

# اثر تنش خشکی بر فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدان و میزان پروتئین های محلول در گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.)

کیوان آقائی<sup>1\*</sup> و فاطمه احمدخانی<sup>1</sup>

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

\*: نویسنده مسئول [keyvanaghahi@znu.ac.ir](mailto:keyvanaghahi@znu.ac.ir)

## چکیده

آویشن یکی از گیاهان دارویی مهم است که هم بصورت طبیعی در بخش های زیادی از مراتع ایران می روید و هم بصورت وسیعی در ایران و جهان کشت می شود. با توجه به قرار گرفتن کشور ایران در منطقه خشک و نیمه خشک و میزان کم بارندگی در کشور لازم است تحقیقاتی به منظور افزایش تحمل تنش خشکی در گیاهان زراعی و دارویی انجام شود. تنش خشکی علاوه بر کاهش محصولات زراعی در ایران موجب کاهش میزان تولید و نیز کیفیت گیاهان دارویی نیز می شود. به همین دلیل به منظور بررسی مکانیسم های تحمل تنش خشکی در آویشن و بررسی امکان افزایش تحمل به خشکی در این گیاهان دارویی با ارزش، فعالیت تعدادی از آنزیم های آنتی اکسیدان بعنوان یکی از راهکارهای مقابله با تنش خشکی در گیاه آویشن خوراکی (*Thymus vulgaris* L.) در یک آزمایش کاملا نصادفی مورد بررسی قرار گرفت. نشاهای آویشن پس از رشد کافی در گلدان های حاوی خاک مناسب تحت تیمار های آبیاری 80٪ (شاهد)، 60٪ و 40٪ ظرفیت زراعی قرار گرفتند. نتایج نشان داد تیمار خشکی اثر معنیداری بر میزان پروتئین های محلول کل و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان داشت. تحت تنش خشکی 60٪ و بخصوص 40٪ مقدار پروتئین های محلول کاهش یافت. فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش یافت که بیشترین مقدار آن در تنش 60٪ بود. فعالیت پراکسیداز تحت تنش خشکی تغییر معنیداری نکرد (60٪) یا کاهش یافت (40٪). بعنوان نتیجه گیری کلی می توان گفت که یکی از مکانیسم های تحمل تنش خشکی در آویشن افزایش فعالیت برخی از آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله کاتالاز می باشد.

**کلمات کلیدی:** آنزیم های آنتی اکسیدان، آویشن، پروتئین کل، تنش خشکی، گیاهان دارویی.

افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش خشکی یکی از بهترین راهکارهای اقتصادی به منظور افزایش میزان تولید محصولات زراعی و دارویی و نیز افزایش بهره‌وری از منابع آب و حفظ منابع آب زیر زمینی می‌باشد (Xiong *et al.*, 2006) به همین منظور هدف اصلی این پژوهش بررسی مکانیسم‌های آنزیمی و مولکولی مقاومت به تنش کم‌آبی یا خشکی در گیاهان دارویی آویشن می‌باشد به امید اینکه بتوانیم راهکارهای مولکولی موثری جهت افزایش مقاومت به خشکی در این گیاهان دارویی با ارزش پیدا کنیم.

### مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی *T. vulgaris* و اعمال تیمارهای خشکی: به منظور کشت گلدان‌ها، بذرها پس از اعمال تیمار سرما (جهت از بین رفتن خواب) کشت داده شد. خاک درون هر گلدان مخلوطی از خاک زراعی، ماسه و کود دامی پوسیده به نسبت 1:3:6 بود. برای هر تیمار 3 گلدان به عنوان 3 تکرار در نظر گرفته شد. گلدان‌ها پس از کشت در اتاق رشد تحت شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی و دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی-گراد قرار گرفتند و هر روز آبیاری شدند. 60 روز پس از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان، گیاهانی که کاملا رشد کرده بودند برای اعمال تیمار خشکی در سطح‌های 80 درصد، 60 درصد و 40 درصد ظرفیت زراعی آماده گردیدند. یک ماه پس از اعمال تنش خشکی نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده و صفات مورد نظر اندازه‌گیری شدند.

### سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش دو گهرمایه‌ی یعنی پراکسید هیدروژن 0/0017 مولار و فنل- آمینوآنتی پیرین 0/0025 مولار استفاده شد (Xiong *et al.*, 2006) هر دو گهرمایه در محلول بافر فسفات 0/2 مولار با  $\text{pH}=7$  تهیه شدند پس از افزودن 475 میکرولیتر پراکسید هیدروژن تغییرات جذب بر

آویشن خوراکی (*Thymus vulgaris* L.) یکی از مهمترین گیاهان دارویی کاشته شده در جهان است. این گیاه حاوی ترکیبات معطر و دارویی متعددی می‌باشد. برگ‌های این گیاه را می‌توان بصورت تازه یا خشک بعنوان عامل اشتها آور مصرف کرد (Farag *et al.*, 2019). برگ‌های این گیاه حاوی مقادیر زیادی از انواع املاح مفید مانند پتاسیم، کلسیم، منیزیوم، آهن، منگنز و سلنیم و نیز ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند: فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی مانند pigenin، نارینژنین، لوتئین و همچنین انواع ویتامین‌ها مانند: A, B6, B9, C, E, K می‌باشد (Alireza *et al* 2015 and Dauqan & Ab-dullah, 2017). همچنین اسانس آویشن که با روش تقطیر با بخار استخراج شده است دارای 20 تا 54 درصد تیمول است که بیشترین ماده فعال اسانس را تشکیل داده و خواص دارویی متعددی دارد (Fachini-Queiroz *et al* 2012).

تنش خشکی یکی از مهمترین چالش‌های محیطی است که در تمام دنیا یک تهدید مهم برای کشاورزی محسوب می‌شود. این تنش موجب کاهش قابل توجه در میزان تولید و کیفیت محصولات زراعی مهم اقتصادی می‌شود. گیاهان می‌توانند با روش‌های مختلف موفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و یا مولکولی به تنش خشکی پاسخ دهند. این پاسخ‌ها موجب ایجاد تغییراتی در آنها می‌شود که یا در برابر تنش مقاومت بیشتری می‌کنند و یا از مواجهه با تنش اجتناب می‌کنند (Ibrahim *et al* 2015). در برخی از این پاسخ‌ها افزایش قابل توجهی در میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مشاهده می‌شود که بدنبال آن فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد. از میان این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توان به پراکسیدازها، کاتالاز و گلوتاتیون رداکتاز اشاره کرد (Aghaei *et al.*, 2009).

زمان در طول موج 510 نانومتر در مدت زمان 120 ثانیه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

### سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، ابتدا بافر فسفات 25 میلی مولار حاوی EDTA 0/1 میلی مولار و پراکسید هیدروژن 10 میلی مولار و PVP 2 در صد تهیه شد. پس از افزودن 975 میکرولیتر گهرمایه پراکسید هیدروژن، تغییرات جذب بر زمان در طول موج 240 نانومتر در مدت زمان 120 ثانیه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. سنجش فعالیت کاتالاز بر اساس کاهش جذب آب اکسیژنه در طول موج 240 نانومتر صورت گرفت.

### اندازه گیری مقدار پروتئین های محلول

برای سنجش مقدار پروتئین از روش Bradford (1976) استفاده شد. برای سنجش غلظت پروتئین به 50 میکرولیتر عصاره پروتئینی، 2/5 میلی لیتر معرف برادفورد اضافه شد و سریع مخلوط شدند. سپس جذب

آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 595 نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین سرم انسانی محاسبه گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری

محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 9.1 انجام شد و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2007 صورت گرفت. مقایسه میانگین ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال 5 و 1 درصد انجام شد. همچنین با استفاده از نرم افزار Totallab Quant الگوی الکتروفورزی پروتئین تجزیه و تحلیل گردید.

### نتایج و بحث

اثر تنش خشکی بر میزان پروتئین های محلول نتایج به دست آمده از آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که تغییرات پروتئین های محلول اندام هوایی تحت تاثیر تیمار خشکی ( $p \leq 0.01$ ) معنی دار بود (جدول 1).

جدول 1. نتایج تجزیه واریانس مقدار پروتئین های محلول اندام هوایی در گیاه *T.vulgaris* تحت تنش خشکی

میانگین مربعات	مقدار پروتئین اندام هوایی (mg/g F.W. )	درجه آزادی (df)	منابع تغییرات
0/03890018**		2	خشکی
0/00032319		14	خطای آزمایش
7/240806		-	ضریب تغییرات

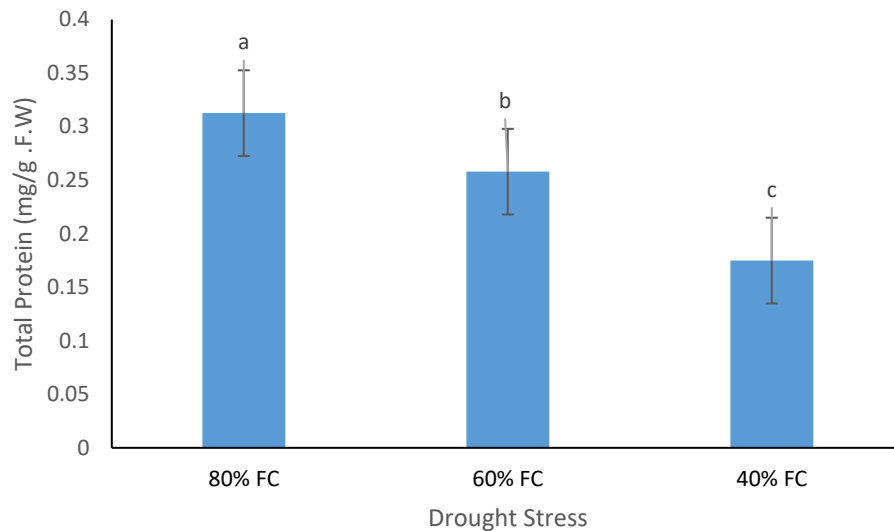
\*\* اختلاف در سطح احتمال 1 درصد

موضوع تغییر و اصلاح مهمی را در بیان ژن به وجود آورده که سبب فعال یا غیر فعال شدن تعدادی از آنزیم ها می شود و به دنبال آن اجازه تغییر در ساختار مخصوص بافت های گیاهی را می دهد. بروز تنش رطوبتی، وضعیت پلی ریبوزوم های موثر در ساخت پروتئین ها را در بافت ها تغییر می دهد. تعداد پلی

یکی از تغییرات عمده بیوشیمیایی که در اثر کاهش رطوبت خاک در گیاهان روی می دهد، تغییر در میزان تولید پروتئین های گیاهی در جهت تجزیه و یا جلوگیری از سنتز بعضی از آن ها و نیز ساخت دسته کوچکی از پروتئین های مخصوص تنش است. این

که توانسته اند تحت این شرایط ادامه بقا یابند ، ظرفیت و توانایی بیشتری در جهت تولید پلی ریبوزوم ها در بافت های خود نشان دادند . به طور کلی تیمار خشکی باعث کاهش غلظت پروتئین شده است که این کاهش معنی دار بود. بیشترین غلظت پروتئین در خشکی 40 در صد ظرفیت مشاهده شد (شکل 1).

ریبوزوم ها در شرایط کم آبی کاهش یافته و میزان آن بستگی به گونه های مختلف گیاهی و نیز اندام های گوناگون گیاهی در یک گیاه واحد متفاوت می باشد . در این رابطه مطالعات انجام شده در گیاه ذرت دلالت بر این دارد که افزایش سطح تنش آبی موجب کاهش در سطح پلی ریبوزوم ها شده و در نتیجه گونه های گیاهی



شکل 1: مقایسه میانگین اثر تنش خشکی بر مقدار پروتئین کل اندام هوایی گیاه *T.vulgaris*

تحت تأثیر خشکی ( $p \leq 0.01$ ) معنی دار بود (جدول 2).

نتایج و بحث حاصل از اثر تیمار خشکی بر فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج به دست آمده از آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که تغییرات فعالیت های آنزیم کاتالاز اندام هوایی

جدول 2. نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیمی در گیاه *T.vulgaris* تحت تنش خشکی

میانگین مربعات		درجه آزادی (df)	منابع تغییرات
فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز ( $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg protein}$ )	فعالیت آنزیم کاتالاز ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )		
0/ 00017875**	0/00000838**	2	خشکی
0/00002704	0/00000132	14	خطای آزمایش
20/18294	18/73945	-	ضریب تغییرات

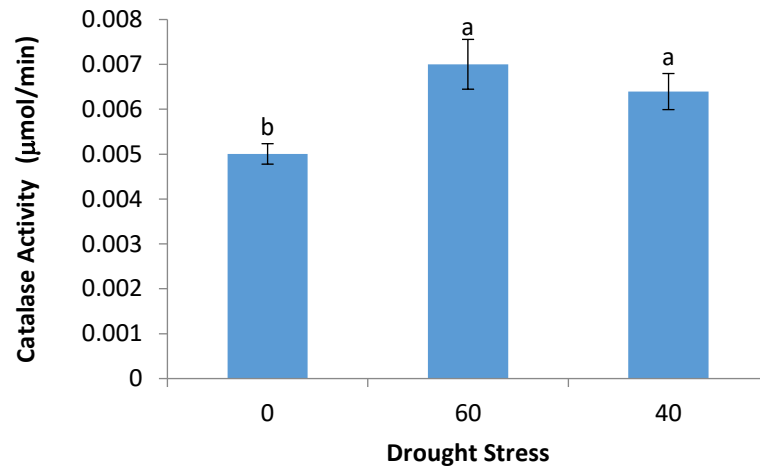
\*\* اختلاف در سطح احتمال 1 درصد

تحت شرایط طبیعی الزامی بوده و نقش مهمی در کسب مقاومت در برابر تنش اکسایشی در واکنش های

آنزیم کاتالاز از سلول ها در برابر پراکسید هیدروژن محافظت می کند. کاتالاز برای برخی از انواع سلول ها

توت تحت شرایط تنش خشکی نشان می دهد که آنتی اکسیدانت کاتالاز تحت شرایط تنش خشکی افزایش می یابد.

تطبیقی سلول ها بازی می کند . تحقیقات انجام شده نشان داد افزایش فعالی کاتالاز جهت کاهش اثرات پراکسید در هنگام تنش های مختلف گیاهان نقش مهمی ایفا نموده است . نتایج تحقیقات انجام شده روی پنج رقم



شکل 2: مقایسه میانگین اثر تیمار خشکی بر فعالیت آنزیم کاتالاز. حروف مشابه نشان دهنده ی عدم معنی داری در سطح 5، 1 درصد است.

نتایج به دست آمده از آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که تغییرات فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز تحت تاثیر تنش خشکی ( $p \leq 0.05$ )، معنی دار بود (جدول 3).

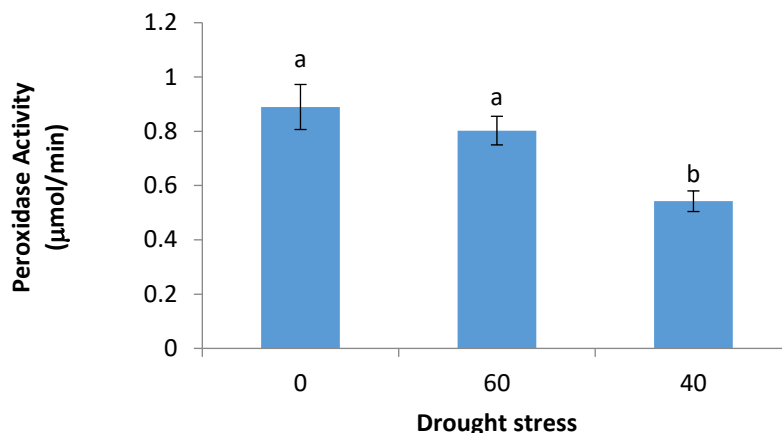
### نتایج و بحث حاصل از اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

جدول 3. نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پراکسیداز و فعالیت ویژه آن در اندام هوایی گیاه *T. vulgaris* تحت تنش خشکی

میانگین مربعات		درجه آزادی (df)	منابع تغییرات
فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز (µmol/min.mg protein)	فعالیت آنزیم پراکسیداز (µmol/min)		
23/96365267**	0/26119608**	2	خشکی
0/92673794	0/02861059	14	خطای آزمایش
20/757202	22/71162	-	ضریب تغییرات

\*\* اختلاف در سطح احتمال 1 درصد

با افزایش تنش خشکی فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش یافته است (شکل 3).



شکل 3: مقایسه میانگین اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز. حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح 5 و 1 درصد می باشد.

سلولی سریع به شروع علامت دفاعی گیاهی می‌شود. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، در طی تنش‌های زیستی و غیرزیستی برای حفاظت سلول‌ها از اثرات خطرناک بالقوه ROS افزایش یافته است

گیاهان گروهی از سازش‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در پاسخ به تنش آب از خود نشان می‌دهند که از آن جمله می‌توان به تغییرات برخی آنزیم‌ها مانند پراکسیداز اشاره نمود. ROS موجب آسیب غشا می‌شود و منجر به ایجاد یک پاسخ

#### منابع:

1. Aghaei, K., Ehsanpour, A. A., and Komatsu, S. (2009). Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. *J. Integr. Plant Biol.* 51, 1095–1103.
2. Alireza, K., Faeghe H., Siamak S. and Negar B. 2015. Study of the effect of extract of
3. *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, pp. 1-5.
4. Dauqan, E.M.A. and Abdullah A., 2017. Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Herb Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 5 (02), 17-22.
5. Fachini-Queiroz, F.C., Kummer R., Estevão-Silva C.F., 2012. Effects of thymol and car-
6. Farag, R. E., Abdelbar, O. H. and Shehata, S. A. Impact of drought stress on some growth, biochemical and anatomical parameters of *Thymus vulgaris* L. 2019. 14th Conf. Agric. Develop. Res., Fac. Agric., Ain Shams Univ.
7. Xiong, L., Wang R.G., Mao G. and Koczan J.M., 2006. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiol.* 142, 1065–107

# Effect of drought stress on the activity of some antioxidant enzymes and total soluble proteins of thyme (*Thymus vulgaris* L.)

Keyvan Aghaei<sup>1\*</sup> and Fatemeh Ahmadkhani<sup>1</sup>

1: Department of Biology, Faculty of Sciences, The University of Zanjan, Zanjan, Iran

\*: Corresponding Author: [keyvanaghaei@znu.ac.ir](mailto:keyvanaghaei@znu.ac.ir)

## Abstract

Thyme is one of the most important medicinal plants which grows naturally in wide areas of range lands in Iran and simultaneously is cultured widely in Iran and other parts of the world. As Iran has placed in arid and semi-arid regions of the world, with actually low precipitation, doing projects in order to reveal the mechanisms or increase the drought tolerance of crop and medicinal plants has great value. Drought stress decreases the yield and quality of medicinal plants as well as crops. To investigate the mechanisms of drought tolerance of thyme plants and to evaluate the possibility of increasing of drought tolerance in these valuable medicinal plants, activity of some antioxidant enzymes and total soluble proteins were been analyzed in *Thymus vulgaris* L. in a complete randomized design experiment. After reaching to the adequate stage of growth, seedlings were grown in pots containing suitable soil, were subjected to different levels of drought stress (80% as control, 60% and 40% irrigation of field capacity (FC) as treatments). Results show that, drought stress had significant effect on total protein content as well as the activity of antioxidant enzymes. At 60% FC treatment and especially at 40% FC the amount of total soluble proteins drastically decreased. However; the activity of catalase increased at 60% FC treatment. The activity of peroxidase did not change significantly at 60% treatment but its activity decreased at 40% treatment. As a conclusion; it can be suggested that, one of the drought tolerance mechanisms of thyme is increasing of the activity of antioxidant enzymes especially the activity of catalase.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Drought stress, Medicinal plants, *Thymus vulgaris*, Total protein.