

بهبود تولید تیمول و کارواکربول در گیاه داروئی آویشن از طریق تاثیر هم‌افزائی اشعه UV-B و هورمون سالیسیلیک اسید

محمد آبیاری*

ایران، تهران، دانشگاه فرهنگیان، گروه علوم پایه

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۸

چکیده

آویشن بدلیل خواصی نظیر آنتی‌اکسیدان، ضد میکروب و ضد سرطان که ریشه در وجود ترکیباتی فعالی مثل تیمول و کارواکربول دارد، در کانون توجه محققان قرار گرفته است. الیستورها بعنوان ابزاری بالقوه جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه با ارزش شناخته شده‌اند. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین تاثیر اشعه UV-B و سالیسیلیک‌اسید بر مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکربول و شناخت سازوکار مولکولی آن انجام شد. جهت اجرای آزمایش، بذور آویشن در گلدان‌های پلاستیکی تحت شرایط گلخانه‌ای و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار کاشته شدند. گیاهچه‌های مرحله پنج‌برگی با سالیسیلیک‌اسید ۱ میلی‌مولار محلول پاشی و به طور همزمان با UV-B پرتوهی فرابنفش شدند. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *GTS*، *DXR*، *CYP178* و *CYP180* بعد از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال تیمارها با افزایش معنی‌داری همراه بود و این افزایش در کاربرد همزمان هر دو الیستور بیشتر بود که گویای اثر هم‌افزائی سالیسیلیک‌اسید و UV-B است. بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت از اعمال تیمارها، بیان ژن‌های درگیر بیوسنتز تیمول و کارواکربول با کاهش همراه بود که گویای استفاده گیاه از سازوکارهای دفاعی برای تخفیف علائم تنش ناشی از مسیر پیام‌رسان سالیسیلیک‌اسید است. سنجش متابولیت‌های تیمول و کارواکربول از نتایج بیان ژن حمایت کرد. در کل، اینگونه می‌توان نتیجه گرفت که با استفاده از تیمار توأم سالیسیلیک‌اسید و UV-B در ۲۴ ساعت بعد از تیمار به بیشترین سطح بیان ژن-های بیوسنتز تیمول و کارواکربول و متعاقبا محتوی متابولیتی آنها در آویشن دست یافت.

واژه های کلیدی: آویشن، سالیسیلیک‌اسید، UV-B، کارواکربول، تیمول

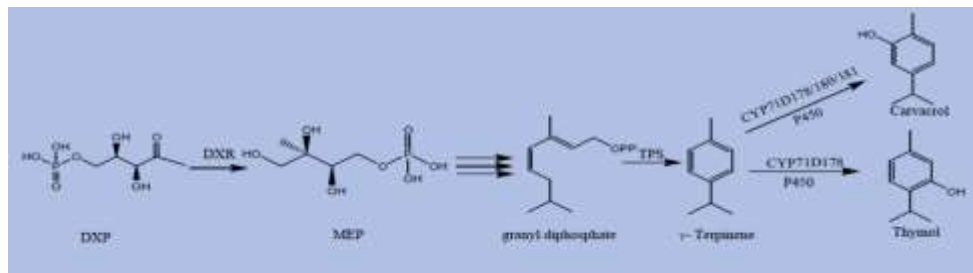
* نویسنده مسئول، تلفن: ، پست الکترونیکی: m.abiyari@cfu.ir

مقدمه

در میان ترکیبات فعال آویشن، تیمول و کارواکربول بخاطر خصوصیات درمانی متنوع خود بیشتر از سایرین مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲۷). تیمول یک ترکیب فنولی با ساختار ۵-ایزوپروپیل-۲-متیل فنول می‌باشد که تفاوت آن با کارواکربول در جایگاه یک گروه هیدروکسیل است. در واقع، تیمول ایزومر کارواکربول است و بویی شبیه به کارواکربول از خود نشان می‌دهد (۲). یافته‌های حاصل از نتایج آزمایشات بالینی حاکی از آن است که تیمول و کارواکربول از خصوصیات متنوع بیولوژیکی مانند

آویشن (*Thymus vulgaris*) یکی از گیاهان دارویی مهم تیره نعناعیان به شمار می‌آید که در نواحی مدیترانه‌ای یافت می‌شود (۱۶). در صنعت غذا، این گیاه دارویی به عنوان طعم‌دهنده غذا مورد توجه قرار گرفته است و در صنعت دارو، به شکل عصاره، روغن و پودر برای مصارف ضد میکروبی، ضد روماتیسم، ضد تومور، ضد اسپاسم، ضد دیابت و آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۸). چنین خواص مهمی به حضور برخی متابولیت‌های ثانویه موجود در بافت‌های آویشن نسبت داده شده است (۱۶).

بعنوان پیش‌ماده ترپنوئیدها تلقی می‌شود. این ترکیب نیز به واسطه فعالیت آنزیمی ۱ دی‌اکسی زایلوز ۵-فسفات ردکتوایزومراز (DXR)، ۲ سی متیل اریتریتول ۴-فسفات (MEP) را تولید می‌کند. بعد از پشت‌سرگذاری واکنش‌های بیوشیمیایی، MEP تبدیل به ژرانیل ۲-فسفات (GP) می‌شود که این ترکیب نیز به نوبه خود توسط گاماترپین سنتاز (TPS) سبب تولید گاماترپین می‌شود که پیش‌ماده تیمول و کارواکرول به شمار می‌آید. در گام آخر، سیتوکروم‌های P450 موجبات تولید تیمول و کارواکرول از پیش‌ماده گاماترپین را فراهم می‌کند (شکل ۱) (۹).



شکل ۱- مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول (۸).

گیاهان بر عهده دارند و لذا سطح آن‌ها در اثر اعمال تنش‌های زیستی و غیرزیستی (منجمله ایستورها) با تغییر مواجه می‌شود.

با توجه به نقش سالیسیلیک‌اسید در تحریک واکنش‌های دفاعی گیاهان (۲۲)، این ترکیب از پتانسیل قابل توجهی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی برخوردار است (۱). در پژوهشی، Capite و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که کاربرد خارجی سالیسیلیک‌اسید منجر به افزایش دو برابری محتوی گلیکوزیدهای ترپنوئید در گیاه دارویی *Actaea racemosa* می‌شود (۳). علاوه بر ترکیبات شیمیایی، مطالعات اخیر حاکی از نقش اشعه فرابنفش در تنظیم متابولیسم ترکیبات فعال گیاهان است (۲۳). در تحقیقی، Ramani و همکاران (۲۰۰۷) مدارکی آزمایشی دال بر این امر ارائه دادند که استفاده از لامپ‌های

اسپاسمولیتیک، ضد التهاب، ضد سرطان، ضد قارچ، ضد باکتری و آنتی‌اکسیدان برخوردار هستند (۸). در نتیجه، مطالعات روز افزونی به سمت فهم جنبه‌های مولکولی مختلف این دو ترکیب، از شناسایی دقیق مسیر بیوسنتز و تنظیم آن تا تعیین مکانیسم‌های اثرگذاری درمانی، هدف‌گذاری می‌شوند.

مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول متشکل بر هفت واکنش آنزیمی است (۹). در این مسیر، نخست پیروات و دی-گلسیر آلدهید ۳-فسفات با یکدیگر ترکیب می‌شوند و پس از پشت‌سرگذاری واکنش‌های بیوشیمیایی لازم، ترکیب دی‌اکسی زایلوز ۵-فسفات (DXP) به وجود می‌آید که

با شناخت مسیر متابولیکی تیمول و کارواکرول و مکانیسم‌های تنظیمی آن، تلاش‌های محققان معطوف بهینه‌سازی و افزایش تولید این ترکیبات از طریق تکنیک‌های مهندسی متابولیت، کشت‌بافت و ریشه موئین شده است (۱۵). در پلت‌فرم‌های کشت‌بافت، بهینه‌سازی محیط کشت، افزودن پیش‌سازها و استفاده از ایستورها از جمله تلاش‌هایی هستند که توسط بیوتکنولوژیست‌ها به منظور افزایش بازدهی تولید آزمایشگاهی متابولیت‌ها اتخاذ می‌شوند (۱۹). ایستورها عوامل زیستی (مثل فیتوپلازما) و غیرزیستی (مثل ترکیبات شیمیایی) متنوعی را شامل می‌شوند که باعث بروز تغییرات قابل توجهی در فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیسم متابولیت‌های ثانویه گیاهان می‌شوند (۶ و ۲۶). تغییر بیوسنتز و تجزیه متابولیت‌های ثانویه بر اثر تیمار ایستورها بدان دلیل است که این ترکیبات نقش دفاعی در

UV-B باعث افزایش سه برابری کاتارانتین در گیاه دارویی *Catharanthus roseus* می‌شود (۲۰). هرچند تاثیرات این الیستور سالیسیلیک‌اسید و UV-B به طور مجزا بر تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مورد بررسی قرار گرفته است، با اینحال نحوه پاسخ هم‌افزایی گیاهان به حضور هر دو الیستور شیمیایی و اشعه‌ای هنوز به شکل سوال در پیکره منابع علمی باقی مانده است.

با توجه به اهمیت ترکیبات تیمول و کارواکول در آویشن و نقش ژن‌های کلیدی *GTS*، *DXR*، *CYP178* و *CYP180* در تولید این دو ترکیب با ارزش، این مطالعه با هدف بررسی اثر هم‌افزایی اشعه UV-B و سالیسیلیک‌اسید بر بیوسنتز تیمول و کارواکول انجام شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی و تیمار آزمایشی: بذور آویشن از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه و سپس جهت ضدعفونی، به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪، ۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳٪ و ۳ بار با آب مقطر شستشو شدند. بذور ضدعفونی‌شده در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک‌برگ پوسیده، خاک باغچه، ماسه گلخانه‌ای با نسبت ۱:۲:۳ تحت شرایط گل‌خانه (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روز، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد روز، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۶۰ درصد) به شکل طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شدند. در مرحله پنج-برگی، سالیسیلیک‌اسید (SA) با غلظت ۱ میلی‌مولار در سه نوبت با فاصله ۵ روز یکبار بر روی برگ گیاهان آویشن محلول‌پاشی شد (۵). همزمان با تیمار سالیسیلیک‌اسید، اشعه فرابنفش از طریق در معرض قراردادن گیاهچه‌ها با لامپ‌های UV-B (۲۸۰ تا ۳۲۰ نانومتر) در پنج نوبت ۱ ساعته با فاصله ۳ روز یکبار اعمال شد (۲۳). در کل، تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: کنترل پیش‌تیمار (قبل از اعمال تیمارها)، کنترل پس‌تیمار برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اتمام اعمال تیمارها، سالیسیلیک‌اسید ۱

میلی‌مولار، اشعه UV-B و تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و UV-B. نمونه‌گیری ۲۴ ساعت بعد از اتمام اعمال تیمارها انجام گرفت. از ورقه‌های پلاستیکی ضدفرابنفش برای جداسازی بخش‌ها و ممانعت از عبور نور بین آنها استفاده شد. لامپ‌های فرابنفش در فاصله ۳۰ سانتی‌متری بالای گلدان‌ها قرار گرفتند. برگ گیاهان شاهد نیز با آب مقطر استریل تحت محلول‌پاشی و با تابش نور معمولی تحت تیمار قرار گرفتند. تا زمان انجام آنالیز بیان ژن، نمونه‌های گیاهی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند.

استخراج DNA، طراحی آغازگرها و RT-PCR: نخست، RNA از نمونه‌های برگ آویشن با استفاده از روش ترایزول استخراج شد (۱۲). به طور خلاصه، ۱ میلی‌لیتر ترایزول به ازای ۰/۱ گرم بافت تازه بکار رفت. نمونه‌های RNA با آنزیم DNase1 تیمار شدند تا RNA خالص و عاری از DNA بدست آید. غلظت RNA با دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر و کیفیت RNA نیز بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد بررسی شد. سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت سیناژن مطابق دستورالعمل شرکت استفاده شد.

طراحی آغازگرهای مرتبط با ژن‌های *GTS*، *DXR*، *CYP178* و *CYP180* با استفاده از اطلاعات ژنی NCBI و نرم‌افزار Primer3 انجام شد (جدول ۱). در اینجا، سه تکرار بیولوژیکی (تعداد تکرار برای هر تیمار) و سه تکرار تکنیکی (تعداد تکرار برای هر نمونه) در نظر گرفته شد. واکنش Real-time PCR شامل ۲ میکرولیتر cDNA (1 μg/μl)، ۳ میکرولیتر SYBR (5X)، ۱ میکرولیتر Primer F (10 pmol/μl)، ۱ میکرولیتر Primer R (10 pmol/μl) و ۱۵ میکرولیتر ddH₂O بود که بعد از تهیه و رقیق‌سازی به ۱۰۰ میکرولیتر، از ۵ میکرولیتر بعنوان الگو برای اجرای واکنش با رنگ SYBR Green (شرکت اینویترورژن) استفاده

گردید. جهت اندازه‌گیری بیان این ژن‌ها از 18s-rRNA به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد.

جدول ۱- نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه.

نام آغازگر	توالی آغازگر (۳→۵)	دمای اتصال
F-CYP178	TGGCCTTTGGAAGCGTCG	~۵۹
R-CYP178	TCAGGCTCATTCCAATAGAGG	
F-CYP180	GGTAAACTGGCGGACTTGGT	~۶۰
R-CYP180	CGAACGGGATTAACCTCGAAA	
F-GTS	CTCTTGATTTCAGACTCCTCAG	~۶۱
R-GTS	GAGGGAGAGCCAAAGAATG	
F-DXR	GCCTTTTGTCTTCTCTTG	~۶۱
R-DXR	TCCGCTCGATGCTTGTCGC	
18s-F	ATGTTTAGAAGGGTGAGTGAGCAGTTTAC	~۶۰
18s-R	GCCTCATCATCATACTTCTCATCATC	

اندازه‌گیری محتوی تیمول و کارواکول: جهت تعیین

غلظت تیمول و کارواکول در برگ‌های آویشن، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC انجام شد. جهت آماده‌سازی برای عصاره‌گیری، نخست نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی خشک شده و سپس ۰/۵ گرم بافت خشک خردشده با ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد ترکیب شد. بعد از فرایند استخراج در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر، محلول بدست‌آمده با کاغذ صافی واتمن فیلتر شد. بعد از سانتریفیوژ با دور ۴۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه، محلول کاملاً شفاف توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان خشک شد. از هر نمونه، محلول استوک (۱۰۰۰ پی پی ام) توسط حلال متانول تهیه شد که این محلول‌ها برای سنجش غلظت تیمول و کارواکول بکار گرفته شدند. در ادامه، ۵۰ میکرولیتر از عصاره به دستگاه HPLC (مجهز به آشکارساز UV و ستون C18 با اندازه ذرات ۵ میکرومتر، قطر ۴ میلی‌متر و طول ۲۵۰ میلی‌متر) تزریق شد. سنجش کارواکول و تیمول در طول موج ۲۸۰ نانومتر صورت گرفت. برای آنالیز کمی ترکیبات، بعد از تزریق محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مشخص و به حصول سطح زیر پیک هر کدام، منحنی کالیبراسیون هر ترکیب رسم شد و توسط معادله خطی منحنی کالیبراسیون، مقدار هر ترکیب در عصاره‌های آویشن برآورد شد (۹).

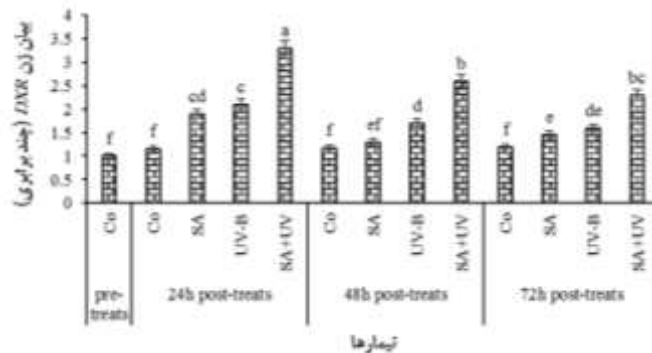
آنالیز داده‌ها

داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش دانکن در نرم‌افزار SAS نسخه ۹٫۴ در سطح ۵ درصد آنالیز شدند. بعد از آنالیز داده‌ها و تعیین اختلاف معنی‌داری مابین نمونه‌ها، نمودارهای حاصل از آنالیز بیان ژن به کمک Excel 2010 ترسیم شدند. از روش کمی‌سازی نسبی $\Delta\Delta CT$ نیز برای بررسی تغییرات کمی بین نمونه‌ها استفاده شد (۱۸).

نتایج

بیان ژن *DXR* تحت تاثیر اشعه UV-B و هورمون اسیدسالیسیلیک: بیان ژن رمزگردان آنزیم ۱ دی‌اکسی زایلوز ۵-فسفات ردکتوازیومراز (*DXR*) به طور معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) بر اثر تیمارهای سالیسیلیک‌اسید و UV-B افزایش یافت. مابین شاهد پیش‌تیمار با شاهد ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت لذا اثر هر تیمار با شاهد هم‌تراز از نظر زمانی مقایسه شد. در دوره زمانی ۲۴ ساعت، بیان ژن *DXR* در تیمار سالیسیلیک‌اسید، UV-B و تیمار ترکیبی آنها به ترتیب ۶۵، ۸۳ و ۱۸۶ درصد نسبت به کنترل افزایش یافت. اما بعد از گذشت ۴۸ ساعت، بیان این ژن در تیمار سالیسیلیک‌اسید، UV-B و تیمار ترکیبی آنها کاهش یافت.

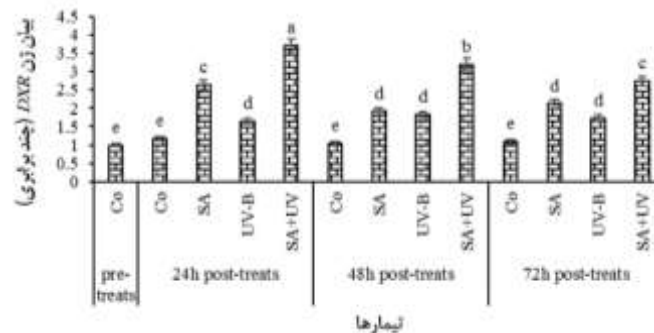
بعد از ۷۲ ساعت نیز، سطح بیان *DXR* تقریباً معادل با ۴۸ ساعت بعد از تیمار بود (شکل ۲).



شکل ۲- بیان ژن *DXR* پس از اعمال اشعه UV-B و هورمون سالیسیلیک‌اسید در روش RT-PCR. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ SA، تیمار سالیسیلیک‌اسید ۱ میلی‌مولار؛ UV-B، تیمار اشعه UV-B؛ SA+UV، تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و اشعه UV-B.

۱۲۵، ۴۲ و ۲۱۸ درصد نسبت به کنترل افزایش یافت. اما بعد از گذشت ۴۸ ساعت، بیان ژن *TPS* توسط سالیسیلیک‌اسید و تیمار ترکیبی آنها کاهش یافت. بعد از ۷۲ ساعت نیز، سطح بیان *TPS* تقریباً معادل با ۴۸ ساعت بعد از تیمار بود (شکل ۳).

بیان ژن *GTS* تحت تاثیر اشعه UV-B و هورمون اسیدسالیسیلیک: بیان ژن گاماتریپین سنتاز (*TPS*) به طور معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) بر اثر اعمال محلول پاشی سالیسیلیک‌اسید و تابش اشعه UV-B افزایش یافت. در ۲۴ ساعت پس از اتمام اعمال تیمارها، بیان این ژن توسط سالیسیلیک‌اسید، UV-B و تیمار ترکیبی آنها به ترتیب



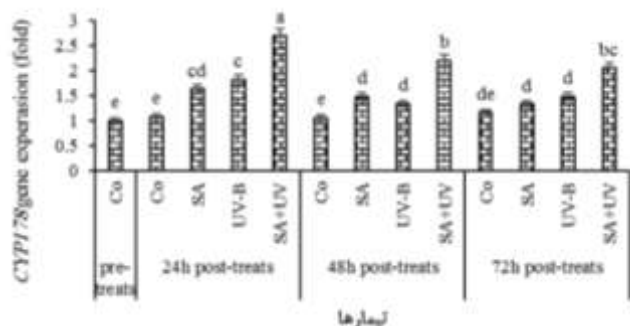
شکل ۳- بیان ژن *GTS* پس از اعمال اشعه UV-B و هورمون سالیسیلیک‌اسید در روش RT-PCR. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ SA، تیمار سالیسیلیک‌اسید ۱ میلی‌مولار؛ UV-B، تیمار اشعه UV-B؛ SA+UV، تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و اشعه UV-B.

معنی‌داری (در سطح ۵ درصد) بر اثر تیمارهای سالیسیلیک‌اسید و UV-B با افزایش همراه بود. در دوره

بیان ژن *CYP178* تحت تاثیر اشعه UV-B و هورمون اسیدسالیسیلیک: سطح رونوشت ژن *CYP178* به طور

از گذشت ۴۸ ساعت نسبت به دوره زمانی ۲۴ ساعت کاهش یافت. بعد از ۷۲ ساعت نیز، سطح بیان *CYP178* تقریباً معادل با ۴۸ ساعت بعد از تیمار بود (شکل ۴).

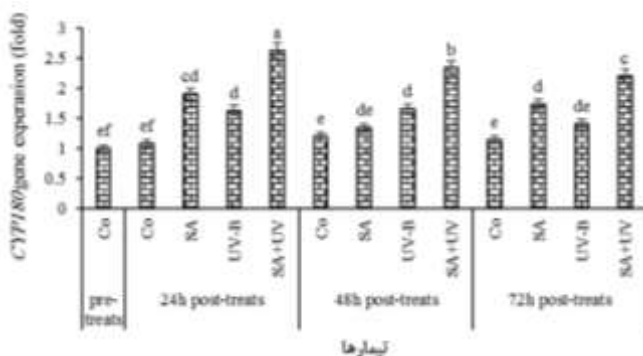
زمانی ۲۴ ساعت، بیان ژن *CYP178* در تیمار سالیسیلیک-اسید، UV-B و تیمار ترکیبی آنها به ترتیب ۶۹، ۵۱ و ۱۵۰ درصد نسبت به کنترل افزایش یافت. با اینحال، بیان این ژن در تیمار سالیسیلیک‌اسید، UV-B و تیمار ترکیبی آنها بعد



شکل ۴- بیان ژن *CYP178* پس از اعمال اشعه UV-B و هورمون سالیسیلیک‌اسید در روش RT-PCR. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ SA، تیمار سالیسیلیک‌اسید ۱ میلی‌مولار؛ UV-B، تیمار اشعه UV-B؛ SA+UV، تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و اشعه UV-B.

یافت. با اینحال، بیان *CYP180* در تیمار سالیسیلیک‌اسید، UV-B و تیمار ترکیبی آنها بعد از گذشت ۴۸ ساعت کاهش یافت. بعد از ۷۲ ساعت نیز، سطح بیان *CYP180* معادل با ۴۸ ساعت بعد از تیمار بود که نشان از تثبیت نوسانات بیان ژن *CYP180* دارد (شکل ۵).

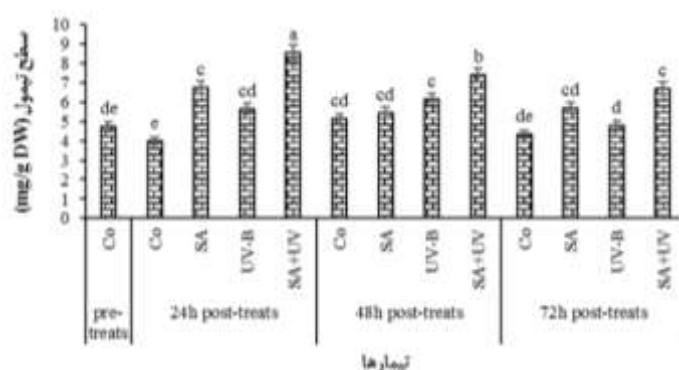
بیان ژن *CYP180* تحت تاثیر اشعه UV-B و هورمون اسیدسالیسیلیک: سطح رونوشت ژن *CYP180* به طور معنی‌داری (در سطح ۵ درصد) بر اثر سالیسیلیک‌اسید و UV-B افزایش یافت. بیان این ژن در تیمار سالیسیلیک-اسید، UV-B و تیمار ترکیبی آنها در دوره زمانی ۲۴ ساعت به ترتیب ۷۸، ۵۲ و ۱۴۲ درصد نسبت به کنترل افزایش



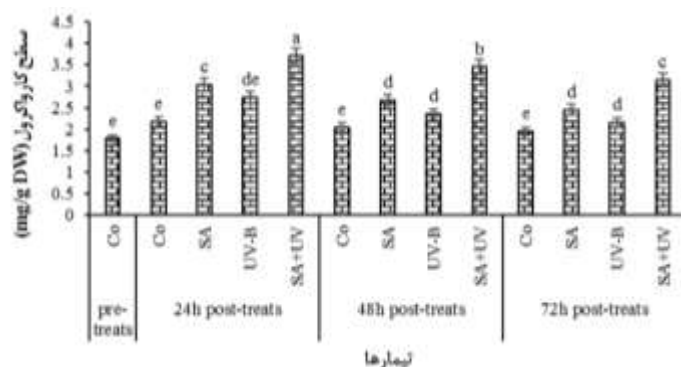
شکل ۵- بیان ژن *CYP180* پس از اعمال اشعه UV-B و هورمون سالیسیلیک‌اسید در روش RT-PCR. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ SA، تیمار سالیسیلیک‌اسید ۱ میلی‌مولار؛ UV-B، تیمار اشعه UV-B؛ SA+UV، تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و اشعه UV-B.

مونوترپین فنولی افت محسوسی داشت. در بین انواع تیمارها، اعمال همزمان اشعه UV-B و اسیدسالیسیلیک و سنجش محتوی آنها ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار توانست به طور معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) سطح تیمول و کارواکرول را در مقایسه با تیمارهای جداگانه در گیاهچه‌های آویشن به ترتیب تا حدود ۱۰۰ و ۷۰ درصد افزایش دهد (شکل ۶ و ۷).

سطح متابولیت‌های تیمول و کارواکرول تحت تاثیر اشعه UV-B و هورمون اسیدسالیسیلیک: مابین شاهد پیش‌تیمار با شاهد ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت لذا اثر هر تیمار با شاهد همتراز از نظر زمانی مقایسه شد. همانگونه که در شکل ۶ و ۷ مشاهده می‌شود، سطح تیمول و کارواکرول در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها، افزایش چشمگیری نسبت به شاهد داشت اما بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت، محتوی هر دو متابولیت



شکل ۶- سطح تیمول پس از اعمال اشعه UV-B و هورمون سالیسیلیک‌اسید در روش RT-PCR. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ SA، تیمار سالیسیلیک‌اسید ۱ میلی‌مولار؛ UV-B، تیمار اشعه UV-B؛ SA+UV، تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و اشعه UV-B.



شکل ۷- سطح کارواکرول پس از اعمال اشعه UV-B و هورمون سالیسیلیک‌اسید در روش RT-PCR. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ SA، تیمار سالیسیلیک‌اسید ۱ میلی‌مولار؛ UV-B، تیمار اشعه UV-B؛ SA+UV، تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و اشعه UV-B.

بحث

می‌دهد که محلول‌پاشی سالیسیلیک‌اسید قادر است تا به‌عنوان یک تقویت‌کننده تولید تیمول و کارواکرول در آویشن مورد استفاده قرار گیرد.

افزایش محتوی مونوترپن‌های تیمول و کارواکرول بعد از تیمار اسیدسالیسیلیک (به خصوص ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار) احتمالاً به این دلیل است که اسیدسالیسیلیک به‌عنوان یک محرک خارجی باعث انتقال سیگنال از غشاء پلاسمایی به سوی اندامکی مثل کلروپلاست و متعاقباً تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. این رادیکال‌های آزاد نیز به نوبه خود مجموعه‌ای از پاسخ‌های دفاعی را فعال می‌کنند که در دل آنها، تولید متابولیت‌های ثانویه جای دارد (۱۱). افزایش بیان و یا فعالیت آنزیم‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه منجر به افزایش محتوی مونوترپن‌های تیمول و کارواکرول می‌شود که گیاه را در مقابله با محرک‌های محیطی یاری می‌دهند (۱۳).

اشعه فرابنفش خورشید تاثیرات متنوعی بر فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول دارد (۷، ۱۷ و ۲۱) به طوری که ترکیب و میزان متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر اشعه‌های فرابنفش و به‌ویژه UV-B قرار می‌گیرند (۱۴). در واقع، اشعه UV-B به‌عنوان یک تنظیم‌کننده بالقوه در بیوسنتز ترکیبات فعال گیاهی مثل ترکیبات فنلی، کاروتنوئیدها و گلوکوزینولات‌ها شناخته شده است (۲۵). در تحقیق اخیر، اثر اشعه UV-B بر بیان ژن‌های *DXR*، *GTS*، *CYP178* و *CYP180* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از این بود که سطح رونوشت آنها به‌طور چشمگیری تحت تاثیر UV-B قرار گرفت. یک روز بعد از اعمال تیمار، بیان آنها افزایش چشمگیری نسبت به شاهد داشت و در ادامه (۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اتمام اعمال تیمار) با کاهش همراه شد. روی هم‌رفته، مشاهدات ما حاکی از نقش بالقوه اشعه UV-B در افزایش تولید تیمول و کارواکرول می‌باشد.

با توجه به تقاضای روز افزون برای تیمول و کارواکرول، شناسایی عوامل موثر بر بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی و مکانیسم‌های عمل آنها می‌تواند گره-گشای مشکل صنعت گیاهان دارویی در تامین این دو ترکیب مهم باشد. بنابراین، مطالعه پیش‌رو متمرکز استفاده از اشعه UV-B و هورمون سالیسیلیک‌اسید و ردیابی اثر آنها بر ژن‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول یعنی *GTS*، *DXR*، *CYP178* و *CYP180* به‌مراه سنجش محتوی این دو ترکیب شد.

سالیسیلیک‌اسید نقش بسزائی در القاء واکنش‌های دفاعی گیاه در مواجهه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی محیطی ایفا می‌کند (۴). افزایش سطح این هورمون سبب القاء مسیرهای پیام‌رسانی می‌شود که به نوبه خود بیان دسته‌بخصوصی از ژن‌های دفاعی و ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهند (۲۵). در این مطالعه، بیان ژن‌های *DXR*، *GTS*، *CYP178* و *CYP180* بعد از ۲۴ ساعت از گذشت اعمال تیمار هورمونی افزایش یافت؛ اما با گذشت زمان (۴۸ ساعت بعد از تیمار)، بیان آنها روند کاهشی در پیش گرفت تا اینکه در ۷۲ ساعت بعد از تیمار تقریباً ثابت شد. با توجه به رابطه مستقیم بین بیان ژن‌های کلیدی و فرآورده‌های حاصل از آنها یعنی تیمول و کارواکرول، به‌نظر می‌رسد که زمان مناسب تیمار سالیسیلیک‌اسید در جهت افزایش تولید دو ترکیب یادشده یک روز بعد از اتمام اعمال تیمار هورمونی باشد. هم‌راستا با یافته‌های ما، Buraphaka و Putalun (۲۰۲۰) نشان دادند که اثر محلول‌پاشی ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید بر گیاه دارویی *Centella asiatica* گویای این واقعیت است که سطح ترپنوئیدها در ساعت اولیه بعد از تیمار با افزایش همراه بود و بعد از آن یک روند کاهشی را دنبال کرد (۲). به‌طور کلی، مشاهدات ما در کنار سایر نتایج حاصل از پژوهش‌های گذشته (۲۴ و ۲۹) نشان

رونویسی القاء‌شونده با سالیسیلیک‌اسید و UV-B باشد که این خود گویای کنترل بیان این ژن‌ها توسط فاکتورهای رونویسی مشابه یا یکسان است. چنین فرضیه‌ای نیز توسط Kianersi و همکاران (۲۰۲۱) گزارش شده است بطوریکه محققان نشان دادند که تیمار الیستورهای مختلف باعث افزایش همزمان بیان ژن‌های درگیر در بیوستز تیمول و کارواکرول می‌شود (۱۰).

از نظر سازوکارهای مولکولی در سطح بیان متابولوم، افزایش غلظت تیمول و کارواکرول آویشن ناشی از تیمار انفرادی یا ترکیبی اسیدسالیسیلیک و UV-B احتمالاً ریشه در تقویت متابولیسم سلولی، تسهیل جذب مواد غذایی از خاک، تغییر تراکم غده‌های تولیدکننده اسانس در سطح برگ و یا تشدید بیوستز مونوترپن‌ها داشته باشد (۵). چنین افزایشی در غلظت تیمول و کارواکرول از نظر کاربردهای دارویی و درمانی حائز اهمیت است چراکه تغییر در مقدار و ترکیب اجزاء اسانس بر کارایی عصاره آویشن در درمان بیماری‌ها تحت بسزائی دارد (۱۶).

در رابطه با دامنه نوسان بیان ژن‌ها و محتوی متابولیت‌ها در پاسخ به تیمارهای سالیسیلیک‌اسید و UV-B، گزارشات مشابهی وجود دارد که حاکی از افزایش ۲ تا ۷ برابری بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوستزی متابولیت‌های ثانویه و افزایش ۲۵ تا ۱۲۵ درصدی محتوی متابولیت‌های ثانویه حاصل از بیان آنها است (۱۰). همچنین، روند افزایشی و متعاقباً کاهش‌ی بیان ژن‌های *GTS*، *DXR*، *CYP178* و *CYP180* و محتوی تیمول و کارواکرول در پاسخ به الیستورهای مختلف نیز آورده شده است که احتمالاً به دلیل پاسخ سریع گیاه به محرک (الیستور) و متعاقباً سازگاری گیاه به شرایط تنش‌زا حاصل از اعمال محرک است (۵).

نتیجه‌گیری

شناخت عوامل موثر بر مسیر بیوستز تیمول و کارواکرول می‌تواند راه را برای تولید بیشتر این متابولیت‌های بارزش

در توجیه افزایش تیمول و کارواکرول توسط UV-B (به خصوص ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار) می‌توان اینگونه استنباط کرد که اشعه UV-B نخست از طریق مسیر پیام‌رسان وابسته به UVR8 (میانکنش‌کننده با COP1) درک می‌شود و سپس این سیگنال از طریق سازوکارهای وابسته به فاکتورهای رونویسی سبب تغییر در بیان ژن‌های درگیر در بیوستز متابولیت‌های ثانویه می‌شود. تغییر ترانس-کریپتوم گیاه نیز به نوبه خود منجر به سه واکنش جداگانه و همپوشان شامل القاء سازگاری به محرک، تحریک واکنش‌های آنزیمی و تعدیل متابولوم گیاه می‌شود (۱۴).

تاکنون، گزارشی از تاثیر همزمان سالیسیلیک‌اسید و UV-B بر ژن‌های بیوستز متابولیت‌های ثانویه گزارش نشده است. تاثیر هم‌افزائی سالیسیلیک‌اسید و UV-B بر بیان ژن‌های رمزگردان آنزیم‌های *GTS*، *DXR*، *CYP178* و *CYP180* در این مطالعه را می‌توان به اثر افزایشی آنها در پیام‌رسانی سلولی طی زمان مقابله با علائم تنش (در اینجا، الیستور) و متعاقباً افزایش فعالیت فاکتورهای رونویسی درگیر در رونویسی ژن‌های یادشده نسبت داد. همچنین، از آنجائیکه مسیر بیوستز سالیسیلیک‌اسید با سایر فنل‌ها مشترک می‌باشد لذا سالیسیلیک‌اسید می‌تواند منجر به افزایش بیوستز ترکیبات مسیر فنیل‌پروپانوییدی همچون تیمول و کارواکرول شود. بنابراین، با مقایسه نتایج این مطالعه با گزارشات گذشته می‌توان پیشنهاد کرد که الیستورهای سالیسیلیک‌اسید و UV-B به واسطه نقش خود در مسیرهای پیام‌رسانی القاء‌شونده با تنش‌های محیطی، موجبات افزایش متابولیت‌های ثانویه را فراهم می‌کنند تا از این طریق گیاه را برای تخفیف علائم تنش یاری نمایند.

از نظر سازوکارهای مولکولی در سطح بیان ژن، به نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن‌های *GTS*، *DXR*، *CYP178* و *CYP180* و متعاقباً تولید ترکیبات حاصل از فعالیت آنزیم‌های آنها (تیمول و کارواکرول) بخاطر برخورداری توالی راه‌انداز آنها از جایگاه‌های اتصال مشابهی برای فاکتورهای

از پتانسیل بالایی در افزایش سطح این ترکیبات برخوردار است که لازم است در تحقیقات آینده مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

کمال سپاسگزاری را از دانشگاه فرهنگیان تهران داریم که حمایت مالی این مطالعه را بر عهده داشت.

در گیاه دارویی آویشن هموار سازد. بررسی بیان ژن‌های *GTS*، *DXR*، *CYP178* و *CYP180* بعد از تیمار اسید-سالیسیلیک و UV-B نشان داد که اعمال همزمان این الیسیتورها (در حدود ۲۴ ساعت بعد از تیمار) می‌تواند سطح بیان آنها را به طور چشمگیری نسبت به کاربرد مجزای آنها افزایش دهد. با توجه به این که محتوی تیمول و کارواکرول مستقیماً تحت تاثیر بیان این ژن‌ها قرار دارد، لذا استفاده توأم از الیسیتورهای اسیدسالیسیلیک و UV-B

منابع

- 1-Ali, B. (2021). Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 31:101884.
- 2-Buraphaka, H., and W. Putalun. (2020). Stimulation of health-promoting triterpenoids accumulation in *Centella asiatica* (L.) Urban leaves triggered by postharvest application of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors. *Industrial Crops and Products*. 146: 112171.
- 3-Capite, A.D., T. Lancaster, and D. Puthoff. (2016). Salicylic acid treatment increases the levels of triterpene glycosides in Black Cohosh (*Actaea racemosa*) rhizomes. *Journal of Chemical Ecology*. 42: 13–16.
- 4-Dučaiová, Z., V. Petruřová, and R. Repčák. (2013). Salicylic acid regulates secondary metabolites content in leaves of *Matricaria chamomilla*. *Biologia*. 68: 904–909.
- 5-Ghasemi-Pirbalouti, A., M. Rahmani Samani, M. Hashemi, et al. (2014). Salicylic acid affects growth, essential oil and chemical compositions of thyme (*Thymus daenensis* Celak.) under reduced irrigation. *Plant Growth Regulation*. 72: 289–301.
- 6-Gu, X.D., M.Y. Sun, L. Zhang, H.W. Fu, L. Cui, R.Z. Chen, D.W. Zhang, J.K. Tian. (2010). UV-B Induced Changes in the Secondary Metabolites of *Morus alba* L. Leaves. *Molecules*. 15(5):2980-2993.
- 7-Huyskens-Keil, S., I. Eichholz, L.W. Kroh, and S. Rohn. (2007). UV-B induced changes of phenol composition and antioxidant activity in black currant fruit (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 81:140-144.
- 8-Kaeidi, A., M. Rahmani, and J. Hassanshahi. (2020). The Protective Effect of Carvacrol and Thymol as Main Polyphenolic Compounds of Thyme on Some Biologic Systems in Disease Condition: A Narrative Review. *JRUMS*. 19 (1): 81-96.
- 9-Krause, S.T., P. Liao, C. Crocoll, B. Boachon, C. Förster, F. Leidecker, N. Wiese, D. Zhao, J.C. Wood, C.R. Buell, J. Gershenzon, N. Dudareva, and J. Degenhardt. (2021). The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 118(52):e2110092118.
- 10-Kianersi, F, A. Pour-Aboughadareh, M. Majdi, P. Poczai. (2021). Effect of methyl jasmonate on thymol, carvacrol, phytochemical accumulation, and expression of key genes involved in thymol/carvacrol biosynthetic pathway in some Iranian Thyme species. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(20):11124.
- 11-Khan, M.I.R., P. Poor, T. Janda. (2022). Salicylic Acid: A Versatile Signaling Molecule in Plants. *J Plant Growth Regulation*. 41: 1887–1890.
- 12-Kumari, A., and S. Pandey-Rai. (2018). Enhanced arsenic tolerance and secondary metabolism by modulation of gene expression and proteome profile in *Artemisia annua* L. after application of exogenous salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*. 132: 590–602.
- 13-Mohammadi, H., F. Amirikia, M. Ghorbanpour, F. Fatehi, H. Hashempour. (2019). Salicylic acid induced changes in physiological traits and essential oil constituents in different ecotypes of *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* under well-watered and water stress conditions. *Industrial Crops and Products*. 129:561-574.
- 14-Nocchi, N., H.M. Duarte, R.C. Pereira, T.U.P. Konno, and A.R. Soares. (2020). Effects of UV-B radiation on secondary metabolite production,

- antioxidant activity, photosynthesis and herbivory interactions in *Nymphoides humboldtiana* (Menyanthaceae). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 112: 112021.
- 15-Owolabi, I.O., C.T. Yupanqui, and S. Siripongvutikorn. (2018). Enhancing secondary metabolites (emphasis on phenolics and antioxidants) in plants through elicitation and metabolomics. *Pakistan Journal of Nutrition*. 17:411-420
- 16-Patil, S.M., R. Ramu, P.S. Shirahatti, C. Shivamallu, and R.G. Amachawadi. (2021). A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. *Heliyon*. 7(5):e07054.
- 17-Pandey, N., and S. Pandey-Rai. (2014). Short term UV-B radiation-mediated transcriptional responses and altered secondary metabolism of *in vitro* propagated plantlets of *Artemisia annua* (L). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 116: 371-385
- 18-Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 29(9): e45-e45.
- 19-Ramirez-Estrada, K., H. Vidal-Limon, D. Hidalgo, E. Moyano, M. Golenioswki, R.M. Cusidó, and J. Palazon. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*. 21:182.
- 20-Ramani, S., J. Chelliah. (2007). UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *BMC Plant Biology*. 7:61.
- 21-Rai, R., R.P. Meena, S.S. Smita, A. Shukla, et al. (2011). UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.- An antimalarial plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 105(3): 216-225.
- 22-Rivas-San Vicente, M., and J Plasencia. (2011). Salicylic acid beyond defense: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*. 62(10): 3321-3338.
- 23-Schreiner, M., J. Martínez-Abaigar, J. Glaab, and M. Jansen. (2014). UV-B induced secondary plant metabolites. *Optik Photonik*. 9(2): 34-37.
- 24-Sivanandhan, G., G.K. Dev, M. Jeyaraj, M. Rajesh, A. Arjunan, M. Muthuselvam, M. Manickavasagam, N. Selvaraj, and A. Ganapathi. (2013). Increased production of withanolide A, withanone, and withaferin a in hairy root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 114:121-129.
- 25- Sun, M., X. Gu, H. Fu, L. Zhang, R. Chen, L. Cui, L. Zheng, D. Zhang, and J. Tian. (2010). Change of secondary metabolites in leaves of *Ginkgo biloba* L. in response to UV-B induction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11: 672-676.
- 26-Thakur, M., S. Bhattacharya, P.K. Khosla, and S. Puri. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 12:1-12
- 27- Shahroodi, E., F. Bernard, D. Tehrani, et al. (2020). Stimulatory effect of salicylic acid on Polyamine oxidase activity in *Thymus daenensis* L. callus. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 33(1):147-157.
- 28- Talebian, Z., A.O. Jafari, M. Yusefinejad. (2016). Morphometric Studies on the 14 species of *Thymus* L. (Lamiaceae) in Iran. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 29(1): 96-106.
- 29- Zare-Hassani, E., R. Motafakkerzad, J. Razeghi, et al. (2019). The effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of secondary metabolites in organ culture of *Ziziphora persica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 138: 437-444.

Improvement of thymol and carvacrol production in thyme plant medicinal through the synergistic effect of UV-B radiation and salicylic acid hormone

Abyari M.

Dept. of Science, Farhanghiyan University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Thyme has attracted the attention of researchers because of its antioxidant, antimicrobial, and anticancer properties, which are due to some active compounds such as thymol and carvacrol. Elicitors are recognized as a potential tool for increasing valuable secondary metabolites. Therefore, this study was carried out to determine the effect of UV-B and salicylic acid on the biosynthesis pathway of thymol and carvacrol, and to understand its molecular mechanism. To perform the experiment, thyme seeds were planted in plastic pots under greenhouse conditions in a completely randomized design with three replications. Seedlings were simultaneously sprayed by 1 mM salicylic acid and irradiated by UV-B. The results showed that the expressions of *DXR*, *GTS*, *CYP178*, and *CYP180* genes were significantly increased after 24 h of treatment. This increase was greater in the simultaneous use of both elicitors, indicating the combined effect of salicylic acid and UV-B. After 48 and 72 h of treatment, the expressions of genes involved in the biosynthesis of thymol and carvacrol were decreased, indicating the plant's use of defense mechanisms to alleviate the symptoms of stress caused by the salicylic acid signaling pathway. Assay of thymol and carvacrol metabolites supported the results of gene expression. In general, it can be concluded that the highest expression levels of thymol and carvacrol biosynthetic genes and their metabolic content in thyme can be achieved 24 h after simultaneous treatment by salicylic acid and UV-B.

Key words: Thyme, Salicylic acid, UV-B, Carvacrol, Thymol.