زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هفتم، شماره بیست و ششم، زمستان ۱۳۹۴، صفحه ۴۱-۵۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۷/۲۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۴/۰۸/۲۴
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۹/۰۱

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های آویشن (*Thymus vulgaris*) تحت تنش شوری در شرایط کشت درون‌شیشه

رؤیا رضوی‌زاده * و نسیم محققیان
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

چکیده

شوری از عوامل مهم محدودکننده رشد گیاهان و تهدید کننده پایداری کشاورزی در مناطق وسیعی از جهان است. به نظر می رسد ارزیابی گیاهان دارویی ارزشمند از نظر غذایی، دارویی و بهداشتی نظیر گیاه آویشن، تحت تنش شوری، به عنوان تلاش‌های تحقیقاتی با هدف کشف مزایای اقتصادی یا بهداشتی، ضروری است. مطالعه حاضر، به منظور بررسی اثر شوری بر شاخص‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه در یک گونه آویشن (*Thymus vulgaris*) در شرایط کشت درون‌شیشه طراحی شد. گیاهچه‌های آویشن حاصل از کشت بذرهای آویشن، چهار هفته پس از رشد در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد و در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد، به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) منتقل شدند و ۲۵ روز پس از واکشت شاخص‌هایی نظیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مواد مؤثره دارویی در گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد. ۲۵ روز پس از تیمار شوری، مقدار کلروفیل‌های a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئید و پروتئین محلول کل در گیاهچه‌ها با افزایش غلظت نمک کاهش معنی‌داری یافت، در حالی که افزایش کربوهیدرات‌ها، پرولین و فنل‌ها را به طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین، تنش شوری موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد. نتایج GC-MASS نشان داد تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهچه‌های آویشن تحت تأثیر شوری دچار تغییرات عمده‌ای گردید. با افزایش شوری میزان پی-سیمن و گاما-ترپینن افزایش و میزان تیمول کاهش یافت. به طور کلی، مشاهده شد که تنش شوری با تغییر در شاخص‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و میزان تولید مواد مؤثره گیاه آویشن می‌تواند سبب تغییر در ارزش و خواص دارویی آن گردد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، آویشن، کشت درون‌شیشه‌ای، تنش شوری، متابولیت‌های ثانویه

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: razavi.roya@gmail.com، شماره تماس: ۰۳۳۱۲۷۲۷۱۲۱

Copyright©2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

انتقال بسیاری از بیماری ها از طریق غذا، محصولات آرایشی و بهداشتی است، لزوم اطمینان از ایمنی و سلامت این مواد از یک سو و ترجیح مردم به استفاده از محصولات طبیعی یا برخاسته از طبیعت از سویی دیگر، سبب شده است تا افزایش تقاضا در استفاده از منابع طبیعی در صنایع مختلف غذایی، دارویی، آرایشی، بهداشتی و غیره به جای فرآورده‌های سنتتیک و مصنوعی در صنعت نگهداری غذا یا مصارف دارویی، پزشکی، آرایشی و بهداشتی از اهمیت بسیاری برخوردار گردد. این موضوع، اهمیت مطالعه در مورد نگهدارنده‌های طبیعی، که منبع عمده آنها متابولیت‌های ثانویه یا مواد مؤثره به دست آمده از گیاهان دارویی است و تغییر در میزان تولید این مواد تحت تأثیر شرایط مختلف محیطی را بیشتر نشان می‌دهد. در نتیجه، امروزه پژوهش ها برای یافتن جانشینی برای داروهای فعلی نظیر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌سرطان‌ها و بررسی داروهای سنتی مانند گیاهان دارویی شدت یافته است و به عبارتی، گیاهان دارویی از اقبال عمومی بهرمند شده‌اند. بسیاری از گونه های گیاهان منبع بزرگی از مواد فعال زیستی در کره زمین هستند به طوری که پیش از معرفی داروهای شیمیایی، انسان برای حفظ سلامتی خود، از گیاهان شف بخش استفاده می نمود. گیاه آویشن با نام علمی *Thymus vulgaris* یکی از شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی است که در کشورهای آسیایی و اروپایی مصارف متنوعی در طب سنتی، صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی دارد (Rustaiyan *et al.*, 2000). این گیاه با دارا بودن متابولیت‌های ثانویه و روغن‌های ضروری نظیر مونوترپن‌های فنلی از جمله: تیمول و کارواکرول که ایزومر تیمول است، پیش سازهای هیدروکربنی مونوترپنی مانند پی-سیمن و گاما-ترپنین، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار مانند لینالول و بورنئول، کامفن و ... دارای خواص غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی فراوانی است که می توان خواص: ضد سرطان، ضد اسپاسم، ضد نفخ، معرق، ضد عفونی کننده، خلط آور، آرام‌بخش بودن، خوشبو کننده، طعم‌دهنده و دافع حشرات را نام برد (Soto-Mendivil *et al.*, 2006؛ Wong *et al.*, 2006؛ Nakamura *et al.*, 2010؛ Zarrini *et al.*, 2010). تنش‌های محیطی زیادی نظیر: تغییرات گسترده آب و هوایی کره زمین، بروز خشکسالی و تشدید تنش شوری، بر بهره وری محصولات زراعی و سنتز متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی تأثیر می‌گذارند و ارزش دارویی گیاهان دارویی تولیدکننده آنها را تغییر می‌دهند (Sudha and Ravishankar, 2003). گزارش‌های متعدد تأییدکننده بر تأثیر تنش های محیطی، مواد معدنی مانند کلسیم و نیتریک اکسید یا فیتوهورمون‌هایی مانند آبسزیک اسید (ABA)، سالیسیلیک اسید (SA)، پلی‌آمین‌ها (polyamines) و جاسمونیک اسید (JA) بر سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان موجود است (Bennett and Wallsgrove, 1994؛ Ravishankar and Rao, 2000؛ Tuteja and Sopory, 2008؛ Esmaeilzadeh Bahabadi and Sharifi, 2013). با توجه به تأثیرپذیری گیاهان از عوامل محیطی، شرایط و میزان سنتز و تجمع ترکیبات ثانویه ممکن است در طول زندگی گیاه دست خوش تغییر گردد. شوری و حضور غلظت بالایی از کلرید سدیم و نمک های دیگر، به عنوان یکی از تنش‌های مخرب محیطی باعث بروز

طیف گسترده‌ای از آشفتگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مانند کم آبی سلولی و حذف آب از سیتوپلاسم و در نتیجه کاهش حجم می شود که تنش اسمزی و سمّیت یونی را به دنبال دارد و بر اساس مطالعات صورت گرفته، تغییر در میزان متابولیت های ثانویه خاص مانند پلی آمین ها و فنل ها و یا بسیاری دیگر از مواد (Navarro *et al*., 2006؛ Mutlu and Bozcuk, 2007) را به دنبال داشته است. همچنین شوری با کاهش انتقال الکترون، به تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) منجر می‌شود که می تواند باعث آسیب های اکسیداتیو قابل توجهی به رنگیزه‌های گیاهی از جمله کلروفیل و درشت مولکول‌هایی مانند نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و غشای لیپیدی گردد (Ashraf, 2009).

گیاهان از سازوکارهای مختلف فیزیولوژی و بیوشیمیایی برای بقای خود در خاک های شور استفاده می کنند که از آنها می‌توان به تعادل و انتقال یون‌ها، جذب یون ها، سنتز املاح محلول و اسمولیت ها نظیر کربوهیدرات‌های محلول (Munns and Tester, 2008)، فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) (James *et al*., 2011) و سنتز پلی‌آمین‌ها نظیر پرولین (Rahnama *et al*., 2010) اشاره کرد. از آنجا که شدت آسیب های وارد شده به گیاهان در اثر شوری و تنش اکسیداتیو به عنوان تنش ثانویه و همراه با شوری، در میان گونه های مختلف گیاهی، اندام های گیاهی یا در مراحل مختلف رشد متفاوت است، عملکرد گونه های مختلف گیاهی در میزان سنتز و تجمع این ترکیبات آلی و تغییر در ظرفیت و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در پاسخ به شوری می‌تواند متفاوت باشد (Abraham *et al*., 2011). بنابراین، لازم است بهبود تحمل به شوری در گیاهان با توسعه روش های جدید مانند کشت بافت گیاهی مورد بررسی قرار گیرد.

کشت بافت گیاهی، شرایط کنترل شده و مستقل از تغییرات محیطی و عوامل طبیعی را برای رشد سریع تر گیاه و تولید و بازدهی بیشتر در سطح کمتر، در سیستم در شیشه و در تمامی طول سال مهیا می سازد که این مزیت برای کشت بسیاری از گیاهان که در طبیعت تنها در فصول خاصی وجود دارند دارای اهمیت بسیاری است. از سوی دیگر، روش کشت بافت تاکنون در بررسی مسیرهای بیوسنتزی، بیوشیمیایی و آنزیمی، متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات مؤثر دارویی و مهم گیاهان، اثر عوامل مختلف همچون تنش‌های زیستی و غیرزیستی کاربرد زیادی داشته است. کشت‌های درون‌شیشه‌ای برای ارزیابی مقاومت به شوری در بسیاری از گونه های دارویی مفید است که در نهایت به انتخاب صفات مطلوب در سلول و باززایی به گیاهان برتر منجر می‌شود (Rai *et al*., 2011).

آویشن یک گیاه آروماتیک است که به دلیل داشتن روغن های ضروری مانند تیمول و سایر مواد مؤثره دارای خواص دارویی فراوانی است و در صنایع آرایشی و بهداشتی نیز کاربرد فراوانی دارد. با توجه به گستره وسیع تأثیرگذاری تنش شوری در خاک های کشور، مطالعه حاضر از یک سو با هدف بررسی میزان تحمل به شوری گیاه آویشن در شرایط کشت در شیشه و همچنین بررسی اثر تنش شوری بر شاخص‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و آنزیم های آنتی اکسیدان در

گیاهچه‌های آویشن انجام شده است و از سوی دیگر، سطح تغییرات متابولیت‌های ثانویه در گیاهچه‌های آویشن و تغییر ارزش دارویی این گیاه در پاسخ به حضور نمک، با استفاده از روش GC-MS، در شرایط کشت درون‌شیشه بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه در شرایط درون‌شیشه: بذرهای آویشن پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس چندین بار شستشو با آب مقطر استریل، روی محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۷ گرم در لیتر آگار با اسیدیته معادل ۵/۸ به منظور جوانه‌زنی قرار گرفتند. سپس محیط‌های کشت حاوی بذرها در اتاقک رشد در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند تا بذرها جوانه زده و رشد کنند. ۴ هفته پس از کشت، گیاهچه ها به محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) منتقل شدند. ۲۵ روز پس از واکشت گیاهچه‌ها در محیط‌های تحت تیمار شوری، شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی متعدی از قبیل: میزان پرولین، کلروفیل، کاروتنوئید، فنل و قندهای محلول، مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز و متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره دارویی در گیاهچه‌های آویشن اندازه‌گیری شدند.

سنجش کلروفیل و کاروتنوئید: به منظور سنجش کلروفیل و کاروتنوئید، ۰/۰۵ گرم از نمونه های برگی در ۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد همگن و سانتریفیوژ شد. سپس، ۱۰ میلی لیتر استون اضافه شد تا محلول به حجم ۱۵ میلی‌لیتر برسد و با انتقال ۳ میلی‌لیتر از عصاره نمونه ها به کووت، جذب خوانی در میلی گرم بافت مورد نظر در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر انجام شد و در نهایت، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب گرم وزن تر محاسبه شد (Lichtenthaler, 1987).

سنجش پرولین، پروتئین، فنل و قندهای محلول: برای سنجش پرولین، نمونه‌های تر وزن شده در ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد همگن و سانتریفیوژ شد. ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین (۱۲۵ میلی گرم نین هیدرین، ۲۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۶ مولار و ۳۰ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال) به نمونه‌ها افزوده شده، به مدت یک ساعت در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. با افزودن تولوئن به نمونه ها و جداسازی محلول رویی، شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Bates *et al*., 1973).

برای اندازه گیری فنل، ۰/۱ گرم نمونه های تر توزین و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد جوشانده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. ۵ میلی لیتر محلول فوقانی جدا شد. به ۲/۵ میلی لیتر از این محلول ۲/۵ میلی لیتر فولن رقیق شده با آب (۳:۱)و ۵ میلی لیتر کربنات سدیم اشباع، افزوده شده، به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی نگه داشته شد. پس از آن، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ g

سانتریفیوژ شد.میزان جذب محلول نمونه‌ها در طول موج ۶۴۰ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد. رسم منحنی استاندارد با استفاده از کاتکول در غلظت‌های مختلف ۰، ۲، ۴،۶، ۸ و ۱۰ میلی‌لیتر و غلظت فنل بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه شد (Matta and Giai, 1969).

برای سنجش مقدار قندهای محلول پس از تهیه معرف آنترون با حل کردن ۰/۵ گرم آنترون در ۵۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۹۵ درصد، ۰/۵ گرم از نمونه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه همگن و سانتریفیوژ شد. سپس به ۴ میلی لیتر از محلول رویی ۸ میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد و جذب نوری آنها در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل U-100، شرکت Shimadzu، ساخت ژاپن) خوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از گلوکز رسم شد و تعیین میزان قند بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید (Yemm and Willis, 1954).

برای سنجش پروتئین‌ها، ۰/۱ گرم بافت برگ در ۴ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (اسیدیته=۷/۲) به همراه ۰/۱ گرم پلی وینیل پلی پیرولیدین (PVP) در هاون ساییده و سانتریفیوژ گردید. جهت اندازه‌گیری پروتئین‌ها با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) از محلول رویی استفاده شد. جذب عصاره‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد پروتئین‌ها با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) رسم انجام شد. میزان پروتئین محلول کل بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه شد.

فعالیت سنجی آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز: مقدار ۰/۱ گرم از بخش هوایی توزین و درون هاون روی یخ قرار داده شد و ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر نمک‌های فسفات حاوی PVP با اسیدیته برابر ۷/۴ به آن افزوده شد. بافت مورد نظر در هاون ساییده شد. بافت‌های عصاره‌گیری شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند.

در سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز، محلول واکنش شامل ۶۲۵ میکرولیتر بافر فسفات حاوی EDTA، ۱۷۵ میکرولیتر آسکوربیک اسید، ۵۰ میکرولیتر H_2O_2، ۵۰ میکرولیتر BSA و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش مقدار فعالیت آنزیمی یک دقیقه پس از افزودن عصاره آنزیمی به محیط واکنش انجام شد و کاهش جذب طی ۲ دقیقه از واکنش در ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز با استفاده از ضریب جذب مولی آسکوربیک اسید (۲/۸ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر) محاسبه شد (Nakano and Asada, 1981).

بررسی میزان فعالیت کاتالاز با بررسی کاهش مقدار H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر برای یک دقیقه انجام شد. مخلوط واکنش شامل: بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیته=۷)، ۱۵ میلی‌مولار H_2O_2 و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در یک حجم ۳ میلی‌لیتر بود. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی مولی ۰/۰۳۹ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه و بر حسب یک واحد (میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه) به ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد (Aebi, 1984).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس بازدارندگی آنزیم SOD از احیا نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) اندازه‌گیری شد. در این روش، مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته=۱۰/۲)، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۶۳ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۱/۳ میکرومولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که با آب مقطر به حجم ۳ میلی‌لیتر رسید. واکنش با برداشتن فویل آلومینیومی و قرار دادن نمونه‌ها در مقابل نور (5000 LUX) آغاز گردید. پس از ۱۵ دقیقه نور قطع شده و بلافاصله جذب نمونه ها در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقداری از آنزیم است که موجب ۵۰ درصد ممانعت احیای NBT در ۵۶۰ نانومتر می شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (Giannopolitis and Ries, 1977).

اندازه گیری مواد مؤثره اسانس با دستگاه گاز کروماتوگراف جرم‌سنجی: بدین منظور، از دستگاه گاز کروماتوگراف (مدل HP-5890، شرکت Hewlett-Packard، ساخت آمریکا) دارای سیستم تله یونی استفاده شد که در آن انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و درجه حرارت ۲۵۰ درجه سانتیگراد برای تولید منبع یون تنظیم گردید. رقیق کردن نمونه‌ها با روش شکافت با نسبت ۱:۱۰۰ انجام شد. ستون مویینه به طول ۵۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۰ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۲۵ میکرومتر و ذرات از جنس متیل سیلیکون کراس لینک بود. شناساگر از نوع انتخابگر جرمی (دستگاه MS، مدل HP-5890، شرکت Hewlett-Packard، ساخت آمریکا) بود. برنامه حرارتی از ۱۰۰ تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد با تغییرات ۴ درجه در دقیقه استفاده شد. از هلیم فوق خالص با سرعت عبور ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و درجه حرارت ۲۵۰ درجه سانتیگراد برای تولید منبع یون تنظیم شد. شناسایی هر ترکیب بر اساس زمان بازداری و جرم ثبت شده آنها انجام شد (Davies, 1990؛ Li *et al*., 2009).

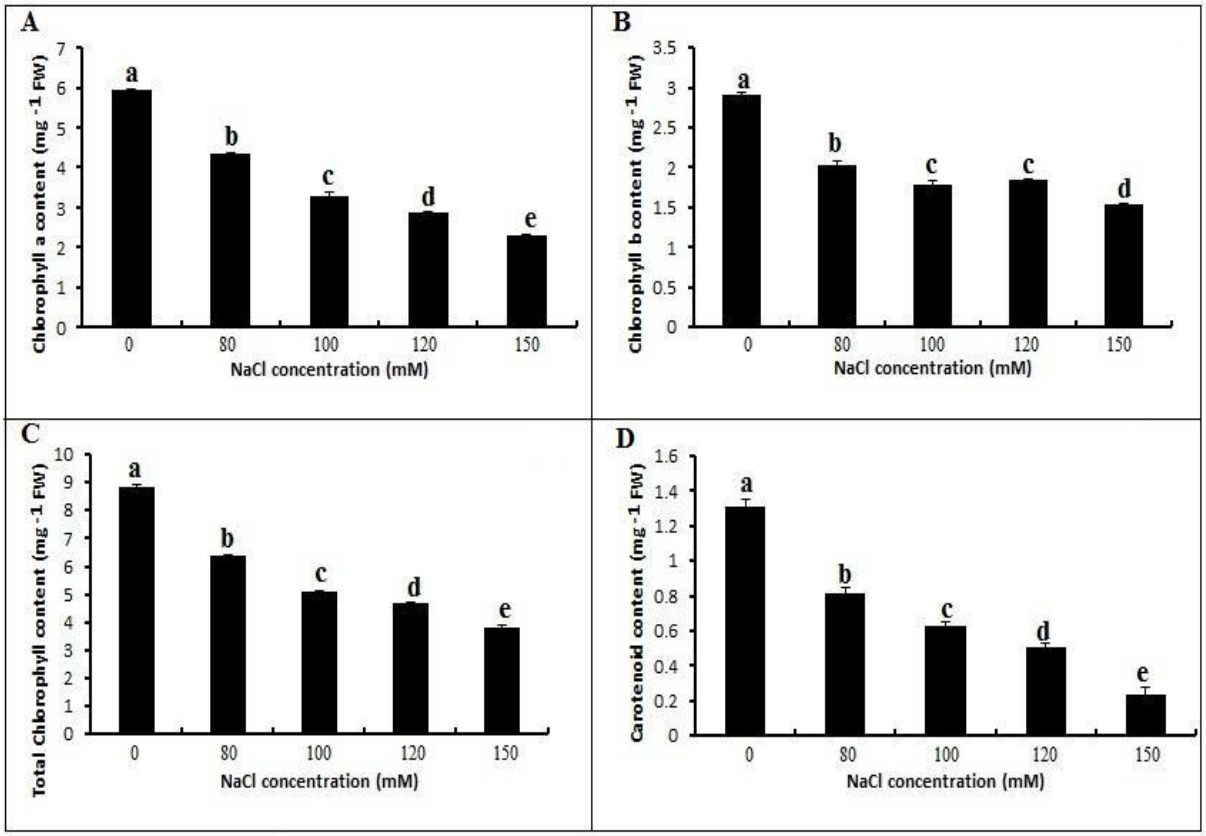
تحلیل داده‌ها: تمام آزمایش‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گرفت. مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $P\leq0.05$ محاسبه گردید.

نتایج

اثر تنش شوری بر شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهچه‌های آویشن

تأثیر تنش شوری بر سنتز کلروفیل و کاروتنوئید: تغییرات مشاهده شده در میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در گیاهچه های آویشن تحت تأثیر تنش شوری در شکل نشان ۱ داده شده است. افزایش غلظت نمک در محیط کشت، باعث کاهش معنی‌دار کلروفیل‌های a و b در گیاهچه‌های آویشن در مقایسه با شاهد شد (شکل ۱-A و B). در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار نمک طی ۲۵ روز سطح کلروفیل در گیاهچه‌های آویشن به کمترین میزان رسید. میزان کلروفیل کل در گیاهچه‌های آویشن کشت شده در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نمک نسبت به گیاهچه های شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد و در تیمار

۱۵۰ میلی‌مولار نمک به کمترین مقدار رسید (شکل ۱-C). همچنین، افزایش غلظت نمک در محیط کشت باعث کاهش میزان کاروتنوئید در مقایسه با شاهد و نیز در مقایسه با سایر غلظت‌های نمک گردید (شکل ۱-D).



شکل ۱- تأثیر تنش شوری بر غلظت کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئید (D) در گیاهچه‌های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P<0.05$ است.

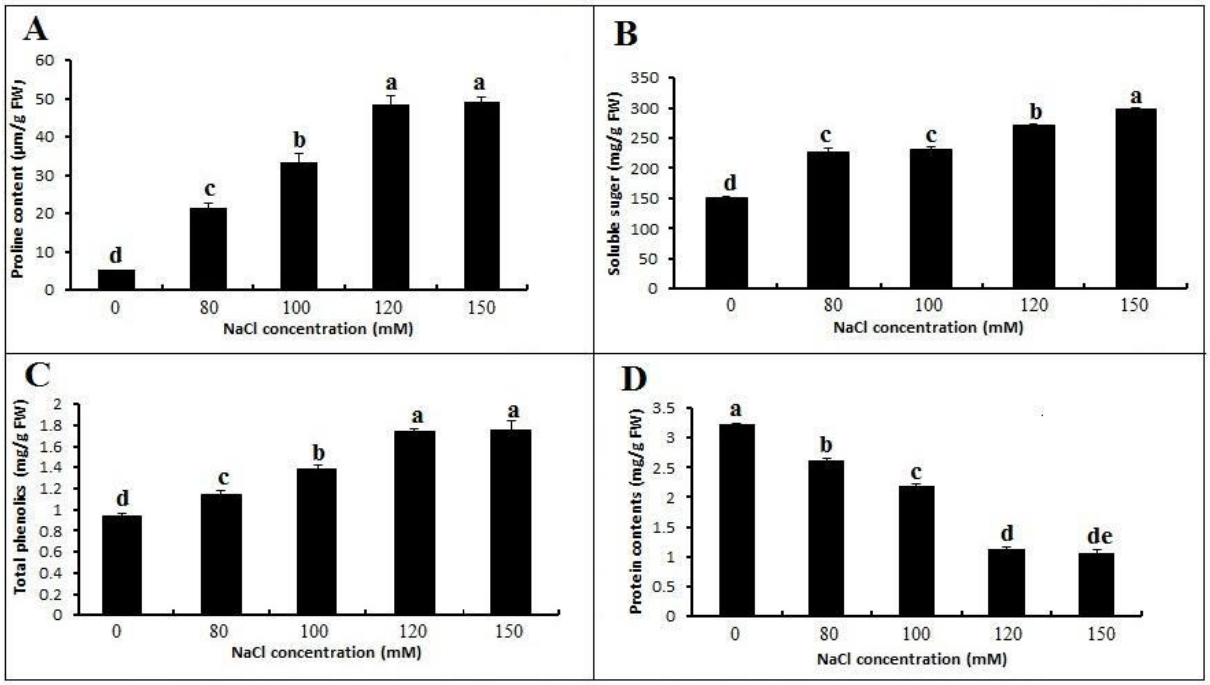
اثر تنش شوری بر سنتز پرولین، فنل، قندهای محلول و پروتئین: افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار در محیط کشت MS، میزان پرولین را در گیاهچه‌های آویشن به طور معنی‌داری افزایش داد (شکل ۲-A)، به طوری که بیشترین میزان تولید و تجمع این اسمولیت، ۲۵ روز پس از کشت در غلظت‌های ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک و کمترین مقدار در گیاهان شاهد مشاهده گردید.

نتایج اندازه‌گیری قندهای محلول نشان داد که طی ۲۵ روز پس از کشت، افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار در محیط کشت MS، باعث افزایش معنی‌دار میزان قندهای محلول در گیاهچه‌های آویشن نسبت به گیاهان شاهد و نیز در مقایسه سطوح مختلف تیمار با یکدیگر گردید و به طور کلی، با تشدید تنش شوری، سنتز قندهای محلول افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲-B).

شکل ۲-C نشان‌دهنده تأثیر غلظت‌های مختلف نمک بر سنتز فنل‌ها در گیاهچه‌های آویشن است. مشاهده شد که ۲۵ روز پس از کشت با افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار، سنتز فنل‌ها در

گیاهچه های آویشن نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی داری افزایش یافته است. به طور کلی، با تشدید تنش شوری، سنتز فنل ها افزایش معنی‌دار داشت و گیاهچه‌های آویشن در ۱۵۰ میلی‌مولار نمک از تمام ظرفیت خود در سنتز فنل‌ها استفاده کرده‌اند.

شکل ۲-D نشان‌دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌دار در محتوای پروتئین در گیاهچه‌های آویشن کشت شده در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف نمک در مقایسه با گیاهان شاهد و نیز در مقایسه سطوح مختلف تیماری با یکدیگر است. ۲۵ روز پس از کشت بیشترین میزان پروتئین در گیاهچه های آویشن کشت شده در محیط کشت MS بدون نمک دیده شد. به طور کلی، افزایش غلظت نمک به کاهش میزان پروتئین منجر گردید.



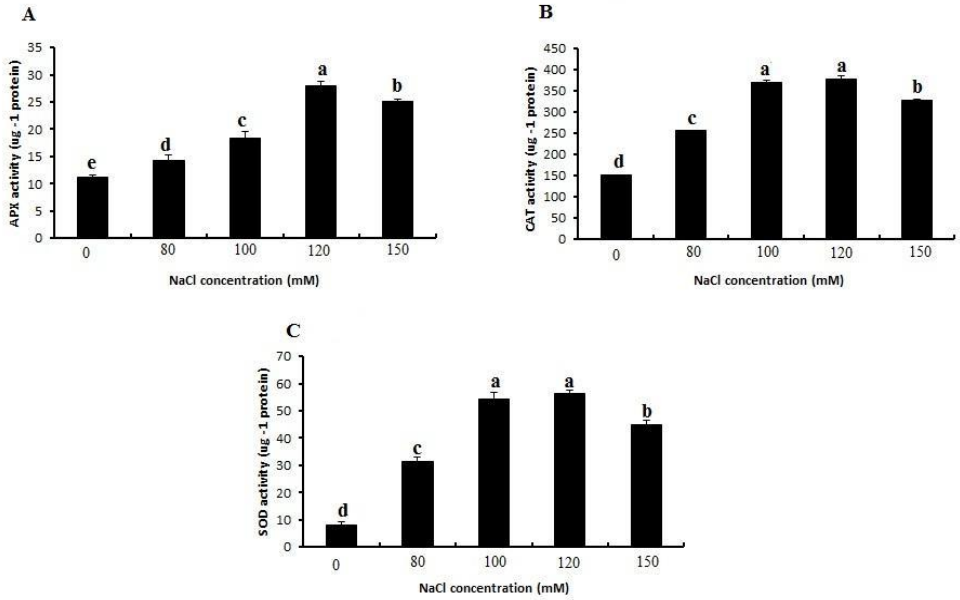
شکل ۲- تأثیر تنش شوری بر غلظت پرولین (A)، قندهای محلول (B)، فنل (C) و پروتئین (D) در گیاهچه‌های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P<0.05$ است.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز تحت تنش شوری: همان طور که در شکل ۳-A نشان داده شده است، طی ۲۵ روز پس از کشت، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه های آویشن با افزایش غلظت نمک تا ۱۲۰ میلی‌مولار در محیط کشت MS، افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد و سایر غلظت های نمک داشت، اما با افزایش غلظت نمک تا ۱۵۰ میلی مولار، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به سطح ۱۲۰ میلی‌مولار کاهش نشان داد.

شکل ۳-B نشان می‌دهد که فعالیت کاتالاز در گیاهچه‌های آویشن کشت شده در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف نمک نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌دار داشته، در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۲۰

میلی‌مولار بیشترین فعالیت را نشان داده است، اما با افزایش میزان تنش در ۱۵۰ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به غلظت ۱۲۰ مشاهده شد.

در شکل ۳-C مشخص است که سطح فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نیز در گیاهچه‌های آویشن، با افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۲۰ میلی‌مولار در محیط کشت MS، طی ۲۵ روز پس از کشت، افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد و در مقایسه با سایر غلظت‌های نمک داشت. اما افزایش بیشتر غلظت نمک به کاهش فعالیت این آنزیم منجر شد. بیشترین سطح فعالیت SOD در ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک، مشاهده گردید.



شکل ۳- تأثیر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (A)، کاتالاز (B) و سوپر اکسید دیسموتاز (C) در گیاهچه‌های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P<0.05$ است.

اثر تنش شوری بر مواد مؤثره اسانس گیاه آویشن: تغییرات ترکیبات اسانس گیاهچه‌های آویشن کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۱۲۰ میلی‌مولار نمک در مقایسه با گیاهان شاهد، طی ۲۵ روز پس از واکشت، با استفاده از GC-MS آنالیز شد (جدول ۱). به طور کلی، در گیاهان شاهد سطح مونوترپن فنلی (تیمول) به مراتب بیشتر از پیش سازهای هیدروکربن مونوترپنی (HC) شامل پی-سیمن و گاما-ترپینن است که در پاسخ به حضور نمک در محیط کشت MS، تنوع الگویی هماهنگی را نشان دادند. در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نمک، میزان آلفا-ترپینولن، آلفا-پینن، آلفا-فیلندرن، میرسن و ۲،۶-دی متیل ۵-۵ هپتانال کاهش یافت که این کاهش در سطح مونوترپن فنلی مانند: تیمول، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار (لینالول و بورنئول)، کامفن قابل توجه بود. در حالی که با اعمال تنش شوری سطح مونوترپن‌های مونوکربنی (پی-سیمن و گاما-ترپینن)، ۱،۷-اکتا دی ان، پارامنتن، ترانس-اوسیمین، منتا-۳،۸-دی انر، ترانس-دی هیدروکارون، کالامنن، گاما-

کادینن، کارواکرول و کارواکرول استات، ترپن ها (به طور عمده بتا-کاریوفیلن)، مشتقات اکسیژن آن (برای نمونه: کاریوفیلن اکسید) در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت. شوری در سطح ۱۲۰ میلی مولار تولید سابینن را به صفر رساند، در حالی که به تولید ماده مؤثره ۲،۴- دی متیل ۲،۴- هپتادین منجر شد. می توان گفت که غلظت بالای نمک در محیط کشت آویشن به افزایش سطح پیش‌سازهای مونوترپن‌های هیدروکربنی (پی-سیمن و گاما-ترپینن) منجر شده در حالی که سطح تیمول را کاهش داده است.

جدول ۱- محتوای نسبی مواد مؤثره اسانس گیاهچه‌های آویشن در غلظت‌های ۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک در شرایط کشت در شیشه

نام ماده	زمان بازداری (دقیقه)	محتوای نسبی (درصد)	
		۰ میلی‌مولار NaCl	۱۲۰ میلی‌مولار NaCl
1,3-Octadiene	۷:۱	۱/۲	۰/۹
1,7-Octadiene	۸:۲	۱/۵	۲/۴
2,4- dimethyl-2,4-heptadiene	۸:۸	-	۱/۸
α-Pinene	۹:۹	۳/۶	۱/۴
Camphene	۱۰:۵	۱/۵	۰/۹
Sabinene	۱۱:۸	۱/۸	-
Para-Menthene-3	۱۳:۱	۱/۴	۳/۶
Myrcene	۱۴:۳	۲/۶	۱/۴
α-Phellandrene	۱۵:۳	۱/۸	۱/۵
2,6-Dimethyl-5-5heptanal	۱۵:۹	۲/۰	۱/۲
α-Terpinene	۱۶:۸	۰/۹	۰/۹
P-Cymene	۱۷:۶	۱۹/۲	۲۱/۹
Gama- Terpinene	۱۸:۹	۱۵/۴	۲۲/۴
Trans-Ocimene	۱۹:۵	۱/۴	۲/۱
Linalool	۲۱:۴	۲/۳	۰/۹
Mentha-3,8-diener	۲۲:۱	۱/۵	۱/۸
α-Terpinolene	۲۵:۲	۲/۵	۱/۴
Para-Cimene	۲۶:۷	۲/۱	۲/۱
Borneol	۲۹:۸	۱/۸	۱/۵
Trance-Dihydrocarvone	۳۳:۵	۰/۹	۱/۶
Thymol methyl ether	۳۴:۷	۱/۱	۲/۰
3,6-Dimethyl-5-5heptanal	۳۵:۸	۱/۳	۱/۴
Thymol	۳۶:۶	۲۶/۱	۱۸/۰
Caevacrol	۳۹:۲	۱/۳	۱/۵
Caevacrol acetate	۴۰:۱	۰/۹	۱/۱
β-caryophyllene	۴۲:۲	۱/۱	۱/۴
Calamenene	۴۳:۵	۰/۸	۱/۰
ɤ-Cadinene	۴۵:۱	۱/۶	۱/۲

بحث

از آنجا که تنش شوری اثر بسیار گسترده ای در گیاهان دارد، نحوه پاسخ دهی گیاه آویشن، به عنوان یک گیاه ارزشمند از نظر دارویی و بهداشتی، نسبت به تنش شوری در شرایط کشت درون شیشه مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان عالی، غلظت و میزان پرولین خود را در پاسخ به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر می‌دهند و تولید زیاد پرولین یک پاسخ وسیع مشاهده شده در گیاهان در مواجهه با انواع تنش‌های محیطی است. در واقع، این اعتقاد وجود دارد که پرولین در ایجاد تحمل به تنش‌ها نقش دارد (Trovato *et al*., 2008؛ Verbruggen and Hermans, 2008؛ Mattioli *et al*., 2009). تجمع اسمولیت‌هایی نظیر پرولین در شرایط تنش شوری در گیاهان متعددی از جمله: نخود (Waheed *et al*., 2006) و ذرت (Chaum and Kirdmanee, 2009) اثبات شده است که می تواند به عنوان یک معیار انتخاب برای ارزیابی مقاوم‌ترین گونه‌ها در نظر گرفته شود (Ahmad *et al*., 2009). در پژوهش حاضر، با افزایش غلظت نمک در گیاهچه های آویشن، سنتز پرولین به طور معنی داری افزایش یافت و در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار به حداکثر رسید. این افزایش ممکن است در اثر افزایش بیان ژن *P5Cs* در پاسخ به شوری باشد به نحوی که افزایش سطح بیان ژن *P5Cs* در *Opuntia streptacantha* (Silva-Ortega *et al*., 2008) به موازات افزایش پرولین در پاسخ به شوری نیز گزارش شده است.

کلروفیل نقش بسیار مهمی در فرآیندهای رشدی گیاهان دارد (Eckhardt *et al*., 2004). بیوسنتز و تخریب کلروفیل تحت کنترل مسیرهای پیچیده سلولی و مولکولی است و این مسیرها توسط عوامل مختلفی تنظیم می‌شوند. فتوسنتز، به عنوان یک مسیر متابولیک مهم در گیاهان عالی و رنگیزه‌های مرتبط با آن یکی از اهداف اصلی مورد تهدید طی تنش شوری محسوب می گردد (Eckhardt *et al*., 2004). محتوای کلروفیل در گیاهچه های آویشن با افزایش غلظت نمک کاهش معنی‌دار یافت و در غلظت بالاتر از ۱۲۰ میلی‌مولار برگ ها دچار نکروز شدند. احتمالاً سمّیت ناشی از کلر در سنتز کلروفیل اختلال ایجاد کرده است. اگر چه هر دو یون سدیم و کلر در بسیاری از اختلالات فیزیولوژیک گیاهان نقش دارند اما سمّیت کلر بیشتر از سدیم است (Tavakkoli *et al*., 2010). گزارش شده است که محتوای کلروفیل در گونه‌های مختلف گیاهی تحت تنش شوری متفاوت است (Bayuelo-Jimenez *et al*., 2012؛ Jamil and Rha, 2013) و در شرایط تنش کاهش می‌یابد که در بسیاری از گیاهان مانند *Stevia rebaudiana* (Rathore *et al*., 2014) و خیار (Zhang *et al*., 2009) گزارش شده است. کاهش کلروفیل و فتوسنتز در واکنش گیاهان به تنش شوری اثبات شده است (Jamil and Rha, 2013). کاهش کلروفیل، ظرفیت فتوسنتزی (واکنش هیل و تثبیت نوری CO_2)، رنگیزه‌های کاروتنوئیدی و فعالیت آنزیم روبیسکو در گیاهچه‌های ذرت نیز تحت تنش شوری مشاهده شده است (Khodary, 2004).

تنش های اکسیداتیو مانند شوری عامل اصلی تولید ROS و دفاع آنتی اکسیدانی هستند که به عدم تعادل و بروز چالش‌های فیزیولوژیکی در گیاهان منجر

می‌شوند (Foyer and Noctor, 2003). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عبارت از فنل‌ها، کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها هستند که در میان این ترکیبات، پلی فنل‌ها به ویژه فلاونوئیدها نقش مهمی در مهار ROS در گیاهان تحت تنش شوری دارند (Navarro *et al*., 2006). افزایش فنل‌ها تحت تنش شوری در بسیاری از گیاهان مانند *Lactuca sativas* (Lee *et al*., 2014) گزارش شده است. در پژوهش حاضر، افزایش غلظت نمک در محیط کشت نیز سطح فنل‌ها را در گیاهچه‌های آویشن افزایش داد.

گزارش های متعددی در مورد اثر شوری بر تجمع قندهای محلول به عنوان پاسخ به تنش شوری یا خشکی در گیاهان مختلف وجود دارد (Murakeozy *et al*., 2003)، این ترکیبات با حفاظت اسمزی (osmoprotection)، ذخیره‌سازی کربن و مهار ROS در کاهش تأثیرات تنش نقش دارند که نقش یک اسمولیت را در تثبیت سلولی غشا و حفظ تورژسانس بازی می‌کند (Jouve *et al*., 2004). در شرایط تنش، در گیاهچه‌های آویشن تحت تنش شوری، میزان قندهای محلول افزایش معنی داری نشان داد. قندها نقش مهمی در سازش ریشه‌ها از طریق تولید پیش‌سازهای لازم برای آنزیم‌های سنتازی، تولید انرژی متابولیک و تنظیم اسمزی ریشه‌ها دارند (Barakat, 2011). انباشته شدن قندها می‌تواند به علت فعال شدن آنزیم‌های بیوسنتزی کربوهیدرات‌ها باشد که این انباشتگی نقش مهمی در کاهش آثار مخرب تنش شوری از طریق تنظیم اسمزی دارد (Ackerson, 1985).

تأثیر منفی تنش شوری بر سنتز پروتئین در شرایط در شیشه در گیاهانی مانند چاودار و سیب‌زمینی تأیید شده است که مطابق با نتایج پژوهش حاضر است. آمینو اسیدهایی مانند سیستئین، آرژنین و متیونین، حدود ۵۵ درصد از کل آمینو اسیدهای آزاد را تشکیل می‌دهند و در زمان مواجهه با تنش شوری کاهش می‌یابند، در حالی که غلظت پرولین در پاسخ به تنش شوری افزایش می‌یابد (Fidalgo *et al*., 2004). فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان یکی از سازوکارهای دفاعی برای مهار سنتز ROS در پاسخ به تنش‌های مختلف زیست محیطی از جمله شوری است (Ashraf and Harris, 2004). گزارش‌های متعددی نیز در ارتباط با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای مهار ROS و افزایش مقاومت به شوری در گیاهان مانند برنج و ذرت ثبت شده است (Sancho *et al*., 1996؛ Gill *et al*., 2013؛ Saxena *et al*., 2013) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

اگرچه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از مسیرهای ژنتیکی تنظیم می شود اما بیوسنتز و عملکرد آنها متأثر از عوامل محیطی نیز هست (Yaniv and Paleitch, 1982؛ Charles *et al*., 1994). بررسی‌های متعدد مشخص کرده است که تغییر در عملکرد اسانس و ترکیبات آنها ناشی از فعالیت آنزیم‌ها و بهبود متابولیسم آنهاست (Hendawy and Khalid, 2005). در مطالعات پیشین از تنش‌های محیطی (درجه حرارت بالا و پایین، خشکسالی، شوری، اشعه فرابنفش و آلودگی پاتوژن‌ها) و محرک های مختلف برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه استفاده شده است(Dixon and Paiva, 1995). مشخص شده است که تنش‌ها و محرک‌ها اثر قابل توجهی در تغییرات سطح فنل ها در کشت بافت داشته اند

(Chalker-Scott and Fnchigami, 1989). مقدار کل متابولیت‌های ثانویه نظیر: آلکالوئیدها، ماده مؤثره و ترکیبات فنلی در اندام‌های هوایی آویشن، نشان‌دهنده ارزش دارویی آن است. با توجه به نتایج جدول ۱ مشاهده شد که بیشترین حضور مواد مؤثره اسانس آویشن به مونوترپن‌های فنلی فعال (تیمول) و پیش‌سازهای هیدروکربنی مونوترپنی مانند پی-سیمن و گاما-ترپینن تعلق دارد. در پژوهش حاضر، تنش شوری به اعمال تغییراتی در میزان تولید و تجمع این ترکیبات منجر شد به طوری که شوری در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار سبب افزایش و کاهش برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهچه های آویشن نسبت به شاهد گردید. با افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۲۰ میلی‌مولار میزان پی‌سیمن و گاما-ترپینن نسبت به گیاه شاهد افزایش و از میزان تیمول کاسته شد. گزارش های متناقضی از تأثیر تنش شوری بر میزان روغن های ضروری در گیاهان دارویی موجود است. برای نمونه، تنش شوری به کاهش این ترکیبات در *Thymus maroccanus* (Belaqziz *et al*., 2009)، *Trachyspermum ammi* (Ashraf and Orooj, 2006) و *Mentha piperita* (Tabatabaie and Nazari, 2007) منجر شده است. این در حالی است که افزایش متابولیت‌های ثانویه و روغن‌های ضروری در *Satureja hortensis* (Baher *et al*., 2002) نیز گزارش شده است. تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه و روغن‌های ضروری تحت تنش شوری یا افزایش مقدار این ترکیبات می تواند به علت افزایش تراکم غدد ترشح‌کننده این ترکیبات یا افزایش تعداد این غدد باشد (Charles *et al*., 1990) یا به کاهش تولید متابولیت‌های اولیه در اثر شوری و در نتیجه در دسترس قرار گرفتن ترکیبات حد واسط برای تولید متابولیت های ثانویه نسبت داده شود (Morales *et al*., 1993). از سوی دیگر، کاهش آنابولیسم گیاهان تحت تنش شوری می تواند کاهش سنتز متابولیت های اولیه و تجمع مواد مؤثره گیاهان را در پی داشته باشد (Morales *et al*., 1993). در هر حال، تغییر در فعالیت آنزیم‌ها و متابولیسم گیاهی در اثر شوری، سطح متابولیت های ثانویه را در گیاهان دارویی دست خوش تغییر می‌نماید (Burbott and Loomis, 1969).

جمع‌بندی

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که تنش شوری و تنش اکسیداتیو ناشی از تیمار غلظت‌های نمک سبب القای پاسخ‌های فیزیولوژیک و افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های آویشن در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌شود که می‌تواند در سازگاری و مقابله گیاهان در برابر شرایط تنش اهمیت داشته باشد. همچنین، تنش شوری به اعمال تغییراتی در میزان تولید و تجمع مواد مؤثره اسانس آویشن منجر گردید. بنابراین، شاید بتوان با تنظیم و بهینه‌سازی شرایط محیطی در شرایط کشت درون‌شیشه در مقاطعی از رشد رویشی گیاه از اعمال تنش شوری به منظور افزایش برخی متابولیت‌ها و مواد مؤثره در آویشن بهره‌برداری نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه پیام نور و قطب تنش‌های گیاهی دانشگاه اصفهان برای همکاری با این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منبع

Abraham, I., Salamo, P., Koncz, C. and Szabados, L. (2011) Identification of *Arabidopsis* and *Thellungiella* genes involved in salt tolerance by novel genetic system. Acta Biologica Szegediensis 55(1): 53-57.

Ackerson, R. C. (1985) Osmoregulation of cotton in response to water stress III, effect of phosphorus fertility. Journal of Plant Physiology 77: 309-312.

Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 105: 121-126.

Ahmad, P., Jeleel, C. A., Azooz, M. M. and Nabi, G. (2009) Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in Plants. Botany Research International 2: 11-20.

Ashraf, M. (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnology Advances 27: 84-93.

Ashraf, M. and Harris, P. J. C. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science 166: 3-16.

Ashraf, M. and 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). Journal of Arid Environment 64(2): 209-220.

Baher, Z. F., Mirza, M., Ghorbanli, M. and Rezaii, M. B. (2002) The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L.. Flavour and Fragrance Journal 17: 275-277.

Barakat, N. A. M. (2011) Oxidative stress markers and antioxidant potential of wheat treated with phytohormones under salinity stress. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 7(4): 250-267.

Bates, L. S., Waldern, R. W. and Treare, L. D. (1973) Rapid determination of free proline for stress students. Plant and soil 39: 205-207.

Bayuelo-Jimenez, J. S., Jasso-Plata, N. and Ochoa, I. (2012) Growth and physiological responses of *Phaseolus* species to salinity stress. International Journal of Agronomy 2012: 13-23.

Belaqziz, R., Romane, A. and Abbad, A. (2009) Salt stress effects on germination, growth and essential oil content of an endemic thyme species in Morocco (*Thymus maroccanus* Ball.). Journal of Applied Science and Research 5(7): 858-863.

Bennett, R. N. and Wallsgrove, R. M. (1994) Secondary metabolites in plant defense mechanisms. New Phytology 127: 617-633.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Burbott, A. J. and Loomis, W. D. (1969) Evidence for metabolic turnover of monoterpenes in peppermint. Plant Physiology 44: 173-179.

Chalker-Scott, L. and Fnchigami, L. H. (1989) The role of phenolic compounds in plant stress responses. In: Low temperature stress physiology in crops (ed. Paul, H. L.) 67-79. CRC Press, Boca Raton.

Charles, D. J., Joly, R. J. and Simon, J. E. (1990) Effect of osmotic stress on the essential oil content and composition or peppermint. Phytochemistry 29: 2837-2840.

Charles, O., Joly, R. and Simon, J. E. (1994) Effect of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. Phytochemistry 29: 2837-2840.

Chaum, S. and Kirdmanee, C. (2009) Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability

and growth characters in two maize cultivars. Pakistan Journal of Botany 41: 87-98.

Davies, N. W. (1990) Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methylsilicon and carbowax 20M phases. Journal of Chromatography 503: 1-24.

Dixon, R. A. and Paiva, N. (1995) Stressed induced phenyl propanoid metabolism. Plant Cell 7(7): 1085-1097.

Eckhardt, U., Grimm, B. and Hortensteiner, S. (2004) Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. Plant Molecular Biology 56: 1-14.

Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Sharifi M. (2013) Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. Journal of Cell Tissue 4(2): 119-128.

Fidalgo, F., Santos, A., Santos, I. and Salema, R. (2004) Effect of long term salt stress on antioxidant defense system, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. Annals of Applied Biology 145: 185-192.

Foyer, C. H. and Noctor, G. (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Physiolgia Plantarum 119: 355-364.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase I. occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

Gill, S. S., Tajrishi, M., Madan, M. and Tuteja, N. (2013) A DESD-box helicase functions in salinity stress tolerance by improving photosynthesis and antioxidant machinery in rice (*Oryza sativa* L. cv. PB1). Plant Molecular Biology 82(1-2): 1-22.

Hendawy, S. F. and Khalid, K. H. A. (2005) Response of sage (*Salvia officinalis* L.) plants to zinc application under different salinity levels. Journal of Appied Science and Research 1(2): 147-155.

James, R. A., Blake, C., Byrt, C. S. and Munns, R. (2011) Major genes for Na^+ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na^+ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. Journal of Experimental Botany 62(8): 2939-2947.

Jamil, M. and Rha, E. S. (2013) NaCl stress-induced reduction in growth, photosynthesis and protein in Mustard. Journal of Agricultural Science 5(9): 114-127.

Jouve, L., Hoffmann, L. and Hausman, J. F. (2004) Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of Aspen (*Populus tremula* L.): involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. Plant Biology 6: 74-80.

Khodary, S. E. A. (2004) Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. International Journal of Agriculture and Biology 6(1): 5-8.

Lee, M. J., Son, J. E. and Oh, M. M. (2014) Growth and phenolic compounds of *Lactuca sativa* L. grown in a closed-type plant production system with UV-A, -B, or -C lamp. Journal Science Food Agricultural 94(2): 197-204.

Li, X. M., Tian, S. L. and Pang, Z. C. (2009) Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and system distillation. Food Chemistry 115: 1114-1119.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chorophylls and carotenoids: pigments photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Matta, A. G. and Giai, I. (1969) Accumulation of phenol in tomato plant infected by different forms of *Fusarium oxysporum*. Phytphatology 59: 512-513.

Mattioli, R., Costantino, P. and Trovato, M. (2009) Proline accumulation in plants: not only stress. Plant

Signal Behavavior 4(11): 1016-1018.

Morales, C., Cusido, R. M., Palazon, J. and Bonfill, M. (1993) Response of *Digitalis purpurea* plants to temporary salinity. Journal of Plant Nutrition 16(2): 327-335.

Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology 59: 651-681.

Murakeozy, E. P., Nagy, Z. and Duhaze, C. Bouchereau A. and Tuza, Z. (2003) Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. Plant Physiology 160(4): 395-401.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiolgia Plantarum 15: 473-497.

Mutlu, F. and Buzcuk, S. (2007) Salinity induced changes of free and bound polyamine levels in Sun flower (*Helianthus annuus* L.) roots differing in salt tolerance. Pakistan Journal of Botany 39: 1097-1102.

Nakamura, A., Fujiwara, S., Matsumoto, I. and Abe, K. (2010) Stress repression in restrained rats by (R)-(-)-linalool inhalation and gene expression profiling of their whole blood cells. Journal of Agriculture Food Chemistry 57(12): 5480-5485.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C. and Martinez, V. (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity. Food Chemisrtry 96: 66-73.

Rahnama, A., James, R. A., Poustini, K. and Munns, R. (2010) Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. Functional Plant Biology 37(3): 255-263.

Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P. and Dhawan, A. K. (2011) Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection- an overview of the recent progress. Environmental and Experimental Botany 71: 89-98.

Rathore, S., Singh, N. and Singh, S. K. (2014) Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of *Stevia rebaudiana* regenerated *in vitro*. Stress Physiology and Biochemistry 10: 287-296.

Ravishankar, G. A. and Rao, S. R. (2000) Biotechnological production of phytopharmaceuticals. Plant Genetic Resources 4(1): 73-102.

Rustaiyan, A., Masoudi, S., Monfared, H., Kamalinejad, A, Lajevardi, M., Sedaghat, T. and Yari, S. (2000) Volatile constituents of three *Thymus* species grown wild in Iran. Planta Medica 66(2): 197-198.

Sancho, M. A., Milrad de Forchetii, S., Pliego, F., Valpuesta, V. and Quesada, M. A. (1996) Total peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 161-167.

Saxena, S., Kaur, H. and Verma, P. (2013) Osmoprotectants: potential for crop improvement under adverse conditions. In: Plant acclimation to environmental stress (Eds. Tuteja, N. and Singh Gill, S.) 197-232. Springer, New York.

Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Aguado-Santacruz, G. A. and Jiménez-Bremont, J. F. (2008) Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. Plant Physiology and Biochemistry 46(1): 82-92.

Soto-Mendivil, E. A., Moreno-Rodriguez, J. F., Estarron-Espinosa, M., Garcia-Fajardo, J. A. and Obledo-Vazquez, E. N. (2006) Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. e-Gnosis 4: 16.

Sudha, G. and Ravishankar, G. A. (2003) Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and involvement of calcium channel modulators. Current Science 84: 775-779.

Tabatabaie, S. J. and Nazari, J. (2007) Influence of nutrient concentration and NaCl salinity on growth, photosynthesis and essential oil content of peppermint and *lemon verbena*. Turkish Journal of Agriculture 31: 245-253.

Tavakkoli, E., Rengasamy, P. and McDonald, G. K. (2010) High concentrations of Na^+ and Cl^- ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. Journal of Experimental Botany 61: 4449-4459.

Trovato, M., Mattioli, R. and Costantino, P. (2008) Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. Rendiconti Lincei 19: 325-346.

Tuteja, N. and Sopory, S. K. (2008) Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. Plant Signal Behavior 3(8): 525-536.

Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids 35: 753-759.

Waheed, A., Hafiz, I. A., Qadir, G., Murtaza, G., Mahmood, T. and Ashraf, M. (2006) Effect of salinity on germination, growth, yield, ionic balance and solute composition of pigeon Pea (*Cajanus cajan* (L.) Mill. sp.). Pakistan Journal of Botany 38: 1103-1117.

Wong, K. C., Ong, K. S. and Lim, C. L. (2006) Composition of the essential oil of rhizomes of *Kaempferia Galanga* L. Flavour and Fragrances Journal 7(5): 263-266.

Yaniv, Z. and Paleitch, D. (1982) Effect of drought on the secondary metabolites of medicinal and aromatic plants. In: Cultivation and utilization of medicinal plants (Eds. Atal, C. K. and Kapur, B. M.) 1: 1-12. Council of Scientific and Industrial Research, Jammu-Tawi.

Yemm, E. W. and Willis, A. J. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemistry 57: 508-514.

Zarrini, G., Bahari-Delgosha, Z., Mollazadeh-Moghaddam, K. and Shahverdi, A. R. (2010) Post-antibacterial effect of thymol. Pharmaceutical Biology 48(6): 633-636.

Zhang, R. H., Li, J., Guo, S. R. and Tezuka, T. (2009) Effects of exogenous putrescine on gas exchange characteristics and chlorophyll fluorescence of NaCl-stressed cucumber seedlings. Photosynthesis Research 100: 155-162.

An investigation of changes in antioxidant enzymes activities and secondary metabolites of thyme (*Thymus vulgaris*) seedlings under *in vitro* salt stress

Roya Razavizadeh * and Nasim Mohagheghiyan
Department of biology, Payame Noor Universtiy, PO BOX 19395-3697 Tehran, IRAN

Abstract
Salinity is one of the major factors limiting the growth of plants that threaten the sustainability of agriculture in vast areas of the world. It seems that the evaluation of medicinal plants such as thyme due to food, pharmaceutical and health is essential under salinity stress to discover its benefits of economic and health. This study was designed to investigate the effect of salinity on physiological parameters, biochemical and secondary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*) under in vitro culture conditions. Thyme seedlings grown from the seeds, 4 weeks after growth at 16 hours of light and 8 hours of dark and at temperature of 25±1 ºC in the growth chamber, were transferred to MS (Murashige and skoog) medium containing different concentrations of NaCl (0, 80, 100, 120 and 150 mM) and 25 days after the subculture, physiological parameters such as antioxidant enzymes activities and active pharmaceutical ingredients were measured. 25 days after salt treatment, the chlorophyll a, b, total chlorophyll, carotenoids, and total soluble protein content were significantly decreased with increasing NaCl concentration, whereas increasing the salt concentration increased carbohydrates, proline and phenolics in thyme seedlings. Also salinity led to a significant increase in the activity of antioxidant enzymes. GC-Mass analysis showed that the productions of secondary metabolites were greatly affected by salinity. By increasing salinity level of P-cymene and Gama Terpinene increased and Thymol decreased. In general, it was observed that salinity with changes the physiological and biochemical parameters and the amount of active ingredients of Thyme can change the value of its medicinal properties.
Key words: Antioxidant enzymes, *In vitro*, Salt stress, Secondary metabolites, Thyme

* Corresponding Author: razavi.roya@gmail.com