

The combined effects of salinity and heat on the yield of rosmarinic acid and expression of some genes involved in its biosynthesis in *Mentha piperita* L. at different time intervals

Azam Gholamnia 

Ph.D. Student, Department of Arid Land and Desert Management. Faculty of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd. E-mail: gholamnia@stu.yazd.ac.ir

Asghar Mosleh Arani 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, Yazd University, Yazd. E-mail: amosleh@yazd.ac.ir

Hamid Sodaeizadeh 

Associate Professor, Department of Arid Land and Desert Management. Faculty of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd. E-mail: hsodaie@yazd.ac.ir

Saeed Tarkesh Esfahani 

Assistant Professor, Department of Arid Land and Desert Management. Faculty of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd. E-mail: s.tarkesh@yazd.ac.ir

Somaieh Ghasemi

Associate Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Natural Resources, Yazd University, Yazd. E-mail: s.ghasemi@yazd.ac.ir

Abstract

Objective

The growth and yield of plants in the arid and semiarid areas are limited by salinity stress. In these areas, salinity intensifies by high temperatures. Peppermint (*Mentha piperita* L.) is of great economic importance in the most of world areas due to their valuable essential oils. This study investigated the simultaneous effects of salinity and heat on rosmarinic acid production and expression of three effective genes (*C4H*, *HPPR*, and *RAS*) in rosmarinic biosynthesis in peppermint.

Materials and methods

The effect of two levels of salinity 60 and 120 mM of sodium chloride (irrigation water with salinity of 10 Mm as control) and heat stress at 35°C (25°C as control) at three interval times (24,

48 and 72 hours) after treatments were measured in a completely randomized design with three replications.

Results

The results showed that salinity stress decreased the relative level of rosmarinic acid. The process intensified over time so that it reached its lowest level at salinity of 60 mM at 72 hours. RAS genes expression was significantly reduced under salinity of 120 mM and 60 mM under 25°C and 35 °C. Changes in the expression level of C4H in peppermint seedlings at the salinity levels of 60 mM and 120 mM at 25°C showed a significant increase (4.1 and 3.6 times respectively) at the first 24 hours compared to control. The expression of HPPR gene in peppermint seedlings at 35 °C increased 2.68, 1.79 and 2.55 times at 24, 48 and 72 hours, respectively, compared to the control.

Conclusions

Simultaneous salinity and heat stress are a limitation factor for growing *Mentha piperita* L. These factors had a negative effect on the biosynthesis of rosmarinic acid in this plant. Salinity and heat stress decreased the expression of some genes and increased the expression of others in peppermint.

Keywords: Gene expression, Rosemaric acid, Salinity, Heat, Peppermint.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Gholamnia A, Mosleh Arani A, Sodaeizadeh H, Tarkesh Esfahani S, Ghasemi S (2022)

The combined effects of salinity and heat on the yield of rosmarinic acid and expression of some genes involved in its biosynthesis in *Mentha piperita* L. at different time intervals. . *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 193-212.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (2), 193-212. DOI: 10.22103/jab.2022.18820.1373

Received: March 10, 2022.

Received in revised form: April 29, 2022.

Accepted: April 30, 2022.


Published online: May 5, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.




© the authors


بررسی اثرات همزمان شوری و گرما بر مقدار و بیان برخی ژن‌های مهم درگیر در بیوسنتز رزمارینیک اسید
در گیاه دارویی نعناء فلفلی (*Mentha piperita L.*) در فواصل زمانی متفاوت

اعظم غلام‌نیا 


دانشجوی دکتری، گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد. رایانامه: gholamnia@stu.yazd.ac.ir

اصغر مصلح آرانی 

*نویسنده مسئول: دانشیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد. رایانامه: amosleh@yazd.ac.ir

حمید سودایی‌زاده 

دانشیار گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد. رایانامه: hsodaie@yazd.ac.ir

سعید ترکش اصفهانی 

استادیار گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد. رایانامه: s.tarkesh@yazd.ac.ir

سمیه قاسمی

دانشیار گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد. رایانامه: s.ghasemi@yazd.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰

چکیده

هدف: رشد و عملکرد گیاهان در جهان به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک تحت تأثیر تنش شوری محدود شده است. در این مناطق، اثر تنش شوری در اثر خشک‌سالی همزمان ناشی از دمای بالا شدت می‌یابد. نعناء فلفلی (*Mentha piperita L.*) از اهمیت اقتصادی زیادی بدلیل اسانس آن در اکثر مناطق جهان برخوردار است. این تحقیق با هدف بررسی اثرات تنش همزمان شوری و گرما بر میزان تولید رزمارینیک اسید و میزان بیان کمی سه ژن موثر در بیوسنتز رزمارینیک اسید (*HPPR*, *RAS*) و (*C4H*) در نعناء فلفلی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تأثیر دو سطح شوری ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (آب آبیاری با شوری ۱۰ میلی‌مولار به عنوان شاهد) و یک سطح تنش گرمایی ۳۵ درجه سانتیگراد (۲۵ درجه سانتیگراد به عنوان شاهد) و در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها در یک آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در ۳ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** نتایج نشان داد که تنش شوری منجر به کاهش رزمارینیک اسید شد و این فرآیند به مرور زمان تشدید شد به طوری که در ۷۲ ساعت پس از تیمار به کمترین میزان خود در سطح شوری ۶۰ میلی‌مولار رسید. بیان ژن *RAS* در گیاهچه‌های نعنای فلفلی در شوری ۶۰ میلی‌مولار و ۱۲۰ میلی‌مولار در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. تغییرات بیان ژن *CAH* در نهال‌های نعنای فلفلی در سطوح شوری ۶۰ میلی‌مولار و ۱۲۰ میلی‌مولار و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌داری (به ترتیب ۴/۱ و ۳/۶ برابر) در ۲۴ ساعت اول نسبت به شاهد نشان داد. میزان بیان ژن *HPPR* در نهال‌های نعنای فلفلی در دمای ۳۵ درجه نسبت به شاهد در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲/۶۸، ۱/۷۹ و ۲/۰۵ برابر افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: تنش‌های همزمان شوری و گرمایی محدودیتی برای کشت نعنای فلفلی محسوب می‌شوند. این عوامل بر روی تولید رزمارینیک اسید در این گیاه تأثیر منفی گذاشته است و موجب کاهش تولید آن گردید. تنش شوری و گرما بیان برخی ژن‌ها را کاهش و بیان برخی دیگر را در نعنای فلفلی افزایش داد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، رزمارینیک اسید، شوری، گرما، نعنای فلفلی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: غلام‌نیا اعظم، مصلح آرائی اصغر، سودایی‌زاده حمید، ترکش اصفهانی سعید، قاسمی سمیه (۱۴۰۱) بررسی اثرات همزمان شوری و گرما بر مقدار و بیان برخی ژن‌های مهم درگیر در بیوسنتز رزمارینیک اسید در گیاه دارویی نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L.) در فواصل زمانی متفاوت. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۴(۲)، ۱۹۳-۲۱۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L.) گیاهی علفی، چندساله، ریزوم‌دار و هیبرید ($2n=48$) از تیره نعنائیان است که از تلاقی میان پونه آبی (*M. aquatica*) و نعنای (*M. spicata*) بوجود آمده است. این گیاه بومی مناطق مدیترانه‌ای است اما امروزه در تمام نقاط دنیا برای مصارف غذایی، دارویی، عطرسازی و پزشکی کشت می‌شود (Afkar & Zand 2020). گونه‌های جنس

Mentha بواسطه اسانس ارزشمندی که دارند، در بیشتر مناطق دنیا اهمیت اقتصادی بالایی دارند. اسانس نعنا فلفلی نیز به‌عنوان جزئی از محصولات غذایی و آرایشی بهداشتی به‌طور گسترده استفاده می‌شود. علاوه بر این دارای خواص دارویی متعددی است که منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره اساسی بسیاری از داروها هستند (Mahendran & Rahman 2020). رشد و عملکرد گیاهان در سراسر جهان توسط تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده متعدد محدود می‌گردد که با تأثیر بر سنتز متابولیت‌های ثانویه ارزش محصول آن‌ها را تغییر می‌دهند (Gull et al. 2019; Saijo & Loo 2020). رزمارینیک اسید یکی از مهمترین ترکیبات ضدسرطانی بوده که در اکثر گیاهان تیره نعنا از جمله نعنا فلفلی به میزان هفت میلی‌گرم در گرم وزن خشک یافت می‌شود. رزمارینیک اسید جزء ترکیبات فنلی بوده و یک استر از کافئیک اسید و ۳،۴-دی-هیدروفیل لاکتیک اسید است که در گیاهان از طریق مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانویید تولید می‌شود. اسید آمینه‌های تیروزین و فنیل آلانین، سوبستراهای این مسیر بیوسنتزی بوده و آنزیم‌های تیروزین آمینوترانسفراز و فنیل آلانین آمینو لیاز آنزیم‌های ابتدایی کاتالیزکننده این مسیر می‌باشند و در نهایت آنزیم‌های سینامیک اسید هیدروکسیلاز (*C4H*)، هیدروکسی فنیل پیرووات ردوکتاز (*HPPR*) و رزمارینیک اسید سینتاز (Rastegari, et al, 2019) منجر به سنتز رزمارینیک اسید می‌شوند (شکل ۱). با توجه به ارزش دارویی این ترکیب و افزایش تقاضا در صنعت دارو سازی از یک طرف و پیچیده و هزینه بر بودن سنتز رزمارینیک اسید به‌طور مصنوعی از طرف دیگر، یافتن راهکاری برای افزایش سطح سنتز آن در گیاه بسیار حائز اهمیت خواهد بود که این امر مستلزم افزایش آگاهی نسبت عوامل مؤثر در تغییر سطح بیان ژن‌های دخیل در فرآیندهای بیوسنتز رزمارینیک اسید می‌باشد (Adham, 2015; Mosleh Arani et al. 2015).

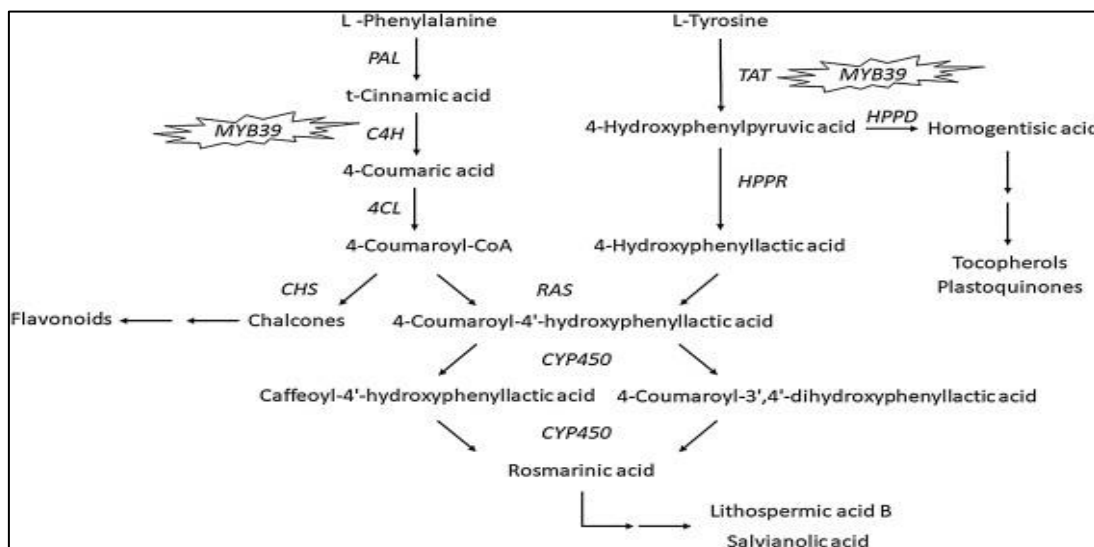
تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده در مناطق خشک و نیمه‌خشک است که کیفیت و عملکرد محصولات کشاورزی را از طریق افزایش فشار اسمزی محلول خاک، کاهش آب قابل استفاده گیاه، سمیت برخی عناصر مانند سدیم و کلر، برهم زدن تعادل در جذب عناصر ضروری و تنش اکسیداتیو تحت تأثیر قرار می‌دهد. گیاهان از طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین سلولی و مولکولی بسیار متفاوت و پیچیده به این تنش پاسخ داده و خود را با شرایط محیطی منطبق و یامتحمّل می‌سازند (Amini Hajiabadi et al. 2021, Mosleh Arani et al. 2018; Mosleh Arani et al. 2011). تنش گرما به‌طور قابل توجهی سطح کل اسیدهای فنلی، ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی، اسید رزمارینیک و فنل‌های محلول در *Mentha spicata*، را کاهش داد (Fletcher et al. 2005). در بررسی تأثیر تنش شوری و گرما بر ویژگی‌های رشدی و بیوشیمی و مولکولی گیاه گوجه فرنگی نشان داده شد که جذب و انتقال سدیم و پتاسیم، بیان ژن و آنزیم‌های مرتبط، در ترکیب این دو تنش نسبت به زمانی که آنها به‌صورت جداگانه به‌کار می‌رود متفاوت بود (Rivero et al. 2014). تغییرات سطح بیان ژن‌های مسیر سنتز رزمارینیک اسید تحت تیمار تنش‌های غیرزیستی، در مطالعات مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفته است. افزایش سطح بیان ژن سینامیک اسید هیدروکسیلاز (*C4H*) در *Carthamus tinctorius* تحت تیمار تنش شوری، زخم و سالیسیلیک اسید در ۶ ساعت بعد از اعمال تیمار و روند افزایشی سطح بیان ژن *C4H* در بافت‌های مختلف و در مراحل مختلف رشد در

Hibiscus cannabinus تحت تنش‌های زخم، شوری، سرما، H_2O_2 ، اسید آسبیزیک و اسید سالیسیلیک مشاهده شد (Sadeghi et al. 2013). در مطالعه‌ای دیگر بیان سیزده ژن درگیر در بیوسنتز پلی فنول در غده‌های پنج رقم سیب زمینی پس از قرار گرفتن در معرض خشک‌سالی بررسی شد. نتایج نشان داد که تغییرات در سطح بیان ژن در اثر خشک‌سالی بسیار به رقم بستگی داشت و در ارقام مقاوم بیان بالاتری از ژن مشاهده شد (André et al. 2009). بسیاری از زمین‌های کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک تحت تأثیر شوری قرار دارند. در این مناطق تأثیر تنش شوری همزمان با تنش حرارت تشدید می‌شود. به دلیل اهمیت دارویی و کاربردهای صنعتی رزمارینیک اسید، بررسی و به دست آوردن بهترین شرایط محیط کشت که بتواند منجر به تولید گیاهی با بیشترین میزان رزمارینیک اسید گردد از مهمترین اهداف در تحقیقات مربوط به کشت گیاهان دارویی مانند نعنا فلفلی می‌باشد. با توجه به اینکه پاسخ گیاه نعنا فلفلی به ترکیب همزمان تنش شوری و گرمایی مورد مطالعه قرار نگرفته است، به علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Arabpour et al. 2008; Mosleh Arany et al. 2021). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Mohammadabadi et al. 2021). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Shahsavari et al. 2021). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). لذا این تحقیق با هدف بررسی میزان تغییرات رزمارینیک اسید و بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز آن در گیاه نعنا فلفلی تحت تأثیر تنش شوری و حرارتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تنش‌های شوری و گرمایی: تکثیر نعنا فلفلی از طریق ریزم‌هایی با قطر و اندازه مساوی انجام شد. تعداد ۳۶ گلدان پلاستیکی به قطر ۲۵ و ارتفاع ۳۰ سانتیمتر تهیه و جهت سهولت خروج زهاب مقداری سنگ ریزه در ته هر گلدان ریخته و با

مخلوطی از خاک باغچه، ما سه، کود دامی به ترتیب به نسبت ۱:۱:۱ پر شد. نهال‌های سالم و هم اندازه در گلخانه با شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ درصد نگهداری شدند (Gowton et al. 2020). پس از رشد نهال‌های نعناء فلفلی تا ارتفاع ۱۸-۲۰ سانتی‌متر و ۱۵-۱۰ برگ، تنش شوری در دو سطح ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (آب آبیاری با شوری ۰ میلی‌مولار به‌عنوان شاهد) و تنش گرمایی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان شاهد) اعمال شد. جهت جلوگیری از شوک به گیاهان، تنش شوری به صورت تدریجی تا رسیدن به دوزهای مورد نظر انجام شد. آبیاری گلدها با ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول‌های مختلف کلرید سدیم و یا آب آبیاری به‌صورت یک درمیان انجام شد.



شکل ۱. بیوسنتز رزمارینیک اسید

Figure 1. Rosmarinic acid biosynthesis

برای تنش حرارتی، گلدها در اتاقک کشت با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و گلدهای شاهد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌هایی از برگ گیاهچه‌های نعناء فلفلی در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها تهیه شدند و به‌منظور اندازه‌گیری میزان رزمارینیک اسید و بیان ژن‌های سینامیک اسید هیدروکسیلاز (*C4H*)، هیدروکسی فیل پیروات ردوکتاز (*HPPR*) و رزمارینیک اسید سینتاز (*RAS*) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Wyse & Netto 2011).

اندازه‌گیری رزمارینیک اسید: جهت اندازه‌گیری مقدار رزمارینیک اسید، نمونه‌های برگ به آزمایشگاه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی (دانشگاه شهید بهشتی) ارسال شد. در ابتدا غلظت‌های یک، شش، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ میلی‌گرم بر لیتر از رزمارینیک اسید در حلال استونیتریل تهیه شد و با تزریق مستقیم ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (مدل ۱۱۰۰ اجیلنت، مجهز به پمپ گرادیان چهار حلالی، با دکتور فوتودیوداری، ستون C18، ۳۰ سانتیمتری)

زمان بازداری و سطح زیر پیک آن‌ها مشخص شد و منحنی و معادله کالیبراسیون به دست آمد. نمونه‌های بافت برگ در حضور نیتروژن مایع پودر شدند. به ۱/۰ گرم بافت پودر شده دو میلی‌لیتر اسید استیک ۱٪ افزوده و به دستگاه اولتراسونیک (بیوروندا، ایتالیا) منتقل شد. سپس نمونه‌ها در 10000 rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شده و ۲۰ میکرولیتر از فاز بالایی بعد از گذراندن از فیلتر به دستگاه HPLC تزریق شد. سطح زیر پیک کروماتوگرام‌های نمونه‌های برگ محاسبه و در معادله کالیبراسیون قرار گرفت و غلظت رزمارینیک اسید در نمونه‌های برگ بر حسب $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ محاسبه شد. (Adham 2015)

طراحی آغازگرها: طراحی آغازگرهای ژن هایسینامیک اسید هیدروکسیلاز (*C4H*)، هیدروکسی فنیل پیروات ردوکتاز (*HPPR*)، اکتین (*Actin*) و ژن رزمارینیک اسید سینتتاز (*RAS*) با استفاده از نرم افزار آنلاین Oligo (www.oligoarchitect.com) انجام شد (جدول ۱). دمای اتصال آغازگرها در واکنش PCR به روش گرادیانت مورد ارزیابی قرار گرفت و عملکرد همه آغازگرها در دمای اتصال ۶۰ درجه سانتیگراد بهینه شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش qPCR

Table 1. Oligonucleotide primer pairs used for qPCR

شماره دسترسی	طول قطعه (bp)	توالی (۳.....۵)	نام ژن
Accession number	Amplicon size (bp)	primer Sequence (5'.....3')	name Gene
MG893899.1	168	GGTTTCCAACACGCCCGATG CCCCTCTTTTGCCACTGAACT	F R <i>HPPR</i>
MH208308.2	125	TGCCGTTCTTCACCAACAAGGTC CCGCCTCAACACGATCCCAT	F R <i>C4H</i>
--	177	TTAGGCGTGGCAAACGAGCACCA CTGGTACTCGGAGTGGTTGAACT	F R <i>RAS</i>
KR082011.1	122	CAAAGAGAAGCTGGCCTACAT CAGCTCCGATAGTGATGACCT	F R <i>Actin</i>

۱ استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA با استفاده از کیت BioFACT™ Total RNA Prep (کره جنوبی) مطابق دستور العمل ارائه شده توسط سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت محصول استخراج RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ مشخص شد. به منظور حذف DNA، پنج میکروگرم RNA استخراج شده با یک میکرولیتر آنزیم DNase (۲۰ u/μL) در I ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد و سپس به همراه یک میکرولیتر (۵۰ mM) EDTA به مدت ۱۰ دقیقه در

۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت BioFACT™ RT Series مطابق دستور العمل ارائه شده توسط سازنده انجام شد. پنج میکروگرم RNA به همراه ۵۰ μM آغازگر (۱۸) Oligodt به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد و سپس در حضور 200 u/μL آنزیم M-MLV reverse transcriptase و ۱۰ mM مخلوط dNTP، به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد به cDNA سنتز شد (Mobasseri et al. 2020).

واکنش Real-time PCR: واکنش qPCR با استفاده از مخلوط BIOFACT™ 2X Real-Time PCR Maste و در دستگاه Applied Biosystems StepOne™ Real-time PCR System مطابق دستور العمل ارائه شده توسط سازنده انجام شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل (200 ng/μL) cDNA، 0.25 μM از هر کدام از آغازگرها، ۱۰ میکرولیتر PCR Maste Mix و آب دو بار تقطیر استریل، آماده شد. برنامه دمایی واکنش به صورت زیر انجام شد: واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۵ ثانیه. پس از اتمام واکنش، چرخه آستانه (Ct) که نمایانگر تعداد نسخه‌های اولیه mRNA و میزان بیان ژن است، با استفاده از نرم‌افزار StepOne v. 2.3 برای هر یک از نمونه‌ها تعیین شد. به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها در نمونه‌های cDNA، از روش $\Delta\Delta Ct$ استفاده شد. نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن با استفاده از داده‌های ژن کنترل داخلی انجام شد (Tehrani et al. 2020).

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی بر مبنای فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون آنوای سه طرفه و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در نرم افزار SPSS v. 26 انجام شد (Moghaddam et al. 2019).

نتایج و بحث

مقایسه میانگین تغییرات سطح رزمارینیک اسید: نتایج مقایسه میانگین تغییرات سطح رزمارینیک اسید در گیاهچه‌های نعاء فلفلی نشان داد که با افزایش سطح شوری میزان رزمارینیک اسید به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۲). تیمار دمایی به‌تنهایی نیز باعث کاهش معنی‌دار رزمارینیک اسید شد. در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با افزایش سطح شوری میزان رزمارینیک اسید کاهش قابل توجهی نسبت به شاهد نشان داد که این روند با گذشت زمان تشدید شد به‌طوری‌که در ۷۲ ساعت بعد از تیمار در سطح شوری ۶۰ میلی مولار به پایین‌ترین سطح خود رسید. این روند در سطح شوری ۱۲۰ میلی مولار نیز با کاهش ۱۰/۹۸ برابری نسبت به شاهد در ۲۴ ساعت اول مواجه شد. دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به‌تنهایی، میزان رزمارینیک اسید را در طی ۲۴ ساعت اول نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتیگراد کاهش داد و در ۴۸ ساعت این کاهش بیشتر (۲/۶۴ برابری) شد اما مقدار آن در ۷۲ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت مجدداً افزایش یافت. در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نیز با افزایش سطح شوری میزان

رزمارینیک اسید کاهش قابل توجهی نسبت به شاهد نشان داد که این روند با گذشت زمان در شوری ۶۰ میلی مولار تشدید شد. مقدار رزمارینیک اسید در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در هر دو سطح شوری به طور معنی داری نسبت به متناظرهای خود در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بیشتر بود.

جدول ۲. تجزیه واریانس میزان رزمارینیک اسید در گیاه نعناع فلفلی تحت تنش‌های شوری و گرمایی

Table 2. Analysis of variance of the rosmarinic acid characteristics in peppermint under salinity and heat stresses.

Means of square	میانگین مربعات	df	درجه آزادی	Source of variation	منابع تغییرات
15.585**	رزمارینیک اسید	1	درجه آزادی	Temperature (A)	دما (الف)
804.830**	رزمارینیک اسید	2	درجه آزادی	Salinity (B)	شوری (ب)
90.424**	رزمارینیک اسید	2	درجه آزادی	Time (C)	زمان (ج)
90.923**	رزمارینیک اسید	2	درجه آزادی	Interaction A×B	الف × ب
4.357**	رزمارینیک اسید	2	درجه آزادی	Interaction A×C	الف × ج
50.012**	رزمارینیک اسید	4	درجه آزادی	Interaction B×C	ب × ج
18.594**	رزمارینیک اسید	4	درجه آزادی	Interaction A×B×C	الف × ب × ج
0.037	رزمارینیک اسید	36	درجه آزادی	Error	خطا
0.0062	رزمارینیک اسید			C.V.%	ضریب تغییرات

***, *, ns به ترتیب معنی دار در سطح یک درصد و پنج درصد و غیر معنی دار.

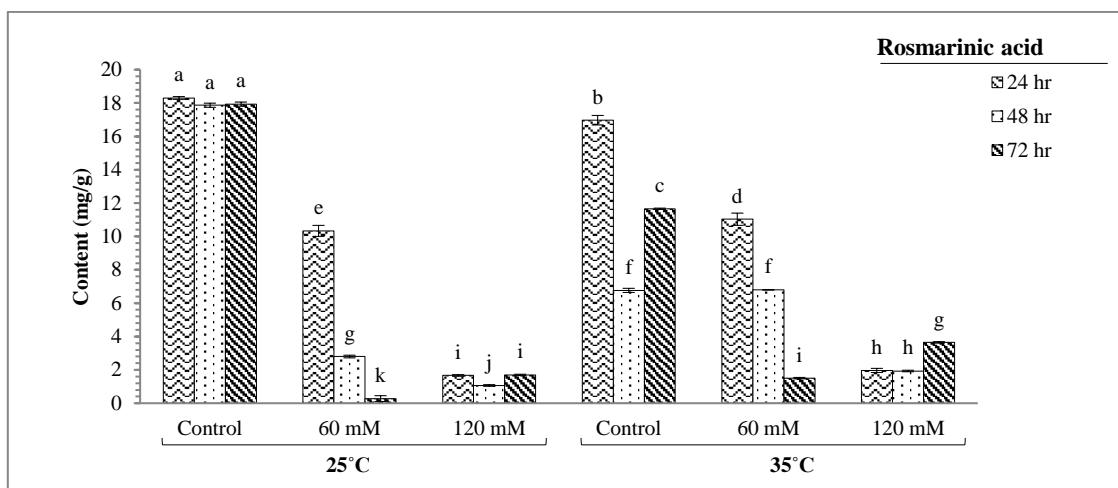
**, *, ns, Significant at $P \leq 0.01$, significant at $P \leq 0.05$, non-significant respectively.

مقایسه تیمارهای متناظر شوری بین دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتیگراد نشان داد که میزان رزمارینیک اسید در تنش دمایی بالاتر بود. هیچ تحقیقی در مورد تاثیر همزمان گرما و شوری بر روی گیاه نعناع فلفلی انجام نشده است ولی در تحقیقی که دو تنش گرما و خشکی بر روی این گیاه بررسی شد نشان داده شد که این دو تنش به تنهایی یا در ترکیب با هم باعث کاهش مقدار ترکیبات فنلی (مانند اسید رزمارینیک، کافیک، کوماریک و فرولیک) شد. این مواد بدلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و خواص ضد سرطانی از اهمیت بسزایی برخوردارند (Alhathloul et al. 2019). مشابه با مطالعه حاضر کاهش مقدار رزمارینیک اسید در گیاه *Mentha spicata* تحت تنش گرمایی بدست آمد (Fletcher et al. 2005). کاهش مقدار رزمارینیک اسید تحت تاثیر تنش گرمایی ممکن است به دلیل کاهش بیوسنتز رزمارینیک اسید و دیگری ممکن است بدلیل فرآیند تخریب سریع آن باشد. مسیر

بیوسنتزی اسید رزمارینیک با استفاده از سوسپانسیون سلولی *Coleus blumei* قبلاً مشخص شده است (Petersen 1997). از نظر آنزیمی، رزمارینیک اسید از اسیدهای آمینه ال-فیل آلانین و ال-تیروزین سنتز می‌شود. در چرخه بیوسنتز اسید رزمارینیک اسید، در اثر کاتالیز دو ماده کوماریول-CoA و ۳-۴ دی-هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید ماده پیش‌تاز رزمارینیک اسید یعنی ۴-کوماریل-۴-هیدروکسی فنیل لاکتات ساخته می‌شود. مطالعات آنزیمی برای کاتالیز این فرآیند، آنزیم سیتوکروم P450 را (در دو موقعیت ۳-هیدروکسیلاز و ۳' هیدروکسیلاز) برای هیدرولیز این پیش‌تاز و تشکیل اسید رزمارینیک پیشنهاد می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد که ۳' هیدروکسیلاز نسبت به دمای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد حساس بوده در حالی که ۳ هیدروکسیلاز نسبت به این دما حساس نیست. بنابراین کاهش مقدار اسید رزمارینیک در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در نعاء فلفلی می‌تواند به غیر فعال شدن این آنزیم در دمای بالا مرتبط باشد. مورد دیگری که ممکن تنش دمایی ایجاد کند این است که رقابت بین واکنش‌های مختلف را زیاد کند. برای مثال ۴-هیدروکسی فنیل پیروات می‌تواند به هوموژنیسات که پیش‌تاز ماده بسیار مهم پرنیل‌کینون است تبدیل شود. پرنیل‌کینون ماده‌ای که در بافت گیاهان برای مقابله با رادیکال‌های آزاد حاصل از تنش‌های محیطی مانند گرما تولید می‌شود. وقتی تنش گرمایی برای گیاه ایجاد شود تقاضا برای این ماده برای مقابله با رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و در نتیجه افزایش تولید هوموژنیسات و در نتیجه کاهش هیدروکسی فنیل پیروات (برای تولید رزمارینیک اسید) را به همراه خواهد داشت. در پژوهشی، بررسی اثر تنش شوری بر گیاه *Salvia officinalis*، کاهش چشمگیر رزمارینیک اسید و مهار رشد گیاه را نشان داد (Todorova et al. 2020) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. در مطالعه‌ای دیگر نیز گزارش کردند که در *Dracocephalum moldavica* تحت تنش حرارت، تغییرات اسید رزمارینیک و محتوای فلفلی کل تحت تأثیر تنش دما، افزایشی را نشان ندادند (Khaleghnezhad et al. 2019).

تجزیه واریانس تغییرات سطح بیان ژن‌ها: نتایج تجزیه واریانس ارزیابی تغییرات سطح بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز رزمارینیک اسید (جدول ۳) نشان داد که فاکتورهای حرارت، شوری و زمان و اثر متقابل آن‌ها تأثیر معناداری بر تغییرات سطح بیان ژن‌های *C4H*، *HPPR* و *RAS* در سطح یک درصد دارند ($P \leq 0.01$). بالاترین و پایین‌ترین ضریب تغییرات به ترتیب در ژن‌های *RAS* با ۰/۰۱۶٪ و *HPPR* با ۰/۰۰۵٪ مشاهده شد.

مقایسه میانگین تغییرات سطح بیان ژن *C4H*: تغییرات سطح بیان ژن *C4H* در گیاهچه‌های نعاء فلفلی (شکل ۳) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سطوح شوری ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار، در ۲۴ ساعت اول افزایش قابل توجهی نسبت به سطح شاهد نشان داد (به ترتیب ۴/۱ و ۳/۶ برابر)، که با گذشت زمان از میزان بیان ژن کاسته شد. در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در سطح شوری شاهد، افزایش معناداری در سطح بیان در مقایسه با ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (۲/۸ برابر). در این دما نیز با اعمال سطوح شوری ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار، در ۲۴ ساعت اول افزایش معناداری در سطح بیان ژن نسبت به سطح شاهد دیده شد (به ترتیب ۳/۹ و ۴/۸ برابر).



شکل ۲. تاثیر متقابل تنش‌های شوری و گرمایی بر مقدار رزمارینیک اسید در گیاهچه‌های نعناع فللی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف یکسان، بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 2. Interaction effects of salinity and heat stresses on the amounts of Rosmarinic acid in peppermint seedling. Data averaged 3 replicates \pm SE. The same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

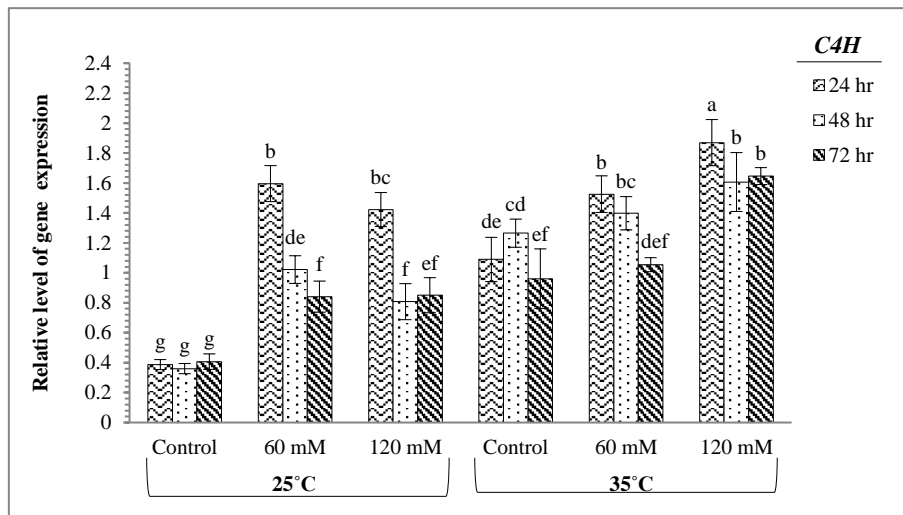
جدول ۳. تجزیه واریانس تغییرات سطح بیان ژن‌ها در گیاه نعناع فللی تحت تنش‌های شوری و گرمایی.

Table 3. Analysis of variance of the relative expression level of genes in peppermint under salinity and heat stresses.

Means of square	میانگین مربعات	df	درجه آزادی	Source of variation	منابع تغییرات
<i>RAS</i>	<i>C4H</i>	<i>HPPR</i>			
2.063**	1.688**	0.704**	1	Temperature (A)	دما (الف)
1.104**	1.604**	0.474**	2	Salinity (B)	شوری (ب)
1.174**	0.590**	0.190**	2	Time (C)	زمان (ج)
0.277**	0.108**	0.065**	4	Interaction A×B×C	الف × ب × ج
0.030	0.020	0.011	36	Error	خطا
0.0016	0.0008	0.0005		C.V.%	ضریب تغییرات

***, **, * and ns, Significant at $P \leq 0.01$, significant at $P \leq 0.05$, non-significant respectively.

مقایسه میانگین تغییرات سطح بیان ژن *HPPR*: نتایج مقایسه میانگین تغییرات سطح بیان ژن *HPPR* در گیاهچه‌های نعنا فلفلی (شکل ۴) نشان داد که با اعمال سطوح شوری ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار و همچنین افزایش حرارت تا ۳۵ درجه سانتیگراد، در ۲۴ ساعت اول، افزایش معناداری در تغییرات سطح بیان ژن *HPPR* در گیاهچه‌های نعنا قابل مشاهده است که با گذشت زمان از اعمال تیمار، این روند کاهش می‌یابد.

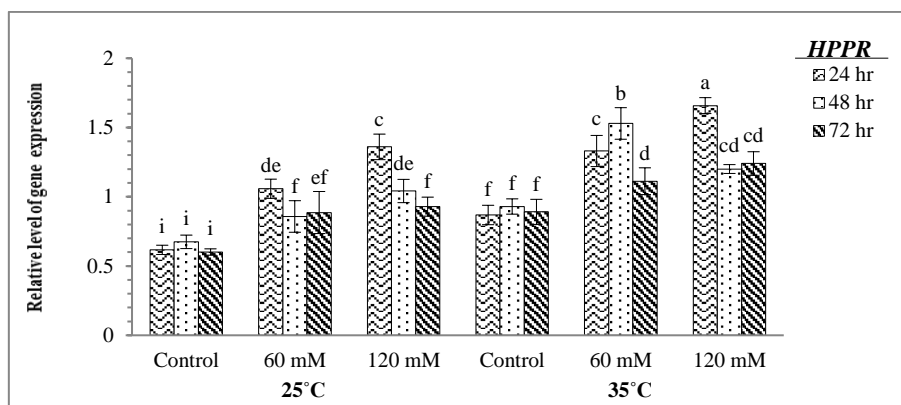


شکل ۳. تاثیر متقابل تنش‌های شوری و گرمایی بر بیان ژن *C4H* در گیاهچه‌های نعنا فلفلی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SE$ است. حروف یکسان، بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 3. Interaction effects of salinity and heat stresses on the C4H gene expression in peppermint seedling. Data averaged 3 replicates $\pm SE$. The same letters indicate no significant.

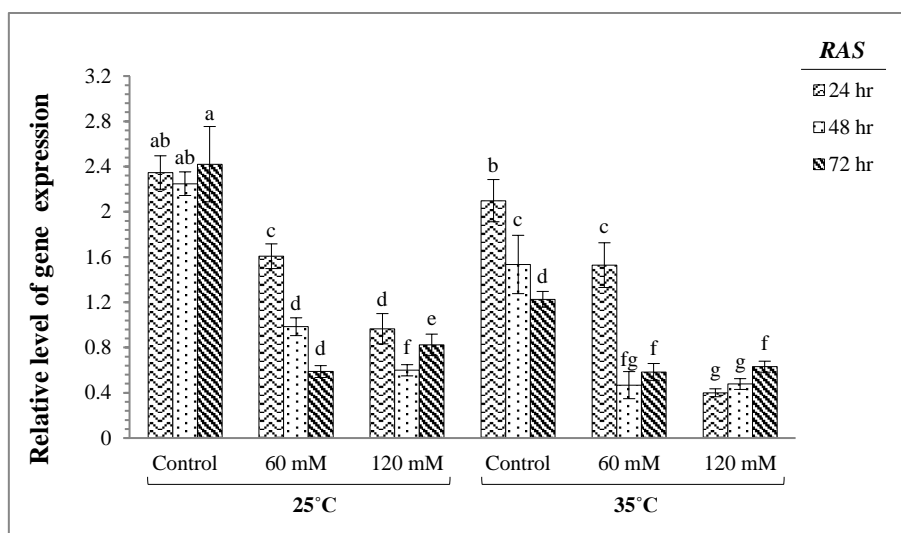
مقایسه میانگین تغییرات سطح بیان ژن *RAS*: نتایج تغییرات سطح بیان ژن *RAS* در گیاهچه‌های نعنا فلفلی (شکل ۵) تحت تیمار سطوح شوری ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نشان داد که سطح بیان ژن با اعمال شوری و گذشت زمان بعد از تیمار، کاهش معناداری در مقایسه با سطح شوری شاهد دارد. در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نیز کاهش بیان ژن در مقایسه با نمونه‌های مشابه در ۲۵ درجه سانتیگراد، معنادار بود و با گذشت زمان نیز بیان ژن کاهش بیشتری نشان می‌دهد. رزمارینیک اسید به عنوان یک ترکیب دفاعی می‌تواند آسیب‌های اکسیداتیو را کاهش دهد و از مرگ سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند. مطالعات بیوژنتیک^۱ و مولکولی در گیاهان *Mentha* و *Coleus blumei* یک مسیر بیوسنتز را پیشنهاد می‌کند که در آن رزمارینیک اسید از ستر ۳،۴-هیدروکسی-فنیل لاکتیک اسید و *4-Cumaryl-CoA*، با کنترل بیان ژن‌های *C4H*، *HPPR* و *RAS* ساخته می‌شود.

¹ Biogenetic



شکل ۴. تاثیر متقابل تنش‌های شوری و گرمایی بر بیان ژن *HPPR* در گیاهچه‌های نعناع فلفلی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SE$ است. حروف یکسان، بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 4. Interaction effects of salinity and heat stresses on the *HPPR* gene expression in peppermint seedling. Data averaged 3 replicates $\pm SE$. The same letters indicate no significant.



شکل ۵. تاثیر متقابل تنش‌های شوری و گرمایی بر بیان ژن *RAS* در گیاهچه‌های نعناع فلفلی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SE$ است. حروف یکسان، بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 5. Interaction effects of salinity and heat stresses on the *RAS* gene expression in peppermint seedling. Data averaged 3 replicates $\pm SE$. The same letters indicate no significant.

در ارزیابی در *Dracocephalum tanguticum* نشان داده شد که ۲۲ ژن شامل چهار ژن *PAL*، سه ژن *C4H*، پنج ژن *4CL*، سه ژن *TAT*، دو ژن *HPPR* و پنج ژن *RAS* در بیوسنتز رزمارینیک اسید دخیل هستند (Li et al. 2017). تغییرات سطح بیان ژن‌های مسیر سنتز رزمارینیک اسید تحت تیمار تنش‌های غیرزیستی، در مطالعات مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفته است. افزایش سطح بیان ژن *C4H* در *Carthamus tinctorius* تحت تیمار تنش شوری، زخم و سالیسیلیک اسید در ۶ ساعت بعد از اعمال تیمار و روند افزایشی سطح بیان ژن *C4H* در بافت‌های مختلف و در مراحل مختلف رشد در *Hibiscus cannabinus* تحت تنش‌های زخم، شوری، سرما، H_2O_2 ، اسید آسیتزیک و اسید سالیسیلیک مشاهده شد (Sadeghi et al. 2013). در مطالعه‌ای دیگر بیان سیزده ژن درگیر در بیوسنتز پلی‌فنول در غده‌های پنج رقم سیب زمینی پس از قرار گرفتن در معرض خشکسالی بررسی شد. نتایج نشان داد که تغییرات در سطح بیان ژن به رقم بستگی داشت و در ارقام مقاوم بیان بالاتری از ژن مشاهده شد (André et al. 2009). در پژوهش دیگر مشاهده شد که رونویسی *C4H* در *Ginkgo biloba* توسط تیمارهای UV-B، سرما، اسید سالیسیلیک و اسید آسیتزیک افزایش یافت، که نشان‌دهنده نقش احتمالی *C4H* در پاسخ به استرس‌ها و سیگنال هورمونی است (Cheng et al. 2018).

پس از اعمال تنش شوری، مسیر فنیل پروپانویید^۲ به سرعت فعال می‌شود. مسیر فنیل پروپانویید یکی از اصلی‌ترین مسیرهای گیاهی برای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه است. تخمین زده می‌شود که ۲۰ درصد کربن تثبیت شده در فرآیند فتوسنتز مستقیماً در این مسیر به کار می‌رود. ترکیبات فنلی به طور طبیعی در سلول‌ها سنتز می‌شوند، با این حال استرس‌های بیولوژیکی میزان سنتز آن‌ها را تغییر می‌دهد. در حقیقت، تغییر در فعالیت‌های آنزیم‌های سنتز یا تجزیه‌کننده این محصولات بر مقدار آن‌ها در سلول تأثیر می‌گذارد. فعالیت مسیر فنیل پروپانویید برای محافظت از گیاه در برابر صدمات ناشی از تنش بسیار مهم است. سینامات^۳-۴-هیدروکسیلاز^۳ (*C4H*) یکی از آنزیم‌های اصلی در مسیر فنیل پروپانویید است که مرحله دوم مسیر را در تبدیل ترانس سینامات^۴ به کومارات^۵ کاتالیز می‌کند. *C4H* عضوی از خانواده پروتئین سیتوکروم P450^۶ است و مونواکسیژناسیون^۷ انواع گسترده‌ای از بسترها را کاتالیز می‌کند که در مسیر سنتز رزمارینیک اسید و یا سنتز لیگنین^۸ منجر به شکل‌گیری فرآیندهای دفاعی می‌شود. دیواره سلول‌های گیاهی در درجه اول از لیگنین تشکیل شده است که عملکردهای پشتیبانی مکانیکی، انتقال آب و واکنش‌های استرسی را انجام می‌دهد. بدیهی است که فنل‌ها در هنگام چالش‌های زیستی و غیرزیستی در بعضی از گیاهان به عنوان ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند. ارزیابی ویژگی‌ها و سطح بیان ژن *HPPR* در *Perilla frutescens* نشان داده شد که

² Phenylpropanoid

³ Cinnamate 4-hydroxylase

⁴ Trans-cinnamate

⁵ Coumarate

⁶ Cytochrome p450

⁷ Monooxygenation

⁸ Lignine

تیمارهای UV-B، اسید سالیسیلیک و اسید آسسیزیک افزایش بیان ژن را تحریک می‌کنند (Lu et al. 2014). ارزیابی تاثیر نانوذره Fe₂O₃ و تنش شوری بر تغییرات بیان ژن‌های دخیل در مسیر سنتز رزمارینیک اسید در *Moldavian balm* نشان دهنده افزایش معنادار سطح رونویسی ژن‌های *PAL*، *TAT* و *RAS* بود. آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز فنیل پروپانویید مستقیماً به عنوان عوامل دفاعی عمل نمی‌کنند. با این حال، آن‌ها با فعال کردن مسیرهای متابولیت‌های ثانویه از گیاه محافظت می‌کنند. در پژوهش حاضر نیز تغییرات سطح بیان ژن‌های *HPPR*، *C4H* و *RAS* در گیاهچه‌های نعاء فلفلی تحت تنش‌های شوری و گرمایی مورد ارزیابی قرار گرفت. تغییرات سطح بیان ژن‌های *C4H* و *HPPR* با اعمال سطوح شوری ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار و همچنین افزایش حرارت تا ۳۵ درجه سانتیگراد، در ۲۴ ساعت اول، افزایش معناداری در گیاهچه‌های نعاء نشان دادند که با گذشت زمان از اعمال تیمار، میزان بیان ژن کاهش یافت. نتایج تغییرات سطح بیان ژن *RAS* در گیاهچه‌های نعاء فلفلی تحت تیمار سطوح شوری ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نشان دهنده کاهش معنادار بیان ژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل بود و با گذشت زمان نیز بیان ژن کاهش بیشتری نشان داد. در پژوهشی دیگر، تنش شوری باعث افزایش سطح بیان ژن‌های *PAL* و *RAS* در *Dracocephalum kotschy* گردید (Vafadar et al. 2019).

نتیجه‌گیری: تنش‌های شوری و گرمایی محدودیتی برای کشت نعاء فلفلی هستند. این عوامل بر روی فیزیولوژی گیاه تاثیر گذاشته و رشد و عملکرد را کاهش می‌دهند. افزایش سطح بیان ژن‌های *C4H* و *HPPR* در مطالعه حاضر تحت تنش‌های شوری و گرما در گیاهچه‌های نعاء فلفلی و تطابق نتایج با داده‌های مطالعات فوق، نشان دهنده ایفای نقش این ژن‌ها در شکل‌گیری فرآیندهای دفاعی در مهار استرس اکسیداتیو می‌باشد. کاهش سطح بیان ژن *RAS* در گیاهچه‌های نعاء تحت تنش شوری و گرما و تطابق آن با کاهش تجمع رزمارینیک اسید در گیاهان تحت تنش می‌تواند باعث افزایش حساسیت گیاه به تنش شود. چنین می‌توان استنباط کرد که ترکیبات ۴-هیدروکسی فنیل-لاکتیک اسید و ۴-هیدروکسی سینامیل-CoA در مسیرهای دیگری از بیوسنتز فنیل پروپانویید مانند بیوسنتز لیگنین شرکت می‌کنند و شکل‌گیری مکانسیم دفاعی گیاه در برابر تنش از مسیری غیر از رزمارینیک اسید انجام می‌پذیرد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه یزد به خاطر همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۴-۱۶۹.

محمدآبادی محمدرضا، سفلائی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۱۱-۱۲۲.

References

- Adham A.N (2015) Comparative extraction methods, phytochemical constituents, fluorescence analysis and HPLC validation of rosmarinic acid content in *Mentha piperita*, *Mentha longifolia* and *Osimum basilicum*. J Pharmacogn Phytochem 3, 130-139.
- Afkar S, Zand R (2020) Genetic Relationships of Some Mint Species Using Seed Storage Protein Pattern. J Genet Resour 6(1), 12-19.
- Alhaithloul HA, Soliman MH, Ameta KL, et al. (2019) Changes in ecophysiology, osmolytes, and secondary metabolites of the medicinal plants of *Mentha piperita* and *Catharanthus roseus* subjected to drought and heat stress. Biomolecules 10, 43-64.
- Amini Hajiabadi A, Mosleh Arani A, Ghasemi S, et al. (2021). Mining the rhizosphere of halophytic rangeland plants for halotolerant bacteria to improve growth and yield of salinity-stressed wheat. Plant Physiol and Biochem, 163, 139-153.
- André CM, Schafleitner R, Legay S et al. (2009) Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. Phytochemistry 70, 1107-1116.
- Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. Agric Biotechnol J 13 (4), 183-200 (In Persian).
- Cheng S, Yan J, Meng X et al. (2018) Characterization and expression patterns of a cinnamate-4-hydroxylase gene involved in lignin biosynthesis and in response to various stresses and hormonal treatments in *Ginkgo biloba*. Acta Physiol Plant. 40, 1-12.
- Fletcher RS, Slimmon T, McAuley CY, Kott LS (2005) Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L). J of Sci and Food Agr 85, 2429-2436.
- Gowton CM, Reut M, Carrillo J (2020) Peppermint essential oil inhibits *Drosophila suzukii* emergence but reduces *Pachycrepoideus vindemmia* parasitism rates. Sci Rep 10, 1-10.

- Gull A, Lone AA, Wani NUI (2019) Biotic and Abiotic Stresses in Plants, Abiotic and Biotic Stress in Plants, Alexandre Bosco de Oliveira, IntechOpen London UK, pp 1-174.
- Khaleghnezhad V, Yousefi AR, Tavakoli A, Farajmand B (2019) Interactive effects of abscisic acid and temperature on rosmarinic acid, total phenolic compounds, anthocyanin, carotenoid and flavonoid content of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). *Sci Hort* 250, 302-309.
- Li H, Fu Y, Sun H et al. (2017) Transcriptomic analyses reveal biosynthetic genes related to rosmarinic acid in *Dracocephalum tanguticum*. *Sci Rep* 7, 1-10.
- Lu X, Hao L, Wang F, Huang C (2014) Molecular cloning, characterization and expression analysis of a gene encoding hydroxyphenylpyruvate reductase involved in rosmarinic acid biosynthesis pathway from *Perilla frutescens*, Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012). Springer pp. 1807-1820.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Mobasser M, Ostadrahimi A, Tajaddini A et al. (2020) Effects of saffron supplementation on glycemia and inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial study. *Diabetes & Metabolic Syndrome, Clinical Research & Reviews*. 14(4), 527-534.
- Moghaddam GA, Rezayatmand Z, Esfahani MN, Khozaei M (2019) Genetic defense analysis of tomatoes in response to early blight disease, *Alternaria alternata*. *Plant Physiol Biochem* 142, 500-509.
- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542.
- Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12, 191-208 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).

- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 289-295.
- Mosleh Arani A, Bakhshi Khaniki G, Nemati N, et al (2011) Investigation on the effect of salinity stress on seed germination of *Salsola abarghuensis*, *Salsola arbuscula* and *Salsola yazdiana*. *Iran J Rangelands Forests Plant Breeding Gen Res.* 18: 2.267-279.
- Mosleh Arany A., De Jong T. J., Kim H. K., et al (2008). Glucosinolates and other metabolites in the leaves of *Arabidopsis thaliana* from natural populations and their effects on a generalist and a specialist herbivore. *Chemoecology*, 18, 65-71.
- Mosleh Arani A, Naderi M, Goldansaz SM. (2015). Effect of Harvesting Time on Essential Oil Content and Composition of *Thymbra spicata*. *J medicinal plants by- products.* 4(1): 51-55.
- Mosleh Arani A, Rafiei A, Tabandeh A, et al. (2018). Morphological and physiological responses of root and leave in *Gleditschia caspica* to salinity stress. *Iran J Plant Biol.* 9: 4.1-12.
- Petersen M (1997) Cytochrome P450 dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus* sp. *Phytochemistry* 45:1165–1172.
- Rahman LU (2020) Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha× piperita* L.)- A review. *Phytotherapy Res* 34(9), 2088-2139.
- Rastegari AA, Nath Yadav A, Yadav N, Tataei Sarshari N (2019) Bioengineering of secondary metabolites, in *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.*, Elsevier 55-68.
- Rivero RM, Mestre T C, Mittler R et al. (2014) The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell and Env* 37, 1059–1073.
- Sadeghi M, Dehghan S, Fischer R et al. (2013) Isolation and characterization of isochorismate synthase and cinnamate 4-hydroxylase during salinity stress, wounding, and salicylic acid treatment in *Carthamus tinctorius*. *Plant Signal Behav* 8, e27335.
- Saijo Y, Loo EPi (2020) Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol* 225, 87-104.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. *Anim Biotechnol* 33, 1-11.
- Tehrani MM, Nasr-Esfahani M, Mousavi A et al. (2020) Regulation of related genes promoting resistant in *Iris* against root rot disease, *Fusarium oxysporum*. sp *gladioli* *Genomics* 112, 3013-3020.

- Todorova D, Katerova Z, Dimitrova R et al. (2020) Exogenous spermine application increases quantity of rosmarinic acid and carnosic acid in salt-treated *salvia officinalis* L. plants in pot experiments, Comptes Rendus de l'Academie Bulg. Des Sci 73.
- Vafadar F, Amooghaie R, Ehsanzadeh P et al. (2020) Melatonin and calcium modulate the production of rosmarinic acid, luteolin, and apigenin in *Dracocephalum kotschy* under salinity stress. Phytochemistry 177, 112422.
- Wyse AT, Netto CA (2011) Behavioral and neurochemical effects of proline. Metab. Brain Dis 26, e159.