Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 39, No. 3, Page 415-432 (2023)

DOI: 10.22092/ijmapr.2023.361047.3273
DOR: 20.1001.1.17350905.1402.39.3.7.6

Variation of growth indices and expression of 1- deoxyxylulose 5-phosphate reductase isomerase (DXR) gene under the effect of salicylic acid and chitosan in *Thymbra spicata* L. with different irrigation levels

Maryam Momeni[1], Abdollah Ghasemi Pirbalouti[2], Amir Mousavi[3*] and Hassanali Naghdi Badi[4]

1- Department of Horticultural Science and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Research Center for Medicinal Plants, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3*- Corresponding author, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
4- Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahed University, Tehran, Iran

Received: January 2023 Revised: April 2023 Accepted: May 2023

Abstract

Background and objectives: *Thymbra spicata* L. belongs to the Lamiaceae family and is a rich source of aromatic compounds and essential oils. This research was conducted to study the effect of salicylic acid and chitosan elicitors on the growth indicators and DXR gene expression in *T. spicata* L. under different levels of irrigation towards enhancing the performance of this medicinal plant in experimental pots in a greenhouse in Ilam province during 2017-18.

Methodology: A factorial design was used with 15 treatments and three replications in a completely randomized study. Irrigation regimes at three levels of normal (A_1), 70% of field capacity (A_2), 40% of field capacity (A_3), and foliar spraying at five levels, including control (B_1), chitosan at concentrations of 0.5 $g.l^{-1}$ (B_2) and 1 $g.l^{-1}$ (B_3), salicylic acid foliar spraying at concentrations of 2.5 mM (B_4) and 5.0 mM (B_5) were used at the 10-12 leaf stage. To prepare chitosan and salicylic acid elicitors, the powders were dissolved in 5% acetic acid and then adjusted to desired concentrations with ddH2O. Irrigation regimes were applied three months after cultivation (15-20 cm seedlings). To apply the elicitors simultaneously with the water stress treatment, foliar spraying was done three times at ten-day intervals. Quantitative RT-PCR was used to investigate the expression changes of the DXR gene, which is one of the key genes in the carvacrol biosynthesis pathway. In this regard, total RNA was extracted, and cDNA was synthesized after assessment of its quantity and quality. With the aid of specific primers, the target sequence was amplified. Furthermore, using the GAPDH reference gene reported in Hyssop thyme, the gene expression level was investigated through the relative quantification method. The method of difference in cycle threshold (2-ΔΔCT) and Relative Expression Software Tool (REST) were used to analyze the data.

Results: The analysis of the variance table showed the effect of different levels of irrigation on all quantitative growth indices, including plant height, root length, number of main branches, root fresh and dry weight, leaf fresh weight, stem fresh and dry weight, except leaf dry weight, were significant (p<0.01). The interactive effect of low irrigation and foliar spray of salicylic acid and chitosan on root fresh weight, leaf fresh weight, and stem fresh weight was significant at 1%. Accordingly, the interaction effect of irrigation and foliar spraying on the dry weight of the stem was significant at the 5% probability level. The results showed that the interactive effect of irrigation and foliar spray on leaf dry weight, number of main branches, and root length was insignificant. In this study, DXR gene expression did not show many changes after applying two different levels of chitosan (0.5 and 1.0 $g.l^{-1}$). In contrast, salicylic acid treatment

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

with 2.5 mM was significant at 1% probability and caused an increase in gene expression. The transcript level of this gene increased 29.72 times after applying 5.0 mM of this solution, which was significant at the 1% level. The amount of low irrigation decreased this gene's expression.
Conclusion: Based on the obtained data, the normal irrigation method is the most suitable for hyssop thyme plants regarding their growth indicators. Foliar spraying of chitosan at different levels did not significantly affect growth indices and DXR gene expression. At the same time, salicylic acid increased them in this species. As a result, salicylic acid elicitor can increase carvacrol yield and biosynthesis.

Keywords: *Thymbra spicata* L., Salicylic Acid, Different levels of irrigation, Chitosan, DXR.

تغییرات شاخص‌های رشدی و بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز (DXR) تحت تأثیر سالیسیلیک اسید و کیتوزان در *Thymbra spicata* L. در سطوح مختلف آبیاری

مریم مؤمنی[۱]، عبداله قاسمی پیربلوطی[۲]، امیر موسوی[۳*] و حسنعلی نقدی بادی[۴]

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم زراعی و باغی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استاد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳*- دانشیار، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، پست الکترونیک: m-amir@nigeb.ac.ir

۴- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: آویشن زوفایی (*Thymbra spicata* L.) گیاهی از تیره نعنائیان (Lamiaceae) منبعی غنی از ترکیب‌های معطر و اسانس است. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر الیسیتورهای سالیسیلیک اسید و کیتوزان بر شاخص‌های رشدی و بیان ژن ۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز (DXR) در این گیاه تحت تأثیر سطوح مختلف آبیاری در راستای افزایش بهره‌وری این گیاه دارویی، به صورت کشت گلدانی و در شرایط گلخانه‌ای در استان ایلام در سال ۹۷-۱۳۹۶ انجام شد.

مواد و روش‌ها: آزمایش مورد نظر به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۵ تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آبیاری در سه سطح نرمال (A_1)، آبیاری ۷۰٪ ظرفیت مزرعه (A_2)، آبیاری ۴۰٪ ظرفیت مزرعه (A_3) و تیمار محلول‌پاشی در پنج سطح که شامل تیمار شاهد (B_1)، تیمارهای کیتوزان در غلظت‌های ۰/۵ گرم در لیتر (B_2) و ۱ گرم در لیتر (B_3)، محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۲/۵ میلی‌مولار (B_4) و ۵ میلی‌مولار (B_5) اعمال شد. محلول‌پاشی در مرحله ۱۰ تا ۱۲ برگی انجام شد. برای استفاده از الیسیتورهای کیتوزان و اسید سالیسیلیک، پودر آنها را در اسید استیک ۵٪ حل کرده و بعد در آب مقطر با غلظت‌های مختلف محلول‌ها آماده شدند. سه ماه بعد از کاشت (بوته‌ها در ارتفاع ۲۰-۱۵ سانتی‌متری) اقدام به اعمال تیمارهای تنش آبی شد. برای اعمال الیسیتورها، همزمان با تیمار تنش آبی، طی سه نوبت به فواصل ده روزه، محلول‌پاشی انجام گردید. برای بررسی تغییرات بیان ژن *DXR* به‌عنوان یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز کارواکرول، از روش RT-PCR کمّی استفاده شد. در همین راستا، RNA تام از نمونه‌ها استخراج و کمّیت و خلوص آنها ارزیابی و تأیید شد. سپس cDNA سنتز و از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر توالی هدف استفاده شد. با استفاده از ژن مرجع GAPDH مربوط به آویشن زوفایی، میزان بیان ژن به روش سنجش نسبی بررسی شد. برای آنالیز داده‌ها از روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه ($2^{-\Delta\Delta CT}$) و نرم‌افزار Relative Expression Software Tool (REST) استفاده گردید.

نتایج: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد سطوح مختلف آبیاری بر همه شاخص‌های کمّی رشد شامل ارتفاع گیاه، طول ریشه، تعداد انشعابات اصلی شاخه، وزن‌تر و خشک ریشه، وزن‌تر برگ، وزن‌تر و خشک ساقه بجز وزن خشک برگ معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$). اثر متقابل کم‌آبیاری و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و کیتوزان بر وزن تر ریشه، وزن تر برگ و وزن تر ساقه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. براساس همین نتایج، شاخص وزن خشک ساقه در تیمار اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که اثر متقابل تیمار آبیاری و محلول‌پاشی بر وزن خشک برگ، تعداد انشعابات اصلی بوته و طول ریشه معنی‌دار نبود. در این پژوهش، بیان ژن DXR بعد از اعمال دو غلظت مختلف کیتوزان (۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر) تغییرات چندانی از خود نشان نداد، در حالی که تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود و سبب افزایش بیان ژن DXR شد. سطح رونوشت این ژن بعد از اعمال تیمار ۵ میلی‌مولار این محلول به اندازه ۲۹/۷۲ برابر افزایش پیدا کرد که در سطح

۱٪ معنی‌دار بود. میزان کم‌آبیاری، بیان این ژن را کاهش داد.
نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده نشان داد که بهترین نوع آبیاری، آبیاری نرمال بود تا گیاه آویشن زوفایی بتواند در شاخص‌های رشدی در وضعیت مطلوبی قرار گیرد. محلول‌پاشی کیتوزان در غلظت‌های مختلف اثر معنی‌داری بر وزن خشک، وزن تر و بیان ژن DXR نشان نداد؛ در حالی که اسید سالیسیلیک در افزایش شاخص‌های رشدی تأثیرگذار بود و بیان ژن DXR نیز همزمان در گونه مذکور در طی محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک افزایش پیدا کرد که می‌تواند حکایت از تأثیر مثبت این الیسیتور در افزایش عملکرد و سنتز مواد موثره ارزشمند ازجمله کارواکرول باشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن زوفایی (*Thymbra spicata* L.)، سالیسیلیک اسید، سطوح مختلف آبیاری، کیتوزان، DXR.

مقدمه

بخش بزرگی از بازار گیاهان دارویی دنیا به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود، ازاین‌رو بیشتر مواد مؤثره گیاهان دارویی از ارزش اقتصادی و نیز ارزش‌افزوده بسیار بالایی برخوردارند (Zhao, 2005). از سوی دیگر، به دلیل اثرهای سوء ناشی از مصرف روزافزون داروهای شیمیایی گرایش مردم در بیشتر نقاط جهان به استفاده از گیاهان دارویی رو به افزایش است. با توجه به اهمیت متابولیت‌های ثانویه، باید به دنبال راهکارهایی برای افزایش این ترکیبات در گیاهان دارویی بود که استفاده از الیسیتورها (محرک‌ها) و ارزیابی برهم‌کنش آنها با تنش‌های محیطی یکی از این راهکارها به‌حساب می‌آید.

الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیر زیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی و تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان می‌شوند (Namdeo, 2007). الیسیتورهای زیستی نقش مؤثری در افزایش کمّیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی و معطر دارند (Emami Bistgani *et al*., 2017؛ Goudarzian *et al*., 2020) و از بین عوامل بوم‌شناسی، تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده به‌ویژه تنش خشکی در بیوسنتز ترکیبات ثانویه نقش بسیار مهمی دارد (Babaei *et al*., 2021؛ khosh Eqbal *et al*., 2020؛ Ahmadi *et al*., 2020). تنش خشکی اثرهای نامطلوبی بر رشد و فعالیت‌های متابولیکی گونه‌های گیاهی دارد و تغییرات معنی‌داری بر عملکرد و ترکیبات متابولیکی گیاه می‌گذارد (Ghasemi Pirbalouti *et al*., 2013)، استفاده از الیسیتورهای کیتوزان و سالیسیلیک اسید با توجه به تحقیقات انجام‌شده بر روی گیاهان دارویی دیگر، می‌تواند راهکار مؤثری در جهت تعدیل تنش خشکی محسوب گردد. کیتوزان یک نوع پلی‌ساکارید به‌عنوان الیستور زیستی در بیوسنتز ترکیبات ثانویه در گونه‌های متعددی در گیاهان دارویی و معطر مورد تأیید است (Emami Bistgani *et al*., 2017؛ Goudarzian *et al*., 2020؛ Ghasemi Pirbalouti *et al*., 2017). برای نمونه، در بررسی که روی اثر محلول‌پاشی کیتوزان بر کتان (*Linum album* L.) انجام شد، نتیجه نشان داد که مواد مؤثره فنلی افزایش پیدا کرد (Esmaeilzadeh Bahabadi *et al*., 2012). در بررسی اثر غلظت‌های مختلف الیگومرهای کیتوزان برای تولید پلی‌فنول‌ها در گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum vulgare*) که توسط Heng و همکاران (۲۰۱۲) انجام شده، نتایج نشان داده است که کیتوزان در غلظت‌های ppm ۲۰۰ و ppm ۵۰۰ باعث افزایش رشد گیاه می‌شود. اسید سالیسیلیک بر رشد و عملکرد گیاهان تأثیر زیادی داشته است، این ماده می‌تواند به عنوان یک راهکار ارزشمند به‌ویژه در عرصه فعالیت‌های نوین کشاورزی در مورد گیاهان دارویی مطرح شود که نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان دارد (Hussein *et al*., 2007). برای نمونه، تنش خشکی ضمن افزایش اسانس در گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum*)، سبب افزایش کیفیت اسانس نیز

شده است (Ramroudi & Khmer, 2013). گیاه دارویی آویشن زوفایی از تیره نعناعیان (Lamiaceae) با نام علمی *Thymbra spicata* L. می‌باشد که در ایران و کشورهای حاشیه شرقی دریای مدیترانه می‌روید. این گیاه به‌عنوان منبع غنی از فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و ایزوپرنوئیدها مانند کارواکرول و تیمول شناخته‌شده است (Maskan & Horuz, 2017). اسانس گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان، ضد قارچ و ضد باکتری است (Kizil, 2010). در بررسی اثر سطوح تنش رطوبتی بر عملکرد، میزان اسانس و خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه زوفایی، نتایج ارائه شده نشان داده است که سطوح مختلف تیمارهای تنش رطوبتی بر صفات مورد بررسی ازجمله عملکرد خشک برگ و بوته، درصد و عملکرد اسانس، شاخص سطح برگ، ارتفاع بوته و رنگیزه‌های فتوسنتزی تأثیر معنی‌داری در جهت افزایش این شاخص‌ها داشته است (Malk Maleki *et al*., 2017).

با توجه به وجود مواد آنتی‌اکسیدانی و ترکیباتی مانند کارواکرول و تیمول در آویشن زوفایی (Maskan & Horuz, 2017) و اهمیت اقتصادی این ترکیبات و از سویی نقش الیسیتورها در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهان، این پژوهش در راستای بررسی اثر کیتوزان و اسید سالیسیلیک بر خصوصیات مرفولوژیکی، فیتوشیمیایی و بیان یکی از ژن‌های مهم در مسیر بیوسنتز کارواکرول (۱- دئوکسی گزیلولوز ۵- فسفات ردوکتاز ایزومراز) در سطوح مختلف آبیاری انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه آویشن زوفایی (*Thymbra spicata* L.) از مرکز خدمات تخصصی گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی واحد ایلام تهیه گردید. کاشت گیاهان در گلخانه جهاد دانشگاهی ایلام واقع در بانگنجاب در گلدان‌هایی با ارتفاع ۲۵ سانتی متر حاوی خاک (پیت ماس، کوکوپیت، پرلیت، ماسه بادی و کود حیوانی به نسبت ۲:۲:۱:۱:۱) با کاشت ۵ تا ۸ بذر انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۵ تیمار و سه تکرار (هر تکرار شامل ۱۲ گلدان) انجام شد. تیمارهای آبیاری در سه سطح نرمال، آبیاری ۷۰٪ ظرفیت مزرعه، آبیاری ۴۰٪ ظرفیت مزرعه و تیمار محلول پاشی در پنج سطح شامل شاهد، تیمارهای کیتوزان در غلظت‌های ۰/۵ گرم در لیتر و ۱ گرم در لیتر، محلول پاشی سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۲/۵ میلی‌مولار و ۵ میلی‌مولار در مرحله ۱۰ تا ۱۲ برگی اعمال شد. کاشت در آبان‌ماه ۱۳۹۶ در گلخانه جهاد دانشگاهی ایلام انجام شد. در ارتفاع ۱۵ تا ۲۰ سانتی متری گیاه، دور آبیاری براساس تیمارهای تنش کم آبی اعمال شد. محلول‌پاشی بعد از اعمال تنش کم‌آبی، در سه نوبت به فاصله ۱۰ روز انجام شد. برای استفاده از الیسیتورهای کیتوزان و اسید سالیسیلیک، ابتدا پودر آنها را در اسید استیک ۵٪ حل کرده و بعد در آب مقطر با غلظت های مختلف تهیه شد. قبل از گلدهی برداشت انجام شد. برای اندازه‌گیری درصد ماده خشک اندام‌های مختلف گیاه، نمونه‌ها در دستگاه آون به مدت ۴۸ ساعت با دمای بین ۷۰ تا ۷۲ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. برای اندازه‌گیری ارتفاع ساقه از خط‌کش استفاده شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک هم از ترازویی با دقت یک هزارم استفاده شد. برای بررسی بیان ژن، ابتدا استخراج RNA کل به وسیله کیت RibospinTM Plant ساخت شرکت GeneAll کره جنوبی طبق دستورالعمل مربوط انجام شد. برای بررسی کمّیت و خلوص RNA استخراج شده، ابتدا از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, Nanodrop, 2000C, USA) و نیز برای تعیین کیفیت RNA استخراج‌شده از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. cDNA با استفاده از کیت ترمو (شرکت Fermentas) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد.

به‌منظور بررسی تغییرات در میزان رونوشت ژن DXR از طریق روش RT-PCR در زمان واقعی (qRT-PCR)، آغازگرهای اختصاصی برای ژن مورد نظر با استفاده از برنامه Primer Quest موجود در سایت IDT Integrated DNA Technologies طراحی و برای سنتز به شرکت تکاپوزیست ارسال شد (جدول ۱). در طراحی آغازگرها،

طول آغازگر (۱۰۰ تا ۱۳۰bp)، درصد GC (۶۰-۴۰٪)، مکمل نبودن آغازگرها با هم و احتمال تشکیل ساختارهای حلقه‌ای مورد توجه قرار گرفت. غلظت پایه آغازگرها پس از سنتز، ۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر بود که توسط آب استریل دوبار تقطیر به غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر رسید. از ژن GAPDH مربوط به گیاه آویشن (*Thymus vulgaris*) به عنوان ژن مرجع در کمّی‌سنجی نسبی استفاده شد (GenBank: HM153755.1). برای اطمینان از طراحی صحیح و عملکرد اختصاصی آغازگرها و پیدا کردن بهترین دمای اتصال به cDNA سنتز شده، واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر T100 (BioRad USA) به‌صورت شیب دمایی انجام شد. برنامه دمایی و مخلوط واکنش PCR به‌ترتیب در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای رفت و برگشت استفاده‌شده در آزمون qRT-PCR
Table 1. Characteristics of forward and reverse primers used in qRT-PCR

Gene	Primer	5'-->3' Sequence	Temperature Annealing (°C) IDT	(bp)
GAPDH	F	CATTCAACATTATTCCCAGCAG	57	192
	R	CGGATTCCTCCTTGATAGCC	57	
DXR	F	GAGGCTCACTATTTGTTTGGG	57	100
	R	ACAGATGAATCCTGTGTTTCG	57	

جدول ۲- چرخه‌های دمایی استفاده شده برای انجام آزمون PCR
Table 2. Temperature cycles used to perform PCR

Number of cycles	Level	Time	Temperature (°C)
1	Primary Denaturation	5 min	95
35	Denaturation	30 min	95
	Junction	30 min	52
	Extension	45 min	72
1	Final Extension	10 min	72

جدول ۳- مواد مورد نیاز برای انجام PCR
Table 3. Materials used to perform PCR

Reaction components	Volume (µl)
10xPCR buffer	2.5
$MgCl_2$	1
dNTPs	0.5
Forward primer	1
Reverse primer	1
Taq polymerase	0.2
cDNA	2
Distilled water	16.8
Total	25

برای واکنش qRT-PCR از دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR System شرکت ABI (Applied Biosystem Incorporation) و کیت HiFi SYBR Mix Plus ساخت شرکت مبنا طب استفاده شد. برای هر ژن دو تکرار بیولوژیکی (از دو گیاه متفاوت) و دو تکرار تکنیکی (دو تکرار برای هر cDNA) در نظر گرفته شد. همچنین میکروتیوب‌های مخصوص واکنش Real-time PCR نیز از شرکت APPLIED BIOSYSTEM تهیه شد. مواد لازم برای انجام واکنش qRT-PCR در جدول ۴ و برنامه دمایی در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۴- مواد مورد نیاز برای انجام qRT-PCR

Table 4. Materials used to perform qRT-PCR

Reaction mixture	Volume (µl)
Sterile double distilled water	4
Leading initiator	1
Returned initiator	1
cDNA diluted 1/10	2
HiFi SYBR Mix Plus	2
Total	10

جدول ۵- برنامه دمایی استفاده شده برای انجام qRT-PCR

Table 5. Temperature program used to perform qRT-PCR

Number of cycles	Level	Time	Temperature (°C)
1	Primary denaturation	10 min	95
4	Denaturation	15 sec	95
	Junction	20 sec	58
	Extension	20 sec	72
1	Denaturation	15 sec	95
	Annealing & Extension	60 min	60

برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های بدست‌آمده از روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه ((Delta Delta Cycle Threshold) ΔΔCT) استفاده شد که ابتدا چرخه آستانه برای نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع، نرمال‌سازی (Normalization) شد و بعد تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده روابط شرح داده شده توسط Livak و Schmittgen (۲۰۰۱) و نرم‌افزار REST® (Relative Expression Software Tool) محاسبه شد. در این طرح، برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. داده‌های بدست‌آمده حاصل از سنجش‌های مختلف، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و آزمون LSD مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند. تجزیه واریانس‌ها نیز با ضریب اطمینان ۹۵٪ ($P\leq 0/05$) انجام و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 رسم شد.

نتایج

براساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۶)، دور آبیاری بر ارتفاع گیاه تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ نشان داد و بیشترین ارتفاع (۳۲/۱۶ سانتی‌متر) در تیمار نرمال آبیاری، کمترین در آبیاری ۴۰٪ ظرفیت مزرعه بود و در تیمار اسید سالیسیلیک ۵ میلی‌مولار نیز ۲۴٪ افزایش ارتفاع بوته نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول ۶).

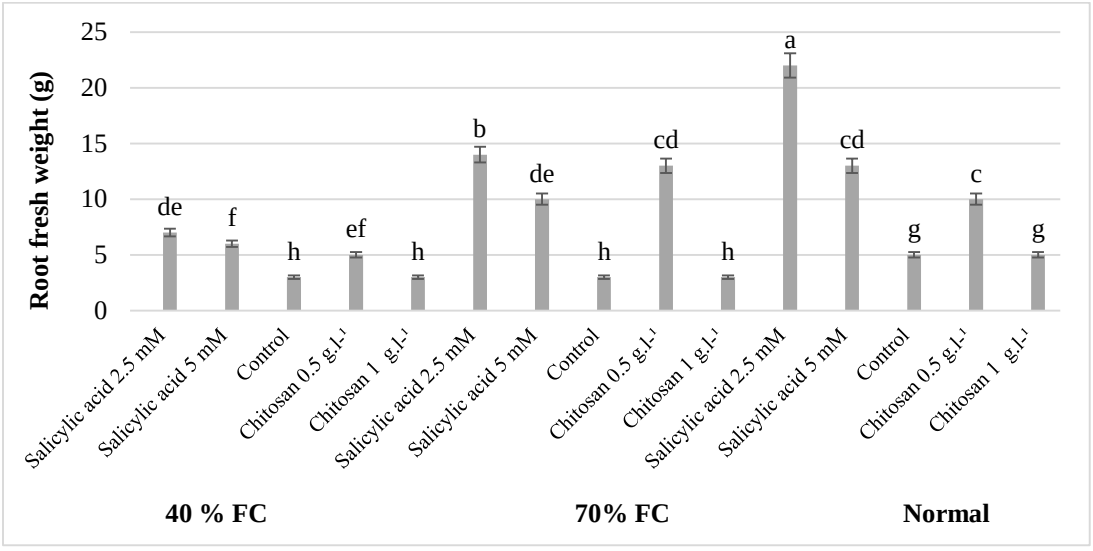
جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و کیتوزان روی شاخص‌های کمّی رشد آویشن زوفایی (***Thymbra spicata***) در شرایط سطوح مختلف آبیاری

Table 6. ANOVA of salicylic acid and chitosan foliar application effects on quantitative growth indices of *Thymbra spicata* under different irrigation levels

S.O.V.	d.f.	Plant height	Root fresh weight	Stem fresh weight	Leaf fresh weight	Root dry weight	Stem dry weight	Leaf dry weight	Number of main branches	Root length
Irrigation	2	147.3**	67.14**	134.6**	88.2**	5.39**	4.30**	2.56^{ns}	29.38**	100.3**
Foliar application	4	97.85**	154.1**	160.9**	72.6**	9.23**	5.0^{ns}	5.14^{ns}	61.91**	91.18**
Irrigation ×Foliar application	8	6.27^{ns}	16.12**	242.9**	4.27**	0.98**	0.26*	6.12 ^{ns}	3.1^{ns}	2.32^{ns}
Experimental error	31	5.38	0.32	0.75	0.36	0.12	0.11	5.29	2.68	2.27
C.V. (%)		7.93	7.66	9.76	4.25	14.93	12.54	12.7	14.89	5.97

n.s., *, and **: non-significant, significant at 1, and 5% probability levels, respectively

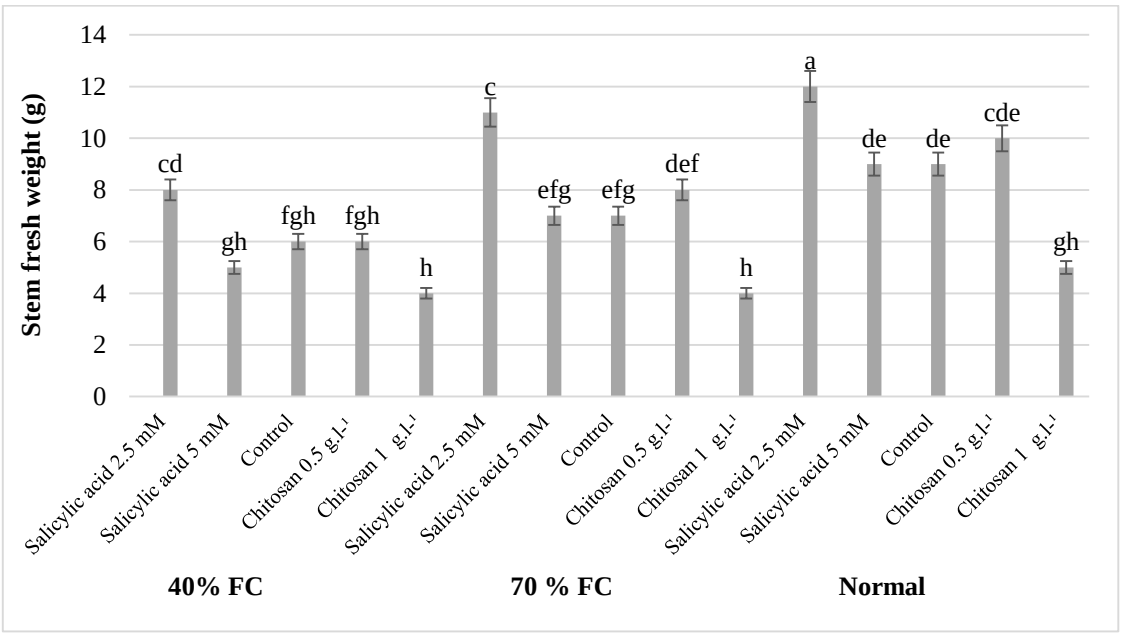
بیشترین وزن تر ریشه در تیمار آبیاری نرمال و مصرف ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و کمترین مقدار نیز در تیمار تنش ۴۰٪ ظرفیت زراعی در زمان عدم مصرف کیتوزان و سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در تمامی سطوح دور آبیاری، همواره بیشترین وزن تر ریشه در تیمار ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و کمترین مقدار آن، در نمونه شاهد مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- اثر سطوح مختلف آبیاری × محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و کیتوزان بر وزن تر ریشه آویشن زوفایی

Figure 1. Different irrigation levels × salicylic acid and chitosan foliar application effects on *Thymbra spicata* root fresh weight

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



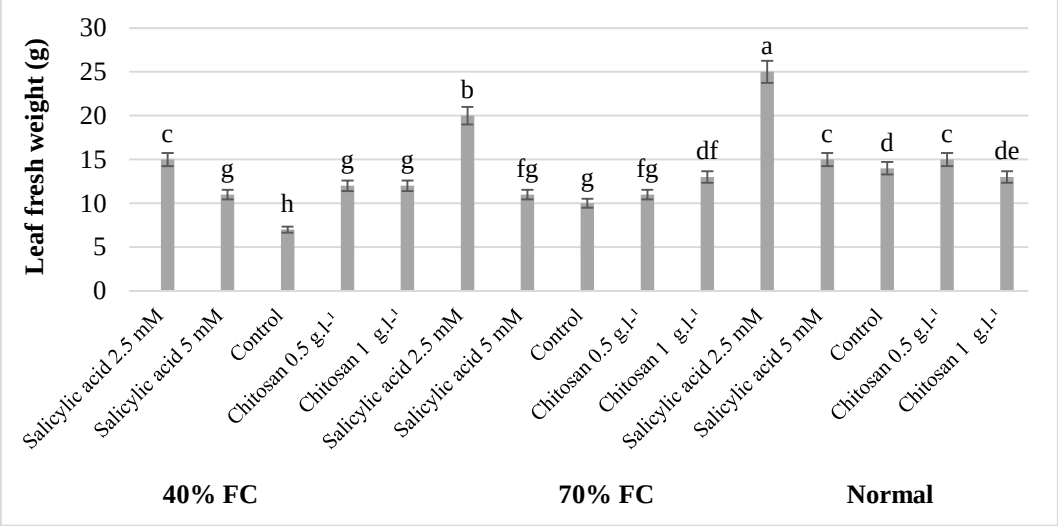
شکل ۲- اثر سطوح مختلف آبیاری × محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و کیتوزان بر وزن تر ساقه آویشن زوفایی

Figure 2. Different irrigation levels × salicylic acid and chitosan foliar application effects on *Thymbra spicata* stem fresh weight

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

بیشترین وزن تر ساقه در تیمار آبیاری نرمال و مصرف ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و کمترین مقدار نیز در تیمار تنش ۴۰٪ ظرفیت زراعی و عدم مصرف کیتوزان یا سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در تمامی سطوح دور آبیاری، همواره بیشترین و کمترین وزن تر ساقه به‌ترتیب در تیمارهای مصرف ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و شاهد دیده شد (شکل ۲).

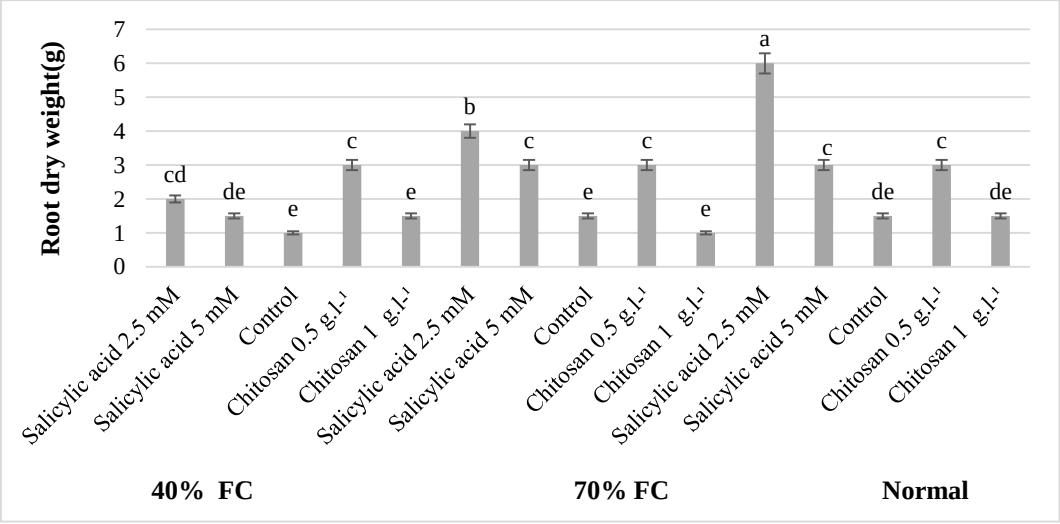
بیشترین وزن تر برگ در تیمار آبیاری نرمال و مصرف ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به مقدار ۲۳/۵ گرم و کمترین مقدار نیز در تیمار تنش ۴۰٪ ظرفیت زراعی و عدم مصرف کیتوزان یا سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در تمامی سطوح دور آبیاری، همواره بیشترین و کمترین وزن تر برگ به‌ترتیب در تیمارهای مصرف ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و شاهد دیده شد (شکل ۳).



شکل ۳- اثر سطوح مختلف آبیاری × محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و کیتوزان بر وزن تر برگ آویشن زوفایی

Figure 3. Different irrigation levels × salicylic acid and chitosan foliar application effects on *Thymbra spicata* leaf fresh weight

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

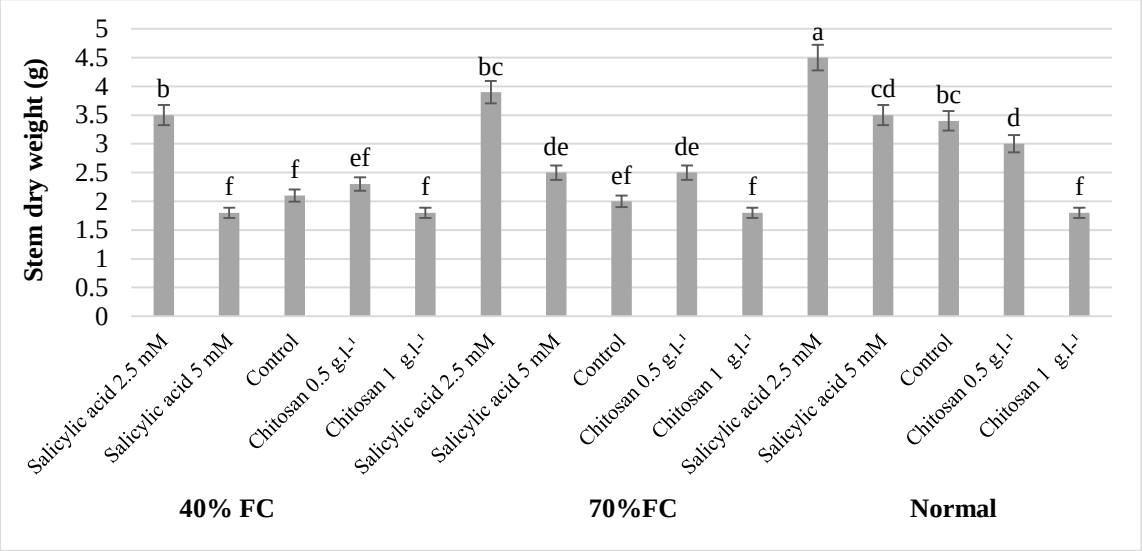


شکل ۴- اثر متقابل دور آبیاری و محلول‌پاشی بر وزن خشک ریشه در آویشن زوفایی

Figure 4. Interaction effect of irrigation cycle and foliar spraying on root dry weight in *T. spicata*

بیشترین وزن خشک ریشه در تیمار آبیاری نرمال و مصرف ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و کمترین مقدار نیز در تیمار تنش ۴۰٪ ظرفیت زراعی و عدم مصرف کیتوزان یا سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در تمامی سطوح دور آبیاری، همواره بیشترین و کمترین وزن خشک ریشه به‌ترتیب در تیمارهای مصرف ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و شاهد دیده شد (شکل ۴).

بیشترین وزن خشک ساقه در تیمار آبیاری نرمال و مصرف ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و کمترین مقدار نیز در تیمار تنش ۴۰٪ ظرفیت زراعی و عدم مصرف کیتوزان یا سالیسیلیک اسید بود و در تمامی سطوح آبیاری، همواره بیشترین و کمترین وزن خشک ساقه به‌ترتیب در تیمارهای مصرف ۲/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و شاهد بدست آمد (شکل ۵).



شکل ۵- اثر سطوح مختلف آبیاری × محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و کیتوزان بر وزن خشک ساقه آویشن زوفایی

Figure 5. Different irrigation levels × salicylic acid and chitosan foliar application effects on *Thymbra spicata* stem dry weight

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

بیشترین انشعابات شاخه اصلی در تیمار آبیاری شاهد و کمترین در تنش ۴۰٪ ظرفیت مزرعه مشاهده شد. اثر محلول‌پاشی بر تعداد انشعابات شاخه اصلی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار و بیشترین میزان آن در تیمار ۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. دور آبیاری بر طول ریشه اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ نشان داد و در دور آبیاری ۴۰٪ کمترین طول ریشه و در تیمار با اسید سالیسیلیک ۲/۵ میلی‌مولار، بیشترین طول ریشه مشاهده شد (جدول ۷).

تأثیر الیسیتورها بر بیان ژن DXR مسیر بیوسنتزی آویشن زوفایی

با توجه به اثرهای محرکی برخی الیسیتورها در بیوسنتز ترپنوئیدها، نقش این مولکول‌های پیام‌رسان در افزایش القاء سطح رونوشت ژن‌های مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها مورد توجه قرارگرفته است. بر این اساس، یکی از ژن‌های مسیر بیوسنتزی کارواکرول برای بررسی تغییرات بیانشان در گیاه آویشن زوفایی تیمار شده با الیسیتورهای اسید سالیسیلیک و کیتوزان در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار در مقایسه با گیاهان شاهد با استفاده از روش qRT-PCR ارزیابی شد. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، الگوی الکتروفورزی نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. وضوح دو باند مربوط به ۲۸s rRNA و ۱۸s rRNA روی ژل، نشان‌دهنده کیفیت RNA کل استخراج شده بود (شکل ۶- a).

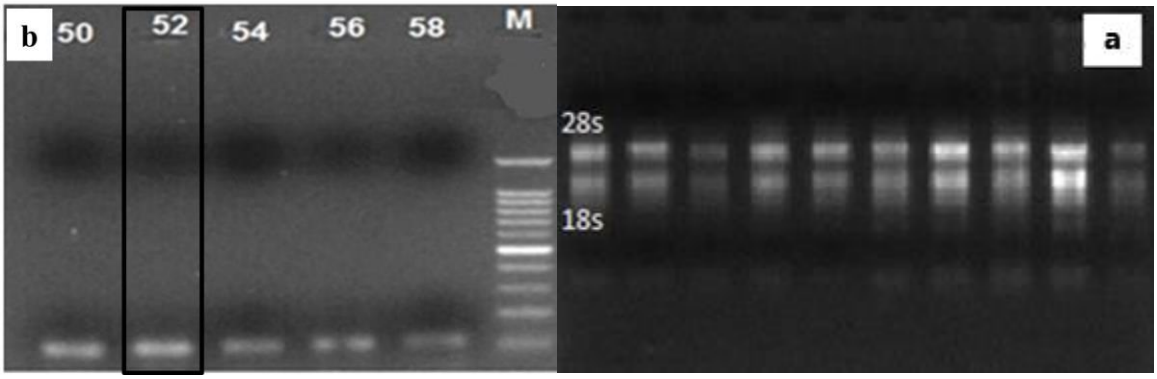
جدول ۷– مقایسه میانگین شاخص‌های کمّی رشد آویشن زوفایی (***Thymbra spicata***) در شرایط سطوح مختلف آبیاری تحت تأثیر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و کیتوزان

Table 7. Means comparison of quantitative growth indices of *Thymbra spicata* under different irrigation levels affected by salicylic acid and chitosan foliar application

Treatment	Plant height (cm)	Root fresh weight (g)	Stem fresh weight (g)	Leaf fresh weight (g)	Root dry weight (g)	Stem dry weight (g)	Leaf dry weight (g)	Number of main branches	Root length (cm)
Irrigation									
Normal	32.16±1.6^{a}	9.517±1.8^{a}	7.82±0.98^{b}	16.4±1.76^{a}	28.38±2.89^{a}	12.27±2.21^{a}	3.92±1.1	3.27±0.76^{a}	2.93±0.54^{a}
irrigation in 70 % field capacity	29.2±1.7^{b}	7.2±31.65^{b}	6.83±1.12^{c}	13.92±1.43^{b}	26.05±3.02^{b}	11±2.02^{b}	3.1±1.2	2.61±0.86^{b}	2.38±0.65^{b}
irrigation in 40 % field capacity	26.4±1.5^{c}	5.67±1.76^{c}	11.99±1.21^{a}	12.06±1.76^{c}	23.6±3.14^{c}	9.7±2.12^{c}	3.38±1.3	2.316±0.45^{c}	1.8±0.43^{c}
Foliar application									
Control	32.16±1.6^{a}	9.517±1.8^{a}	6.53±1.01^{b}	11.5±2.05^{b}	22.33±3.43^{c}	7.66±0.94^{c}	4.58±1.01	2.76±0.32^{a}	1.56±0.32^{bc}
Salicylic acid (2.5 mM)	29.2±1.7^{b}	7.2±31.65^{b}	6.57±0.93^{b}	13.3±2.14^{a}	30.22±4.12^{a}	11.3±1.43^{b}	3.08±0.97	2.64±0.33^{ab}	2.44±0.21^{ab}
Salicylic acid (5 mM)	26.4±1.5^{c}	5.67±1.76^{c}	7±0.87^{b}	13.42±2.54^{a}	29±3.98^{a}	15.4±2.02^{a}	3.21±1.03	2.77±0.38^{a}	2.8±0.18^{a}
Chitosan (0.5 g.l^{-1})	32.16±1.6^{a}	9.517±1.8^{a}	17.03±2.65^{a}	13.43±2.77^{a}	23.8±3.12^{c}	10.55±1.76^{bc}	2.6±1.12	1.93±0.28^{c}	1.42±0.21^{c}
Chitosan (1 g.l^{-1})	29.2±1.7^{b}	7.2±31.65^{b}	6.60±0.76^{b}	13.5±2.65^{a}	27±3.17^{b}	11.66±1.80^{b}	3.17±1.08	2.18±0.41^{b}	1.8±0.25^{b}

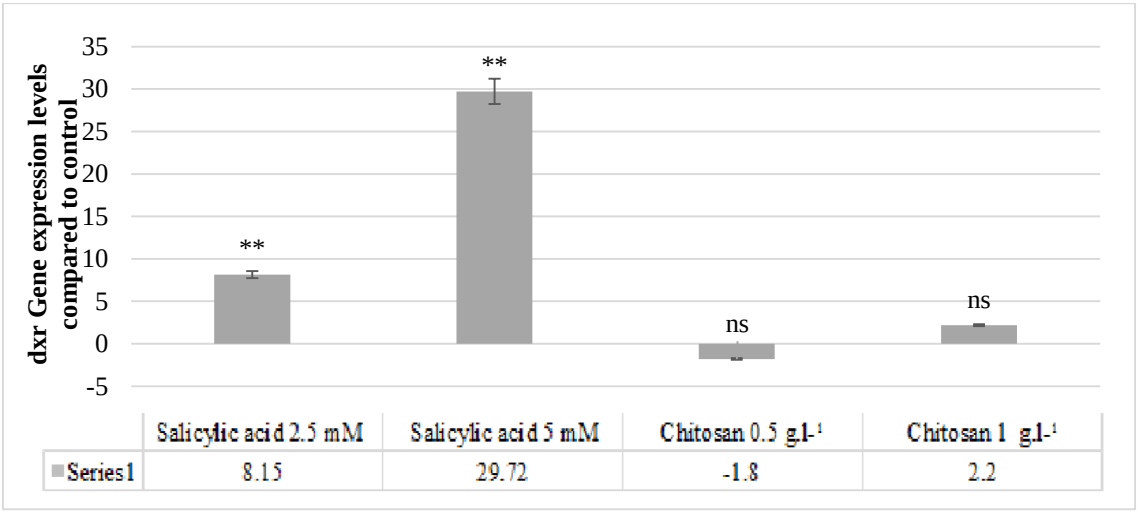
In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

همچنین غلظت RNA استخراج‌شده با استفاده دستگاه نانودراپ در حدود ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. نسبت جذب نوری طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر نشان‌دهنده عدم آلودگی RNA استخراجی بود (شکل ۶- b).



شکل ۶- **a**: الگوی الکتروفورزی نمونه‌های **RNA** تام استخراج شده از آویشن زوفایی (***Thymbra spicata***) تیمارشده با الیسیتورهای اسید سالیسیلیک و کیتوزان روی ژل آگارز ۱٪؛ **b**: نتایج واکنش **PCR** برای ژن **DXR** روی ژل آگارز ۱٪

Figure 6. a: Electrophoretic pattern of total RNA samples extracted from *Thymbra spicata* treated with salicylic acid and chitosan elicitors on 1% agarose gel; b: PCR results for DXR gene on 1% agarose gel
(Each reaction annealing temperature is observed above the corresponding well), M: 1Kb molecular weight marker (Fermentas)



شکل ۷- تأثیر غلظت و نوع الیسیتور بر میزان رونویسی نسبی ژن **DXR** طی آبیاری نرمال آویشن زوفایی

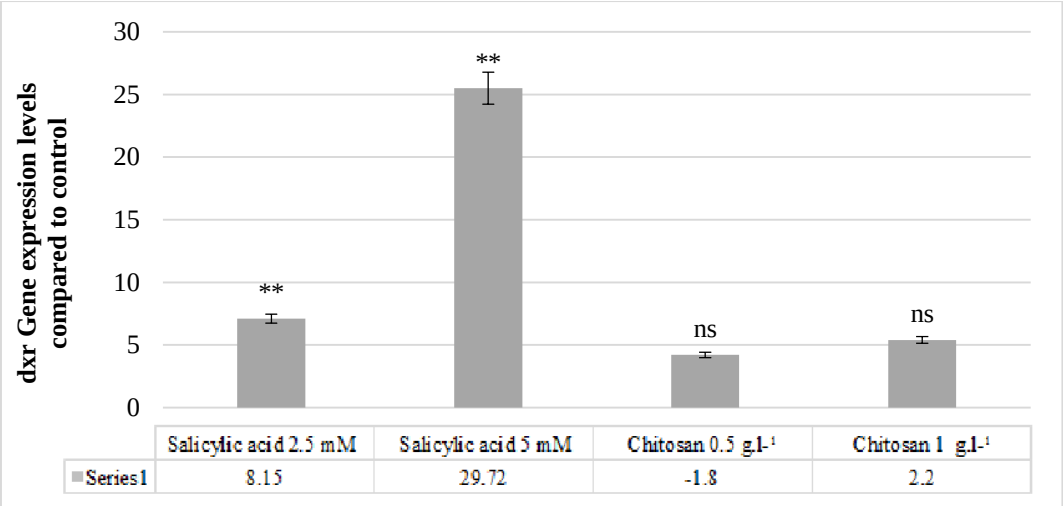
Figure 7. Concentration and elicitor type effects on relative transcription of DXR gene during normal irrigation in *Thymbra spicata*
Means comparison at 5% probability level (Duncan test)

برای اطمینان از کارکرد اختصاصی آغازگرهای طراحی‌شده و تعیین بهترین دمای اتصال این آغازگرها به رشته الگو، از PCR با شیب دمایی استفاده شد و مناسب‌ترین دما برای حداکثر کارایی آغازگرهای طراحی‌شده (۵۲ درجه سانتی‌گراد) تعیین شد (شکل ۶).

در آبیاری نرمال، بیان ژن DXR بعد از اعمال دو غلظت مختلف کیتوزان (۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر) تغییرات معنی‌داری نشان نداد (شکل ۷)، اما در تیمار با سالیسیلیک اسید با

غلظت ۲/۵ میلی‌مولار نسبت به گیاهان شاهد بیان ژن افزایش پیدا کرد و در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد.

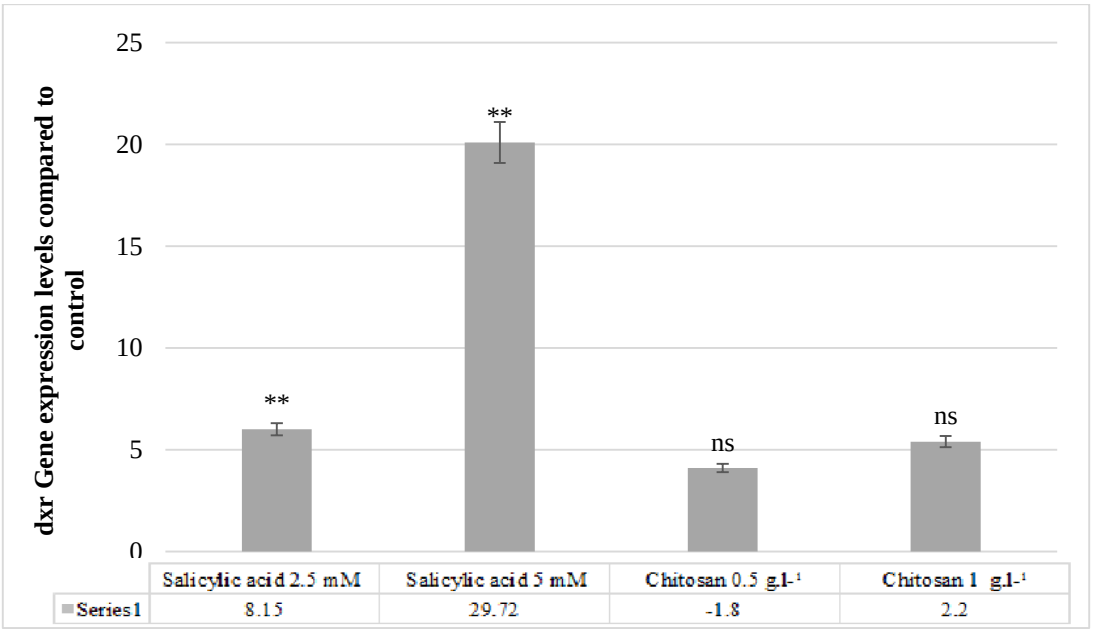
در آبیاری ۷۰٪، بیان ژن DXR بعد از اعمال دو غلظت مختلف کیتوزان (۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر) تغییرات چندانی نشان نداد (شکل ۸)، اما در تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار نسبت به گیاهان شاهد افزایش بیان ژن مشاهده شد.



شکل ۸- تأثیر غلظت و نوع الیسیتور بر میزان رونویسی نسبی ژن **DXR** در سطح آبیاری ۷۰٪ ظرفیت زراعی آویشن زوفایی

Figure 8. Concentration and elicitor type effects on relative transcription of DXR gene at 70% of field capacity irrigation level in *Thymbra spicata*

Means comparison at 5% probability level (Duncan test)



شکل ۹- تأثیر غلظت و نوع الیسیتور بر میزان رونویسی نسبی ژن **DXR** در سطح آبیاری ۴۰٪ ظرفیت زراعی آویشن زوفایی

Figure 9. Concentration and elicitor type effects on relative transcription of DXR gene at 40% of field capacity irrigation level in *Thymbra spicata*

Means comparison at 5% probability level (Duncan test)

در آبیاری ۴۰٪، میزان کم‌آبیاری اثر معنی‌داری بر میزان بیان ژن DXR در آویشن زوفایی نشان داد (شکل ۹)، به‌طوری که در محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار، اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد.

بحث

امروزه دانش علوم گیاهی در پی راهی برای کاهش هزینه‌های تولید و افزایش عملکرد است. یکی از جنبه‌هایی که در این راستا همواره مورد توجه واقع‌شده، افزایش توانایی گیاهان برای مقابله با انواع تنش‌های زنده و غیر زنده محیطی است. تنش خشکی منجر به ایجاد پیام‌هایی می‌شود که باعث فعال کردن کانال‌های یونی، فعالیت کینازها، تولید و تجمع انواع انتقال دهنده علائم از قبیل آب اکسیژنه و اسید سالیسیلک می‌گردد. در نهایت این پیام‌ها می‌تواند منجر به بیان ژن‌های مسیر متابولیت‌های مؤثر ازجمله DXR شود که سبب افزایش معنی‌دار مونوترپن‌های موجود در گیاه می‌شود. در این بررسی، مصرف اسید سالیسیلیک چه در شرایط تنش خشکی و چه در شرایط عدم تنش منجر به افزایش بیان ژن در گیاه دارویی آویشن زوفایی شد. در تحقیقی با آنالیزهای نیمه کمّی و تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری بیان ژن DXR در غلظت‌های مختلف از بازدارنده‌های مونولین و فوسمیدومیسین نشان داد که میزان بیان ژن DXR در تیمارهای فوسمیدومیسین با غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرو مولار به لحاظ آماری نسبت به شاهد معنی‌دار نیست، اما غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار فوسمیدومیسین سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن DXR شده‌است. هرچند نقش تنظیمی آنزیم DXR بستگی به نوع گیاه، بافت و مرحله نمو دارد، اما گزارش‌هایی در مورد تنظیم در سطح بیان این ژن و همبستگی بین میزان بیان ژن DXR و تولید مونوترپن‌های مشتق از مسیر MEP کلروپلاستی ارائه شده است (Ramak *et al*., 2014). در گیاه تراریخت نعنا بیان ژن DXR باعث افزایش معنی‌دار مونوترپن‌های موجود در اسانس این گیاه شده و در مقابل، خاموش کردن جزئی این ژن در گیاه مذکور، کاهش شدید مونوترپن‌ها را در پی داشته است (Ramak *et al*., 2014). نتایج بررسی بیان ژن DXR در مسیر متیل اریتریتول فسفات در پلاستیدها در گیاه مرزه تابستانه (*Satureja hortensis*) نشان داد اعمال الیسیتورهای غیرزیستی اسید سالیسیلیک سطح بیان این ژن‌ها را تغییر و ترکیبات ثانویه ازجمله ترکیب‌های مونوترپنی را در مرزه افزایش داد (Ghobadi *et al*., 2017). بیوسنتز مونوترپن کارواکرول در گیاه مرزه خوزستانی به‌طور عمده از مسیر MEP انجام می‌شود و آنزیم DXR در تنظیم بیوسنتز مونوترپن کارواکرول نقش داشته و یک همبستگی مثبت بین افزایش بیان ژن DXR و بیوسنتز کارواکرول را در گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) نشان می‌دهد، اگرچه در بافت‌های مختلف نقش این ژن متفاوت است، اما به نظر می‌رسد که DXR نقش مهمتری را در این مسیر بر عهده داشته باشد و می‌توان از این ژن به‌عنوان یک کاندید برای دستکاری‌های ژنتیکی برای افزایش تولید مونوترپن‌ها استفاده کرد (Ramak *et al*., 2014). غلظت‌های مختلف الیسیتور کیتوزان نیز باعث افزایش بیان ژن CVOM نسبت به نمونه‌های شاهد در گیاه ریحان شده است. در شرایط تنش و غیر تنش، میزان بیان ژن افزایش یافته است (Deshamps *et al*., 2008). Naderi و همکاران (۲۰۱۶) نیز افزایش بیان ژن CVOMT را در غلظت‌های مختلف کیتوزان گزارش کردند که نتایج آن با این مطالعات مطابقت دارد.

در این تحقیق، با افزایش تنش خشکی وزن تر و وزن خشک نسبت به شاهد کمتر شد. این کاهش می‌تواند تحت تأثیر اثر کاهش میزان کلروفیل ۲ یا بازدهی فتوسنتز باشد که توسط Viera و همکاران (۱۹۹۱) نیز گزارش شده است. تنش خشکی باعث تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی زیادی می‌شود که بر رشد و نمو گیاه اثر می‌گذارد (Harish Prashanth *et al*., 2007؛ Khaje & Naderi, 2014). در تحقیقات انجام شده بر تأثیر مهاری تنش آب بر رشد گیاه، عقیده بر این است که اثر مهاری تنش خشکی بر

شاخص‌های رشد به دلیل کاهش میزان آب برگ و تثبیت ترکیبات نیتروژنی است که بر تقسیم سلولی و طویل شدن تأثیرگذار است (Omidbaigi, 2007). مطالعات گذشته نشان می‌دهد، تنش خشکی باعث کاهش عملکرد بسیاری از گیاهان می‌شود (Pu *et al*., 2009؛ Hassanzadeh *et al*., 2016). در پژوهشی که برای بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر شاخص‌های رشدی گیاه آویشن دنایی در شرایط تنش کم‌آبی انجام شده است، نتایج نشان داد که محلول‌پاشی اثرهای منفی شرایط کم‌آبیاری را کاهش و بالاترین شاخص‌های رشدی را نشان داد (Abdi *et al*., 2021). در این پژوهش، شاخص‌های رشد ازجمله ارتفاع، شاخه فرعی، وزن تر و خشک ساقه و برگ تحت تأثیر تنش خشکی کاهش یافتند.

کیتوزان بر فیزیولوژی و متابولیسم گیاهان مختلف، مؤثر است (Khaje & Naderi, 2014). افزایش ارتفاع، سطح برگ و عملکرد سیر (*Allium sateiva*) در شرایط تنش خشکی در اثر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید به میزان ۰/۵ میلی‌مولار در شرایط کنترل و تحت تنش خشکی مشاهده شده است (Farooq, 2010). محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک احتمالاً از طریق بهبود تثبیت کربن، سنتز متابولیت‌ها و حفظ وضعیت آب بافت‌های گیاهی باعث افزایش رشد می‌شود (Harish Prashanth *et al*., 2007).

در این پژوهش نیز افزایش عملکرد بیولوژیک تحت تأثیر محلول‌پاشی توأم کیتوزان و اسید سالیسیلیک در شرایط تنش متوسط مشاهده شد. در تحقیقات انجام‌شده گزارش‌شده که کاربرد محلول‌پاشی کیتوزان بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) به‌عنوان الیسیتور زیستی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Naderi *et al*., 2015). غلظت‌های بالاتر کیتوزان به دلیل ایجاد لایه‌ای براق و چسبنده در سطح برگ‌ها باعث کاهش نفوذ نور به داخل مزوفیل، کاهش فتوسنتز و مقدار رشد گیاه می‌شود. کاهش رشد در محلول‌پاشی با غلظت‌های بالای کیتوزان ممکن است به دلیل کاهش اندازه روزنه‌ها، افزایش مقدار انعکاس نور خورشید و کاهش مقدار فتوسنتز باشد (Taheri, 2014). به‌نظر می‌رسد کیتوزان سبب افزایش سطح برگ و در نهایت افزایش وزن خشک برگ و وزن خشک ساقه می‌شود (Emami Bistgani, 2016).

نتایج پژوهش نشان داد که خصوصیات مرفولوژیکی تحت تأثیر دور آبیاری قرارگرفته و شاخص‌های رشدی کاهش پیدا کردند. به‌نظر می‌رسد با توجه به نظریه موازنه رشد- تمایز که توسط Chen و همکاران (۲۰۱۱) ارائه شده است، تا زمانی که امکان تقسیم و گسترش سلولی وجود داشته باشد کربن صرف رشد می‌شود. با وقوع تنش کم‌آبی رشد متوقف‌شده و گیاه کربن را در مسیر سنتز و تشکیل مخازن متابولیت‌های ثانویه صرف می‌کند، رشد گیاه کاهش می‌یابد و کربن تثبیت شده در فتوسنتز می‌تواند برای سنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده شود، بهترین نوع آبیاری برای این گیاه، آبیاری نرمال است تا گیاه آویشن زوفایی بتواند در شاخص‌های رشدی خود در وضعیت مطلوبی قرار گیرد. محلول‌پاشی کیتوزان و اسید سالیسیلیک تأثیرات متفاوتی بر گیاه آویشن زوفایی نشان داد که اسید سالیسیلیک نسبت به کیتوزان در جهت افزایش شاخص‌های رشدی تأثیر بیشتری داشت. بیان ژن DXR در مسیر بیوسنتز کارواکرول آویشن زوفایی در محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک افزایش پیدا کرد و دور آبیاری میزان بیان این ژن را کاهش داد. محلول‌پاشی کیتوزان اثری بر بیان ژن نداشت. بنابراین به‌نظرمی‌رسد که استفاده از سالیسیلیک اسید ۵ میلی‌مولار با توجه به نتایج این تحقیق در افزایش بیان ژن DXR و میزان بیوسنتز کارواکرول اثرگذار باشد.

سپاسگزاری

از آقای دکتر کریستوف کرول (Christoph Crocoll) از دانشگاه کپنهاگ دانمارک برای ارائه مشاوره در طراحی آنالیز مولکولی به‌طور ویژه قدردانی می گردد.

References

- Abdi, L., Asghari, H., Tolyat Abolhassani, M., Amerian, M. and NaghdiBodi, H., 2021. Effect of salicylic acid on growth and phytochemical characteristics of *Thymus daenensis* under drought irrigation. Journal of Plant Process and Function, 11(48): 195-210.
- Ahmadi, H., Babalar, M., Sarcheshmeh, M., Morshedloo, M.R. and Shokrpour, M., 2020. Effects of exogenous application of citrulline on prolonged water stress damages in hyssop (*Hyssopus officinalis* L.): Antioxidant activity, biochemical indices and essential oils profile. Food Chemistry, 333: 127433.
- Babaei, K., Moghaddam, M., Farhadi, N. and Ghasemi Pirbalouti, A., 2021. Morphological, physiological and phytochemical responses of Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.) to drought stress. Scientia Horticulturae, 284 110-116.
- Chen, Y., Guo, Q., Liu, L., Liao, L. and Zhu, Z., 2011. Influence of fertilization and drought stress on the growth and production of secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. Journa of Medicinal Plants Research, 5: 1749-1755.
- Deshamps, C., Raskin, I. and Simon, J.E., 2008. Regulation of Essential Oil accumulation in Basil (*Ocimum basilicum* L.) in Response to Elicitation. International Journal of Plant Sciences, 169(8): 981-986.
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hashemi, M., 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. The Crop Journals, 5(5): 407-415.
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhsandeh, M. and Ghasemi Pirbaluti, A., 2016. The effect of drought stress and elicitor of chitosan on photosynthetic pigments, proline, soluble sugars and lipid peroxidation in *Thymus deanensis* Celak. In Shahrekord climate, Environmental Stresses in Agricultural Sciences, 10(1): 1-20.
- Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Safaie, N. and Behmanesh, M., 2012. Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culture. Journal of Plant Biology, 11: 13-26.
- Farooq, M., Wahid, A., Lee, D.J., Cheema S.A. and Aziz, T., 2010. Comparative time course action of the foliar applied glycinebetaine, salicylic acid, nitrous oxide, brassinosteroids and spermine in improving drought resistance of rice. Journal of Agriculture and Crop Sciences, 196: 336-345.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Samani, M.R., Hashemi, M. and Zeinali, H., 2013. Salicylic acid affects growth, essential oil and chemical compositions of thyme (*Thymus daenensis* Celak.) under reduced irrigation. Plant Growth Regulation, 72(3): 289-301.
- Ghassemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Salimi, A., Golparvar, A. and Hamedi, B., 2017. Effects of foliar of the application chitosan and reduced irrigation on essential oil yield, total phenol content and antioxidant activity of extracts from green and purple basil. *Acta Scientlarum*. Polonorum HortorumCultus, 16(6): 177-186.
- Ghobadi, S., Marofi, A. and Majdi, M., 2017. Differential expression of the key genes involved in the biosynthesis of monoterpenes in different tissues and in response to abiotic elicitors in Summer savory (*Satureja hortensis*). Journal of Cell & Tissue (JCT), 7(3): 275-291.
- Goudarzian, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hossaynzadeh, M., 2020. Menthol, balance of menthol/menthone, and essential oil contents of *Mentha Piperita* L. under foliar-applied chitosan and inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 23(5): 1012-1021.
- Harish Prashanth, K.V.S.M., Dharmesh, K.S., Jagannatha, R. and Tharanathan, R.N., 2007. Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. Carbohydrat, 342: 190-195.
- Hassanzadeh, K., Hemmati, Kh. and Alizadeh, M., 2016. Effect of organic fertilizers and salicylicacid on the yield and some secondary metabolites of *Melissa officinalis* L. Journal of Plant Production Research, 23(1): 107-130.
- Heng, Y., Xavier, C., Lars, F., Christensen, P. and Kai, G., 2012. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 136-143.
- Hussein, M.M., Balbaa, L.K. and Gaballah, M.S., 2007. Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3: 321-328.
- Khaje, H. and Naderi, S., 2014. The effect of chitosan on some antioxidant enzymes activities and biochemistry characterization in *Melissa officinalis*. Crop Science Research. Arid Region, 1(1): 100-117.
- Khosh Eqbal, F., Ghasemi Pirbalouti, A., Enteshari, S. and Davarpanah, S.J., 2020. Qualitative and quantitative effects of drought stress on essential oil compositions of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). Journal of Plant Research, 33(2): 292-303.
- Kizil, S., 2010. Determination of essential oil variations of *Thymbra spicata* L., naturally growing

- Pu, G.B., Dong-Ming, M., Chen, J.L. and Ma, L.Q., 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Reports, 28(7): 1127-1135.
- Ramak, P., Osaloo, S. K., Sharifi, M., Ebrahimzadeh, H. and Behmanesh, M., 2014. Biosynthesis, regulation and properties of plant monoterpenoids. Journal of Medicinal Plants Research, 8(29): 983-991.
- Ramroudi, M. and Khmer, A., 2013. Interaction effects of salicylic acid spraying and different irrigation levels on some quantity and quality traits, and osmoregulators in *Ocimum basilicum*. Applied Research of Plant Ecophysiology, 1(1): 19-31.
- Taheri, Q., 2014. Effect of chitosan foliar application on the physiological characteristics of *Ferula flabelliloba* under drought stress. Agricultural Research of Iran, 13(4): 728-737.
- Viera, H.J., Bergamaschi, H., Angelocci, L.R. and Libardi, P.L., 1991. Performance of two bean cultivars under two water availability regimes. II. Stomatal resistance to vapour diffusion, transpiration flux density and water potential in the plant (in Portugal). Pesquisa Agropecuária Brasileira, 9: 1035-1040.
- Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23: 283-333.

in the wild flora ogeast Mediterranean and southeastern Anatolia regions of Turkey. Industrial Crops and Products, 32: 593-600.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods, 25(4): 402-408.
- Malk Maleki, F., Abbasi, N., Sharifi Ashourabadi, A., Brari, M. and Zare, M., 2017. Investigating the effect of moisture stress levels on yield, essential oil amount and physiological characteristics of (*Thymbra spicata* L.). Environmental Stresses in Agricultural Sciences, 11(4): 943-957.
- Maskan, M. and Horuz, E., 2017. Evaluation of antioxidant properties of Za'atar (*Thymbra spicata*) essential oils as natural antioxidant for stability of palm olein during deep-fat frying process. Journal of Food Science and Technology, 54: 1794-1801.
- Naderi, S., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Fakheri, B., 2015. The effect of chitosan on some physiological and biochemictry characterization in basil (*Ocimum basilicum*). Plant Process and Function, 4(12): 29-41.
- Naderi, M., Mosleh Arani, A., Ahmadi, R., Jafarzadeh, A.A. and Tahmasabipour, A., 2016. Investigating some ecological features of medicinal and endangered species of *Thymbra spicata* L. in Ilam province (Telome, Tang Bina and Shirpanah regions). Journal of Environmental Protection, 4(9): 387
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharmacognosy, 1: 69-79.
- Omidbaigi, R., 2007. Production and processing of medicinal plants. Astane Ghods Razavi Press, 325p. (In Persian)