

بررسی تغییرات صفات رشدی و متابولیت‌های ثانویه در گیاه دارویی *Thymus vulgaris L.* تحت استرس‌های ملایم شوری و خشکی

صدیقه فابریکی اورنگ^{۱*}، بهنام داودنیا^۲

^۱استادیار، عضو هیات‌علمی گروه ژنتیک و به‌زادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

^۲دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۰۱

چکیده

در این تحقیق آزمایشی گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به منظور مطالعه روند تغییرات صفات رشدی و فیتوشیمیایی گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris L.*) تحت شرایط ملایم شوری و خشکی در دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) در سال ۱۳۹۵ انجام پذیرفت. تیمارهای مورد استفاده شامل تنش خشکی (50% F.C)، تنش شوری (100 mM NaCl) و تیمار شاهد (100% F.C) بودند. صفات وزن تر و خشک اندام هوایی، تعداد شاخه فرعی، قطر شاخه اصلی، قطر شاخه فرعی، ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک ریشه، طول ریشه، میزان کلروفیل و محتوی نسبی آب برگ (RWC) بعد از اتمام دوره تنش در گیاهان هر سه تیمار اندازه‌گیری شدند. همچنین میزان فنل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین در سه اندام برگ، ساقه و ریشه به روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. نتایج آماری نشان داد که تنش‌های خشکی و شوری اثر معنی‌داری بر تمام صفات مورفولوژیک، به جز وزن خشک اندام هوایی و تعداد شاخه فرعی داشتند؛ به طوری که تحت تنش خشکی ارتفاع گیاه، قطر شاخه اصلی، قطر شاخه فرعی، وزن خشک ریشه، وزن تر ریشه و وزن تر اندام هوایی در مقایسه با شرایط عدم تنش کاهش یافتند. نتایج نشان داد که نوع تنش اثر معنی‌داری بر میزان فلاونوئید و فنل کل در برگ و ساقه داشته است. در مقابل، اختلاف معنی‌داری بین تنش‌های مختلف از نظر فلاونوئید و فنل کل ریشه وجود نداشت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تحت تنش خشکی میزان فنل و فلاونوئید کل برگ، در مقایسه با شرایط عدم تنش افزایش پیدا کرد. در جمع‌بندی این تحقیق مشخص شد که شوک‌های ملایم خشکی و شوری سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه در آویشن باغی شدند ولیکن تأثیر تنش شوری در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با تنش خشکی کمتر بود.

واژه‌های کلیدی: آویشن باغی، خشکی، شوری، صفات رشدی، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

آویشن باغی با نام علمی *Tymus vulgaris* L. یکی از گیاهان دارویی معروف در دنیا می‌باشد (Omid-Beigi, 1997). این گیاه از تیره نعناعیان (Lamiaceae یا Labiate)، چندساله، با ساختار بوته‌ای بالشتکی یا کپه‌ای، ساقه مستقیم علفی یا چوبی، پر شاخه، با ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و گاه‌آ تا ۴۵ سانتی‌متر می‌باشد (Burnie, 1995). از اسانس آویشن در نوشیدنی‌ها و صنایع دارویی - بهداشتی و از برگ آن در فرآورده‌های غذایی استفاده می‌شود. اسانس روغنی آویشن دارای خواصی نظیر ضداسپاسم، بادشکن، ضدکرم، ضدرماتیسم، خلط‌آور، آنتی‌اکسیدان و نگه‌دارنده طبیعی غذا می‌باشد. اسانس این گیاه از جمله ده اسانس معروف می‌باشد که جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد (NaghdiBadi and Makizadeh Tafti, 2003). آویشن یکی از گیاهان با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا بوده که در یکی دو دهه اخیر خواص ضد سرطانی آن مورد توجه محققان قرار گرفته است (Lixandru et al., 2010). متابولیت‌های ثانویه اساساً با کنترل و هدایت ژنتیکی سنتز می‌شوند ولی ساخت آن‌ها به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. به طوری که عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و نیز در مقدار و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها نظیر آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها، اسانس‌ها و امثال آن می‌گردد (Ameri et al., 2008).

بابایی و همکاران (Babae et al., 2010) در گیاه آویشن نشان دادند که تنش خشکی اثر معنی‌داری بر پارامترهای رشدی و عملکرد اندام رویشی داشت و با افزایش تنش خشکی ارتفاع بوته، تعداد ساقه جانبی، وزن تر و خشک اندام هوایی، حجم ریشه، وزن تر و خشک ریشه و طول ریشه کاهش یافتند. قادری و همکاران (Ghaderi et al., 2016) گزارش کردند که

با اعمال تنش کم آبی وزن خشک ریشه و اندام هوایی آویشن باغی نسبت به شاهد کاهش یافتند در حالی که طول ریشه افزایش نشان داد. همچنین در آزمایش بررسی تنوع صفات مورفولوژیک ۲۴ اکوتیپ آویشن، همبستگی بین عملکرد و صفات طول بوته، عرض بوته، طول برگ و میزان تاج پوشش مثبت گزارش شد (Parvizparashkoh et al., 2014).

نتایج آزمایشی در گیاه آویشن باغی نشان داد که با اعمال تنش کم آبی میزان کلروفیل کل و کارتنوئید نسبت به شاهد کاهش یافتند، در حالی که میزان پرولین افزایش نشان داد (Ghaderi et al., 2016). قادری و همکاران (Ghaderi et al., 2016) بر اساس نتایج آزمایش خود روی گیاه آویشن گزارش کردند که رنگیزه‌های فتوسنتزی و طول اندام هوایی از معیارهای مهم مرتبط با عملکرد (وزن خشک اندام هوایی) می‌باشند که می‌توانند در اصلاح آویشن با عملکرد و ماده مؤثره بالا به‌عنوان هدف اساسی در اصلاح گیاهان دارویی سودمند باشند.

یکی دیگر از مهم‌ترین تنش‌های محیطی، تنش شوری می‌باشد که از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر در تغییر رشد گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه است (Nikolova and Ivancheva, 2005). در همین رابطه حسینی و همکاران (Hosseini et al., 2016) بر روی آویشن باغی گزارش نمودند که تنش شوری بر ارتفاع بوته، تعداد ساقه جانبی، وزن تر و خشک اندام رویشی، وزن تر و خشک ریشه، طول ریشه و طول و عرض برگ تأثیر معنی‌دار داشت و با افزایش سطح شوری محتوای نسبی آب برگ کاهش و میزان تیمول و کارواکرول افزایش یافتند. رزمجو و همکاران (Razmjoo et al., 2008) نیز گزارش دادند که ارتفاع بوته، تعداد گل، تعداد شاخه، قطر طبق دانه، وزن تر گل، وزن خشک گل و طول میانگره انتهایی در تنش

شوری در گیاه دارویی بابونه به طور معنی داری کاهش یافت.

با اشاره به اینکه کشور ایران با کثرت مناطق خشک و نیمه خشک و در نتیجه مستعد شوری می باشد و مطالعه واکنش صفات رشدی گیاه آویشن باغی در مواجه شدن با تنش های غیرزنده جهت امکان سنجی توسعه سطح کشت در مناطق خشک و نیمه خشک حائز اهمیت است؛ به همین جهت در تحقیق حاضر اثر تنش های ملایم خشکی و شوری به عنوان شوک غیرزنده محیطی بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه آویشن باغی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۵ در شرایط گلخانه و آزمایشگاه دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انجام پذیرفت. بذور آویشن باغیاز مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) تهیه و سپس درون سینی نشاء کشت گردیدند. بذور کشت شده در فاصله زمانی ۱۵ تا ۲۰ روز جوانه زده و پس از شش هفته، نشاها به گلدان ها انتقال و تا مرحله قبل از گلدهی همه گلدان ها به صورت منظم آبیاری گردیدند. این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار در سه تکرار و هر تکرار با سه گلدان اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل تنش خشکی (آبیاری در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی)، تنش شوری با نمک NaCl (۱۰۰mM) و تیمار شاهد (آبیاری نرمال در سطح ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) در مرحله قبل از شروع گلدهی به مدت دو هفته اعمال گردید. با مشاهده ظهور علائم تنش، نمونه برداری جهت ارزیابی صفات مورفولوژیک و فیتوشیمیایی انجام گرفت.

اندازه گیری صفات مورفولوژیک: به منظور سنجش صفات مورفولوژیک، برداشت گیاهان در دو مرحله

انجام شد؛ در مرحله اول اندام هوایی گیاه برداشت شده و پارمترهای وزن تر اندام هوایی، تعداد شاخه فرعی، قطر شاخه اصلی، قطر شاخه فرعی و ارتفاع گیاه به ترتیب اندازه گیری شدند. در مرحله دوم ریشه شویی توسط الک انجام و مقادیر وزن تر ریشه و طول ریشه اندازه گیری شد؛ سپس اندام های مذکور به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد داخل آون قرار گرفته و وزن خشک صفات مذکور ثبت گردیدند. همچنین میزان سبزینگی یا غلظت کلروفیل بافت زنده گیاهی به وسیله دستگاه spad (مدل SPAD 502 PlusChlorophyll Meter) اندازه گیری شد.

تهیه عصاره متانولی: ابتدا بخش های مختلف گیاه جداگانه آسیاب شده و پنج گرم از هر نمونه درون ۵۰ میلی لیتر متانول خالص (مرک) به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه شیکر عصاره گیری شد. سپس عصاره ها به وسیله روتاری در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد تغلیظ و جهت تبخیر متانول اضافی، داخل هود و در دمای اتاق به صورت روباز قرار گرفتند. در نهایت عصاره های خشک شده در فریزر و در محیط تاریک تا زمان مصرف نگه داری شدند.

تعیین محتوای فنل کل: سنجش محتوای فنل کل عصاره ها با استفاده از معرف فولین - سیوکالتیو انجام شد (Slinkard and Singleton, 1977). در این سنجش ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با یک میلی لیتر محلول فولین - سیوکالتیو و دو میلی لیتر محلول سدیم کربنات ۷/۵ درصد مخلوط و سپس حجم نهایی مخلوط با آب مقطر به هفت میلی لیتر رسانده شد. پس از گذشت دو ساعت در دمای اتاق، جذب محلول ها با اسپکتروفوتومتر DOUBLE BEAM مدل UV/Vis 4802 در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری شد. در نهایت با استفاده از اسید گالیک به عنوان استاندارد، منحنی کالیبراسیون رسم

قرار گرفتند. برای تجزیه‌های آماری از نرم‌افزارهای SPSS و MSTATC و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

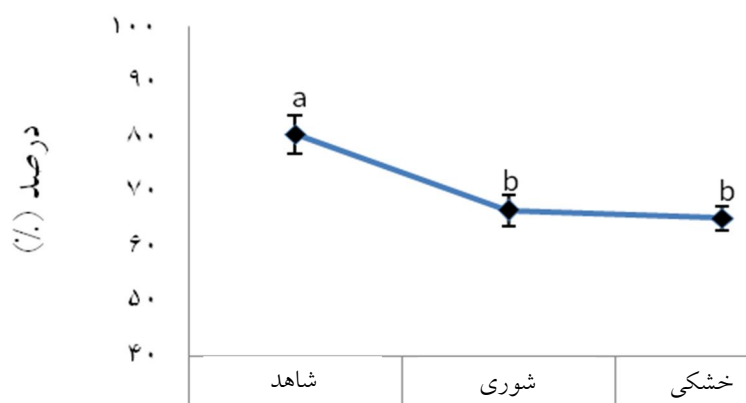
نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که منبع تغییر تنش، اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0/01$) بر محتوی نسبی آب برگ داشت (جدول ۱)؛ به طوری که تیمارهای مختلف از نظر تاثیر بر مقدار صفت مذکور در سه کلاس آماری مختلف قرار گرفتند و بیشترین ($80/52$) و کمترین ($65/12$) مقدار محتوی نسبی آب برگ به ترتیب مربوط به شرایط عدم تنش و تنش خشکی بود (شکل ۱). مطابق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، تنش‌های اعمال شده اثر معنی‌داری بر مقادیر طول ریشه، ارتفاع بوته، قطر شاخه اصلی و فرعی داشتند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، ارتفاع گیاه در شرایط تنش خشکی ($11/07$ سانتی‌متر) نسبت به شرایط عدم تنش ($17/4$ سانتی‌متر) به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد؛ در حالی که مقدار طول ریشه در تنش خشکی نه تنها کاهش پیدا نکرد، بلکه نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۲). همچنین قطر شاخه اصلی و فرعی در شرایط تنش به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کردند؛ به طوری که بین تنش شوری و خشکی اختلافی وجود نداشت (جدول ۲). تیمارهای اعمال شده تأثیر معنی‌داری بر تعداد شاخه فرعی نشان ندادند (جدول ۱).

گردید و محتوی فنل کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره گزارش شد.

تعیین محتوای فلاونوئید کل: جهت سنجش فلاونوئید کل از روش McDonald و همکاران (McDonald et al., 2001) استفاده شد. به همین جهت $0/5$ میلی‌لیتر عصاره (در غلظت $1/10$ گرم بر میلی‌لیتر) با $1/5$ میلی‌لیتر متانول خالص (مرک)، $0/1$ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید 10 درصد، $0/1$ میلی‌لیتر استات پتاسیم 1 مولار و $2/8$ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شد. سپس محلول واکنش در محیط تاریک و در دمای اتاق به مدت 30 دقیقه قرار گرفت و میزان جذب در طول موج 415 نانومتر قرائت شد. به‌منظور تهیه منحنی استاندارد، از محلول روتین در حلال متانول در غلظت‌های $1000-100$ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ استفاده گردید و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت‌ها به صورت میلی‌گرم روتین در هر گرم عصاره ثبت گردید.

سنجش محتوای آنتوسیانین (Nogues and Baker, 2000): جهت ارزیابی محتوی آنتوسیانین، $0/2$ گرم از بافت تر برگ در سه میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل متانول $99/5$ درصد و هیدروکلریک اسید خالص به نسبت 99 به 1) همگن و سپس درون تیوب دو میلی‌لیتری ریخته و به حجم رسانده شد. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها، جذب عصاره رویی در 530 نانومتر برای آنتوسیانین تعیین و نتایج به‌صورت جذب در گرم وزن تر ($\text{OD.g}^{-1}.\text{FW}$) مورد مقایسه



شکل ۱: روند تغییرات و مقایسه میانگین محتوی نسبی آب برگ در گیاه دارویی آویشن باغی تحت تنش‌های خشکی، شوری و عدم تنش (شاهد). (حروف غیریکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد)

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک و فیتوشیمیایی در گیاه آویشن باغی تحت تنش‌های خشکی و شوری.

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (M.S)					
		وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	طول ریشه	تعداد شاخه فرعی	قطر شاخه اصلی	قطر شاخه فرعی
تنش	۲	۹/۷۴**	۰/۵۸**	۳۳/۲۱**	۱۳/۶۷ ^{ns}	۲/۲۴*	۰/۳۱**
خطای آزمایشی	۶	۰/۱۱	۰/۰۰۴	۱/۷۱	۲/۸۸	۰/۲۲	۰/۰۲۸
CV%		۱۰/۱۴	۷/۱۲	۷/۴۳	۱۲/۹	۱۸/۳۱	۱۱/۵۷

ادامه جدول ۱-

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (M.S)				
		وزن تر اندام هوایی	ارتفاع بوته	محتوی نسبی آب برگ	فلاونوئید کل برگ	فلاونوئید کل ساقه
تنش	۲	۵۵/۸۷*	۳۱/۳۹**	۲۱۷/۶۸**	۱۰۸۴۷/۱*	۱۰۹۶/۲۱*
خطای آزمایشی	۶	۹/۱۳	۰/۹۶	۶/۸۳	۱۶۴۷/۶۶	۱۲۸/۰۱
CV%		۱۵/۶۸	۶/۶۹	۳/۷	۲۲/۳۵	۱۱/۸۷

ادامه جدول ۱-

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (M.S)			
		فنل کل برگ	فنل کل ساقه	فنل کل ریشه	غلظت کلروفیل
تنش	۲	۲۱۸۰/۴۲**	۲۰۵/۷۲*	۱۰۴/۷۶ ^{ns}	۱۹۹**
خطای آزمایشی	۶	۲۳/۷۲	۲۶/۱۷	۳۵/۶۷	۶/۸۸
CV%		۲/۹۳	۴/۲	۶/۳۵	۵/۰۷

n.s و **: به ترتیب اختلاف غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

قرار گرفتند و بیشترین (به ترتیب با مقادیر ۵/۱۷ و ۱/۳۳ گرم) و کمترین (به ترتیب با ۱/۵۸ و ۰/۴۶ گرم) میزان وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه به ترتیب مربوط به شرایط عدم تنش و تنش خشکی بود (جدول ۲).

نتایج حاصل از آزمایش نشان دادند که نوع تنش اثر معنی‌داری در سطح یک درصد ($P \leq 0/01$) بر میزان وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه داشت (جدول ۱)، به طوری که تنش‌های خشکی، شوری و شاهد از نظر تأثیر بر صفات مذکور در سه کلاس مختلف آماری

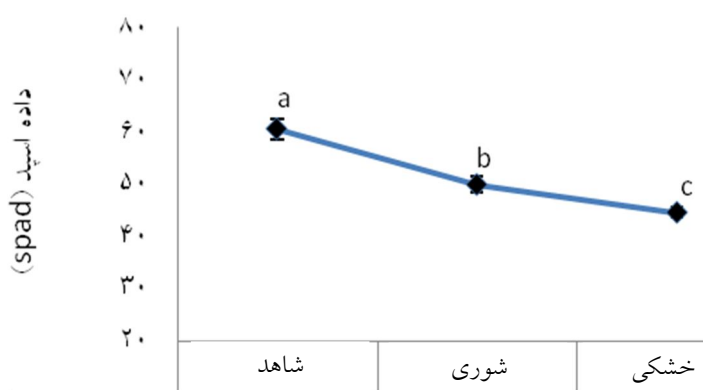
جدول ۲: مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک با روش دانکن در گیاه آویشن باغی تحت تنش‌های خشکی و شوری.

میانگین صفات							
تیمار	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	طول ریشه	ارتفاع بوته	قطر شاخه اصلی	قطر شاخه فرعی	وزن تر اندام هوایی
بدون تنش	۵/۱۷ A	۱/۳۳ A	۱۵/۳ B	۱۷/۴ A	۳/۵ A	۱/۸۲ A	۲۳/۸ A
تنش خشکی	۱/۵۸ C	۰/۴۶ C	۲۱/۴ A	۱۵/۴ B	۲/۳ B	۱/۳۲ B	۱۵/۳ B
تنش شوری	۳/۰۴ B	۱/۰۱ B	۱۶/۱ B	۱۱/۰۷ C	۱/۸ B	۱/۲۱ B	۱۸/۶ AB

حروف غیریکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد.

به جز صفت طول ریشه، سایر صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه در شرایط تنش از خود کاهش نشان دادند. همچنین میزان سبزی‌نگی یا کلروفیل گیاه آویشن باغی تحت هر دو تنش کاهش معنی‌داری پیدا کرد، به طوری که بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها مقدار این کاهش در شرایط تنش خشکی در مقایسه با تنش شوری به مراتب بیشتر بود (شکل ۲).

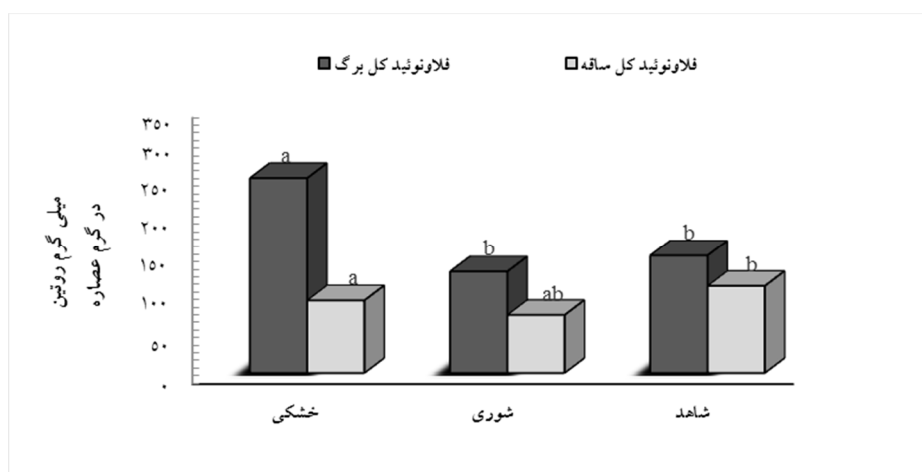
طبق نتایج تجزیه واریانس نوع تنش اثر معنی‌داری در سطح پنج درصد بر میزان وزن تر اندام هوایی داشت، ولیکن در مورد میزان وزن خشک اندام هوایی اختلاف معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین (۲۳/۸۷ گرم) و کمترین (۱۵/۳ گرم) میزان وزن تر اندام هوایی به ترتیب مربوط به شرایط عدم تنش و تنش خشکی بود (جدول ۲). در مجموع



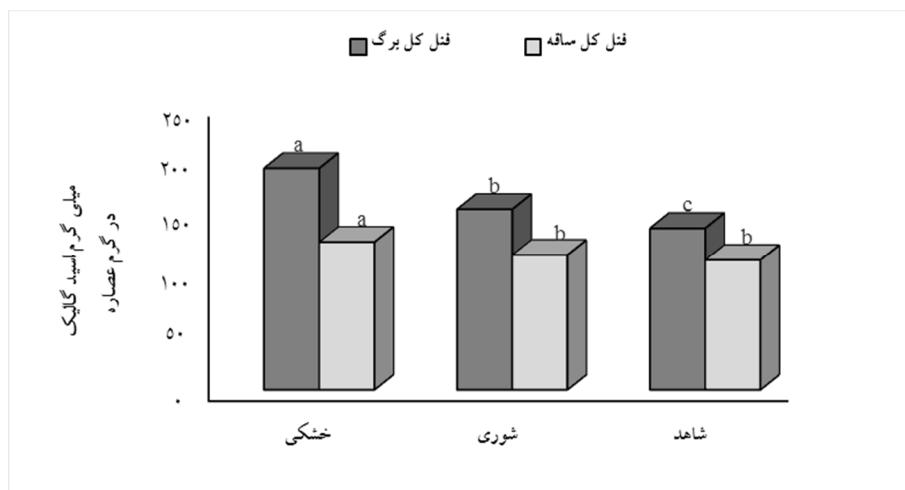
شکل ۲: روند تغییرات و مقایسه میانگین غلظت کلروفیل در گیاه دارویی آویشن باغی تحت تنش‌های خشکی، شوری و عدم تنش (شاهد). (حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد).

در هر گرم عصاره) و کمترین (۱۴۲/۶۶ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره) مقدار فنل کل برگ به ترتیب مربوط به تنش خشکی و عدم تنش بود. همچنین میزان فنل کل ساقه در تنش خشکی بیشتر از تنش شوری و شاهد بود؛ در حالی که بین تنش شوری و شاهد اختلاف معنی داری از نظر فنل کل ساقه وجود نداشت (شکل ۴). همچنین تیمارهای اعمال شده اختلاف معنی داری از نظر مقدار فنل کل ریشه با یکدیگر نشان ندادند (جدول ۱). طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس، تنش های خشکی و شوری اثر معنی داری در سطح یک درصد ($P \leq 0/01$) بر میزان محتوی آنتوسیانین گیاه آویشن باغی داشتند (جدول ۱)؛ به طوری که با مقایسه میانگین داده ها، بیشترین ($2/57 \text{ OD.g}^{-1} \cdot \text{FW}$) و کمترین ($1/69 \text{ OD.g}^{-1} \cdot \text{FW}$) مقدار آنتوسیانین گیاه به ترتیب مربوط به تنش خشکی و عدم تنش بود (شکل ۵).

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تنش های خشکی و شوری اثر معنی داری در سطح احتمال ($P \leq 0/05$) بر میزان فلاونوئید کل برگ و ساقه نشان دادند (جدول ۱). مقایسه میانگین ها نشان داد که از نظر میزان فلاونوئید کل برگ بین تنش خشکی با عدم تنش و تنش شوری اختلاف معنی داری وجود داشت؛ به طوری که بیشترین (۲۵۶/۶۱ میلی گرم روتین در هر گرم عصاره) و کمترین (۱۵۴/۶۹ میلی گرم روتین در هر گرم عصاره) مقدار فلاونوئید کل به ترتیب مربوط به تنش خشکی و شرایط عدم تنش بود (شکل ۳). در حالی که تیمارهای خشکی و شوری تأثیر معنی داری بر افزایش محتوی فلاونوئید کل ریشه نداشتند (جدول ۱). با تجزیه واریانس داده ها مشخص گردید که تیمارهای مورد استفاده اثر معنی داری بر محتوی فنل کل برگ و ساقه به ترتیب در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد داشتند (جدول ۱). با مقایسه میانگین داده ها، بیشترین (۱۹۵/۴ میلی گرم گالیک اسید



شکل ۳: مقایسه میانگین فلاونوئید کل برگ و ساقه در گیاه دارویی آویشن باغی تحت تنش های خشکی، شوری و عدم تنش (شاهد). (حروف غیریکسان بالای ستون ها نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد می باشد)



شکل ۴: مقایسه میانگین فنل کل برگ و ساقه در گیاه دارویی آویشن باغی تحت تنش‌های خشکی، شوری و عدم تنش (شاهد). (حروف غیریکسان بالای ستونها نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح یک درصد می‌باشد)

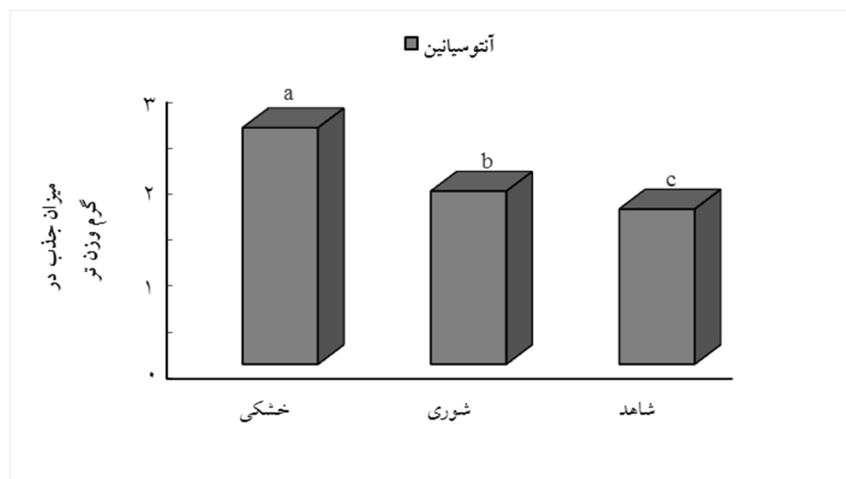
کل یا وزن تر اندام هوایی گیاه آویشن باغی بهره‌مند شد.

محاسبه ضرایب همبستگی ساده پیرسونی بین صفات مورد مطالعه در مجموع سه شرایط نشان داد که بیشتر صفات مورفولوژیک و غلظت کلروفیل دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری با یکدیگر بودند. همچنین مقادیر صفات فیتوشیمیایی نظیر فنل کل برگ، فنل کل ساقه و آنتوسیانین همبستگی مثبت و معنی‌داری با یکدیگر نشان دادند. در تائید نتایج تجزیه همبستگی، در نمایش گروه‌بندی صفات (شکل ۶) تطابق خوبی بین نتایج تجزیه کلاستر و تجزیه همبستگی وجود داشت؛ به طوری که صفات دارای همبستگی مثبت با یکدیگر در تجزیه همبستگی، در دندروگرام کلاستر ترسیم شده در گروه‌های یکسان قرار گرفتند.

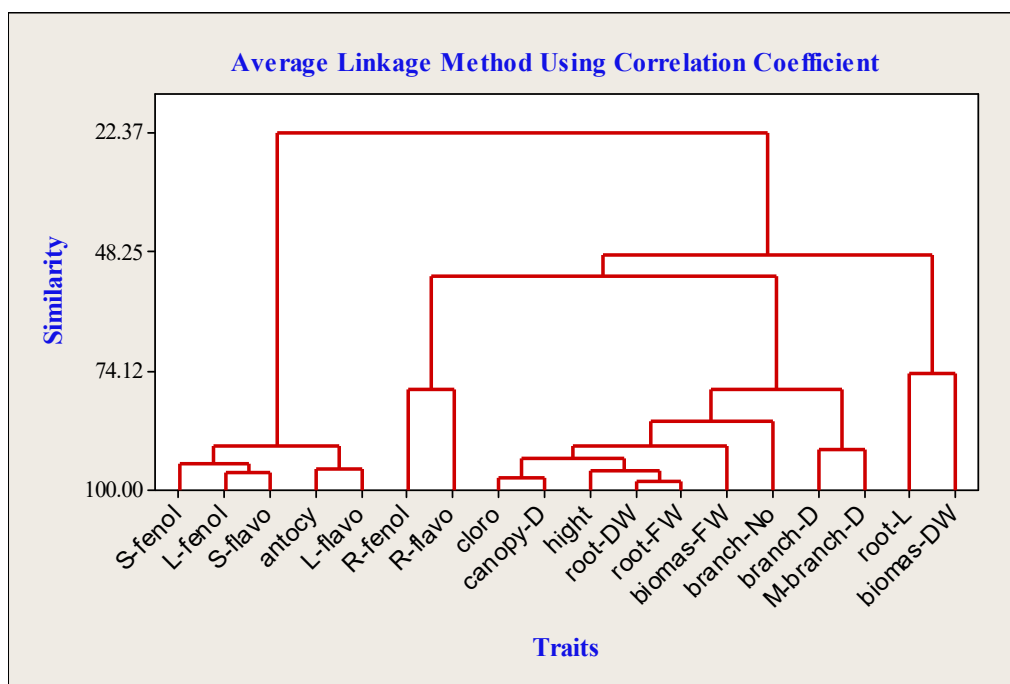
نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون گام به گام در خصوص نحوه تاثیر صفات مورفو-فیتوشیمیایی بر وزن تر اندام هوایی به‌عنوان متغیر وابسته (y) نشان داد که، صفات وزن تر ریشه (X_1)، وزن خشک اندام هوایی (X_2)، طول ریشه (X_3)، فلاونوئید کل برگ (X_4)، ارتفاع گیاه (X_5)، قطر شاخه فرعی (X_6) و قطر شاخه اصلی (X_7) به‌ترتیب اهمیت وارد معادله رگرسیونی شدند. مدل برآزش شده

$$y = -9.45 + 1.65X_1 + 1.26X_2 - (0.18X_3 + 0.017X_4 + 0.11X_5 + 2.16X_6 + 0.45X_7)$$

دارای ضریب تبیین یک بوده و بنابراین صفاتی که وارد معادله شدند صددرصد تغییرات وزن تر اندام هوایی را تحت شرایط مختلف توجیه کردند. لذا از این صفات می‌توان بطور غیرمستقیم در بهبود بیوماس



شکل ۵: مقایسه میانگین محتوی آنتوسیانین برگ در گیاه دارویی آویشن باغی تحت تنش‌های خشکی، شوری و عدم تنش (شاهد). (حروف غیریکسان بالای ستونها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد)



شکل ۶: تجزیه کلاستر صفات مورفولوژیک و فیتوشیمیایی در گیاه آویشن باغی در مجموع سه شرایط تنش خشکی، شوری و عدم تنش. (صفات به ترتیب از راست به چپ: وزن خشک بیوماس، طول ریشه، قطر شاخه اصلی، قطر شاخه فرعی، تعداد شاخه، وزن تر بیوماس، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، ارتفاع بوته، قطر کانوی، میزان کلروفیل، فلاونوئید ریشه، فنل ریشه، فلاونوئید برگ، میزان آنتوسیانین، فلاونوئید ساقه، فنل برگ، فنل ساقه)

برگ در پاسخ به تنش‌های خشکی و شوری کاهش پیدا کردند. در همین رابطه پازکی و همکاران (Pazoki et al., 2012) گزارش دادند که تنش خشکی سبب کاهش طول ساقه، وزن خشک ریشه، وزن

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، ارتفاع بوته، قطر شاخه اصلی، قطر شاخه فرعی، وزن تر هوایی، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و محتوی نسبی آب

Couee et al., 2006) و گیاه در مقابله با آنها به منظور سازش با شرایط جدید، تولید فندهای محلول را به منظور جلوگیری از تغییر شکل و تخریب مولکول‌های زیستی افزایش می‌دهد (Kefeli et al., 2003).

در مقایسه با تحقیق حاضر، نتایج آزمایش قادری و همکاران (Ghaderi et al., 2016) در گیاه آویشن باغی نشان داد که با اعمال تنش کم آبی میزان کلروفیل کل و کارتنوئید نسبت به شاهد کاهش یافتند، در حالی که میزان پرولین افزایش نشان داد. در آزمایش حسینی و همکاران (Hosseini et al., 2016) نیز بر روی آویشن باغی، با افزایش سطح تنش شوری میزان کلروفیل و کارتنوئید کاهش، اما با افزایش سطح شوری میزان تیمول و کارواکرول افزایش یافتند. بابایی و همکاران (Babaei et al., 2010) نیز افزایش درصد تیمول و میزان پرولین را در گیاه آویشن گزارش کرده‌اند. حسینی و امیدباگی (Hosni and Omidbaigi, 2002) نیز در گیاه ریحان گزارش کردند که مقادیر کلروفیل a و b و کلروفیل کل در اثر کم‌آبی کاهش یافت. از دیگر واکنش‌های گیاهان در برابر تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌توان به تولید آسکوربات، توکوفرول، کارتنوئیدها و ترکیبات فنلی اشاره کرد که با افزایش محتوی فنل کل و فلاونوئید کل در اثر تنش‌های خشکی و شوری در تحقیق حاضر مطابقت دارد (Ozkur et al., 2009). در همین راستا بتائیب و همکاران (Bettaieb et al., 2011) گزارش دادند که تنش خشکی سبب افزایش محتوی فنلی، فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی و از طرفی سبب کاهش میزان کلروفیل در گیاه مریم‌گلی شده است، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همسو می‌باشد. با توجه به کاهش غلظت کلروفیل و همچنین کاهش رشد مورفولوژیکی گیاه در پاسخ به تنش خشکی و شوری، به نظر می‌رسد که گیاه در مواجهه با این

خشک هوایی و محتوی نسبی آب برگ در گیاه آویشن گردید. نتایج بابایی و همکاران (Babaei et al., 2010) در گیاه آویشن نیز نشان داد که با افزایش تنش خشکی ارتفاع بوته، تعداد ساقه جانبی، وزن تر و خشک اندام هوایی، حجم ریشه، وزن تر و خشک ریشه و طول ریشه کاهش یافتند. همچنین قادری و همکاران (Ghaderi et al., 2016) گزارش کردند که با اعمال تنش کم آبی وزن خشک ریشه و اندام هوایی آویشن باغی نسبت به شاهد کاهش یافتند در حالی که طول ریشه افزایش نشان داد. در آزمایش حسینی و همکاران (Hosseini et al., 2016) بر روی آویشن باغی، تنش شوری بر ارتفاع بوته، تعداد ساقه جانبی، وزن تر و خشک اندام رویشی، وزن تر و خشک ریشه، طول ریشه و طول و عرض برگ تاثیر معنی‌دار داشت. همچنین بر اساس تحقیقات صورت گرفته در گیاهان دارویی بابونه آلمانی (Ghaedijashni and Rahbarian et al., 2011) و شوید (Setayeshmehr and Ganjali, 2013)، تنش خشکی و شوری به طور معنی‌داری سبب کاهش صفات مورفولوژیک گردید، که با نتایج این تحقیق هم راستا می‌باشد.

در این تحقیق، تنش‌های خشکی و شوری اثر معنی‌داری بر میزان فنل کل برگ و ساقه، فلاونوئید کل برگ و ساقه، آنتوسیانین و غلظت کلروفیل برگ در گیاه آویشن باغی داشتند و به‌طور کلی سبب افزایش میزان فلاونوئید کل برگ، آنتوسیانین، فنل کل برگ و ساقه در گیاه آویشن باغی تحت تنش خشکی گردیدند. در حالی که غلظت کلروفیل در شرایط تنش خشکی و شوری در مقایسه با شرایط عدم تنش کاهش پیدا کرد. یکی از تغییراتی که در اغلب تنش‌های زیستی و غیرزیستی رخ می‌دهد تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) است که سبب تخریب کلروفیل و ماکرومولکول‌ها در گیاه می‌گردد

نعنایان می‌شود. مقایسه نتایج صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه آویشن و مطالعه نتایج همبستگی بین صفات مختلف گویای آن است که گیاه در شرایط تنش به‌جای تخصیص انرژی خود به‌منظور تولید اندام‌های رویشی به سمت تولید متابولیت‌های ثانویه به‌منظور مقاومت به شرایط نامساعد روی می‌آورد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد ارتفاع بوته، قطر شاخه اصلی، قطر شاخه فرعی، وزن تر اندام‌هوایی، وزن تر و خشک ریشه و محتوی نسبی آب برگ در پاسخ به تنش‌های خشکی و شوری کاهش پیدا کردند. تنش شوری سبب افزایش فنل کل در گیاه گردید ولی میزان فلاونوئید کل گیاه را کاهش داد. میزان فلاونوئید کل برگ، آنتوسیانین، فنل کل برگ و ساقه تحت تنش خشکی افزایش یافتند، در حالی که غلظت کلروفیل در هر دو تنش خشکی و شوری کاهش یافت. در این تحقیق میزان ترکیبات فنلی در اندام‌های هوایی به‌خصوص برگ، بیشتر از ریشه بود. در جمع‌بندی کلی مشخص شد که تنش‌های محیطی سبب افزایش برخی از متابولیت‌های ثانویه در آویشن باغی شدند ولیکن تأثیر تنش شوری در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در مقایسه با تنش خشکی کمتر بود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاران محترم آزمایشگاه ژنومیکس دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) که با فراهم ساختن امکانات آزمایشگاهی ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌نمایم.

تنش‌ها رشد رویشی خود را کاسته و به منظور مقابله با اثرات گونه‌های واکنشگر اکسیژن و سازگار شدن با شرایط جدید، تولید متابولیت‌های ثانویه از قبیل ترکیبات فنلی و آنتوسیانین را در خود افزایش می‌دهد. در همین راستا قادری و همکاران (Ghaderi et al., 2016) نیز روی گیاه آویشن گزارش کردند که رنگیزه‌های فتوستتزی از معیارهای مهم مرتبط با عملکرد (وزن خشک اندام هوایی) می‌باشند. همچنین در مقایسه با نتایج حاصل از این تحقیق، گزارش کرده‌اند که تنش آبی سبب افزایش اسانس در مرزه (Bahreininejad, 2002)، آویشن دناپی (Baher et al., 2002)، آویشن باغی (Eman et al., 2008)، مریم‌گلی (Bettaieb et al., 2009)، سنبل هندی (Fatima et al., 2000) و پونه کوهی (Dunford and Vazquez, 2005) شده است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که میزان ترکیبات فنلی در اندام‌های هوایی به‌خصوص برگ، بیشتر از ریشه می‌باشد. باتوجه به سنتز ترکیبات فنلی در کلروپلاست‌ها بر اساس آزمایشات کیفیلی و همکاران (Kefeli et al., 2003) و نیز با توجه به بالا بودن محتوی کلروپلاستی در اندام‌های هوایی نسبت به ریشه، بالا بودن مقدار ترکیبات فنلی در اندام‌های هوایی در مقایسه با ریشه امری طبیعی می‌باشد. در همین رابطه بهداد و همکاران (Behdad et al., 2015) گزارش کردند که محتوی فنلی گیاه درمنه در اندام هوایی بالاتر از ریشه بود.

طبق نتایج تحقیق حاضر تنش شوری سبب افزایش فنل کل در گیاه گردید ولی میزان فلاونوئید کل گیاه را کاهش داد که می‌تواند به دلیل تأثیرات بازدارنده NaCl بر مسیر بیوسنتز این ماده باشد که در نهایت موجب کاهش اسانس در گیاهان خانواده

References

1. Ameri, A.A., Nasiri-Mahallati, M., and Rezvani-Moghaddam, P. 2008. The effect of different amounts of nitrogen and plant density on nitrogen use efficiency, yield and active ingredients of marigold plant (*Calendula officinalis* L.). Iranian Journal of Field Crops Research, 5(2): 315-325.
2. Babaee, K., Amini Dehaghi, M., Modares Sanavi, S.A.M. and Jabbari, R. 2010. Water deficit effect on morphology, prolin content and thymol percentage of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26(2): 239-251.
3. Baher, Z.F., Mirza, M., Ghorbanli, M. and BagherRezaii, M. 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(4): 275-277.
4. Bahreininejad, B., Razmjoo, J. and Mirza, M. 2013. Influence of water stress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daenensis*. International Journal of Plant Production, 7(1): 155-166.
5. Behdad, A., Abrishamchi, P. and Jankju, M. 2015. Relation to phonology, phenolics content and alleopathic effect of *Artemisia khorassanica* Krash on growth and physiology of *Bromus kopetdaghensis* Drobov. Iranian biology Journal, 28(2): 243-256.
6. Bettaieb, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F. and Marzouk, B. 2011. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. Acta Physiologiae Plantarum, 33(4): 1103-1111.
7. Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannas, W.A., Kchouk, M.E. and Marzouk, B. 2009. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. Scientia Horticulture, 120(2): 271-275.
8. Burnie, D. 1995. Wild Flowers of the Mediterranean. Dorling Kindersley, London, 320 p.
9. Couee, I., Sulmon, C., Gouesbet, G. and Amrani, A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, 57(3): 449-459.
10. Dunford, N.T. and Vazquez, R.S. 2005. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. Journal of Applied Horticulture, 7(1): 20-22.
11. Eman, E., Aziz, S.T., Hendawi, E., Din, A. and Omer, E.A. 2008. Effect of soil type and irrigation intervals on plant growth, essential oil yield and constituents of *Thymus vulgaris* plant. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 4(4): 443-450.
12. Fatima, S., Farooqi, A.H.A., Sharma, S., Kumar, S., Kukreja, A.K., Dwivedi, S. and Singh A.K. 2000. Effect of drought stress and plant density on growth and essential oil metabolism in *Citronella java* cultivars. In Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences, 22(1): 563-567.
13. Ghaderi, A.A., Fakheri, B.A. and Mahdi-nezhad, N. 2017. Evaluation of the morphological and physiological traits of Thyme under water deficit stress and foliar application of ascorbic acid. Agricultural Crop Management, Online Publication.
14. Ghaedijashni, M. and Mousavi-Neek, S. 2015. Effects of drought stress and phosphorous and zinc on the morphological and agronomic traits German chamomile essential oil. Journal of Environmental Stresses in Crop Sciences, 8(1): 65-72.
15. Hosseini, H., Mousavi-Fard, S., Fatehi, F. and Qaderi, A. 2016.

- Changes in phytochemical and morpho-physiological traits of Thyme (*Thymus vulgaris* CV Varico 3) under different salinity levels. *Journal of Medicinal Plants*, 16(1): 1-13.
16. Hosni, A. and Omidbaigi, R. 2002. Effects of water stress on some morphological, physiological and metabolic Basil. *Journal of Agricultural Knowledge*, 12(3): 47-59.
17. Kefeli, V.I., Kalevitch, M.V. and Borsari, B. 2003. Phenolic cycle in plants and environment. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2(1): 13-18.
18. Lixandru, B.E., Dracea, N.O., Dragomirescu, C.C., Dragulescu, E.C., Coldea, I.L., Anton, L. and Codita, I. 2010. Antimicrobial activity of plant essential oils against bacterial and fungal species involved in food poisoning and/or food decay. *Roum Arch Microbiol Immunol*, 69(4): 224-230.
19. McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich M. and Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry*, 73(1): 73-84.
20. Naghdi-Badi, H.E. and Makizadeh-Tafti, M. 2003. A review of thyme (*Thymus vulgaris*). *Medical Herbs Quarterly*, 2(7): 1-12.
21. Nikolova, M.T. and Ivancheva, S.V. 2005. Quantitative flavonoid variations of *Artemisia vulgaris* L. and *Veronica chamaedrys* L. in relation to altitude and polluted environment. *Acta Biologica Szegediensis*, 49(3-4): 29-32.
22. Nogue, S. and Baker, N.R. 2000. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany*, 51(348): 1309-1317.
23. OmidBeigi, R. 1997. Approach the production and processing plants. *Astan Quds Razavi, Mashhad*, 397 p.
24. Ozkur, O., Ozdemir, F., Bor, M. and Turkan, I. 2009. Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparisovata* to drought. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3): 487-492.
25. Parvizparashkoh, S., Mohamadi, A. and Mousavi, S. 2013. Study of morphologic diversity of 24 *Thymus* ecotypes. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*. 21(2): 329-342.
26. Pazoki, A., Rezaee, A., Habibi, D. and paknejad, F. 2012. Effects of drought stress, ascorbate and gibberellin spraying on some morphological traits, leaf relative water content and cell membrane stability of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Crop Journal*, 8(1): 1-13.
27. Rahbarian, P., Afsharmanesh, G. and Modafeabehzadi, N. 2011. Effect of drought stress and plant density on *Hibiscus sabdariffa* in Jiroft region. *Iranian Journal of Modern Findings of Agriculture*, 5(3): 237-245.
28. Razmjoo, K., Heydarzadeh, P. and Sabzalian, M.R. 2008. Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(4): 451-454.
29. Setayeshmehr, Z. and Ganjeali, A. 2013. Effects of drought stress on growth and physiological characteristics of dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Horticultural Science*, 27(1): 27-35.
30. Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1): 49-55.

Changes in growth characteristics and secondary metabolites in *Thymus vulgaris* L. under moderate salinity and drought shocks

Fabriki-Ourang, S.^{1*}, Davoodnia, B.²

¹Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

²M.Sc. of Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

Received Time: 20-8-2017 Accepted Time: 22-5-2018

Abstract

In order to evaluation of phytochemical and growth changes from *Thymus vulgaris* L. under moderate abiotic stresses, an experiment was carried out at Imam Khomeini International University in a completely randomized design with three replications during 2016. The treatments consisted of drought (50% FC), salinity (100 mM NaCl) and non-stress control (100% FC). Root fresh weight, root dry weight, root length, main branch diameter, sub-branch diameter, sub-branch number, shoot dry weight, shoot fresh weight, plant height, relative water content and chlorophyll content were measured. Also, total phenols, flavonoids and anthocyanins were assayed in leaves, roots and stems by using spectrophotometer. Statistical analysis showed that drought and salinity had significant effects on morphological traits, except for shoot dry weight and number of lateral branches. Generally, morphological traits affected by drought stress in compared with non-stress condition; so that, plant height, main branch diameter, lateral branch diameter, root dry weight, root fresh weight and shoot fresh weight decreased under drought stress compared to non-stressed plants. Analysis of variance showed that stresses had significant effects on leaf and stem flavonoids and phenol contents. By contrast, there was no significantly difference between drought and saline stresses in terms of total flavonoids and phenol of roots. Mean comparisons showed that the amount of leaf phenols and flavonoids increased under drought stress in compared with non-stress condition. In conclusion, this study showed that drought and salinity were increased secondary metabolites in thyme, but the effect of salinity in increasing of secondary metabolites was lower than drought stress.

Keywords: Drought, Salinity, Secondary metabolites, *Thymus vulgaris* L.

*Corresponding author; s.ourang910@gmail.com