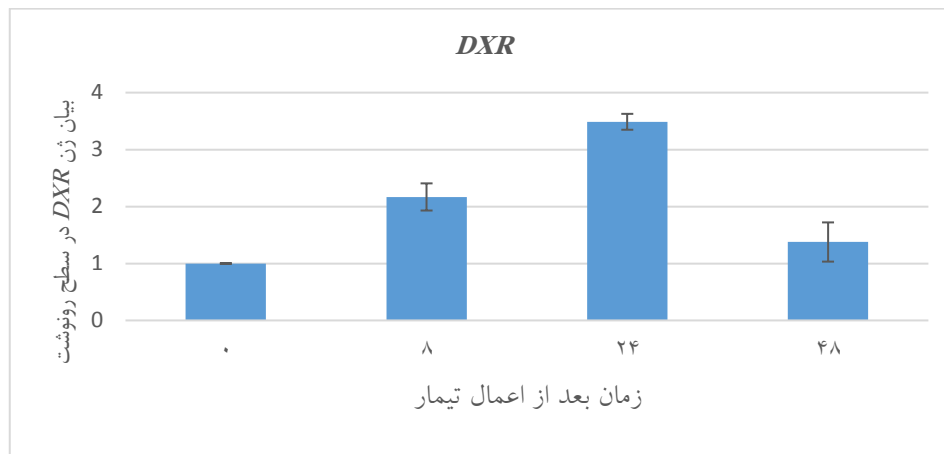
شکل ۴. الف- حضور RNAها به کمک الکتروفورز ژل آگارز (سایز مارکر 50-1500 bp شرکت SINACLON).

ب- باندهای واکنش PCR برای cDNAهای سنتز شده با کمک آغازگر ژن *SAND*.

Figure 4. A) RNA extraction bands on electrophoresis agarose gel. B) PCR bands for cDNA synthesized by *SAND* primers

در مطالعه حاضر، بررسی بیان ژن *DXR* نشان داد که این ژن تأثیرپذیری بالایی از هورمون متیل جاسمونات دارد. بیان ژن مذکور بلافاصله پس از اعمال هورمون افزایش یافت. پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال هورمون، میزان بیان به بالاترین مقدار خود رسیده است (شکل ۵). ژن *DXR* نقش کلیدی در مسیر بیوسنتزی ترکیبات ترپنی به ویژه مسیر MEP دارد، بنابراین، به نظر می‌رسد که اعمال هورمون متیل جاسمونات به مدت ۲۴ ساعت در گیاه زنیان منتج به بیوسنتز بیشتر مونوترپن‌هایی نظیر تیمول خواهد شد. ملاحظات بدست آمده، با نتایج حاصل از شناسایی ترکیبات اساسی در گیاه زنیان تطابق دارد. با توجه به نتایج جدول ۳، میزان بیان پیش‌ساز مونوترپن‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال هورمون متیل جاسمونات به حداکثر مقدار رسیده است. در سایر مطالعات نیز نتایج مشابهی گزارش شده است. افزایش بیان ژن *DXR* در گیاه نعناع (*Mentha piperrita*) منجر به افزایش تولید مونوترپن‌ها در اساس گیاه تراریخت نسبت به گیاه شاهد شد (Mahmood & Correau, 2001). در مطالعه بر روی گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) تحت تیمارهای مینولین و فوسمیدومیسین گزارش شده است؛ میزان بیان ژن *DXR* در تیمار

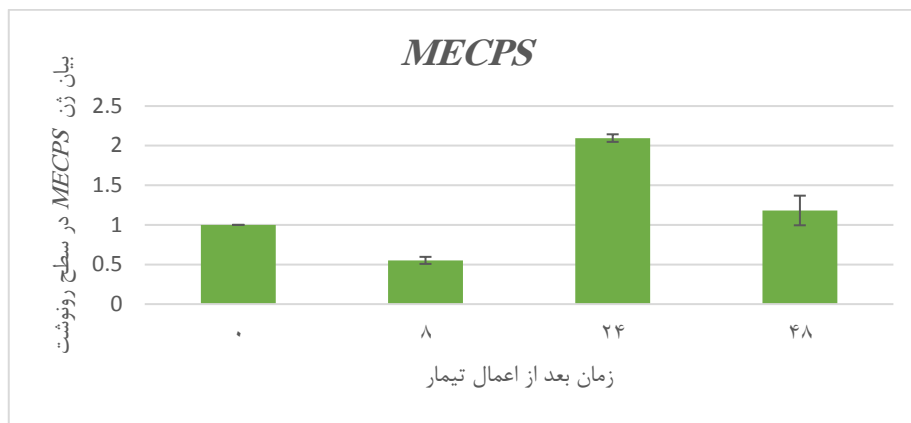
فوسمیدومیسین با غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومولار به لحاظ آماری از زمان صفر تا ۱۰۰ ساعت نسبت به گیاه شاهد تغییرات معنی‌داری نشان نداده است. درحالی‌که، در غلظت ۷۵ میکرومولار در ساعات اولیه ۳ تا ۲۴ ساعت پس از اعمال هورمون، افزایش معنی‌داری مشاهده شد و پس از آن بیان این ژن کاهش معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد نشان داده‌است (Ramak et al. 2012). ژن *MECP5* پنجمین ژن در مسیر MEP برای بیوسنتز ترپنوئیدها می‌باشد (Bick et al. 2003). تحقیقات وجود رابطه مستقیمی میان میزان بیان ژن *MECP5* و تولید ترپنوئیدها نشان می‌دهد (Veau et al. 2000).



شکل ۵. بیان ژن *DXR* در زمان‌های متفاوت در گل‌آذین گیاه دارویی زنیان پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات.

Figure 5. *DXR* gene expression in 4 different times after using methyl jasmonate in Ajowan.

نتایج حاصل از بررسی بیان این ژن تحت تأثیر هورمون متیل‌جاسمونات در مقایسه با ژن خانه‌دار برای نخستین بار در گیاه دارویی زنیان نشان داد، پس از گذشت ۸ ساعت از اعمال هورمون، میزان بیان ژن کاهش یافته‌است. درحالی‌که میزان بیان آن پس از ۲۴ ساعت از اعمال هورمون بطور قابل توجهی افزایش می‌یابد (بیش از دو برابر) و به حداکثر میزان خود رسید. میزان بیان ژن مذکور پس از ۴۸ ساعت کاهش یافته، اما همچنان از میزان بیان ژن در گیاه شاهد (محلول پاشی شده با آب مقطر) بیش‌تر است (شکل ۶).



شکل ۶. بیان ژن *MECPS* در زمان های متفاوت در گل آذین گیاه دارویی زنیان پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات.

Figure 6. *MECPS* gene expression in 4 different times after using methyl jasmonate in Ajowan.

یکی دیگر از مهم ترین ژن های مسیر بیوسنتزی مونوترپن ها *GDS* می باشد. محصول این ژن (آنزیم ژرانیل دی فسفات سنتاز) با اتصال دو مولکول ۵ کربنه دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) و ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) به یکدیگر، ژرانیل دی فسفات ۱۰ کربنه را می سازد که پیش ساز مونوترپن ها است (Trapp & Croteau, 2001; Mahmoud & Croteau, 2002). نتایج حاصل از بررسی تغییر بیان ژن *GDS* تحت تأثیر تیمار هورمونی متیل جاسمونات نشان داد، بیان این ژن ۸ ساعت پس از اعمال تیمار شروع به افزایش می کند و پس از ۴۸ ساعت از اعمال هورمون به بیش ترین مقدار خود می رسد (شکل ۷). مطالعه بیان نیمه کمی (میزان بیان ژن در روش نیمه کمی به کمک نرم افزار و با استفاده از میزان شدت باندهای حاصل از PCR معکوس بر روی ژل آگارز در دستگاه الکتروفورز محاسبه می شود و داده های آن به صورت مقایسه ای تفسیر می شود) ژن *GDS* در گیاه سیاه دانه تحت تأثیر تیمار متیل جاسمونات ۰/۱ میلی مولار نشان داد، بیان این ژن در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاه شاهد در ابتدا و پس از گذشت ۴ ساعت از اعمال تیمار افزایش یافته است. این افزایش تا ۸ ساعت بعد از اعمال تیمار ادامه داشته و سپس روند ثابتی از میزان بیان مشاهده شد (Elyasi et al. 2015).



شکل ۷. بیان ژن GDs در زمان‌های متفاوت در گل‌آذین گیاه دارویی زنیان پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات.

Figure 7. GDs gene expression in 4 different times after using methyl jasmonate in Ajowan.

بر اساس نتایج کروماتوگرافی گازی، ۱۰ ترکیب اصلی در گیاه دارویی زنیان شناسایی شد (جدول ۳). ترکیبات اصلی شامل دو نوع ترکیب ثانویه از خانواده ترپن‌ها به نام‌های γ -Terpinene و Carvacrol می‌باشد (Majnoon hosseini & davazdah, 2004; emami, 2007; khajeh et al. 2004). γ -Terpinene، مونوترپنی است که پیش‌ساز اصلی‌ترین ترکیب گیاه دارویی زنیان یعنی همان تیمول است (Crocoll et al. 2010; Crocoll, 2011) که در شرایط بهینه و به دور از تنش‌ها بیش از ۵۰٪ از اسانس زنیان را تشکیل می‌دهد (Bairwa et al. 2012). نتایج تحقیقات حاکی از آن است، که گیاهان اغلب در شرایط وجود تنش‌های محیطی از رشد کمتری برخوردار هستند، چرا که در حضور تنش‌ها مواد موجود را به افزایش سنتز ترکیبات ثانویه (ترکیبات ترپنی) اختصاص می‌دهند تا بقای خود را در شرایط سخت محیطی تضمین نمایند (Rezaei-Chiyaneh, 2011; Bettaieb et al. 2009; Rebey et al. 2012). در تحقیق حاضر، با اعمال تیمار هورمونی متیل جاسمونات میزان پیش‌ساز تیمول تغییر چشمگیری داشت؛ پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال تیمار میزان پیش‌ساز تیمول نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و به حداکثر رسید (جدول ۳). گاماترپین در نمونه شاهد ۶۳٪ از میزان کل اسانس گیاه را تشکیل می‌دهد که میزان آن پس از گذشت ۸ و ۲۴ ساعت به ۷۰ تا ۸۰ درصد افزایش یافت، در حالیکه پس از گذشت ۴۸ ساعت میزان آن کاهش و به ۷۴ درصد می‌رسد. نتایج به دست آمده، با نتایج حاصل از سایر مطالعات در این زمینه مطابقت دارد (Jamshidi et al. 2012; Rezaei-Chiyaneh, 2011). پس از تیمول، مونوترپن کارواکرول بالاترین فراوانی را دارد و برخلاف گاماترپین، با اعمال متیل جاسمونات سیر نزولی نشان داده است. تیمول و کارواکرول هر دو پیش‌ساز مشترک دارند بنابراین در حالت رقابتی افزایش در مقدار یک ترکیب باعث کاهش مقدار ترکیب دیگر می‌شود بنابراین رابطه معکوس

بین تولید این دو ماده وجود دارد. میزان این ترکیب در نمونه شاهد دارای بیشترین مقدار و پس از اعمال تیمار؛ به ویژه در ساعات اولیه پس از هورمون پاشی، میزان تولید آن به شکل قابل توجهی کاهش یافته است. در سایر مطالعات نیز نتایج مشابهی گزارش شده است (Rezaei-Chiyaneh, 2011).

جدول ۳. ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه دارویی زنیان.

Table 3. Chemical compounds found in essential oil of Ajowan.

ترکیبات	شاخص بازداری	نمونه شاهد	۸ ساعت بعد از	۲۴ ساعت بعد	۴۸ ساعت بعد از
Component	کواتس	Control sample	تیمار	از تیمار	تیمار
	Kovats retention index	(%)	8 hours after treatment (%)	24 hours after treatment (%)	48 hours after treatment (%)
α -thujene	925	0.34	0.25	0.26	0.33
α -Pinene	933	0.19	0.08	0.07	0.09
Sabinene	972	0.42	0.37	0.14	0.39
β -Pinene	977	3.09	0.58	0.22	0.29
β -Myrcene	990	1.02	1.20	1.23	1.13
α -Terpinene	1017	0.54	0.53	0.71	0.57
p-Cymene	1025	8.34	7.88	4.00	6.19
B-phellandrene + Limonene	1029	0.26	0.28	0.31	0.29
γ -Terpinene	1063	63.21	70.60	83.78	74.42
Carvacrol	1309	22.54	18.20	16.12	16.25

همان طور که می دانیم، از جمله مشکلات مطالعه بر روی عملکرد هورمون های گیاهی، چند وجهی بودن عملکرد آن هاست. به این مفهوم که، در ساعات متفاوت پس از اعمال هورمون، عملکردهای مختلفی مورد انتظار است. در نتیجه، تغییرات بیان (کاهش-افزایشی) ژن های *DXR* و *MECPS* در بازه های زمانی مورد مطالعه چندان دور از انتظار نخواهد بود. با این حال، ژن *GDS*، در بازه زمانی ۸ تا ۴۸ ساعت با روند افزایشی ثابت، عملکرد نسبتاً پایداری را نشان می دهد. آنچه حائز اهمیت است، افزایش در میزان بیان هر سه ژن مورد مطالعه پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال هورمون است. نتیجه این افزایش بیان، افزایش تولید γ -Terpinene پس از گذشت ۲۴

ساعت از اعمال هورمون متیل جاسمونات است. این امر توجیه مناسبی برای استفاده از هورمون مذکور در جهت افزایش تولید و خلوص ماده مؤثره تیمول در گیاه دارویی زنیان است.

نتیجه گیری: نتایج حاصل و بررسی مقادیر ترکیب‌های فعال ثانویه تحت تأثیر تیمار هورمونی متیل جاسمونات نشان داد، هورمون متیل جاسمونات می‌تواند محرکی برای مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها باشد. از آنجایی که تیمول اصلی‌ترین و مهم‌ترین ترکیب گیاه دارویی زنیان است، هر عاملی که باعث افزایش تولید و یا تغییر در میزان پیش‌سازهای آن شود، حائز اهمیت است. بنابراین افزایش ۲۰ درصدی پیش‌ساز آن (γ -Terpinene) در ترکیب‌های اسانس گیاه زنیان می‌تواند تأثیر چشمگیری در تولید و خلص‌سازی تیمول به‌همراه داشته باشد. با توجه به اینکه بیان هر ۳ ژن ساختاری با گذشت ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات افزایش یافته است، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش γ -Terpinene به‌عنوان پیش‌ساز تیمول، در ترکیب اسانس گیاه زنیان، در نتیجه افزایش فعالیت این ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز آن می‌باشد. اگرچه این افزایش تولید می‌تواند به دلیل تأثیر تیمار هورمونی بر کلیه ژن‌های دخیل در این مسیر باشد، اما با در نظر گرفتن نتایج حاضر می‌توان گذشت ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات را بعنوان بهترین تیمار جهت تأثیر حداکثری در بیان ژن‌های ساختاری و ترکیبات اسانس گیاه دارویی زنیان معرفی نمود. همان‌طور که می‌دانیم، از جمله مشکلات مطالعه بر روی عملکرد هورمون‌های گیاهی، چند وجهی بودن عملکرد آن‌هاست. به این مفهوم که، در ساعات متفاوت پس از اعمال هورمون، عملکردهای مختلفی مورد انتظار است. در نتیجه، تغییرات بیان (کاهش-افزایشی) ژن‌های *DXR* و *MECPS* در بازه‌های زمانی مورد مطالعه چندان دور از انتظار نخواهد بود. با این حال، ژن *GDS*، در بازه زمانی ۸ تا ۴۸ ساعت با روند افزایشی ثابت، عملکرد نسبتاً پایداری را نشان می‌دهد. آنچه حائز اهمیت است، افزایش در میزان بیان هر سه ژن ساختاری مورد مطالعه پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال هورمون است. نتیجه این افزایش بیان، افزایش تولید γ -Terpinene پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال هورمون متیل جاسمونات است. این امر توجیه مناسبی برای استفاده از هورمون مذکور در جهت افزایش تولید و خلوص ماده مؤثره تیمول در گیاه دارویی زنیان است.

References

- Aharoni A, Jongsma M, Kim T et al. (2006) Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochem Rev* 5, 49–58.
- Ashraf M, Orooj A (2006) Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* L. Sprague). *J Arid Environ* 64, 209–220.
- Bairwa M, Rajput M, Sachdeva S (2012) Modified Kuppaswamy's Socioeconomic Scale.

- Social Researcher Should Include Updated Income Criteria. *Indian J Community Med* 38, 185–186.
- Bettaieb I, Zakhama N, Aidi-Wannes N, Kchouk M, Marzouk B (2009) Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Sci Hortic* 120, 271–275.
- Bick J, Lange B (2003) Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch Biochem Biophys* 415, 146–154.
- Brouki milan E, Hassni L, Abdollahi Mandoulakani B et al. (2016) The effect of different concentrations of methyl jasmonate on the activity of antioxidant enzymes and total protein in basil. *J Crop Improv* 18, 103-115.
- Burlat V, Ou32din A, Courtois M, Rideau M, St-Pierre B (2004) Co- expression of three MEP pathway genes and geraniol 10- hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid- derive. *Plant J* 38, 131–141.
- Coroll C (2011) biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450 in oregano and thyme. PhD Thesis at the Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena and the Friedrich-Schiller-University, Jena. 96-108.
- Crocoll C, Asbach J, Novak J, Gershenzon J, Degenhardt J (2010) Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Mol Biol* 73, 587–603.
- Eblagh N, Fateh E, Farzane M, Osfuri M (2014) Effect of Cattle Manure Application, Phosphate Solubilizing Bacteria and Different Phosphorous Levels on Yield and Essence Components of *Trachyspermum ammi* L. *J Agri Sci Sustain Prod*, 35-45.
- Elyasi R, Majdi M, Bahramnejad b, Mirzaghaderi GH (2015) Expression analysis of genes involved in terpenes biosynthesis in black cummin (*Nigella sativa*) plants treated with methyl jasmonate. *Iranian J Plant Breed Genet Res* 24. 54-65.
- Ferreira F, David L, Luthria D, Sasaki T, Heyerick A (2010) Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules* 15, 3135–3170.

- Ghanadnia M, Hadad R, Zarrinkob F, Sharifi M (2011) Different expression of limonene synthase gene in the organs and developmental stages of *Cuminum cyminum* L. Iranian J Med Aromatic Plants 27, 495–508.
- Ghanati F, Bakhtiyarian S, Abdolmaleki P (2010) Effects of methyl jasmonate on the secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. JMBS 1, 20-30.
- Jamshidi E, Ghalavand A, Sefidkon F, Goltaph E (2012) Effects of different nutrition systems (organic and chemical) on quantitative and qualitative characteristics of Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) under water deficit stress. Iranian J Med Aromatic Plants 28, 309-323.
- Khajeh M, Yamini Y, Sefidkon F, Bahramifar N (2004) Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chem 86, 587–591.
- Krishnamoorthy V, Madalageri M (1999) Bishop weed (*Trachyspermum ammi* L.): an essential crop for north Karnataka. Med Aromat Plant Sci Biotech 21, 996–998.
- Lawrence B (2000) Ajowan oil compositional and bibliographical data. Perfume Flavourist 19, 13–20.
- Mahmoud S, Croteau R (2002) Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. Trends Plant Sci 7, 366–373.
- Majidi M, Karimzadeh G, Malboobi M (2014) Spatial and developmental expression of key genes of terpene biosynthesis in *Tanacetum parthenium*. Biol Plantarum 58, 379–384.
- Majnoon Hosseini N, Davazdah-Emami S (2007) Crops and the Production of Medicinal Plants and Spices. (K. Peter, Ed.) (Malhotra,). Tehran University Publications.
- Mirzahosseini SM, Sadat-Noori SA, Amanzadeh Y, Javid MG, Howyze MS (2017) Phytochemical assessment of some native ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) ecotypes in Iran. Ind Crops Prod 105, 142-147.
- Phillipson JD (2007) Phytochemistry and pharmacognosy. Phytochem 68, 2960–2972.
- Ramak P, Kazempour Osaloo S, Ebrahimzadeh H, Sharifi M, Behmanesh M (2012) Expression of gene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and its relation to monoterpene Carvacrol biosynthesis in *Satureja khuzestanica*. J Plant Res (Iran J Biol) 27, 622-634.
- Ramanujam S, Joshi B, Saxena MB (1964) Extent and randomness of cross-pollination in some umbelliferous spices of India. Indian J Genet Plant Breed 24, 62–67.

- Rebey B, Jabri-Karoui I, Hamroumi-Sellami I, Bourgou S, Limam F, & Marzouk B (2012) Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Ind Crops Prod* 36, 238–245.
- Rezaei-Chiyaneh E (2011) Effects of different irrigation treatments on essential oil accumulation, its composition and some ecophysiological traits in Fennel (*Foeniculum vulgare*). PhD thesis Department of Plant of Eco-physiological, Faculty of Agriculture, university of Tabriz, Tabriz. 329-338.
- Sadat-Noori S, Norouzi M, Karimzadeh G, Shirkoool K, Niazian, M (2017) Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)*, 1–9.
- Saydpour F, Sayyari M (2016) Impact of methyl jasmonate on Enhancing Chilling Tolerance of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Seedlings. *J Crop Prod Proc (JCPP)* 6, 47-59.
- Soltani Howyzeh M, Sadat-Noori SA, Shariati J (2018) Essential oil profiling of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) industrial medicinal plant. *Ind Crops Prod* 119, 255-259.
- Soltani Howyzeh M, Sadat-Noori SA, Shariati J, Amiripour M (2018) Comparative transcriptome analysis to identify putative genes involved in thymol biosynthesis pathway in medicinal plant *Trachyspermum ammi* L. *Sci Rep* 8. 1-19.
- Soltani Howyzeh M, Sadat-Noori SA, Shariati J, Amiripour M (2018) Identification of terpenoid backbone biosynthetic pathway genes in Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) by RNA-Seq. *Modern Genet J (MGJ)* 3, 133-141.
- Trapp S, Croteau R (2001) Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genet* 158, 811–832.
- Veau B, Courtois M, Oudin A, Chenieux J, Rideau M, Clastre M (2000) Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus* *Biochim Biochim Biophys. Biochim Biophys*, 159–163.