بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک آویشن قره‌باغی (*Thymus fedtschenkoi* Ronniger) تحت سطوح مختلف پرتو فرابنفش به همراه کاربرد ترکیبات آنتی اکسیدان

علیرضا شایگان‌فر*[۱]، مجید عزیزی[۲]، موسی رسولی[۱]
[۱*] گروه علوم باغبانی و فضایی سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر
[۲] گروه علوم باغبانی و فضایی سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
*نویسنده مسئول: Shayganfar.a.r@gmail.com

چکیده

پرتو فرابنفش به عنوان یک فشار انتخابی روی موجودات فتوسنتز کننده مطرح است. در طول تاریخ تکامل زمین، گیاهان با سطوح مختلف فرابنفش، به ویژه B، مواجه بوده و سازگاری پیدا کرده‌اند. شناخت ما از اثرات بیولوژیک پرتو فرابنفش روی گیاهای هنوز در مراحل نخست خود است. در این مطالعه، صفات فیزیولوژیک آویشن قره‌باغی شامل گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پروکسیداز، آسکوربات پروکسیداز، سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز، مالون دآلدئید، پرولین، فنل کل و کلرفیل آ، ب و کل مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه تنش رایج در رویشگاه‌های آویشن می‌تواند تنش فرابنفش B باشد، در این مطالعه علاوه بر ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیک آویشن دنایی تحت سه سطح مختلف فرابنفش (فرابنفش محیط، تنش فرابنفش B و کاهش فرابنفش)، هدف ایجاد شرایطی بود که با کاهش اثرات سوء تغییر سطوح فرابنفش توسط برخی تیمارهای محافظ (ملاتونین، گلوتاتیون و مخلوطی برابر از نانوکود آهن و روی)، بتوان تولید متابولیت ثانویه القا شده توسط پرتو فرابنفش را از طریق کاهش هزینه صرف شده به رفع اثرات نامطلوب، افزایش داد. آزمایش مزرعه‌ای به صورت طرح کرت‌های خرد شده در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و در شرایط طبیعی اجرا شد. نتایج نشان داد در سطوح فرابنفش B و "فرابنفش کاهش یافته"، بهترین تاثیر بر فعالیت آنزیم‌ها به ترتیب مربوط به تیمار نانوکود، گلوتاتیون، ملاتونین و شاهد بود. اما در سطح محیطی فرابنفش، ملاتونین بهتر از گلوتاتیون عمل کرد.

کلمات کلیدی: پرتو فرابنفش B، گلوتاتیون، ملاتونین، نانوکود

مقدمه

کمتر از ۷٪ از پرتو خورشید که به سطح زمین می‌رسد تقریبا در دامنه بین ۲۹۵ تا ۴۰۰ نانومتر قرار دارد (فرابنفش A تا فرابنفش B)، طول موج‌های کوتاه‌تر فرابنفش توسط ازن استراتوسفری فیلتر می‌شود (McKenzie *et al.*, 2007). گیاهان به خاطر ویژگی یکجا نشینی که دارند نمی‌توانند از فرابنفش B فرار کنند. افزون بر این، گیاهان به نور خورشید به عنوان منبع فتوسنتز وابسته هستند. در واقع آن‌ها نیازمند دستیابی به تعادلی بین به دام انداختن نور بهینه و حفاظت فرابنفش B هستند (Ulm, and Jenkins, 2015). از دیدگاه تخریب ازن، پرتو فرابنفش B به عنوان یک عامل تنش‌زای محیطی برای موجودات فتوسنتز کننده به حساب می‌آید (Caldwell *et al.*, 2007). اما از دیدگاه تکاملی این چنین تصوری جای سوال دارد. از آغاز حیات گیاهان همواره در معرض فرابنفش B توسعه و تکامل یافته‌اند و ماشین ژنتیکی آن‌ها با سطوح فرابنفش B محیط[۱] روند تکاملی پیوسته[۲] را طی کرده است. بنابراین، می‌توان گفت که ماشین متابولیتی گیاهان شامل همه عناصر ضروری، برای همزیستی نرمال[۳] با سطح رایج فرابنفش B سازگار است و بنابراین پرتو فرابنش B نباید به عنوان یک عامل تنش‌زای محیطی به حساب آید. در حقیقت سطح معمول پرتو فرابنفش B

1- Ambient UV-B
2- Coevolved
3- Normal coexistence

IrHC2019

محیط باید به عنوان یک فاکتور سیگنالی که در برگیرنده بیان ژن‌های مرتبط با توسعه نرمال گیاه است بررسی شود (Jenkins, 2009). در این صورت حذف فرابنفش B باید به عنوان یک فاکتور سیگنالی غیر عادی که در برگیرنده بیان و/یا سرکوب یک سری دیگر از ژن‌هاست بررسی شود (Hectors *et al.*, 2007). به واسطه پژوهش‌های مزرعه‌ای و آزمایشگاهی یک اجماع عمومی وجود دارد که افزایش فرابنفش B تغییرات فیزیولوژیک، آناتومیک، مرفولوژیک و بیوشیمیایی در گیاهان ایجاد می‌کند (Searles, *et al.*, 2001). دامنه گسترده‌ای از حساسیت‌های درون و برون گونه‌ای[1] به پرتو فرابنفش B وجود دارد (Gilbert *et al.*, 2009). گیاهان بواسطه سازوکار تکاملی خود، برای جلوگیری از اثرات نامطلوب پرتو فرابنفش B روش‌های محافظتی مختلفی را کسب کرده‌اند. اثر بخشی توان دفاع آنتی‌اکسیدانی و توان تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه را می‌توان با کاربرد ترکیبات دارای ماهیت شیمیایی با حالات کارکردی مختلف افزایش داد. تغییرات در فرآیندهای فیزیولوژی برآیند برهمکنش فاکتورهای محیطی و ژنتیک در موجودات زنده است. به تبع، تغییرات در فیزیولوژی نیز دربرگیرنده پیامدهای بعدی شامل تغییر در متابولیت‌های ثانویه، فنوتیپ، فنولوژی و غیره خواهد بود. به عبارت بهتر، تغییرات در فنولوژی، فنوتیپ و مرفولوژی پیامد تغییرات در فیزیولوژی بوده که در اثر برهمکنش عوامل محیطی و ژنتیکی حاصل می‌شوند.

مواد و روش‌ها

بوته‌های آویشن قره‌باغی از رویشگاه طبیعی خود از کوه‌های سوباشی واقع در استان همدان در اسفند ماه ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد به روش تقسیم بوته در مزرعه آزمایشی دانشگاه ملایر کشت شد. آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام گرفت. زمین مورد نظر به سه بلوک آزمایشی بر حَسَب چهار تیمار فرابنفش تقسیم شد. سپس این بلوک‌ها به چهار کرت آزمایشی مطابق چهار سطح تیمار آنتی اکسیدان تقسیم گردید و در هر کرت ۳ ردیف آویشن کشت شد. روی قطعه بدون پرتو فرابنفش یک چارچوب فلزی با ابعادی بزرگ‌تر قرار گرفت. سپس فیلترهایی از ورق‌های پلی‌کربنات مقاوم به فرابنفش پرتو فرابنفش روی این فریم قرار نصب شد. گفتنی است پوشش پلی‌کربنات تقریبا تمام پرتو فرابنفش محیطی را فیلتر می‌کند. چارچوب به صورت شیروانی شیب‌دار، در امتداد شمالی-جنوبی در نظر گرفته شد و اطراف چارچوب در هر چهار طرف برای گردش آزادانه هوا باز گذاشته شد. در بلوک فرابنفش B، روی هر کرت دو لامپ فلورسنت پرتو فرابنفش B ۴۰ واتی باند پهن با پیک تابشی ۳۱۳ نانومتر قرار داده شد. لامپ‌ها در یک قاب براق و منعکس کننده نور قرار داده شدند، به طوری که پرتو فرابنفش را روی گیاهان تابانده می‌شد. این قاب‌ها در سمت شمالی هر کرت و در ارتفاع ۵۵ سانتی از مرکز کرت‌ها طوری قرار دادیم که نور بر روی کرت بتابد. مدت تابش پرتو فرابنفش هنگام ظهر از ساعت ۱۱ تا ۱۴ در نظر گرفته شد. با تنظیم فاصله ۵۵ سانتی‌متری، شدت تابش پرتو فرابنفش B با شبیه سازی ٪۲۵ تخریب لایه ازن به میزان ۵+ $kJ\ m^{-2}d^{-1}$ در نظر گرفته شد. گیاهان همزمان با هر آبیاری و در هر ۱۰ روز یکبار در طول دوره رشد به میزان ۱۰۰ mg/l با آمینواسید ملاتونین، ۵۵۰ mg/l گلوتاتیون و ۵ gr/l با مخلوطی برابر از هر دو نانوکود آهن و روی محلول پاشی شدند. سنجش میزان فعالیت کاتالاز بر اساس میزان تجزیه آب اکسیژنه طبق روش Aebi (۱۹۸۴) انجام گرفت. برای سنجش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز از روش Sgherri و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون پروکسیداز از روشHopkins و Tudhope (۱۹۷۳) با T-بوتیل هیدروپروکسیداز به عنوان سوبسترا استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت آسکوربات پروکسیداز به روش Yoshimura و همکاران (۲۰۰۰) به وسیله مانیتورینگ میزان اکسیداسیون آسکوربات در ۲۹۰ نانومتر انجام گرفت. سنجش سوپر اکسید دیسموتاز بر اساس تغییر شیمیائی نیترو بلوتترازولیوم و طبق روش Minami و Yoshikawa (۱۹۷۹) انجام شد. میزان مالون‌دی‌آلدئید با روش Ohkawa و همکاران (۱۹۷۹) سنجش شد. سنجش پرولین با روش Bates (۱۹۷۳) استفاده شد. میزان فنل کل در نمونه ها به وسیله روش تغییر یافته فلین-سیاکالتئو تعیین شد (Pennycooke *et al.*, 2005).

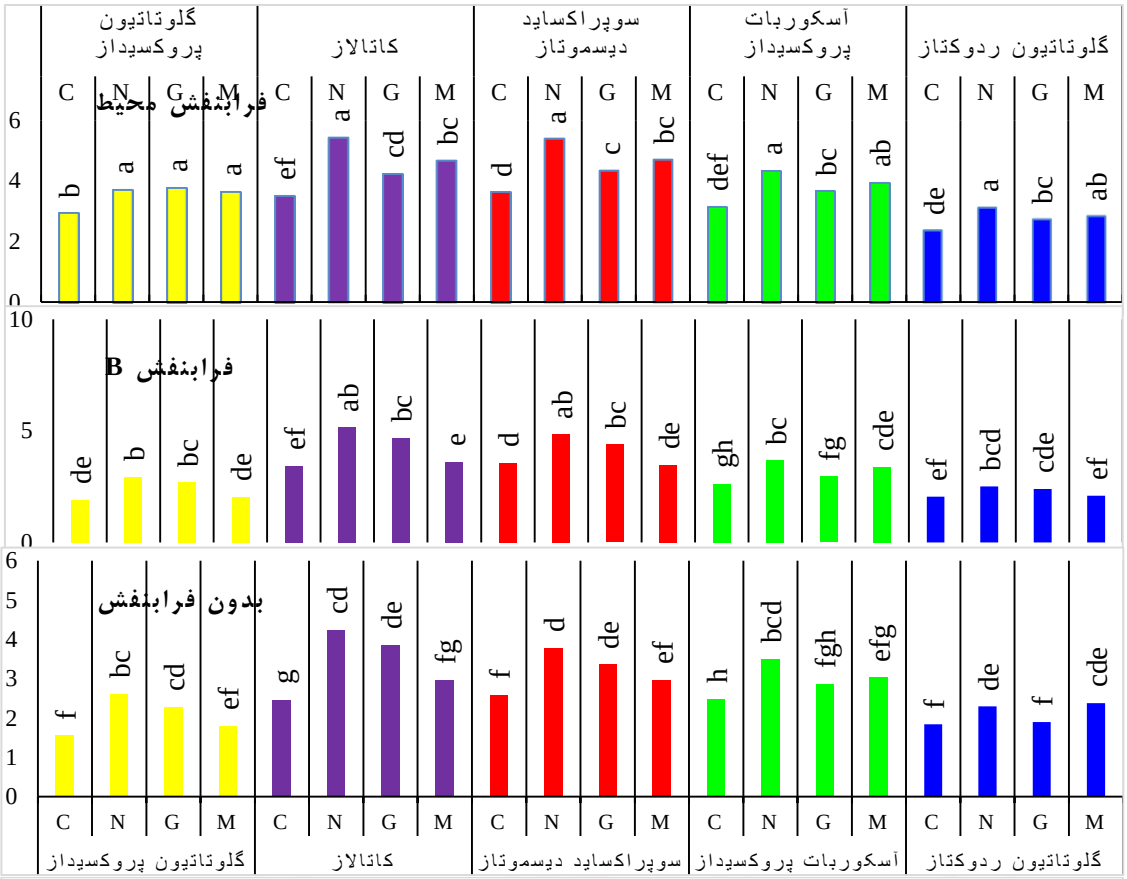
1- Intra- and interspecific sensitivity

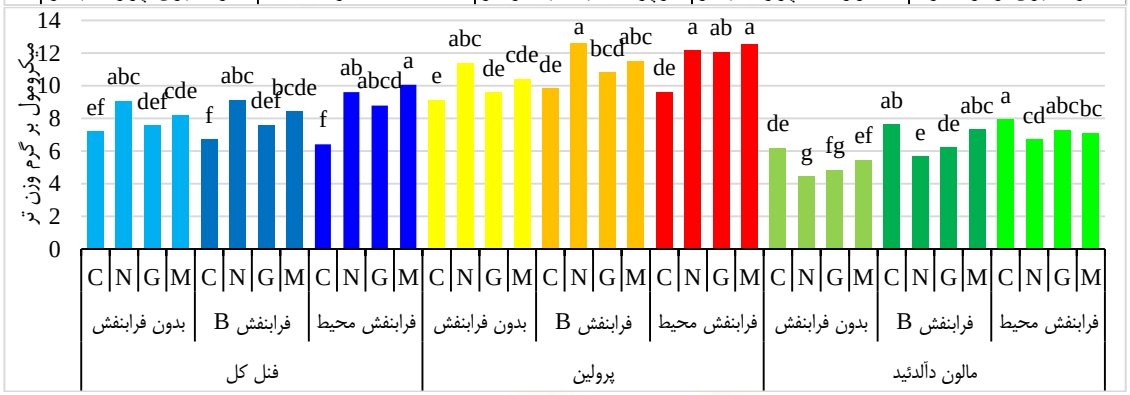
IrHC2019

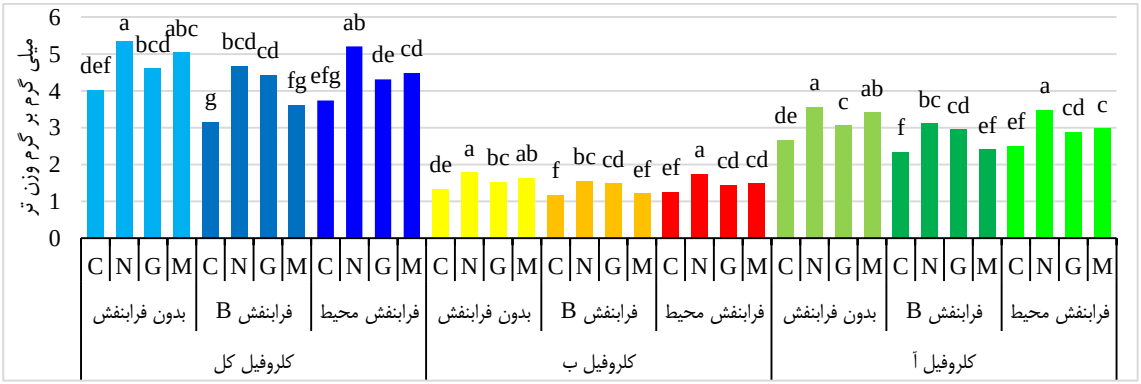
نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک نشان داد که اثرات متقابل سطوح فرابنفش و ترکیبات آنتی‌اکسیدان بجزء در فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز و گلوتاتیون پروکسیداز و میزان پرولین در باقی صفات معنی‌دار شد. فعالیت آنزیم‌ها در هر سطح فرابنفش الگوی و توازن یکسانی بین تیمارهای آنتی‌اکسیدانی به کار رفته نشان می‌دهد، اما این الگو در بین سطوح مختلف فرابنفش تفاوت دارد (شکل ۱ بالا). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌ها در تیمار نانوکود تحت فرابنفش محیط دیده شد. در هر سطح فرابنفش بیشترین فعالیت آنزیم‌ها نیز در تیمارهای نانوکود مشاهده شد. کمترین میزان فعالیت آنزیم‌ها مربوط به تیمار شاهد تحت "فرابنفش کاهش یافته" بود. در هر سطح فرابنفش نیز کمترین میزان فعالیت مربوط به تیمارهای شاهد در همان سطوح بود. صرف نظر از سطوح معنی‌داری، می‌توان گفت که افزایش فعالیت آنزیم‌ها در سطوح فرابنفش B و کاهش یافته، به ترتیب مربوط به تیمارهای نانوکود، گلوتاتیون، ملاتونیون و سپس شاهد بود. اما در سطح فرابنفش محیط بعد از تیمار نانوکود، تیمار ملاتونین قرار داشت. بیشترین میزان مالون دآلدئید مربوط به تیمار شاهد تحت فرابنفش محیط بود. دیگر تیمارها هر کدام به نوعی باعث کاهش میزان این ترکیب شدند. کمترین میزان نیز در تیمار نانوکود تحت "فرابنفش کاهش یافته" مشاهده شد. در کل در هر سطح فرابنفش، بیشترین و کمترین میزان مالون دآلدئید به ترتیب مربوط به تیمارهای شاهد و نانوکود بود. بیشترین میزان پرولین و فنل کل در تیمار ملاتونین و نانوکود در سطح فرابنفش محیط و در تیمارهای نانوکود تحت فرابنفش B و "فرابنفش کاهش یافته" دیده شد و کمترین میزان آن‌ها در هر سطح فرابنفش مربوط به تیمارهای شاهد بود. تقریبا روندی معکوس با آنچه در مورد فعالیت آنزیم مالون‌دآلدئید دیده شد (شکل ۱ وسط). بیشترین و کمترین میزان کلروفیل (آ، ب و کل) به ترتیب در تیمار نانوکود در سطح "فرابنفش کاهش یافته" و تیمار شاهد در فرابنفش B دیده شد. به طور کلی نیز در هر سطح فرابنفش بیشترین و کمترین میزان کلروفیل در تیمارهای نانوکود و شاهد دیده شدند. میانگین کلروفیل (آ، ب و کل) به ترتیب در سطح "فرابنفش کاهش یافته"، فرابنفش محیط و فرابنفش B بیشتر بود. در دو سطح فرابنفش محیط و "فرابنفش کاهش یافته"، پس از تیمار نانوکود، تیمار ملاتونین و سپس گلوتاتیون اثرات بیشتری در محافظت از کلروفیل داشتند. اما در سطح فرابنفش B پس از نانوکود، ترکیب گلوتاتیون اثر مثبتی نسبت به ملاتونین داشت (شکل ۱ پایین). در کل سطح محیطی فرابنفش ملاتونین و در دو سطح دیگر فرابنفش (به ویژه تنش فرابنفش B) بیشترین تاثیر مثبت مربوط به تیمار نانوکود بود. ملاتونین یک ترکیب ایندول آمین مشتق شده از تریپتوفان، با دامنه گسترده‌ای از فعالیت‌های گوناگون فیزیولوژیک است و از نظر ساختار با هورمون اکسین نزدیکی زیادی دارد. پیشنهاد شده است که ملاتونین برخی از عملکردهای خود را در گیاه به وسیله سازوکاری مانند آنچه ایندول استیک اسید انجام می‌دهد به انجام می‌رساند (Arnao and Hernández, 2015). ترکیب شبه هورمون ملاتونین در شرایط غیر تنش‌زا (در اینجا شرایط فرابنفش محیط) مانند تنظیم کننده‌های رشد عمل می‌کند و لذا باعث بهبود رشد و افزایش توسعه گیاه خواهد شد. اما چناچه گیاه با تنش شدیدتری مواجه شود، احتمالا کارایی ترکیب ملاتونین مانند دیگر ترکیبات قوی‌تر آنتی‌اکسیدان نخواهد بود. از طرفی در تنش فرابنفش به احتمال زیاد ترکیب شبه هورمونی ملاتونین همانند ترکیب مشابه خود یعنی اکسین دچار تجزیه می‌شود، از اینرو ما تاثیر مثبتی را شاهد نخواهیم بود. از طرفی نباید از خاطر دور داشت که مقدار تجویز شده (۱۰۰ میکرولیتر ملاتونین، ۵۰۰ میکرولیتر گلوتاتیون) نیز در ایجاد این تفاوت به ویژه در سطح "فرابنفش کاهش یافته" بی تاثیر نبوده است. لذا به این خاطر در این سطح از فرابنفش، کارایی گلوتاتیون البته به صورت غیر معنی‌دار بهتر از ملاتونین مشاهده شد. نقش عمده و عملکرد اصلی ترکیب تری‌پپتید گلوتاتیون (برخلاف ملاتونین) بیشتر به ویژگی و عملکرد آن در سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه بر می‌گردد. گلوتاتیون علاوه بر اینکه در چرخه بسیار مهم آسکوربات-گلوتاتیون نقش محوری ایفا می‌کند، خود نیز دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی بوده و به طور مستقیم وارد فعالیت‌های سمیت‌زدایی می‌شود (Anjum *et al.*, 2010). اثربخشی تیمار نانوکود احتمالا به نقش آهن و روی به عنوان کوفاکتورهای مهم در بسیاری از آنزیم‌ها آنتی‌اکسیدان و آنزیم‌های موجود در زنجیره الکترون فتوسنتزی و تنفسی در فیزیولوژی گیاهان برمی‌گردد.

IrHC2019


گلوتاتیون پروکسیداز
کاتالاز
سوپراکساید دیسموتاز
آسکوربات پروکسیداز
گلوتاتیون ردوکتاز
C N G M
فرابنفش محیط
فرابنفش B
بدون فرابنفش


میکرومول بر گرم وزن تر
C N G M
بدون فرابنفش
فرابنفش B
فرابنفش محیط
فنل کل
پرولین
مالون دآلدئید


میلی گرم بر گرم وزن تر
C N G M
بدون فرابنفش
فرابنفش B
فرابنفش محیط
کلروفیل کل
کلروفیل ب
کلروفیل آ

IrHC2019

شکل ۱. بالا: بر همکنش تاثیر سطوح مختلف فرابنفش و ترکیبات آنتی‌اکسیدان بر میزان فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه (بالا). میزان مالون دآلدئید، پرولین و فنل کل (وسط). میزان کلروفیل آ، کلروفیل ب و کلروفیل کل (پایین). C: شاهد (بدون ترکیب آنتی-اکسیدان)، N: نانوکود، G: گلوتاتیون، M: ملاتونین. حروف موجود بر روی ستون‌ها نشانه سطوح معنی‌داری در سطح احتمال $p\leq0.01$، سطوح معنی‌داری برای هر ترکیب که با رنگ‌های مختلف نشان داده شده است به صورت جداگانه محاسبه شده است، بنابراین باید از مقایسه بین ترکیبات مختلف خوداری نمود. واحد اندازه‌گیری آنزیم‌ها: واحد بین‌المللی بر گرم وزن‌تر.

برخی از منابع

Anjum, N. A., Umar S., and Chan, M. T. (Eds.), Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. Springer, Dordrecht, Netherlands, 2010.

Arnao, M., and Hernández-Ruiz, J. 2015. Functionsofmelatonin inplants: a review. *Journal of Pineal Research, 59: 133–150.*

Ballaré, C. L. 2003. Stress under the sun. Spotlight on ultraviolet- B responses. *Plant Physiology, 132: 1725–1727.*

Caldwell, M. M., Bornman, J. F., Ballaré, C. L., Flint, S. D.,and Kulandaivelu, G. 2007. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical and Photobiological Sciences, 6: 252–266.*

Gilbert, M., Pörs, Y., Grover, K., Weingart, I., Skotnica, J., Grimm, B., Seidlitz, H.K., Langebartels, C., and Wilhelm, C. 2009. Intra- and interspecific differences of 10 barley and 10 tomato cultivars in response to short-time UV-B radiation: a study analysing thermoluminescence, fluorescence, gas-exchange and biochemical parameters. *Environmental Pollution, 157: 1603–1612.*

Hectors, K., Prinsen, E., De Coen, W., Jansen, M. A. K., and Guisez, Y. 2007. *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytologist, 175: 255–270.*

Jenkins, G. I. 2009. Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology, 60: 407–431.*

Physiological Responses of *Thymus fedtschenkoi* Ronniger under Different Levels of Ultraviolet Radiation and Protectant Treatments

Alireza Shayganfar[1]*, Majid Azizi[2], Mousa Rasouli[1]

[1*] Department of Horticultural Sciences and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

[2] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Shayganfar.a.r@gmail.com

Abstract

UV radiation is considered as a selection pressure on the photosynthetic organisms. During the evolutionary history of the Earth, the terrestrial plants coevolved under different solar UV-B levels and may have experienced significantly higher UV-B irradiances than the current surface UV-B level. Our knowledge on biological effects of the UV radiation on plants was in its infancy. In this study, the studied physiological characteristics included glutathione reductase, glutathione peroxidase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, catalase, malondialdehyde, proline, total phenol and chlorophyll a, b and total. Given that the prevalent stress in *thymus* habitats can be UV stress, the present study aimed to investigate the physiological responses of *Thymus fedtschenkoi* Ronniger in their natural habitats under different levels of UV (including ambient UV, elevated UV-B, and excluded solar UV), and to seek conditions that can induce desirable changes using UV (especially UV-B) radiation as an effective elicitor and protectant compounds as antioxidants (including melatonin, glutathione, and nano-fertilizer). The field experiment was conducted by a factorial experiment on base of randomized complete block. The results showed that under elevated UV-B and excluded UV, the positive effect on enzymes activity was related to treatment of nano-fertilizer, glutathione, melatonin and control, respectively. However, under ambient UV, melatonin is better than glutathione.

***Keywords*:** Glutathione, Melatonin, Nano-fertilizer, UV-B

IrHC2019