مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۲۶۰-۲۴۸

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

# تاثیر تنش شوری بر رشد، پارامترهای فیزیولوژیک و بیان ژنهای تیمول و کارواکرول آویشن دنایی

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

فواد فاتحی*[۱]، حمید محمدی[۲]
Foad Fatehi[1*], Hamid Mohammadi[2]

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 دنایی یک گیاه چند ساله متعلق به تیره نعناعیان 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 تاثیر 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 آمونیالیاز (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 رداکتوایزومراز (DXR)، ترپین سینتاز، آلفا-ترپینن سینتاز و گاما-ترپینن 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 دنایی در شرایط تنش شوری عمدتا 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 دنایی،
تیمول،
کارواکرول،
بیان ژن،
ترکیبات فنولی

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

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

## 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 می شود ( Munns 2008). آویشن (*Thymus. sp*) یکی از بزرگ‌ترین جنس‌ها در خانواده‌ی نعناعیان است. در حال حاضر، ۲۱٤ گونه و ۳٦ 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 دنایی 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 دنایی 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 داروئی 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



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

باعث فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (Nabavi *et al.* 2015) و همچنین مطالعات بسیار اندکی در زمینه تاثیر تنش شوری بر بیوماس، متابولیت‌های ثانویه و مسیر بیوسنتزی آن صورت گرفته است. لذا آزمایشی طراحی شد که هدف از آن تاثیر تنش شوری ناشی از کلرید سدیم با غلظت‌های مختلف بر رشد، محتوای ترکیبات تیمول و کارواکرول و بیان ژنهای آن‌ها بود.

## مواد و روش‌ها

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 استفاده‌شده بر اساس تحقیقات، حاوی کوکوپیت و پرلایت به نسبت ۱ به ۳ (۳:۱) بود. بذرها پس از ضدعفونی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران کشت شد و ٤ ماه پس از کشت، تیمار شوری (شامل سطوح شوری ۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید) به مدت ٤ هفته اعمال گردید. پس از اعمال تنش، صفات ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک اندام هوایی، فنل کل، فلاونوئید، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و درصد تیمول و کارواکرول موجود در عصاره مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. قسمتی از گیاهان جهت بررسی بیان ژن-های مورد مطالعه در فریزر ۸۰- تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

**اندازه‌گیری 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 ٤۰۵، ساخت شرکت هاوشین تکنولوژی کره جنوبی استفاده گردید. بدین منظور، ۰/۵ گرم گیاه خشک آسیاب شده، توزین و در داخل ارلن ۲۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. پس از آن ۱۰ میلی‌لیتر 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 شیشه‌های کوچک تیره رنگ و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**محتوی فلاونوئید کل:** این سنجش به روش Chang و همکاران (2002) انجام شد. به این ترتیب، به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی، ۰/۱ میلی‌لیتر از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه گردید. پس از آن، ۰/۱ میلی‌لیتر از استات پتاسیم ۱ مولار و در پایان ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، جذب آن‌ها در طول موج ٤۱۵ نانومتر اندازه-گیری شد. سپس منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های متفاوت کرستین رسم و در نهایت میزان فلاونوئید معادل کرستین در هر گرم پودر خشک گیاه (mg QUE $g^{-1}$ DW) تعیین گردید.

**محتوی فنل کل:** به ۱ میلی‌لیتر از عصاره متانولی، ۱ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ٦ مولار و ۵ میلی‌لیتر متانول ۷۵ درصد افزوده و در لوله‌های درب‌دار در بن ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت قرار داده شد. سپس در دمای اتاق سرد و پس از آن توسط آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول اخیر در لوله‌های مجزا، ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۲ درصد)، ۱/۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر و ۵۰ میکرولیتر 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 یووی‌دار ( PG Instrument LTD $T80^{+}$ UV/VIS, UK) نسبت به شاهد (معرف فولین- سیکالتو) قرائت گردید. از اسید گالیک به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. از غلظت‌های مختلف اسید گالیک در متانول برای بدست آوردن منحنی استاندارد استفاده گردید. محتوی فنل کل عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه ( mg GAE $g^{-1}$ DW) تعیین شد (Singleton and Rossi 1965).

**سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز:** مقدار ۰/۳ گرم از بافت تازه برگ را توزین کرده و در ٦/۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار (pH=8/8) روی یخ ساییده شد و عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی



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

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

از رسوب جدا شد این محلول حاوی آنزیم PAL است. مخلوطی از یک میلی‌لیتر بافر استخراجی بالا، ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۰/٤ 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 ٦ مولار متوقف گردید . در نهایت، به محلول حاصل ۱۵ میلی‌لیتر اتیل‌استات 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 میلی لیتر 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 آیی 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 ٤۰۰۰rpm) 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 C18(Vertex) دارای اندازه ذرات ۵ میکرومتر طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ٤ میلی‌متر بود. اندازه‌گیری تیمول و کارواکرول در طول موج۲۸۰ 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 عصارها تعیین گردید ( Mišan et al. 2011).

**بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز تیمول:**

**استخراج RNA کل:** برای استخراج RNA کل بافت گیاهی از روش کومزینسکی و ساچی ۱۹۸۷ که مبتنی بر ترایزول 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 به‌مدت 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 به‌ترتیب با ژل آگارز ۱٪ و خوانش اسپکتروفتومتری ۲٦۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتری در دستگاه NanoDrop ( ThermoScientific 2000c, USA) 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*DXR*، *TPSI*، *TPS2*، *TPS5* و ژن کنترل *18srRNA* موردنیاز 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 نرم‌افزارOligo7 (Rychlik, 2007) مورد استفاده قرار



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

گرفت. در نهایت پرایمرهای طراحی شده برای ارزیابی اختصاصی بودن در نرم‌افزار 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<br>Primer name | توالی<br>Sequence (5´-3´) | دمای ذوب<br>Tm (◦C) | اندازه قطعه موردتکثیر<br>Amplicon size (bp) |
|---|---|---|---|
| *DXR*-F | TATGACTTCGAGGCCCTTGTTAAAGAG | 62 | 195 |
| *DXR*-R | TGTATCCAAGGCTTGCCAGAAGG | 62 | |
| *TPS*1-F | GAGGGAAGGCGAAAACACAC | 56 | 140 |
| *TPS*1-R | TCCAGTGAAGAGGGAGATCC | 55 | |
| *TPS*2-F | GCTGAAGAGAGGGGACGTG | 59 | 103 |
| *TPS*2-R | CTCCCGCAGCAGATACTTCAC | 60 | |
| *TPS*5-F | GATACAAATGCGTCGGAGGAGG | 61 | 133 |
| *TPS*5-R | CTGTAGCCTCCACCACTTGTTC | 60 | |
| *18srRNA*-F | ATGTTTAGAAGGGTGAGTGAGCAGTTTAC | 59 | 191 |
| *18srRNA*-R | GCCTCATCATCATACTCTTCCTCATCATC | 60 | |

**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، مدت‌زمان لازم برای بسط قطعه، غلظت $MgCl_2$ و سایر عوامل مؤثر بر تکثیر بهینه گردید و شرایط بهینه بدست‌آمده در دستگاه StepOne Real Time PCR (ABI, USA) اجرا گردید.

واکنش تکثیر این ژن‌ها به‌صورت ۱۰ دقیقه واسرشته سازی اولیه و ٤٠ چرخه (با دمای واسرشته سازی اولیه ۹٤ 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 نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات با نرم‌افزار SAS (ver. 9.2) انجام شد، مقایسه میانگین تیمارها نیز به روش آزمون PLSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. داده‌های به دست آمده از آنالیز بیان ژن با استفاده از روش دلتا Ct ($\Delta\Delta$Ct) تصحیح‌شده 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.

## نتایج و بحث

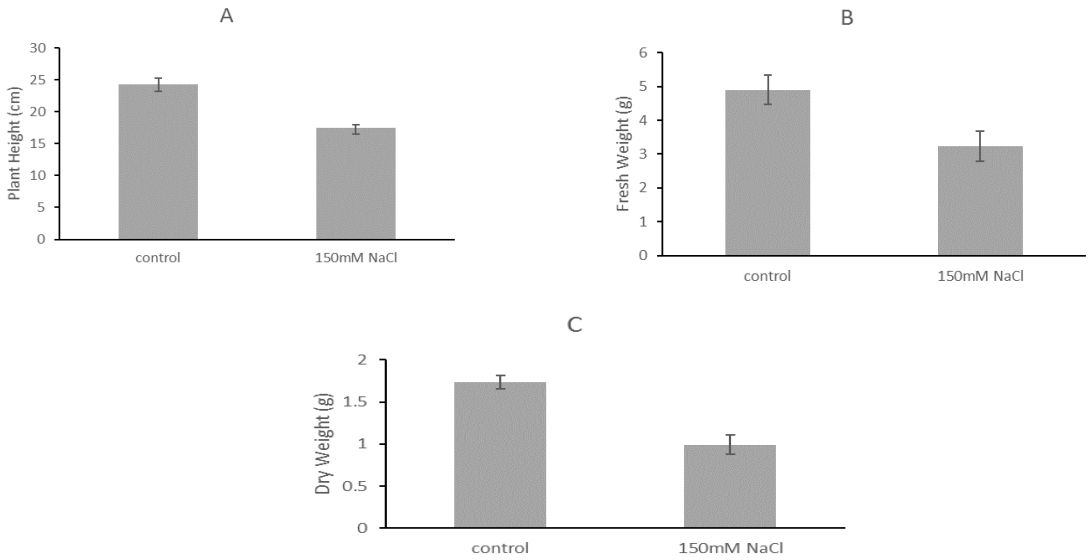
**صفات مورفولوژیک:** نتایج نشان داد ارتفاع بوته آویشن دنایی درشرایط تنش شوری کاهش یافت (شکل ۱). میزان کاهش در ارتفاع بوته در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد ۲۷/۸ درصد بود. همچنین کاهش ۳٤/۰۱ و ٤۲/۹۹ درصدی به ترتیب در وزن تر و خشک بوته در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۱). مطالعات نشان داده که 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 آمونیالیاز:** داده‌ها نشان داد افزایش قابل توجهی در غلظت فنل کل در گیاهان تحت تنش شوری در مقایسه با شاهد وجود دارد (شکل ۲).



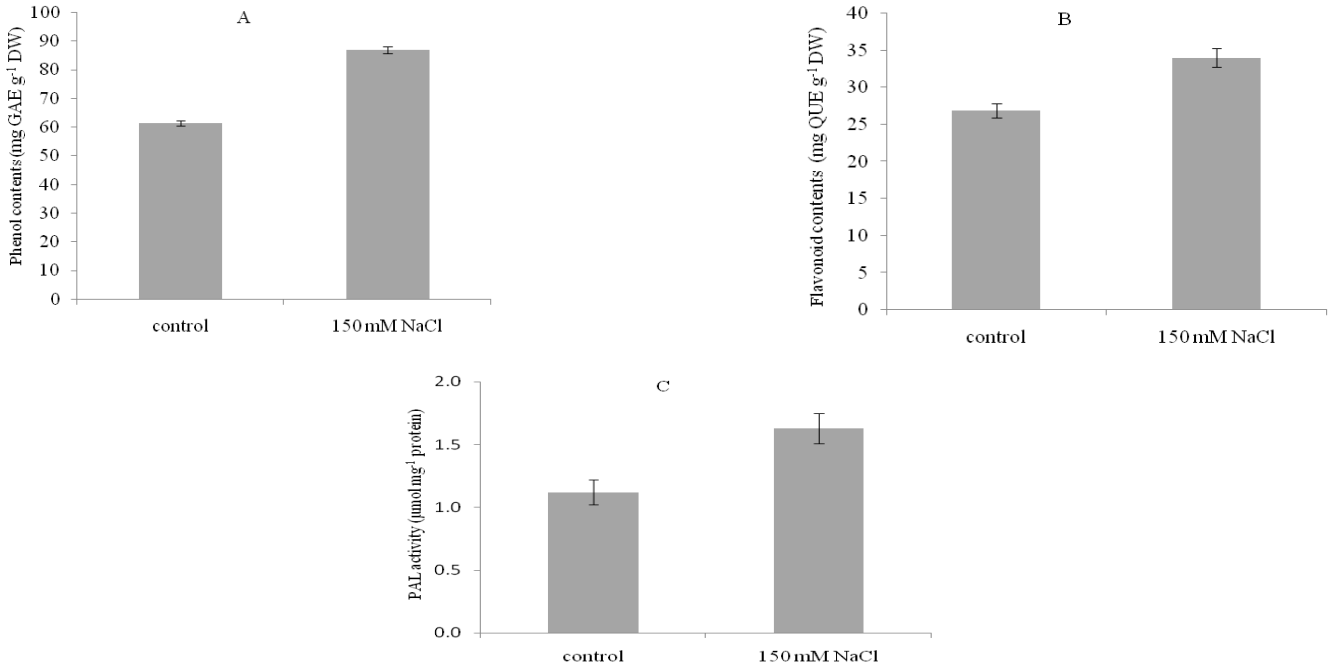
[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]




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

این افزایش می‌تواند منجر به بهبود سیستم آنتی‌آکسیدانتی 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 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



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

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

نتایج نشان داد فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (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 کربوهیدارت‌ها، و یا افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در گیاهان باشد (Ghadyeh Zarrinabadi et al. 2019). به‌طور معمول ترکیبات فنلی توسط مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می‌شوند، که در آن آنزیم PAL نقش کلیدی در تغییر متابولیت‌های اولیه برای تولید متابولیت‌های ثانویه بازی می‌کند (Darvizheh 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 qRTPCR 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 تاثیر بر مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه گیاهان داروئی 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 اخیرا شناسایی شده است (Crocoll 2011). تیمول و کارواکرول به عنوان مونوترپن‌های فنولی از دی‌متیل آلیل دی‌فسفات (DMAPP) و ایزوپنتنیل دی‌فسفات (IPP) سنتز می‌شوند که به ترتیب از طریق مسیرهای موالونیک اسید (MVA) و متیل اریتریتول-٤-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 مرحل انتهایی که منجر به بیوسنتز تیمول می‌شوند شامل ترپین سینتاز، گاما ترپینن 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 کنترل کننده 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 زایلو-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 اصلی‌ترین پیش‌ماده مونوترپن‌ها را کاتالیز می‌کند (Lichtenthaler 1999; Cheng *et al.* 2007).

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

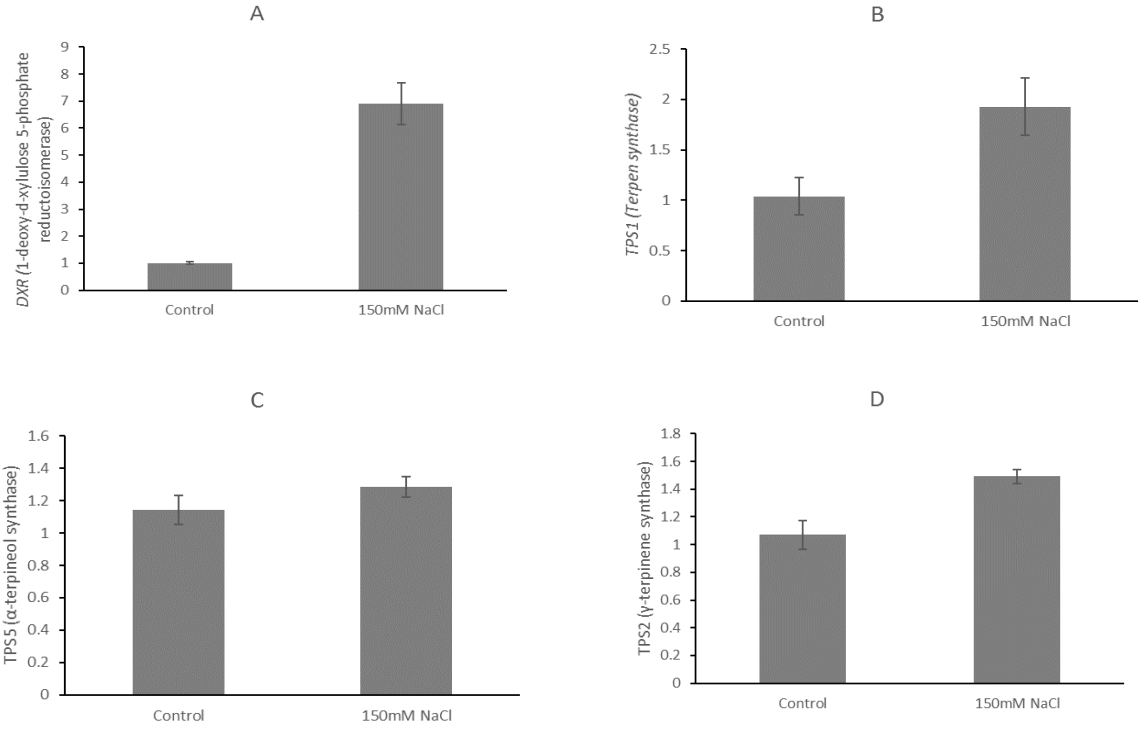
نتایج بیان ژن آلفا و گاما ترپینن سینتاز نشان داد شوری ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به ترتیب افزایش اندک (۱۲/۲۸ درصد) و زیاد (۳۹/۳۵ درصد) در بیان ژن‌های آلفا و گاما ترپینن سینتاز نسبت به شرایط شاهد نشان داد (شکل ۳). با توجه به اینکه در مسیر بیوسنتزی تیمول، ژرانیل پیروفسفات به آلفا پینول تبدیل شده و این ترکیب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



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

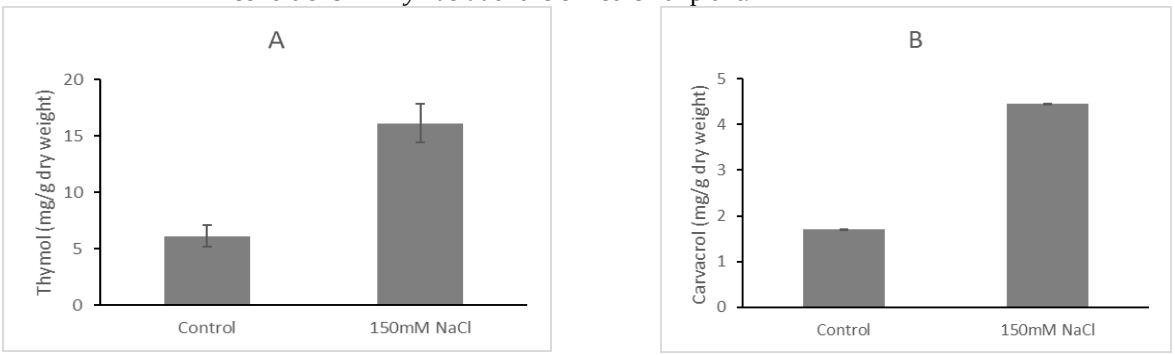
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

طریق حلقوی کردن GPP منجر به تولید گاما-ترپینن می‌شود. به علاوه آنزیم‌های متعلق به خانواده سیتوکروم P450 مونواکسیژناز نیز در تبدیل‌های بعدی گاما-ترپینن 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 CYP71D 17 8 تولید می‌شود در حالی‌که کارواکرول از طریق CYP 71D17 80و CYP 71D1081 سنتز می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد تولید تیمول از طریق p-cymene و گاما-ترپینن صورت می‌گیرد (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 طوری‌که مطالعات Mendes و همکاران (۲۰۱۳) مشخص نمود که سطوح رونوشت‌برداری آلفا ترپینن سینتاز در شاخساره‌های *Thymus caespititius* بالا بود.




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

**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 ٤- مقایسه میانگین محتوای تیمول (A) و کارواکرول (B) تحت شرایط تنش شوری در گیاه داروئی آویشن دنایی.

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



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

**بررسی محتوای تیمول و کارواکرول:** نتایج آزمایش حاضر نشان داد محتوای تیمول آویشن دنایی در شرایط تنش شوری در مقایسه با شرایط بدون تنش شوری افزایش ۱۶۳/۳٤ درصدی داشت (شکل ٤). همچنین افزایش ۱٦۲/۲۰ درصدی در محتوای کارواکرول در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ٤). مطالعات متعددی نشان می‌دهد محتوای اسانس و در نتیجه بیوسنتز تیمول و کارواکرول 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 نهایتا 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 نموی، شرایط فصلی خاص، قابلیت دسترسی مواد غذایی قرار می‌گیرد که در این بین، شرایط تنش مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه است (Liang *et al.* 2019). این ترکیبات ممکن است تعدادی فعالیت بیولوژیکی نیز داشته باشند (Zhang *et al.* 2018). کشت گیاه داروئی زمانی اقتصادی است که مقدار متابولیت‌های اولیه و ثانویه آن در حد مطلوب باشد. تنش‌های غیر زیستی باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهان داروئی 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 نعناع (Aziz *et al.* 2008)، ریحان (Ashraf and Orroj 2006) باعث کاهش در محتوای اسانس‌ها بویژه مونوترین‌ها 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 کارواکرول افزایش ولی γ-trepine در 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 اسیمیلاسیون خالص یا توزیع اسیمیلاتها در طول فرایندهای رشد و تمایز باشد. گاهی اوقات، کاهش در متابولیسم اولیه گیاهان در طول تنش می‌تواند منجر به تجمع محصولات واسط ویژه شود که این ترکیبات حد واسط 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 بازداری 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 بیوسنتزی تیمول و کارواکرول، بیان ژن در شرایط تنش شوری در مقایسه با شرایط بدون تنش بالاتر بود که این نشان می‌دهد موقعی‌که 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 کارواکرول در گیاه آیشن دنایی داشته باشد که افزایش میزان آن در شرایط تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار نیز دلیلی بر این مدعاست. بنا بر نتایج بدست آمده آویشن دنایی توانایی رشد در زمین‌های با شوری متوسط جهت تولید عملکرد بیولوژیکی و متابولیکی قابل قبول را دارا می باشد.



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

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

## 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 Biochemistry162: 156-159.

**Crocoll C, Asbach J, Novak J, Gershenzon J, Degenhardt J. 2010.** Terpene synthases of oregano (Origanum vulgare L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. Plant Molecular Biology 73(6): 587-603.

**Crocoll C. 2011.** Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases 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 theNucleic 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), maliondialdehyde (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



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

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−ΔΔCT 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 caespititius. 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.



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

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

**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, Amarowixz 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.

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

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]

**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 Mohammadi[2]

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.

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

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.9.4 ]