Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 51, No 1, Spring 2020 (195-205)
DOI: 10.22059/ijfcs.2019.267935.654536

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۹ (ص۲۰۵-۱۹۵)

اثر دما بر متابولیت ها و بیان برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول در آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)

بهنام مندک[۱]، ولی اله محمدی*[۲]، جواد هادیان[۳]، حسن زینالی خانقاه[٤]

۲،۱ و ٤- به‌ترتیب دانشجوی دکترا، دانشیار و استاد، گروه زراعت واصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،

۳- استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۷)

چکیده

عوامل محیطی مختلف سبب تغییر در میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می شوند. به‌منظور بررسی اثر دما بر متابولیت‌های ثانویه و بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی تیمول و کارواکرول در آویشن باغی، آزمایشی با سه تیمار دمایی گرما، سرما و شرایط طبیعی در اتاقک رشد، به مدت یک ماه اجرا شد. میزان ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه Gc/MS و Gc و میزان بیان ژن‌های *TvTps1*، *CYP178*، *CYP180* و *CYP181* به‌وسیله qRT-PCR اندازه گیری شد. اگرچه اعمال هر دو تیمار دمایی گرما و سرما، ترکیبات مونوترپنی فنولی (تیمول و کارواکرول) را نسبت به شرایط طبیعی افزایش داد، دمای بالا سبب افزایش معنی‌دار میزان کارواکرول و دمای پائین، سبب افزایش معنی دار مقدار تیمول شد. تیمارهای دمایی در مقایسه با شرایط طبیعی، میزان گاماترپنین را کاهش داد. تجزیه بیان ژن‌ها نشان داد که اعمال تیمار سرما، سبب افزایش میزان بیان ژن‌های *TvTps1* و *CYP178* و تیمارگرما موجب کاهش آن‌ها شد. میزان بیان ژن‌های *CYP180* و *CYP181* در هر دو شرایط سرما و گرما افزایش نشان داد؛ اگرچه میزان افزایش در شرایط گرما، بسیار بیشتر از تیمار سرما بود. به‌طورکلی نتایج نشان داد که دمای محیط نقش بسزایی در میزان متابولیت‌های آویشن دارد و احتمالا مناطق گرم تر برای تولید کارواکرول و مناطق سردتر برای تولید تیمول مناسب تر هستند.

واژه‌های کلیدی: آویشن، تیمول، کارواکرول، محیط، سرما،گرما، CYP.

The impact of temperature on metabolites and the expression of genes involved in thymol and carvacrol biosynthesis pathway in *Thymus vulgaris*

Behnam Mondak[1], Valiollah Mohammadi[1*], Javad Hadian[2], Hassan Zeynali Khanghah[1]

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, 2. Institute of Medicinal Plants and Raw Materials, Shahid Beheshti University.

(Received: October 21, 2018 - Accepted: Alpril 6, 2019)

ABSTRACT

Environmental factors make changes in the amount and type of secondary metabolites. To study the effects of temperature regimes on secondary metabolites and the expression of genes involved in biosynthesis pathway of thymol and carvacrol in thyme, an experiment was conducted in a growth chamber for one month with three thermal treatments including heat, cold and normal temperatures. Essential oil compounds were measured by Gc / MS and Gc and the expression of *TvTps1*, *CYP178* and *CYP180* genes assayed by qRT-PCR. Both heat and cold temperatures increased the phenolic monoterpen compounds (thymol and carvacrol) compared to normal condition. High temperature led to significant increases in carvacrol while low temperature resulted in a great increase in the amount of thymol. Gamaterpenin level was declined due to thermal treatments. Gene expression analysis revealed that the cold condition increased the expression of *TvTps1* and *CYP178* genes, while heat decreased the expressions. *CYP180* and *CYP181* were highly expressed under both cold and heat conditions, although the amount of expression was much higher under high temperature. Generally, the results indicated that the environment temperature played a key role in thyme metabolites type and content. It could be concluded that the regions with high and low temperatures were suitable for carvacrol and thymol production, respectively.

Keywords: Carvacrol, cold, CYP, effect, heat, thyme, thymol.

* Corresponding author E-mail: vmohammadi@ut.ac.ir

مقدمه

گیاهان دارویی، یکی از منابع مهم تولید دارو هستند که بشر سالیان دراز، از آن‌ها استفاده نموده است و در عصر حاضر نیز روز به روز براهمیت آن‌ها افزوده می‌شود، به‌طوری‌که صنعت گیاهان دارویی، یکی از معدود صنایع دارای رشد دو رقمی است (Omidbeygi, 2009). به‌علاوه گیاهان دارویی، به‌دلیل توأم بودن ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات همولوگ دارویی در آن‌ها، با بدن انسان سازگاری بهتری دارند و معمولا فاقد عوارض ناخواسته داروهای شیمیایی هستند و به‌خصوص در موارد مصرف طولانی و در بیماری‌های مزمن، بسیار مناسب‌تر می‌باشند (Omidbeygi, 2009). در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، گیاهان دارویی نقشی حیاتی در ارتقای سلامت و درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها دارند (Timmermans, 2003).

آویشن (Thymus) یکی از جنس‌های مهم تیره نعنا (Lamiaceae) می‌باشد که در تمام فارماکوپه‌های معتبر، از پیکر رویشی آن به‌عنوان دارو یاد شده است و خواص دارویی آن مورد تایید قرار می‌باشد (Jamzad, 2009). این گیاه با دارا بودن اسانس‌های روغنی و ترکیبات شیمیایی دارویی، یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی در جهان است و اسانس آویشن در ردیف ۱۰ اسانس اول معروف دنیاست (Letchamo & Gosselin, 1996) . در ایران، ۱۴ گونه از جنس تیموس وجود دارد که بیشترین پراکندگی این جنس، در استان‌های شمالی و غربی کشور است. از بین ۱۴ گونه ذکر شده، چهار گونه *T. daenensis*, *T. persicus*, *T. carmanicus*, *T. trautretteri* ، اندمیک ایران می‌باشند (Jamzad, 1998). از ترکیبات عمده اسانس این گیاه می‌توان به چهار ترکیب تیمول[1]، کارواکرول [2]، پاراسیمن[3] و گاماترپینن[4] را نام برد. از گیاهان این جنس، به‌عنوان داروی ضد سرفه، هضم کننده، خلط آور، ضدنفخ و برای درمان سرماخوردگی در طب سنتی استفاده می‌شود (Zargari, 1997). در بین داروهای تولید شده از گیاه دارویی، آویشن پس از نعنا در رتبه دوم قرار دارد (Fakhr Tabatabai, 2006). به‌علاوه از آویشن و ترکیبات موجود در آن در صنایع مختلف از جمله در ساخت انواع عطر، ادکلن، مطبوع کننده‌های هوا، بوزداها، طعم دهنده‌های ترکیبی، ساخت رزین‌ها، حشره‌کش‌ها، داروی‌های ضد عفونی کننده و غیره، استفاده فراوانی می‌شود (Stahl-Biskup & Saéz, 2000).

متابولیت‌های ثانویه به ترکیباتی اطلاق می‌شود که دارای نقش حیاتی در فرآیند زندگی گیاه نیستند، اما گیاه برای پاسخ به شرایط محیطی، آن‌ها را تولید می کند. متابولیت‌های ثانویه گیاهان به سه گروه اصلی ترپنوئیدها، ترکیبات فنولی و ترکیبات نیتروژن‌دار که خود از زیرگروه‌های آلکالوئیدها و گلوکوزینولات‌ها تشکیل شده است تقسیم می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه آویشن از گروه ترپنوئیدها (ترپن‌ها) هستند که بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌روند. این ترکیبات از استیل کوآنزیمA یا ترکیبات حد واسط گلیکولیتیک ساخته می‌شوند. تمامی ترپن‌ها از اجزای پنج کربنه‌ای که اسکلت کربنی منشعب ایزوپنتانی دارند، تشکیل شده‌اند. ترپنوئیدها متعلق به کلاس بزرگی از تولیدات طبیعی با خواص مهم دارویی و صنعتی می باشند و امروزه نزدیک به ۲۵۰۰۰ ساختار ترپنوئید از گیاهان، میکروارگانیسم‌ها، حشرات و موجودات دریایی شناسایی و جداسازی شده است (Garshenzen *et al.*, 2007). با وجود پیچیدگی زیاد در ساختار، ترپنوئیدها از دو واحد پایه ایزوپرن، شامل ایزوپنتیل پیروفسفات و دی متیل آلیل پیروفسفات ساخته شده‌اند.

به‌طورکلی، ترپنوئیدها از دو مسیر بیوسنتزی مستقل تولید می‌شوند؛ مسیر موالونات در سیتوسول است که بیشتر مسئول بیوسنتز ایزوپنتیل دی فسفات مورد نیاز برای سنتز سنرکوئی‌ترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها و پلی ترپن‌ها است، درحالی‌که مسیر۲- متیل- اریتریتول-۴- فسفات در پلاستیدها است و مسئول سنتز ایزوپنتیل دی

[1] Thymol
[2] Carvacrol
[3] P-Cymene
[4] Gamma- terpinene

فسفات مورد نیاز برای مونوترپن‌ها، دی‌ترپن‌ها و تتراترپن‌ها می‌باشد (Rodhich *et al.*, 2005). شکل ۱، مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها را در گیاهان نشان می‌دهد. تیمول و کارواکرول که ترکیب اصلی اسانس آویشن را تشکیل می‌دهند، در گروه منوترپن‌های فنولی قرار می گیرند و از طریق مسیر بیوسنتز متیل اریترول فسفات (MEP) واقع در پلاستید تولید می‌شوند. به‌طورکلی، آنزیم ژرانیل دی فسفات سنتتاز (GDS)، یک آنزیم کلیدی در این مسیر بیوسنتزی است که سبب ترکیب ایزوپنتیل دی فسفات (IPP) و دی متیل دی فسفات (DMAP) می‌شود و ژرانیل دی فسفات (GPP) که پیش ماده اصلی سنتز مونوترپن‌ها است را تولید را می کند (Burke *et al*., 1999; Lichtenthaler, 1999). در ادامه، GPP توسط مونوترپن سنتتازها به ترکیبات مونوترپنی مختلف تبدیل می‌شود (Davis & Croteau., 2000; Mahmood & Croteau, 2003; Lambert *et al*., 2011). آنزیم گاماترپنین سنتتاز که جزو مونوترپن سنتتازها است، سنتز گاماترپنین از GDS را کاتالیز می‌کند؛ گاماترپنین پیش ماده سنتز تیمول و کارواکرول، به عنوان ترکیبات اصلی آویشن می‌باشد (Crocoll, 2011) در نهایت، آنزیم‌های سیتوکروم ۴۵۰ مونوکسیژناز (CYP) و *CYP71D178*, *CYP71D180* و *CYP71D181*/ین ماده را به ترکیبات نهایی تیمول و کارواکرول تبدیل می‌کنند (Crocoll *et al*., 2010; Crocoll *et al*., 2011).

میزان و ترکیب اجزای تشکیل دهنده اسانس، علاوه بر ژنتیک، به‌شدت تحت تاثیر عوامل محیطی مانند آب، دما، طول روز، شدت و طول موج نور، UV ، کیفیت خاک است (Maffei, 2011; Flencher *et al*., 2005; Novak *et al*., 2010; Sangwan *et al*., 2011). مطالعات نشان می‌دهد که در گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*) تیمار سرما و گرما، نوع ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس را تغییر می‌دهد (Novak *et al*.,2010). Clark & Menary (1980) به بررسی اثر دما در گیاه نعنا فلفلی (*Mentha piperita*) پرداختند و گزارش نمودند که به‌طورکلی، دما بر روی میزان ترکیبات اسانس اثر می‌گذارد، درصورتی‌که در مطالعه صورت گرفته بر روی نعنای ژاپنی گزارش شد که دما هیچ تاثیری بر محتوی منتول ندارد (Duriyaprapan *et al*., 1986). در بررسی اثر تغییرات فصلی روی مریم گلی (*Salvia officinalis*) و دو رقم مرزه (*Satureja hortensis*) گزارش شد که تغییرات فصلی، سبب تغییر در متابولیت‌ها می‌شود (Gröger *et al*., 2011; Hossein *et al*., 2007) Yanivie (1982) & Palevitch نیز بیان داشتند که اگرچه متابولیت‌های ثانویه، تحت کنترل عوامل ژنتیکی هستند، اما به شدت تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. طبق نتایج Pateraki & Kanelli (2008) تنش‌ها سبب افزایش بیان برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها می‌شوند. در مطالعه اثر کم آبی بر مرزنجوش گزارش شد که سطوح مختلف خشکی، سبب تغییر در ترکیبات اسانس و همچنین میزان بیان ژن‌های سنتز کننده ترکیبات اسانس می‌شود. همچنین گزارش شد که بین میزان بیان ژن‌های سنتز کننده برخی از ترکیبات با میزان ترکیبات موجود در اسانس، همبستگی بسیار بالایی وجود داشت (Morshedlo *et al*., 2017). نتایج مطالعه اثر کوتاه مدت سرما بر میزان بیان ژن‌های TPS1 و DXR را در آویشن باغی نشنان داد که سرما بر میزان بیان این ژن‌ها اثر می‌گذارد. Habibi *et al* (2018) و Eguchi *et al*. (2016) گزارش نمودند که اعمال تنش گرمای کوتاه مدت در آویشن باغی، سبب افزایش میزان گاماترپنین و همچنین افزایش بیان ژن سنتز کننده این ترکیب می شود.

با توجه به کشت وسیع آویشن در اقلیم‌های مختلف، به نظر می‌رسد که دما در تولید نوع و میزان متابولیت‌های آویش موثر است. تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر دما بر روی متابولیت‌ها و بیان ژن‌های آویشن صورت نگرفته است.در این راستا این پژوهش با اهداف زیر انجام شد: الف) بررسی اثر دما بر نوع و میزان متابولیت‌های ثانویه در آویشن باغی جهت تعیین مناسب ترین مناطق آب و هوایی برای تولید متابولیت مورد نظر و ب) شناسایی ژن‌های مهم مسیر بیوسنتزی تیمول و کارواکرول در پاسخ به دما، به‌منظور بهره گیری در برنامه‌های مهندسی متابولیت.

مواد و روش ها

تهیه مواد گیاهی

در این پژوهش، بذرهای رقم اصلاح شده و تجاری Deutscher winter از گونه آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند و درمحیط کشت کوکوپیت و پرلیت در گلخانه کشت شدند. پس از رشد، گیاهان به مزرعه گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل شدند. در پائیز سال دوم، یک بوته انتخاب شد و به‌منظور تهیه کلون، قلمه‌هایی از گیاه انتخابی تهیه شدند و در گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت در گلخانه ریشه‌دار شدند. قلمه‌ها به گلدان‌های بزرگتر انتقال داده شدند و پس از سازگار شدن به اتاقک رشد منتقل شدند. برای اعمال تیمارهای دمایی، سه منطقه دزفول، اردبیل و کرج، به‌ترتیب به‌عنوان گرم‌ترین، سردترین و معتدل‌ترین ناحیه کشور در فصل تابستان انتخاب شد. میانگین دمای حداقل و حداکثر ۳۰ ساله این مناطق، از سایت سازمان هواشناسی کشور دریافت شد و متناسب با دماهای به‌دست آمده، شرایط دمایی این مناطق در اتاقک‌های رشد شبیه سازی شد. روند افزایش و کاهش دما، متناسب با شرایط طبیعی بود، به‌گونه‌ای که از صبح تا عصر، دمای هوا روند افزایشی داشت و از عصر تا صبح روز بعد، روند کاهشی داشت (جدول ۱). لازم به‌توضیح است که اعمال تیمارهای دمایی، به‌صورت همزمان و در سه اتاقک رشد جداگانه انجام شد. مدت زمان در نظر گرفته شده برای اعمال هر یک از تیمارهای دمایی، یک ماه بود. در طی این مدت، آبیاری و نگهداری از گلدان‌ها به‌صورت طبیعی انجام شد و طول شبانه روز نیز برای تمامی تیمارها، طول ۱۶ ساعت روز (دوره روشنایی) و هشت ساعت شب (دوره تاریکی) در نظر گرفته شد.

جدول ۱- برنامه ۱۴ ساعته تیمار دمایی یک ماهه در اتاقک رشد.

Table1. Temperature program of growth chamber for 24 hours in one month.

Moderate treatment		Cold treatment		Heat treatment	
Temperature ^{0}c	Time	Temperature ^{0}c	Time	Temperature ^{0}c	Time
17	0:00-6	10	00-8	26	00-5
24	6-11	13	8-11	22	5-8
28	11-13	19	11-14	38	8-12
34	13-16	26	14-17	43	12-16
26	16-24	18	17-24	33	16-24

سنجش ترکیبات اسانس

پس از یک ماه تیمار دمایی، جهت بررسی ترکیبات اسانس، اندام هوایی گیاهان برداشت شد و در دمای اتاق خشک شدند. استخراج اسانس با استفاده از کلونجر و بر طبق فارماکوپه (British Pharmacopoeia, 1993)، به‌مدت سه ساعت انجام گرفت. ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه‌های GC و GC/MS در پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی اندازه‌گیری شد. تجزیه آماری داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم افزار SAS Ver.9.3 انجام شد و برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

اندازه گیری بیان ژن

به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ترکیبات موجود در اسانس آویشن، پس از اعمال تیمار دمایی، نمونه برگی از گیاهان گرفته شد و تا زمان استخراج RNA در فریزر در دمای ۸۰ ^{o}C - نگهداری شد. استخراج RNA به روش لیتیم کلراید (LiCl) و از ۰/۱ گرم نمونه برگی انجام شد (Channuntapipat *et al.*, 2001). در ادامه، کمیت و کیفت RNA استخراجی با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. پس از تائید کمیت و کیفت RNA استخراجی، به‌منظور حذف DNA ژنومی و جلوگیری از ایجاد اختلال در واکنش Real- time PCR، از تیمار DNAaseI بر پایه روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد. برای ساخت cDNA و با توجه به نتایج نانودراپ، دو میکروگرم از RNA هر نمونه برداشته شد و با استفاده از کیت شرکت

Promega و بر طبق دستور شرکت سازنده، همه cDNA ها ساخته شدند. سپس برای ارزیابی کیفیت cDNA ساخته شده با استفاده از آغازگر ژن مرجع *18s* بر روی نمونه‌ها PCR انجام شد. به هدف سنجش بیان ژن، توالی ژن گاماترپنین سنتاز با شماره JQ957866.1 از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت شد. در مورد ژن-های *CYP 178*، *CYP 180* و *CYP181* از توالی‌های شناسایی شده توسط Crocoll (2011) استفاده شد. به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها، از ژن خانه‌دار *18s* استفاده شد. طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزارهای بر خط DNA Integrate Technology (https://eu.idtdna.com/calc/analyzer) و primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/) انجام شد. سنتز پرایمر نیز توسط شرکت سیگما انجام گرفت (جدول ۲).

پس از اطمینان از کیفیت cDNA، واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت Applied Biosystems™ SYBR™ Green PCR Master Mix با سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی انجام شد در نهایت، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001) انجام شد.

جدول۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در سنجش بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول در آویشن در پاسخ به دماهای مختلف.

Table 2. Primer sequence used for expression analysis of the genes involved in biosynthesis pathway of thymol and carvacrol in thyme in response to different thermal treatments.

Primer Name	Forward	Reverse	PCR Product Length (bp)
18 s (Reference gene)	5' ATGA TAACTCGACGGATCGC	5' CTTGGATGTGGTAGCCGTTT	110
CYP180 (carvacrol)	5'- GCAAAGAAGAATGCGAGGTC -3'	5'- GATTGAACGTGTCGGGATCT-3'	160
CYP71D181(pcymen)	5'- TACTGGAAAGACCCCGACAC -3'	5'- CGAACGGGATTAACTCGAAA -3'	160
TvTPS1	5' AGGATCCAAAGGCTAGAGGC	5' CACGTCCCCTCTCTTCAGC	160
CYP178	5' TGGCCTTTGGAAGCGTCG	5' TCAGGCTCATTCCAATAGAGG	140

نتایج و بحث

نتایج مربوط به تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اعمال تیمارهای دمایی، تاثیر معنی‌داری بر میزان تیمول، کارواکرول، گاماترپنین، پاراسیمن و آلفاترپنین، به‌عنوان ترکیبات اصلی اسانس آویشن داشت (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس ترکیبات اسانس آویشن باغی در پاسخ به تیمارهای دمایی.

Table 3. ANOVA of essential oil components of thyme in response to thermal treatments.

SOV	df	Mean of Squares				
		Thymol	Carvacrol	Gammaterpenin	P- cymen	Alpha terpenin
treat	2	316.51**	2.43**	381.57**	51.36**	4.86**
error	6	0.38	1.35	11.1	0.01	006.77

نتایج تجزیه ترکیبات اسانس (جدول ۴) نشان داد که اعمال تیمارهای دمایی، افزایش هر دو ترکیب مونوترپنی فنولی تیمول و کارواکرول را در مقایسه با شرایط کنترل به همراه داشته است (شکل ۱)، به‌گونه‌ای که مقدار تیمول در شرایط تنش سرما و گرما، به‌ترتیب ۸۴ و ۴۸ درصد افزایش یافت. همچنین مقدار کارواکرول نیز به‌ترتیب ۱۰۰ و ۱۳۱ درصد افزایش پیدا یافت (شکل ۱). بر اساس نتایج تجزیه ترکیبات اسانس، در شرایط اعمال تنش سرد نسبت به شرایط نرمال، مقدار تیمول به شکل معنی‌داری افزایش پیدا یافت. همچنین مقدار کارواکرول نیز در شرایط تنش سرما نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت.

جدول ۴- ترکیب شیمیایی تشکیل دهنده اسانس آویشن باغی در پاسخ به تیمارهای دمایی.

Table 4. Chemical composition of *Thymus vulgaris* essential oil in response to thermal conditions.

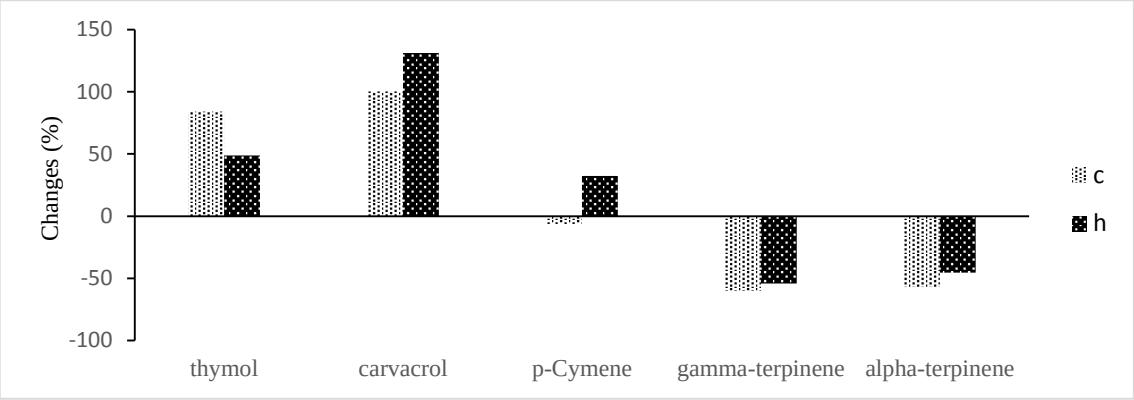
Noumber	Coumpound%	RI	Control	Heat	Cold
1	α-Thujene	930	1.87	1.76	1.74
2	α _Pinene	939	0.9	0.93	0.94
3	Camphene	954	0.41	0.44	0.59
4	Sabinene	975	0.36	0.35	0.37
5	1-Octen-3-ol	979	0.50	0.45	0.53
6	β_Pinene	979	1.50	1.53	1.49
7	α _Terpinene	1017	2.07	1.83	2.01
8	*p*-Cymene	1025	19.7	18.5	26.15
9	1,8-Cineole	1031	1.01	1.08	0.98
10	γ_Terpinene	1060	4.22	1.81	2.30
11	Linalool	1097	1.22	1.21	1.33
12	Borneol	1169	0.65	0.75	0.81
13	α_Terpineole	1190	0.15	0.15	0.17
14	Thymol	1292	24.39	44.93	36.31
15	Carvacrol	1300	1.31	2.69	3.03

اعمال شرایط تنش سرما، سبب کاهش ۳۹/۶ درصدی پاراسیمن، ۶۰ درصدی گاماترپینن و ۵۷ درصدی آلفاترپنین نسبت به شرایط نرمال شد. اعمال تنش گرما، سبب افزایش میزان تیمول و کارواکرول شد. همچنین در شرایط تنش گرما، مقدار پاراسیمن در حدود ۳۲ درصد نسبت به شرایط کنترل افزایش پیدا کرد. اعمال تنش گرما، موجب کاهش ۵۴ درصدی گاماترپنین و ۴۵ درصدی آلفاترپنین نسبت به شرایط نرمال شد (شکل۱). نکته قابل توجه در خصوص تغییر ترکیبات اسانس این بود که اگرچه میزان تیمول و کارواکرول در هر دوتیمار گرما و سرما افزایش پیدا کرد، اما میزان افزایش مقدار تیمول در شرایط سرد نسبت به شرایط گرم، تفاوت معنی‌داری داشت و مقدار این ترکیب در شرایط تنش سرما، به میزان بیشتری افزایش یافت همچنین در شرایط تنش گرما، مقدار کارواکرول افزایش بیشتر و معنی داری نسبت به شرایط سرد داشت.

به‌طورکلی نتایج نشان داد که اعمال تیمارهای دمایی، افزایش ترکیبات مونوترپنی فنولی و کاهش گاماترپنین به عنوان پیش ماده سنتز مونوترپن‌های فنولی را به همراه دارد. Crocoll *et al* (2010) گزارش کردند که گاماترپنین، پیش ماده اصلی سنتز ترکیبات مونوترپنی فنول می‌باشد و پاراسیمن، محصول فرعی تبدیل این ماده به محصولات نهایی است. نتایج این پژوهش نیز نشان داد که افزایش ترکیبات مونوترپنی فنولی، سبب کاهش پیش ماده سنتز این ترکیبات شد. در بررسی کموتایپ تیمول مرزنجوش گزارش شد که با افزایش دما، میزان پاراسیمن افزوده و میزان تیمول کاهش یافت (Dudai *et al.*, 2003). در مطالعه انجام شده روی مرزنجوش (*Origanum*) مشخص شد که در شرایط تیمار دمایی پائین (سرد)، ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس، تیمول و در شرایط تیمار دمایی بالا (گرم)، ماده اصلی تشکیل دهنده اسانس، کارواکرول خواهد بود (Novak *et al.*, 2010) . مطالعه انجام شده روی مرزنجوش نشان داد که سنتز دو ترکیب مونوترپنی فنولی (تیمول و کارواکرول) تحت تاثیر دما، به‌صورت متضاد است. در این گزارش بیان شد که اگرچه تیمول و کارواکرول از لحاظ ساختاری تا حدود زیادی شبیه به هم هستند، اما دو آنزیم متفاوت برای تشکیل آن‌ها از پیش ماده P-cymene نیاز است (Novak *et al.*, 2010).

نتایج مطالعه‌ای بر روی دو رقم مرزه که در فضای باز کشت شده بودند و نمونه برداری از آن‌ها در فاصله ماه‌های ژوئن تا اکتبر (تیر تا آبان) انجام شده بود، نشان داد که تمام مونوترپن سنتتازها و مونوترپن‌ها، تحت تاثیر رقم و فصل قرار می‌گیرند (Groger *et al.*, 2011). بر اساس نتایج پژوهش انجام شده روی گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare* spp. *hirtum*)، مقدار P-cymene در اسانس مربوط به نمونه‌هایی که در اواخر پائیز از یونان جمع شده بودند،نسبت به نمونه‌های جمع‌آوری شده در تابستان، بیشتر بود که دلیل آن‌را به کاهش فعالیت تیمول و کارواکرول هیدروکسیلاز در شرایط سرد نسبت دادند. نتیجه این آزمایش نسبت به آزمایش‌های گذشته بحث برانگیز بود، به‌گونه‌ای که بر

خلاف سایر آزمایش‌ها، میزان تیمول در شرایط سرد، کاهش و در نمونه‌های مناطق گرم، افزایش یافت (Kokini *et al*., 1997). در مطالعه صورت گرفته بر روی فراوانی کموتایپ‌های مختلف آویشن در نقاط مختلف فرانسه گزارش شد که کاهش فروانی جمعیت‌هایی با کموتایپ تیمول در برخی مناطق، با برخی از ویژگی‌های اکولوژیکی منطقه مورد مطالعه از قبیل گرما و خشکی بیشتراین مناطق و سنگلاخی بودن بیشتر زمین نسبت به مناطقی که تیمول در آن از فروانی بیشتری برخوردار بود، همبستگی داشت (Thompson *et al*., 2003).

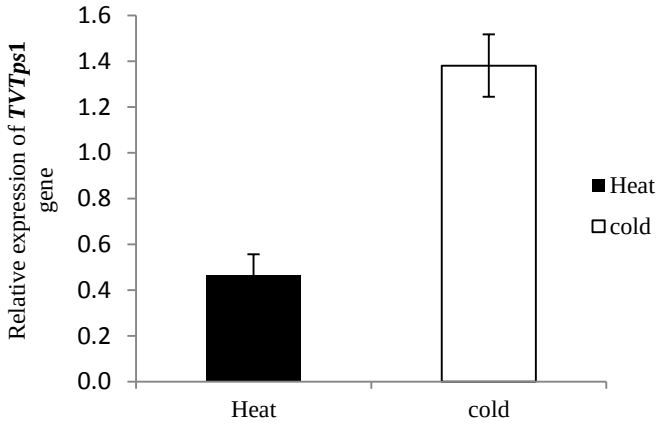


شکل۱- درصد تغییرات ترکیبات موجود در اسانس آویشن ولگار در پاسخ به تیمارهای دمایی گرم (h) و سرد (c) در مقایسه با شاهد

Figure 2. Changes percentage of essential oil compounds of *Thymus Vulgaris* in response to heat and cold treatments compared to control.

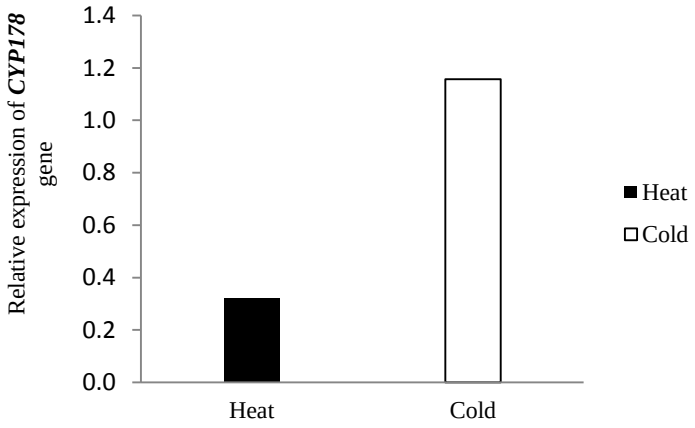
نتایج مربوط به تجزیه بیان ژن گاماترپنین سنتتاز که سنتز گاماترپنین به عنوان پیش ماده سنتز تیمول و کارواکرول را بر عهده دارد نشان داد که درحالی‌که در شرایط تنش گرما، از بیان این ژن کاسته شد، در شرایط اعمال تنش سرما، بیان این ژن افزایش اندکی نسبت به شرایط کنترل داشت (شکل ۲). مقایسه نتایج بیان این ژن با میزان گاماترپنین موجود در اسانس نشان داد که در شرایط تنش گرما، میزان بیان این ژن با میزان متابولیت همخوانی داشت و اعمال تنش گرما، سبب کاهش میزان متابولیت و همچنین کاهش بیان ژن مربوط به سنتز این ترکیب شد. با وجودکاهش میزان گاماترپنین در شرایط تنش سرما، بیان ژن سنتز کننده این ترکیب، هر چند کم اما افزایش یافت. Rodulf *et al* (2016) گزارش کردند که بیان ژن *TVTPS1* با میزان گاماترپنین تولیدی همبستگی بالایی وجود دارد. در مطالعه تاثیر کوتاه مدت گرما بر آویشن ولگار گزارش شد که افزایش دما، سبب افزایش در میزان گاماترپنین و پاراسیمن شد اما میزان تیمول تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت (Eguchi *et al*., 2016). در این مطالعه بیان شد که افزایش مقدار گاماترپنین و پاراسیمن در پاسخ به دما می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که مسیر بیوسنتزی این دو ترکیب، یک مسیر وابسته به دما است؛ همچنین بیان ژن گاماترپنین سنتتاز در پاسخ به افزایش دما افزایش یافت. Habibi *et al* (2018) گزارش کردند که القای تنش سرما در آویشن باغی، کاهش بیان ژن *TPS1* را به همراه داشت.

نتایج مربوط به سنجش میزان بیان ژن *CYP178* که به عنوان ژن سنتز کننده تیمول شناسایی شده است (Crocoll, 2011) نشان داد که میزان بیان این ژن در شرایط تنش گرما کاهش می‌یابد، درحالی‌که در شرایط تنش سرما، بیان این ژن نسبت به شرایط کنترل افزایش پیدا کرده است (شکل ۳). Pateraki & Kanelli (2008) در مطالعه خود بر روی *Cistus creticus* گزارش نمودند که تنش‌ها، سبب افزایش بیان چندین ژن در مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها می‌شود.



شکل ۲- بیان نسبی ژن گاماترپنین سنتتاز (*TVTps1*) در آویشن.

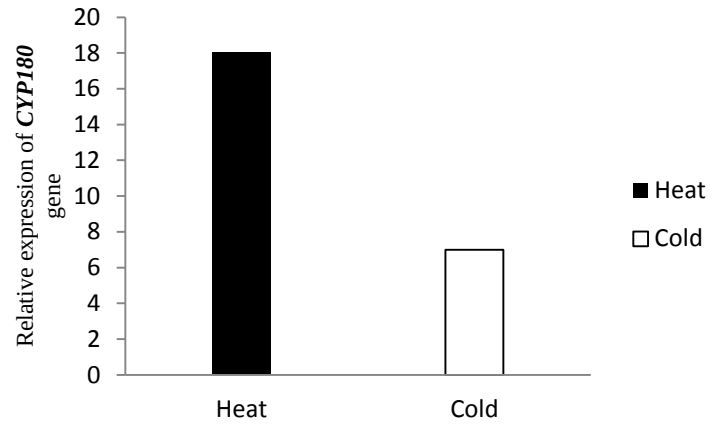
Figure 2. Relative expression of gamaterpenin synthase gene *(TVTps1)* in thyme.



شکل ۳- بیان نسبی ژن *CYP ۱۷۸* در آویشن.

Figure 3. Relative expression of *CYP 178* gene (Thymol synthase) in thyme.

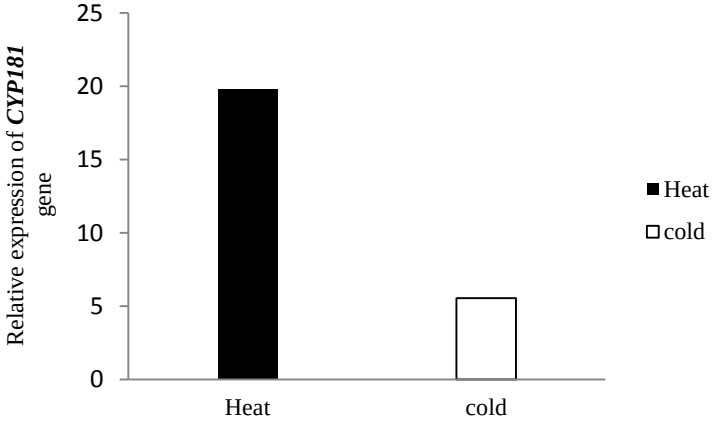
نتایج مربوط به بیان ژن *CYP180* که تحت عنوان ژن کارواکرول سنتتاز معرفی شده است (Crocoll, 2011) نشان داد که اعمال تیمارهای دمایی، افزایش بیان این ژن را به همراه داشته است (شکل ۴). بر اساس نتایج به‌دست آمده، اعمال تنش گرما و سرما، به‌ترتیب موجب افزایش ۱۸ و هفت برابری بیان ژن CYP180 شده است. با توجه به این‌که این ژن، سنتز کارواکرول را بر عهده دارد (Crocoll, 2011; Morshedlo *et al*., 2017)، مقایسه نتایج به‌دست آمده از این بخش با نتایج حاصل از تجزیه ترکیبات اسانس نشان داد که بیان این ژن با میزان کارواکرول موجود در اسانس همخوانی داشت، به این‌صورت که بیشترین مقدار کارواکرول در شرایط تنش گرما به‌دست آمد. Morshedlo *et al* (2017) نیز در بررسی اثر خشکی بر مرزنجوش، همبستگی حدود ۸۰ درصدی این ژن با میزان کارواکرول را گزارش کردند.



شکل ۴- بیان نسبی ژن *CYP ۱۸۰* در آویشن

Figure 4. Relative expression of *CYP180* gene in thyme.

بررسی میزان بیان ژن *CYP181* نتایج نشان داد که اعمال تنش های دمایی، سبب افزایش قابل توجهی در میزان بیان ژن *CYP 181* شده است (شکل ۵). بر اساس نتایج، اعمال تنش گرما موجب افزایش حدودا ۲۰ برابری در میزان بیان این ژن شده است. Crocoll *et al.*, (2011) بیان نمودند که این ژن در سنتز کارواکرول نقش دارد در حالی که Krause *et al*. (2014) اظهار داشتند که این ژن در سنتز پاراسیمن نقش دارد. بر اساس مقایسه میزان بیان این ژن با میزان ترکیبات اسانس، به نظر می‌رسد که این ژن، سنتز پاراسیمن را بر عهده دارد. در مورد تیموس می‌توان گفت که فعال شدن مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها می‌تواند سبب محافظت در برابر تنش گرما شود (Eghuchi *et al.*, 2016).



شکل ۵- بیان نسبی ژن *CYP ۱۸۱* در آویشن.

Figure 5. Relative expression of *CYP181* gene in thyme.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج نشان داد که القای تیمارهای دمایی، سبب افزایش ترکیبات مونوترپنی فنولی تیمول و کارواکرول می‌شود. بر اساس نتایج به‌دست آمده، میزان تیمول در شرایط تنش سرما، افزایش بیشتر و معنی‌داری نسبت به شرایط تنش گرما داشت، درحالی‌که در شرایط تنش گرما، میزان کارواکرول افزایش بیشتری نسبت به شرایط سرد داشت. همچنین نتایج نشان داد که افزایش میزان تیمول و کارواکرول، کاهش گاماترپنین را به دنبال دارد. تنش گرما سبب کاهش بیان ژن‌های *TvTps1* و *CYP178* و افزایش بیان ژن‌های *CYP180* و *CYP181* شد. در شرایط تنش

سرما، بیان تمامی ژن‌های مورد بررسی افزایش پیدا کرد. بر اساس نتایج این پژوهش می توان نتیجه گرفت که مناطق گرم تر برای تولید کارواکرول و مناطق داری تابستان خنک برای تولید تیمول مطلوب‌تر هستند. با توجه به اثر دما بر میزان بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز ترکیبات، به نظر می‌رسد که یکی از عوامل موثر در پاسخ به دما، وجود عوامل تنظیمی پاسخ دهنده در ناحیه پروموتوری این ژن‌هاست که پیشنهاد می‌شود این موضوع در پژوهش‌های بعدی مورد آزمایش قرار گیرد.

REFERENCES

1. Burke, C. C., Wildung, M. R. & Croteau, R. (1999). Geranyl diphosphate synthase: Cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 9, 13062–13067.
2. Channuntapipat, C., Sedgley, M. & Collins, G. (2001). Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S1, S7, S8, and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 1115-1122 .
3. Clark, J. & Menary, R. C. (1980). Environmental effects on peppermint (*Mentha. piperita* L) I. Effect of day length, photon flux density, night and day temperature on yield and composition of peppermint oil. *Australian Journal of Plant Physiology*, 7, 685-692.
4. Crocoll, C. (2011). Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. PhD Dissertation. Biologisch Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany.
5. Davis, E. M. & Croteau, R. (2000). Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Topics in Current Chemistry*, 209, 53–95.
6. Dudai, N., Putievsky, E., Palevitch, D & Halevy, A. (1992). Monoterpene content in *Origanum syriacum* as affected byenvironmental conditions and flowering. *Physiologia Plantarum*, 84, 453-459.
7. Duriyaprapan, S., Britten, E. J. & Basford, K. (1986). The effect of temperature on growth, oil yield and oil quality of Japanese mint. *Annals of Botany*, 58, 729-736.
8. Eguchi, Y., Widiastuti, A., Odani, H., Chinta, Y. D., Shinohara, M., Misu, H., Kamoda, H., Watanabe, H. & Hasegaw, M. (2016). Identification of terpenoids volatilized from *Thymus vulgaris* L. by heat treatment and their in vitro antimicrobial activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94, 83-89.
9. Fakhr Tabatabai, S. M. (2006). A systematic encounter with living nature and other articles in the field of ecology. Anteshar Co., Tehran, 186 Pp.
10. Fletcher, R., Slimmon, T., Auley, S. & Kott, L. (2005). Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint *(Mentha spicata* L*). Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2429–2436.
11. Gershenzon, J. & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 7,408-414.
12. Gröger, S., Schmiderer, C., Steinborn, R. & Novak, J. (2012). Seasonal influence on gene expression of monoterpene synthases in *Salvia officinalis* (Lamiaceae). *Plant Physiology*, 169, 353-359.
13. Habibi, S., Qaderi, A. & Fatehi, F. (2017). The Study of relative expression of key genes of thymol biosynthesis pathway in *Thymus vulgaris* cv. '*Varico 3'* under Cold Stress Using Real-Time PCR. *Journal of Medicinal plants*, 16 (4), 50-59.
14. Jamzad, Z. (2009). *Thymus and Satureja species of Iran*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. (In Persian)
15. Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N. & Lanaras, T. (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*, 44, 883- 886.
16. Lambert, E., Faizal, A. & Greelen, D. (2011). Modulation of triterpene saponin production: in vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 220-237.
17. Maffei, M. & Scannerini ,S. (2011). Photomorphogenic and chemical responses to blue light in *Mentha piperita*. *Journal of Essential Oil Research*, 72, 712-718.

18. Mondak, B., Mohammadi, V. A., Zeinali, H. & Hadian, J. (2015). Evaluation of genetic variability in Iranian *Thymus daenensis* sub sp. daenensis, by use of inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Journal of modern genetic*, 10(4), 575-584.
19. Morshedloo, M. R., Craker, L. E., Salami, A., Nazeri, V., Sang, H. & Maggi, F. (2017). Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 119-128.
20. Nickavar, B., Mojab, F. & Dolat-Abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry*, 90, 609–611. (In Persian)
21. Novak, J., Lukas, B. & Franz, C. (2010). Temperature influences thymol and carvacrol differentially in *Origanum* spp. (Lamiaceae). *Journal of essential oil research*, 22, 412-418.
22. Omid baigi, R. (2009). *Product and processing of medicinal plant*. Astan Ghods Razavi Press. Mashhad, Iran. (In Persian)
23. Pateraki, A. & Kanellis, K. (2010). Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. creticus, *Plant Cell Report*, 29, 629- 641.
24. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
25. Rudolph, K., Parthier, C., Egerer-Sieber, C., Geiger, D., Muller, Y. A., Kreis, W. & Müller, F. (2016). Expression, crystallization and structure elucidation of γ-terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. *Acta Crystallogr*, 72, 16-23.
26. Sangwan, N., Farooqi, A. H., Shabih, F. & Sangwam, R. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34, 3-21.
27. Schellmann, S. & Hülskamp, M. (2005). Epidermal differentiation: trichomes in Arabidopsis as a model system. *The International Journal of Developmental Biology*, 49 (5-6), 579-584.
28. Stahl-Biskup, E. & Saéz, F. (2002). Thyme: the genus *Thymus, medicinal and aromatic plant-industrial profiles*, Taylor & Francis, London.
29. Thompson, J., Chalchat, J. E., Michet, A., Linhart, Y. & 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, 859-880.
30. Timmermans, K. (2003). Intellectual property rights and traditional medicine: policy dilemmas at the interface. *Social Science & Medicine*, 57,745-756.
31. Yanivie, Z. & Palevitch, D. (1982). Effects of drought on secondary metabolites of medicinal and aromatic plants. In: Atal CK, Kapur BM (eds) Cultivation and Utilization of Medicinal Plant. Regional Research Laboratory council of Scientific & Industrial Research, Jammu-Tawi, pp.1–12.