بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

(بیوتکنولوژی در کشاورزی)

عنوان:

مطالعه تظاهر برخی ژن‌های کاندیدا در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌های فنولی در جمعیت‌های گیاهی آویشن

از:

سمیه بهادر

استاد راهنما:

دکتر بابک ربیعی

استاد مشاور:

دکتر سیدحسن حسنی کومله

اسفند ۱۳۹۲

تقدیم به

مادرم به پاس فداکاری های کم نظیرش و

پدرم به پاس حمایت های بی دریغ اش

پروردگارا! اعتراف می کنم که نه زبان شکر تو را دارم و نه توان شکر از بندگان تو؛ و امابر حسب وظیفه، از کلیه اساتید ارجمندم که در طول سال های به یادماندنی تحصیلم افتخار شاگردیشان را داشتم، شکر می نمایم.

از استاد راهنمای محترم جناب آقای دکتر بابک ربیعی که با نهایت بردباری و مهربانی مرا از راهنمایی های و مساعدت های بی دریغ شان در این مسیر ارزنده بهره مند فرمودند، خاضعانه سپاسگزارم.

از استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر سید حسن حسنی کومله که در طول انجام این پایان نامه در جهت رفع مشکلات بنده صبورانه همکاری کردند، صمیمانه شکر می کنم.

از داوران ارجمند، جناب آقای دکتر حبیب الله سمیع زاده لایحی و سرکار خانم دکتر عاطفه صبوری که زحمت باز خوانی این پایان نامه را بر عهده داشتند، کمال شکر و قدردانی را دارم.

از مدیر محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر جالعلی الفتی که زحمت برگزاری و اداره جلسه دفاع بنده را بر عهده گرفتند، صمیمانه شکر می کنم.

از اساتید محترم گروه بیوتکنولوژی کشاورزی آقایان دکتر محمد مهدی سوهانی، علی اعلمی و رضا شیرزادیان خرم آباد که دو سال افتخار شاگردی شان را داشتم، نهایت شکر را دارم.

از مسئول محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی، جناب آقای مهندس محمد حسین رضادوست که زحمات زیادی را متقبل شدند، کمال شکر را دارم.

از سرکار خانم دکتر یاسمن سکلی عضو هیئت علمی دانشکده علوم دانشگاه تهران که علیرغم مشغله های متعدد، بسیار خوب یاینده همکاری کردند، نهایت شکر را دارم.

همچنین یاد و خاطره تمامی دوستان عزیزم خانم ها: زهرا کچلکی، سارا فتاحیان، سعیده علیدوست، لیلا رمانی، فهیمه آروندی، حمیرا عشقی و آقایان: امین عابدی، محسن صفایی، فرهاد معصومی و پیمان منبری را گرامی داشته و برای تمامی آن ها سعادت، سلامت و پیروزی را از خداوند منان خواستارم.

و در پایان از خانواده عزیزم، به خصوص برادانم قاسم، دارا و مهدی که در جمع آوری نمونه های گیاهی به بنده کمک فراوان نموده اند، صمیمانه شکرم.

عنوان **صفحه**

مقدمه **۱**

فصل اول : کلیات و مرور منابع

۱-۱- پیشینه استفاده از گیاهان دارویی ۶
۱-۲- وضعیت گیاهان دارویی در ایران ۶
۱-۳- گیاهان بومی ۷
۱-۴- ویژگی دارویی بودن گیاهان ۸
۱-۵- آویشن ۸
۱-۵-۱- گیاه‌شناسی ۹
۱-۵-۲- مشخصات فیتوشیمیایی آویشن ۱۰
۱-۵-۳- خواص دارویی و درمانی آویشن ۱۰
۱-۵-۴- تیپ‌های شیمیایی آویشن ۱۱
۱-۵-۵- اعداد کروموزومی ۱۱
۱-۵-۶- اساس ژنتیکی و اکولوژیکی بیوسنتز ترپن‌های فنولی کارواکرول و تیمول آویشن ۱۲
۱-۶- تنوع در مقدار و اجزای اسانس آویشن ۱۳
۱-۷- متابولیسم ترپنوئیدهای فعال گیاهی ۱۳
۱-۷-۱- تشکیل IPP و DMAPP ۱۴
۱-۷-۲- تشکیل پیش ماده پرینیل دی‌فسفات ۱۷
۱-۸- مونو و سزکوئی‌ترپن سینتازها ۱۸
۱-۹- سیتوکروم P450 ۱۸
۱-۹-۱- سیتوکروم P450 مونواکسیژناز ۲۰
۱-۹-۲- بیوسنتز مونوترپن‌های فنولی در گیاه آویشن ۲۱
۱-۱۰- الگوی بیان ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتز ترپن‌ها و ارتباط آنها با مقدار تولید ترپن‌ها ۲۳
۱-۱۱- جیبرلین ۲۴
۱-۱۱-۱- بیوسنتز و کاتابولیسم جیبرلین ۲۴
۱-۱۱-۲- انواع سیتوکروم P450ها در متابولیسم جیبرلین ۲۶
۱-۱۱-۳- عوامل درگیر در مسیر پاسخ به جیبرلین ۲۷
۱-۱۱-۴- درگیری مسیر یوبی کوئینون/پروتئوزوم در مسیر انتقال پیام جیبرلین ۲۸
۱-۱۱-۵- مدل انتقال پیام جیبرلین در آرابیدوپسیس ۳۰
۱-۱۱-۶- تاثیر جیبرلین بر فاکتورهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی ۳۱
۱-۱۲- بیان ژن و روش Q Real Time PCR ۳۴
۱-۱۲-۱- مراحل Q Real Time PCR ۳۵
۱-۱۲-۲- رنگ متصل شونده به DNA ۳۵
۱-۱۲-۳- ژن مرجع ۳۶
۱-۱۲-۴- نرمال سازی ۳۶
۱-۱۲-۵- راندمان Q Real Time PCR ۳۷
۱-۱۲-۶- کمی‌سازی نسبی ۳۸
۱-۱۲-۶-۱- بدون اصلاح راندمان PCR ۳۸
۱-۱۲-۶- ۲- با اصلاح راندمان PCR ۳۹
۱-۱۲-۷- استفاده از چند ژن مرجع برای نرمال‌سازی ۳۹

۱-۱۲-۸- محاسبه مقدار انحراف معیار ΔCt ۴۰

فصل ۲: مواد و روش‌ها

۲-۱- آزمایش اول: بررسی صفات مورفولوژیک و بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز در جمعیت‌های گیاهی آویشن ۴۲
۲-۱-۱- مواد گیاهی ۴۲
۲-۱-۲- شناسایی نمونه‌های گیاهی ۴۲
۲-۱-۳- تهیه خاک ۴۴
۲-۱-۴- کاشت نمونه‌های گیاهی ۴۴
۲-۱-۵- بررسی صفات مورفولوژیک ۴۶
۲-۱-۶- بررسی میزان بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز ۴۷
۲-۱-۶-۱- نمونه برداری و استخراج Total RNA ۴۷
۲-۱-۶-۲- بررسی کمیت RNA با اسپکتروفتومتر ۴۹
۲-۱-۶-۳- ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده ۵۰
۲-۱-۷- ساخت cDNA ۵۱
۲-۱-۷-۱- تیمار DNAse ۵۱
۲-۱-۷-۲- مراحل ساخت cDNA ۵۱
۲-۱-۷-۳- واکنش کنترل منفی RT- PCR ۵۲
۲-۱-۷-۴- بررسی صحت ساخت cDNA ۵۲
۲-۱-۷-۵- واکنش کنترل منفی NTC ۵۳
۲-۱-۷-۶- طراحی آغازگر ۵۳
۲-۱-۷-۷- بررسی الگوی بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز با استفاده از واکنش RT- PCR ۵۵
۲-۱-۷-۸- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۵۶
۲-۱-۷-۹- بررسی الگوی بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز با استفاده از واکنش Real Time PCR ۵۶
۲-۱-۸- تجزیه‌های آماری ۵۸
۲-۲- آزمایش دوم: بررسی خصوصیات مورفولوژیک و الگوی بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز تحت تاثیر سن گیاه و هورمون ۵۹
۲-۲-۱- مواد گیاهی ۵۹
۲-۲-۲- بررسی خصوصیات مورفولوژیکی آویشن باغی تحت تاثیر هورمون جیبرلین و سن گیاه ۶۰
۲-۲-۳- بررسی درصد اسانس در گیاهان دوساله تحت تاثیر هورمون جیبرلین ۶۱
۲-۲-۴- بررسی بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز در آویشن باغی تحت تاثیر هورمون جیبرلین و سن گیاه ۶۱
۲-۲-۴-۱- نمونه‌برداری، استخراج RNA و سنتز cDNA ۶۱
۲-۲-۵- بررسی بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز نمونه‌های مجهول با استفاده از Real Time PCR ۶۲
۲-۲-۶- تجزیه‌های آماری ۶۲
۲-۳- آزمایش سوم: بررسی اثر دما و شدت نور بر میزان بیان نسبی ژن‌های مونوترپن سینتاز در سه گونه آویشن ۶۳
۲-۳-۱- نمونه‌برداری، استخراج RNA و سنتز cDNA ۶۴
۲-۳-۲- بررسی بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز با استفاده از Real Time PCR ۶۴

فصل ۳: نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی نوع گونه گیاهی ۶۶
۳-۲- نتایج آزمایش اول: بررسی خصوصیات مورفولوژیک و بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز در هفت جمعیت آویشن مطالعه شده ۶۶
۳-۲-۱- خصوصیات مورفولوژیک جمعیت‌های آویشن مورد مطالعه ۶۶
۳-۲-۲- بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مونوترپن سینتاز در جمعیت‌های آویشن مورد مطالعه ۷۳

۳-۲-۲-۱- آنالیز کمیت و کیفیت RNA استخراج شده ۷۳
۳-۲-۲-۲- بررسی عدم وجود آلودگی DNA ژنومی و صحت ساخت cDNA ۷۴
۳-۲-۲-۳- بررسی منحنی استاندارد ۷۴
۳-۲-۲-۴- مقایسه میزان بیان نسبی ژن گاماترپیین سینتاز ۷۶
۳-۲-۲-۵- مقایسه میزان بیان نسبی ژن‌های تیمول سینتاز ۷۷
۳-۲-۲-۶- مقایسه میزان بیان ژن‌های کارواکرول سینتاز ۷۹
۳-۲-۳- بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مونوترپن سینتاز در جمعیت‌های آویشن مورد مطالعه ۸۲
۳-۳- نتایج آزمایش دوم: بررسی خصوصیات مورفولوژیک و بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز آویشن باغی تحت تاثیر دو فاکتور سن و هورمون جیبرلین ۸۵
۳-۳-۱- بررسی خصوصیات مورفولوژیک آویشن باغی تحت تاثیر دو فاکتور سن و هورمون جیبرلین ۸۵
۳-۳-۲- بررسی عملکرد اسانس در گیاهان دوساله آویشن باغی تحت تاثیر هورمون جیبرلین ۱۰۰
۳-۳-۳- بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مونوترپن سینتاز در آویشن باغی تحت تاثیر دو فاکتور سن گیاه و هورمون جیبرلین ۱۰۱
۳-۳-۳-۱- مقایسه سطوح بیان ژن گاماترپینن سینتاز (*TPS*) ۱۰۱
۳-۳-۳-۲- مقایسه سطوح بیان ژن تیمول سینتاز ۱۰۲
۳-۳-۳-۳- مقایسه سطوح بیان ژن‌های کارواکرول سینتاز ۱۰۴
۳-۴- نتایج آزمایش سوم: بررسی اثر دما و شدت نور بر میزان بیان نسبی ژن‌های مونوترپن سینتاز در سه گونه آویشن ۱۱۰
۳-۴-۱- بررسی بیان نسبی ژن گاماترپینن سینتاز ۱۱۰
۳-۴-۲- بررسی بیان نسبی ژن‌های تیمول سینتاز ۱۱۱
۳-۴-۳- بررسی بیان نسبی ژن‌های کارواکرول سینتاز ۱۱۲
۳-۵- نتیجه‌گیری کلی ۱۱۵
۳-۶- پیشنهادها ۱۱۷
منابع ۱۲۰

فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۲-۱- مشخصات جغرافیایی جمعیت‌های مختلف آویشن مطالعه شده در این پژوهش	۴۳
جدول ۲-۲- روش تهیه آب DEPC	۴۸
جدول ۲-۳- روش تهیه بافر TBE (5X)	۵۱
جدول ۲-۴- مواد مصرفی در سنتز cDNA	۵۲
جدول ۲-۵- لیست آغازگرهای مورداستفاده در آزمایش	۵۴
جدول ۲-۶- ترکیب و مقدار مواد مورد استفاده در محلول مادری PCR	۵۵
جدول ۲-۷- برنامه دستگاه ترموسایکلر در تکثیر ژن‌ها	۵۵
جدول ۲-۸- مواد مصرفی در Real Time PCR نمونه‌های مجهول برای هر واکنش	۵۷
جدول ۲-۹- مواد مصرفی در Real Time PCR نمونه‌های مجهول برای هر واکنش در آزمایش دوم	۶۲
جدول ۳-۱- خلاصه تجزیه واریانس خصوصیات مورفولوژیک هفت جمعیت آویشن مورد مطالعه	۷۱
جدول ۳-۲- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک هفت جمعیت آویشن مطالعه شده	۷۲
جدول ۳-۳- مقایسه میزان بیان نسبی ژن‌های مونوترپن سینتاز در جمعیت‌های گیاهی آویشن	۸۵
جدول ۳-۴- خلاصه تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک مطالعه شده در آویشن باغی تحت تاثیر دو فاکتور سن گیاه و غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین	۸۷
جدول ۳-۵- مقایسه میانگین سطوح اثر متقابل سن× غلظت جیبرلین بر صفات مورفولوژیک مطالعه شده در آویشن باغی	۹۹
جدول ۳-۶- خلاصه تجزیه واریانس تحت تاثیر دو فاکتور سن گیاه و غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین بر میزان بیان نسبی ژن‌های مونوترپن سینتاز	۱۰۱

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- مسیرهای بیوسنتز تولید ترپنوئیدهای فرار در گیاهان	۱۷
شکل ۱-۲- آنالیز نمودار خوشه‌ای سیتوکروم P450 جداسازی شده از مرزنگوش، آویشن باغی و مرزنگوش بستامی	۲۲
شکل ۱-۳- مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول در گیاهان آویشن و مرزنگوش	۲۳
شکل ۱-۴- مسیر اصلی متابولیسم جیبرلین (GA3) در اندامک‌های مختلف سلول‌های گیاهان عالی	۲۷
شکل ۱-۵- مدل انتقال پیام جیبرلین در آرابیدوپسیس	۳۰
شکل ۲-۱- جمعیت‌های مختلف آویشن در مرحله رشد رویشی	۴۴
شکل ۲-۲- مراحل کشت گیاهان	۴۵
شکل ۲-۳- کفشدوزک کریپتولموس	۴۶
شکل ۲-۴- پروفایل حرارتی واکنش Real Time PCR	۵۷
شکل ۲-۵- کنترل آفات آویشن به‌وسیله کفشدوزک کریپتولموس	۶۰
شکل۳-۱- الکتروفورز ژل آگارز RNA کل استخراج شده از نمونه‌های برگ جمعیت‌های مختلف آویشن	۷۳
شکل۳-۲- الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد	۷۴
شکل ۳-۳- منحنی استاندارد تهیه شده از سری رقت‌سازی فرآورده Real Time PCR جمعیت باب‌زنگی	۷۵
شکل ۳-۴- میزان بیان نسبی ژن گاماترپینن سینتاز به‌دست آمده از Real Time PCR در هفت جمعیت آویشن	۷۷
شکل ۳-۵- میزان بیان نسبی ژن *CYP71D178* به‌دست آمده از Real Time PCR در هفت جمعیت آویشن	۷۸
شکل ۳-۶- میزان بیان نسبی ژن *CYP71D179/182* به‌دست آمده از Real Time PCR در هفت جمعیت آویشن	۷۹
شکل ۳-۷- میزان بیان نسبی ژن *CYP71D180* به‌دست آمده از Real Time PCR در هفت جمعیت آویشن	۸۰
شکل ۳-۸- میزان بیان نسبی ژن *CYP71D181* به‌دست آمده از Real Time PCR در هفت جمعیت آویشن	۸۱
شکل ۳-۹- مقایسه طول میان‌گره‌های انتهایی برگ گیاهان زیر یک‌ساله آویشن باغی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین	۹۰
شکل ۳-۱۰- مقایسه طول میان‌گره‌های انتهایی برگ گیاهان دوساله آویشن باغی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین	۹۰
شکل ۳-۱۱- مقایسه شکل برگ در گیاهان زیر یک‌ساله تحت تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین	۹۴
شکل ۳-۱۲- مقایسه شکل برگ در گیاهان دوساله تحت اثیر غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین	۹۴
شکل ۳-۱۳- مقایسه عملکرد اسانس گیاهان دوساله آویشن باغی تحت تاثیر هورمون جیبرلین	۱۰۰
شکل ۳-۱۴- مقایسه میانگین سطوح مختلف سن×هورمون جیبرلین بر میزان نسبی بیان ژن گاماترپینن سینتاز	۱۰۲
شکل ۳-۱۵- مقایسه میانگین سطوح مختلف سن×هورمون جیبرلین بر میزان نسبی بیان ژن *CYP71D178*	۱۰۳
شکل ۳-۱۶- میانگین سطوح مختلف سن×هورمون جیبرلین بر میزان نسبی بیان ژن *CYP71D179/182*	۱۰۴
شکل ۳-۱۷- میانگین سطوح مختلف سن×هورمون جیبرلین بر میزان نسبی بیان ژن *CYP71D180*	۱۰۵
شکل ۳-۱۸- میانگین سطوح مختلف سن×هورمون جیبرلین بر میزان نسبی بیان ژن *CYP71D181*	۱۰۶
شکل ۳-۱۹- مقایسه میزان بیان نسبی ژن گاماترپینن سینتاز در سه گونه آویشن تحت تاثیر دما و شدت نور	۱۱۱
شکل ۳-۲۰- مقایسه میزان بیان نسبی ژن‌های تیمول سینتاز در سه گونه آویشن تحت تاثیر دما و شدت نور	۱۱۱
شکل ۳-۲۱- مقایسه میزان بیان نسبی ژن‌های کارواکرول سینتاز در سه گونه آویشن تحت تاثیر دما و شدت	۱۱۲

چکیده

مطالعه تظاهر برخی ژن‌های کاندیدا در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌های فنولی در جمعیت‌های گیاهی آویشن

سمیه بهادر

جنس آویشن (*Thymus*) متعلق به خانواده نعناعیان است که بیش از ۱۸ گونه آن در نواحی مختلف کشور ایران پراکنش دارد. از میان داروهای گیاهی تولید شده، گیاه آویشن بعد از نعناع دارای رتبه دوم در جهان است. تنظیم بیان ژن‌های مونوترپن سینتازی که مسئول تشکیل کارواکرول و تیمول از پیش ماده گاماترپینن در جنس آویشن هستند، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. این پژوهش با سه هدف اصلی و در سه آزمایش انجام شد. هدف از انجام آزمایش اول، بررسی صفات مورفولوژیک و الگوی بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز در هفت جمعیت آویشن بود. آزمایش دوم با هدف بررسی الگوی بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز در گونه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) و تحت تاثیر سن گیاه و هورمون جیبرلین انجام شد. در نهایت آزمایش سوم با هدف بررسی تاثیر دما و شدت نور بر میزان بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز در سه گونه آویشن کرمانی (*Thymus caramanicus* Jalas)، آویشن باغی و زیرگونه برگ نیزه‌ای آویشن دنایی (*Thymus daenensis* subsp *lancifolius* (Celak) Jalas) انجام شد. میزان بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز با استفاده از روش Real Time PCR نسبی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که به‌جز ژن *CYP71D180* در جمعیت باب‌گرگی، بقیه ژن‌های مونوترپن سینتاز در همه جمعیت‌ها بیان می‌شوند. همچنین جمعیت‌های مربوط به گونه آویشن کرمانی از لحاظ صفات مورفولوژیک و میزان بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز نسبت به دیگر جمعیت‌ها از جمله رقم اصلاح شده آویشن باغی مناسب‌تر هستند. الگو و میزان بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز تحت تاثیر هورمون جیبرلین و سن گیاه قرار گرفت و غلظت‌های ۳۰ و ۶۰^{ppm} هورمون جیبرلین بیشترین تاثیر را روی صفات مورفولوژیک و بیان نسبی ژن‌های مونوترپن سینتاز در گونه آویشن باغی داشتند. همچنین تحت تاثیر دما و شدت نور، بیان ژن‌های گاماترپینن سینتاز، تیمول سینتاز و کارواکرول سینتاز به‌ترتیب در گونه آویشن باغی، زیرگونه آویشن دنایی و آویشن کرمانی به‌طور قابل ملاحضه‌ای افزایش یافت. ازاین‌رو، با توجه به خصوصیات مورفولوژیک، بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز و پروفایل متابولیت‌های ثانویه، می‌توان از دو گونه آویشن کرمانی و زیرگونه برگ نیزه‌ای آویشن دنایی به‌ترتیب جهت استحصال کارواکرول و تیمول در برنامه‌های اصلاحی و اهلی‌سازی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: گاماترپینن سینتاز، کارواکرول سینتاز، تیمول سینتاز، بیان نسبی، جیبرلین، Real Time PCR

Abstract

Study on candidate genes expression related to biosynthesis pathway of phenolic monoterpenes in Thyme populations

Somaye Bahador

Thymus genus belongs to the Lamiaceae family which has more than 18 different species distributed in different areas of Iran. Among herbal drugs, thyme has second rank in the world after mint. The monoterpenes synthase genes which are responsible for thymol or carvacrol formation from γ-terpinene are little known regarding its regulation in *Thymus* genus. This study was conducted in three experiments with three main purposes. The purpose of the first experiment was to investigate the morphological traits and gene expression patterns of monoterpenes synthase in seven population of thyme. The second experiment was conducted to evaluate the effect of plant age and exogenously applied gibberellic acid (GA_3), on expression levels of monoterpenes synthase genes in *Thymus vulgaris* L. Finally, the aim of the third experiment was to assess the effect of temperature and light intensity on expression levels of monoterpenes synthase genes in three species, *Thymus caramanicus* Jalas, *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* subsp *lancifolius* (Celak) Jalas. The relative expression levels of monoterpenes synthase genes were determined by Real-Time PCR. The results showed that all monoterpenes synthase genes were expressed in all populations except *CYP71D180* gene which was not expressed in Babgorgi population. Also, populations of *Thymus caramanicus* Jalas had better morphological traits and the highest transcript levels of monoterpenes synthase genes than *Thymus vulgaris* L. Plant age and GA_3 exerted significant influences on morphological traits and gene expression of the monoterpenes synthases in *Thymus vulgaris* L. and the concentrations of 30 and 60 ppm GA_3 lead to a significant increase transcript levels of monoterpene synthase and morphological traits value. The results of the third experiment indicated that the transcript levels of γ-terpinene synthase, thymol synthases and carvacrol synthases increased in *Thymus vulgaris* L., *Thymus daenensis* subsp *lancifolius* (Celak) and *Thymus caramanicus* Jalas, respectively. So, according to morphological traits, gene expression patterns of monoterpenes synthase and secondary metabolites profile, *Thymus caramanicus* Jalas and *Thymus daenensis* subsp *lancifolius* (Celak) can be used in breeding and domestication programs for extraction carvacrol and thymol, respectively.

Keyword: γ-terpinene synthase, Carvacrol synthase, Thymol synthase, Relative transcript levels, Gibberellin, Real-Time PCR

مقدمه

گیاهان با استفاده از انرژی نورانی خورشید و فاکتورهای سبز قادر به سنتز تعداد زیادی از محصولات طبیعی و بیولوژیکی فعال هستند [Crocoll, 2011]. بسیاری از این مواد در سیستم دفاعی گیاهان برعلیه حشرات، پاتوژن‌ها و در مواجه با استرس‌های زیستی و غیرزیستی دارای فعالیت هستند [Huang et al., 2010]. علاوه‌براین، استفاده از متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی و ادویه‌ای در سال‌های اخیر در زمینه‌های مختلفی چون صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی و صنایع غذایی رشد چشم‌گیری داشته است، به‌طوری‌که امروزه برای جایگزین کردن مواد شیمیایی با فرآورده‌های طبیعی، تحقیقات زیادی در راستای حذف و یا کاهش افزودنی‌های شیمیایی در مواد غذایی انجام گرفته است، در همین زمینه تلاش‌های متعددی برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و ترکیبات ضدمیکروبی از منابع گیاهی صورت گرفته است [Milan, 2006].

مقدار و کیفیت متابولیت‌های تولید شده در گیاهان دارویی تحت تاثیر دو عامل ژنتیکی و محیطی است، به‌طوری‌که در رویشگاه‌ها و مناطق مختلف تغییر می‌کنند که دلیل این امر نوسان فعالیت‌های متابولیکی گیاه تحت تاثیر عوامل محیطی است. زمانی‌که برخی از عوامل محیطی تغییر می‌کنند، موجود زنده باید به‌نحوی با محیط و شرایط جدید سازگار شود که این سازگاری بر پایه یک جریان و فرایند بیوشیمیایی و ریختی استوار است [امیدبیگی، ۱۳۸۸]. ازاین‌رو، گونه‌های یکسان و متفاوت در شرایط اقلیمی و اکولوژیکی خاص از نظر کمیت و کیفیت اسانس دارای تیپ‌های مختلف شیمیایی هستند که این تنوع باعث تغییر در دامنه فعالیت‌های دارویی و بیولوژیک آنها می‌شود. انعطاف‌پذیری ژنتیکی جمعیت‌های یک گونه باعث می‌شود که به‌تدریج تحت تاثیر نیروی تکامل در مناطق جغرافیایی مختلف، جمعیت‌های متفاوتی از یک گونه به‌وجود آیند که از نظر فعالیت‌های نموی، فیزیولوژیکی، شیمیایی، بوتانیکی و نهایتاً ژنتیکی از یکدیگر متمایز می‌شوند. زمانی که گیاه در ابتدا با تغییرات محیطی خاص روبرو می‌شود، تغییراتی در رفتار فیزیولوژیکی آن جهت سازگاری به محیط جدید ایجاد می‌شود که این تغییرات معمولاً ناپایدارند، ولی اگر اوضاع محیطی مذکور در محل رویش گیاه پایدار شود، نسل‌های بعدی در جهت سازگاری به محیط جدید انتخاب می‌شوند و این سازگاری به‌تدریج به صفات موروثی و قابل انتقال به نتاج تبدیل می‌شوند. اکثر عوامل محیطی ابتدا روی متابولیسم اولیه گیاه تاثیر می‌گذارند و متعاقباً متابولیسم ثانویه گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهند. نحوه تاثیر می‌تواند به شکل تغییر در تناسب اندام‌های گیاهی، عملکرد متابولیت‌ها و اجزای آنها در سطح گیاه باشد [Bernath, 2002].

جنس آویشن[۱] متعلق به خانواده نعناعیان[۲] است و این جنس دارای گونه‌های زیادی است. معروف‌ترین گونه این جنس آویشن باغی[۳] است که مطالعات و تحقیقات زیادی روی آن انجام شده و یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی است که تولید آن در مقیاس تجاری در بعضی از کشورهای اروپایی صورت می‌گیرد. بالغ بر ۲۱۵ گونه از جنس آویشن شناخته شده است و از میان این گونه‌ها، تعداد محدودی در سطح تجاری کشت و تولید می‌شوند و از میان گونه‌های آویشن، ۱۸ گونه از ایران شناسایی شده است. دو ترپنوئید تیمول[۴] و کارواکرول[۵] تنها در تعداد محدودی گونه‌های گیاهی از جمله آویشن‌ها وجود دارند. نقش اصلی فارماکولوژیکی آویشن به‌سبب وجود ترکیبات ترپنوئیدی موجود در اسانس آن است. این ترکیبات به عنوان مسدود کننده کانال‌های کلسیم عمل می‌کنند و بدین دلیل خاصیت کاهش دهنده قندخون دارند [جم‌زاد، ۱۳۸۸].

تشکیل تیمول و کارواکرول از پیش ماده گاماترپینن[۶] به‌وسیله آنزیم‌های سیتوکروم P450 مونواکسیژناز است. در مسیر تشکیل تیمول و کارواکرول دو آنزیم دخالت دارند که یکی گاماترپینن سینتاز است که GPP را به گاماترپینن تبدیل می‌کند و دیگری سیتوکروم‌های P450 می‌باشند که واکنش تبدیل گاماترپینن به تیمول و کارواکرول را کاتالیز می‌کنند و پاراسیمن[۷] به‌عنوان فرآورده جانبی واکنش تولید می‌شود [Crocoll, 2011].

نتایج تحقیقات مختلف نشان دهنده تفاوت در حضور، عدم‌حضور و میزان ترکیبات فنولی در جمعیت‌های گیاهی آویشن تحت شرایط اقلیمی و آب و هوایی مختلف محل رویش و همچنین شرایط زراعی آنها می‌باشد [نیک‌آور و همکاران، ۱۳۸۳؛ اکبری‌نیا و میرزا، ۱۳۷۸؛ Naghdi Badi et al., 2004]. مثلاً به‌دلیل ماهیت افزایش تولید این متابولیت‌ها تحت شرایط خاص اکولوژیکی محل رویش، در بیشتر موارد میزان تولید ترکیبات فوق در شرایط زراعی کاهش یافته است که بیانگر تاثیر بیشتر عوامل محیطی بر کمیت و کیفیت تولید متابولیت‌های ثانویه در این جمعیت‌ها و در حقیقت بیانگر تغییر بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز این مواد تحت تاثیر

---

1. Thymus
2. Lamiaceae
3. *Thymus vulgaris* L.
4. Thymol
5. Carvacrol
6. γ - terpinene
7. p-cymene

تغییر شرایط محیطی و انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد. از این جهت، شناسایی جمعیت‌ها و افرادی که تولید اسانس و اجزای اسانس آنها بیشتر تحت کنترل ژنتیکی باشد، در سطح بیوشیمایی، متابولیتی، پروتئینی و ژنتیکی می‌تواند از نظر اصلاحی و اهلی‌سازی این گونه گیاهی از اهمیت به‌سزایی برخوردار باشد.

با توجه به این‌که ژن‌های مونوترپن سینتاز مسئول بیوسنتز ترکیبات ترپنوئیدی، برای اولین بار به‌وسیله کروکول [Crocoll, 2001] در آویشن باغی شناسایی و معرفی شدند و بعد از آن در مورد گونه‌های دیگر این جنس بررسی نشده‌اند، و توجه به این موضوع که خانواده ژنی فوق دارای تشابه توالی آمینواسیدی نسبتاً زیادی در بین گونه‌ها و جنس‌های مختلف خانواده نعناعیان است، این فرض در نظر گرفته شد که ژن‌های مونوترپن سینتاز در گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف آویشن حضور داشته و میزان بیان آنها با فرآورده‌های متابولیتی حاصل از آنزیم‌های کدشده به‌وسیله آنها، دارای همبستگی باشند. همچنین از این موضوع نمی‌توان چشم‌پوشی کرد که جنس آویشن دارای ۱۸ گونه با تنوع زیاد در کمیت و کیفیت ترکیبات ترپنوئیدی است که به‌صورت بومی در کشور پهناور ایران وجود دارند. بنابراین با توجه به موارد فوق، این پژوهش انجام شد که هدف از آن، بررسی و مقایسه حضور و عدم حضور، پایداری و میزان بیان ژن‌های مونوترپن سینتاز در هفت جمعیت آویشن تحت شرایط ثابت دمایی، نوری و رطوبتی جهت دستیابی به جمعیت‌های با صفات مطلوب‌تر و بیان بیشتر و پایدارتر ژن‌های مونوترپن سینتاز بود.

کلیات و بررسی منابع

۱-۱- پیشینه استفاده از گیاهان دارویی

بشر در تمام دوران تاریخ از گیاهان به‌عنوان منابع اصلی خوراک و پوشاک استفاده کرده و به موازات تلاش برای خوراک و پوشاک از مواد موجود در پیکره گیاهان برای تامین سلامتی و بهبود بیماری‌های خود استفاده کرده است. اطلاعات به‌دست آمده از سنگ‌نوشته‌ها و متون تاریخی نشان می‌دهد که بیش از ۳۷ قرن قبل از میلاد مسیح مردمان مصر و چین از گیاهان به‌عنوان دارو استفاده می‌کردند و حتی بدین منظور آنها را کشت و کار می‌کردند. علاوه‌براین، منابع تاریخی حاکی از آن است که مردم یونان باستان به‌خوبی با خواص دارویی گیاهان آشنا بودند و بقراط حکیم، بنیانگذار طب یونان قدیم به‌شمار می‌رود.

در طی قرون هشتم تا دهم میلادی، دانشمندان ایرانی ازجمله بوعلی‌سینا و محمد زکریای رازی به دانش "درمان با گیاه" رونق زیادی بخشیدند و کتاب‌های معروفی مانند "قانون" و "الحاوی" را تالیف نمودند [امیدبیگی، ۱۳۸۸]. در اواخر قرن هجدهم و اوایل قرن نوزدهم، تحقیقات علمی گسترده‌ای روی گیاهان دارویی صورت گرفت و همزمان نتایج آن به صورت دارونامه‌های گیاهی منتشر شدند. طی سال‌های اخیر تحقیقات در زمینه‌های مختلف مرتبط با گیاهان دارویی، افزایش یافته است. در حال حاضر بیشترین سهم تحقیقات در این زمینه، به علوم پزشکی، گیاه‌شناسی و کشاورزی گیاهان دارویی مربوط می‌شود [Doreswamy et al., 2006].

۱-۲- وضعیت گیاهان دارویی در ایران

کشور پهناور ما که بخش عمده فلات ایران را شامل می‌شود، بیش از ۱۶۴۸۰۰۰ کیلومتر مربع وسعت دارد. در اطراف این فلات، کوه‌های مرتفع فراوان و رشته کوه‌های متعددی مشاهده می‌شود و در نتیجه اختلاف ارتفاع نسبتاً زیادی را به‌وجود آورده‌اند که از ۲۴ متر در سواحل دریای خزر تا ۵۶۲۸ متر در قله دماوند تغییر می‌کند. اختلاف درجه حرارت و میزان بارندگی در نقاط مختلف ایران بسیار متفاوت بوده و دربرگیرنده سه ناحیه رویشی اروپا- سیبری، ایران- تورانی و خلیج- عمانی می‌باشد. در نتیجه چنین شرایط متنوع اقلیمی، زیست بوم‌های بسیار متنوع و ویژه‌ای در تمام نقاط کشور به وجود آمده است. یکی از ویژگی‌های مهم کشور ایران دارا بودن ۱۱ نوع اقلیم از ۱۴ نوع اقلیم شناخته شده در دنیاست، ازاین‌گذشته، حدود ۸ هزار گونه گیاهی را در خود جای داده است که این میزان گیاه، درصد بالایی از گیاهان دارویی کل جهان را تشکیل می‌دهد و از این تعداد ۱۸۰۰ گونه بومی ایران بوده و گونه‌هایی هستند

که در هیچ جای دیگر دنیا یافت نمی‌شوند. در مجموع، حدود ۱۴۰۰ گونه از خاصیت دارویی برخوردارند و برخی از کارشناسان معتقدند تا حدود ۲۳۰۰ گونه گیاه دارویی در ایران قابل رویش است [دانشیان، ۱۳۸۷].

کشور ایران از نظر آب و هوایی پتانسیل تولید و پرورش انواع گونه‌های گیاهان را دارد و اگر این کار در مجرای صحیحی قرار بگیرد، می‌تواند هم بخش صنعت، هم پزشکی و هم داروسازی را متحول نماید، ولی متاسفانه تعداد اندکی از این گیاهان در صنایع دارویی کشور استفاده می‌شوند. از مهمترین گیاهان دارویی ایران می‌توان به زعفران، زیره‌سبز، زیره‌سیاه، شیرین‌بیان، سدر، اکلیل‌کوهی، حنا، اسطوخدوس، کرفس، دارچین، بابونه، اکالیپتوس، فلفل قرمز، مرزه، گونه‌های مختلف آویشن، نعناع، شوید، گزنه، شمعدانی عطری، درمنه، کنگرفرنگی، مورد، باریجه و رازیانه شیرین اشاره کرد که در سطح گسترده کشت می‌شوند [دانشیان، ۱۳۸۷].

۱-۳- گیاهان بومی

گیاهان بومی یا گیاهان "خانه‌زادها" هر سرزمین، گیاهان پرارزش انحصاری آن سرزمین هستند. برخی از گونه‌های بومی فاقد گسترش و پراکندگی و با شمار اندک در همان محدوده کوچک خاستگاه خود باقی مانده‌اند. این گیاهان بومی در واقع گروهی از گیاهان نادر هر سرزمین هستند. گیاهان بومی از حیث پراکنش به چند گروه تقسیم می‌شوند: گیاهان بومی انحصاری محدوده کوچک خاستگاه خود، گیاهان بومی یک سرزمین، گیاهان بومی چند سرزمین مجاور و حتی گیاهان بومی یک قاره. گروه اول مانند گیاهان نادر، دارای ارزش بسیار و اهمیت علمی و اقتصادی انحصاری بوده و مانند آنها در محدوده کوچک رویشگاه‌های خود در معرض خطر نابودی در اثر عوامل طبیعی و غیرطبیعی هستند. ازاین‌رو، شناسایی و حفاظت از آنها بسیار اهمیت دارد [قهرمان و عطار، ۱۳۸۳]. کشور ایران از نظر تعداد گونه‌های بومی دارای ۱۸۱۰ گونه بومی می‌باشد و مهمترین مراکز گیاهان بومی در ایران عبارت‌اند از:

نواحی شمالی: شیب‌های جنوبی البرز مرکزی.

نواحی غربی: ارتفاعات زاگرس (کردستان تا فارس).

نواحی جنوبی: کرمان (ارتفاعات چوپار، لاله‌زار و هزار)، فارس (اطراف شیراز، ارتفاعات بمو، مرودشت و دشت ارژن).

۱-۴- ویژگی دارویی بودن گیاهان

ویژگی دارویی بودن گیاهان به‌واسطه ترکیبات متنوعی است که طی واکنش‌های متابولیسمی در پیکره این گیاهان تولید و تجمع می‌یابند. به‌طورکلی، یک سری واکنش‌های شیمیایی که واسطه آنزیمی دارند، در گیاهان زنده به‌عنوان متابولیسم شناخته می‌شوند. با هماهنگی واکنش‌های جزئی، مسیرهای متابولیکی شکل می‌گیرند که به سنتز مولکول‌هایی مثل قندها، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، اسیدهای نوکلئیک و پلی‌مرهای آنها، شامل دئوکسی ریبونوکلئیک اسید و ریبونوکلئیک اسید می‌انجامد. این تولید و تجمع به‌عنوان متابولیسم اولیه در نظر گرفته می‌شود و ترکیب‌های تولید شده از آن را متابولیت‌های اولیه می‌نامند که برای زنده ماندن و ادامه حیات گیاه ضروری هستند. علاوه براین، در گیاهان مسیرهای متابولیکی دیگری وجود دارد که نقش محصولات این مسیرها در گیاهان چندان بارز و مشخص نیست و محصولات مذکور برای بقا و حیات گیاهان لازم و ضروری نیستند. به‌همین علت مسیر متابولیکی آنها را ثانویه (متابولیسم ثانویه) و مواد تولید شده از آنها را متابولیت‌های ثانویه می‌نامند. گیاهان ترکیبات متنوعی با وزن مولکولی پایین تولید می‌کنند که تا به حال صد نوع از این ترکیبات شناسایی شده‌اند، اما فقط تعداد کمی از آنها در گروه متابولیت‌های ثانویه قرار می‌گیرند. از آنجا که بسیاری از مولکول‌های کوچک که به‌وسیله متابولیسم اولیه تولید می‌شوند، به‌عنوان واحد سازنده متابولیت‌های ثانویه ضروری هستند، ارتباط بین متابولیسم اولیه و ثانویه وجود دارد. مسیرهای متابولیکی بخشی از برنامه تکاملی به‌حساب می‌آیند. درواقع متابولیسم ثانویه نشانه تمایز سلول‌هاست. تاکنون بالغ بر ۳۰ هزار نوع ترکیب طبیعی از عالم موجودات زنده مورد شناسایی قرار گرفته است که بیش از ۸۰٪ این ترکیبات، متابولیت‌های ثانویه گیاهی تلقی می‌شوند و حدود ۱۲۱ دارو با اثرات بالینی مشخص، از آنها فرموله و عرضه شده است [Ramachandra and Ravishankar, 2002].

۱-۵- آویشن

آویشن گیاهی است که به فارسی "آویشن" و در کتب طب سنتی فارسی با نام‌های "حاشا"، "آوشن" و "صعتر الحمیر" نام برده شده است. در مناطق مختلف ایران، گونه‌های مختلف آن با اسامی محلی مختلفی شناخته می‌شود، از جمله در همدان آن را "آزربه"، در اطراف تهران "آویشن یا آویشم" و در طالقان "زروه"، در آذربایجان و مناطق ترکی زبان "ککلیک اوتی" یا "کاکله اوتی" نامیده می‌شود [زرگری، ۱۳۷۶]. نام جنس *Thymus* از کلمه یونانی Thyo به معنای عطر گرفته شده است. تفسیر دیگری که در رابطه با نام این جنس وجود دارد، کلمه یونانی *Thymos* است که به معنای قوت است و *Thymus* به گروهی از گیاهان اطلاق می‌شد که دارای اثر تقویت کننده و محرک بودند. آویشن

به‌علت داشتن عطر و همچنین خواص دارویی در اکثر مناطق دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. وجود غده‌ها در سطح برگ‌ها و گل‌های گیاه، عامل اصلی بو و خواص دارویی آن است [جم‌زاد، ۱۳۸۸].

جنس آویشن یکی از جنس‌های خانواده نعناع است که در زیرخانواده نپتوئیده[1] قرار دارد و از نظر فیلوژنی با جنس‌های *Origanum*، *Zataria* و *Micromeria* قرابت و خویشاوندی دارد [Morales, 2002].

معروف‌ترین گونه این جنس، آویشن باغی است که مطالعات و تحقیقات زیادی درباره آن انجام شده است و یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد که تولید آن در مقیاس تجاری در بعضی از کشورهای اروپایی صورت می‌گیرد. بالغ بر ۲۱۵ گونه از جنس آویشن شناخته شده است. از میان گونه‌های آویشن، ۱۸ گونه از ایران شناسایی شده است که از این تعداد قبلاً ۱۴ گونه و زیرگونه توسط پروفسور رشینگر[2] در فلور ایرانیکا گزارش شده است. دو ترپنوئید تیمول و کارواکرول تنها در تعداد محدودی گونه‌های گیاهی از جمله آویشن‌ها وجود دارند [جم‌زاد، ۱۳۸۸].

دورگ‌گیری طبیعی در این جنس بسیار معمول است و در جایی که دو گونه یا بیشتر در کنار هم رشد می‌کنند، بین آنها دورگ‌گیری صورت می‌گیرد. بیشتر حشرات ملاقات کننده گل‌ها، زنبورها هستند که به‌مقدار زیاد بین گیاهان مجاور پرواز می‌کنند و عامل مهمی در انتقال دانه‌های گرده به‌حساب می‌آیند [Thompson, 2002].

از نظر رنگ گل، میزان پوشش کرک، شکل و اندازه برگ‌ها و سایر صفات مورفولوژیکی تنوع به چشم می‌خورد و این عامل مهمی در شناسایی و تعیین حد و مرز بین آویشن‌ها و درنهایت رده‌بندی آنها می‌باشد. اصولاً شناسایی گونه‌ها بر اساس نمونه‌های هرباریومی و بدون در اختیار داشتن طیف وسیعی از گونه‌های منطقه، مشکل می‌باشد. از طرف دیگر شناسایی نمونه‌های حاصل از کاشت بذرهای جمع‌آوری شده از گیاهان یک منطقه که دارای گونه‌های مختلفی هستند، کار بسیار پیچیده و مشکل است [جم‌زاد، ۱۳۸۸].

۱-۵-۱-گیاه‌شناسی

آویشن‌ها گیاهانی چندساله، بوته‌ای، بالشتکی یا کپه‌ای با فرم افراشته، خیزان، خمیده و یا خزنده و علفی هستند. اصولاً گیاهانی کوتاه قد هستند و ارتفاع آنها کمتر از ۵۰ سانتی‌متر است. البته به‌ندرت گونه‌هایی با ارتفاع بیشتر وجود

---

[1]. Nepetoideae

[2] . Rechinger