مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۱۶۹-۱۶۱

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1

DOR:20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بررسی بیان ژن‌های الفا سنتاز و گاما سنتاز و ارتباط آن با بیوسنتز مونوترپن تیمول و کارواکرول در گیاه دارویی آویشن باغی رقم واریکو ۳

Investigation of γ-Terpinene synthesis and α- Terpinene synthesis reductoisomerase genes expression and its relation to monoterpene carvacrol biosynthesis in *Thymus vulgaris* cv. 'Varico 3'

شکوفه حبیبی[۱]، عبداله احتشام نیا*[۱]، فواد فاتحی[۲]، اردشیر قادری[۳]
Shokoufeh Habibi [1], Abdollah Ehtesham Nia*[1], Foad Fatehi [2], Ardeshir Ghaderi [3]

۱- گروه علوم باغبانی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.
۲- گروه کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.
۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران.

1. Department of Horticultural Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
2. Department of Agriculture, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran.
3. Medicinal Plants Research Center, Medicinal Plants Research Institute, University Jihad, Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ab.ehteshamnia@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۰)

چکیده

آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) گیاهی خشکی دوست بوده و به سهولت قادر به تحمل کم آبی و خشکی است، مهم‌ترین ماده موثره موجود در آویشن تیمول است دارای خواص ضد میکروبی، دارویی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. تاکنون تحقیقی در رابطه با تاثیر سرما بر میزان تغییرات ژن‌های مسیر سنتز تیمول در آویشن انجام نشده است. این پژوهش به‌منظور بررسی تاثیر تنش دمای پایین در زمان‌های صفر، ۳، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از اعمال تیمار در قالب طرح کاملاً تصادفی بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول شامل TPS2 وTPS5 با استفاده از روش RT-PCR طی سال‌های ۱۳۹٤ و ۱۳۹۵ انجام شد. جهت بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مسیر سنتز تیمول (MVA , MEP) در آویشن باغی رقم واریکو۳ تحت تنش سرمایی از آزمون t استفاده گردید. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان داد که تنش سرمایی بر میزان بیان ژن‌ها اثر معنی‌داری دارد و میزان بیان ژن TPS5 در بازه‌های متفاوت زمانی تنش افزایش یافت و در بازه زمانی ٤۸ ساعت به بیشترین بیان رسید و در ژن TPS2 بیشترین میزان بیان در بازه زمانی ۳ ساعت ۳/٤٦ برابر نسبت به شاهد مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

آویشن باغی،
بیان ژن،
تنش سرمایی،
تیمول و کارواکرول،
مسیر MEP

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1]

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 (Gedif and Hahn, 2002). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت میزان تجارت گیاهان دارویی تا سال ۲۰۵۰ میلادی بالغ بر پنج تریلیون دلار خواهد بود (Baser, 1997). در سال‌های اخیر استفاده از مواد طبیعی گیاهان دارویی به جای افزودنی‌های مصنوعی که دارای اثرات جانبی می‌باشد مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Paradiso et al., 2008). یک سوم داروهای مورد استفاده بشر را داروهای با منشأ گیاهی تشکیل می‌دهند و این میزان رو به افزایش است (Baser, 2008).

آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) گیاهی از تیره نعناعیان (Lamiaceae) و گونه آویشن باغی دیپلوئید 2n=30 است (Horwath et al., 2008). بومی منطقه مدیترانه غربی از شبه جزیره ایبری تا ایتالیا و کشت آن در سرتاسر جهان گسترش پیدا کرده است (Figueiredo et al., 2008). آویشن باغی دارای ساختار بوته‌ای، چندساله و دارای ساقه مستقیم و علفی یا چوبی است (Sarma, 2004; Sharafzadeh, 2011). این گیاه دارای چندین کاربرد در طب سنتی است که به عنوان ضد نفخ، تعریق آور، مدر، ضد عفونی کننده، ضد کرم، بی حس کننده، ضد اسپاسم، ضد کرم روده، ضد اسهال , مسکن درد و همچنین در درمان سوءهاضمه، سندروم روده تحریک پذیر، تب، زخم، درد مفاصل و استخوان، سردرد، میگرن، تهوع و سرماخوردگی به کار برده می‌شود (Sajed et al., 2013).

کارلن و همکاران (۲۰۰۹) به منظور بهینه کردن کیفیت و عملکرد محصول آویشن باغی، یک برنامه اصلاحی انجام شد و ٥٦ دورگه جدید توسط تلاقی کلون‌های نرعقیم و نر بارور حاصل گردید. این هیبریدها طی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۲ با بررسی صفات مختلف مانند عملکرد ورن خشک، اسانس، مقاومت به سرما ارزیابی شدند (Carlen et al., 2009). در بین گیاهان هیبرید حاصل شده، هیبرید امید بخش، 'واریکو ۳' ('Varico 3') نامیده شد. گیاهان دارای دامنه‌های دمایی مشخصی برای رشد و نمو بهینه می‌باشند که در خارج از آن، تولید و پراکنش آنها محدود می‌شود (Carlen et al., 2009). ترپن‌ها از مسیر ۲- سی متیل اریتریتول ٤- فسفات (MEP) سنتز می‌شوند. طی این مسیر که در پلاستید رخ می‌دهد ابتدا پیروات (Pyruvate) و دی گلیسرآلدهید ۳- فسفات (G3P) با یکدیگر ترکیب شده و پس از انجام واکنش‌های بیوشیمیایی لازم دی اکسی زایلو ٥- فسفات (DXP) به‌وجود می‌آید که این ماده نیز تحت تاثیر آنزیم ۱- دی اکسی دی زایلوز ٥- فسفات ردوکتوایزومراز (DXR) باعث تبدیل دی اکسی زایلو٥- فسفات (DXP) به ۲- سی متیل اریتریتول ٤- فسفات (MEP) می‌شود (Rohmer et al., 1996). گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه را به منظور اثرات متقابل با محیط را تولید می‌کنند که توسط انسان به عنوان ترکیب دارویی مصرف می‌شوند (Oksman-Caldentey and Inzém, 2004). سرما، خشکی و شوری از جمله تنش‌هایی هستند که بر رشد و نمو گیاهان و تولید محصول اثر مضر دارند (Rahaii et al., 2010). شناخت مکانیزم‌هایی که گیاهان پیام تنش‌ها را به سیستم سلولی جهت فعال سازی واکنش‌های انطباق با تنش ارسال می‌کنند از جمله ملزومات بنیادی برای توسعه‌ی بیشتر مقاومت گیاهان زراعی به تنش در راستای افزایش بهره‌وری در تولید غذا برای جمعیت رو به رشد جهان به شمار می‌رود (Huang et al., 2012). قرار گرفتن در معرض سرما از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی برای گیاهان در مناطق معتدله می‌باشد (Janská et al., 2010). سرما عامل محدود کننده‌ی رشد گیاهان بوده و به دو دسته‌ی دمای سرمازدگی (۰-۱۵ درجه‌سانتی‌گراد) و دمای یخزدگی (<۰ درجه سانتی‌گراد) تقسیم می‌شود بیشتر گیاهان نمی‌توانند تنش یخزدگی را به راحتی پشت‌سر بگذارند، ولی پس از قرار گرفتن در معرض دمای سرمازدگی می‌توانند مقاوم‌تشان را نسبت به دمای یخزدگی افزایش دهند (Zhou et al., 2011). Mondak et al (2020) به بررسی اثر دما بر متابولیت ها و بیان برخی از ژن های مسیر تیمول و کارواکرول در آویشن باغی پرداختند. در این بررسی اعمال تیمار گرمایی و سرمایی سبب افزایش ترکیبات مونوترپنی فنولی (تیمول و کارواکرول) نسبت به شرایط طبیعی شد و دمای بالا و پائین به ترتیب سبب افزایش معنی دار کارواکرول و تیمول شد (Mondak et al., 2020).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1]

گیاهان می‌توانند با درک تنش سرما و سپس فعال‌سازی سیستم‌های دفاعی و سازگاری خود باعث افزایش مقاومت در برابر تنش سرمایی شوند. بطور عمومی یک فرایند انتقال پیام با درک پیام شروع شده و پس از آن به وسیله پیامبرهای ثانویه شامل القای کلسیم، انواع احیاکننده‌های اکسیژن (ROS) و اینوزیتول فسفاتازها ادامه می‌یابد (Huang et al., 2012). گیاهان از مکانیسم‌های متعدد فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی جهت سازگاری به سرما استفاده می‌کنند (Rahaii et al., 2010). شناسایی و بررسی عملکرد ژن‌های القا شونده با تنش که در فرایند تنظیم تحمل گیاه به تنش‌های محیطی موثر است، در شناخت بیولوژی مولکولی و به‌نژادی گیاهان و رسیدن به تولید پایدار از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: ابتدا بذرها برای جوانه‌زنی در محیط کشت MS کشت شدند و پس از جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه‌ها، بین مرحله چهار تا هشت برگی، از هر ظرف شیشه‌ای *این ویترو* گیاهچه یک اندازه و مشابه از نظر رویشی انتخاب و گیاهک به کمک پنس به آرامی از آگار جدا شده و پس از شستشوی ریشه گیاهک‌ها با آب ولرم، در گلدان‌های کوچکی که با ترکیبی از کوکوپیت و پیت موس استریل (۳:۱) جهت سازگاری منتقل گردید. سپس گلدان‌ها با مقدار کمی آب مقطر مه‌پاش گردیدند. سپس برای حفظ حداکثر رطوبت، روی گلدان‌ها را با سر پوش پلاستیکی پوشانده و به اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۵۰۰۰ لوکس منتقل شدند.

اعمال تنش: گیاهک‌های سازگار شده جهت اعمال تیمارها به سرد خانه با دمای چهاردرجه‌سانتی گراد انتقال گردیدند، 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 RNA کل در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج عصاره و سنجش تیمول و کارواکرول: مقدار ۱۰ گرم برگ را در یک ارلن دربدار ریخته و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول اضافه گردید. به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه اولتراسونیک عصاره‌گیری خواهد شد (۱۵ دقیقه عصاره‌گیری، ۱۵ دقیقه استراحت به دستگاه، در مجموع ٤ ساعت به‌طول می‌انجامد.) سپس برای مدت ۲٤ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در محیط تاریک قرار داده خواهد شد. در ادامه بالنی را به دقت توزین کرده و با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی عصاره در آن صاف خواهد شد. عصاره صاف شده را با روتاری در دمای زیر ۵۰ درجه تغلیظ کرده و دوباره توزین کرده، تا وزن عصاره بدست آید. تا زمان مصرف در فریزر در ۱۸- درجه‌سانتی‌گراد قرار داده خواهد شد. برای تهیه محلول استوک از عصاره تغلیظ شده، آن‌قدر به آن متانول اضافه خواهد شد که غلظت آن به ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برسد. به محلول نهایی متانول اضافه خواهد شد تا غلظت آن به ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برسد. از دستگاه مدل PLATIN blue به همراه پمپ L7100 مجهز به آشکارساز آرایه فوتونی(PDA) در طول موج ۲۷٤ nm نانومتر، سیستم تزریق اتوماتیک و رابط نرم‌افزاری EZchrom استفاده شد. ستون مورد استفاده Nucleodur 100-5, C18 ساخت شرکت MACHEREY-NAGEL کشور آلمان با طول ۲۵۰ میلی‌متری و قطر داخلی ٤,٦ میلی‌متر بود. فاز متحرک مورد استفاده شامل فاز A آب ٤۵٪ در فاز B استونیتریل به صورت ایزوکراتیک و سرعت جریان 1 میلی‌لیتر در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. استونیتریل و آب با خلوص کروماتوگرافی و سایر موارد مورد استفاده از شرکت مرک تهیه گردید. قبل تزریق نمونه و استاندارد با فیلتر سرسرنگی ۰,۲۲ میلی متری در ویال ۱,۵ میلی متری صاف شد و حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق گردید. در تحلیل های آماری، از داده های حاصل از HPLC برای تعیین مقدار تیمول و کارواکرول موجود در نمونه‌ها استفاده شد.

استخراج RNA کل: جهتاستخراج RNA کل بافت گیاهی از روش مبتنی بر ترایزول و رسوب الکلی (روش بهبود یافته پروتکل) چومسینسکی و ساچی استفاده گردید (Chomczynski and Sacchi, 1987).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1]

طراحی پرایمرها: جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن-های Terpen syntase α ، Terpen synthase Gamma و ژن کنترل 18srRNA مورد نیاز برای این مطالعه، توالی‌های گزارش شده در بانک جهانی داده‌های بیوتکنولوزی (National Center of Biotechnological Database (NCBI) مربوط به این ژن‌ها گرفته شد و در نرم‌افزار Bioedit همردیف‌سازی توالی‌ها صورت گرفت . نواحی محافظت شده این ژن‌ها شناسایی و برای طراحی پرایمر در نرم افزار Oligo7 (Rychlik, 2007). مورد استفاده قرار گرفت (Hall, 1999). تمامی نکات مربوط به طراحی اعم از درصد GC بالای ۵۰ درصد و حضور G و یا C در انتهای '۳ پرایمرها، دمای اتصال ٦۰ درجه و طراحی پرایمر از ناحیه '۳ ژن مورد توجه قرار گرفت. در نهایت پرایمرهای طراحی شده برای ارزیابی اختصاصی بودن در ابزار primer-BLAST سایت NCBI مورد آزمون قرار گرفت. برای

نمونه‌های RNA استخراج شده برای ارزیابی یکپارچگی و همچنین غلظت آن‌ها به ترتیب با ژل آگاروز ۱٪ و خوانش اسپکتروفتومتری ۲٦۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتری در دستگاه NanoDrop (ThermoScientific2000c, USA) مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق برای تبدیل RNA کل استخراج شده به DNA مکمل یا cDNA از روش استفاده همزمان OligodT و پرایمرهای تصادفی در حضور آنزیم Reverse transcriptase و به کار بردن مقدار ۱ میکروگرم RNA برای انجام واکنش استفاده گردید.

واکنش Real Time PCR: برای انجام آنالیز بیان ژن به روش Real Time PCR از روش مبتنی بر رنگ فلورسنس SYBR green استفاده گردید. در این روش ابتدا در دستگاه ترموسایکلر معمولی شرایط انجام واکنش PCR شامل حجم واکنش، غلظت پرایمر، دمای اتصال پرایمرها، مدت زمان لازم برای بسط قطعه، غلظت $MgCl_2$ و سایر عوامل موثر بر تکثیر بهینه گردید و شرایط بهینه بدست آمده در دستگاه StepOne Real Time PCR (ABI, USA) اجرا گردید. برای بهینه کردن دمای اتصال پرایمرها از روش Gradient PCR استفاده گردید. همچنین صحت و درستی cDNA سنتز شده با استفاده از PCR ژن کنترل در همه نمونه‌های مورد مطالعه انجام گرفت.

تحلیل آماری: داده‌های بدست آمده از آنالیز بیان ژن با استفاده از مدل دلتا Ct ($\Delta\Delta$Ct) تصحیح شده با بازدهی (Efficiency corrected calculation) تکثیر (Livak and Schmittgen, 2001) و در نرم افزار Excel 2007 وارد شدند و مورد آزمون Ttest قرار گرفت و برای مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف از آزمون دانکن استفاده گردید ($P<0.05$).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن گاماترپینن سنتاز در شرایط تنش ۳، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت نشان داد که بیان این ژن در شرایط تنش ۳ ساعت نسبت به شاهد به‌طور قابل توجه و معنی‌دار افزایش و در بازه‌های ۱۲ ($P<0.01$) و ۲٤ ($P<0.01$) ساعت نسبت به شاهد کاهش می‌یابد. در شرایط تنش ٤۸ ساعت افزایش در بیان مشاهده گردید و اختلاف نسبت به شاهد معنی‌دار بوده است ($P>0.01$). با توجه به شکل ۱ بیان ژن TPS2 در زمان‌های مختلف قرارگیری در شرایط تنش نسبت به شاهد، بیشترین میزان بیان ژن در شرایط تنش ۳ ساعت و کمترین میزان بیان ژن در شرایط تنش ۱۲ ساعت مشاهده گردید.

نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن آلفا ترپینن سنتاز در شرایط تنش سه، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت نشان داد که بیان این ژن در شرایط تنش سه، ۱۲ و ۲٤ ساعت نسبت به شاهد اختلاف مشاهده شده معنی‌دار نبوده است ($P>0.05$).

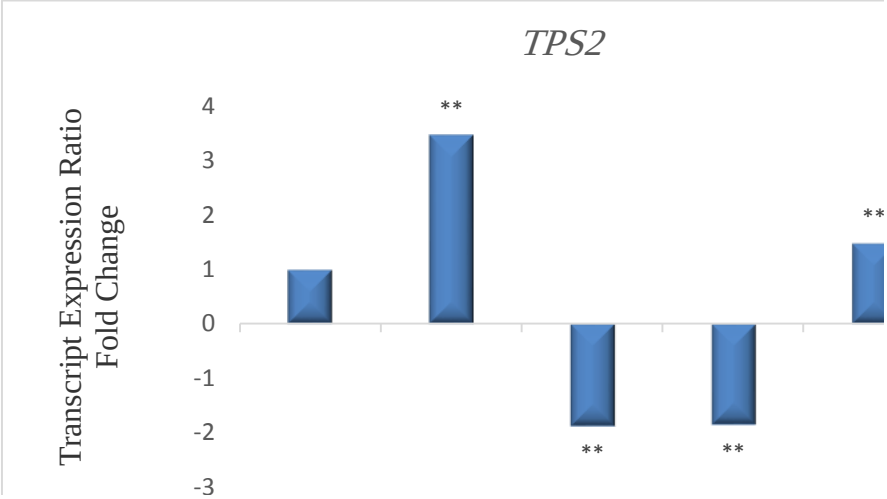
در شرایط تنش ٤۸ ساعت افزایش در بیان مشاهده گردید و اختلاف مشاهده شده در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است ($P<0.01$). با توجه به شکل ۲ بیان ژنTPS5 در زمان‌های مختلف قرارگیری در شرایط تنش نسبت به شاهد، بیشترین میزان بیان ژن در شرایط تنش ٤۸ ساعت مشاهده گردید.

نتایج اندازه‌گیری تیمول و کارواکرول در گیاه دارویی آویشن باغی با HPLC نشان داد که اثر بازه‌های زمانی مختلف بر مقادیر کارواکرول و تیمول در سطوح مختلف تنش سرمایی بر گیاه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

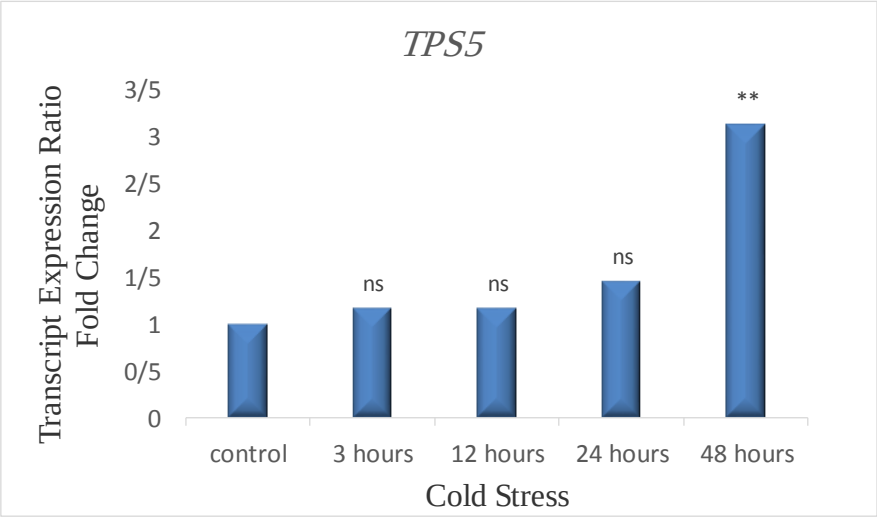
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1]

آویشن باغی رقم واریکو۳ در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها (شکل۳) 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 بجز ٤٨ ساعت پس از تنش داشت.



شکل ۰۱- بیان نسبی ژن TPS2 در گیاه آویشن تحت تنش سرمایی. ** معنی دار در سطح یک درصد.

Figure 1- Relative expression of TPS2 in thyme under cold stress. ** Significant at p<0.01.



شکل ۲- بیان نسبی ژن TPS5 در گیاه آویشن تحت تنش سرمایی. ** معنی دار در سطح یک درصد، ns غیرمعنی دار.

Figure 2- Relative expression of TPS5 in thyme under cold stress. ** Significant at p<0.01, ns Non-significant.

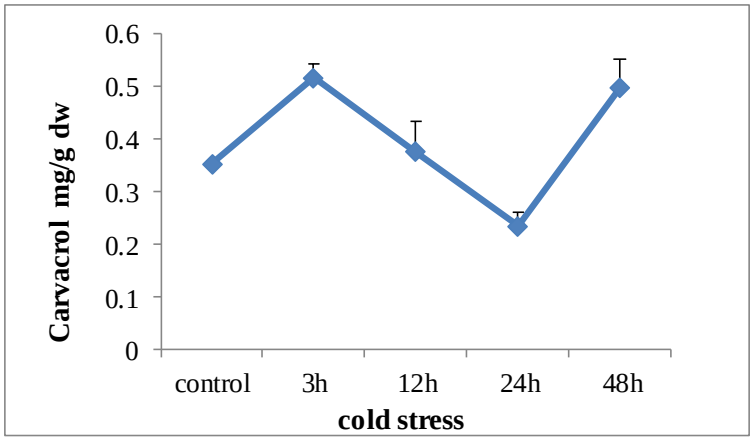
جدول ۰- تجزیه واریانس مقادیر تیمول و کارواکرول در سطوح مختلف تنش سرمایی بر گیاه آویشن باغی رقم واریکو۳. ** معنی دار در سطح یک درصد.

Table 1- Analysis of variance (ANOVA) Thymol and Carvacrol in Thyme under cold stress. ** Significant at p<0.01.

Thymol تیمول	Carvacrol کارواکرول	Source of variation منابع تغییرات
۳/۰۳٦**	۰/۰٤**	Treatment تیمار
۰/۰۰٦	۰/۰۰٤	Error خطا
۲/۲۸	۱٦/۹۲۷	Coefficient of variation ضریب تغییرات

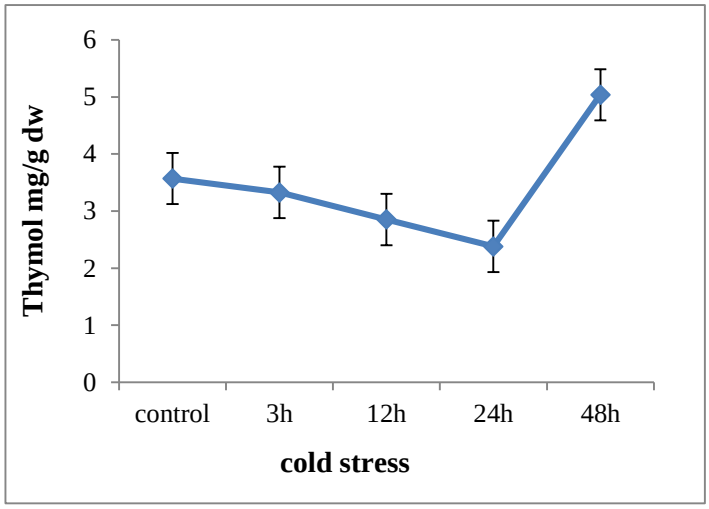
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1]

مقایسه میانگین‌ها (شکل٤) نشان داد که قرارگیری نمونه‌ها به‌مدت ٤٨ 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 ۳- اثر بازه‌های زمانی تنش سرمایی بر میزان کارواکرول. * ارور بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

Figure 3- Amount of Carvacrol in thyme in different time point of cold stress. *The bars indicate standard error.



شکل ۰- اثر بازه‌های زمانی تنش سرمایی بر میزان تیمول. * ارور بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

Figure 4- Amount of Thymol in thyme in different time point of cold stress. *The bars indicate standard error.

نتایج حاصل نشان داد که تنش سرمایی بر میزان بیان ژن‌ها اثر معنی‌داری داشته و میزان بیان ژن TPS5 در بازه‌های متفاوت زمانی تنش افزایش و در بازه زمانی ٤٨ ساعت به بیشترین بیان رسید. بیشترین میزان بیان در ژن TPS2 در بازه زمانی سه ساعت ٣/٤٦ برابر نسبت به شاهد مشاهده شد. ژرانیل دی فسفات تحت تاثیر آنزیم مونوترپن سنتاز به مونوترپن‌ها تبدیل می‌شود (Lambert et al., 2011). گاما ترپن سنتاز (γ-Terpinene synthesis)، مونوترپن سنتازی است که ژرانیل دی فسفات را به گاما ترپینن تبدیل می‌کند. گاما ترپینن پیش ماده تیمول در گیاهانی مانند آویشن و پونه است (Crocoll et al., 2010). در مطالعه‌ای که با استفاده از تیمارهای اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات و ترانس‌سینامیک در گیاه دارویی آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) انجام شد میزان بیان ژن TPS2 بعد از ٢٤ ساعت در گیاه آویشن نشان داد که بیان این ژن تحت تاثیر این تیمارها تغییر می‌کند (Malekzadeh et al., 2016). در مطالعات انجام شده آنالیز بیوانفورماتیکی ژن ترپن سینتاز۲ در آویشن باغی و مقایسه آن

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1]

با سایر گیاهان نتایج این تحقیق یک پایه اطلاعات بیوانفورماتیکی در رابطه با شناخت هر چه دقیق‌تر این ژن برای انجام دست‌ورزی‌های ژنتیکی در راستای افزایش تیمول در گیاهان دارویی فراهم می‌آورد (Nemani et al., 2016). با توجه به مصرف بالای تیمول، بهتر است برای تولید بیشتر، از روش‌های نوینی همچون افزایش بیان و انتقال ژن‌های مهم مسیر سنتز آن از جمله ترپن سینتاز استفاده شده که منجر به افزایش تولید این ماده با ارزش در گیاهان دارویی و رسیدن به راندمان مطلوب تولید آن در واحد سطح می‌شود (Baser, 1997).

در پژوهشی تجزیه بیان ژن‌های مسیر تیمول و کارواکرول در آویشن باغی نشان داد که اعمال تیمار سرما، سبب افزایش میزان بیان ژن‌های TvTps1 و CYP178 و تیمارگرما موجب کاهش آنها خواهد شد. در این مطالعه، میزان بیان ژن‌های CYP180 و CYP181در هر دو شرایط سرما و گرما افزایش نشان داد؛ اگرچه میزان افزایش در شرایط گرما، بسیار بیشتر از تیمار سرما بود (Mondak et al., 2020). در مطالعه‌ای که به بررسی بیوانفورماتیکی گاماترپینن سنتاز کلون شده در گیاه دارویی مرزه (*Satureja hortensis*) انجام شد (Maroofi et al., 2016) مشاهده شد که 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. اگرچه توضیح چگونگی مکانیسم تنظیمی بیان ژن TPS5 و TPS2 در بیوسنتز مونوترپن تیمول و کارواکرول در گیاه آویشن باغی نیازمند شواهد مستدل بیشتری می باشد، اما به احتمالی می‌توان گفت که بیوسنتز مونوترپن تیمول و کارواکرول در گیاه آویشن باغی رقم واریکو۳ به‌طور عمده از مسیر MEP صورت می‌گیرد و آنزیم آلفا و گاما در تنظیم بیوسنتز مونوترپن تیمول و کارواکرول نقش دارند. اگر هدف به دست آوردن گیاهی با تولید بیشتر تیمول باشد، علاوه بر ژن‌های اختصاصی کدکننده مسیر بیوسنتز، بررسی همزمان بیان ژن سایر آنزیم‌هایی که بیوسنتز را در سایر مسیرهای تولیدی کد می‌کنند نیز حائز اهمیت می‌باشد. همچنین تلاش برای یافتن راه‌هایی برای کاهش فعالیت آنزیم‌های ناخواسته و در نتیجه افزایش بیان ژن آنزیم‌های مورد نظر نیز دارای اهمیت می‌باشد. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی، بازه‌های زمانی بیشتر تنش سرمایی و همچنین دماهای متفاوت و زیر صفر درجه سانتی‌گراد بر بیان ژن‌های مسیر سنتز تیمول در آویشن باغی رقم واریکو ۳ مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

Baser KHC. 1997. Industrial utilization of medicinal and aromatic plants. Acta Horticulturae. 503:177-192.

Carlen C, Schaller M, Carron CA, Vouillamoz JF, Baroffio June CA. 2009. The new Thymus vulgaris L. hybrid cultivar'Varico 3'compared to five established cultivars from Germany, France and Switzerland. In IV International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants-ISBMAP. 860 (pp. 161-166).

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry. 162(1), pp.156-159.

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 molecular biology. 73: 587-603.

Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJ. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour and Fragrance Journal. 23(4), pp.213-226.

Gedif T, Hahn HJ. 2002. Herbalists in Addis Ababa and Butajira, Central Ethiopia: Mode of service delivery and traditional pharmaceutical practice.Ethiopian Journal of Health Development. 16(2), 183-189.

Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In Nucleic acids symposium series. Vol. 41, pp. 95-98.

Horwath AB, Grayer RJ, Keith-Lucas DM, Simmond MS. 2008. Chemical characterisation of wild populations of Thymus from different climatic regions in southeast Spain. Biochemical Systematics and Ecology. 36(2), pp.117-133.

Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF. 2012. Signal transduction during cold,

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1]

salt, and drought stresses in plants. Molecular biology reports. 39(2), pp.969-987.

Janská A, Maršík P, Zelenková S, Ovesna J. 2010. Cold stress and acclimation–what is important for metabolic adjustment? Plant Biology. 12(3), pp.395-405.

Lambert E, Faizal A, Geelen D. 2011. Modulation of triterpene saponin production: in vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. Applied biochemistry and biotechnology. 164 :220-237.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods. 25(4), pp.402-408.

Malekzadeh A, Majdi M, Maroufi A. 2016. Evaluation of gamma-terpinene synthase gene expression under salicylic acid, methyl treatments Jasmonate and trans-cinnamate in thyme (*Thymus vulgaris* L.). Agricultural research. (In Farsi with English abstract).

Maroofi A, Ghobadi S, Majdi M. 2016. Bioinformatics study of cloned gamma-terpinene synthase in safflower (*Satureja hortensis*). 9th National biotechnology congress, Tehran, Iran (In Farsi with English abstract).

Mondak B, Mohammadi V, Hadian J, Zeynali Khanghah H. 2020. The impact of temperature on metabolites and the expression of genes involved in thymol and carvacrol biosynthesis pathway in *Thymus vulgaris*. Iranian Journal of Field Crop Science. 51, (1): 195-205. (In Farsi with English abstract).

Nemani M, Sadat Noori A, Tohaidfar M, Ramshini H. 2016. Bioinformatics analysis of terpene synthase 2 gene in Thyme and comparing it with other plants. 9th National biotechnology congress, Tehran, Iran. (In Farsi with English abstract).

Oksman-Caldentey KM, Inzém D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends Plant Science. 9(9): 433-440.

Paradiso VM, Summo C, Trani A, 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 MA, Abdmishani S, Shang P. 2010. Assessment of the MYB gens exprtion modle in wheat (*Triticum aestivum* 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 with English abstract).

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.

Rychlik W. 2007. OLIGO 7 primer analysis software. Humana Press. pp. 35-59.

Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M. 2013. *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi Thyme) an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. Journal of ethnopharmacology. 145(3), pp.686-698.

Sharafzadeh Sh. 2011. Effect of Nitrogen, Phosphorous and potassium on growth, essential oil and total phenolic content of Garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Advances in Environmental Biology. 5(4): 699-703.

Sharma R. 2004. Agro-Techniques of Medicinal Plants. Daya Publishing House, Delhi. 264p.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature. 469(7329), pp.221-225.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Investigation of γ-Terpinene synthesis and α- Terpinene synthesis reductoisomerase genes expression and its relation to monoterpene carvacrol biosynthesis in *Thymus vulgaris* cv. 'Varico 3'

Shokoufeh Habibi [1], Abdollah Ehtesham Nia*[1], Foad Fatehi [2], Ardeshir Ghaderi [3]

1. Department of Horticultural Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
2. Department of Agriculture, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran.
3. Medicinal Plants Research Center, Medicinal Plants Research Institute, University Jihad, Karaj, Iran.
*Corresponding Author, Email: ab.ehteshamnia@gmail.com

Abstract

Thyme (*Thymus vulgaris* L.) is xerophytes plant that can tolerat against drought and water loss stress easily. Most important secondary metabolites in Thyme are Thymol that have medicinal, antioxidant and antimicrobial properties. No research has carried out so far on the effects of cold stress on the synthesis of Thymol pathway genes and on the physiological and biochemical characteristics. This study was designed to investigate the effect of low temperature stress (4 °C) on the expression Thymol pathway genes such as TPS2 and TPS5 genes using RT-PCR in the time period of 0, 3, 12, 24 and 48 hours after treatment. To evaluate the levels of relative expression of these genes for the synthesis of Thymol (MVA, MEP) t-test was used. TPS2 gene has highest expression within the 3 hours after treatment (3.46 times) compared to the control.

Keywords: *Thymus vulgaris*, Cold stress, Gene Expression, Pathway MEP, Thymol and Carvacrol

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.6.1]