مقاله پژوهشی

مقایسه پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) به تنش خشکی و شوری با پتانسیل اسمزی برابر در کشت هیدروپونیک

محمدرضا دهقانی و مریم دهجی‌پور حیدرآبادی*

گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج)رفسنجان، رفسنجان

(تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۶/۰۵، تاریخ پذیرش نهایی:۱۴۰۰/۱۱/۱۹)

چکیده

این پژوهش به‌منظور مقایسه برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه بادرنجبویه به تنش اسمزی حاصل از خشکی و شوری با پتانسیل اسمزی برابر انجام شد.گیاهان بادرنجبویه رشدیافته در کشت هیدروپونیک، در معرض تنش خشکی و شوری با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ و کلرید سدیم به‌مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. سپس نمونه‌برداری از گیاهچه‌ها جهت بررسی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، ترکیبات فنلی، مالون دی‌آلدئید، درصد نشت یونی، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و میزان اسید رزمارینیک انجام شد. همچنین بیان ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز با روش Real-time PCR بررسی شد. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تنش خشکی و شوری میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، ترکیبات فنلی، پرولین آزاد، مالون دی‌آلدئید، نشت یونی، فعالیت آنزیم و بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز، بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز و میزان اسید رزمارینیک را در سطح احتمال یک درصد تحت‌تأثیر قرار داد. کاهش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی در تنش خشکی و شوری مشاهده شد. میزان ترکیبات فنلی در گیاهان تحت تنش شوری نسبت به گیاهان تحت تنش خشکی و شاهد افزایش یافت. افزایش میزان پرولین آزاد در گیاهان تحت تنش خشکی و شوری به‌ترتیب ۱۱ و ۲۵ درصد بود. میزان مالون دی‌آلدئید و درصد نشت یونی در گیاهان تحت تنش خشکی و شوری نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داد. افزایش بیان نسبی ژن و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در تنش شوری مشاهده شد. افزایش بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز در تنش خشکی و شوری، افزایش میزان اسید رزمارینیک را به میزان ۴۲ و ۶۰ درصد نسبت به گیاهان شاهد موجب شد. براساس نتایج به‌دست آمده، گیاه بارنجبویه به تنش خشکی و شوری با پتانسیل اسمزی برابر واکنش متفاوتی نشان داد. این گیاه با افزایش بیشتر محتوای پرولین، ترکیبات فنلی، اسیدرزمارینیک، بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، به تنش اسمزی حاصل از شوری پاسخ مناسب‌تری نسبت به تنش اسمزی حاصل از خشکی داده است.

واژه‌های کلیدی: اسیدرزمارینیک، بادرنجبویه، خشکی، شوری، فنیل‌آلانین آمونیالیاز

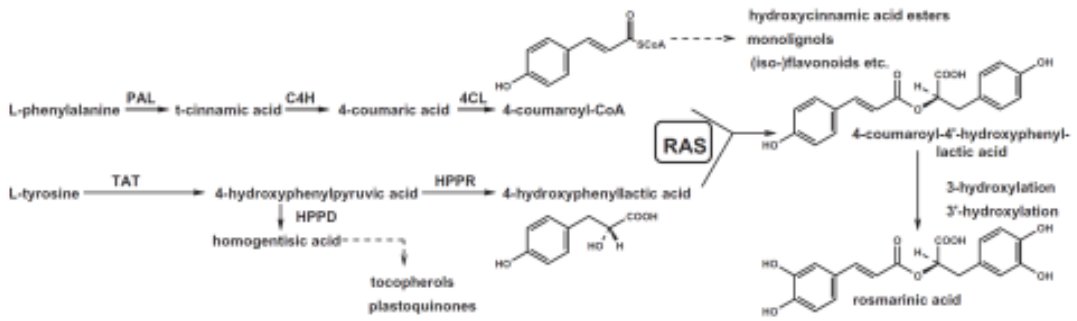
مقدمه

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاهی علفی از خانواده نعناعیان با خواص دارویی متعدد مانند تسکین‌دهنده، ضداسپاسم، آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری، ضدویروس، ضدجهش و آرام‌بخش است. در سال‌های اخیر این گیاه دارویی به‌دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه مهم و کاربرد این ترکیبات در

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m.dahaji@vru.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی اسیدرزمارینیک در گیاهان تولیدکننده این متابولیت ثانویه (Weitzel and Petersen, 2011)

زمینه‌های مختلف پزشکی، صنایع آرایشی- بهداشتی و صنایع غذایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Moradkhani *et al.*, 2010). اسید رزمارینیک (استر اسید کافئیک و ۳، ۴ دی هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید) به‌عنوان ترکیب دارویی فعال و غالب در گیاه بادرنجبویه شناسایی شده است که حدود ۰/۵ تا ۶/۸ درصد از وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهد (Kittler *et al.*, 2018).

خشکی و شوری اصلی‌ترین عوامل محیطی تأثیرگذار بر تولید محصولات زراعی در جهان و از جمله ایران هستند. این تنش‌ها به‌دلیل اثرگذاری‌های اسمزی بر دامنه گسترده‌ای از واکنش‌های سوخت‌وسازی، موجب اختلال در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیسمی سلول می‌شوند. تنش اسمزی به‌علت تولید گونه‌های فعال اکسیژن با کاهش میزان فتوسنتز، رشدونمو گیاه را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. چنان‌چه تولیدگونه‌های فعال اکسیژن به‌طور دقیق تنظیم نشود ممانعت رشدونمو گیاهی را موجب می‌شود (Isayenkov, 2012). نتایج مطالعات نشان داده است گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده درنتیجه تنش اسمزی با پراکسیده‌کردن لیپیدهای غشایی، افزایش میزان مالون دی‌آلدئید، نفوذپذیری غشا و نشت یونی را باعث می‌شوند (Morales and Munne-Bosch, 2019). تجمع ترکیبات سازگار مانند پرولین، در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری، فلزات سنگین و گرما در گیاهان مشاهده شده است. پرولین نه‌تنها به‌عنوان منبع انرژی و حذف‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن در تعدیل تنش در گیاهان نقش دارد، بلکه با تنظیم اسمزی در شرایط تنش از تخریب ساختارهای سلولی جلوگیری می‌کند (Amini *et al.*, 2015). از طرفی دیگر ترکیبات فنلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در پاسخ به تنش‌های محیطی قادرند اثرات منفی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های غیرزیستی را با حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تا حدودی کاهش دهند (Samec *et al.*, 2021).

تنش اسمزی با تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به‌عنوان محصولات جانبی متابولیسم سلولی، فعالیت‌های آنزیمی و بیان ژن‌ها را نیز تغییر می‌دهد (Cramer *et al.*, 2011). در گیاهان تولیدکننده اسید رزمارینیک، ارتباط سنتز اسید رزمارینیک با بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی آن مانند ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز تأیید شده است (Weitzel and Petersen, 2011).

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است سنتز اسید رزمارینیک، فعال‌ترین و فراوان‌ترین ترکیب دارویی موجود در گیاه بادرنجبویه، از طریق مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئیدی با استفاده از پیش‌ماده فنیل‌آلانین و با دخالت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL: EC 4.3.1.5) شروع و تشکیل اسید رزمارینیک در این مسیر بیوسنتزی توسط آنزیم رزمارینیک اسید سینتاز (RAS: EC 2.3.1.140) کاتالیز می‌شود.

ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز جداسازی‌شده از گیاه بادرنجبویه به‌ترتیب شامل یک اینترون و فاقد اینترون هستند که پروتئین‌هایی مشتمل بر ۸۳۶ و ۴۲۷ اسید آمینه را به رمز در می‌آورند. همچنین تنها حضور یک نسخه از ژن رزمارینیک اسید سینتاز در بادرنجبویه گزارش شده است (Weitzel and Petersen, 2011). براساس

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

پژوهش‌های صورت‌گرفته، متابولیت‌های ثانویه تولیدشده در گیاهان دارویی با حذف گونه‌های فعال اکسیژن، به‌عنوان یک سازگاری با شرایط تنش در دفاع غیرآنزیمی این گیاهان در برابر تنش‌ها نقش مؤثری دارند (Isah, 2019).

طی دهه‌های اخیر، اثرات فیزیولوژیکی و مولکولی تنش‌های گیاهی بر رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گونه‌های زراعی بررسی شده است. در مورد گیاهان دارویی اطلاعات چندانی در زمینه تنش و پاسخ‌های دفاعی همراه با تولید متابولیت‌های ثانویه وجود ندارد. لذا در این پژوهش تأثیر تنش خشکی و شوری با پتانسیل اسمزی برابر بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و مولکولی متأثر از این تنش‌ها در کشت هیدروپونیک گیاه بادرنجبویه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی سطحی بذرها با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) و اتانول ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) انجام شد. بعد از جوانه‌زنی بذرها در تاریکی، گیاهچه‌های یکسان به ظروف کشت مخصوص کشت هیدروپونیک حاوی محیط تغییریافته هوگلند انتقال و در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵°C و شدت نور ۶۰$\mu mol m^{-2} S^{-1}$ قرار داده شدند. تنش خشکی و شوری با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG 6000) و کلرید سدیم (NaCl) اعمال شد. غلظت کلرید سدیم و پلی‌اتیلن مورد نیاز جهت ایجاد پتانسیل اسمزی برابر با ۱/۷ بار با استفاده از رابطه وانت‌هوف (۱) و میشل و کافمن (۲) محاسبه شد.

رابطه ۱)

$$\psi_s = -MIRT$$

رابطه ۲)

$$\psi_s = -(1.18\times10^{-2})\times C - (1.18\times10^{-4})\times C^2 + (2.67\times10^{-4})\times C\times T + (8.39\times10^{-7})\times C^2\times T$$

در رابطه ۱، ψ_s پتانسیل اسمزی برحسب بار، M مولاریته محلول کلرید سدیم، I درجه یونیزاسیون کلرید سدیم، R ثابت گازها و T دما برحسب درجه کلوین و در رابطه ۲، ψ_s پتانسیل اسمزی بر حسب بار،C غلظت PEG برحسب گرم بر کیلوگرم و T دما برحسب درجه سانتی‌گراد است.

نمونه‌برداری ۱۴ روز پس از آغاز تنش انجام و نمونه‌های گیاهی پس از انجماد با ازت مایع تا هنگام بررسی‌های بعدی به فریزر ۸۰°C- منتقل شدند. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

سنجش کلروفیل و کاروتنوئید: ۰/۱ گرم از نمونه برگی را در ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد درون هاون چینی ساییده و توسط کاغذ صافی صاف و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. شدت جذب محلول در طول‌موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena) خوانده شد. میزان کلروفیل و کاروتنوئید با استفاده از روابط زیر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد.

رابطه ۳)

$$Chl\ a\ (mg\ g^{-1}) = [\ ۱۲/۷(A_{۶۶۳}) - ۲/۶۹(A_{۶۴۵})]\times V/(۱۰۰۰W)$$

رابطه ۴)

$$Chl\ b\ (mg\ g^{-1}) = [\ ۲۲/۹(A_{۶۴۵}) - ۴/۶۸(A_{۶۶۳})]\times V/(۱۰۰۰W)$$

رابطه ۵)

$$Chl\ a{+}b\ (mg\ g^{-1}) = [\ ۲۰/۲(A_{۶۴۵}) - ۸/۰۲(A_{۶۶۳})] \times V/(۱۰۰۰W)$$

رابطه ۶)

$$Car\ (mg\ g^{-1}) = [۱۰۰۰(A_{۴۷۰}) - ۱/۸۲(Chl\ a) - ۸۵/۰۲(Chl\ b)]/۱۹۸\times V/(۱۰۰۰W)$$

در رابطه‌های فوق، V حجم نمونه استخراج‌شده برحسب میلی‌لیتر و W وزن تر نمونه برحسب گرم است (Arnon, 1949).

پراکسیداسیون لیپید و نشت یونی: محصول پراکسیداسیون لیپیدها، مالون دی‌آلدئید، با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید (TBA) تعیین شد. ۱ میلی‌لیتر TBA ۰/۵ درصد به ۱ میلی‌لیتر عصاره استخراج‌شده با تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰°C نگهداری و بلافاصله روی یخ منتقل شد. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena) خوانده شد. غلظت مالون دی‌آلدئید با استفاده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

از ضریب خاموشی (ε=۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$) محاسبه و برحسب میکرومول بر گرم وزن تازه بیان شد (De Vos *et al*., 1991). برای اندازه‌گیری نشت یونی ابتدا ۰/۳ گرم نمونه توزین و با آب‌مقطر شست‌وشو داده شد. سپس درون لوله‌های آزمایش حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر در دمای ۲۵°C و به‌مدت ۲۴ ساعت با استفاده از شیکر تکان داده و پس از آن نشت یونی محلول L_1 با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (EC متر: مدل Eco Met ساخت کشور کره) اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد به نمونه‌ها ۲۰ سی‌سی آب‌مقطر اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو و در پایان نشت یونی محلول L_2 اندازه‌گیری و میزان درصد نشت یونی EC با استفاده از رابطه (۷) محاسبه شد (Lutts *et al*., 1996).

رابطه ۷)

$$EC\ (\%) = [L_1/(L_1+L_2)]\times 100$$

سنجش پرولین آزاد کل: ۰/۲ گرم از برگ‌های جوان با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳ درصد (W/V) درون هاون چینی ساییده و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. سپس به روشناور بدست آمده، ۲ میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال افزوده و به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار داده شد. پس از سرد کردن مخلوط واکنش روی یخ، به آن ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و پس از مخلوط‌شدن، جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena) خوانده شد (Bates *et al*., 1973).

استخراج و سنجش میزان فنل کل و اسیدرزمارینیک: ترکیبات فنلی کل براساس روش رنگ سنجی با استفاده از معرف فولین- سیوکالتیو اندازه‌گیری شد (Singleton and Rossi, 1965). ۰/۲ گرم نمونه خشک با استفاده از متانول با هم‌زدن پیوسته به‌مدت ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شد. ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالتیو به ۲۰ میکرولیتر عصاره متانولی اضافه و بعد از گذشت ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم اشباع شده اضافه و در تاریکی به‌مدت ۲ ساعت نگه‌داری شد. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر خوانده و مقدار فنل کل برحسب منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد. برای استخراج اسید رزمارینیک عصاره‌گیری نمونه‌های خشک با استفاده از اتانول ۳۰٪ (v/v) صورت گرفت. مخلوط آزمایش شامل ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره صاف شده، ۳ میلی‌لیتر اتانول و زیرکونیوم اکسی کلراید $ZrOCl_2$ در غلظت نهایی ۰/۵ مولار بود. مخلوط حاصل به‌مدت پنج دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۳۶۲ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت اسید رزمارینیک در هر نمونه، با استفاده از استاندارد اسید رزمارینیک برحسب میکروگرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد (Ozturk *et al*., 2010).

سنجش میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز: به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز ۰/۲ گرم نمونه برگی منجمد را درون هاون توسط بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸ حاوی مرکاپتواتانول دو میلی‌مولار ساییده و سپس با سرعت ۹۰۰۰×g به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ و روشناور برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل فنیل‌آلانین (۱۰میلی‌مولار) به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر، بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار به میزان یک میلی‌لیتر با اسیدیته ۸/۸، آب‌مقطر به میزان ۰/۴ میلی‌لیتر و عصاره استخراجی به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر بود. مخلوط واکنش به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری و واکنش آنزیمی با استفاده از اسید کلریدریک ۶ مولار متوقف شد. اسید سینامیک تولیدشده پس از استخراج توسط اتیل استات، در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیم برحسب میزان اسید سینامیک به ازای میلی‌گرم پروتئین در مدت زمان یک ساعت بیان شد (Wang *et al*., 2006).

بررسی بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز: استخراج RNA نمونه‌ها با استفاده از کیت Column RNA isolation kit براساس دستورالعمل شرکت سازنده (دنا زیست آسیا) انجام و پس از حذف DNA ژنومی با استفاده از آنزیم DNase1، محصول شرکت Thremo Scientific، کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای اختصاصی برای واکنش‌های RT-PCR

ژن		توالی آغازگرها	شماره دسترسی (GenBank)	دمای اتصال (°C)	طول قطعه تکثیر شده (bp)
MoPAL	رفت:	5' GCCGAAGTCATGAACGGAAAGC 3'	FN665700	۵۸	۱۳۲
	برگشت:	5' CGCAGCCTTAACATAACCGCTC 3'			
MoRAS	رفت:	5' ACGCCCCGACCTCAACCTTATC 3'	FR670523	۵۸	۱۳۲
	برگشت:	5' AAGTGGTGCTCGTTTGCCACG 3'			
MoEF1α	رفت:	5' TTGCTGCTGCAACAAGATGGAC 3'	HQ694771	۵۸	۱۳۲
	برگشت:	5' GGGACGAATGCGATTTTGTCGG 3'			

دستگاه نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز تأیید شد. ساخت رشته اول cDNA از ۰/۵ میکروگرم RNA کل با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit شرکت Thermo Scientific انجام شد. به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها از آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر cDNA استفاده شد (Doring *et al.*, 2014). ژن EF1α به‌عنوان شاهد داخلی جهت بررسی کمی بیان ژن‌ها در نظر گرفته شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ نشان داده شده است. ساخت آغازگرها توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی به سفارش شرکت دنا زیست‌آسیا صورت گرفت. مراحل واکنش شامل سه مرحله به‌ترتیب مرحله اول، ۹۵°C به‌مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم،۴۰ چرخه ۹۵°C به‌مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۲۵ ثانیه و مرحله سوم، منحنی ذوب از ۵۵ تا ۹۵°C با فاصله‌های افزایشی ۰/۵°C در مدت ۱۵ ثانیه بود. دستگاه Real-time مدل 9600 plus شرکت Bioer، برای بررسی بیان ژن‌ها به روش Relative Quantitative PCR مورد استفاده قرار گرفت. بیان نسبی ژن‌های مورد نظر با استفاده از EF1α به‌عنوان شاهد داخلی و روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001).

کلیه بررسی‌های در سه تکرار مستقل، هر یک با سه تکرار تکنیکی انجام شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۹ برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده شد. با مشاهده تفاوت معنی‌دار در تجزیه واریانس (ANOVA)، مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد با آزمون دانکن صورت گرفت. برای محاسبه میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها از بسته نرم‌افزاری Excel نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

نتایج و بحث

اثر تنش خشکی و شوری بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی: میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید تحت‌تأثیر اثر تیمار در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت (جدول ۲).

چنان‌چه در جدول ۳ نشان داده شده است گیاهان تحت تنش خشکی و شوری کاهش معنی‌دار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید را نسبت به گیاهان بدون تیمار نشان دادند ($P \leq ۰/۰۵$). کاهش در میزان کلروفیل کل در تنش خشکی و شوری نسبت به شاهد حدود ۴۵ درصد بود، اگرچه میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تنش خشکی و شوری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان نداد (جدول ۳).

تنش‌های غیرزیستی کارآیی فتوسنتز را از طریق تأثیر منفی بر بیوسنتز کلروفیل، عمل فتوسنتز، مکانیسم زنجیره انتقال الکترون و پارامترهای تبادلات گازی کاهش می‌دهند. خشکی و شوری با ایجاد تنش اسمزی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند O_2^- و H_2O_2 می‌شوند که این مولکول‌های مخرب با پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی به‌ویژه کلروفیل را به‌دنبال خواهند داشت. به‌عبارتی‌دیگر تنش‌های خشکی و شوری با ناپایداری غشا تیلاکوئیدها از طریق کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات تنش شوری و خشکی بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
تیمار	۲	۱/۳۰۴**	۰/۱۶۹**	۲/۳۹۹**	۰/۰۸۸**
اشتباه	۶	۰/۰۱۳	۰/۰۰۱	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات (٪)		۷/۲۳	۴/۳۷	۴/۷۰	۳/۹۶

**** اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد**

جدول ۳- تأثیرات تنش خشکی و شوری بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی

تیمار	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
	(میلی‌گرم بر گرم وزن تر)			
بدون تیمار	۲/۳۵±۰/۱۲a	۰/۹۹±۰/۰۳a	۳/۳۴±۰/۱۳a	۰/۷۷±۰/۰۱a
تنش خشکی	۱/۱۷±۰/۱۱b	۰/۶۰±۰/۰۰b	۱/۷۷±۰/۱۱b	۰/۴۶±۰/۰۲b
تنش شوری	۱/۲۵±۰/۱۲b	۰/۵۷±۰/۰۴b	۱/۸۲±۰/۰۸b	۰/۵۰±۰/۰۲b

داده‌ها میانگین سه تکرار مستقل ±انحراف استاندارد و حروف متفاوت معرف اختلاف معنی‌دار (P≤ ۰/۰۵) براساس آزمون دانکن است.

به‌شدت فتوسنتز را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (Sharma *et al.*, 2019). به‌نظر می‌رسد تنش اسمزی حاصل از خشکی و شوری با افزایش سطح اسید آبسیزیک، یک سری وقایع سیگنالینگ مرتبط با بیان ژن‌های مرتبط با تنش و مسیرهای انتقال پیام را فعال می‌کند که با فعال‌سازی کلروفیلاز و تجزیه کلروفیل از طریق کاهش میزان کلروفیل، کارآیی فتوسنتز را در گیاهان کاهش می‌دهد (Zou *et al.*, 2010). بررسی‌ها نشان داده است که تنش‌های محیطی میزان کاروتنوئید را از نظر کمی و کیفی تحت‌تأثیر قرار می‌دهند. در گیاهان تحت تنش عدم تعادل بین جذب نوری فتوسنتز و تثبیت کربن در چرخه کالوین منجر به تحریک و برانگیختگی بیش از حد الکترون‌ها شده و با اکسید کردن کاروتنوئید و آسیب غشایی، کاهش میزان کاروتنوئید را در پی داشته است (Muller *et al.*, 2001). کاهش میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در تنش خشکی و شوری در گیاه سیاهدانه (رحمانی و همکاران، ۱۳۹۹) و شیرین‌بیان (حسینی و همکاران، ۱۳۹۸) گزارش شده است. همچنین تنش خشکی و شوری باعث کاهش میزان کلروفیل کل و کاروتنوئید در گیاه آویشن (Razavizadeh *et al.*, 2017) و ریحان (Menezes *et al.*, 2017) شد که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.

اثر تنش خشکی و شوری بر پارامترهای بیوشیمیایی: میزان ترکیبات فنلی، پرولین آزاد، مالون دی‌آلدئید و نشت یونی تحت‌تأثیر اثر تیمار در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت (جدول ۴).

میزان ترکیبات فنلی در گیاهان تحت تنش شوری به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاهان بدون تیمار افزایش یافت؛ درحالیکه در گیاهان تحت تنش خشکی میزان ترکیبات فنلی نسبت به گیاهان بدون تیمار، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری (P ≤ ۰/۰۵) نشان نداد (شکل ۲). ترکیبات فنلی گروه بزرگی از ملکول‌های آلی هستند که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در پاسخ به تنش‌های محیطی، قادر به حذف رادیکال‌های آزاد هستند. سنتز ترکیبات فنلی به‌رغم کاهش رشد گیاه در شرایط تنش، به‌مانند سدی دفاعی، گیاه را درمقابل تنش‌های محیطی حمایت می‌کنند (Samec *et al.*, 2021). بررسی‌های انجام‌شده، افزایش بیوسنتز و تجمع ترکیبات فنلی و متابولیت‌های ثانویه را در گیاه بادرنجبویه تحت تنش شوری نشان داده است

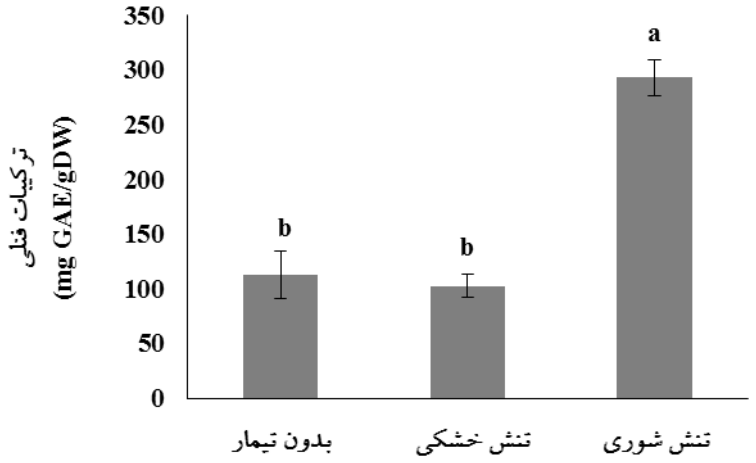
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

جدول ۴- تجزیه واریانس اثرات تنش شوری و خشکی بر میزان ترکیبات فنلی، پرولین آزاد، مالون دی‌آلدئید و نشت یونی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		ترکیبات فنلی	پرولین آزاد	مالون دی‌آلدئید	نشت یونی
تیمار	۲	۳۴۵۰۷/۲۵۶ **	۷/۱۳۷**	۰/۳۴۸**	۲۷۰/۴۴۶**
اشتباه	۶	۲۸۲/۰۵۶	۰/۵۳۰	۰/۰۰۸	۲۲/۳۶۹
ضریب تغییرات (٪)		۹/۹۰	۵/۹۴	۸/۰۸	۶/۸۱

**** اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد**

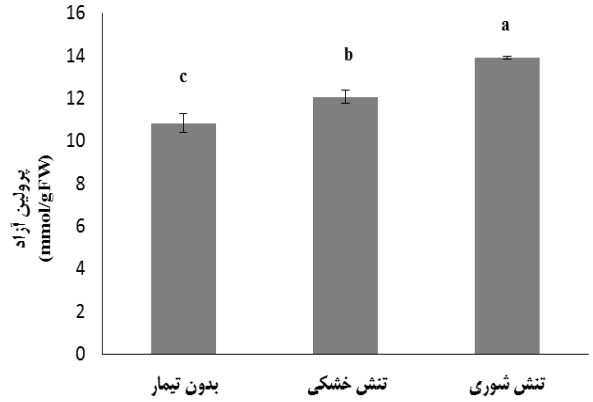


شکل ۲- تغییرات میزان ترکیبات فنلی تحت تنش خشکی و شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد و حروف متفاوت معرف اختلاف معنی‌دار (P≤ ۰/۰۵) براساس آزمون دانکن است.

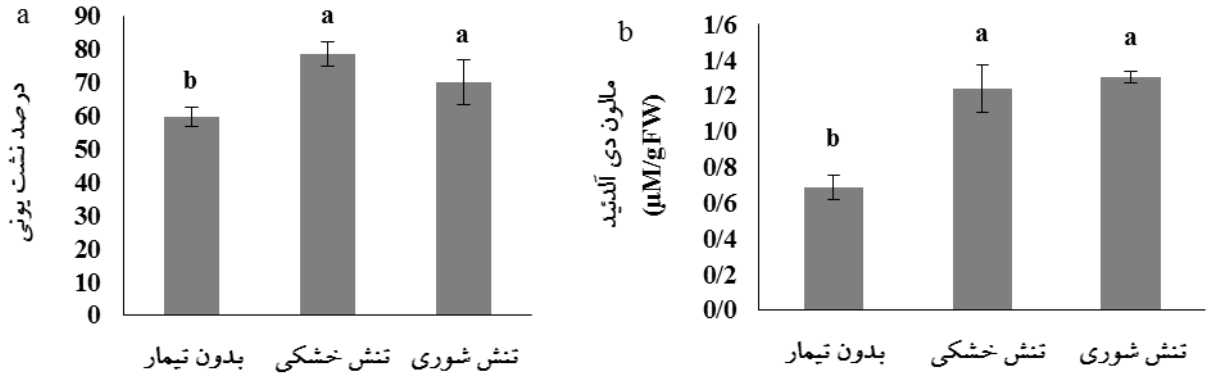
(Hawrylak-Nowak *et al.*, 2021). با توجه به نتایج این پژوهش، افزایش میزان ترکیبات فنلی در تنش شوری نسبت به تنش خشکی می‌تواند مقاومت بیشتر گیاه بادرنجبویه به تنش شوری و یا حساسیت بیشتر آن را به تنش خشکی نشان دهد.

براساس نتایج نشان داده‌شده در شکل ۳، تنش طولانی مدت خشکی و شوری در گیاه بادرنجبویه، میزان پرولین آزاد را نسبت به گیاهان بدون تیمار افزایش داد. در گیاهان تحت تنش خشکی و شوری به‌ترتیب افزایش ۱۱ و ۲۵ درصد پرولین در پاسخ به این تنش‌ها نسبت به گیاهان بدون تیمار مشاهده شد (شکل ۳). تجمع اسموپروتکتانت‌هایی مانند پرولین در گیاهان تحت تنش یکی از پاسخ‌های دفاعی جهت حفظ فشار اسمزی سلول است. ظرفیت تجمع پرولین در شرایط تنش با تحمل تنش در گیاهان ارتباط دارد. به‌عبارتی پرولین تجمع‌یافته در طی تنش، علاوه بر تحمل در طول تنش به‌عنوان ذخیره نیتروژن آلی در بهبود تنش نیز نقش دارد. پرولین با حذف گونه‌های فعال اکسیژن، از طریق بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بهبود فعالیت فتوسیستم II در فتوسنتز و رشد گیاه، حفظ وضعیت آبی مناسب و پایدارنمودن ساختار درشت مولکول‌ها در غشا، تحمل به تنش را در گیاهان افزایش می‌دهد (Ben Ahmed *et al.*, 2010). در این پژوهش افزایش بیشتر پرولین در تنش شوری می‌تواند تحمل گیاه بادرنجبویه به تنش شوری نسبت به تنش خشکی را نشان دهد. این نتیجه با نتایج قدیری و همکاران (۱۳۹۹) در افزایش سطح پرولین برگ‌ها در زمان تنش و افزایش تحمل به تنش خشکی مطابقت داشت.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]



شکل ۳- تغییرات میزان پرولین آزاد تحت تنش خشکی و شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد و حروف متفاوت معرف اختلاف معنی‌دار (P≤ ۰/۰۵) براساس آزمون دانکن است.



شکل ۴- تأثیر تنش خشکی و شوری بر درصد نشت یونی (a) و میزان مالون دی‌آلدئید(b). داده‌ها میانگین سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد و حروف متفاوت معرف اختلاف معنی‌دار (P≤ ۰/۰۵) براساس آزمون دانکن است.

میزان مالون دی‌آلدئید و درصد نشت یونی در گیاهان تحت تنش خشکی و شوری نسبت به گیاهان بدون تیمار افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل a,b ۴)؛ به‌گونه‌ای که میزان مالون دی‌آلدئید در گیاهان تحت تنش حدود دو برابر گیاهان بدون تیمار بود. همچنین درصد نشت یونی در شرایط تنش به‌طور متوسط نسبت به گیاهان بدون تنش ۱/۲ برابر افزایش یافت (شکل ۴). در این پژوهش، در میزان مالون دی‌آلدئید و درصد نشت یونی در گیاهان تحت تنش خشکی و شوری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴). تنش‌های غیرزیستی با ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن با پراکسیده‌کردن لیپیدهای غشایی، افزایش میزان مالون دی‌آلدئید را موجب می‌شوند (Sachdev *et al*., 2021). تنش خشکی افزایش میزان مالون دی‌آلدئید را در گیاه بادرنجبویه به‌دنبال داشت (Jamal Omidi *et al*., 2018). افزایش میزان آسیب به غشای سلولی در شرایط تنش، کاهش نفوذپذیری انتخابی غشا و افزایش نشت یونی را موجب می‌شود (Morales and Munne-Bosch, 2019). نتایج مطالعه رحمانی و همکاران (۱۳۹۹) در بررسی اثر تنش خشکی و شوری با پتانسیل اسمزی برابر بر گیاه سیاهدانه نشان داده است که افزایش بیشتر میزان مالون دی‌آلدئید در تنش خشکی نسبت به تنش شوری حساس‌بودن گیاه را به تنش خشکی نسبت به شوری تأیید کرده است.

اثر تنش خشکی و شوری بر فعالیت، بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز، بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز و میزان اسیدرزمارینیک: فعالیت آنزیم و بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

جدول ۵- تجزیه واریانس اثرات تنش خشکی و شوری بر فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)، بیان نسبی ژن‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و رزمارینیک اسید سینتاز (RAS) و میزان اسید رزمارینیک (RA)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		فعالیت آنزیم PAL	بیان نسبی ژن PAL	بیان نسبی ژن RAS	میزان RA
تیمار	۲	۱۱۷۰۲۲/۱۶۹ **	۵/۶۰۹**	۱/۵۶۵**	۱۱۰۸/۱۷۹**
اشتباه	۶	۱۱۶۵/۸۷۷	۰/۱۶۳	۰/۰۷۵	۱۰/۵۲۵
ضریب تغییرات (٪)		۵/۵۱	۲۵/۵۴	۱۵/۶۵	۳/۹۰

** **اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد**

آمونیالیاز، بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز و میزان اسید رزمارینیک تحت‌تأثیر تیمار در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت (جدول ۵).

براساس نتایج نشان داده‌شده در شکل ۵ بیان نسبی ژن و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز با یکدیگر مطابقت داشت. بیان نسبی ژن و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاهان تحت تنش خشکی نسبت به گیاهان شاهد به میزان ۴۱ و ۳۹ درصد کاهش یافت. درحالیکه در گیاهان تحت تنش شوری بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز نسبت به گیاهان شاهد حدود سه برابر افزایش نشان داد. همچنین افزایش ۲۰ درصد فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاهان تحت تنش شوری در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۵).

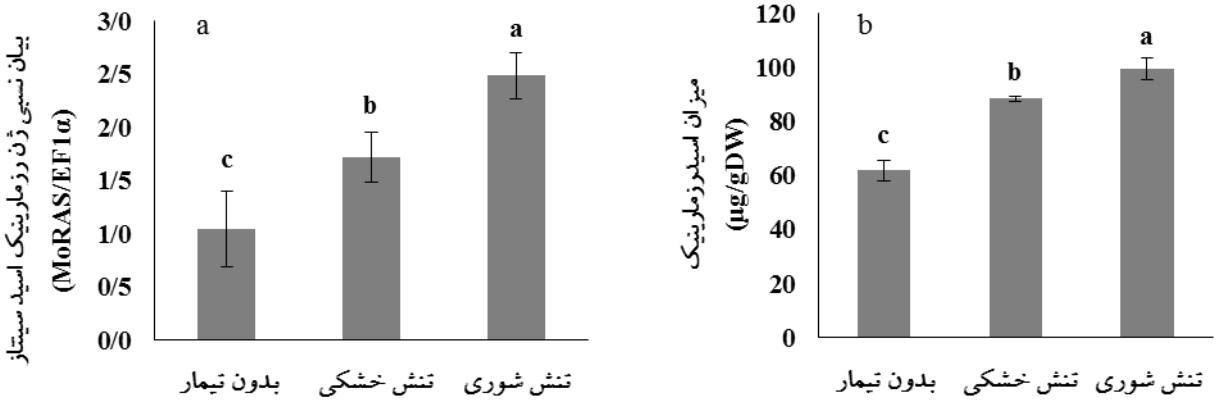
آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز به‌وسیله خانواده چندژنی کوچکی در گیاهان بیان می‌شود. از آنجایی‌که آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی نقش دارد، فعالیت و بیان ژن آن در برابر تنش‌های مختلف، از قبیل زخم، خشکی، شوری، فلزات سنگین و حملات ویروسی، باکتریایی یا قارچی تغییر نشان داده است (Olsen *et al*., 2008). بررسی فعالیت و بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در درک بهتر مکانیسم‌های دفاعی در مقابل تنش‌های مختلف در گیاهان دارویی به‌طور قابل‌توجهی مفید خواهد بود. نتایج مطالعات نشان داده است ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئیدی اغلب در هماهنگی با بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز تنظیم و سنتز ترکیبات فنلی را موجب می‌شوند (Sharma *et al*., 2019). گیاهان بادرنجبویه تحت تنش اوزون، افزایش دو برابری بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز را نسبت به شاهد نشان دادند (Doring *et al*., 2014). همچنین گزارش‌هایی در تأیید ارتباط بین افزایش بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز با تحمل بیشتر به شرایط تنش در گیاهان مشاهده شده است (Vafadar *et al*., 2020; Nag and Kumaria, 2018; Soleimani *et al*., 2017). فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، آنزیمی کلیدی در شروع مسیر فنیل پروپانوئیدی، در اغلب موارد، به‌صورت یک محافظ علیه تنش‌های گیاهی عمل می‌کند (Sahu *et al*., 2013). براساس نتایج این پژوهش بیان نسبی ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز نشان داد افزایش بیان این ژن در تنش شوری که با فعالیت آن مطابقت داشت مقابله بهتر گیاه بادرنجبویه را در برابر تنش شوری نسبت به تنش خشکی با پتانسیل اسمزی برابر تأیید می‌کند.

بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز در تنش خشکی و شوری نسبت به گیاهان بدون تیمار به‌ترتیب ۱/۶ و ۲/۱ برابر افزایش نشان داد (شکل ۶). افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز در تنش خشکی و شوری نسبت به گیاهان شاهد در راستای نتایج مطالعات دیگر در گیاه بادرنجبویه بود (Vafadar *et al*., 2020; Ahmadi *et al*., 2019). براساس نتایج بررسی DNA ژنومی و ساترن‌بلات، ژن اسید رزمارینیک سینتاز در بادرنجبویه فاقد اینترون و تنها یک نسخه از این ژن در گیاه بادرنجبویه وجود دارد (Weitzel and Petersen, 2011). افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز در گیاه بادرنجبویه در استفاده از اسید آبسیزیک به‌عنوان یک فیتوهورمون تنش و تابش اوزون نسبت به گیاهان شاهد گزارش شده است

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

شکل ۵- فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (a) و بیان نسبی ژن (b) تحت تنش خشکی و شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد و حروف متفاوت معرف اختلاف معنی‌دار (P≤ ۰/۰۵) براساس آزمون دانکن است.



شکل ۶- بیان نسبی ژن رزمارینیک اسید سینتاز (a) و میزان اسید رزمارینیک (b) تحت تنش خشکی و شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار مستقل ±انحراف استاندارد و حروف متفاوت معرف اختلاف معنی‌دار (P≤ ۰/۰۵) براساس آزمون دانکن است.

(Mousavi and Shabani, 2019; Doring *et al*., 2014). همچنین در گیاه آویشن تحت تنش خشکی، افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز مشاهده شده است ارتباط تغییرات میزان اسید رزمارینیک با فعالیت و بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی آن در گیاه بادرنجبویه نشان داده شده است. چنان‌چه در شکل ۱ نشان داده شده است تشکیل اسید رزمارینیک در این مسیر بیوسنتزی توسط آنزیم رزمارینیک اسید سینتاز کاتالیز می‌شود (Weitzel and Petersen, 2011). براساس نتایج نشان داده شده در شکل ۶ میزان اسید رزمارینیک در تنش خشکی و شوری در مقایسه با گیاهان بدون تیمار به‌میزان ۴۲ و ۶۰ درصد افزایش یافت. افزایش میزان اسید رزمارینیک با افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز در تنش خشکی و شوری هماهنگ بود. افزایش میزان اسید رزمارینیک با افزایش بیان ژن رزمارینیک اسید سینتاز در گیاه بادرنجبویه تحت تنش گرمایی و شوری و همچنین در گیاه آویشن در تنش خشکی، در نتایج سایر مطالعات نیز گزارش شده است (Vafadar *et al*., 2020; Trocsanyi *et al*., 2015Pistelli *et al*., 2019;). اثر تنش‌های غیرزیستی بر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف نشان داده شده است (Kumar and Sharma, 2018). متابولیت‌های ثانویه، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی با حذف گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی دارند (Isah, 2019). بنابراین گیاه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

بادرنجبویه در تنش شوری با افزایش سنتز و تجمع میزان اسید رزمارینیک نسبت به تنش خشکی مقاومت بیشتری نشان داده است.

نتیجه‌گیری

تنش‌های غیرزیستی از قبیل خشکی و شوری اصلی‌ترین عوامل محیطی هستند که تولید محصول را در دنیا تحت‌تأثیر قرار داده‌اند. تنش اسمزی حاصل از این تنش‌ها فرایندهای فیزیولوژیکی و مولکولی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. در این پژوهش پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه بادرنجبویه به تنش اسمزی حاصل از خشکی و شوری با پتانسیل اسمزی برابر در کشت هیدروپونیک متفاوت بود. در تنش شوری نسبت به تنش خشکی محتوای پرولین، ترکیبات فنلی و اسید رزمارینیک افزایش بیشتری نسبت به شاهد نشان داد. به‌عبارتی گیاه بادرنجبویه در تنش شوری با افزایش میزان پرولین و ترکیبات فنلی و همچنین سنتز بیشتر متابولیت ثانویه اسید رزمارینیک از طریق افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز آن، توان دفاع آنتی‌اکسیدانی خود را افزایش داده و پاسخ‌های دفاعی مناسب‌تری در تنش شوری نسبت به تنش خشکی نشان داده است.

منابع

حسینی، م.، صمصام‌پور، د.، ابراهیمی، م. و خان احمدی، م. (۱۳۹۸) ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و برخی آنتی‌اکسیدان‌ها تحت شرایط تنش خشکی در دو ژنوتیپ شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.). فرآیند و کارکرد گیاهی ۸: ۳۱۰-۲۹۹.

رحمانی، و.، موحدی دهنوی، م.، یدوی، ع. ر.، بلوچی، ح. م. و حمیدیان، م. (۱۳۹۹) پاسخ‌های فیزیولوژیک سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) به سیلیکات کلسیم تحت تنش‌های شوری و خشکی با پتانسیل اسمزی برابر. فرآیند و کارکرد گیاهی ۹: ۹۰-۷۷.

قدیری، ا.، جهانبخش گده‌کهریز، س. و رئیسی ساداتی، س. ی. (۱۳۹۹) مطالعه میزان پروتئین کل، قند محلول، محتوای پرولین و بیان ژن *P5CS* در برگ‌های سه رقم گندم تحت تنش خشکی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲: ۱۴۴-۱۲۵.

Ahmadi, T., Shabani, L. and Sabzalian, M. (2019) Improvement in drought tolerance of lemon balm, *Melissa officinalis* L. under the pre-treatment of LED lighting. Plant Physiology and Biochemistry 139: 548-557.

Amini, S., Ghobadi, C. and Yamchi, A. (2015) Proline accumulation and osmotic stress: An overview of *P5CS* gene in plants. Journal of Plant Molecular Breeding 3: 44-55.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhriss, M. and Ben Abdullah, F. (2010) Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 4216-4222.

Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S. Pezzotti, M. and Shinozaki, K. (2011) Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. BMC Plant Biology 11: 1-14.

De Vos, C., Schat, H., De Waal, M., Vooijs, R. and Ernst, W. (1991) Increased resistance to copper induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. Physiologia Plantarum 82: 523-528.

Doring, A. S., Pellegrini, E., Della Batola, M., Nali, C., Lorenzini, G. and Petersen, M. (2014) How do background ozone concentrations affect the biosynthesis of rosmarinic acid in *Melissa officinalis*? Journal of Plant Physiology 171: 35-41.

Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Stasinska-Jakubas, M., Wojciak, M., Sowa, I. and Matraszek-Gawron, R. (2021) NaCl-induced elicitation alters physiology and increases accumulation of phenolic compounds in *Melissa officinalis* L. International Journal of Molecular Sciences 22: 6844.

Isah, T. (2019) Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biological Research 52: 1-25.

Isayenkov, S. (2012) Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. Cytology and Genetics 46: 302-318.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

Jamal Omidi, F., Mohajjel Shoja, H. and Sariri, R. (2018) Effect of water-deficit stress on secondary metabolites of *Melissa officinalis* L.: Role of exogenous salicylic acid .Caspian Journal of Environmental Sciences: 16: 121-134.

Kittler, J., Kruger, H., Ulrich, D., Zeiger, B., Schutze, W., Bottcher, C., Krahmer, A., Gudi, G., Kastner, U., Heuberger, H. and Marthe, F. (2018) Content and composition of essential oil and content of rosmarinic acid in lemon balm and balm genotypes (*Melissa officinalis*). Genetic Resources and Crop Evolution 65: 1517-1527.

Kumar, I. and Sharma, R. K. (2018) Production of secondary metabolites in plants under abiotic stress: An overview. Significances of Bioengineering and Biosciences 2: 196-200.

Livak, K. and Schmittgen, T. (2001) Analysis of relative gene expressiondata using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25: 402-408.

Lutts, S., Kinet, J. and Bouharmont, J. (1996) NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Annals of Botany 78: 389-398.

Menezes, R. V., Azevedo Neto, A. D., Gheyi, H. R., Cova, A. M. and Silva, H. H. (2017) Tolerance of basil genotypes to salinity. Journal of Agricultural Science 9: 283-295.

Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A. and Meftahizade, H. (2010) *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. Journal of Medicinal Plants Research 4: 2753-2759.

Morales, M. and Munne-Bosch, S. (2019) Malondialdehyde: facts and artifacts. Plant Physiology 180: 1246-1250.

Mousavi, S. and Shabani, L. (2019) Rosmarinic acid accumulation in *Melissa officinalis* shoot cultures is mediated by ABA. Biologia Plantarum 63: 418-424.

Muller, P., Li, X. P. and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiology 125: 1558-1566.

Nag, S. and Kumaria, S. (2018) In silico characterization and transcriptional modulation of phenylalanine ammonia lyase (PAL) by abiotic stresses in the medicinal orchid *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. Phytochemistry 156: 176-183.

Olsen, K. M., Lea, U. S., Slimestad, R., Verheul, M. and Lillo, C. (2008) Differential expression of four Arabidopsis PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. Journal of Plant Physiology 165: 1491-1499.

Ozturk, M., Duru, M. E., Ince, B., Harmandar, M. and Topcu, G. (2010) A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. Food Chemistry 123: 1352-1356.

Pistelli, L., Tonelli, M., Pellegrini, E. Cotrozzi, L., Pucciariello, C., Trivellini, A., Lorenzini, G. and Nali, C. (2019) Accumulation of rosmarinic acid and behaviour of ROS processing systems in *Melissa officinalis* L. under heat stress. Industrial Crops and Products 138: 111469.

Razavizadeh, R., Adabavazeh, F., Rostami, F. and Teimouri, A. (2017) Comparative study of osmotic stress effects on the defense mechanisms and secondary metabolites in *Carum copticum* seedling and callus. Journal of Plant Process and Function 5: 24-33.

Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M. and Hasanuzzaman, M. (2021) Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. Antioxidants 10: 277.

Sahu, R., Gangopadhyay, M. and Dewanjee, S. (2013) Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. Acta Physiologiae Plantarum 35: 1473-1481.

Samec, D., Karalija, E., Sola, I., Vujcic Bok, V. and Salopek-Sondi, B. (2021) The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. Plants 10: 118.

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Yadav, P. and Khanna, K. (2019) Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: A review. Journal of Plant Growth Regulation 1-23.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

Soleimani, Z., Afshar, A. and Nematpour, F. (2017) Responses of antioxidant gene and enzymes to salinity stress in the *Cuminum cyminum* L. Russian Journal of Plant Physiology 64: 361-367.

Trocsanyi, E., Gyorgy, Z., Inotai, K., Szabo, K., Pluhar, Z., Radacsi, P., Malekzadeh, M. and Nemeth-Zamborine, E. (2015) Enhanced rosmarinic acid accumulation and rosmarinic acid synthase gene expression under drought stress in thyme (*Thymus vulgaris*). Planta Medica 81: 246.

Vafadar, F., Amooaghaie, R., Ehsanzadeh, P., Ghanadian, M., Talebi, M. and Ghanati, F. (2020) Melatonin and calcium modulate the production of rosmarinic acid, luteolin, and apigenin in *Dracocephalum kotschyi* under salinity stress. Phytochemistry 177: 112422.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

Wang, J., Zheng, L., Wu, J. and Tan, R. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide 15: 351-358.

Weitzel, C. and Petersen, M. (2011) Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. Phytochemistry 72: 572-578.

Zou, J. J., Wei, F. J., Wang, C., Wu, J. J., Ratnasekera, D., Liu, W. X. and Wu, W. H. (2010) Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid-and Ca^{2+}-mediated stomatal regulation in response to drought stress. Plant Physiology 154: 1232-1243.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]

Comparison of physiological and molecular responses of *Melissa officinalis* L. to osmotic stress imposed by drought and salinity with iso-osmotic potential in hydroponic culture

Mohammadreza Dehghani and Maryam Dahajipour Heidarabadi*

Department of Genetics and Plant Production, Agriculture College, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

(Received: 27/08/2021, Accepted: 08/02/2022)

Abstract

This study was performed to compare some physiological and molecular responses of lemon balm to osmotic stress imposed by drought and salinity stresses with equal osmotic potential in hydroponic culture. Growing lemon balm plants in hydroponic culture were treated with drought and salinity stress using polyethylene glycol 6000 and sodium chloride for 14 days. Then, seedlings were sampled to evaluate the amount of photosynthetic pigments, proline, phenolic compounds, malondialdehyde, ion leakage percentage, phenylalanine ammonialyase activity and the amount of rosmarinic acid. Also, the expression of phenylalanine ammonialyase and rosmarinic acid synthase genes was examined by real-time PCR. This experiment was performed as a completely randomized design with three replications. The results showed that photosynthetic pigments, phenolic compounds, free proline, malondialdehyde, ion leakage, enzyme activity and relative expression of phenylalanine ammonialyase gene, relative expression of rosmarinic acid synthase and rosmarinic acid content affected by drought and salinity stresses at one percent level of probability. Also, a significant reduction in photosynthetic pigments was observed in drought and salinity stresses. The phenolic compounds content in plants under salinity stress increased compared to the plants under drought stress and untreated. The increase in free proline in plants under drought and salinity stresses was 11% and 25%, respectively. The amount of malondialdehyde and the percentage of ion leakage in plants under drought and salinity stress increased compared to the control plants. Relative gene expression and phenylalanine ammonialyase activity increased in salinity stress. Increasing the relative gene expression of rosmarinic acid synthase in drought and salinity stresses increased rosmarinic acid content by 42 and 60% compared to untreated plants. According to the results, lemon balm responded differently to drought and salinity with iso-osmotic potential. In another words, the plant had a better response to osmotic stress induced by salinity than drought with more increase in proline, phenolic compounds, rosmarinic acid contents, relative gene expression and phenylalanine ammonialyase enzyme activity.

Keywords: Drought, Lemon balm, Phenylalanine ammonialyase, Rosmarinic acid, Salinity

Corresponding author, Email: m.dahaji@vru.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.50.6.1]