

تأثیر تنش شوری بر رشد، پارامترهای فیزیولوژیک و بیان ژنهای

تیمول و کارواکرول آویشن دنايي

Effects of salinity stress on the growth, physiological parameters and genes expression of thymol and carvacrol in *Thymus daenensis*

فواد فاتحي^{۱*}، حميد محمدي^۲

Foad Fatehi^{1*}, Hamid Mohammadi²

۱- گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

1. Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

2. Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fatehi.foad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۷)

چکیده

آویشن دنايي یک گیاه چند ساله متعلق به تیره نعنائیان است که حاوی مونوترپن‌های مختلفی مثل تیمول و کارواکرول است. به منظور بررسی اثر تنش شوری بر رشد، محتوای ترکیبات تیمول و کارواکرول و بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی این ترکیبات، آزمایشی در گلخانه پژوهشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد تنش شوری تأثیر معنی-داری بر صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد دارد. تنش شوری در سطح ۱۵۰ میلی-مولار باعث کاهش معنی‌دار در ارتفاع، وزن تر و خشک بوته و افزایش معنی‌دار در محتوای فنل کل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز (PAL) گردید. همچنین محتوای تیمول و کارواکرول در شرایط تنش شوری به طور معنی‌داری افزایش یافت که با بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی این ترکیبات مشخص گردید بیان ژن ۱-دی‌اکسی-D-زایلوز-۵-فسفات رداکتوايزومراز (DXR)، ترپین سینتاز، آلفا-ترپین سینتاز و گاما-ترپین سینتاز در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد افزایش یافت که این میزان افزایش در بیان ژن DXR در مقایسه با بقیه ژن-های مورد مطالعه خیلی بیشتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش متابولیت‌های ثانویه تیمول و کارواکرول در گیاه داروئی آویشن دنايي در شرایط تنش شوری عمدتاً ناشی از افزایش بیان ژن کلیدی DXR است که با مهندسی آن در آینده انتظار می‌رود به افزایش متابولیت‌های مذکور دست یافت.

واژه‌های کلیدی

آویشن دنايي،
تیمول،
کارواکرول،
بیان ژن،
ترکیبات فنولی

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4>

DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4

Genetic Engineering and Biosafety
Journal

Volume 9, Number 2
2021

<http://gebsj.ir/>

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

مقدمه

تنش شوری یکی از مهمترین فاکتورهای محیطی است که تولید گیاهان را در سراسر دنیا محدود می‌کند (Wan et al. 2018). مطالعات نشان داده که در گونه‌های گیاهی حساس، شوری هم باعث کاهش آب و هم سمیت بونی می‌شود و منجر به کمبود مواد غذایی، کاهش رشد و حتی مرگ گیاهان می‌شود (Munns 2008). آویشن (*Thymus. sp*) یکی از بزرگ‌ترین جنس‌ها در خانواده‌ی نعناعیان است. در حال حاضر، ۲۱۴ گونه و ۳۶ زیرگونه از آن‌ها شناسایی شده است. بیش‌ترین گیاهان جنس آویشن به طور گسترده‌ای در مناطق مختلف جهان به عنوان نوشیدنی (چای)، طعم دهنده‌ی غذایی (ادویه و چاشنی) و داروی گیاهی به کار می‌رود (Stahl-Biskup and Saez 2002). کشور ایران به دلیل وسعت و تنوع شرایط اکولوژیکی، تعداد قابل توجهی از گونه‌های آویشن را دارا می‌باشد (Shayganfar et al. 2018). آویشن دناپی گیاهی پایا و بوته‌ای است عمدتاً در کوه‌های زاگرس و البرز، ارتفاعات کوهستانی و دامنه‌های غرب و جنوب غربی ایران یافت می‌شود (Abdollahi Arpanahi and Feizian, 2019). اندام هوایی گیاه آویشن دناپی دارای اسانس می‌باشد که حاوی ترکیبات شیمیایی متعددی است که دو ایزومر تیمول و کارواکرول از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد (Heydari et al. 2019).

ترکیبات شیمیایی غالب در پیکر رویشی گونه‌های مختلف آویشن، اسانس می‌باشد. غیر از اسانس ترکیباتی مانند تانن، ساپونین، فلاونوئید و مواد تلخ در پیکر رویشی آویشن وجود دارد (Stahl-Biskup and Saez 2002). مطالعات نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف این جنس از نظر ترکیبات موجود در اسانس در دو گروه گونه‌های دارای ترکیبات فنولی شامل دو تیپ تیمول و تیپ کارواکرول و گونه‌های دارای ترکیبات غیرفنولی شامل تیپ مونوترپن‌های هیدروکربنه و تیپ مونوترپن‌های الکی می‌باشند. شرایط محیطی رویشگاه‌ها در نمو هر کدام از تیپ‌های فنولی و غیر فنولی نقش داشته که این نقش می‌تواند به ظهور تدریجی یک تیپ شیمیایی مشخص منجر گردد (Senatore et al. 1998). مونوترپن‌ها از شایع‌ترین متابولیت‌ها در اسانس گیاهان دارویی است. مطالعات نشان داده تیمول، کارواکرول، *p-cymene* و

y-terpinene اجزای اصلی اسانس گونه‌های آویشن، شناخته شده است (Ghasemi Pirbalouti et al. 2013). تحقیقات نشان داده فاکتورهای مهم برای تعیین تیپ شیمیایی آویشن، مقدار تیمول و کارواکرول است (Pitarokili et al. 2014). وجود این دو ترکیب در گیاه آویشن باعث فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (Nabavi et al. 2015).

جهت مقابله با شوری، گیاهان مکانیسم‌هایی را توسعه داده‌اند که تجمع نمک را در ارگان‌های مختلف تنظیم کند. گونه‌های گیاهی متحمل معمولاً به خوبی قادرند مکانیسم حفاظتی‌شان را در برابر شرایط تنش در مقایسه با گیاهان حساس بکار بگیرند. این ممکن است شامل توزیع یون سمی در میان بافت‌ها یا در درون سلول‌ها، یا تجمع اسمولیت‌ها باشد که به حفظ فعالیت فتوسنتزی کمک می‌کند (Neto et al. 2014; Mittovo et al. 2002). از طرف دیگر، به طور معمول در شرایط تنش‌های محیطی مثل شوری میزان انواع اکسیژن فعال افزایش می‌یابد و اگر پاکسازی نشوند ممکن است باعث آسیب‌های جدی اکسیداسیونی به ماکرومولکول‌ها شوند. گیاهان متحمل معمولاً دارای راهبردهای دفاعی موثری برای به تعادل رساندن میزان اکسیدانت‌ها و آنتی-اکسیدانت‌ها هستند (Mittler 2002) که سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی ترکیبی از آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی (مثل SOD, CAT و POD) و آنتی اکسیدانت‌های غیر آنزیمی (مثل اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، ویتامین E و ترکیبات فنلی) است (Xalxo and Keshavkant 2019). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که تنش از طریق تاثیر بر مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی می‌تواند منجر به افزایش اسانس شود. چون این ترکیبات می‌توانند نقش دفاعی برای گیاهان داشته باشند (Bistgani et al., 2017). تیمول و کارواکرول از جمله متابولیت‌های ثانویه هستند و جزو مونوترپن‌های فنولی می‌باشند که به دلیل فعالیت بالای آنتی-اکسیدانتی در این زمینه می‌توانند نقش حفاظتی داشته باشند (Nabavi et al. 2015).

با توجه به اینکه تحقیقات نشان داده فاکتورهای مهم برای تعیین تیپ شیمیایی آویشن، مقدار تیمول و کارواکرول است (Pitarokili et al. 2014) و وجود این دو ترکیب در گیاه آویشن

باعث فعالیت بالای آنتی اکسیدانی می شوند (Nabavi et al. 2015) و همچنین مطالعات بسیار اندکی در زمینه تأثیر تنش شوری بر بیوماس، متابولیت های ثانویه و مسیر بیوسنتزی آن صورت گرفته است. لذا آزمایشی طراحی شد که هدف از آن تأثیر تنش شوری ناشی از کلرید سدیم با غلظت های مختلف بر رشد، محتوای ترکیبات تیمول و کارواکول و بیان ژنهای آن ها بود.

مواد و روش ها

این مطالعه در گلخانه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار به صورت کشت در گلدان انجام شد. بستر کاشت استفاده شده بر اساس تحقیقات، حاوی کوکوپیت و پرلایت به نسبت ۱ به ۳ (۳:۱) بود. بذرها پس از ضد عفونی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران کشت شد و ۴ ماه پس از کشت، تیمار شوری (شامل سطوح شوری ۰ و ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلرید) به مدت ۴ هفته اعمال گردید. پس از اعمال تنش، صفات ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک اندام هوایی، فنل کل، فلاونوئید، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز و درصد تیمول و کارواکول موجود در عصاره مورد اندازه گیری قرار گرفت. قسمتی از گیاهان جهت بررسی بیان ژن های مورد مطالعه در فریزر ۸۰- تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

اندازه گیری صفات مورفولوژیک: در پایان دوره تنش شوری که متقارن با شروع گلدهی نیز بود صفات ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی اندازه گیری گردید.

استخراج عصاره گیاهی با روش التراسونیک: استخراج عصاره گیاهی با استفاده از روش التراسونیک انجام گرفت (Başkan et al. 2007). جهت استخراج عصاره گیاهی از دستگاه التراسونیک مدل ۴۰۵، ساخت شرکت هاوشین تکنولوژی کره جنوبی استفاده گردید. بدین منظور، ۰/۵ گرم گیاه خشک آسیاب شده، توزین و در داخل ارلن ۲۵ میلی لیتری قرار داده شد. پس از آن ۱۰ میلی لیتر حلال متانول- آب به آن اضافه گردید، و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام التراسونیک قرار داده شد. پس از آن محتویات ارلن را از

کاغذ صافی عبور داده، و عصاره بدست آمده را تا زمان آزمایش در شیشه های کوچک تیره رنگ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

محتوی فلاونوئید کل: این سنجش به روش Chang و همکاران (2002) انجام شد. به این ترتیب، به ۰/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی، ۰/۱ میلی لیتر از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه گردید. پس از آن، ۰/۱ میلی لیتر از استات پتاسیم ۱ مولار و در پایان ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، جذب آن ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد. سپس منحنی استاندارد بر اساس غلظت های متفاوت کرسین رسم و در نهایت میزان فلاونوئید معادل کرسین در هر گرم پودر خشک گیاه ($\text{mg QUE g}^{-1} \text{DW}$) تعیین گردید.

محتوی فنل کل: به ۱ میلی لیتر از عصاره متانولی، ۱ میلی لیتر کلریدریک اسید ۶ مولار و ۵ میلی لیتر متانول ۷۵ درصد افزوده و در لوله های درب دار در بن ماری ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. سپس در دمای اتاق سرد و پس از آن توسط آب مقطر به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. به ۱ میلی لیتر از محلول اخیر در لوله های مجزا، ۱ میلی لیتر کربنات سدیم (۲ درصد)، ۱/۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر و ۵۰ میکرو لیتر معرف فولین سیوکالتو (۵۰ درصد) اضافه گردید. بعد از گذشت نیم ساعت میزان جذب محلول حاصل را در طول موج ۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر یووی دار (PG Instrument LTD T80+ UV/VIS, UK) نسبت به شاهد (معرف فولین- سیکالتو) قرائت گردید. از اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. از غلظت های مختلف اسید گالیک در متانول برای بدست آوردن منحنی استاندارد استفاده گردید. محتوی فنل کل عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه ($\text{mg GAE g}^{-1} \text{DW}$) تعیین شد (Singleton and Rossi 1965).

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز: مقدار ۰/۳ گرم از بافت تازه برگ را توزین کرده و در ۶/۵ میلی لیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار (pH=8/8) روی یخ ساییده شد و عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی

بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز تیمول:

استخراج RNA کل: برای استخراج RNA کل بافت گیاهی از روش کومزینسکی و ساچی ۱۹۸۷ که مبتنی بر تریزول و رسوب الکلی می‌باشد استفاده گردید (Chomczynski and Sacchi, 1987).

تیمار DNase: برای حذف آلودگی احتمالی DNA موجود در نمونه‌ها از روش تیمار با آنزیم DNase I استفاده گردید. در این روش مقدار ۵ میکروگرم نمونه RNA با ۱/۵ میکرولیتر آنزیم DNase I (Fermentase, USA) و ۱/۵ میکرولیتر بافر مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (جدول ۱) و در نهایت برای حذف و غیرفعال کردن آنزیم DNase I مقدار ۲ میکرولیتر EDTA با غلظت ۵۰ میلی مولار اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت نمونه‌ها برای خوانش نهایی غلظت RNA کل باقیمانده نمونه‌ها در دستگاه Nanodrop مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده: نمونه‌های RNA استخراج شده برای ارزیابی یکپارچگی و همچنین غلظت آن‌ها به ترتیب با ژل آگارز ۱٪ و خوانش اسپکتروفتومتری ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتری در دستگاه NanoDrop (ThermoScientific, USA, 2000c) مورد بررسی قرار گرفتند.

سنتز cDNA از RNA: در این تحقیق برای تبدیل RNA کل استخراج شده به DNA مکمل یا cDNA از روش استفاده همزمان OligodT و پرایمرهای تصادفی در حضور آنزیم Reverse transcriptase و بکار بردن مقدار ۱ میکروگرم RNA برای انجام واکنش استفاده گردید.

طراحی پرایمر: جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های *TPS5*، *TPS2*، *TPSI*، *DXR* و ژن کنترل *18srRNA* مورد نیاز برای این مطالعه، توالی‌های گزارش شده در بانک جهانی داده‌های بیوتکنولوژی مربوط به این ژن‌های گرفته شد و در نرم‌افزار Bioedit (Hall 1999) هم‌ردیف سازی توالی‌ها صورت گرفت. نواحی محافظت‌شده این ژن‌ها شناسایی و برای طراحی پرایمر در نرم‌افزار Oligo7 (Rychlik, 2007) مورد استفاده قرار

از رسوب جدا شد این محلول حاوی آنزیم PAL است. مخلوطی از یک میلی‌لیتر بافر استخراجی بالا، ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس واکنش توسط ۰/۵ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۶ مولار متوقف گردید. در نهایت، به محلول حاصل ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات افزوده شد. فاز روغنی تشکیل شده جدا و باقیمانده در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا تبخیر شود. سپس باقیمانده، که همان سینامیک اسید است در ۳ میلی‌لیتر سود ۰/۰۵ مولار حل شد و غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر بدست آمد. فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید (Lister et al. 1996).

اندازه‌گیری میزان تیمول و کارواکرول: برای اندازه‌گیری میزان تیمول و کارواکرول از روش کروماتوگرافی مایع با کار آبی بالا (HPLC) استفاده شد. جهت آماده سازی نمونه‌های گیاهی برای عصاره گیری، ابتدا نمونه‌ها در دمای اتاق و دور از نور خشک شد. سپس ۰/۵ گرم بافت خشک و آسیاب شده با ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد (۸۰ درصد اتانول و ۲۰ درصد آب) مخلوط شد. فرایند استخراج به مدت ۱۵۰ دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر ادامه یافت. در نهایت محلول حاصل توسط کاغذ صافی واتمن صاف گردید. پس از سانتریفیوژ (به مدت ۵ دقیقه و دور ۴۰۰۰rpm) کردن محلول کاملاً صاف و شفاف به دست آمد. ۵۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده به دستگاه HPLC مدل (KNAUER-Germany) تزریق گردید. این دستگاه مجهز به تشخیص دهنده UV مدل K۲۵۰۱ و ستون (Vertex)C18 دارای اندازه ذرات ۵ میکرومتر طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ۴ میلی‌متر بود. اندازه‌گیری تیمول و کارواکرول در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. جهت آنالیز کمی ترکیبات، با تزریق محلول‌های استاندارد با غلظت‌های معین و به دست آوردن سطح زیر پیک هر کدام، منحنی کالیبراسیون مربوط به هر ترکیب رسم شد و با استفاده از معادله خطی منحنی کالیبراسیون، میزان کلی هر کدام از مواد مورد نظر در عصاره‌ها تعیین گردید (Mišan et al. 2011).

گرفت. در نهایت پرایمرهای طراحی شده برای ارزیابی اختصاصی بودن در نرم افزار primer-BLAST سایت NCBI مورد آزمون قرار گرفت. لیست پرایمرهای طراحی شده برای دستیابی به توالی ژن‌های مورد مطالعه در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱- لیست آغازگرهای طراحی شده

Table 1. Primer sequences

نام آغازگر Primer name	توالی Sequence (5'-3')	دمای ذوب Tm (°C)	اندازه قطعه مورد تکثیر Amplicon size (bp)
DXR-F	TATGACTTCGAGGCCCTTGTTAAAGAG	62	195
DXR-R	TGTATCCAAGGCTTGCCAGAAGG	62	
TPS1-F	GAGGGAAGGCGAAAACACAC	56	140
TPS1-R	TCCAGTGAAGAGGGAGATCC	55	
TPS2-F	GCTGAAGAGAGGGGACGTG	59	103
TPS2-R	CTCCCGCAGCAGATACTTCAC	60	
TPS5-F	GATACAAATGCGTCGGAGGAGG	61	133
TPS5-R	CTGTAGCCTCCACCACTTGTTT	60	
18srRNA-F	ATGTTTAGAAGGGTGAGTGAGCAGTTTAC	59	191
18srRNA-R	GCCTCATCATCATACTCTTCCTCATCATC	60	

نتایج و بحث

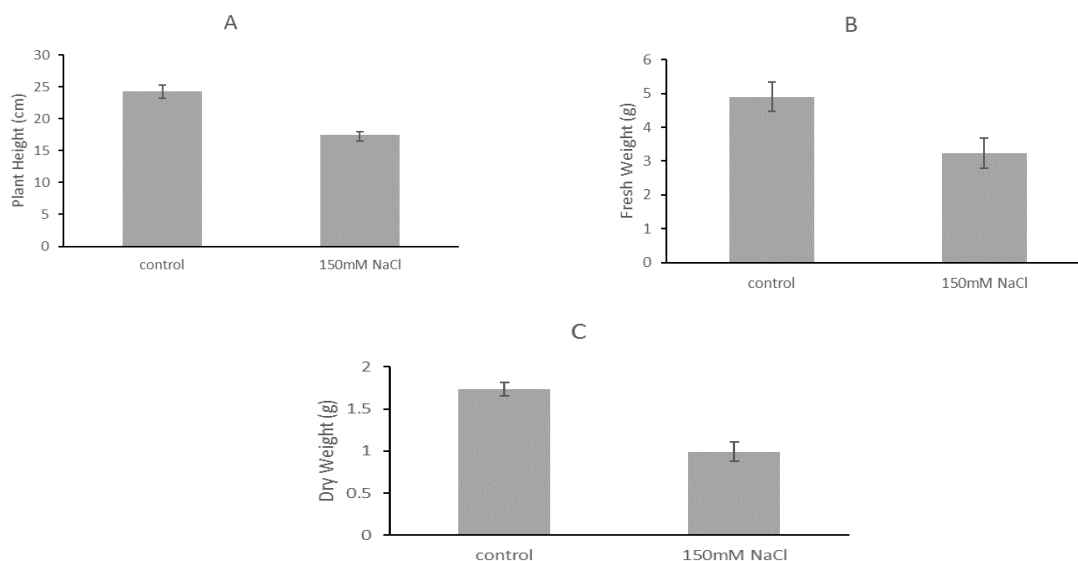
صفات مورفولوژیک: نتایج نشان داد ارتفاع بوته آویشن دناپی در شرایط تنش شوری کاهش یافت (شکل ۱). میزان کاهش در ارتفاع بوته در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد ۲۷/۸ درصد بود. همچنین کاهش ۳۴/۰۱ و ۴۲/۹۹ درصدی به ترتیب در وزن تر و خشک بوته در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۱). مطالعات نشان داده که تنش شوری می‌تواند به عنوان بازدارنده رشد گیاه در برخی از گیاهان دارویی باشد (Said-Al Ahl and Omer 2011; Aziz *et al.* 2008) و مشخص شده که شوری باعث کاهش محتوای کلروفیل‌ها شده که این کاهش می‌تواند مربوط به بازدارندگی سنتز کلروفیل به همراه افزایش تجزیه کلروفیل باشد. عدم تعادل در متابولیسم کلروفیل منجر به کاهش فتوسنتز و احتمالاً مرگ گیاه در شرایط حاد باشد.

بررسی فنل کل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز: داده‌ها نشان داد افزایش قابل توجهی در غلظت فنل کل در گیاهان تحت تنش شوری در مقایسه با شاهد وجود دارد (شکل ۲).

واکنش PCR در زمان واقعی: برای انجام بررسی بیان ژن به روش Real Time PCR از روش مبتنی بر رنگ فلورسنس SYBR green استفاده گردید. در این روش ابتدا در دستگاه ترموسایکلر معمولی شرایط انجام واکنش PCR شامل حجم واکنش، غلظت پرایمر، دمای اتصال پرایمرها، مدت زمان لازم برای بسط قطعه، غلظت $MgCl_2$ و سایر عوامل مؤثر بر تکثیر بهینه گردید و شرایط بهینه بدست آمده در دستگاه StepOne Real Time PCR (ABI, USA) اجرا گردید.

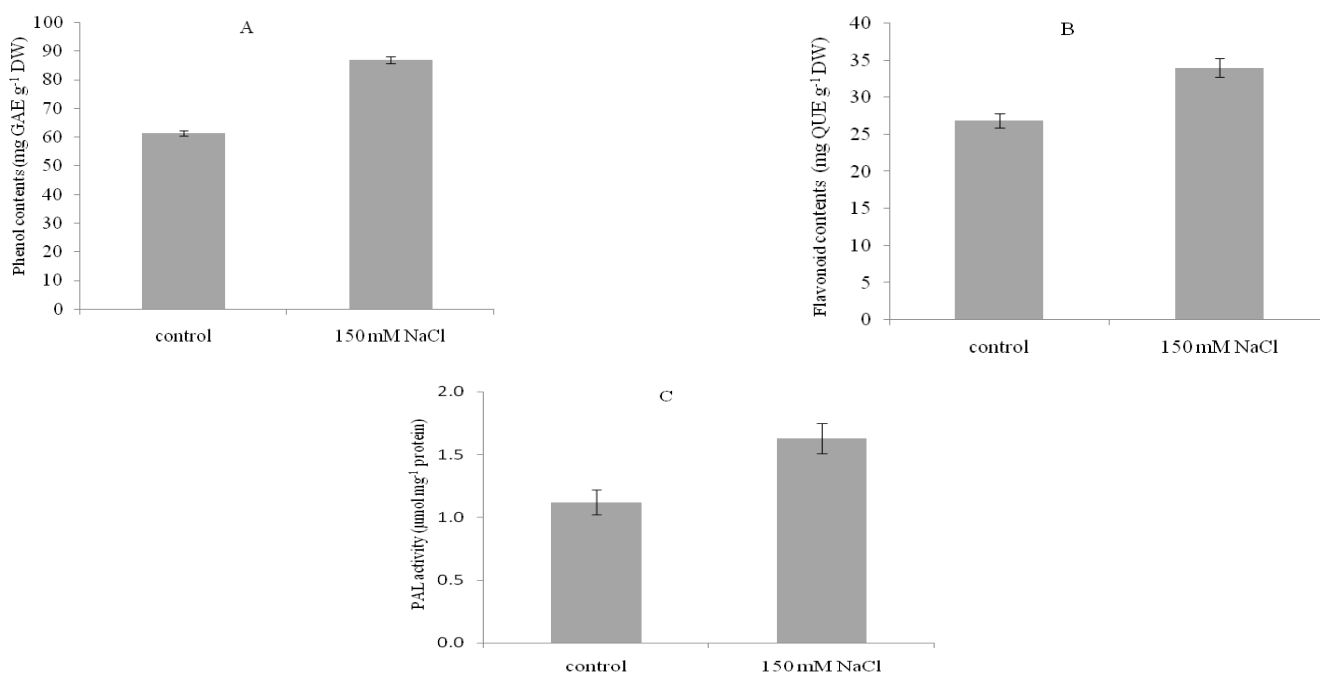
واکنش تکثیر این ژن‌ها به صورت ۱۰ دقیقه واسرشته سازی اولیه و ۴۰ چرخه (با دمای واسرشته سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای بهینه آورده شده در جدول به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آنزیمی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه) صورت گرفت.

آنالیز داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها پس از نمونه برداری و اندازه‌گیری صفات با نرم‌افزار SAS (ver. 9.2) انجام شد، مقایسه میانگین تیمارها نیز به روش آزمون PLSD در سطح احتمال ۰.۰۵ انجام شد. داده‌های به دست آمده از آنالیز بیان ژن با استفاده از روش دلتا $\Delta\Delta Ct$ تصحیح شده با بازدهی تکثیر (Livak and Schmittgen 2001) مورد آنالیز قرار گرفتند و در نرم‌افزار Excell وارد شدند. برای مقایسه هر تیمار با شاهد آزمون تی تست انجام شد.



شکل ۱- مقایسه میانگین صفات ارتفاع بوته (A)، وزن تر (B) و وزن خشک (C) اندام هوایی گیاه داروئی آویشن دنیایی تحت تنش شوری.

Figure 1. Mean comparison of plant height (A), shoot fresh weight (B) and dry weight (C) of *Thymus daenensis* medicinal plant under salinity stress.



شکل ۲- مقایسه میانگین صفات محتوای فنل کل (A)، فلاونوئید (B) و فعالیت آنزیم PAL (C) اندام هوایی گیاه داروئی آویشن دنیایی تحت تنش شوری.

Figure 2. Mean comparison of total phenol (A), flavonoid content (B) and PAL enzyme activity (C) of *Thymus daenensis* medicinal plant under salinity stress.

نیز در شرایط تنش شوری نسبت به بدون تنش شوری افزایش پیدا کرد (شکل ۲). مطالعات نشان می‌دهد گیاهان در پاسخ به شرایط نامساعد محیطی مانند شوری، متابولیت‌های ثانویه پلی‌فنلی با وزن مولکولی پایین مانند فلاونوئیدها را تولید می‌کنند، تا

این افزایش می‌تواند منجر به بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاهان در سم‌زدایی انواع اکسیژن فعال شود و همچنین می‌تواند به عنوان منبع کربنی تحت شرایط تنش عمل کند (Weidner et al. 2009). همچنین مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد محتوای فلاونوئید

بتوانند به واسطه تعدیل انواع اکسیژن فعال (ROS) در بافت‌های گیاهی، نقش دفاعی خود را به عنوان آنتی‌اکسیدان ایفا کنند (Khalid et al., 2019).

نتایج نشان داد فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز (PAL) به طور معنی‌داری در گیاهان تحت تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار در مقایسه با بدون تنش افزایش یافت (شکل ۲). PAL آنزیم کلیدی مسئول بیوسنتز ترکیبات فنلی و اکثر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است که دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی هستند و می‌توانند به گیاهان کمک کنند که در شرایط نامساعد محیطی منجر به پاک‌سازی انواع اکسیژن فعال شوند (Taiz and Zeiger 2002). در این مطالعه، افزایش محتوی فنل تحت شرایط تنش خشکی ممکن است ناشی از کاهش انتقال قندهای محلول و تجمع کربوهیدرات‌ها، و یا افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز (PAL) در گیاهان باشد (Ghadyeh Zarrinabadi et al. 2019). به‌طور معمول ترکیبات فنلی توسط مسیر فنیل پروپانویید سنتز می‌شوند، که در آن آنزیم PAL نقش کلیدی در تغییر متابولیت‌های اولیه برای تولید متابولیت‌های ثانویه بازی می‌کند (Darvizeh et al. 2018)، و ماده اولیه را برای بیوسنتز فنولیک‌های کل و فلاونوئیدها سنتز می‌کند (Jaafar et al. 2012).

بررسی بیان ژن: بررسی بیان ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتزی تیمول و کارواکرول با روش qRT-PCR نشان داد بیان ژن ۱-دی‌اکسی-D-زایلوز-۵-فسفات رداکتوایزومراز (DXR) در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد افزایش ۵۸۶/۷۳ درصدی را نشان داد (شکل ۳). مطالعات نشان می‌دهد که تنش از طریق تأثیر بر مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی می‌تواند منجر به افزایش اسانس شود. چون این ترکیبات می‌توانند نقش دفاعی برای گیاهان داشته باشند (Bistgani et al. 2017). مسیر بیوسنتزی تیمول و کارواکرول اخیراً شناسایی شده است (Crocoll 2011). تیمول و کارواکرول به عنوان مونوترپن‌های فنولی از دی-متیل آلیل دی‌فسفات (DMAPP) و ایزوپنتنیل دی‌فسفات (IPP) سنتز می‌شوند که به ترتیب از طریق مسیرهای موالونیک اسید (MVA) و متیل اریتریتول-۴-فسفات (MEP) تولید می‌شوند. سپس DMAPP و IPP به ژرانیل پیروفسفات (GPP) و ژرانیل ژرانیل پیروفسفات (GGPP) و فارنسیل پیروفسفات (FPP) تبدیل

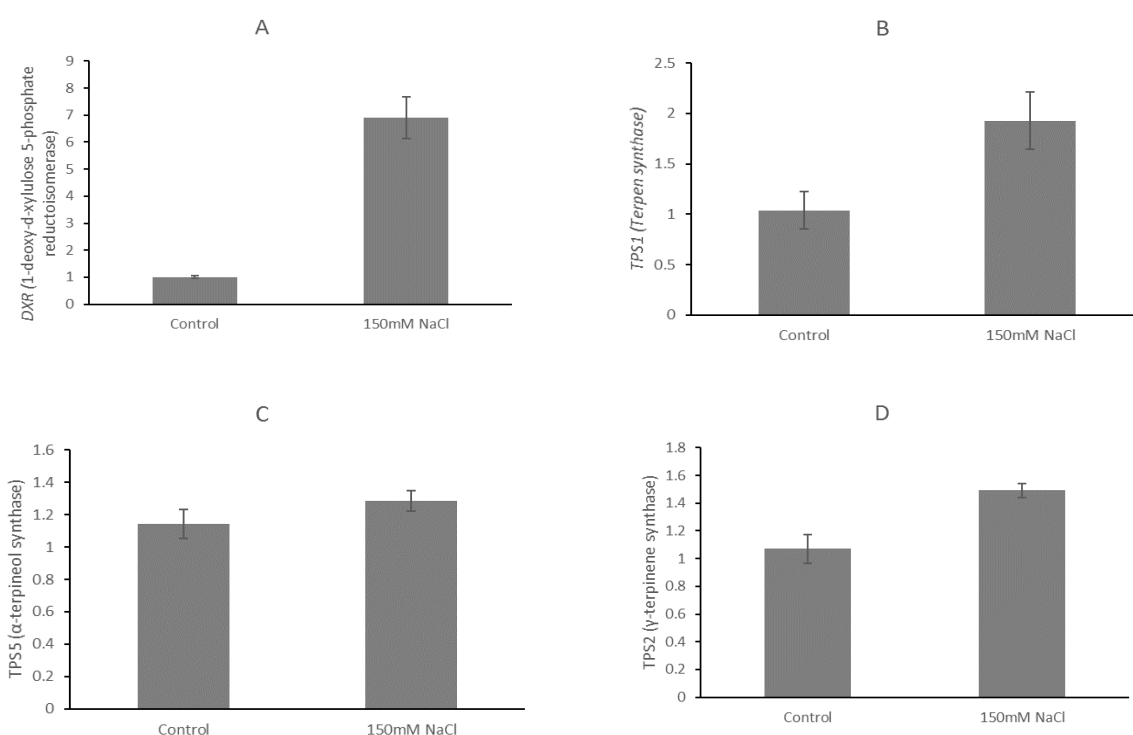
می‌شوند. مونوترپن‌ها از GPP تولید می‌شوند. ژن‌های مرتبط با مرحله انتهایی که منجر به بیوسنتز تیمول می‌شوند شامل ترین سینتاز، گاما ترینین سینتاز و خانواده سیتوکروم P 450 71 است (Dudareva et al. 2005). مطالعات نشان می‌دهد که مسیر MEP منجر به تولید دی‌ترپن‌ها و مونوترپن‌ها در کلروپلاست می‌شود، در حالی‌که مسیر MVA در سیتوپلاسم قرار دارد و منجر به تولید سزکوئی‌ترپن‌ها می‌شود (Lee et al. 2015). با توجه به اینکه ژن DXR نقش کنترل‌کننده و کلیدی در مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) دارد بدین ترتیب که پیروات و گلیسر آلدهید-۳-فسفات در پلاستیدها با هم ترکیب و به ۱-دی‌اکسی زایلوز-۵-فسفات (DXP) تبدیل و این ماده بواسطه فعالیت آنزیم ۱-دی‌اکسی-D-زایلوز-۵-فسفات رداکتوایزومراز (DXR) به طور غیر قابل برگشتی تبدیل به متیل اریتریتول فسفات (MEP) می‌شود. این مرحله به عنوان اولین مرحله کلیدی در مسیر MEP به حساب می‌آید (Takahashi et al. 1998). ژرانیل پیروفسفات سینتاز (GPS) آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی است که اتصال سر به دم IPP و DMAPP به ژرانیل پیروفسفات (GPP) به عنوان اصلی-ترین پیش‌ماده مونوترپن‌ها را کاتالیز می‌کند (Lichtenthaler 1999; Cheng et al. 2007).

میزان بیان ژن ترین سینتاز در سطح ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، افزایش ۸۵/۸۵ درصدی نسبت به شرایط شاهد نشان داد (شکل ۳). ژن ترین سینتاز از جمله ژن‌های اصلی دخیل در بیوسنتز تیمول بوده و آنزیم ترین سینتاز (TPS) واسطه‌های پرنیل پیروفسفات (GPP و FPP) را به ترتیب به مونوترپن و سزکوئی-ترین تبدیل می‌کند. بنابراین تغییر در بیان ژن ترین سینتاز می‌تواند تأثیرات قابل توجهی بر محتوای تیمول داشته باشد (Trindade et al. 2018).

نتایج بیان ژن آلفا و گاما ترینین سینتاز نشان داد شوری ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به ترتیب افزایش اندک (۱۲/۲۸ درصد) و زیاد (۳۹/۳۵ درصد) در بیان ژن‌های آلفا و گاما ترینین سینتاز نسبت به شرایط شاهد نشان داد (شکل ۳). با توجه به اینکه در مسیر بیوسنتزی تیمول، ژرانیل پیروفسفات به آلفا پینول تبدیل شده و این ترکیب تحت تأثیر فعالیت آنزیم آلفا ترینین سینتاز به آلفا ترینین تبدیل می‌شود. همچنین آنزیم گاما-ترین سینتاز از

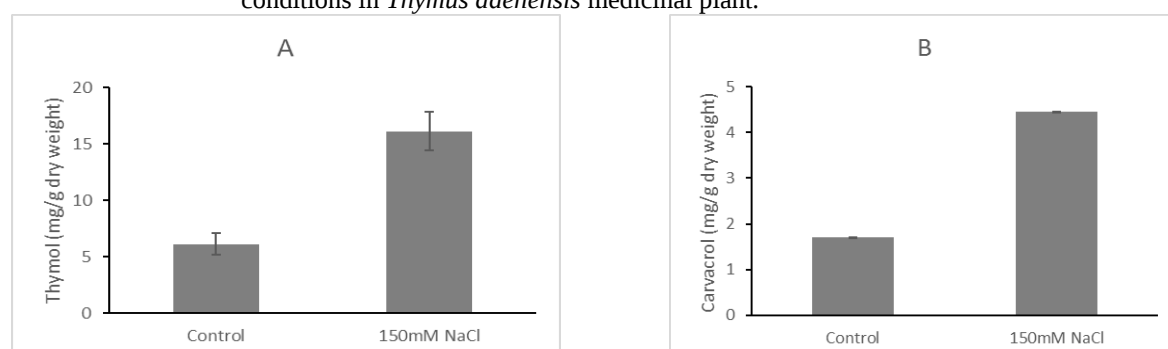
و گاما-ترپین صورت می گیرد (Rahimmalek and Goli 2013). گزارش‌های دیگری نیز نشان می‌دهد که همبستگی زیادی بین غلظت ترپن‌ها و سطوح بیان mRNA ها در مسیر بیوسنتزی مرتبط وجود دارد به عبارتی بیوسنتز ترپنوئیدها در سطوح رونویسی تنظیم بالایی را نشان می‌دهند (Crocoll et al. 2010). به طوری که مطالعات Mendes و همکاران (۲۰۱۳) مشخص نمود که سطوح رونوشت‌برداری آلفا ترپین سینتاز در شاخساره‌های *Thymus caespititius* بالا بود.

طریق حلقوی کردن GPP منجر به تولید گاما-ترپین می‌شود. به علاوه آنزیم‌های متعلق به خانواده سیتوکروم P450 مونواکسیژناز نیز در تبدیل‌های بعدی گاما-ترپین به تیمول و کارواکرول دخیل هستند (Rudolph et al. 2016; Crocoll 2011). مطالعات نشان می‌دهد تیمول به طور منحصر به فردی از طریق سیتوکروم مونواکسیژناز 8 17 CYP71D تولید می‌شود در حالی که کارواکرول از طریق 80 17 CYP71D و 1081 CYP71D سنتز می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد تولید تیمول از طریق p-cymene



شکل ۳- مقایسه میانگین بیان ژن‌های DXR (A)، TPS (B)، آلفا (C) و گاما (D) ترپین سینتاز تحت شرایط تنش شوری در گیاه دارویی آویشن دنايي.

Figure 3. Mean comparison of gene expression of DXR (A), TPS (B), α- (C) and γ-Terpinene synthase under salinity stress conditions in *Thymus daenensis* medicinal plant.



شکل ۴- مقایسه میانگین محتوای تیمول (A) و کارواکرول (B) تحت شرایط تنش شوری در گیاه دارویی آویشن دنايي.

Figure 4. Mean comparison of thymol (A) and carvacrol (B) contents under salinity stress in *Thymus daenensis* medicinal plant.

بررسی محتوای تیمول و کارواکربول: نتایج آزمایش حاضر نشان داد محتوای تیمول آویشن دنبایی در شرایط تنش شوری در مقایسه با شرایط بدون تنش شوری افزایش ۱۶۳/۳۴ درصدی داشت (شکل ۴). همچنین افزایش ۱۶۲/۲۰ درصدی در محتوای کارواکربول در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۴). مطالعات متعددی نشان می‌دهد محتوای اسانس و در نتیجه بیوستز تیمول و کارواکربول و تجمع آن‌ها در بافت‌های مختلف یا در واکنش به عوامل محیطی مختلف متفاوت است (Mohammadi et al. 2018; Shiyab et al. 2012; Majidi et al. 2017). به نظر می‌رسد که تحت شرایط تنش، تراکم بالاتر غدد کرکی منجر به افزایش تجمع اسانس می‌شود یا به علت تولید ترپن بیشتر که ناشی از توزیع اندک کربن در نمو است باشد که نهایتاً منجر به بهبود واکنش‌های دفاعی گیاه می‌شود (Turtola et al. 2003). تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله شرایط محیطی و عوامل ژنتیکی، نوع گونه‌های گیاهی، مراحل نمو، شرایط فصلی خاص، قابلیت دسترسی مواد غذایی قرار می‌گیرد که در این بین، شرایط تنش مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر بیوستز متابولیت‌های ثانویه است (Liang et al. 2019). این ترکیبات ممکن است تعدادی فعالیت بیولوژیکی نیز داشته باشند (Zhang et al. 2018). کشت گیاه دارویی زمانی اقتصادی است که مقدار متابولیت‌های اولیه و ثانویه آن در حد مطلوب باشد. تنش‌های غیر زیستی باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی می‌شود چون در این شرایط، متابولیت‌های ثانویه باعث جلوگیری از اکسیداسیون سلول می‌شود (Farouk and Al-Amri 2019). گزارش‌های دیگری نیز نشان می‌دهد که تنش شوری در برخی از گونه‌های گیاهی مثل گونه‌های نعنای (Aziz et al. 2008)، ریحان (Ashraf and Orroj 2006) باعث کاهش در محتوای اسانس‌ها بویژه مونوترپن‌ها می‌شود. همچنین برعکس در برخی از گونه‌های گیاهی دیگر مثل مرزنجوش، تنش شوری باعث افزایش چندین ترکیب اسانس شد (Baghalian et al. 2008). همچنین افزایش در درصد اسانس در مرزه، مریم گلی، آویشن و ریحان تحت تنش شوری مشاهده شد (Baher et al. 2002; Hendawy and Khalid 2005; Ezz El-Din et al. 2009).

اما در ترکیب اسانس نتایج متفاوتی مشاهده شد به عنوان مثال از ترکیبات اسانس مثل کارواکربول افزایش ولی γ -trepine با coriander با افزایش شوری کاهش یافت (Neffati and Marzouk 2008). مطالعات نشان داد که افزایش تراکم غدد اسانس همراه با تعداد بیشتر تولید غدد در طول تنش می‌تواند دلیلی برای تجمع اسانس در برخی از گونه‌های گیاهی باشد. عامل دیگر می‌تواند اسیمیلایون خالص یا توزیع اسیمیلایها در طول فرایندهای رشد و تمایز باشد. گاهی اوقات، کاهش در متابولیسم اولیه گیاهان در طول تنش می‌تواند منجر به تجمع محصولات واسطه ویژه شود که این ترکیبات حد واسطه می‌تواند به سمت سنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله اسانس شیفت پیدا کند. در گیاهانی که سطوح متابولیت‌های ثانویه در شرایط تنش کاهش پیدا می‌کند این می‌تواند مربوط به آنابولیسم کلی باشد که در شرایط تنش شوری بازدارنده می‌شود (Said-Al Ahl and Omer 2011).

نتایج ما نشان داد افزایش در فعالیت آنزیم PAL در شرایط تنش شوری می‌تواند منجر به افزایش ترکیبات فنولی شود و این ترکیبات می‌توانند در فرایند سازگاری گیاهان به شرایط تنش شوری موثر واقع شوند. همچنین، برای تمامی ژن‌های مورد مطالعه در مسیر بیوستزی تیمول و کارواکربول، بیان ژن در شرایط تنش شوری در مقایسه با شرایط بدون تنش بالاتر بود که این نشان می‌دهد موقعی که یک گیاه در معرض تنش‌های غیر زیستی بویژه شوری است، بیان تعدادی از ژن‌ها تغییر می‌کند و منجر به تغییر سطوح چندین پروتئین و متابولیت در درون سلول می‌شود. تغییر بیان این ژن‌ها ممکن است برای اعطاء محافظت یا حساسیت به تنش‌های غیر زیستی مسئول باشند. همچنین نتایج نشان داد که ژن کلیدی DXR می‌تواند نقش اصلی در تنظیم محتوای تیمول و کارواکربول در گیاه آویشن دنبایی داشته باشد که افزایش میزان آن در شرایط تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار نیز دلیلی بر این مدعاست. بنا بر نتایج بدست آمده آویشن دنبایی توانایی رشد در زمین‌های با شوری متوسط جهت تولید عملکرد بیولوژیکی و متابولیکی قابل قبول را دارا می‌باشد.

منابع

- Abdollahi Arpanahi A, Feizian M. 2019.** Variation in the essential oil composition and morphological Parameters of *Thymus daenensis* Clack. with two species of mycorrhizal fungi under water deficit conditions. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 22(3): 675-684.
- Ashraf M, Orooj A. 2006.** Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague). *J Arid Env* 64(2): 209-220.
- Aziz EE, Al-Amier H, Craker LE. 2008.** Influence of salt stress on growth and essential oil production in peppermint, pennyroyal, and apple mint. *J Herbs Spices Med Plants* 14:77-87.
- Baghalian K, Haghiry A, Naghavi MR, Mohammadi A. 2008.** Effect of saline irrigation water on agronomical and phytochemical characters of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Scientia Hort* 116:437-441.
- Baher ZF, Mirza M, Ghorbanli M, Rezaii MB. 2002.** The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour Fragr J* 17: 275-277.
- Başkan S, Öztekin N, Erim FB. 2007.** Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry* 101(4): 1748-1752.
- Bistgani ZE, Siadat SA, Bakhshandeh A, Pirbalouti AG, Hashemi M. 2017.** Morpho-physiological and phytochemical traits of *Thymus daenensis* Celak. in response to deficit irrigation and chitosan application. *Acta Physiologiae Plantarum* 39(10): 231.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002.** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis* 10(3): 178-182.
- Cheng AX, Lou YG, Mao YB, Lu S, Wang LJ, Chen XY. 2007.** Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(2): 179-186.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Crocchi C, Asbach J, Novak J, Gershenzon J, Degenhardt J. 2010.** Terpene syntheses of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 73(6): 587-603.
- Crocchi C. 2011.** Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene syntheses and cytochrome P450s in oregano and thyme. Academic Dissertation, der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Darvizheh H, Zahedi M, Abaszadeh B, Razmjoo J. 2018.** Effects of Irrigation Regime and Foliar Application of Salicylic Acid and Spermine on the Contents of Essential Oil and Caffeic Acid Derivatives in *Echinacea purpurea* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 37(4): 1267-1285.
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J. 2005.** The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(3): 933-938.
- Ezz El-Din AA, Aziz EE, Hendawy SF, Omer EA. 2009.** Response of *Thymus vulgaris* L. to salt stress and alar (B9) in newly reclaimed soil. *J Appl Sci Res* 5: 2165-2170.
- Farouk S, Al-Amri SM. 2019.** Exogenous melatonin-mediated modulation of arsenic tolerance with improved accretion of secondary metabolite production, activating antioxidant capacity and improved chloroplast ultrastructure in rosemary herb. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 180: 333-347.
- Ghadyeh Zarrinabadi I, Razmjoo J, Abdali Mashhadi A, Karimmojeni H, Tseng TM. 2019.** Irrigation effect on yield and desirable metabolites of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) genotypes. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 60(4): 467-478.
- Ghasemi Pirbalouti A, Hashemi M, Ghahfarokhi FT. 2013.** Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*
- Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Paper presented at the Nucleic acids symposium series.
- Hendawy SF, Khalid KhA. 2005.** Response of sage (*Salvia officinalis* L.) plants to zinc application under different salinity levels. *J Appl Sci Res* 1: 147-155
- Heydari A, Hadian J, Esmaeili H, Kanani MR, Mirjalili MH and Sarkhosh A. 2019.** Introduction of *Thymus daenensis* into cultivation: Analysis of agro-morphological, phytochemical and genetic diversity of cultivated clones. *Industrial Crops and Products* 131: 14-24.
- Jaafar HZ, Ibrahim MH, Mohamad Fakri NF. 2012.** Impact of soil field water capacity on secondary metabolites, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), malondialdehyde (MDA) and photosynthetic responses of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth). *Molecules* 17(6): 7305-7322.
- Khalid M, Ur-Rahman S, Bilal M, HUANG DF. 2019.** Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens-A review. *Journal of Integrative Agriculture* 18(1): 211-230.
- Lee GW, Lee S, Chung MS, Jeong YS, Chung BY. 2015.** Rice terpene synthase 20 (OsTPS20) plays an important role in producing terpene volatiles in response to abiotic stresses. *Protoplasma* 252(4): 997-1007.
- Liang C, Wang L, Lei J, Duan B, Ma W, Xiao S, Qi H, Wang Z, Liu Y, Shen X, Guo S. 2019.** A Comparative Analysis of

- the Chloroplast Genomes of Four *Salvia* Medicinal Plants. *Engineering* 5(5): 907-915.
- Lichtenthaler HK. 1999.** The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 50(1): 47-65.
- Lister CE, Lancaster JE, Walker JRL. 1996.** Phenylalanine ammonia-lyase activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand grown apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121(2): 281-285.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Majdi M, Malekzadeh-Mashhady A, Maroufi A, Crocoll C. 2017.** Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. *Plant Physiology and Biochemistry* 115: 152-162.
- Mendes MD, Figueiredo AC, Oliveira MM, Trindade H. 2013.** Essential oil production in shoot cultures versus field-grown plants of *Thymus caespitosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 113(2): 341-351.
- Mišan AČ, Mimica-Dukić NM, Mandić AI, Sakač MB, Milovanović IL, Sedej IJ. 2011.** Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Central European Journal of Chemistry* 9(1): 133-142.
- Mittler R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M. 2002.** Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol Plant* 115: 393-400.
- Mohammadi H, Amirikia F, Ghorbanpour M, Fatehi F, Hashempour H. 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.
- Munns R, Tester M. 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651-681.
- Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. 2015.** Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry* 173: 339-347.
- Neffati M, Marzouk B. 2008.** Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *Industrial Crops and Products* 28: 137-142.
- Neto MCL, Lobo AKM, Martins MO, Fontenele AV, Silveira JAG. 2014.** Dissipation of excess photosynthetic energy contributes to salinity tolerance: a comparative study of salt-tolerant *Ricinus communis* and salt-sensitive *Jatropha curcas*. *J Plant Physiol* 171: 23-30.
- Pitarokili, D., Constantinidis, T., Saitanis, C. and Tzakou, O., 2014.** Volatile compounds in *Thymus* sect. *teucrioides* (Lamiaceae): intraspecific and interspecific diversity, chemotaxonomic significance and exploitation potential. *Chemistry & Biodiversity* 11(4): 593-618.
- Rahimmalek M, Goli SAH. 2013.** Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymys daenensis* subsp. *daenensis*. *Celak leaves. Industrial Crops and Products* 42: 613-619.
- Rudolph K, Parthier C, Egerer-Sieber C, Geiger D, Muller YA, Kreis W, Mueller-Ur F. 2016.** Expression, crystallization and structure elucidation of γ -terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* 72(1): 16-23.
- Rychlik W. 2007.** OLIGO 7 primer analysis software. In *PCR primer design* (pp. 35-59). Humana Press.
- Said-Al Ahl HAH, Omer EA. 2011.** Medicinal and aromatic plants production under salt stress. A review. *Herba Polonica* 57: 72-87.
- Senatore F, Urrunaga Soria E, Urrunaga Soria R, Della Porta G, De Feo V. 1998.** Essential oils from two Peruvian *Satureja* species. *Flavour and Fragrance Journal* 13(1): 1-4.
- Shayganfar A, Azizi M, Rasouli M. 2018.** Various strategies elicited and modulated by elevated UV-B radiation and protectant compounds in *Thymus* species: Differences in response over treatments, acclimation and interaction. *Industrial Crops and Products* 113: 298-307.
- Shiyab S, Shatnawi M, Shibli R, Al-Zweiri M, Akash M, Aburijai T. 2012.** Influence of developmental stage on yield and composition of *Origanum syriacum* L. oil by multivariate analysis. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(15): 2985-2994.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-158.
- Stahl-Biskup E, Sáez F eds. 2002.** Thyme: the genus *Thymus*. CRC Press.
- Taiz L, Zeiger E. 2002.** *Plant Physiology*, 3rd edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA, pp. 224.
- Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H. 1998.** A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(17): 9879-9884.
- Tohidi B, Rahimmalek M, Arzani A. 2017.** Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry* 220: 153-161.
- Trindade H, Pedro LG, Figueiredo AC, Barroso JG. 2018.** Chemotypes and terpene synthase genes in *Thymus* genus: State of the art. *Industrial Crops and Products* 124: 530-547.
- Turtola S, Manninen AM, Rikala R, Kainulainen P. 2003.** Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 29(9): 1981-1995.

- Wan S, Wang W, Zhou T, Zhang Y, Chen J, Xiao B, Yang Y, Yu Y. 2018.** Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of *Camellia sinensis* in response to salt stress. *Plant Growth Regul* 84: 481–492.
- Wang L, Stegemann JP. 2010.** Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetlytrimethylammonium bromide. *Biomaterials* 31(7): 1612-1618.
- Weidner S, Karolak M, Karamac M, Kosinska A, Amarowicz R. 2009.** Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) under drought stress followed by recovery. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 78(2): 97-103.
- Xalxo R, Keshavkant S. 2019.** Melatonin, glutathione and thiourea attenuates lead and acid rain-induced deleterious responses by regulating gene expression of antioxidants in *Trigonella foenum graecum* L. *Chemosphere* 221: 1-10.
- Zhang L, Zhuang H, Zhang Y, Wang L, Zhang Y, Geng Y, Gou Y, Pei S, Wang Y. 2018.** Plants for health: an ethnobotanical 25-year repeat survey of traditional medicine sold in a major marketplace in North-west Yunnan, China. *Journal of Ethnopharmacology* 224: 119-125.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Effects of salinity stress on the growth, physiological parameters and
genes expression of thymol and carvacrol in *Thymus daenensis*

Foad Fatehi^{1*}, Hamid Mohammadi²

1. Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

2. Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: fatehi.foad@gmail.com

Abstract

Thymus daenensis Celak. is a perennial plant belonging to the family Lamiaceae that contains various monoterpenes such as thymol and carvacrol. In order to investigate the effect of salinity stress on growth, the content of thymol and carvacrol compounds and the expression of genes involved in the biosynthetic pathway of these compounds, an experiment was conducted in the research greenhouse in the form of a randomized complete block design with three replications. The results showed that salinity stress had a significant effect on the studied traits at a 1% probability level. Salinity stress at the level of 150 mM NaCl caused a significant reduction in plant height, fresh and dry weight and increasing of total phenol, flavonoids contents, PAL enzyme activity. The content of thymol and carvacrol in salinity stress significantly increased. Study of the genes expression involved in the biosynthesis of these compounds indicated that the genes expression of DXR, terpenes synthase, α -terpinene synthase and γ -terpinene synthase increased in comparison to control. These increments of increase in gene expression of DXR compared with other studied genes were much higher. Therefore, it can be concluded that the increase of secondary metabolites in *Thymus daenensis*, thymol and carvacrol, in salinity stress conditions due to increased expression of DXR key gene. It is expected to increase these metabolites in the future with its engineering.

Keywords: Carvacrol, Gene expression, Phenolic compounds, Thymol, *Thymus daenensis* Celak.