Journal of Medicinal Plants Biotechnology
JMPB

Original Article

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

Keyvan Aghaei [1*] and Fatemeh Ahmadkhani[1]

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

ARTICLEINFO

Article history

Submitted: 2021-09-24
Revised: 2021-10-16
Accepted: 2021-11-12

KEYWORDS

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

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.

* Corresponding author: ***Keyvan Aghaei***
✉ E-mail: *keyvanaghaei@znu.ac.ir*
Journal homepage:

مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
JMPB

مقاله پژوهشی

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

کیوان آقائی[1]* و فاطمه احمدخانی[1]
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

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 تصادفی مورد بررسی قرار گرفت نشاهای آویشن پس از رشد کافی در گلدان های حاوی خاک مناسب تحت تیمار های آبیاری ۸۰٪ (شاهد)، ۶۰٪ و ۴۰�٪ 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 ۶۰٪ و بخصوص ۴۰٪ مقدار پروتئین های محلول کاهش یافت فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش یافت که بیشترین مقدار آن در تنش ۶۰٪ بود فعالیت پراکسیداز تحت تنش خشکی تغییر معنیداری نکرد(۶۰٪) یا کاهش یافت (۴۰٪) 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

اطلاعات مقاله

تاریخ

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۲
بازنگری: ۱۴۰۰/۰۵/۱۲
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸

کلید واژه

آنزیم های آنتی اکسیدان، آویشن، پروتئین کل، تنش خشکی، گیاهان دارویی.

* *نویسنده مسئول*: **کیوان آقائی**
ایمیل: *keyvanaghaei@znu.ac.ir*
آدرس اینترنتی: *mpb.znu.ac.ir*

مقدمه

آویشن خوراکی (Thymus vulgaris L.) یکی از مهمترین گیاهان دارویی کاشته شده در جهان است. این گیاه حاوی ترکیبات معطر و دارویی متعددی می باشد. برگهای این گیاه را می توان 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 آنتی اکسیدان مانند: فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی مانند pigenin ، نارینژنین، لوتئین و همچنین انواع ویتامین ها مانند: A, B6, B9, C, E, K می باشد (Alireza et al 2015 and Dauqan & Ab-dullah, 2017). همچنین اسانس آویشن که با روش تقطیر با بخار استخراج شده است دارای ۲۰ تا ۵۴ 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 چالش های محیطی است که در تمام دنیا یک تهدید مهم برای کشاورزی محسوب می شود. این تنش موجب کاهش قابل توجه در میزان تولید و کیفیت محصولات زراعی مهم اقتصادی می شود. گیاهان می توانند با روش های مختلف موفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و یا مولکولی به تنش خشکی پاسخ دهند. این پاسخ ها موجب ایجاد تغییراتی در آنها می شود که یا در برابر تنش مقاومت بیشتری می کنند و یا از مواجهه با تنش اجتناب می کنند (Ibra-him et al 2015). در برخی از این پاسخ ها افزایش قابل توجهی در میزان گونه های فعال اکسیژن (ROS) مشاهده می شود که بدنبال آن فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدان و ترکیبات آنتی اکسیدان افزایش می یابد. از میان این آنزیم های آنتی اکسیدان می توان به

پراکسیداز ها، کاتالاز و گلوتاتیون رداکتاز اشاره کرد (Aghaei et al., 2009).

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

مواد و روش ها

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 هرگلدان مخلوطی ازخاک زراعی، ماسه و کوددامی پوسیده به نسبت ۱:۳:۶ بود. برای هر تیمار ۳ گلدان به عنوان ۳ تکرار در نظر گرفته شد. گلدان‌ها پس از کشت در اتاق رشد تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و هر روز آبیاری شدند. ۶۰ روز پس از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان، گیاهانی که کاملا رشد کرده بودند برای اعمال تیمار خشکی در سطح های ۸۰ درصد، ۶۰ درصد و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی آماده گردیدند. یک ماه پس از اعمال تنش خشکی نمونه های گیاهی جمع آوری شده و صفات مورد نظر اندازه گیری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش دو گهرمایه‌ی یعنی پراکسید هیدروژن ۰/۰۰۱۷ مولار و فنل-

آمینوآنتی پیرین ۰/۰۰۲۵ مولار استفاده شد (Xiong *et al.*, 2006) هر دو گهرمایه در محلول بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۷ تهیه شدندپس از افزودن ۴۷۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن تغییرات جذب بر زمان در طول موج ۵۱۰ نانومتر در مدت زمان ۱۲۰ ثانیه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، ابتدا بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و پراکسیدهیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و PVP ۲ در صد تهیه شد. پس از افزودن ۹۷۵ میکرولیتر گهرمایه‌ی پراکسیدهیدروژن، تغییرات جذب بر زمان در طول موج ۲۴۰ نانومتر درمدت زمان ۱۲۰ ثانیه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. سنجش فعالیت کاتالاز بر اساس کاهش جذب آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر صورت گرفت.

اندازه‌گیری مقدارپروتئین های محلول

برای سنجش مقدار پروتئین از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. برای سنجش غلظت پروتئین به ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، ۲/۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد و سریع مخلوط شدند. سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین سرم انسانی محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماري

محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹.۱ انجام شد و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار 2007 Excel صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد انجام شد. همچنین با استفاده از نرم‌افزار Totallab Quant الگوی

الکتروفورزی پروتئین تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج و بحث

اثرتنش خشکی برمیزان پروتئین های محلول

نتایج به دست آمده از آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که تغییرات پروتئین های محلول اندام هوایی تحت تاثیر تیمار خشکی ($p \leq 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۱).

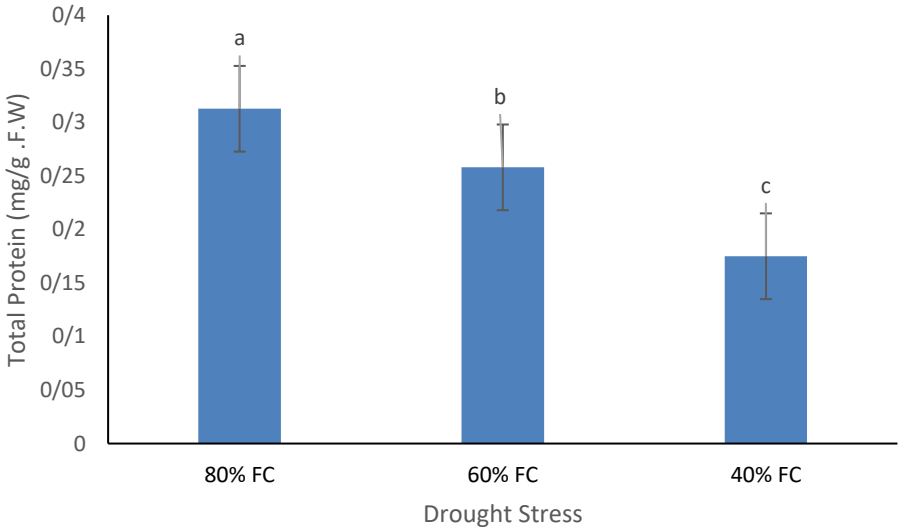
جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس مقدار پروتئین های محلول اندام هوایی در گیاه *T.vulgaris* تحت تنش خشکی

منابع تغییرات		میانگین مربعات
	درجه آزادی (df)	مقدار پروتئین اندام هوایی (mg/g F.W.)
خشکی	۲	۰/۰۳۸۹۰۰۱۸**
خطای آزمایش	۱۴	۰/۰۰۰۳۲۳۱۹
ضریب تغییرات	–	۷/۲۴۰۸۰۶

** اختلاف در سطح احتمال ۱ درصد

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 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 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 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 معنی‌دار بود. بیشترین غلظت پروتئین در خشکی ۴۰ در صد ظرفیت مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه میانگین اثر تنش خشکی بر مقدار پروتئین کل اندام هوایی گیاه *T.vulgaris*.

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

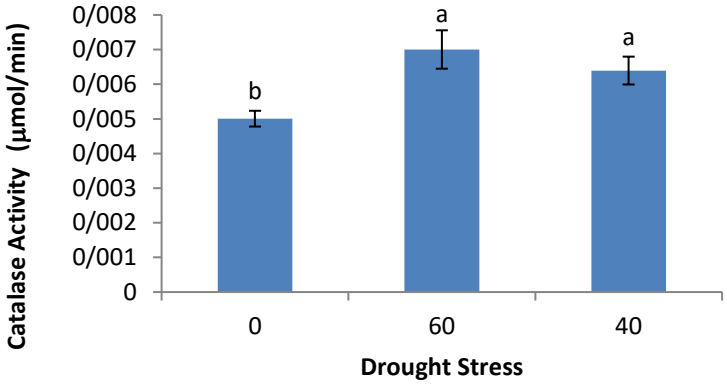
نتایج به دســـت آمده از آنالیز تجزیه واریانس نشـان داد که تغییرات فعالیت های آنزیم کاتالاز اندام هوایی تحت تأثیر خشکی ($p \leq 0.01$) معنی دار بود (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیمی در گیاه *T.vulgaris* تحت تنش خشکی

منابع تغییرات		میانگین مربعات	
	درجه آزادی (df)	فعالیت آنزیم کاتالاز (µmol/min)	فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز (µmol/min.mg protein)
خشکی	۲	۰/۰۰۰۰۰۸۳۸**	۰/ ۰۰۰۱۷۸۷۵**
خطای آزمایش	۱۴	۰/۰۰۰۰۰۱۳۲	۰/۰۰۰۰۲۷۰۴
ضریب تغییرات	–	۱۸/۷۳۹۴۵	۲۰/۱۸۲۹۴

** اختلاف در سطح احتمال ۱ درصد

آنزیم کاتالاز از سلول ها در برابر پراکسید هیدروژن محافظت می کند. کاتالاز برای برخی از انواع سلول ها تحت شرایط طبیعی الزامی بوده و نقش مهمی در کسب مقاومت در برابر تنش اکسایشی در واکنش های تطبیقی سلول ها بازی می کند . تحقیقات انجام شده نشان داد افزایش فعـالی کـاتـالاز جهـت کـاهش اثرات پراکســـید در هنگام تنش های مختلف گیاهان نقش مهمی ایفا نموده اســـت . نتایج تحقیقات انجام شـــده روی پنج رقم توت تحت شـــرایط تنش خشـــکی نشـــان می دهد که آنتی اکســـیدانت کاتالاز تحت شـــرایط تنش خشـــکی افزایش می یابد.



شکل ۲: مقایسه میانگین اثر تیمار خشکی بر فعالیت آنزیم کاتالاز. حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم معنی‌داری در سطح ۵، ۱ درصد است.

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

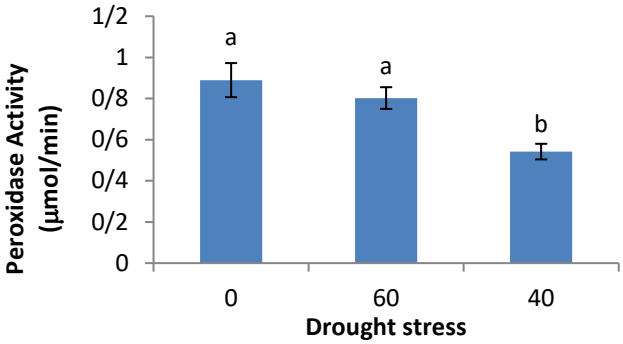
نتایج به دست آمده از آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که تغییرات فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز تحت تاثیر تنش خشکی ($p \leq 0.05$)، معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پراکسیداز و فعالیت ویژه آن در اندام هوایی گیاه *T.vulgaris* تحت تنش خشکی

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات	
		فعالیت آنزیم پراکسیداز (µmol/min)	فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز (µmol/min.mg protein)
خشکی	۲	۰/۲۶۱۱۹۶۰۸**	۲۳/ ۹۶۳۶۵۲۶۷**
خطای آزمایش	۱۴	۰/۰۲۸۶۱۰۵۹	۰/۹۲۶۷۳۷۹۴
ضریب تغییرات	-	۲۲/۷۱۱۶۲	۲۰/۷۵۷۲۰۲

** اختلاف در سطح احتمال ۱ درصد

با افزایش تنش خشکی فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش یافته است (شکل ۳) .



شکل۳: مقایسه میانگین اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز. حروف مشابه نشان دهنده عدم معنیداری در سطح ۵ و ۱ درصد می باشد.

گیاهان گروهی از سازش های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشـیمیایی را در پاسـخ به تنش آب از خود نشـان می دهند که از آن جمله می توان به تغییرات برخی آنزیم ها مانند پراکسیداز اشاره نمود . ROS موجب آسـیب غشـا می‌شـود و منجر به ایجاد یک پاسخ سلولی سریع به شروع علامت دفاعی گیاهی می‌شـود. فعالیت آنزیم‌های کلتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و سوپراکسید دیسـموتـاز (SOD)، در طی تنش‌هـای زیستی و غیرزیستی برای حفاظت سلول‌ها از اثرات خطرناک بالقوه ROS افزایش یافته است

ملاحظات اخلاقی:

حامی مالی: این پژوهش هیچ کمک مالی از سازمان های تأمین مالی دریافت نکرده است.

تعارض منافع: طبق اظهار نویسنده، این مقاله تعارض منافع ندارد.

برگرفته از پایان نامه/رساله: این مقاله برگرفته از پایان نامه/رساله نبوده است.

منابع

- Aghaei,K.,Ehsanpour,A.A.,andKomatsu,S.(2009).Potatorespondstosaltstressbyincreasedactivityof antioxidantenzymes. *J. Integr.Plant Biol.* 51, 1095–1103.
- Alireza, K., Faeghe H., Siamak S. and Negar B. 2015. Study of the effect of extract of
- *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. Journal of Traditional and Complementary Medicine, pp. 1-5.
- 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.
- Fachini-Queiroz, F.C., Kummer R., Estevão-Silva C.F., 2012. Effects of thymol and car-vacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. Evid.-Based Complement Alt. Med., pp, 1-10. Ibrahim, M.F.M., Bondok A.M.; Al-Senosy N.K. and Younis R.A.A., 2015. Stimulation Some of Defense Mechanisms in Tomato Plants under Water Deficit and Tobacco mosaic virus (TMV) World Journal of Agricultural Sciences 11 (5), 289-302.
- 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.
- Xiong, L., Wang R.G., Mao G. and Koczan J.M., 2006. Identification of drought tolerance deter-minants by

genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. Plant Physiol., 142, 1065–107.