الگوی بیان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز تیمول در آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) تحت تنش سرما

شکوفه حبیبی[۱]، عبداله احتشام‌نیا*[۲]، فواد فاتحی[۳] و اردشیر قادری[۴]

۱- دانشجوی فارغ التحصیل کارشناسی‌ارشد علوم‌باغبانی، داشگاه لرستان ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه لرستان، خرم آباد ۳- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران ۴- استادیار گروه گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، کرج، ایران

نویسنده مسئول: *ab.ehteshamnia@gmail.com*

چکیده

تاکنون تحقیقی در رابطه با تاثیر سرما بر میزان تغییرات بیان ژن‌های مسیر سنتز تیمول در آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) انجام نشده است. این پژوهش که بخشی از بررسی تاثیر تنش دمای پایین (زمان‌های صفر، سه، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار) بر میزان تیمول و کارواکرول و بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول شامل *DXr*، *TVHMGR*، *TPS1*، *Tps2 (gamma)* و *Tps5 (Alpha)* با استفاده از روش RT-PCR q است به بررسی میزان بیان نسبی ژن *Tps2* از ژن‌های مهم درگیر در سنتز تیمول پرداخته است. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان داد که بیان این ژن در شرایط تنش سه ساعت نسبت به شاهد به‌طور قابل توجه و معنی‌دار افزایش و در بازه‌های ۱۲ و ۲۴ساعت نسبت به شاهد کاهش و مجدداً در شرایط تنش ۴۸ ساعت افزایش در بیان مشاهده گردید و اختلاف نسبت به شاهد معنی‌دار بود ($P>0.01$). این ژن از ژن‌های مهم در مسیر بیوسنتز تیمول هست که با بیان متابولیت‌های تیمول و کارواکرول، از طریق محدود کردن سرعت واکنش، ارتباط مستقیم دارد.

کلمات کلیدی: آویشن باغی، تنش سرمایی، تیمول، بیان ژن

مقدمه

گیاهان دارویی از منابع مهم تولید دارو هستند که بشر سالیان دراز از آن‌ها استفاده نموده و روز به روز بر اهمیت آن‌ها افزوده می‌گردد. طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت میزان تجارت گیاهان دارویی تا سال ۲۰۵۰ میلادی بالغ بر پنج تریلیون دلار خواهد بود (Baser, 1997). آویشن باغی(*Thymus vulgaris* L.) گیاهی از تیره نعناعیان(Lamiaceae) و دیپلوئید 2n=30 است (Horwath *et al*., 2008). آویشن باغی دارای ۱۶۰ جنس و بیش از ۳۰۰۰ گونه می‌باشند. در ایران ۴۷ جنس و حدود ۳۷۰ گونه از گیاهان این خانواده وجود دارد (Croteau*et al*, 2005). بومی منطقه مدیترانه غربی از شبه جزیره ایبری تا ایتالیا و کشت آن در سرتاسر جهان گسترش پیدا کرده است (Figueiredo *et al*, 2010).

در سال‌های اخیر استفاده از مواد طبیعی گیاهان دارویی به‌جای افزودنی‌های مصنوعی که دارای اثرات جانبی می‌باشد مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Paradiso *et al*, 2008). اساس مطالعات انجام شده، ماده موثره اصلی آویشن باغی(*Thymusvulgaris* L.)، اسانس است که ۰/۸ تا ۲/۶ درصد (معمولاً یک درصد) می‌باشد و قسمت اعظم آن را فنل‌ها (۲۰ تا ۸۰ درصد)، هیدروکربن‌های مونوترپنی مثل (p-cymene و y-terpinen) تشکیل می‌دهد که گاهی هر کدام از این ترکیبات تا ۸۰ درصد (یا بیشتر) از ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهند. به‌طور طبیعی تیمول جزء اصلی فنلی در آویشن است و کارواکرول نیز یک جزء فرعی است (Letchamo *et al*, 1995).

رشد و پراکنش گیاهان در طبیعت تحت تاثیر انواع تنش‌های زنده و غیر زنده قراردارد. گیاهان به‌طور متناوب با انواع تنش‌های محیطی مثل دمای پایین، تنش اسمزی، خشکی، غرقابی، گرما، تنش اکسیداتیو و سمیت فلزات سنگین مواجه هستند. دما، عامل محیطی مهمی است که از فصلی به فصل دیگر تغییر می‌کند و دستخوش نوسانات غیرقابل پیش‌بینی و زودگذر روزانه است (Browse *et al*, 2001). سرما به‌عنوان یکی از تنش‌های محیطی در گسترش جغرافیایی گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گیاهان ازمکانیسم‌های متعدد فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی جهت سازگاری به سرما استفاده می‌کنند (Rahaii *et al*, 2010). این مکانیسم‌ها نه تنها به‌طول دوره تنش بستگی دارد، بلکه به مرحله نموی و پارامترهای مورفولوژیکی-آناتومیکی گیاه در زمان تنش نیز وابسته است (Achard *et al*, 2008). شناسایی و بررسی عملکرد ژن‌های القا شونده با تنش که در فرایند تنظیم تحمل گیاه به تنش‌های محیطی موثر است، درشناخت بیولوژی مولکولی و به‌نژادی گیاهان و رسیدن به تولید پایدار از اهمیت ویژه‌ای برخورداراست.

با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در رابطه با تاثیر سرما بر میزان تغییرات بیان ژن‌های مسیر سنتز تیمول در آویشن انجام نشده است، این پژوهش که بخشی از بررسی اثر تنش دمای پایین بر میزان تیمول و کارواکرول و بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول شامل *DXr*، *TVHMGR*، *TPS1*، *Tps2*و*Tps5* با استفاده از روش PCR در زمان واقعی[1] است به بررسی میزان بیان نسبی ژن *Tps2*/ز ژن‌های مهم درگیر در سنتز تیمول پرداخته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی و استخراج RNA کل

بذرهای آویشن باغی رقم واریکو۳ (*Thymus vulgaris* L. CV.Varico3) از موسسه تحقیقات اصلاح، تهیه نهال و بذر سوئیس تهیه شدند. بذور در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) به‌عنوان محیط کشت پایه جهت تولید گیاهچه درون شیشه‌ای کشت شدند. نمونه‌برداری از گیاهچه‌های آویشن باغی در زمان‌های صفر، سه، ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش سرمایی انجام شد. بسته‌های آلومینیومی حاوی گیاهچه‌های آویشن در ازت مایع منجمد و تا زمان استخراج RNAکل در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای ارزیابی الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه نمونه‌های منجمد شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA کل مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های RNA استخراج شده با استفاده از کیت برای ارزیابی یکپارچگی و همچنین غلظت آن‌ها به‌ترتیب با ژل آگاروز ۱٪ و خوانش اسپکتروفتومتری ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتری در دستگاه (NanoDropThermoScientific2000c, USA) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج RNA و تبدیل آن به cDNA با استفاده از کیت مقدار بیان ژن در حضور ژن کنترل 18srRNAبه روش Real Time PCR در دو تکرار تکنیکی و آزمایشگاهی مورد آزمون قرار گرفت. تمام مراحل این آزمون با رعایت نکات ایمنی و در محیط عاری از آنزیم RNase انجام گرفت. برای از بین بردن RNase روی سطوح شیشه‌ایی از اعمال تیمار دمایی ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت و در شرایط استریل استفاده شد. برای غیر فعال کردن آنزیم RNase محلول‌های مورد استفاده از آب دو بار تقطیر تیمار شده به ۰/۱DEPC درصد به طول یک شبانه روز و اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت.

1- Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

آنالیز آماری داده‌های بیان ژن

داده‌های به‌دست آمده از آنالیز بیان ژن با استفاده از مدل دلتا Ct (ΔΔCt) تصحیح شده با بازدهی[1] تکثیر (لیواک و اسمیتژن[2] ۲۰۰۱). مورد انالیز قرار گرفتند و در نرم افزار Excel 2007 وارد شدند. مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف (تفاوت بین تیمارهای مختلف، تفاوت بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری) وارد نرم افزار SPSS18 شده و مورد آزمون t قرار گرفت و برای مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف از آزمون دانکن استفاده گردید ($P<0.05$).

نتایج

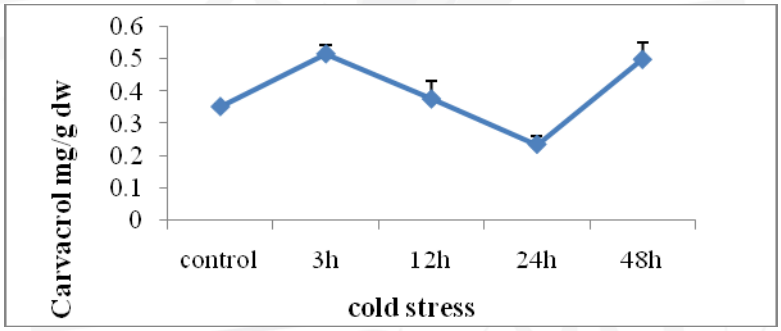
نتایج اندازه‌گیری تیمول و کارواکرول در گیاه دارویی آویشن باغی با HPLC

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر بازه‌های زمانی مختلف بر مقادیر کارواکرول و تیمول در سطوح مختلف تنش سرمایی بر گیاه آویشن باغی رقم واریکو۳ در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار شد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس مقادیر تیمول و کارواکرول در سطوح مختلف تنش سرمایی بر گیاه آویشن باغی رقم واریکو۳

منابع تغییرات	کارواکرول	تیمول
تیمار	۴/۰۱۷**	۳۰۳/۶۶۹**
خطا	۰/۴۴۹	۰/۶۱۳
ضریب تغییرات	۱۶/۹۲۷	۲/۲۸

مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱) نشان داد که قرارگیری نمونه‌ها به‌مدت سه ساعت شرایط تنش سرمایی سبب افزایش محتوی کارواکرول در نمونه‌ها گردید که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر زمان‌های مورد بررسی به‌جز ۴۸ ساعت پس از تنش داشت.

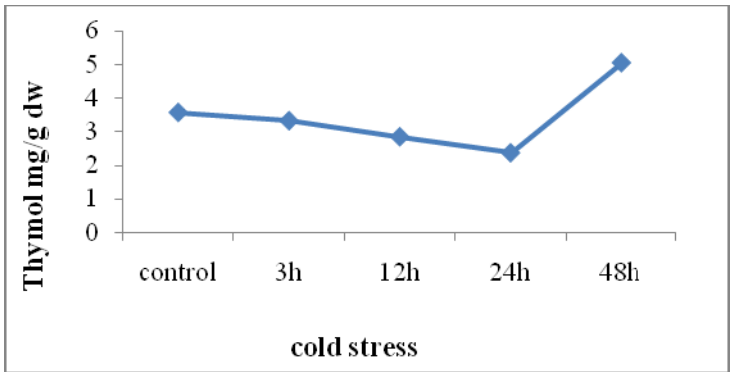


شکل ۱-اثر بازه‌های زمانی تنش سرمایی بر میزان کارواکرول

*حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

1 Efficiency corrected calculation
2 LivakandSchmittgen

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



شکل ۲- اثر بازه‌های زمانی تنش سرمایی بر میزان تیمول.

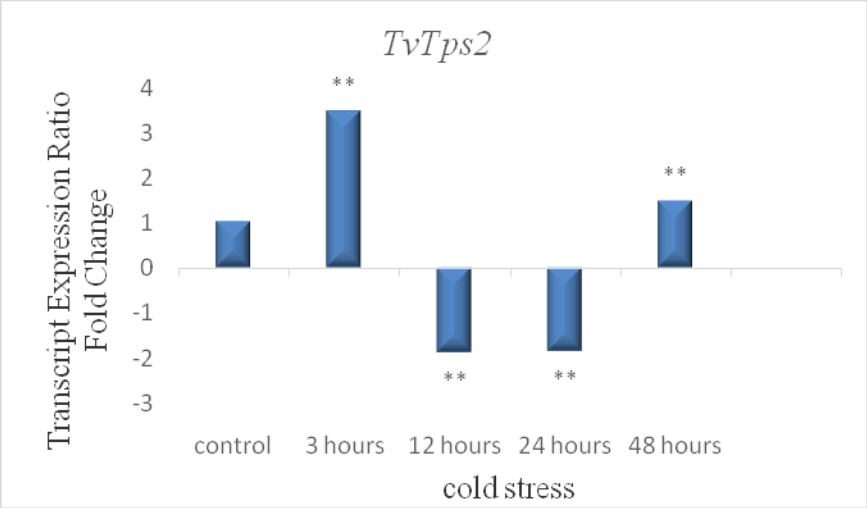
*حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول که جزو منوترپن‌ها هستند در تعدادی از گیاهان شناسایی شده است. برای سنتز تیمول و کارواکرول نیاز به گاماترپینن سنتاز است و این آنزیم باید ژرانیل دیفسفاترا حلقوی و به گاما ترپینن تبدیل کند. تشکیل گاماترپینن توسط آنزیم گاماترپینن سنتاز اولین مرحله از مسیر تشکیل ترپن‌های فنلی از جمله تیمول و کارواکرول می‌باشد. مهم‌ترین مکانیزم کنترل ترکیب این مونوترپن‌ها تنظیم رونوشت ژن گاماترپینن سنتاز است (Crocoll *et al*, 2010). با توجه به مصرف بالای تیمول، تولید هر چه بیشتر این ماده، از اهمیت بالایی برخوردار است. بدین منظور شناسایی مسیرهای تولید این متابولیت ثانویه و ژن‌های دخیل در آن و استفاده از آن‌ها در انتقال و افزایش بیان ژن در گیاهان دارویی تولیدکننده تیمول، حائز اهمیت بالایی می‌باشد.

Cristina*et al*. (2008) پس از انجام مطالعه‌ای پایین بودن درجه حرارت محیط را عامل موثری در کاهش بازدهی اسانس گونه *T. vulgaris* گزارش نموده‌اند و Thompson *et al*. (2003) دمای زیاد محیط و فراوانی مقدار کلسیم را در خاک به‌عنوان عاملی موثر در افزایش عملکرد اسانس *T. vulgaris* گزارش نموده‌اند. دمای پایین عاملی تأثیر گذار در کاهش تولید اسانس در مورد گونه *T. migricus* و *T. vulgaris* گزارش شده است که یافته‌های این تحقیق با آن مطابقت نمی‌نماید (Figueiredo *et al*, 2008).

میزان بیان نسبی ژن *TvTps2*

در این مطالعه به بررسی نتایج بیان نسبی ژن *Tps2*/ ژن‌های مهم درگیر در سنتز تیمول پرداخته است. نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن گاما ترپینن سنتاز در شرایط تنش سه، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که بیان این ژن در شرایط تنش سه ساعت نسبت به شاهد به‌طور قابل توجه و معنی‌دار افزایش و در بازه‌های ۱۲ ($P<0.01$) و ۲۴ ($P<0.01$) ساعت نسبت به شاهد کاهش می‌یابد (شکل ۳). در شرایط تنش ۴۸ ساعت افزایش در بیان مشاهده گردید و اختلاف نسبت به شاهد معنی‌دار بوده است ($P>0.01$). با توجه به شکل بیان ژن *TvTps2*، بیشترین میزان بیان ژن در شرایط تنش سه ساعت و کمترین میزان بیان ژن در شرایط تنش ۱۲ ساعت مشاهده گردید.



شکل ۳- بیان نسبی ژن *TvTps2* در گیاه آویشن تحت تنش سرمایی

**حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد.

آنزیم گاما ترپینن سنتاز، ژرانیل دی فسفات[1]را به گاما ترپینن تبدیل می‌کند. گاما ترپینن سنتاز یک آنزیم کلیدی در تولید اسانس در آویشن باغی می‌باشد، که حدود۳۰٪ از اسانس در این گونه‌ها و تعدادی پیش‌ساز برای تولید مونوترپن‌های آروماتیک اصلی مانند پی‌سیمن و تیمول را تولید می‌کند ژرانیل دی فسفات نیز تحت تاثیر آنزیم مونوترپن سنتاز به مونوترپن‌ها تبدیل می‌شود (Lambert *et al*, 2011). گاما ترپن سنتاز[2] مونوترپن سنتازی است که ژرانیل دی فسفات را به گاما ترپینن تبدیل می‌کند. گاما ترپینن پیش ماده تیمول درگیاهانی مانند آویشن و پونه[3]است (Crocoll *et al*, 2010). در مطالعه‌ای که با استفاده از تیمارهای اسیدسالیسیلیک، متیل جاسمونات و ترانس‌سینامیک درگیاه دارویی آویشن باغی(*Thymus vulgaris* L.)انجام شد میزان بیان ژن *TvTps2* بعد از ۲۴ ساعت در گیاه آویشن نشان دادکه بیان این ژن تحت تاثیر این تیمارها تغییر می‌کند.

ژن گاماترپینن سنتاز اصطلاحاً محدود کننده سرعت واکنش است یعنی با بیان متابولیت‌های ذکر شده ارتباط مستقیم دارد. بنابراین بررسی مولکولی این ژن می‌تواند کمک قابل توجهی در راستای افزایش متابولیت‌های ثانویه با ارزش از طریق روش‌های کشت بافت و مهندسی ژنتیک در گیاه دارویی آویشن باغی بنماید.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که تنش سرمایی بر میزان بیان ژن‌ها اثر معنی‌داری داشته و میزان بیان ژن *TvTps5* در بازه‌های متفاوت زمانی تنش افزایش و در بازه زمانی۳ و ۴۸ ساعت به بیشترین بیان رسید. بررسی بیان ژن‌های مختلف نشان داد که از بین ژن‌های بررسی شده در این تحقیق، ارتباط نزدیکی بین میزان بیان ژن*TvTps2* و تیمول و کارواکرول وجود دارد؛ بنابراین، بیوسنتز تیمول در این گیاه بیشتر به مسیر MEP[4] وابسته است. به‌همین دلیل می‌توان گفت که افزایش میزان تیمول در آویشن باغی رقم واریکو ۳ می‌تواند به علت افزایش بیان ژن*TvTps2* باشد که نقش کلیدی را در بیوسنتز تیمول ایفا می‌کند.

1 Geranyl diphosphate
2 γ-Terpinene synthesis
3 *Oregano vulgare*
4 2-c-Methyl-Erythritol 4-Phosphate

منابع

Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P. and Genschik, P. 2008. The cold-inducible CBF1 factor–dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. The Plant Cell, 20(8), pp.2117-2129.

Baser, K.H.C. 1997. Industrial utilization of medicinal and aromatic plants. Acta Horticulturae: 503:177-192.

Browse, J. and Xin, Z., 2001. Temperature sensing and cold acclimation. Current Opinion in Plant Biology, 4(3), pp.241-246.

Cristina, F.A., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Scheffer, J.J.C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour Fragr. J., 23: 213-226.

Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J. and Degenhardt, J. 2010. Terpene synthases of oregano (*Origanumvulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis.Plant molecular biology, 73(6), pp.587-603.

Croteau, R.B., Davis, E.M., Ringer, K.L. and Wildung, M.R. 2005. Menthol biosynthesis and molecular genetics. Naturwissenschaften. 92, 562–577.

Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Scheffer, J.J. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour and Fragrance Journal, 23(4), pp.213-226.

Horwath, A.B., Grayer, R.J., Keith-Lucas, D.M. and Simmonds, M.S. 2008.Chemical characterisation of wild populations of Thymus from different climatic regions in southeast Spain.Biochemical Systematics and Ecology, 36(2), pp.117-133.

Lambert, E., Faizal, A. and Geelen, D., 2011. Modulation of triterpene saponin production: in vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. Applied Biochemistry and Biotechnology, 164(2), pp.220-237.

Letchamo, W., Xu, H.L. and Gosselin, A., 1995. Variations in photosynthesis and essential oil in thyme.Journal of plant physiology, 147(1), pp.29-37.

Paradiso, V.M., Summo, C., Trani, A. and Caponio, F. 2008. An effort to improve the shelf life of breakfast cereals using natural mixed tocopherols.Journal of Cereal Science, 47(2), pp.322-330.

Rahaii, M., Naghavi, M., Alizade, H., Malbobi, M.A., Abdmishani, S., Shang, P. 2010. Assessment of the MYB gens exprtionmodle in wheat (*Triticumaestivum* L.) in short time stress of salinity and cold using quantitative RT- PCR approach. Iranian Journal of Field Crop Science, 41: 433-446 (In Farsi).

Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B. and Ehlers, B. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris*chemotypes.Journal of Chemical Ecology, 29(4), pp.859-880.

Gene Expression Pattern of Key Genes in Thymol synthesis in Garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Under Cold stress

Shokoufeh Habibi[1], AbdollahEhteshamnia[*2], Foad Fatehi[3], Ardeshir Qaderi[4]

1- Old M.Sc of Horticulture science Department, Lorestan University, Khoramabad, Iran
*2- Assistant Professor of Horticulture science Department, Lorestan University, Khoramabad, Iran
3- Assistant Professor of Agriculture Department, Payame-Nour University, Tehran, Iran
4- Assistant Professor of Medicinal plants Department, Faculty of Medicinal plants, Tehran, Iran
Corresponding Author: ab.ehteshamnia@gmail.com

Abstract

So far, research on the effects of cold on the changes Thymol synthesis pathway genes on Thyme (*Thymus vulgaris* L.) not been done.This study was designed to investigate the effect of low temperature stress in the time period of zero, three, 12, 24 and 48 hours after treatment in the expression of genes involved in the biosynthesis of Thymol CRD contains *DXr*, *TVHMGR, TPS1, gamma* and *Alpha* using qRT-PCR in thyme varico 3 under stress cold was used. TvTps2 highest expression within the first three hours times compared to the control. The genes of the genes in the biosynthesis of important metabolites thymol and carvacrol, thymol, stating that, by limiting the reaction rate, are directly related.

Keywords: Thyme, Thymol, cold stress, gene expression