

بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول در گیاه آویشن

باغی (*Thymus vulgaris*) تحت تنش شوری

Gene Expression Analysis of Thymol and Carvacrol Biosynthesis Pathway in *Thymus vulgaris* under Salinity Stress

حسیه حسینی^۱، فؤاد فاتحی^{۲*}، صادق موسوی فرد^۳، اردشیر قادری^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، ایران

۲- استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، ایران

۴- استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

Hosseini H¹, Fatehi F^{*2}, Mousavi Fard S³, Qaderi A⁴

1- MSc Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture Lorestan University, Iran

4- Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) یکی از گیاهان تیره نعنائیان (Lamiaceae) است که در مدیترانه و برخی نواحی آسیا می‌روید و امروزه در مناطق مختلف جهان و از جمله در ایران کشت و تولید می‌شود. اثرات دارویی این گیاه مربوط به ترکیبات مونوترپن‌های فنولی مختلف از جمله تیمول و کارواکرول است. این تحقیق در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. تیمارها در چهار سطح شوری (شاهد، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) با سه تکرار به اجرا درآمد و صفات فیزیولوژیکی و عملکرد فیتوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی بیان ژن‌ها با روش qRT-PCR بررسی شد و اسانس‌گیری توسط دستگاه HPLC انجام شد. نتایج نشان داد شوری اثر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بر بیان ژن‌های مورد مطالعه داشت. بیش‌ترین میزان بیان ژن‌های (*TvTPS1*) و (*TvTPS5*) در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار و بیش‌ترین میزان بیان ژن (*TvDXR*) در تیمار ۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید مشاهده شد. هم‌چنین بیش‌ترین میزان تیمول و کارواکرول در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد. شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم با تأثیر بر ژن‌های ابتدای مسیر بیوسنتزی MEP و افزایش بیان ژن‌ها انتهای مسیر بیوسنتز تیمول از طریق فرآورده‌های سیگنالی تولید مونوترپن‌های تیمول و کارواکرول را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
تنش شوری
مونوترپن‌ها
رنگیزه‌های فتوسنتزی

مقدمه

شوری بعد از خشکی دومین عامل محیطی فراگیر و محدود کننده تولیدات کشاورزی بوده که سطح قابل توجهی از زمین‌های کشاورزی ایران را تحت تاثیر خود قرار داده است. مشکلات شوری در گیاهان عالی در اثر ازدیاد کلرید سدیم به صورت سمیت و تنش اسمزی ایجاد می‌شود (Parida et al. 2004). آویشن باغی با دارا بودن بیش از ۲۰ نوع ترکیب شیمیایی شناخته شده و مؤثر از مهم‌ترین گیاهان دارویی به شمار می‌رود (Horwath et al. 2008). مهم‌ترین ترکیبات آویشن عبارت‌اند از: تیمول، کارواکربول، پاراسیمین و تی کاریوفیلین (Yadegari and Mosadeghzad 2012). ترپنوئیدها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در حفاظت گیاهان در برابر آفات گیاه‌خوار، بیماری‌ها، جلب گرده‌افشان‌ها و حشرات پراکنده کننده بذر نقش دارند (Ferreira et al. 2010). دو مسیر بیوسنتزی جهت تشکیل ترپنوئیدها وجود دارد (Gomez-Gale et al. 2007; Munoz-Bertomeu et al. 2008)؛ مسیر کلاسیک موالونیک اسید (MVA) و مسیر ۲-C-متیل-D-اریتریتول-۴-فسفات (MEP) (Lichtenthaler 1999). مونوترپن‌ها از مسیر MEP سنتز می‌شوند. این مسیر که در پلاستیدها رخ می‌دهد شامل هفت مرحله آنزیمی درگیر در تشکیل IPP^۱ و DMAPP^۲ از پیروات و گلسیرآلدهید-۳-فسفات^۳ است. اولین مرحله در این مسیر متراکم شدن پیروات و گلسیرآلدهید-۳-فسفات توسط آنزیم DXP سینتاز (DXS)^۴ به منظور ایجاد ۱-دئوکسی-D-زایلوز-۵-فسفات (DXP)^۵ است. سپس DXP توسط DXP ردوکتاز ایزومراز (DXR)^۶ به MEP تبدیل می‌شود. پس از آن MEP توسط فعالیت آنزیمی پی‌درپی ۲-سی-D-اریتریتول-۴-فسفات سیتیدیل ترنسفرز (MCT)^۷، ۴-دی فسفوسیتیدیل-۲-سی-D-اریتریتول کیناز (CMK)^۸، ۲-سی-D-اریتریتول-۲ و ۴ سیکلو دی فسفات سینتاز

(MDS)^۹ و ۱-هیدروکسی-۲-متیل-۲-(E)-بوتنیل-۴-دی فسفات سینتاز (HDS)^{۱۰} به ۱-هیدروکسی-۲-متیل-۲-(E)-بوتنیل-۴-دی فسفات (HMBPP)^{۱۱} تبدیل می‌شود. آخرین مرحله نیز توسط فعالیت آنزیمی همزمان تنها یک آنزیم، بنام ۱-هیدروکسی-۲-متیل-۲-(E)-بوتنیل-۴-دی فسفات ردوکتاز (HDR)^{۱۲}، HMBPP به پیش ماده‌های مورد نیاز ترین‌ها یعنی IPP و DMAPP تبدیل می‌شود (Rohdich et al. 2005). IPP و DMAPP توسط فعالیت آنزیمی ایزوپنتنیل دی فسفات ایزومراز (IDI)^{۱۳} می‌توانند به یکدیگر تبدیل شوند (شکل ۱). در ادامه با ترکیب شدن این دو ماده و تحت تاثیر ژرانیل دی فسفات سینتاز^{۱۴} (GPPs)، ژرانیل دی فسفات^{۱۵} (GPPs) که پیش ماده مونوترپن‌هاست، به وجود می‌آید. ژرانیل دی فسفات نیز تحت تاثیر آنزیم مونوترپن سینتاز به مونوترپن‌ها تبدیل می‌شود (Davis and Croteau 2000) (شکل ۲).

تیمول مونوترپنی فنولی است که دارای سه گروه متیل، یک حلقه بنزن و یک گروه هیدروکسیل با فرمول شیمیایی C₁₀H₁₄O است. با کشف مسیر MEP در دهه اخیر مشخص شد که این مسیر مرتبط با مسیر بیوسنتزی MVA است و در بیوسنتز مونوترپن‌های فنولی دارای نقش است (Rohmer 1999). با توجه به مصرف بالای تیمول در صنایع بهداشتی و دارویی تولید هر چه بیشتر این ماده، از اهمیت بالایی برخوردار است. تحقیقات نشان داده است که ژن DXR نقش مهمی در مسیر بیوسنتز MEP دارد و با افزایش بیان این ژن میزان تولید مونوترپن‌ها افزایش می‌یابد (Estevez et al. 2000; Carretero-Paulet et al. 2002). در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) تیمار متیل جاسمونات با تاثیر بر بیان ژن‌های ابتدای مسیر بیوسنتزی MEP باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه این مسیر شد (Ruiz-May et al. 2009). با توجه به مطالعات محدود انجام شده در زمینه تاثیر تنش شوری بر میزان تغییرات ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های تیمول و

¹ Isopentenyl diphosphate

² Dimethylallyl diphosphate

³ D-glyceraldehyde-3-phosphate

⁴ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatesynthase

⁵ Deoxyxylulose-5-phosphate

⁶ 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase

⁷ 2-C-methyl-D-erythritol4-phosphatecytidyltransferase

⁸ 4-(cytidine5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritolkinase

⁹ 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase

¹⁰ 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase

¹¹ 1-hydroxy-2-methylbut-2-(E)butenyl-4-diphosphate

¹² 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphatereductase

¹³ Isopentenyl-diphosphate Disomerase

¹⁴ Geranyl diphosphate synthesis

¹⁵ Geranyl diphosphate

صفات مورد نظر اندازه‌گیری شد. برداشت بوته‌ها به‌منظور استخراج و اندازه‌گیری درصد تیمول و کارواکرول در مرحله قبل از گلدهی انجام شد. پس از پایان تنش، نمونه‌های مربوطه به هر سطح شوری جهت استخراج RNA، در ازلت مایع تثبیت و تا زمان آزمایش بررسی بیان ژن در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

محتوای کلروفیل a و b و کل از روش Arnon (1949) و کارتنوئید از روش Lichtenthaler (1987) و با استفاده از روابط زیر محاسبه شد.

$$a \text{ کلروفیل} = [12.7 (A663.2) - 2.69 (A645.8)] \times V/1000 \times W$$

$$b \text{ کلروفیل} = [22.9 (A645.8) - 2.69 (A663.2)] \times V/1000 \times W$$

$$\text{کلروفیل کل} = [20.2 (A645.8) + 8.02 (A663)] \times V/1000 \times W$$

$$[\text{کلروفیل (b)} - 104] - 3.27(a \text{ کلروفیل}) = [1000(A470) - 104(b \text{ کلروفیل})] / 227$$

در روابط فوق A طول موج جذب اسپکتروفتومتر، V حجم عصاره مورد استفاده برای سنجش توسط اسپکتروفتومتر، W وزن ماده گیاهی مورد استفاده برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کارتنوئید است. غلظت بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاهی تعیین شد.

به‌منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ، پس از توزین برگ‌های تازه، به مدت ۲۴ ساعت در آب با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا به حالت آماس درآیند. سپس برگ‌های آماس شده با کاغذ صافی خشک و وزن برگ‌های آماس یافته اندازه‌گیری شد. پس از توزین، برگ‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. پس از توزین مجدد مقدار محتوای نسبی آب از معادله زیر محاسبه شد (Qasim et al. 2003).

$$RWC (\%) = (W_F - W_D) / (W_T - W_D) \times 100$$

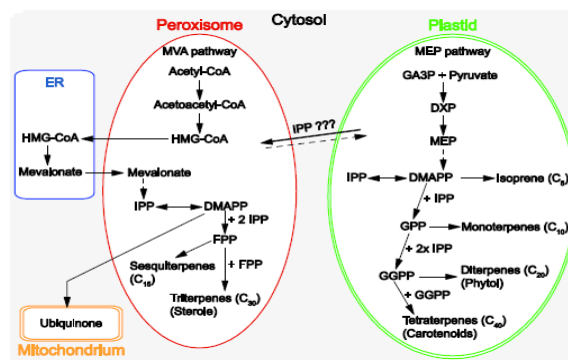
W_F = وزن اولیه برگ‌ها

W_T = وزن برگ‌های آماس

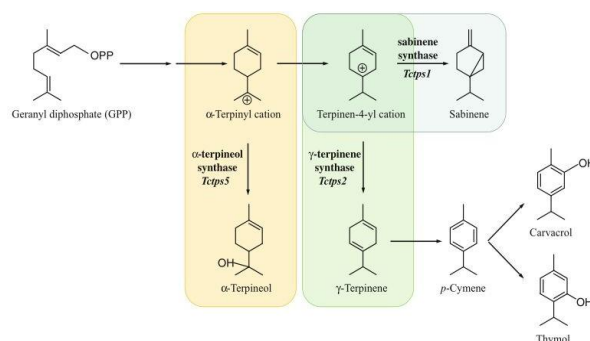
W_D = وزن خشک برگ‌ها

به‌منظور سنجش درصد نشت الکتروولیت، با استفاده از دستگاه پانچ از هر برگ دیسک‌های دایره‌ای شکل تهیه شد. قطعات حاصل در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت دو ساعت در دمای ۲۵

کارواکرول در آویشن باغی، این تحقیق با هدف بررسی تاثیر سطوح مختلف شوری بر عملکرد تولید متابولیت‌های ثانویه (تیمول و کارواکرول)، صفات فیزیولوژیک و میزان تغییرات بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز تیمول شامل (TvDXR, TvTPS1, TvTPS5) و پی بردن به ارتباط بین میزان رونوشت این ژن‌ها و متابولیت‌های تولید شده در گیاه انجام شد.



شکل ۱- مسیر بیوسنتز متیل اریتریتول (MEP) و موالونات (MVA) (Sapir- Mir et al. 2008).



شکل ۲- ژن‌های پایین دست دخیل در تشکیل تیمول و کارواکرول (Degenhardt et al. 2009).

مواد و روش‌ها

این پژوهش در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار به‌صورت کشت در گلدان انجام شد. بستر کشت مورد نظر بر اساس تحقیقات حاوی کوکوپیت و پرلایت به نسبت ۱ به ۳ بود. بوته‌های همسن آویشن باغی بعد استقرار در شرایط گلدان به مدت ۲۸ روز تحت تنش شوری قرار گرفتند. در ارزیابی صفات فیتوشیمیایی و فیزیولوژیکی تیمار شوری شامل چهار سطح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید بود. پس از اعمال دوره تنش شوری

درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس هدایت الکتریکی اولیه (EC_1)، با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و پس از سرد شدن در دمای اتاق، هدایت الکتریکی ثانویه (EC_2) اندازه‌گیری شد. در نهایت درصد نشت الکترولیت برگ (ELP) برحسب درصد از طریق فرمول زیر محاسبه شد (Barranco et al. 2005).

$$ELP = (EC_1/EC_2) \times 100$$

برای اندازه‌گیری ترکیبات تیمول و کارواکربول از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. برای این منظور ۵۰ میکرو لیتر از عصاره تهیه شده به دستگاه HPLC مدل (KNAUER-Germany) تزریق شد. این دستگاه مجهز به دکتور UV مدل K۲۵۰۱ و ستون C_{18} (Vertex) دارای اندازه ذرات ۵ میکرومتر، طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ۴ میلی‌متر بود. اندازه‌گیری تیمول و کارواکربول در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. جهت آنالیز کمی ترکیبات، با تزریق محلول‌های استاندارد با غلظت‌های معین و به‌دست 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 شد (MiSan et al. 2011).

استخراج RNA با روش ترايزول از بافت برگ شاهد و تیمارها صورت گرفت (Chomczynski and Sacchi 1987). به‌منظور حذف آلودگی احتمالی DNA موجود در نمونه‌ها از تیمار با آنزیم DNase I استفاده شد. بر این اساس مقدار ۱ μ l از ۵ μ g/ μ l نمونه RNA، ۱/۵ μ l از بافر ۱۰ X DNase I، ۱/۵ μ l آنزیم (1U/ μ l) DNase I (Fermentase, USA) با هم مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و درنهایت برای حذف و غیرفعال کردن آنزیم DNase I مقدار ۲ میکرو لیتر EDTA با غلظت ۵۰mM اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و خوانش در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه NanoDrop (ThermoScientific 2000c USA) انجام گرفت. ساخت cDNA با استفاده از ۱ μ g از RNA خالص‌سازی شده و آغازگرهای

الیگو T و هگزامر تصادفی^۱ توسط آنزیم Reverse transcriptase انجام شد. به‌منظور انجام این واکنش ابتدا آغازگرها، RNA و آب DEPC مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و بلافاصله به سطح یخ منتقل شدند. به نمونه‌ها مخلوط آنزیم و بافر اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم RT، در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. مقدار ۱ μ l از هر واکنش جهت انجام آزمایش مرحله بعد استفاده شد. مراحل تهیه پلیت لازم برای انجام واکنش PCR مواد براساس (جدول ۱) با هم مخلوط شدند و حجم نهایی واکنش ۱۵ μ l در نظر گرفته شد. برای بهینه کردن دمای اتصال پرایمرها از روش Gradient PCR استفاده شد. همچنین صحت و درستی cDNA سنتز شده با استفاده از PCR ژن کنترل (18srRNA) در همه نمونه‌های مورد مطالعه انجام گرفت. برای واکنش کنترل از بدون الگو (NTC) بجای cDNA، آب MQ اضافه شد. در نهایت به پلیت ۴۸ چاهکی با توجه به نقشه ۱۵ μ l از مخلوط واکنش اضافه شد. واکنش تکثیر تصادفی این ژن‌ها به صورت ۱۰ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه و ۴۰ چرخه (با دمای واسرشته‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها مدت ۳۰ ثانیه و بسط آنزیمی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه) صورت گرفت. همچنین برای اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده، در تکثیر ژن مورد نظر از منحنی ذوب (Melting curve) استفاده شد. لیست آغازگرهای طراحی شده برای دستیابی به توالی ژن‌های مورد مطالعه در (جدول ۲) آورده شده‌است.

جدول ۱- مواد شیمیایی و مقادیر مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

مواد شیمیایی	حجم (μ l)
cDNA (1 μ g/ μ l)	۲
SYBR premix 5X	۳
Primer F (10 pmol/ μ l)	۰/۸
Primer R (10 pmol/ μ l)	۰/۸
ddH2O	۱۵

¹ Random hexamer primer

جدول ۲- لیست آغازگرهای طراحی شده

Primer name	Sequence
DXR-F	TATGACTTCGAGGCCCTTGTTAAAGAG
DXR-R	TGTATCCAAGGCTTGCCAGAAGG
TPS1-F	GAGGGAAGGCGAAAACACAC
TPS1-R	TCCAGTGAAGAGGGAGATCC
TPS5-F	GATACAAATGCGTCGGAGGAGG
TPS5-R	CTGTAGCCTCCACCACTTGTTTC
18srRNA-F	ATGTTTAGAAGGGTGAGTGAGCAGTTTAC
18srRNA-R	GCCTCATCATCATACTCTTCCTCATCATC

جهت نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن از ژن کنترل داخلی 18srRNA استفاده شد. میزان نسبی بیان ژن با استفاده از دو تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی (RNA) محاسبه شد. برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن از روش $\Delta\Delta Ct$ استفاده شد که بر اساس فرمول زیر است (Schmittgen and Livak 2008).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - (\text{ژن کنترل داخلی}) \quad \Delta Ct = (\text{ژن مورد نظر})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = ?$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها پس از نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات ذکرشده توسط نرم‌افزار SAS (ver. 9.2) انجام و مقایسه میانگین تیمارها نیز به روش آزمون PLSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج

شوری اثر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بر نشت الکترولیتی غشا داشت (جدول ۳). همچنین مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که با افزایش سطح شوری، نشت الکترولیتی غشا افزایش می‌یابد به‌طوری که کم‌ترین و بیش‌ترین نشت الکترولیتی به‌ترتیب در تیمار شاهد و تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (جدول ۴). نشت الکترولیتی غشاء سلولی از جمله خصوصیات فیزیولوژیک است که تحت تأثیر تنش‌های محیطی دچار تغییر می‌شود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر شوری بر میزان نشت یونی معنی‌دار نبوده اما با افزایش سطح شوری مقدار آن افزایش یافت. افزایش نشت الکترولیتی مواد نشانه آسیب و کاهش پایداری غشاها می‌باشد که در اثر حالت اکسیداتیو ناشی از شوری به‌وجود آمده است

(Dkhil and Denden 2012). تنش اکسیداتیو از طریق ترکیبات دارای اکسیژن فعال، مولکول‌های لیپید، پروتئین و نهایتاً ساختار غشا سلولی را تخریب می‌کند (Molassiotis 2006). توانایی هرچه بیش‌تر گیاه در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث حفظ پایداری غشاءهای سلولی شده و حفظ توانایی تولید مواد فتوسنتزی تحت تنش اکسیداتیو می‌شود (Cai et al. 2008).

تنش شوری اثر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بر محتوای نسبی آب برگ‌ها داشت (جدول ۳). بر اساس نتایج مقایسه میانگین مشاهده شد که با افزایش سطح شوری از ۵۰ به ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار محتوای نسبی آب برگ به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴). شوری از طریق کاهش آب در سطح سلولی حالت تنش کم آبی را بوجود می‌آورد و هر چه این شوری بیش‌تر باشد تنش کم آبی شدیدتر خواهد بود (Yildirim et al. 2009).

نتایج نشان داد که سطوح شوری بر مقدار کلروفیل a، b و کارتنوئیدها از لحاظ آماری اثر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) دارد (جدول ۳). مقایسه میانگین تیمارها نشان داد بالاترین مقدار کلروفیل a، b و کارتنوئید در سطح شاهد (عدم شوری) و کمترین مقادیر صفات مذکور در سطح ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (جدول ۴). کاهش سطح کلروفیل تحت تأثیر شوری بالا یکی نشانه‌های عمومی وقوع تنش اکسیداتیو است (Smirnoff 1996) که بر اثر کاهش سطح سنتز کلروفیل از یک سو و تجزیه کلروفیل توسط آنزیم کلروفیل‌لاز رخ می‌دهد (Santos 2004). کارتنوئیدها نسبت به کلروفیل حساسیت کمتری در برابر تنش‌ها دارند. گزارش شده که تنش شوری تأثیر معنی‌داری بر مقدار کارتنوئید داشته است، مقدار کارتنوئیدها نیز تحت تأثیر تنش شوری کاهش یافته است اما میزان آن کم‌تر از کلروفیل بوده است (Kiarostami et al. 2010). نتایج نشان داد شوری اثر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بر محتوای پرولین برگ‌ها دارد (جدول ۳). مقایسه میانگین تیمارها نشان داد، با افزایش سطح شوری میزان پرولین در برگ‌ها افزایش می‌یابد. با افزایش سطح شوری از صفر (شاهد) به ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار مقدار پرولین برگ به‌ترتیب ۵/۸، ۵/۸ و ۱۱/۷۶ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (جدول ۴). با توجه به نقش پرولین در حذف رادیکال‌های آزاد و محافظت از مولکول‌های بزرگ در زمان وقوع تنش‌ها مقدار آن در سلول‌های گیاهی

افزایش می‌یابد (Rahdari et al. 2012). از آنجا که گلوتامات پیش‌ساز سنتز پرولین و کلروفیل بوده و در زمان تنش مقدار پرولین افزایش می‌یابد حاکی از این موضوع است که سلول‌های گیاهی سنتز پرولین را بر حفظ بهینه مقدار کلروفیل سلولی ترجیح می‌دهند و به‌همین دلیل مقدار کلروفیل کل کاهش می‌یابد. هم‌چنین تنش شوری باعث فعالیت بیش‌تر آنزیم لیگاز گلوتامات و تبدیل گلوتامات به پرولین می‌شود. یکی دیگر از دلایل کاهش

مقدار کلروفیل، استفاده از نیتروژن برای سنتز پرولین می‌باشد (Rahdari et al. 2012). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد شوری اثر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بر درصد تیمول و کارواکربول دارد (جدول ۵) مقایسه میانگین سطوح شوری نشان داد با افزایش سطح شوری از صفر به ۱۰۰ میلی‌مولار مقدار تیمول و کارواکربول افزایش اما در سطح ۱۵۰ میلی‌مولار کاهش می‌یابد (جدول ۶). در این تحقیق اعمال تنش شوری سبب افزایش ترکیبات تیمول و کارواکربول شد.

جدول ۳- تجزیه واریانس مربوط به صفات فیزیولوژیکی در آویشن باغی رقم واریکو ۳ تحت تنش شوری

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتونوئید	پرولین	محتوای نسبی آب	نشت الکترولیت
تکرار	۲	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۱۲۷ ^{ns}	۰/۰۰۲۰ ^{ns}	۰/۰۲۷ ^{ns}	۰/۰۰۰۵ ^{ns}	۴۴/۵۲ ^{ns}	۰/۰۰۵
تیمار	۳	۰/۴۴۱ ^{**}	۰/۰۶۵ ^{**}	۰/۶۷۸ ^{**}	۰/۷۸۸ ^{**}	۰/۰۰۲ ^{**}	۱۱۴/۴۵ ^{**}	۰/۰۲۳ ^{ns}
اشتباه آزمایشی	۶	۰/۰۰۴۶	۰/۰۰۳۶	۰/۰۱۲۶	۰/۰۶۰۰	۰/۰۰۲	۳۴/۱۳	۰/۰۳۶
ضریب تغییرات (%)		۸/۷۰۰	۸/۸۱	۸/۳۰	۱۷/۴۸	۱۰/۰۱۰	۱۵/۵۹	۲۴/۷۲۰

^{ns}, ^{*}, ^{**} به ترتیب غیر معنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش شوری بر خصوصیات فیزیولوژیکی در آویشن باغی رقم واریکو ۳

سطوح شوری	کلروفیل a (mg/g)	کلروفیل b (mg/g)	کلروفیل کل (mg/g)	کارتونوئید (mg/g)	محتوای نسبی آب (%)	نشت الکترولیت (%)	پرولین (mg/g DM)
صفر	۱/۲۲ a	۰/۸۲ a	۱/۷۷ a	۱/۹۲ a	۵۰/۳۰ a	۰/۴۱ a	۰/۱۷c
۵۰	۱/۰۵ ab	۰/۷۸ b	۱/۶۵ a	۱/۶۸ a	۵۷/۶۰ a	۰/۴۹ a	۰/۱۸b
۱۰۰	۰/۶۶۷ c	۰/۶۷ c	۱/۱۶ b	۰/۹۷ b	۲۴/۶۶ b	۰/۵۲ a	۰/۱۸b
۱۵۰	۰/۳۷ d	۰/۴۸ d	۰/۷۴۵c	۰/۹۵ b	۱۷/۰۰ b	۰/۶۳ a	۰/۱۹a

میانگین‌های دارای حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد هستند.

جدول ۵- تجزیه واریانس تیمول و کارواکربول در آویشن رقم واریکو ۳ تحت تنش شوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	تیمول	کارواکربول
تکرار	۲	۰/۰۰۴۹ ^{**}	۰/۰۰۰۳۳ ^{ns}
تنش شوری	۳	۱۱/۳۶ ^{**}	۰/۰۵۴۹۲ ^{**}
اشتباه آزمایشی	۶	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۳۴

^{ns}, ^{*}, ^{**} به ترتیب به معنی غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

۱۵۰ میلی‌مولار به ترتیب ۳۳/۲۸، ۴۶/۴۱ و ۶۰/۳۸ برابر نسبت به شاهد کاهش نشان داد (جدول ۷). مونوترپن‌ها از مسیر MEP سنتز می‌شوند. این مسیر که در پلاستیدها رخ می‌دهد، ابتدا پیرووات و دی گلیسرآلدئید ۳- فسفات با یکدیگر ترکیب و پس از انجام واکنش‌های بیوشیمیایی لازم دی اکسی زایللو ۵- فسفات (DXP) به وجود می‌آید، که این ماده نیز تحت تأثیر آنزیم DXR به متیل اریتریتول فسفات (MEP) تبدیل می‌شود. ژن DXR به عنوان یک ژن کنترلی مهم عمل می‌کند، زیرا اولین مرحله اصلی و متمایزکننده مسیر MEP با این ژن آغاز می‌شود (Majdi et al. 2014; Degenhard et al. 2009). به غیر از ژن DXR ژن‌ها دیگری هم چون CMK^1 ، MDS^2 ، HDS^3 ، MCT^4 در مسیر بیوستز ایزوپرنوئیدها قرار دارند که تحت تنش بیان آن‌ها نیز دچار تغییر می‌شود (Pulido et al. 2012). ژن DXR نقش تعیین کننده‌ای در هدایت میان واسطه‌ها به سمت مسیرهای IPP و DMAPP دارد (Carretero-Paulet L et al. 2002). بررسی بیان ژن DXR و ارتباط آن با بیوستز مونوترپن کارواکرول در گیاه مرزه خوزستانی نشان داد که سنتز کارواکرول به طور عمده از مسیر MEP صورت می‌گیرد و آنزیم DXR در تنظیم بیوستز مونوترپن کارواکرول نقش داشته و میزان فعالیت آنزیم مذکور در سطح نسخه‌برداری (Transcriptional regulation) ژن کنترل می‌شود (Ramak et al. 2014).

نتایج بررسی بیان ژن DXR در مراحل رویشی و زایشی ژنوتیپ‌های مختلف بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*) نشان داد که میزان بیان این ژن می‌تواند تحت تأثیر مرحله رشدی و ژنوتیپ تغییر کند (Majdi et al. 2014).

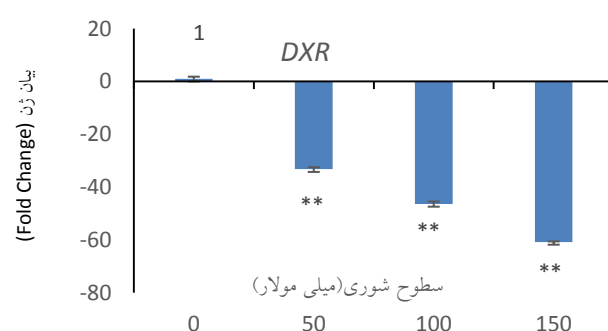
نتایج بیان ژن ترپین سنتاز نشان داد که با افزایش میزان بیان ژن روند یکسانی نداشته است. میزان بیان ژن ترپین سنتاز در سطح ۵۰ میلی‌مولار ۳/۳۳ برابر نسبت به حالت نرمال کاهش نشان داد. در سطوح شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک به ترتیب ۲۱/۳۳ و ۱/۲۷ افزایش بیان نشان داد (جدول ۸). نتایج بیان ژن

افزایش این ترکیبات را می‌توان به این صورت توجیه نمود، با توجه به اینکه تنش شوری اثراتی از قبیل بسته شدن روزنه‌ها، کاهش در سرعت انتقال مواد غذایی، کاهش پتانسیل آب سلولی، کاهش فتوسنتز، توقف رشد، تجمع اسید آسبزیک و پرولین، تشکیل رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو را به همراه دارد، لذا هنگامی که این گیاهان در شرایط تنش محیطی قرار می‌گیرند از طریق تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف از خود در برابر این شرایط محافظت می‌کنند (Sabra et al. 2012). همچنین در تحقیق دیگری که بر روی گیاه آویشن انجام گرفته است تنش شوری باعث افزایش مقدار تیمول شد که همسو با نتایج تحقیق حاضر است (El-Din et al. 2009).

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف شوری بر میزان تیمول و کارواکرول در آویشن رقم واریکو ۳

سطح تنش شوری	تیمول (میلی گرم در گرم ماده خشک)	کارواکرول (میلی گرم در گرم ماده خشک)
شاهد	۱۱/۵ b	۲/۳۰ b
۵۰	۸/۲۳ d	۲/۲۰ c
۱۰۰	۱۲/۷۶ a	۲/۴۸ a
۱۵۰	۹/۷۲ c	۲/۱۹ c

میانگین دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد آماری هستند.



شکل ۳- میزان بیان ژن DXR نسبت به شاهد در آویشن رقم واریکو ۳ تحت تنش شوری. ns، *، ** به ترتیب به معنی غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

نتایج بیان ژن نشان داد که شوری اثر معنی‌داری بر بیان این ژن داشته است (شکل ۳). میزان بیان ژن DXR در سطح ۵۰، ۱۰۰ و

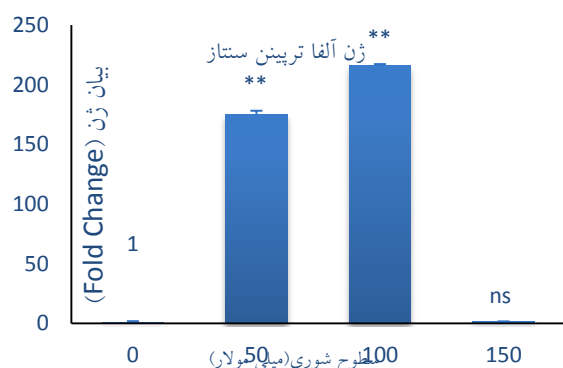
¹ 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase

² 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase

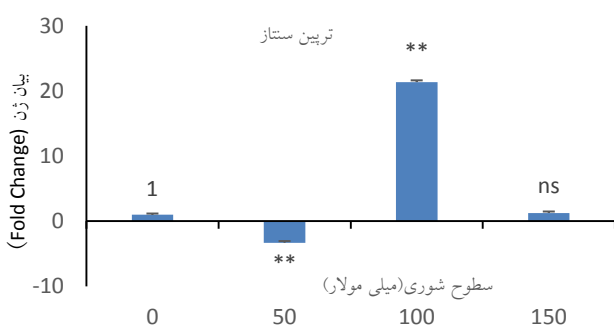
³ 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate synthase

⁴ 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase

نتایج بیان ژن آلفا ترپین سنتاز نشان داد که با افزایش شوری میزان بیان ژن روند یکسانی نداشته و در سطوح شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار به ترتیب ۱۷۵، ۲۱۶ و ۱/۶۴ برابر نسبت به شاهد افزایش بیان نشان داد (جدول ۹). شوری تاثیر معنی‌داری بر بیان این ژن داشت به‌طوری‌که با افزایش شوری تا سطح ۱۰۰ میلی‌مولار باعث افزایش و با رسیدن به ۱۵۰ میلی‌مولار بیان سیر نزولی نشان داد (شکل ۴). در ادامه مسیر بیوستز تیمول، ژرانیل دی فسفات به آلفا پینول تبدیل می‌شود. آلفا پینول تحت تاثیر آنزیم آلفا ترپین سنتاز به آلفا ترپین تبدیل می‌شود. آلفا ترپین سنتاز از جمله ژن‌های اصلی در مسیر بیوستز تیمول بوده و تغییر در بیان این ژن می‌تواند بر مقدار تولید تیمول در گیاه تاثیرگذار باشد (Crocoll et al. 2011).



شکل ۴- میزان بیان ژن آلفا ترپین سنتاز نسبت به شاهد در آویشن رقم واریکو ۳ تحت تنش شوری. **، *، ns به ترتیب به معنی غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.



شکل ۵- میزان بیان ژن آلفا ترپین سنتاز در آویشن رقم واریکو ۳ تحت تنش شوری. **، *، ns به ترتیب به معنی غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

نشان داده است که شوری به‌صورت معنی‌داری بر بیان این ژن تاثیر گذاشته است. با این وجود با افزایش تنش تا سطح ۱۰۰ میلی‌مولار باعث افزایش و ادامه تنش روند افزایش بیان را کاهش داده است (شکل ۵).

این ژن از جمله ژن‌های اصلی در مسیر بیوستز تیمول بوده (Crocoll et al. 2011) و تغییر در بیان آن می‌تواند بر مقدار تولید تیمول تاثیرگذار باشد. بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستزی مونوترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها تحت تاثیر اسید سالیسیلیک در گیاه سیاه‌دانه نشان داد که ژن‌های مونوترپن سنتاز، ژرانیل دی فسفات سنتاز، بتا آمیرین سنتاز و اسکوالن اپوکسیداز در برگ‌های اسیدسالیسیلیک دارای بیان‌های متفاوتی بودند الیاسی و همکاران (۱۳۹۴).

جدول ۷- نتایج بیان ژن DXR در آویشن رقم واریکو ۳ تحت تنش شوری

تیمارها	میزان بیان نسبت به شاهد (Fold Change)	p-value
۵۰	-۳۳/۲۸	۰/۰۰۴
۱۰۰	-۴۷/۴۱	۰/۰۰۲۲
۱۵۰	-۶۰/۳۸	۰/۰۰۰۰۴

جدول ۸- نتایج بیان ژن ترپین سنتاز در آویشن رقم واریکو ۳ تحت تنش شوری

تیمارها	میزان بیان نسبت به شاهد (Fold Change)	p-value
۵۰	-۳/۳۳	۰/۰۰۹
۱۰۰	۲۱/۳۳	۰/۰۰۰۰۰۷
۱۵۰	۱/۲۷	۰/۳۱

میزان بیان ژن لیمونن سنتاز در گیاه نعناع فلفلی تحت تاثیر متیل جاسمونات در غلظت صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار نشان داد که میزان بیان این ژن در بازه زمانی ۴ تا ۱۲ ساعت بعد از تیمار با متیل جاسمونات افزایش و بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت کاهش یافت (Afkar et al. 2013).

سطح شوری اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که رقم واریکو ۳ آویشن باغی در زمین‌های با شوری کم تا متوسط قابلیت کشت داشته و عملکرد اقتصادی و متابولیتی قابل قبولی را نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری و مساعدت گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی و استادان گرانقدر پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج و همچنین از استادان فرهیخته گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

- Afkar S, Karimzadeh G, Jalali-Javaran M, MozafarSharifi M, Behmanesh M (2013) Influence of Methyl Jasmonate on Menthol Production and Gene Expression in Peppermint (*Mentha piperita* L.). Journal of Medicinal Plants and By-products 1:75-82.
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24:1-16.
- Barranco D, Ruiz N, Campo G (2005) Frost tolerance of eight olive cultivars. Horticulture Science 40:558-60.
- Cai K, Gao D, Luo S, Zeng R, Yang J, Zhu X (2008) Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. Physiologia Plantarum 134: 324-333.
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodriguez-Concepcion M, Ferrer A, Boronat A, Campos N (2002) Expression and Molecular Analysis of the Arabidopsis DXR Gene Encoding 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reducto isomerase, the First Committed Enzyme of the 2-C-Methyl-d-Erythritol 4-Phosphate Pathway. Plant physiology 129:1581-1591.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 162:156-159.
- Crocoll C (2011) Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. University of Jena, Germany.
- Davis EM, Croteau R (2000) Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. Topics in Current Chemistry 209:53-95.

جدول ۹- نتایج بیان ژن آلفاترپین سنتاز در آویشن رقم واریکو ۳ تحت تنش شوری

تیمارها	میزان بیان نسبت به شاهد (Fold Change)	p-value
۵۰	۱۷۵	۰/۰۰۰۲۷
۱۰۰	۲۱۶	۰/۰۰۰۰۰۴
۱۵۰	۱/۶۴	۰/۵۱

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد فرایندهای مهم فتوسنتز و رشد و نمو گیاه آویشن تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرد. میزان بیان ژن‌های مورد بررسی تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش بیان نشان دادند و بیش‌ترین مقدار متابولیت ثانویه تیمول نیز در این

- Degenhardt J, Kollner TG, Gershenzon J (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. Phytochemistry 70:1621-1637.
- Dkhil BB, Denden M (2012) Effect of salt stress on growth, anthocyanins, membran permeability and chlorophyll fluorescence of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedlings. American Journal of Plant Physiology 7:174-83.
- El-Din AE, Aziz EE, Hendawy S, Omer E (2009) Response of *Thymus vulgaris* L. to salt stress and alar (B9) in newly reclaimed soil. Journal of applied sciences research 5:2165-70.
- Elyasi R, Majidi M, Bahramnejad B, Mirzaghaderi GH (2015) Expression pattern analysis of genes involved in the biosynthetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with salicylic acid. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 23:164-174.
- Estevez JM, Cantero A, Romero C, Kawaia H, Jimenez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y, Leon P (2000) Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. Plant Physiology 124: 95-104.
- Ferreira JF, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A (2010) Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. Molecules 15: 3135-3170.
- Gomez-Galera S, Pelacho AM, Gene A, Capell T, Christou P (2007) The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. Plant Cell Reports 26:1689-1715.

- Horwath AB, Grayer RJ, Keith-Lucas DM, Simmonds MS (2008) Chemical characterisation of wild populations of Thymus from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology* 36:117-133.
- Kiarostami K, Mohseni R and Saboori A. (2010). Biochemical changes of Rosmarinus officinalis under salt stress. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 6:114-122.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-382.
- Lichtenthaler HK (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 50: 47-65.
- Majdi M, Karimzadeh G, Malboobi M (2014) Spatial and developmental expression of key genes of terpene biosynthesis in Tanacetum parthenium. *Biologia Plantarum* 58: 379-384.
- Misan A, Mimica-Dukic N, Mandic A, Sakac M, Milovanovic I, Sedej I (2011) Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Open Chemistry* 9:133-42.
- Molassiotis A, Sotiropoulos T, Tanou G, Kofidis G, Diamantidis G, Therios E (2006) Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biologia Plantarum* 50:61-8.
- Munoz-Bertomeu J, Ros R, Arrillaga I, Segura J (2008) Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. *Metabolic Engineering* 10: 166-177.
- Parida AK, Das AB, Mittra B, Mohanty P (2004) Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove Bruguiera parviflora. *Zeitschrift fur Naturforschung C* 59:408-14.
- Pulido P, Perello C, Rodriguez-Concepcion M (2012) new insights into plant isoprenoid metabolism. *Molecular Plant* 5:964-967.
- Qasim M, Ashraf M, Jamil MA, Ashraf M, Rha ES (2003) Water relations and leaf gas exchange properties in some elite canola (*Brassica napus*) lines under salt stress. *Annals of Applied Biology* 142:307-316.
- Rahdari P, Tavakoli S, Hosseini SM (2012) Studying of salinity stress effect on germination, proline, sugar, protein, lipid and chlorophyll content in purslane (*Portulaca oleracea* L.) leaves. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 8:182-193.
- Ramak P, Kazempour Osaloo S, Ebrahimzadeh H, Sharifi M, Behmanesh M (2014) Expression of gene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and its relation to monoterpene carvacrol biosynthesis in *Satureja khuzestanica*. *Journal of Agronomy* 27: 622-634.
- Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W (2005) Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochemical Society Transactions* 33:785-791.
- Rohmer M (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* 16:565-574.
- Ruiz-May E, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2009) Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate. *Molecular biotechnology*; 41: 278-285.
- Sabra A, Daayf F, Renault S (2012) Differential physiological and biochemical responses of three Echinacea species to salinity stress. *Scientia Horticulturae* 135:23-31.
- Santos CV (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae* 103:93-99.
- Sapir-Mir M, Mett A, Belausov E, Tal-Meshulam S, Frydman A, Gidoni D, Eyal Y (2008) Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiology* 148:1219-1228.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols* 3: 1101-1108.
- Smirnoff N (1996) Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78:661-669.
- Yadegari M, Mosadeghzad Z (2012) Biofertilizers effects on quantitative and qualitative yield of Thyme (*Thymus vulgaris*). *African Journal of Agricultural Research* 7: 4716-4723.
- Yildirim E, Karlidag H, Turan M (2009) Mitigation of salt stress in strawberry by foliar K, Ca and Mg nutrient supply. *Plant, Soil and Environment* 55:213-221.