

تجزیه بیان ژن‌های بیوستنزی تیمول و کارواکرول در بافت‌های مختلف آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)

عاطفه مشهدی ملک‌زاده^۱، محمد مجدی^{۲*} و اسعد معروفی^۳

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

پست الکترونیک: m.majdi@uok.ac.ir

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۱۵

چکیده

آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) یکی از مهمترین گیاهان دارویی است که بیش از ۲۰ نوع ترکیب شیمیایی مهم شناخته شده دارد. ژن ۱-دی اکسی دی زابلوز ۵-فسفات ردوکتوایزومراز (*DXR*) به عنوان نقطه کنترلی مهم در مسیر MEP عمل می‌کند، زیرا اولین مرحله اصلی و متمایزکننده مسیر MEP می‌باشد. گام‌ترین جزء کلیدی اسانس در آویشن باغی می‌باشد، که حدود ۳۰٪ از اسانس را تشکیل می‌دهد و به وسیله گام‌ترین سنتاز تولید می‌شود. سیتوکروم‌های مختلف از P450s شامل *CYP71D178* و *CYP71D180* است که با واسطه گام‌ترین در بیوستنزی تیمول و کارواکرول دخیل هستند. این پژوهش، با هدف بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در بیوستنزی تیمول و کارواکرول شامل *DXR*، گام‌ترین سنتاز، *CYP71D178* و *CYP71D180* در بافت‌های گل و برگ آویشن باغی انجام شد. در این مطالعه الگوی بیان این ژن‌ها در بافت‌های گل و برگ با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه کمی بررسی شد. میزان بیان ژن در بافت گل نسبت به برگ برای ژن‌های *DXR*، گام‌ترین سنتاز، *CYP71D178* و *CYP71D180* به ترتیب ۱/۷، ۲/۷، ۱/۹ و ۲ برابر بیشتر بود و شدت بیان ژن‌های مختلف نیز با هم متفاوت بود. میزان بیان این ژن‌ها در کرک‌های غده‌ای بالا بود. بنابراین بیان بالا در بافت گل احتمالاً به دلیل تراکم بالای کرک‌های غده‌ای می‌باشد. با توجه به این نتایج میزان اسانس بیشتر در گل نسبت به برگ می‌تواند ناشی از بیان بیشتر ژن‌های بررسی شده در گل نسبت به برگ باشد.

واژه‌های کلیدی: *DXR*، آویشن، گام‌ترین، *CYP71D178*، *CYP71D180*، بیان ژن

مقدمه

آویشن از گیاهان دارویی مهم متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد که دارای ترکیبات ارزشمند و مفیدی است که در صنایع دارویی و بهداشتی کاربرد دارد (Ozguven & Tansi, 1998; Horwath et al., 2008). جنس آویشن (*Thymus*) در سال ۱۷۳۵ میلادی توسط لینه شناسایی و طبقه‌بندی شد که شامل گروه بزرگی از گیاهان دارویی با ساقه‌های چوبی است (Elena-Rossello, 1981). آویشن با نام عمومی Thyme گیاهی دولپه‌ای متعلق به خانواده نعناعیان و زیر خانواده Nepetoideae است که به صورت گیاهی چندساله با ارتفاع ۲۰ تا ۵۰ سانتی‌متر و گل‌هایی به رنگ سفید تا ارغوانی دارای میوه‌ای به شکل فندقه با پوستی صاف می‌باشد (Vernet et al., 1986; Ozguven & Tansi, 1998). گونه آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) دیپلوئید ($2n=30$) است (Horwath et al., 2008). آویشن تاریخچه مصرف دارویی، غذایی، ضد عفونی‌کنندگی و خوشبوکننده طولانی مدتی دارد و در مطالعات فراوانی اهمیت ترکیبات شیمیایی آن بررسی شده است (Elena-Rossello, 1981; Behnia et al., 2008; Lopez-Pujol et al., 2004).

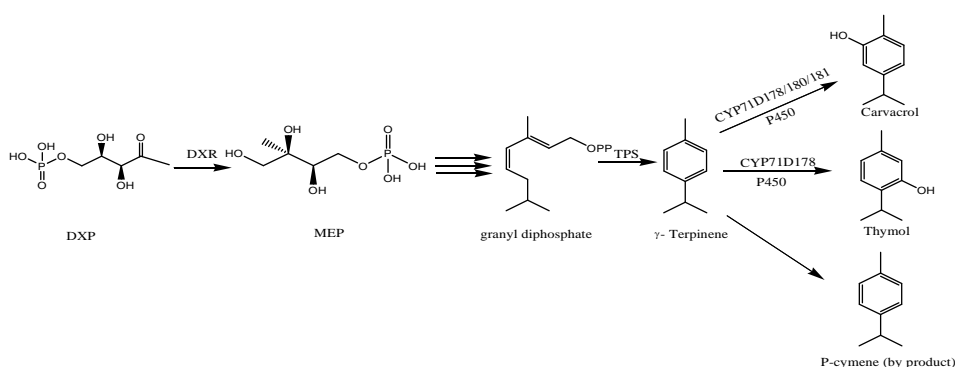
مواد شیمیایی تشکیل‌دهنده آویشن عمدتاً به دو گروه فلاونوئیدها و اسانس تقسیم‌بندی می‌شوند. فلاونوئیدها شامل تیموسین (*Thymosin*)، ایزوتیمونین (*Isotimonin*)، تیموزین (*Thymosin*)، فلاونول‌ها (*Flavonols*) و لوتولین (*Luteolin*) بوده و ترکیبات اصلی اسانس فرار در آویشن مونوترپن‌های آروماتیک هستند که شامل تیمول (*Thymol*) (۳۸ درصد)، کارواکرول (*Carvacrol*) (۱۵-۲ درصد)، پی-سیمین (*P-cymene*) (۲۳ درصد)، گاماترینین (*Terpinene*) (۲۸ درصد) و کامفور (*Camphor*) (۱۵-۱ درصد) می‌باشند. البته از سایر مواد تشکیل‌دهنده آویشن می‌توان به تانن‌ها (*Tanin*) ساپونین‌ها (*Saponin*) و رزمارینیک اسید اشاره کرد (Ozguven & Tansi, 1998; Behnia et al., 2008). این گیاهان، ناشی از اسانس موجود در کرک‌های غده‌ای است که در اندام‌های هوایی گیاه وجود دارد (*Gershenzon*)

مطالعات انجام شده نشان داده است که تیمول در کرک‌های غده‌ای سنتز می‌شود (Fahn, 1988). مهمترین ماده مؤثر موجود در آویشن تیمول است که به دلیل خواص ضد آفت، ضد میکروبی، دارویی و آنتی‌اکسیدانی آن اهمیت بالایی دارد (Isman, 2000; Hummelbrunner & Isman, 2001; Ultee et al., 2002; Sedy & Koschier, 2003; Braga et al., 2008).

تیمول یک مونوترپن فنولی است که دارای ۳ گروه متیل، یک حلقه بنزنی و یک گروه هیدروکسیل با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}O$ می‌باشد (Crocchi et al., 2010). مونوترپن‌ها از مسیر MEP (2-C-methylerythritol 4-phosphat) سنتز می‌شوند. در طی این مسیر که در پلاستید رخ می‌دهد ابتدا پیرووات (*Pyruvate*) و دی گلیسرآلدهید ۳-فسفات با یکدیگر ترکیب شده و پس از انجام واکنش‌های بیوشیمیایی لازم دی‌اکسی زایللو ۵-فسفات (*Deoxyxylose-5-phosphate*) به وجود می‌آید که این ترکیب نه تنها پیش ماده برای ایزوپرنوئیدها می‌باشد بلکه به‌عنوان کوفاکتور تیامین پیروفسفات و پیرودوکسال فسفات نیز به‌کار برده می‌شود (Julliard & Douce, 1991; Julliard, 1992). این ماده نیز تحت تأثیر آنزیم DXR (*1-deoxy-D-xylose-5-phosphate reductoisomerase*) تبدیل به دی‌اکسی زایللو ۵-فسفات به ۲-سی متیل اریتریتول ۴-فسفات (MEP) می‌شود. در واقع اولین مرحله از مسیر MEP در بیوسنتز ایزوپرنوئیدها می‌باشد (Rohmer et al., 1993). بنابراین DXR نقش مهمی در کنترل مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها در پلاستید دارد. پس از انجام واکنش‌های دیگر، ایزوپنتیل دی فسفات (*Isopentenyl diphosphate*) و دی متیل‌آلیل دی فسفات (*Dimethylallyl diphosphate*) به وجود می‌آیند که این دو ماده قابلیت تبدیل به یکدیگر را دارند. در ادامه با ترکیب شدن این دو ماده و تحت تأثیر ژرانیل دی فسفات سنتاز (*Geranyl diphosphate synthesis*) و ژرانیل دی فسفات (*Geranyl diphosphate*) که پیش ماده مونوترپن‌ها است به وجود می‌آید (شکل ۱). ژرانیل دی فسفات نیز تحت تأثیر آنزیم مونوترپن سنتاز به

عمل انجام می‌شود. اخیراً، سیتوکروم P450s مختلف، *CYP71D178* و *CYP71D180* در آویشن و پونه‌کوهی جداسازی شده است که در مراحل انتهایی بیوسنتز تیمول و کارواکرول دخیل می‌باشند، که در این مسیر گام‌اترپین به‌طور مستقیم به تیمول و کارواکرول تبدیل می‌شود و پی-سیمن نیز به‌عنوان محصول جانبی تشکیل می‌شود (شکل ۱) (Crocoll *et al.*, 2010).

مونوترپین‌ها تبدیل می‌شود (Burke *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2000; Davis & Croteau, 2000; Mahmoud & Croteau, 2003; Van Schie *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2011). گام‌اترپین سنتاز (Terpinene synthesis -)، یک مونوترپین سنتاز است که ژرانیل دی فسفات را به گام‌اترپین تبدیل می‌کند. گام‌اترپین پیش ماده تیمول و کارواکرول در گیاهانی مانند آویشن و پونه است (Crocoll *et al.*, 2010) (Grosso *et al.*, 2010) که با واسطه سیتوکروم P450ها این



شکل ۱- مسیر پیشنهادی برای تشکیل تیمول و کارواکرول در پونه و آویشن واقع در پلاستیدها (Crocoll *et al.*, 2010)

متفاوت باشد (Burlat *et al.*, 2004; Majdi *et al.*, 2014). در این پژوهش بیان نیمه‌کمی ژن‌های بیوسنتزی تیمول و کارواکرول شامل DXR، گام‌اترپین سنتاز، *CYP71D178* و *CYP71D180* در بافت‌های برگ و گل در گیاه آویشن بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذر آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان کشت شد. سایر آزمایش‌ها، در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان انجام شد.

استخراج RNA

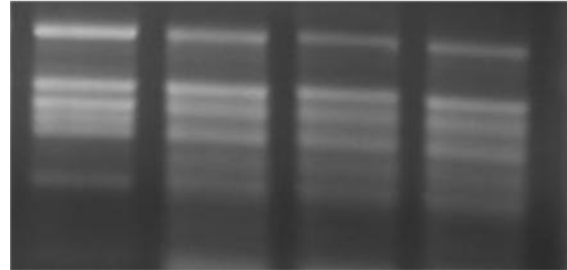
برای استخراج RNA تام از بافت‌های سالم گل و برگ آویشن، از کیت سیناژن محلول RNAX™_PLUS همراه با

سیتوکروم P450s منواکسیژناز (Cytochrome P450s monooxygenases) از یک کلاس آنزیمی شناخته شده که در همه موجودات از جمله حیوانات، باکتری‌ها، قارچ‌ها، آرکتی‌ها (Archaea)، پروتیست‌ها (Protists) و حتی ویروس‌ها وجود دارد (Anonymous, 2009) (**Error!**) (Reference source not found). تعداد کل P450 سال ۲۰۰۹ به بیش از ۱۱۰۰۰ رسید (Anonymous, 2008). بزرگ‌ترین گروه از P450s (۴۲۶۶ آنزیم‌ها) در گیاهان است که دلیلی برای تنوع بسیار زیاد ساختاری محصولات طبیعی در این سلسله یا قلمرو می‌باشد.

ترپنوئیدها در گیاهان نقش‌های متفاوتی دارند. چون کمیت و کیفیت ترپین‌ها در بافت‌های مختلف برگ و گل متفاوت است، پس احتمالاً بیان ژن‌های مرتبط نیز متفاوت است و بیوسنتز این ترکیبات معمولاً مرتبط با میزان بیان ژن‌های آنها در سطح رونوشت می‌باشد. با توجه به این نقش‌ها تصور می‌شود که بیان این ژن‌ها در بافت‌های مختلف گیاه

استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer 3 و Oligonucleotide Properties Calculator آغازگرها طراحی شد. طول قطعه-ای که با این جفت آغازگر برای ژن *GAPDH* تکثیر می‌شود تقریباً ۴۰۰ جفت باز است. در این تحقیق ژن خانه‌دار *GAPDH* به‌عنوان ژن کنترل داخلی برای نرم‌ال‌سازی داده‌ها استفاده شد. به‌منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن *DXR* توالی‌های مربوط به گونه‌های نعناع، مریم‌گلی، کلنوس (*Plectranthus barbatus*)، گل میمون و گل پرپوش (*Catharanthus roseus*) از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Editseq توالی‌های پروتئینی cDNA هر ژن به‌طور جداگانه ذخیره شدند. در مرحله بعد توالی‌های ذخیره شده در نرم‌افزار MegAlign از مجموعه نرم‌افزارهای DNASTAR (شرکت Lasergene) هم‌ردیف شدند. ابتدا توالی‌های پروتئینی مربوط به هر ژن هم‌ردیف شدند و بعد مناطق حفاظت شده در سطح پروتئین شناسایی شد. به‌منظور شناسایی توالی‌های حفظ شده نوکلئوتیدی از روی توالی‌های پروتئینی حفاظت شده از پایگاه اینترنتی Expasy استفاده شد. در مرحله بعد، آغازگرهای انتخاب شده با استفاده از Oligonucleotide Properties Calculator بررسی شدند تا آغازگرهای اختصاصی مناسب برای مناطق حفاظت شده هر ژن طراحی شوند. به‌منظور بررسی بیان ژن‌های گاماترینین سنتاز، CYP71D178 و CYP71D180 آغازگرها براساس توالی‌های اختصاصی مربوط به ژن گاماترینین سنتاز در گیاه آویشن طراحی شدند. توالی ژن گاماترینین سنتاز با شماره شناسایی JQ957866.1 از پایگاه داده NCBI به‌دست آمد. همچنین برای بررسی بیان ژن‌های CYP71D180 و CYP71D178 براساس توالی این ژن‌ها که توسط Crocoll و همکاران (۲۰۱۱) توالی‌یابی شده آغازگرها طراحی شدند. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) طراحی شد و دمای اتصال و سایر خصوصیات نیز با برنامه آنلاین Oligonucleotide محاسبه شد (جدول ۱).

کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵ درصد و آب DEPC (دی اتیل پیروکربنات) طبق پروتکل شرکت سیناژن استفاده شد. پس از استخراج RNA کل، کیفیت آن به‌وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد بررسی شد (شکل ۲).



شکل ۲- RNA استخراجی از نمونه‌های برگ‌ی آویشن باغی

سنتز cDNA

برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت ویوانتیس (نام شرکت و کشور به انگلیسی) به شرح زیر استفاده شد. ابتدا ۶ میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر Oligo dt و ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار به میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری اضافه شد و بعد با استفاده از آب عاری از نوکلئاز حجم نهایی به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و بعد به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. به نمونه‌ها ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس و ۷/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به آنها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای نگهداری نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی-گراد قرار داده شدند.

واکنش PCR

طراحی آغازگرها

برای طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن *GAPDH* (Glyceride aldehyde 3 phosphate) به‌عنوان ژن مرجع توالی مورد نیاز از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت شد و بعد با

جدول ۱. مشخصات مربوط به آغازگرهای استفاده شده

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال محاسباتی
F-GAPDH	CGCTCCAATGTTTGTGTGG	59.4 °C
R-GAPDH	CATCCTCGGTGTATCCAAGG	60.5 °C
F-GAMMA	AGGATCCAAAGGCTAGAGGC	60.5 °C
R-GAMMA	CACGTCCCCTCTCTCAGC	61.6 °C
F-DXR	GCCTTTTGTCTTCTCTTGC	61.2 °C
R-DXR	TCCGCTCGATGCTTGTGCG	61.6 °C
F-CYP180	GGTAAACTGGCGGACTTGGT	61.2 °C
R-CYP180	CGAACGGGATTAAGCTCGAAA	60 °C
F-CYP178	TGGCCTTTGGAAGCGTCG	58.4 °C
R-CYP178	TCAGGCTCATTCCAA TAGAGG	59.5 °C

GAPDH: گلیسرآلدئید-۳-فسفات، GAMMA: گاماترپین سنتاز، DXR: ۱-داوکسی-دی-زایلو-۵-فسفات ردوکتوایزومراز، CYP180: CYP71D180، CYP178: CYP71D178

شرایط واکنش PCR

معمول از ۲۰ دوره شروع می‌کنند تا دوره‌ای که در آن همه نمونه‌ها وارد فاز پلاتو می‌شوند و تفاوتی از خود نشان نمی‌دهند، به دست بیاید و برای بررسی الگوی بیان ژن‌ها دوره‌های قبل از فاز پلاتو و مربوط به فاز نمایی به کار گرفته شود. تجزیه و تحلیل محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم پروماید انجام شد. لازم به ذکر است در تمام واکنش‌های PCR انجام شده در این مطالعه از آغازگرهایی با غلظت ۵ پیکومولار استفاده شد. چرخه‌های حرارتی مربوط به هر یک از ژن‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

واکنش RT-PCR در دستگاه ترمال سایکلر انجام شد. در بررسی بیان تعداد چرخه کمتر از ۳۵ مربوط به فاز نمایی (Exponential phase) در نظر گرفته شد. با توجه به اینکه در روش RT-PCR نیمه کمی زمانی که نمونه‌ها وارد فاز اشباع یا پلاتو (The Plateau phase) شوند دیگر قابل مقایسه با هم نیستند، از این رو تعداد دوره باید در مرحله نمایی تکثیر باشد. این تعداد دوره که در آزمایش‌های مختلف متفاوت است به صورت آزمایشی به دست می‌آید، به این صورت که در PCRهای مختلف تعداد دوره‌ها را به طور

جدول ۲. چرخه حرارتی واکنش RT-PCR

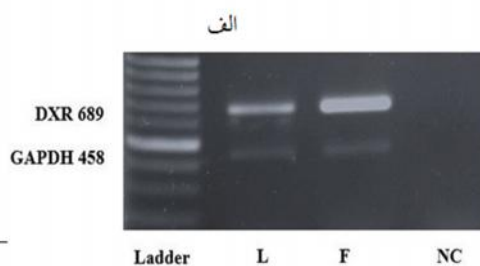
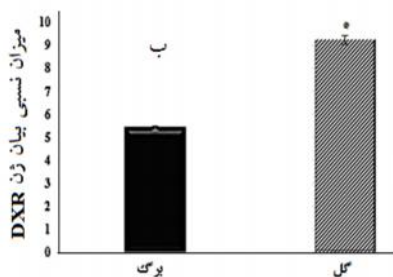
مرحله	زمان	دما	تعداد چرخه			
			DXR	Gamma-terpiene synthase	CYP71D178	CYP71D180
واسرشت اولیه	۵ (دقیقه)	۹۴	۱	۱	۱	۱
واسرشت	۴۵ (ثانیه)	۹۴	۲۷	۳۰	۳۲	۳۲
اتصال	۴۵ (ثانیه)	۵۰-۵۷	۲۷	۳۰	۳۲	۳۲
بسط	۵۴ (ثانیه)	۷۲	۲۷	۳۰	۳۲	۳۲
بسط نهایی	۵ (دقیقه)	۷۲	۱	۱	۱	۱

از آزمون t در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS برای بررسی تفاوت بیان ژن بافت‌های گل و برگ استفاده شد. نمودارهای مناسب برای تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار Excel رسم شد. برای نرمال سازی داده‌ها از نرم افزار Minitab 17 به روش Anderson-Darling استفاده شد.

نتایج و بحث

بیان ژن‌های DXR، گاماترینین سنتاز، CYP71D180 و CYP71D178 در بافت‌های مختلف

به منظور مطالعه بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز تیمول و کارواکرول در اندام‌های هوایی آویشن، بیان نیمه کمی ژن‌های DXR، گاماترینین سنتاز، CYP71D180 و CYP71D178 در بافت‌های برگ و گل در گیاه آویشن مطالعه شد. بیان نیمه کمی ژن DXR در بافت‌های برگ و گل نشان داد که بیان ژن DXR در بافت گل نسبت به برگ بیشتر است و این اختلاف بیان معنی دار می‌باشد ($P < 0.05$). میزان بیان نسبی ژن DXR در گل و برگ به ترتیب حدود ۹ و ۵ بود که نشان می‌دهد بیان این ژن در بافت گل نسبت به بافت برگ ۱/۷ برابر بیشتر است (شکل ۳).



شکل ۳. الف) نمایش بیان نیمه کمی ژن DXR در اندام‌های برگ و گل گیاه آویشن (L: برگ، F: گل، NC: کنترل منفی). در هر ستون اندازه باند پایین تقریباً ۴۵۸ جفت‌باز و مربوط به ژن کنترل داخلی و باند بالا حدود ۶۸۹ جفت‌باز مربوط به ژن DXR است. ب) نمودار بررسی بیان ژن DXR در اندام‌های برگ و گل در آویشن. مقایسه میانگین به روش t -test

گیاهی روند متفاوتی را نشان می‌دهد، به نحوی که در برخی گونه‌های گیاهی بیان پایدار در همه بافت‌ها مشاهده می‌شود

بررسی میزان بیان ژن‌های DXR، گاماترینین سنتاز، CYP71D178 و CYP71D180

استخراج RNA با استفاده از RNX-Plus از بافت‌های سالم برگ و گل انجام شد و با کمک ژل آگارز ۱ درصد، کمیت و کیفیت RNA و تعیین غلظت با دستگاه نانودراپ مشخص شد و همه آنها هم‌غلظت شدند و مطابق روش ذکر شده در مراحل قبل از آنها cDNA سنتز شد. پس از اتمام واکنش PCR، محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. در نهایت از ژل‌ها با استفاده از دستگاه UVIDoc عکس گرفته شد. نمونه‌ای از الکتروفورز محصول PCR ژن مورد بررسی در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. سپس با استفاده از نرم افزار GelQuantNET میزان بیان ژن‌ها به داده‌های کمی تبدیل شد و هر نمونه با توجه به GAPDH مربوطه نرمال سازی شد و میانگین بیان ژن با استفاده از سه تکرار زیستی محاسبه شد.

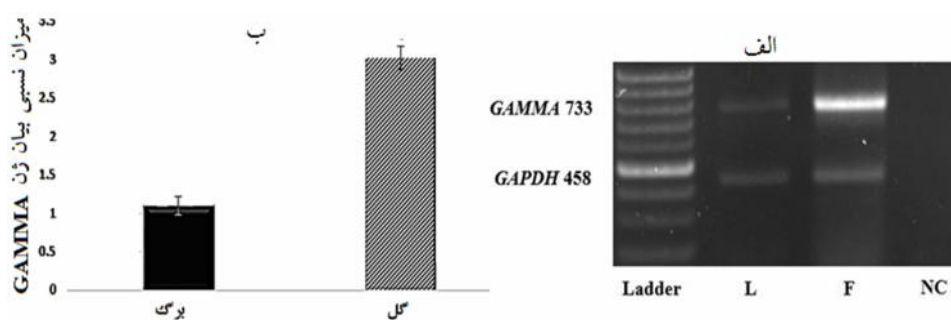
تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از نرم افزار GelQuantNE (Das & Laederach, 2004) عکس‌های مربوط به ژل (داده‌های حاصل از RT-PCR نیمه کمی) به داده‌های کمی تبدیل شد.

با توجه به نتایج به دست آمده در مورد بیان ژن DXR به نظر می‌رسد که بیان این ژن در بافت‌های مختلف گونه‌های

تاریخت نسبت به شاهد شده است (Mahmood and Corteau, 2001). در مقابل خاموشی جزئی این ژن در گیاه نعنای منجر به کاهش اسانس در این گیاه شد که چنین نتایجی نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بیان این ژن با ایزوپرنوئیدهای پلاستییدی می‌باشد. در برخی گیاهان نیز ارتباط مثبتی بین بیوسنتز متابولیت‌های مرتبط با مسیر MEP و بیان ژن DXR مشاهده نشده است. به‌عنوان مثال در میوه گوجه فرنگی در حال رسیدن تجمع زیاد کاروتنوئیدها با افزایش بیان در ژن DXR مرتبط نبود (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001).

بیان نیمه‌کمی ژن گاماترینین سنتاز در بافت‌های برگ و گل نشان داد که بیان این ژن در بافت گل نسبت به برگ بیشتر است و اختلاف میزان بیان ژن‌ها معنی‌دار بود ($P < 0.05$). البته بیان این ژن در بافت گل نسبت به بافت برگ $2/74$ برابر بیشتر بود (شکل ۴).



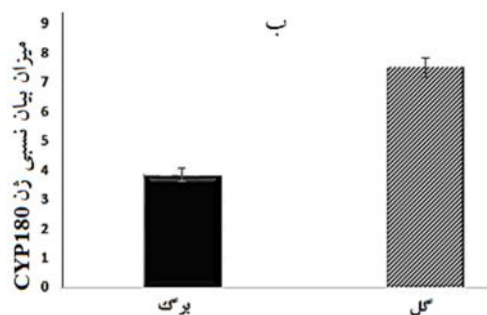
شکل ۴. الف) نمایش بیان نیمه‌کمی ژن گاماترینین سنتاز در بافت‌های برگ و گل گیاه آویشن. (L: برگ، F: گل، NC: کنترل منفی). در هر ستون اندازه باند پایین تقریباً ۴۵۸ جفت‌باز و مربوط به ژن کنترل داخلی و باند بالا حدود ۷۳۳ جفت‌باز مربوط به ژن گاماترینین سنتاز بوده است. ب) نمودار بررسی بیان ژن گاماترینین سنتاز در بافت‌های برگ و گل در آویشن. مقایسه میانگین به‌روش t-test

مونوترپن مرتبط وجود دارد. به‌عنوان مثال اخیراً گزارش شده است که ژن VvTer (کدکننده مونوترپن سنتاز برای تولید آلفا ترپینول) در انگور، بیشترین بیان در جوانه گل و بعد در برگ‌ها و گل‌های باز شده در مقایسه با سایر بافت‌ها گزارش شده است (Matarese *et al.*, 2014). البته بیان بیشتر ژن گاماترینین سنتاز در گل گیاه آویشن نسبت به برگ می‌تواند نشان‌دهنده میزان بیشتر متابولیت‌های مرتبط

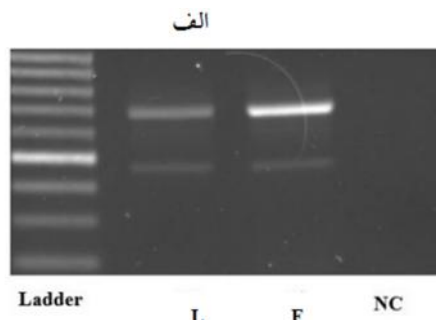
و در برخی نیز بیان در بافت‌های مختلف با هم متفاوت است. به‌عنوان مثال گزارش شده است که بیان ژن DXR در گیاه پریوش در بافت‌های مختلف گیاه متفاوت است، و بیان ژن DXR در گل و جوانه گل نسبت به برگ بیشتر می‌باشد (Burlat *et al.*, 2004). همچنین در گیاه بابونه کبیر میزان بیان ژن DXR در بافت گل بیشتر از برگ و در برگ‌ها بیشتر از ساقه و ریشه گزارش شده است (Majdi *et al.*, 2014). با توجه به اینکه ژن DXR نقش کلیدی در بیوسنتز ترکیبات ایزوپرنوئیدی دارد، بنابراین بیان بیشتر در گل آویشن نسبت به برگ می‌تواند نشان‌دهنده ارتباط مستقیم آن با بیوسنتز بیشتر ترکیبات ایزوپرنوئیدی پلاستییدی در گل نسبت به برگ باشد. در این ارتباط نقش مثبت DXR در کنترل تجمع ایزوپرنوئیدها در گیاهان به‌وسیله نتایج آزمایش‌های مختلف تأیید شده است. به‌عنوان مثال افزایش بیان ژن DXR در گیاه نعنای (*Mentha piperita*) منجر به افزایش تولید مونوترپن‌های اسانس در برگ‌های گیاه

بیان متفاوت مونوترپن سنتزهای مختلف در گونه‌های گیاهی مختلف گزارش شده است، در بیشتر مطالعات این مرحله به‌عنوان مرحله کلیدی در بیوسنتز ترکیبات حاوی اسکلت مونوترپنی شناخته شده است و بیان ویژه این ژن در بافت‌های مختلف گونه‌های گیاهی مختلف گزارش شده است. بنابراین به‌نظر می‌رسد که در بیشتر گونه‌های گیاهی ارتباط مستقیم بین میزان رونوشت مونوترپن سنتاز و

بررسی بیان نیمه کمی ژن *CYP71D180* در بافت‌های برگ و گل نشان داد که بیان این ژن در بافت گل نسبت به برگ بیشتر است و از لحاظ آماری دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد. بیان این ژن در بافت گل نسبت به بافت برگ ۲/۰۱ برابر بیشتر است (شکل ۵).

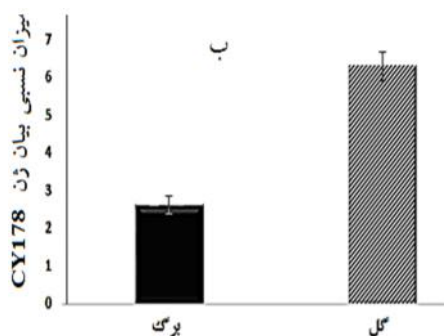


باشد. به طوری که در ارتباط با این موضوع ارتباط مستقیم قوی بین میزان غلظت و ترکیب ترین‌ها با میزان رونوشت ترین سنتازهای مرتبط در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (Crocoll *et al.*, 2010; Nagegowda, 2010; Grausgruber-Gröger *et al.*, 2012).

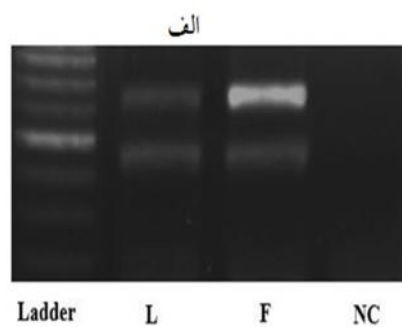


شکل ۵. الف) نمایش بیان نیمه کمی ژن *CYP71D180* در بافت‌های برگ و گل گیاه آویشن (L: برگ، F: گل، NC: کنترل منفی). در هر ستون اندازه باند پایین تقریباً ۴۵۸ جفت‌باز و مربوط به ژن کنترل داخلی و باند بالا حدود ۶۵۴ جفت‌باز مربوط به ژن *CYP71D180* بود. ب) نمودار بررسی بیان ژن *CYP71D180* در بافت‌های برگ و گل در آویشن. مقایسه میانگین به روش t-test

معنی‌دار می‌باشد. البته بیان این ژن در بافت گل نسبت به بافت برگ ۱/۹۴ برابر افزایش یافته است (شکل ۶).



بیان نیمه کمی ژن *CYP71D178* در بافت‌های برگ و گل مطالعه شد و نتایج نشان داد که بیان این ژن در بافت گل نسبت به برگ بیشتر است، و از لحاظ آماری تفاوت



شکل ۶. الف) نمایش بیان نیمه کمی ژن *CYP71D178* در بافت‌های برگ و گل گیاه آویشن (L: برگ، F: گل، NC: کنترل منفی). در هر ستون اندازه باند پایین تقریباً ۴۵۸ جفت‌باز و مربوط به ژن کنترل داخلی و باند بالا حدود ۶۵۴ جفت‌باز مربوط به ژن *CYP71D178* بوده است. ب) نمودار بررسی بیان ژن *CYP71D178* در بافت‌های برگ و گل در آویشن. مقایسه میانگین به روش t-test

کرک‌های غده‌ای بیان می‌شوند و تراکم کرک‌های غده‌ای در گل نسبت به برگ بیشتر می‌باشد، بنابراین بیان بیشتر این

ژن‌های *CYP71D178* و *CYP71D180* متعلق به خانواده *CYP450* می‌باشد. چون *CYP450*ها اکثراً در

(al., 2009). با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که جداسازی کرک‌های غده‌ای و توالی‌یابی RNA در آنها در مراحل مختلف نمو برگ و گل و تحت تأثیر الیستورهای مختلف می‌تواند راهکار مناسبی در جهت شناسایی فرایند تنظیم بیوسنتز تیمول و کارواکرول و یا سایر ترکیبات مشابه ترینی در گیاه دارویی آویشن و سایر گونه‌های گیاهی نزدیک در خانواده نعناعیان باشد.

سپاسگزاری

از آقای دکتر کریستوف کروکول (Christoph Crocoll؛ دانشگاه کپنهاگ دانمارک) به دلیل در اختیار قرار دادن توالی ژن‌های CYP به‌طور ویژه تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده:

- Anonymous. 2008. <http://drnelson.uthsc.edu/P450stats.Feb2008.htm>
- Anonymous. 2009. <http://drnelson.uthsc.edu/P450.Statistics.Aug2009.pdf>.
- Behnia, M., Haghighi, A., Komeylizadeh, H., Tabaei, S.J.S. and Abadi, A., 2008. Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on *in vitro* growth of *Entamoeba histolytica*. *The Korean Journal of Parasitology*, 46: 153-156.
- Braga, P.C., Culici, M., Alfieri, M. and Dal Sasso, M., 2008. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 472-477.
- Burke, C.C., Wildung, M.R. and Croteau, R., 1999. Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 13062-13067.
- Burlat, V., Ou32din, A., Courtois, M., Rideau, M. and St-Pierre, B., 2004. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *The Plant Journal*, 38:131-141.
- 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-Universitat.

ژن‌ها در گل گیاه آویشن باغی نسبت به برگ می‌تواند ناشی از تراکم بیشتر کرک‌های غده‌ای در واحد سطح باشد (Majdi et al., 2011).

گزارش شده است که میزان بیان ژن CYP71D1 در گیاه پروانش در گلبرگ گل بالا بوده و در ریشه، ساقه و برگ جوان کاهش می‌یابد. رونوشت ژن CYP71D1 در برگ مسن مشاهده نشد. همچنین میزان رونوشت ژن CYP71D1 در جوانه‌های در حال توسعه مورد بررسی قرار گرفت. سطح mRNA مربوط به ژن CYP71D1، کمترین میزان در جوانه تازه تشکیل و بالاترین در گلبرگ گل می‌باشد، که نشان می‌دهد رونوشت ژن CYP71D1 با توسعه گل افزایش می‌یابد (He et al., 2012). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که روند بیان ژن‌های بیوسنتزی تیمول و کارواکرول در بافت‌های برگ و گل تقریباً مشابه بوده و بیان بیشتر در بافت گل نسبت به برگ در همه ژن‌های مطالعه شده مشاهده می‌شود. بنابراین میزان بیان ژن گاماترینین سنتاز در بافت گل نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی بیشتر است. احتمالاً در بافت گل به دلیل تراکم بالای کرک‌های غده‌ای بیان ژن‌هایی که در کرک‌های غده‌ای بیان می‌شوند، بیشتر است. بیان ژن‌های AdAFS1 و AdGDS1 که به ترتیب کدکننده ژرماکرن دی سنتاز (Germacrene D synthase 1) و آلفا فارنسنین دی سنتاز (Alpha farnesene synthase1) از گیاه کیوی در بافت‌های برگ، جوانه گل، گل و گل‌های باز شده در رقم‌های "Chieftain" و "Hayward" می‌باشد توسط real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. بیان دو ژن AdAFS1 و AdGDS1 در گل به میزان قابل توجهی بالاتر از بافت برگ بود. بیان ژن AdAFS1 در بافت برگ هر دو رقم مشابه بود و با گسترش برگ کاهش یافت. میزان بیان ژن AdGDS1 در بافت برگ رقم Chieftain در هر دو حالت جوان و گسترش یافته حدود ۳۰ برابر بیشتر از رقم Hayward بود. در بافت گل بیان هر دو ژن در قسمت گلبرگ و پرچم در بالاترین میزان خود قرار داشت. بیان دو ژن AdAFS1 و AdGDS1 در کاسبرگ در هر دو رقم و همچنین در مادگی Hayward پایین‌ترین میزان خود را قرار داشت (Nieuwenhuizen et al., 2011).

- Julliard, J.H., 1992. Biosynthesis of the pyridoxal ring (vitamin B6) in higher plant chloroplasts and its relationship with the biosynthesis of the thiazole ring (vitamin B1). *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie*, 314: 285-290.
- Julliard, J.H. and Douce, R., 1991. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 2042-2045.
- 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: 220-237.
- Lopez-Pujol, J., Bosch, M., Simon, J. and Blanche, C., 2004. Allozyme diversity in the tetraploid endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). *Annals of Botany*, 93: 323-332.
- Mahmoud, S.S. and 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.
- Mahmoud, S.S. and Croteau, R.B., 2003. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in pepper mint by controlling a downstream monoterpene reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 14481-14486.
- Majdi, M., Liu, Q., Karimzadeh, Gh., Malboobi, M.A., Beekwilder, J., Cankar, K., Vos, R.D., Todorovi, S., Simonovi, A. and Bouwmeester, H., 2011. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Phytochemistry*, 72: 1739-1750.
- Majdi, M., Karimzadeh, Gh. and Malboobi, M.A., 2014. Spatial and developmental expression of key genes of terpene biosynthesis in *Tanacetum parthenium*. *Biologia Plantarum*, 58: 379-384
- Matarese, F., Cuzzola, A., Scalabrelli, G. and D'Onofrio, C., 2014. Expression of terpene synthase genes associated with the formation of volatiles in different organs of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*, 105: 12-24.
- Nagegowda, D.A., 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *Febs Letters*, 584: 2965-2973.
- Nieuwenhuizen, N.J., Wang, M.Y., Matich, A.J., Green, S.A., Chen, X., Yauk, Y.K., Beuning, L.L., Nagegowda, D.A., Dudareva, N. and Atkinson, R.G., 2009. Two terpene synthases are responsible for the major sesquiterpenes emitted from the
- Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J. and 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.
- Das, R. and Laederach, A., 2004. *GelQuant user's manual*. Stanford University, USA.
- Davis, E.M. and Croteau, R., 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes, *Biosynthesis*. Springer, pp. 53-95.
- Elena-Rossello, J., 1981. Cytotaxonomic and evolutionary studies in *Thymus* (Labiatae); Relationships of the members of section *Thymus jalias* (1), *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, pp. 51-60.
- Fahn, A., 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108: 229-257.
- Gershenzon, J., Maffei, M. and Croteau, R., 1989. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiology*, 89: 1351-1357.
- Grausgruber-Gröger, S., Schmiderer, C., Steinborn, R. and Novak, J., 2012. Seasonal influence on gene expression of monoterpene synthases in *Salvia officinalis* (Lamiaceae). *Journal of Plant Physiology*. 169: 353-359.
- Grosso, C., Figueiredo, A.C., Burillo, J., Mainar, A.M., Urieta, J.S., Barroso, J.G., Coelho, J.A. and Palavra, A.M., 2010. Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Journal of Separation Science*, 33: 2211-2218.
- He, L., Zhao, S. and Hu, Z., 2012. A novel cytochrome P450 gene from *Catharanthus roseus* cell line C 20 hi: cloning and characterization of expression." *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2: 250-255.
- 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: 117-133.
- Hummelbrunner, L.A. and Isman, M.B., 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpene essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 715-720.
- Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19: 603-608.

- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E.E., Froehlich, J.E. and Croteau, R., 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology*, 120: 879-886.
- Turner, G.W., Gershenzon, J. and Croteau, R.B., 2000. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology*, 124: 665-680.
- Ultee, A., Bennik, M. and 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.
- Van Schie, C.C., Ament, K., Schmidt, A., Lange, T., Haring, M.A. and Schuurink, R.C., 2007. Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins. *The Plant Journal*, 52: 752-762.
- Vernet, P., Gouyon, R. and Valdeyron, G., 1986. Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica*, 69: 227-231.
- flowers of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Journal of Experimental Botany*, 60: 3203-3219.
- Ozguven, M. and Tansi, S., 1998. Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22: 537-542.
- Rodríguez-Concepción, M., Ahumada, I., Diez-Juez, E., Sauret-Güeto, S., Lois, L.M., Gallego, F., Carretero-Paulet, L., Campos, N. and Boronat, A., 2001. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant Journal*, 27:213-222.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. and Sahm, H., 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal*, 295: 517-524.
- Sedy, K. and Koschier, E., 2003. Bioactivity of carvacrol and thymol against *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci*. *Journal of Applied Entomology*, 127: 313-316.

Expression analysis of biosynthetic genes of thymol and carvacrol in different tissues of thyme (*Thymus vulgaris*)

A. Mashhady Malekzadeh¹, M. Majdi^{2*} and A. Maroufi³

1-M.Sc., Department of Agriculture, College of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. Iran.

2*- Corresponding Author, Assist. Prof., College of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. Iran.

E.mail: m.majdi@uok.ac.ir

3 - Assist. Prof., College of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. Iran.

Received: 28.11.2015 Accepted: 04.05.2016

Abstract

Thymus vulgaris is one of the most important medicinal plants with more than 20 types of known important chemical compositions. A gene named 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) acts as an important control point, as this is the first committed step in the MEP pathway. α -terpinene is a key component in essential oil of thyme which constituted up to 30% of the essential oil in the species and is biosynthesized via α -terpinene as a penultimate precursor. Different cytochrome P450 including CYP71D178 and CYP71D182 are involved in the biosynthesis of thymol and carvacrol in thyme and oregano via the α -terpinene as an intermediate. The aim of the present work was to study the expression patterns of genes involved in thymol and carvacrol biosynthesis including DXR, α -terpinene synthase, CYP71D178 and CYP71D180 genes in flowers and leaves of thyme. Gene expression analysis of DXR, α -terpinene synthase, CYP71D178 and CYP71D180 genes were carried out by semi-quantitative RT-PCR technique. The relative gene expression of flowers compared with leaves for DXR, α -terpinene synthase, CYP71D178 and CYP71D180 genes were 1.7, 2.7, 1.9 and 2 fold higher, respectively and the gene expression intensity varied for each gene. Expression of aforementioned genes in glandular trichomes were high, hence the higher gene expression in flowers might be related to higher density of glandular trichomes. Based on these results, higher content of essential oils in flowers compared to leaves is most likely further related to the higher expression of related genes in flowers rather than leaves.

Keywords: DXR, *Thymus vulgaris*, α -terpinene, CYP71D178, CYP71D182, Gene expression