بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز و ارتباط آن با بیوسنتز مونوترپن کارواکرول در گیاه مرزه خوزستانی

پروین رامک[۱]، شاهرخ کاظم پور اوصالو*[۱]، حسن ابراهیم‌زاده[۲]، مظفر شریفی[۱] و مهرداد بهمنش[۳]

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

[۲] تهران، دانشگاه تهران، دانشکده زیست‌شناسی، گروه علوم گیاهی

[۳] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹

چکیده

گیاه دارویی مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) یک گیاه بومی می‌باشد که در مناطقی از جنوب ایران پراکنش دارد. مونوترپن کارواکرول عمده‌ترین ترکیب اسانس گیاه مرزه خوزستانی را تشکیل می‌دهد (≤۹۰٪) و این امر سبب خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه اسانس این گیاه شده است. در این تحقیق، ریز شاخه‌های مرزه خوزستانی در محیط LS به مدت ۲۱ روز تحت تأثیر غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) بازدارنده‌های فوسمیدومیسین و موینولین قرار گرفتند. سپس میزان کارواکرول در تیمارهای مختلف به وسیله HPLC سنجش و مقایسه شد. همچنین بیان ژن آنزیم- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز (DXR) در غلظت‌های ذکر شده و غلظت بهینه (۷۵ میکرو مولار) از بازدارنده های مذکور، در بازه زمانی صفر تا ۱۰۰ ساعت در مقایسه با نمونه شاهد، با روش Semi-quantitative RT-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که بازدارنده‌های بکار برده شده در بعضی از غلظت‌ها بر میزان کارواکرول و بیان ژن *DXR* اثر می‌گذارند و روند تغییرات به گونه‌ای است که می‌توان بخشی از تنظیم بیوسنتز کارواکرول را در سطح نسخه‌برداری از ژن *DXR* در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز، کارواکرول، مرزه خوزستانی، Semi-quantitative RT-PCR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۴۰۴، پست الکترونیکی: skosaloo@gmail.com

مقدمه

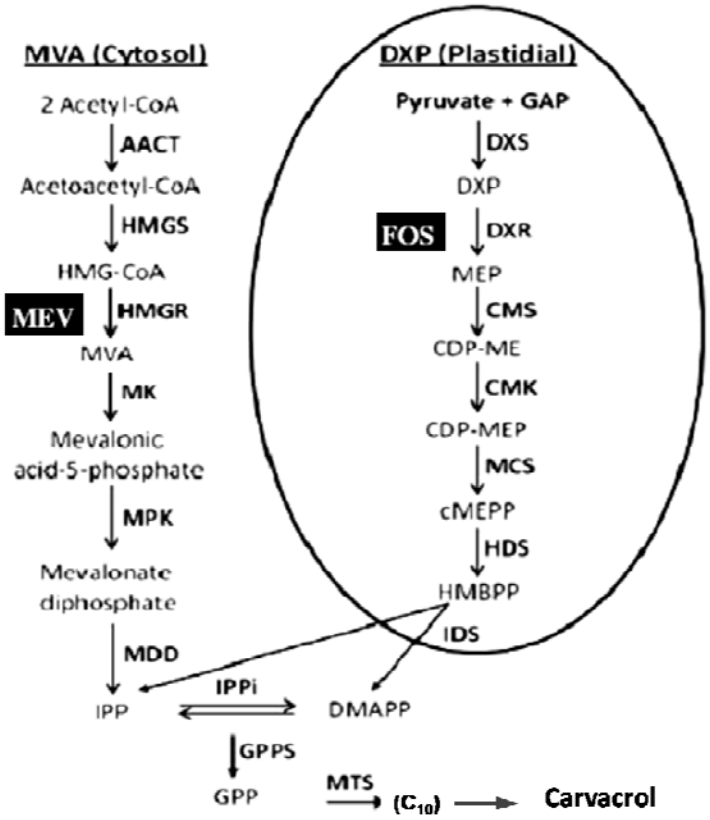
مونوترپن‌ها گروه بزرگی از ترپنوئیدها هستند که از سلولهای گیاهان تک لپه، دولپه، قارچ‌ها و جلبک‌ها ترشح می شوند و مثل همه ترپن های دیگر از ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP) و ایزومر آن دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) منشأ دارند. مونوترپن ها برای خود گیاه نقش دفاعی و حمایتی داشته و در جذب حشرات گرده افشان، دفع آفات و مقاومت در برابر تنش های محیطی به گیاه کمک می کنند. این مواد همچنین دارای ارزش صنعتی و دارویی فراوانی هستند و در اقتصاد و سلامت انسان ها نقش مهمی دارند (۵ و ۲۸).

تا قبل از کشف مسیر متیل اریتریتول فسفات کلروپلاستی (MEP)، تصور می شد که پیش ساز IPP در گیاهان همانند جانوران منحصراً از مسیر موالونات (MVA) تأمین می شود. Bach و Lichtenthaler در سال ۱۹۸۳ با به‌کار بردن ماده موینولین (mevinoloin) که بازدارنده اختصاصی آنزیم ۳- هیدروکسی متیل و ۳- متیل گلوتاریل کوانزیم A ردوکتاز (HMGR) می باشد، اظهار داشتند که احتمالا"

یک مسیر موالونات مجزا در کلروپلاست ها وجود دارد و احتمال حضور آنزیم HMGR کلروپلاستی را مطرح کردند. در سال ۱۹۹۶ مسیر MEP کلروپلاستی به‌وسیله تحقیقات Rohmer و همکاران قاطعانه ثابت گردید. هم اکنون این واقعیت پذیرفته شده است که پیش ساز IPP در گیاهان از دو مسیر کاملا" مجزا یعنی MVA سیتوسلی و MEP کلروپلاستی قابل تأمین است (۴۶). در گیاهان، آنزیم ۳- هیدروکسی متیل و ۳- متیل گلوتاریل کوانزیم A ردوکتاز (HMGR, EC 1.1.1.34) به عنوان آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتزی MVA شناخته شده است (۲۶) (شکل ۱). این آنزیم ماده ۳- هیدروکسی متیل و ۳- متیل گلوتاریل کوانزیم A را با استفاده از دو مولکول NADPH به موالونیک اسید تبدیل می کند، موالونیک اسید اولین حد واسط اختصاصی مسیر بیوسنتزی MVA می باشد.

چگونگی فعالیت آنزیم HMGR در گیاهان بسیار پیچیده‌تر از جانوران بوده و بر خلاف جانوران در گیاهان این آنزیم به‌وسیله یک خانواده ژنی کد می شود (۹، ۱۰، ۵۵ و ۵۹).

مسیر MEP کلروپلاستی با عمل یک آنزیم همچگالشی از نوع ترانس کتولاز تحت عنوان ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات سنتاز (DXS, EC 2.2.1.7) آغاز می گردد. این آنزیم ماده ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات (DXP) را با یک واکنش تراکمی بین دو پیش ساز گلیسرآلدئید فسفات و پیروات، سنتز می کند (۴۷). آنزیم بعدی که با عمل بر روی DXP تولید ۲-c- متیل اریتریتول۴- فسفات (MEP) می کند، آنزیم DXP ردوکتاز ایزومراز(DXR, EC 1.1.1.267) است که آخرین آنزیم در مسیر تولید MEP می باشد؛ پس از تولید MEP چند مرحله آنزیمی پیاپی دیگر تا تولید IPP وجود دارد (۲۷ و ۴۷) (شکل ۱).



شکل۱- مسیرهای بیوسنتزی متیل اریتریتول فسفات (MEP) و موالونات (MVA)، (منبع با اندکی تغییرات ۳۵)

AACT acetoacetyl-coenzyme A thiolase; ***CDP-ME*** **4**-(cytidine 5_-diphospho)-2-*C* methyl-D-erythritol; ***CDP-MEP*** **CDP-ME**-2-phosphate; ***cMEPP*** 2-*C*-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate; ***CMK*** 4-(cytidine 5_-diphospho) 2-*C*-methyl-D-erythritol kinase; ***CMS*** 2-*C*methyl- D-erythritol 4-phosphate transferase; ***DMAPP*** dimethylallyl diphosphate; ***DXP*** 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; ***DXR*** DXP reductoisomerase; ***DXS*** **DXP** synthase; ***FOS*** Fosmidomycine; ***GAP*** glyceraldehyde 3-phosphate; ***GPP*** geranyl diphosphate; *GPPS* GPP synthase; ***HDS*** 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate; ***HMBPP*** 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate synthase; ***HMG-CoA*** 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; ***HMGR*** HMG-CoA reductase; ***HMGS*** HMG-CoA synthase; ***IDS*** isopentenyl diphosphate/dimethylallyl diphosphate synthase; ***IPP*** isopentenyl diphosphate; ***IPPi*** IPP isomerase; ***MCS*** 2-*C*-methyl-D erythritol- 2,4-cyclodiphosphate synthase; ***MDD*** mevalonate diphosphate decarboxylase; ***MEP*** 2-*C* methyl-D-erythritol 4-phosphate; *MK* MVA kinase; ***MEV*** Mevinolin*;* ***MPK*** mevalonate-5-phosphate kinase; ***MTS*** monoterpene synthase; ***MVA*** mevalonate

مرزه خوزستانی (Satureja khuzistanica) گیاهی با خواص دارویی متعدد است که در جنوب غرب ایران رویش دارد. هشت جمعیت از این گیاه در استان های لرستان، ایلام و خوزستان (32°45′ N and 33°01 ′ N)، در ارتفاع ۱۱۰۰– ۴۹۰ و در مناطق سنگلاخی و خاک های فقیر با اسیدیته ۷/۹ تا ۸/۲ پراکنش دارند. میزان مونوترپن کارواکرول در اسانس جمعیت های این گیاه ۹۵٪–۸۹/۵٪ می باشد (۲۱).

کارواکرول ($C_6H_3CH_3(OH)(C_3H_7$) یک مونوترپن تک حلقه ای است که در اسانس بعضی از گیاهان تیره نعناع همانند پونه کوهی (oregano)، آویشن (thyme) و مرزه (savory) با غلظت بالا دیده می شود (۸، ۱۸ و ۵۳). کارواکرول مشتق هیدروکسیله P – سیمن (p-Cymene, C10H14) می باشد و به دلیل حضور گروه هیدروکسیل در ساختارش، اثرات ضد میکروبی بمراتب قویتر از پیش سازش دارد (۵۷). قدرت میکروب‌کشی کارواکرول، همانند دیگر مواد فنلی به دلیل افزایش نفوذپذیری غشاء های میکروارگانیسم ها نسبت به پروتون و پتاسیم و در نتیجه از بین رفتن نیروی محرک پروتونی غشاها، عدم کارایی پمپ های پروتونی و تخلیه انرژی می باشد. همچنین تغییرات شدید اسیدیته درون سلولی و به دنبال آن تشکیل اکسیژن های فعال، سبب اکسیداسیون چربی ها و پروتئین ها شده و در نهایت سبب فروپاشی سلول می گردد (۲۴ و ۵۸).

میزان خلوص بالای کارواکرول در اسانس این گیاه یک ویژگی منحصر به فرد است که با توجه به اطلاعات ما، تاکنون در گیاه دیگری گزارش نشده است. همین امر سبب شده است تا در سال های اخیر تحقیقات داروشناسی و پزشکی زیادی روی اثرات ضد ویروسی، ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی دیابتیک و آنتی‌اکسیدانت برخی اجزای سازنده اسانس این گونه صورت بگیرد (۱، ۲، ۳، ۶، ۷، ۲۰، ۲۲، ۳۳، ۴۹، ۵۰ و ۵۴). البته نباید فراموش کرد که عملکرد اسانس در این گیاه پائین است (۲۲ و ۴۹)، ازاین‌رو شناخت عملکرد فیزیولوژی و مولکولی آنزیم های دخیل در مسیر بیوسنتز مونوترپن کارواکرول در گیاه مرزه خوزستانی، اولین قدم در مسیر بکارگیری ابزارهای مهندسی متابولیت برای افزایش عملکرد اسانس در این گیاه خواهد بود.

موینولین از گروه استاتین ها (Statins) با فرمول شیمیایی $C_{24}H_{36}O_5$ و وزن مولکولی g/mol ۴۰۴، در مسیر بیوسنتزی MVA به عنوان بازدارنده اختصاصی آنزیم کلیدی HMGR شناخته شده است (۹، ۳۷ و ۵۵) و فوسمیدومیسین با فرمول شیمیایی $C_4H_{10}NO_5P$ و وزن مولکولی g/mol ۱۸۳ به لحاظ ساختاری همساخت ۲–c– متیل–D–اریتروز ۴– فسفات (DXP) بوده و با اشغال جایگاه فعال آنزیم کلیدی DXR، شناخته‌شده‌ترین بازدارنده اختصاصی مسیر MEP می باشد (۱۹، ۳۲، ۳۴ و ۶۲). این بازدارنده ها تاکنون دست‌مایه تحقیقات متعددی در چگونگی شناخت فیزیولوژی و مولکولی مسیرهای بیوسنتزی MEV و MEP، نقش این مسیرها در بیوسنتز محصولات نهایی (End product) و نیز میزان مشارکت

(Crosstalk) این دو مسیر در بیوسنتز انواع ترپن ها در گیاهان مختلف بوده اند (۴، ۳۶، ۳۷ و ۵۶).

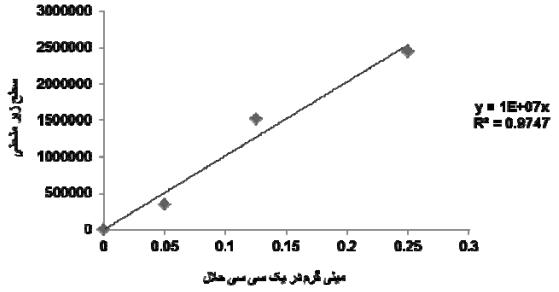
مواد و روشها

مواد گیاهی و اعمال تیمار: ریز شاخه های (Shoot culture) ۳cm گیاه مرزه خوزستانی که در محیط درون شیشه تکثیر شده بودند (۴۴) در محیط غذایی LS (۳۸) که محتوی بازدارنده های مویولین و فوسمیدومیسین در پنج غلظت (۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرو مول در لیتر) بود به مدت ۲۱ روز کشت شدند. محیط عاری از بازدارنده ها هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. شیشه های کشت در ژرمیناتور با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای c° ۲۵ قرار داده شدند.

بازدارنده ها: مویولین (Sigma, M2147) به روش Rodriguez-Conception و Gruissem (۱۹۹۹) به فرم فعال تبدیل شد و بعد استوک اصلی به وسیله آب دیونیزه به غلظت mM ۱۰ تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد. فوسمیدومیسین (Sigma, F8682) در آب دیونیزه حل و استوک اصلی با غلظت mM ۱۰ در دمای ۲۰- نگهداری شد.

استخراج عصاره و سنجش کارواکرول: به‌منظور استخراج کارواکرول از روش Ji و همکاران (۲۰۰۴) با اندکی تغییرات استفاده شد، به این صورت که: ۲/. گرم از ماده تر گیاهی در ۱۰ میلی لیتر اتانل ۹۵٪ سائیده شده و پس از ۳۰ دقیقه شیک شدن به مدت یک ساعت سونیکیت شد (2200EP S3-50HZ). عصاره استخراج شده به وسیله دستگاه های HPLC و GC/MS مورد سنجش قرار گرفت.

دستگاه HPLC مدل UV/Vis detector 2500 (Knauer) و ستون بکاربرده شده ODS3 (C18: 250mm-4.6mm) بود. طول موج دستگاه روی ۲۷۴ نانومتر تنظیم شد، سرعت جریان حلال نیز ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه و فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک، حاوی متانل، آب و استیک اسید (۸۰ : ۲۰ : ۱ درصد) بود. میزان کارواکرول در نمونه ها بر اساس سطح زیرمنحنی و با استفاده از منحنی استاندارد و حجم محلول نهایی محاسبه گردید. منحنی استاندارد کارواکرول براساس سطح زیرمنحنی ترکیب کارواکرول (sigma, 282197) در سه غلظت ۰/۳، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در یک سی سی حلال استونیتریل (Merck) به‌دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی استاندارد کارواکرول

همچنین از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) از شرکت Agilent Technology (HP)، مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، برای تفکیک و شناسایی ترکیبات موجود در عصاره اتانلی استخراج شده از نمونه ها استفاده شد. برنامه حرارتی ستون از c°۶۰ شروع شده و پس از ۵ دقیقه توقف در همان دما، به تدریج با سرعت ۳ درجه در دقیقه افزایش یافته تا به c°۲۱۰ رسید. دمای محفظه تزریق c°۳۰۰ بود و دتکتور دستگاه GC از نوع FID بود که دمای آن c°۲۷۰ تنظیم شد. از گاز هلیم به عنوان گاز حامل استفاده شد که فشار ورودی به ستون برابر $^{-2}$۳Kgcm بود. مدل طیف نگار جرمی مورد استفادهTechnologies 5973 Network بود که مجهز به دتکتور Mass selective با ستون HP-5 (30 m × 0.25 mm id) بود. برنامه‌ریزی حرارتی ستون شبیه به برنامه‌ریزی دستگاه GC بود، با این تفاوت که دمای نهایی ستون تا c°۲۵۰ بالا برده شد. دمای محفظه تزریق c°۱۰

بالاتر از دمای نهایی ستون (۲۶۰°c) تنظیم شد و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود.

در تحلیل‌های آماری، از داده های حاصل از هر دو روش HPLC و GC/MS برای تعیین مقدار کارواکرول موجود در نمونه ها استفاده شد.

طراحی آغازگرها: از آنجائیکه در پایگاه بین المللی NCBI، گزارشی از توالی ژن۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز از گونه های سرده مرزه موجود نبود، ازاین‌رو با الگو قراردادن توالی ژن۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز در گیاه Salvia militorrhiza (FJ768959.1) و بلاست کردن توالی این ژن با نرم‌افزار تحت وب NCBI Blast و همردیف سازی توالی های بدست‌آمده با نرم‌افزار تحت وب ClastaW نوکلئوتیدهای تغییر نیافته مشخص و با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Raner و Oligo5 آغازگرها طراحی شدند.آغازگرها به وسیله شرکت کره ای BIONEER با درجه خلوص(HPSF) High Purified Salt Free به صورت لیوفیلیز ساخته شدند. در ادامه از آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر cDNA با طول قطعات ۳۷۵ bp استفاده شد. محصول PCR توسط یک شرکت کره ای (Macrogen) تعیین توالی شد و توالی مذکور پس از تأیید نهایی با Accession number (AB677954) در پایگاه بین المللی NCBI ثبت گردید.

واکنش زنجیره ای ترنس کریپتاز معکوس (RT-PCR): RNA کل از برگ ها با استفاده از RNX (RNA extraction solution) و مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده (Cinagene) استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز، نانو درآپ و اسپکتروفتومتر (WPA, Biowave II) ارزیابی گردید. ۱۰۰ نانو گرم از RNA کل با استفاده از اولیگومرتیمیدین (Oligo- dT_{18}) به عنوان آغازگر (Primer) برای ساختن cDNA با استفاده از کیت (Cinagene) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد.

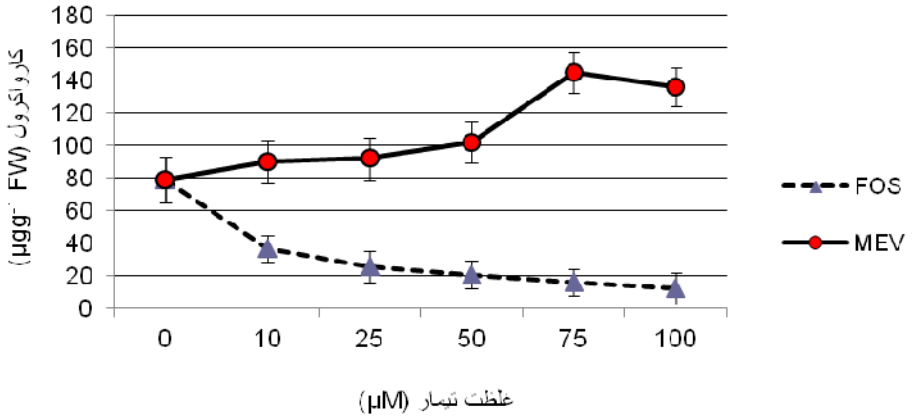
بررسی بیان ژن۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز (*DXR*): به‌منظور بررسی بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز (*DXR*) از دو دسته آغازگرهای طرحی شده، پیشرو 5'- CCTTTCGTCCTTCCTCTTGC-3' و برگشتی 5'- ATG AAT CCT GTG TTT CGA CC-3' استفاده شد و برای کنترل داخلی از آغازگرهای اختصاصی پیشرو- 5' GCA GGG ATC CAC GAG ACC ACC -3' و برگشتی 5'- CCC ACC ACT GAG CAC AAT GTT CC -3' برای تکثیر cDNA ژن اکتین (House keeping)، متعلق به گیاه *Linum usitatissimum* که از سایت NCBI با Accession number (GR508908) بدست آمد، در RT-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، همچنین تعداد مناسب چرخه ها و دمای بهینه اتصال (Annealing) با استفاده از گرادیان چرخه ها و دما برای هریک از ژن ها، تعیین گردید. بهترین شرایط تکثیر تعداد ۳۵ چرخه تعیین شد که مبنای انتخاب بر اساس نرسیدن به وضعیت ثابت در تکثیر محصول PCR بود، همچنین بهترین دمای اتصال پرایمرها برای ژن *DXR* ۵۲°c و برای اکتین ۵۸°c تعیین شد. چرخه های دمایی مورد استفاده PCR به‌ترتیب شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه بود که بعد ۳۵ چرخه با ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال برای ژن اکتین (۵۸°c) و ژن *DXR* (۵۲°c) به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر نهایی در ۷ دقیقه دنبال شد. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز (۱٪) الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) به مدت ۳۰ دقیقه مشاهده و عکسبرداری شد. برای ارزیابی کمی بیان ژن ها از مقایسه شدت چگالی

باندهای ژن نسبت به کنترل داخلی و از نرم‌افزار Image Guage var.4 استفاده شد. برای تعیین ماهیت و صحت عملکرد آغازگرهای اکتین، قطعات حاصل از PCR برای تعیین توالی به شرکت سینا ژن ارسال شد. بیان ژن *DXR* در تیمارهای مونولین و فوسمیدومیسین با غلظت های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار سنجیده شد و همچنین بیان این ژن در تیمار های ۷۵ میکرو مولار مونولین و فوسمیدومایسن (غلظت های بهینه) در بازه زمانی صفر تا ۱۰۰ ساعت در مقایسه با نمونه شاهد مورد سنجش قرار گرفت. برای بررسی بیان ژن از هر تیمار حداقل دو تکرار مستقل (هر تکرار شامل ترکیب همگن حداقل سه ریز شاخه بود که به طور مجزا تیمار داده شده بودند) استفاده شد و از میانگین بیان ژن ها در هر تیمار برای ارزیابی نهایی استفاده شد.

تحلیل آماری: آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی اجرا شد و برای ارزیابی اثر تیمارها بر فاکتورهای مورد سنجش، داده ها با نرم افزار SPSS Var.18 آنالیز واریانس شدند و مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن و با ضریب اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده ها نشان داد که فوسمیدومیسین سبب کاهش شدید مقدار کارواکرول در گیاه تحت تیمار شده است (شکل ۳)، به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰µM مقدار کارواکرول به کمتر از ۱۶ میکروگرم در گرم وزن تر رسید.



شکل ۳- اثر تیمارهای مونولین و فوسمیدومیسین بر میزان کارواکرول

اسپری فوسمیدومیسین بر روی برگ های درخت هوآ (*Hevea brasiliensis*)، سبب کاهش شدید مونوترپن های سابینن (Sabinene)، آلفا و بتا پینن شده است (۱۵)، همچنین تحقیقات Loreto و همکارانش (۲۰۰۴) بر روی گیاه بلوط سبز (*Quercus ilex*) نشان داد که فوسمیدومیسین با غلظت ۳۰ میکرومول سبب کاهش سریع در ترشح مونوترپن های سابینن، آلفاپینن و بتاپینن از برگ های این گیاه شد، به‌طوری‌که پس از گذشت یک ساعت مقدار ترشح مونوترپن های ذکر شده تقریبا" به صفر رسید. مطالعاتی که روی تغییرات مهندسی متابولیت ها در گونه *Mentha×Piperita* از تیره نعناع (Lamiaceae) انجام شده حکایت از آن داشت که منبع اصلی تأمین پیش سازهای IPP و DMAPP برای بیوسنتز مونوترپن ها در این گیاه، مسیر MEP کلروپلاستی می‌باشد (۶۰). همچنین روشن

شده است که فراهمی این پیش سازها یک عامل تعیین کننده در بیوسنتز مونوترپن ها می‌باشد (۴۱). اما مطالعات Schuhr و همکاران روی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) در سال ۲۰۰۳ شواهدی دال بر مشارکت دو مسیر MVA سیتوسلی و MEP کلروپلاستی در تأمین پیش سازهای IPP و DMAPP برای تولید مونوترپن ها ارائه می‌دهد و تحقیقات Hampel و همکاران روی گیاه تمشک (*Fragaria×ananassa*) در سال ۲۰۰۷ نشان داد که مسیر MEP کلروپلاستی هیچ نقشی در بیوسنتز مونوترپن های الفا پینن (α-pinene)، لینالول (linalool)، آلفا و بتا ایونون (α-and β-ionone) ندارد و مسیر MVA سیتوسلی بیوسنتز مونوترپن های ذکر شده را عهده‌دار می‌باشد.

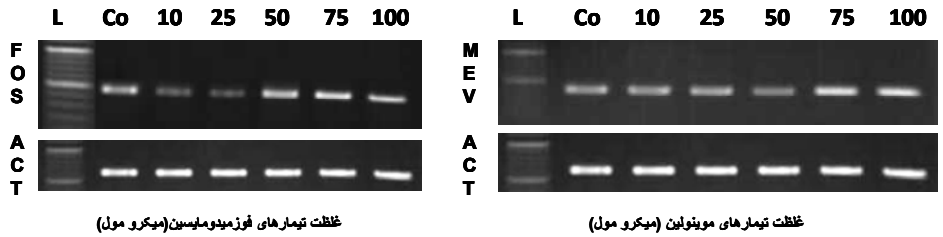
نتایج این تحقیق نشان داد که بازدارنده موینولین در غلظت های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار بر میزان کارواکرول بی تأثیر بوده اما غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از این بازدارنده سبب افزایش معنی‌دار میزان کارواکرول نسبت به شاهد شده اند. تحقیقات Dudareva و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی گیاه گل‌میمون (*Antirrhinum majus*) نیز نشان داده است که غلظت ۵۰ میکرومول از بازدارنده موینولین تأثیری بر بیوسنتز مونوترپن ها در این گیاه ندارد. گزارشی در خصوص اثر افزاینده موینولین بر مونوترپن‌ها موجود نمی‌باشد. اما می توان گفت، افزایش مونوترپن کارواکرول در غلظت های بالای موینولین (۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) می‌تواند نتیجه نوعی پاسخ دفاعی و سازگاری گیاه مرزه خوزستانی برای مقابله با آثار موینولین باشد، زیرا برخی تحقیقات نشان داده اند که سلول های گیاهی وقتی به مدت طولانی در معرض موینولین قرار می‌گیرند، سعی می‌کنند (به حد امکان) خود را با شرایط سازگار نمایند، ازاین‌رو اقدام به خنثی سازی (Neutralized) موینولین به وسیله آنزیم هایی خاص می‌کنند (۲۵)، آنزیم های عضو خانواده سیتوکروم P450 از مهمترین آنزیم هایی هستند که در این خنثی سازی مشارکت می‌کنند (۳۰). البته همبستگی مثبت بین میزان بیان و فعالیت برخی آنزیم های عضو خانواده سیتوکروم P450 با بیوسنتز کارواکرول، تیمول (۱۶)، ترنس کاروئول، ترنس ایزو پیپرتنئول (۴۲) و دیگر مونوترپن ها در تحقیقات متعددی تأئید شده است (۱۱ و ۱۳).

آنالیزهای نیمه کمی با نرم‌افزار Image Guage و همچنین تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری بیان ژن *DXR* در غلظت های مختلف از بازدارنده های موینولین و فوسمیدومیسین نشان داد (شکل ۴) که میزان بیان ژن *DXR* در تیمارهای فوسمیدومیسین با غلظت های ۱۰ و ۲۵ میکرو مولار به لحاظ آماری نسبت به شاهد معنی دار نیست، اما غلظت های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرو مولار فوسمیدومیسین سبب افزایش معنی دار در بیان ژن *DXR* شده‌اند. همچنین رد گیری بیان ژن *DXR* در مسیر زمان (Time-course gene expression) (شکل ۵) نشان می‌دهد که بیان ژن *DXR* در نمونه شاهد از زمان صفر تا ۱۰۰ ساعت تغییر معنی داری نشان نداده است و تیمار ۷۵ میکرو مولار فوسمیدومیسین در ساعت های ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ سبب افزایش معنی دار بیان ژن *DXR* نسبت به شاهد شده است، در صورتیکه پس از ۲۴ ساعت بیان این ژن دچار کاهش معنی داری نسبت به شاهد شده است.

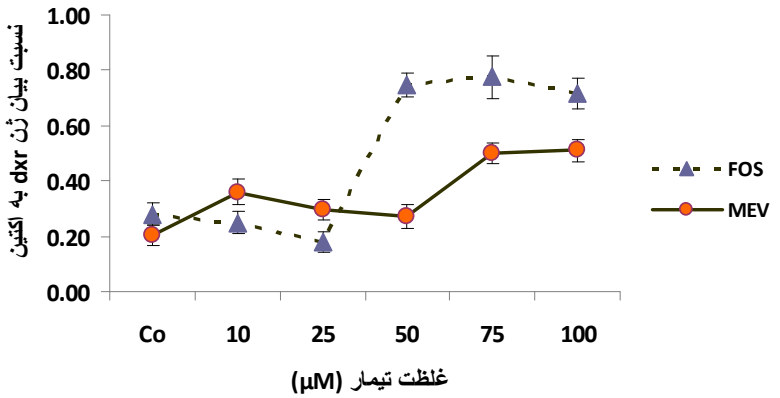
تحقیقات Carretero-Paulet و همکاران (۲۰۰۲) نشان داده که یک ساعت پس از تیمار گیاهچه های آرابیدوپسیس با فوسمیدومیسین، بیان ژن و میزان پروتئین آنزیم DXR به بیشترین مقدار نسبت به نمونه شاهد رسید که این امر می‌تواند ناشی از یک تنظیم بازخورد منفی (feedback suppression) در پاسخ به مسدود شدن شدید فعالیت آنزیم DXR به وسیله فوسمیدومیسین باشد. همچنین در سوسپانسیون سلولی گیاه تاکسوس چینی، بازدارنده های فوسمیدومیسین و موینولین سبب تحریک بیان ژن آنزیم DXR (*Taxus chinensis*) شدند (۶۳). اما گزارش Laule و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که بیان ژن کد کننده آنزیم DXR در نمونه های تحت تیمار بازدارنده های موینولین و

فوسمیدومیسین نسبت به شاهد تغییر معنی داری نداشته و تحت تأثیر این بازدارنده ها قرار نمی‌گیرد. غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ میکرو مولار مویونولین سب افزایش معنی دار بیان ژن *DXR* شده‌اند، در حالیکه غلظت های۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرو مولار از این بازدارنده بر بیان ژن *DXR* بی اثر بوده‌اند (شکل ۴). همچنین بررسی هایی که بر روی بیان ژن *DXR* در غلظت ۷۵ میکرومولار در مسیر زمان (Time-course gene expression) (شکل ۵) انجام شد، نشان داد که تیمار ۷۵ میکرومولار مویونولین سبب افزایش بیان ژن *DXR* از ساعت ۳ تا ۴۸ شده است که البته پس از طی ۴۸ ساعت بیان ژن *DXR* نسبت به شاهد تغییر معنی داری را نشان نداد. البته مقایسه این داده ها با میزان بیوسنتز کارواکرول (شکل ۳)، یک همبستگی مثبت بین افزایش بیان ژن *DXR* و بیوسنتز کارواکرول را در گیاه مرزه خوزستانی نشان می‌دهد.

(الف)



(ب)

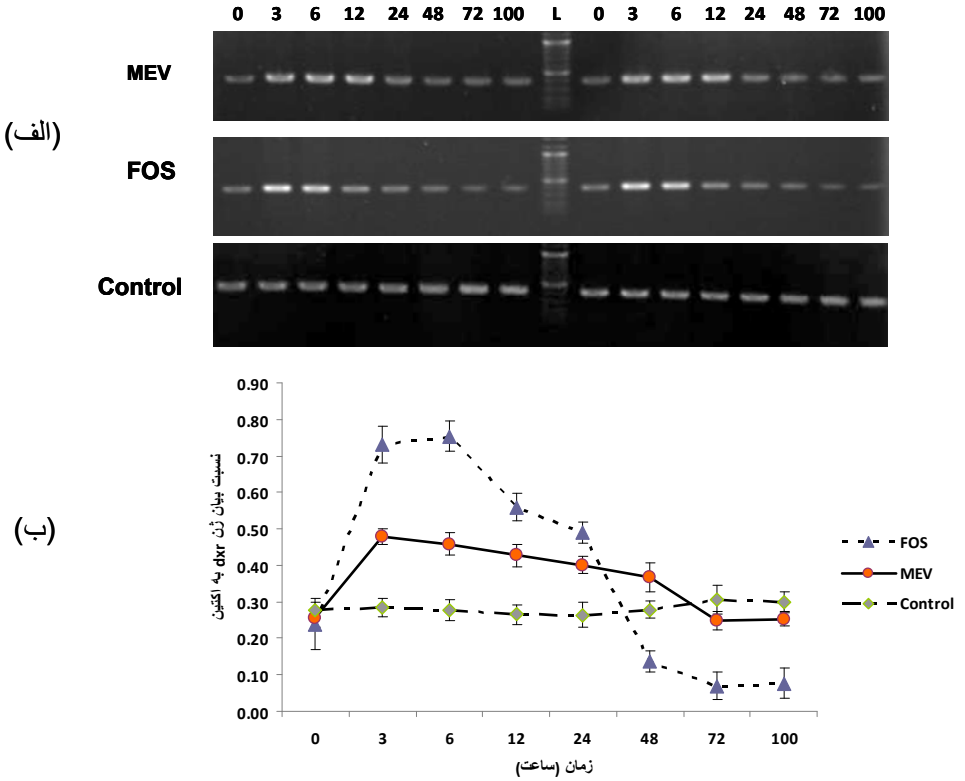


شکل۴- بررسی بیان ژن *DXR* در غلظت‌های مختلف بازدارنده های مویونولین و فوسمیدومیسین در گیاه مرزه خوزستانی، الف) تصویر الکتروفورزی محصول PCR ژن *DXR* و اکتین (کنترل داخلی)، ب) اندازه‌گیری مقدار نسبی بیان ژن *DXR* در غلظت‌های مختلف مویونولین و فوسمیدومیسین با استفاده از نرم‌افزار Image Guage

MEV Mevinolin; **FOS** Fosmidomycin; **ACT** Actin

هرچند نقش تنظیمی آنزیم DXR در بیوسنتز مونوترپن ها بستگی به نوع گیاه، بافت و مرحله نمو دارد، اما گزارش‌هایی در خصوص تنظیم در سطح بیان این ژن و همبستگی مثبت بین میزان بیان ژن *DXR* و تولید مونوترپن های مشتق از مسیر MEP کلروپلاستی موجود می باشد. در گیاه تراریخت نعناع (*Mentha piperita*)، افزایش بیان ژن *DXR*، سبب افزایش معنی دار مونوترپن های موجود در اسانس این گیاه نسبت به نمونه وحشی (wild type) شد و در مقابل، خاموش کردن جزئی (partial gene silencing) ژن *DXR* در این گیاه سبب کاهش شدید مونوترپن ها شد (۴۰). همچنین تحقیقات McConkey و همکاران (۲۰۰۰) نیز همبستگی بین میزان فعالیت و بیان ژن آنزیم های مسیر

MEP و بیوسنتز مونوترپن ها را در نعناع (*Mentha piperita*×) تأیید می‌کند، اما این همبستگی در گیاه ریحان (Ocimum basilicum) بسیار ضعیف گزارش شده است (۲۹)؛ البته گزارش‌های Besser و همکاران (۲۰۰۹)، Xie و همکاران (۲۰۰۸) و Schmiderer و همکاران (۲۰۱۰) تنظیم بیوسنتز مونوترپن ها را در سطح بیان ژن *DXR* تأیید نمی‌کنند و مکانیسم های پس از رونوشت برداری (posttranscriptional regulatory mechanisms) را بر بیوسنتز مونوترپن ها مؤثر می‌دانند.



شکل۵- رد گیری بیان ژن *DXR* در مسیر زمان (Time-course gene expression) در غلظت ۷۵ میکرومولار از بازدارنده‌های موینولین و فوسمیدومیسین در گیاه مرزه خوزستانی، الف) تصویر الکتروفورزی محصول PCR ژن *DXR* در تیمارهای موینولین، فوسمیدومیسین و کنترل، ب) اندازه‌گیری مقدار نسبی بیان ژن *DXR* در بازه زمانی صفر تا ۱۰۰ ساعت در تیمارهای موینولین، فوسمیدومیسین و کنترل با استفاده از نرم‌افزار Image Guage

اگرچه توضیح چگونگی مکانیسم تنظیمی بیان ژن *DXR* بر بیوسنتز مونوترپن کارواکرول در گیاه مرزه خوزستانی نیازمند شواهد مستدل بیشتری می‌باشد، اما به احتمالی می‌توان گفت که بیوسنتز مونوترپن کارواکرول در گیاه مرزه خوزستانی بطور عمده از مسیر MEP صورت می‌گیرد و آنزیم DXR در تنظیم بیوسنتز مونوترپن کارواکرول نقش داشته و میزان فعالیت آنزیم مذکور در سطح نسخه‌برداری ژن (Transcriptional regulation) کنترل می‌شود.

منابع

۱. سفیدکن، ف .، صادق زاده، ل.، تیموری، م.، عسگری، ف و احمدی، ش. (۱۳۸۶). بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس دو گونه مرزه *Satureja bachtiarica* Bunge و *Satureja khuzistanica* Jamzad در دو مرحله برداشت . فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد 23 ، شمارهٔ2

۲. مجد، ا .، نژادستاری، ط.، خاوری نژاد، ر.ع .، دوستی، ب. (۱۳۸۷). بررسی تغیرات کمی و کیفی ترکیبات سازنده اسانس گونه دارویی مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) در طول تکوین گیاه و خواص ضد میکروبی اسانس آن در شرایط in vitro. مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، جلد۱۸، شماره۷۰/۱

3. Abdollahi, M.; Salehnia, A.; Mortazavi, SH.; Ebrahimi, M.; Shafiee, A.; Fouladian, F. (2003). Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of *Satureja khuzistanica* in rat in vivo: a oxicopharmacological study. Medicinal Scienc Monitor, 9: 331–335.
4. Adam, K.; Zapp, J. (1998). Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. Phytochemical Analysis, 48: 953–959.
5. Aharoni, A.; Jongsma, M.A.; Bouwmeester, H.J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. Trends in Plant Science,10 : 594–602.
6. Amanlou, M.; Dadkhah, F.; Salehnia, A.; Farsam, H.; Dehpour, A.R. (2005). An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzistanica* Jamzad extract. Journal of Pharmaceutical Sciences, 8: 102–6.
7. Amanlou, M.; Fazeli, M.R.; Arvin, A.; Amin, H.G.; Farsam, H. (2004). Antimicrobial activity of crude methanolic extract of *Satureja khuzistanica*. Fitoterapia, 75: 768–70.
8. Arrebola, M. L.; Navarro, M.C.; Jime´nez, J.; Oca´na, F.A. (1994). Yield and composition of the essential oil of Thymus serpylloides subsp serpylloides. Phytochemistry, 1: 67–72.
9. Bach, T.J.; Lichtenthaler, H.K. (1983). Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation. Physiologia Plantarum, 59: 50–60.
10. Bach, T.J.; Wettstein, A.; Boronat, A.; Ferrer, A.; Enjuto, M.; Gruissem, W.; Narita, J.0. (1991). Properties and molecular cloning of plant HMG-CoA reductase. In Physiology and Biochemistry of Sterols. G. W. Patterson and W. D. Nes, editors. American Oil Chemist's Society, Champaign, IL. 29-49.
11. Bertea, C.M.; Schalk, M.; Karp, F.; Maffei, M.; Croteau, R. (2001). Demonstration That Menthofuran Synthase of Mint (Mentha) Is a Cytochrome P450 Monooxygenase: Cloning, Functional Expression, and Characterization of the Responsible Gene. Archives of Biochemistry and Biophysics, 390: 279-286
12. Besser, K.; Harper, A.; Welsby, N.; Schauvinhold, I.; Slocombe, S.; Li, Y.; Dixon, R.A.; Broun, P. (2009). Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. Plant Physiology, 149: 499–514.
13. Bouwmeester, H.J.; Gershenzon, J.; Konings, M.C.J.M.; Croteau, R. (1998). Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway - I. Demonstration of enzyme activities and their changes with development. Plant Physiology, 117: 901-912
14. Carretero-Paulet, L.; Ahumada, I.; Cunillera, N.; Rodriguez-Concepcion, M.; Ferrer, A.; Boronat, A.; Campos, N. (2002). Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis DXR* gene encoding 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-Methyl-Derythritol- 4-phosphate pathway; Plant Physiology. 129: 1581–1591
15. Chen, J.W.; Bai, K.D.; Cao, K.F. (2009). Inhibition of monoterpene biosynthesis accelerates oxidative stress and leads to enhancement of antioxidant defenses in leaves of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Acta Physiologiae Plantarum, 31: 95–101.
16. Crocoll, C. (2011). Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. PhD Thesis, Friedrich Schiller-Universität, Jena.
17. Dudareva, N.; Andersson, S.; Orlova, I.; Gatto, N.; Reichelt, M.; Rhodes, D.; Boland, W.; Gershenzon, J. (2005). The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102: 933–938.
18. Farsam, H.; Amanlou, M.; Radpour, MR.; Salehnia, A,N.; Shafiee, A. (2004). Composition of the essential oils of wild and cultivated *Satureja khuzistanica* Jamzad from Iran. Flavour and Fragrance Journal, 19 : 308-310.
19. Fellermeier, M.; Kis, K.; Sagner, S.; Maie,r U.; Bacher, A.; Zenk, M.H. (1999). Cell-free conversion of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate and 2-*C*-methyl-d-erythritol 4-phosphate into _-carotene in higher plants and its inhibition by fosmidomycin. Tetrahedron Letters, 40: 2743–2746.
20. Ghazanfari, G.; Minaie, B.; Yasa, N.; Nakhai, A.L.; Nikfar, A. (2006). Biochemical and

histopathological evidences for beneficial effects of *Satureja khuzistanica Jamzad* essential oil on the mouse model of inflammatory bowel disease. Toxicology Mechanisms and Methods, 16: 365-372.

21. Hadian, J.; Mirjalilia, M.H.; Kananib, M.R.; Salehnia, A.; Ganjipoor, P. (2011). Phytochemical and Morphological Characterization of Satureja khuzistanica Jamzad Populations from Iran. Chemistry and Biodiversity, 8: 902-915.

22. Haeri, s.; Minaie, B.; Amin, G.; Nikfa,r S.; Khorasani, R.; Esmaily, H. (2006). Effect of *Satureja khuzistanica* essential oil on male rat fertility. Fitoterapia, 77: 495-499.

23. Hampel, D.; Swatski, A.; Mosandl, A.; Wüst, M. (2007). Biosynthesis of Monoterpenes and Norisoprenoids in Raspberry Fruits (*Rubus idaeus* L.): The Role of Cytosolic Mevalonate and Plastidial Methylerithritol Phosphate Pathway.

24. Helander, I. M.; Alakomi, H-L.; Latva-Kala, K.; Mattila- Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E. J.; Gorris, L. G. M.; Wright, V.A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 3590–3595.

25. Hemmerlin, A.; Bach, T.J. (1998). Effects of mevinolin on cell cycle progression and viability of tobacco BY-2 cells. Plant Journal, 14: 65–74.

26. Hemmerlin, A.; Hoeffler, J.F.; Meyer, O.; Tritsch, D.; Kagan, I.A.; Billiard, C.G.; Rohmer, M.; Bach, T.J. (2003). Cross-talk between the Cytosolic Mevalonate and the Plastidial Methylerythritol Phosphate Pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells The Journal of Biological Chemistry, 29: 26666-26676.

27. Herz S, Wungsintaweekul J, Schuhr CA, Hecht S, Lu¨ ttgen H, Sagner S, Fellermeier M, Eisenreich W, Zenk MH, Bacher A (2000) Biosynthesis of terpenoids: ygbB protein converts 2-phospho-4-(cytidine 5_-diphospho)-2- *C*-methyl-d-erythritol to 2-*C*-methyl-d-erythritol 2,4- cyclodiphosphate. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97: 2486–2490.

28. Holopainen, J,K.; Gershenzon, J. (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. Trends in Plant Science, 15: 176-184.

29. Iijima, Y.; Davidovich-Rikanati, R.; Fridman, E.; Gang, D.R.; Bar, E.; Lewinsohn, E.; Pichersky, E. (2004). The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. Plant Physiology, 136: 3724–3736.

30. Jacobsen, W.; Kirchner, G.; Hallensleben, K.; Mancinelli, L.; Deters, M.; Hackbarth, I. (1999). Comparison of cytochrome P-450-dependent metabolism and drug interactions of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl- CoA reductase inhibitors lovastatin and pravastatin in the liver. Drug Metabolism and Disposition, 27: 173–179.

31. Ji, L.; Wang, F.; Liu, Y. Y.; Tong, Y.; Li, X. D.; Feng, X. F. (2004). Determination of carvacrol and thymol in Mosla chinensis by HPLC. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 29: 1030–1032.

32. Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altinciek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Turbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthale,r H.K. (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. Science, 285: 1573–1576.

33. Kheirandish, F; Delfan, B.; Farhadi, S.; Ezatpour, B.; Khamesipour, K.; Kazemi, B.; Ebrahimzade, F.; Rashidipour, M. (2011). The effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on the lesions induced by *Leishmania major* in BALB/c mice. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5(5): 648-653.

34. Kuzuyama, T.; Shimizu, T.; Takahashi, S.; Seto, H. (1998). Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-d-xylulose 5 phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Tetrahedron Letters, 39: 7913–7916.

35. Lane, A.; Boecklemann, A.; Woronuk, G.N.; Sarker, L.; Mahmoud, S.S. (2010). A genomics resource for investigating regulation of essential oil production in Lavandula angustifolia. Planta, 231: 835–45.

36. Lange, B.M.; Ketchum, E.B.R.; Croteau, R.B. (2001). Isoprenoid Biosynthesis. Metabolite Profiling of Peppermint Oil Gland Secretory Cells and Application to Herbicide Target Analysis. Plant Physiology, 127: 305–314.

37. Laule, O.; Fu¨rholz, A.; Chang, H.S.; Zhu, T.; Wang, X.; Gruissem, W.; Lange, B.M. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100: 6866–6871.

38. Linsmaier, E.M.; Skoog, F. (1965). Organic

growth factor requeriments of tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 18: 100-127.

39. Loreto, F.; Pinelli, P.; Manes, F.; Kollist, H. (2004). Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by Quercus ilex leaves. Tree Physiology, 24: 361–367.

40. Mahmoud, S.S.; 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: 8915–8920.

41. Mahmoud, S.S.; Croteau, R.B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. Trends *in* Plant Science, 7: 366–373.

42. Mau, C.J.D.; Karp, F.; Ito, M.; Honda, G.; Croteau, R.B. (2010). A candidate cDNA clone for (-)- limonene-7-hydroxylase from *Perilla frutescens*. Phytochemistry, 71: 373-379

43. McConkey, M.E.; Gershenzon, J.; Croteau, R.B. (2000). Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. Plant Physiology, 122: 215–224.

44. Ramak, P.; Sharifi, M.; Kazempour, S.O.; Ebrahimzadeh, H.; Behmanesh , M. (2011). Studies on seed germination and *in vitro* shoot multiplication of *Satureja khuzistanica* Jamzad, an important medicinal plant. African Journal of Biotechnology, 10 (83): 19407-19414.

45. Rodríguez-Concepción, M.; Gruissem, W. (1999). Arachidonic acid alters tomato *HMG* expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. Plant Physiology. 119, 41–48.

46. Rodríguez-Concepción, M.; Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. Plant Physiology,130: 1079–1089.

47. Rohmer, M. (2003.) Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis: elucidation and distribution. Pure and Applied Chemistry 75: 375–388.

48. Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringermeyer, S.; Sahm, H. (1996). Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Journal of the American Chemical Society 118: 2654–2566.

49. Saaadat, M.; Pornormohamadi, S.; Donyavi, M.; Khorasani, R.; Amin, G.; Salehnia, A. (2004). Altration of rat hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities by *Satureja khuzistanica* Jamzad essential oil. Journal of Pharmaceutical Sciences, 7: 310-314.

50. Safarnavadeh, T.; Rastegarpanah, M. (2011). Antioxidants and infertility treatment, the role of Satureja Khuzestanica: A mini-systematic review. Iranian Journal of Reproductive Medicine, 9 (2): 61-70.

51. Schmiderer, C.; Grausgruber-Gröger, S.; Grassi, P.; Steinborn, R.; Novak, J. (2010). Influence of gibberellin and daminozide on the expression of terpene synthases in common sage (*Salvia officinalis*). Journal of Plant Physiology, 167: 779–786.

52. Schuhr, C.A.; Radykewicz, T.; Sagner, S.; Latzel, C.; Zenk, M.H.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Rohdich, F.; Eisenreich, W. (2003). Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. Phytochemistry Reviews, 2: 3–16.

53. Sefidkon, F.; Abbasi, k.; Jamzad, Z.; Ahmadi, S. (2007). The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. Food Chemistry, 100: 1054–1058.

54. Shahsavari, R.; Ehsani, A.; Houshmand, M.; Salehnia, a.; Ahangari, G.; Firoozrai, M. (2009). Plasma Glucose lowering effect of the wild *Satureja khuzistanica Jamzad* essential oil in diabetic rat : role of decreased gluconeogenesis. Pakistan journal of biological sciences, 12(2):140-145.

55. Stermer, B.A.; Bianchini, G.M.; Korth, K.L. (1994). Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. Journal of Lipid Research, 35 : 1133-1140.

56. Towler, M.J and Weathers, P.J. (2007). Evidence of artemisinin production from IPP stemming from both the mevalonate and the nonmevalonate pathways. Plant Cell Reports, 26: 2129–2136.

57. Ultee, A.; Bennik, M.H.J.; Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-

borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 68:1561-1568.

58. Ultee, A.; Kets, E.P.W.; Smid, E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 65:4606-4610.

59. Weissenborn, D.L.; Denbow, C.J.; Laine, M.; Lång, S.S.; Yang, Z.; Yu, X.; Cramer, C.L. (1995). HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: molecular specialization within a complex pathway. Physiologia Plantarum, 93: 393–400.

60. Wildung, M.R.; Croteau, R.B. (2005). Genetic engineering of peppermint for improved essential oil composition and yield. *Transgenic Research*,14: 365–372.

61. Xie, Z.; Kapteyn, J.; Gang, D.R. (2008). A systems biology investigation of the MEP/terpenoidand shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels ofmetabolic control in sweet basil glandular trichomes. *Plant Journal*, 54: 349–61.

62. Zeidler, J.; Schwender, J.; Muller, C.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Beck, E.; Jomaa, H.; Lichtenthaler, H.K. (1998). Inhibition of the non mevalonate 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. Z Naturforsch, 53: 980–986.

63. Zhi, L.; Long-Jiang, Y.U., Chun-Yan, L.I.; Chun-Fang, Z. (2005). Effects of Fosmidomycin and Lovastatin Treatment on Taxol Biosynthesis in Suspension Culture Cells of Taxus chinensis. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology , 31 (2): 199-204.

Expression of gene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and its relation to monoterpene carvacrol biosynthesis in *Satureja khuzestanica*

Ramak P.[1], Kazempour Osaloo S.[1], Ebrahimzadeh H.[2] Sharifi M.[1] and Behmanesh M.[3]

[1] Plant Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Botany Dept., Faculty of Biological Sciences, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[3] Genetics Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Satureja khuzistanica Jamzad is a native plant that is dispersed throughout southern Iran. This plant has been used as analgesic and antiseptic medication among the inhabitants of southern parts of Iran. Carvacrol as the main component of the wild *S. khuzistanica* (≤90%) has been found to have significant antioxidant properties. In this study, the *shoot cultures* of *Satureja khuzestanica* in LS medium were affected by different concentrations of FOS and MEV (0, 10, 25, 50, 75 and 100µM) for 21 days. Then the Carvacrol content in different treatments was assayed by HPLC method. The level of *1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase* (*DXR*) gene expression in concentrations above and the optimal concentration (75 µM) in durations of 0 to 100 hours was monitored by Semi-quantitative RT-PCR method. Our results showed that some concentrations of inhibitors can have an influence on *DXR* expression and carvacrol contents**.** The changes observed in carvacrol can be considered as a result of different levels of *DXR* expression.

Key words: Carvacrol, *1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase* (*DXR*), *Satureja khuzestanica*, Semi-quantitative RT-PCR