مجله علمی-پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات ایران
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، صفحات ۲۹-۱۵

ISSN NO: 2008-8485

بررسی تأثیر تنش سرما بر میزان فعالیت آنزیم های مالون دی‌آلدئید، پراکسیداز و کاتالاز در چند گونه آویشن

The Effect of Cold Stress on the Activity of Malon di-aldehyde, Peroxidase and Catalase Enzymes in Several Species of Thyme

میلاد مشوق[1]*، دکتر سعدالله هوشمند[2] و دکتر محمد ربیعی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۷

چکیده

تنش سرما یک تنش غیر زیستی مشتمل بر تحرکات هواشناختی است که در دمای پایین اتفاق می‌افتد. تنش سرما در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به عنوان مهمترین عامل محدود کننده گیاهان معرفی شده است. در بررسی فعالیت های آنتی اکسیدانی آنزیم های کاتالاز ،مالون دی آلدئید و پراکسیداز تحت تیمارهای دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد (شاهد)، صفر درجه و ۵- درجه سانتی‌گراد در ۳ گونه آویشن *Thymus vulgaris, Thymus daensis* و*Thymus kotschyanus* که مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد؛ در بین ارقام آویشن مورد مطالعه تنوع قابل توجهی از نظر نحوه‌ی پاسخ به تنش های دمایی وجود دارد و میزان تغییرات آنزیم در هر ۳ دما بسیار توجیه کننده نقش حفاظت کننده آنها در مقابل تغییرات محیطی می‌باشد. تنها در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، برهمکنش ارقام با دماهای تحت تیمار مخصوصا دمای ۲۰درجه سانتی‌گراد (شاهد) و صفر درجه معنی‌دار نبود که نشان دهنده‌ی برابری نحوه‌ی واکنش ارقام آویشن به دو دمای تحت تیمار می‌باشد.

واژه های کلیدی: تنش سرما، گیاه آویشن، فعالیت آنزیم های انتی اکسیدانی.

[1] - دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد. *مکاتبه کننده: miladmoshavegh1993@gmail.com
[2] - استاد تمام، گروه اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد.
[3] - استاد یار، گروه اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد.

مجله علمی - پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

مقدمه

بیشتر گیاهان در محدوده‌ی دمایی بالاتر از نقطه‌ی یخ زدگی آسیب می‌بینند که معمولا به دمای پایینتر از ۱۵ درجه سانتی-گراد، دمای تنش [1] می‌گویند(Lukatkin *et al*, 2012). این آسیب دیدگی که چیلینگ نامیده می‌شود با آسیب دیدگی فریز متفاوت است. به عبارت دیگر گونه‌های گیاهی حساس در محدوده‌ی دمایی چیلینگ آسیب می‌بینند. دمای پایین به عنوان یک تنش غیر زیستی همواره گونه های گیاهی مهم را در سرتاسر دنیا مورد هجمه قرار می‌دهد و باعث اختلال در متابولیسم یاخته های گیاهی می‌شود (Lukatkin *et al*, 2012). در ایران نیز بیش از دو و نیم میلیون هکتار از مزارع در مناطق سرد سیر، در معرض آسیب سرمای زمستانه قرار دارد (میر محمدی میبدی، ۱۳۸۳). یکی از اهداف اصلی تحقیقات درمورد تنش های محیطی روشن ساختن نحوه‌ی سازگاری گیاهان در قبال تغییرات محیطی و تنش های محیطی می‌باشد (میر محمدی میبدی، ۱۳۸۳). آویشن یکی از جنس های خانواده نعناعیان و از مهمترین گیاهان دارویی ایران است که به دلیل داشتن دو ترکیب تیمول و کارواکرول، دارای خواص دارویی ضد میکروبی، ضد باکتریایی و ضد نفخ است (کاوه، ۱۳۹۲). از طرفی افزایش قابل توجه گرایش به کاربرد گیاهان دارویی در جهان سبب ایجاد تغییراتی در استراتژی کشاورزی و توسعه آن در جوامع گردیده است (Drazic and Pavlovic, 2005) یکی از مهمترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان که تحت تنش سرما ایجاد می‌شود تولید گونه‌های فعال اکسیژن است.ROS شکلهای فعال اکسیژن بوده که در مراحل حیاتی مانند تنفس و فتوسنتز تولید می‌شوند. کاهش پایداری متابولیکی ناشی از عوامل ناساز گار محیطی (تنش سرما) در تولید بیشتر گونه های اکسیژن فعال [2] نقش دارد (Suzuki and Mittler, 2006). ژو و راجر Zhou and roger, (2005) در بررسی آنزیم های آنتی اکسیدانی القا شده تحت تنش سرما در گل های مارگریت بیان داشتند که در دمای بالاتر از صفر درجه‌ی سانتی‌گراد فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در پاسخ به کاهش دما، افزایش یافت. آنزیم های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز، پلی فنیل اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در پاکسازی رادیکال های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند (Agarwal and Pandey, 2004). همچنین همبستگی های گوناگونی بین تنش کمبود آب و میزان آنتی اکسیدان های محلول درآب درون سلولی گزارش شده است (Zhu, 2000). آنزیم هایی که بررسی می‌کنیم علاوه بر حفظ سطح ROS سلول تحت شرایط تنش، صرفا در پاکسازی ROS نقش دارند.

خصوصیات تاکسونومی گونه های مورد مطالعه‌ی آویشن

***Thymus daensis*:** از گونه های مهم آویشن است که به دنایی معروف می‌باشد. این گونه دارای ساقه ای کوتاه که در پایین کاملا چوبی است. ارتفاع گل دهنده حداکثر ۳۰ سانتی‌متر است. طول برگ از ۵/۶ تا ۱۶ و عرض برگ از ۴/۲ تا ۴ میلی‌متر است. برگ ها ممکن است به صورت همپوش یا کوتاهتر از میانگره ها باشد. زمان وقوع گلدهی آنها خرداد تا تیر می‌باشد. این گیاه در مناطق مختلف کشور به ویژه در شمال و غرب پراکنده است(اکبری نیا و میرزا، ۱۳۸۷). (شکل۱- اولی از سمت راست).

***Thymus kotschyanus*:** این گونه در مناطق مختلف ایران شامل مناطق وسیعی از نواحی شمالی، غربی و مرکزی ایران مانند گیلان، مازندران، آذربایجان، کردستان، اطراف تهران، لرستان و برخی نواحی دیگر رشد می‌کند. همچنین گیاهی است چوبی-علفی تقریبا راست کوتاه قد، ساقه با انشعابات زیاد، بدون شاخه های قاعده ای خوابیده، رگبرگ ها در سطح زیرین برگ برجسته، جام گل سفید یا صورتی کم رنگ که زمان گلدهی اواخر بهار تا اواسط تابستان می-باشد (Jamzad, 2009)(شکل۱).

1- chilling temperature
2- reactive oxygen species (ROS)

ISSN NO: 2008-8485

***Thymus vulgaris*:** از گونه های اصلاح شده می‌باشد که به آویشن باغی معروف است. این گونه در ابتدای رشد به صورت بالا رونده و دارای رشد سریع می‌باشد. قسمت تحتانی برگ قرمز رنگ می‌باشد. ارتفاع این گونه نسبت به سایر گونه ها بلند تر می‌باشد (شکل۱).

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تنش سرما در مراحل مختلف رشدی در گیاه آویشن، تمامی مراحل تکثیر و نگهداری (از جوانه زنی تا مرحله ۶ تا ۸ برگی) در گلخانه پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام شد. میزان دما در گلخانه طی مدت انتظار ۲۳/۴ درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت نسبی ۴۳ درصد قرائت شد. منطقه مورد مطالعه در عرض جغرافیایی ۳۲ درجه شمالی و طول جغرافیایی ۵۰ درجه شرقی و ارتفاع ۲۱۰۰ متری از سطح دریا واقع شده است. اقلیم منطقه مطابق با روش امبرژه نیمه خشک سرد با متوسط بارندگی سالیانه ۳۵۰ میلی‌متر و متوسط دمای سالیانه ۱۲ درجه سانتی-گراد می‌باشد.

کشت و نگهداری نشاهای گیاه آویشن

بذور آویشن از مؤسسه ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران[1] واقع در شهر کرج اخذ شد و در ۲۴ دی ماه ۱۳۹۵ این بذور در سینی های نشاء با افزودن کود ورمی کمپوست کشت شد و پس از آبیاری و نم دار کردن، سطح خاک را به مدت ۴ روز با لایه ای از سلفون پوشانده پس از این مدت بذور جوانه زده و آبیاری آنها یک روز در میان انجام شد. ۲۰ آبان ماه زمان انتقال نشاها به گلدان های مقوایی با ابعاد ۸/۴۸ ×۴/۹۷ سانتی‌متر تعیین شد و همچنین خاک ورمی کمپوست به میزان ۳۵ گرم برای هر گلدان در نظر گرفته شد. گیاهچه ها به مدت ۱۵ روز جهت سازگاری با شرایط گلدان در گلخانه دانشگاه شهرکرد نگهداری شدند و در این مدت تنک علف های هرز هفته ای یک بار انجام شد. این پژوهش که در قالب طرح تجزیه مرکب با سه تکرار برای گونه های معرفی شده انجام شد پس از تیمار در دماهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان شاهد و صفر درجه و منفی پنج درجه سانتی‌گراد به مدت دو روز، به شرایط بهینه گلخانه به مدت یک هفته بازگشت داده شد و پس از آن به منظور اندازه گیری محتوای آنزیم های آنتی اکسیدانی، عصاره گیری به عمل آمد.

شکل۱-تولید گیاهچه های گونه‌ی *Thymus daensis* ، گونه‌ی *Thymus kotschyanus* و *Thymus vulgaris* به ترتیب از راست به چپ

Figure1- Production of species seedlings *Thymus daensis* and *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* from right to left, respectively

1-IBRC

عصاره گیری به منظور استخراج پروتئین های سیتوپلاسمی

۰/۵ گرم از نمونه‌ی گیاهی بر روی حمام یخ در هاون چینی به کمک ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار به خوبی ساییده شد. سپس با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچالدار (SIGMA V957) در دمای ۴درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

سنجش میزان مالون دی آلدئید[1]

دومین سطح از محصول اکسیداسیون که شامل آلدئید ها و کتون ها می‌باشد لیپید پراکسید است که یک (اسید چرب اشباع) می‌باشد. برای سنجش میزان مالون دی آلدئید، به یک میلی‌لیتر عصاره‌ی استخراج شده، یک میلی لیتر محلول ۵ درصد اسید تیوباربیتوریک [2] که حاوی اسید تریکلرو استیک [3] ۲۰ درصد است، اضافه گردید مخلوط حاصل در حمام بن ماری در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه حرارت داده شد و سپس درون حمام یخ قرار گرفت. مخلوط حاصل با ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس جذب آن به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری Eli 2092335 CARY100 (VARIAN) ساخت کشور برزیل در دو طول موج ۵۳۵ نانومتر به طور اختصاصی و ۶۰۰نانومتر به طور غیر اختصاصی اندازه گیری و طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$MDA\ [mmol\ g\ fw^{-1}] = (A_{535} - A_{600})V / \varepsilon\ d\ FW$$

A: عدد خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری ε: ضریب خاموشی که در طول موج ۵۳۵ نانومتر برابر با (۱۵۵ $mM^{-1}CM^{-1}$) می‌باشد d: پهنای کووت می-باشد.V:حجم نمونه است. FW: اکی والان وزن تر در نمونه می‌باشد.

سنجش میزان گایاکول پراکسیداز[4]

برای سنجش میزان POX ابتدا محلول استوک ۰/۲M بافر فسفات پتاسیم .به صورت پودر ۲/۷۲g با حل شدن در ۱۰۰ml تهیه شد و ۰/۲ M بافر فسفات به صورت پودر ۴/۵۶g در ۱۰۰ml آب مقطر حل شد. ml ۸۷/۷ محلول استوک بافر فسفات با ۱۲/۳ بافر فسفت و با ۱۰۰ml آب مقطر به حجم رسانیده شد. میزان pH بافر فسفات پتاسیم با pHمتر برروی ۶ تنظیم شد. ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد در ml ۱۹/۹ آب مقطر حل شد (۴۴ میلی مولار آب اکسیژنه) همچنین ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول در ml ۱۹/۹ در آب مقطر حل شد (۴۵ میلی مولار گایاکول). میزان POX با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$POX(mmol\ minute^{-1} mg\ protein^{-1}) = (\Delta A_{470}/\Delta t)V_{mix} / \varepsilon d\ P\ V\ extra$$

A: عدد خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتریε: ضریب خاموشی که در طول موج ۴۷۰ نانومتر برابر با (۲۶,۶ $mM^{-1}CM^{-1}$) می‌باشد (کیتو و شیمیزو، ۱۹۸۷). d: پهنای کووت (cm) می‌باشد.P: محتوای عصاره پروتئینی استخراج (mg ml^{-1}). V_{extra}: حجم استخراج.

سنجش میزان کاتالاز[5]

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز محلول استوک بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ M به صورت پودر۲/۷۲ گرم در ۱۰۰ml آب مقطر و بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ M به مقدار ۴/۵۶ گرم در ml ۱۰۰ آب مقطر حل شد. ml ۳۹ بافر فسفات به همراه ml ۶۱ بافرفسفات با ml ۱۰۰ آب مقطر به حجم رسانیده شد. PH . بافر فسفات پتاسیم روی ۷ تنظیم شد. همچنین ۳۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد در ml ۹/۷ آب مقطر حل شد. میزان CAT با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Narwal *et al*, 2009)

1-MDA
2-TBA
3- TCA
4- POX
5-CAT

$$CAT(mmol\ _{H2O2}\ minute^{-1} mg\ protein^{-1}) = (\Delta A_{240}/\Delta t)V_{mix} / \varepsilon d\ P\ V\ extra$$

A: عدد خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری ε: ضریب خاموشی که در طول موج ۲۴۰ نانومتر برابر با($40\ mM^{-1}CM^{-1}$) می‌باشد d: پهنای کووت (cm) می‌باشد. P: محتوای عصاره پروتئینی استخراج ($mg\ ml^{-1}$). V_{extra}: حجم استخراج.

نتایج حاصل بصورت تجزیه مرکب[1] تجزیه گردید و اثر محیط (سطوح سرما) و اثر متقابل آنها مورد بررسی قرار گرفت. جهت آنالیز داده ها از نرم افزار SAS استفاده شد و برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون حداقل تفاوت معنی دار[2] استفاده شد.

نتایج و بحث

میزان فعالیت مالون دی آلدئید

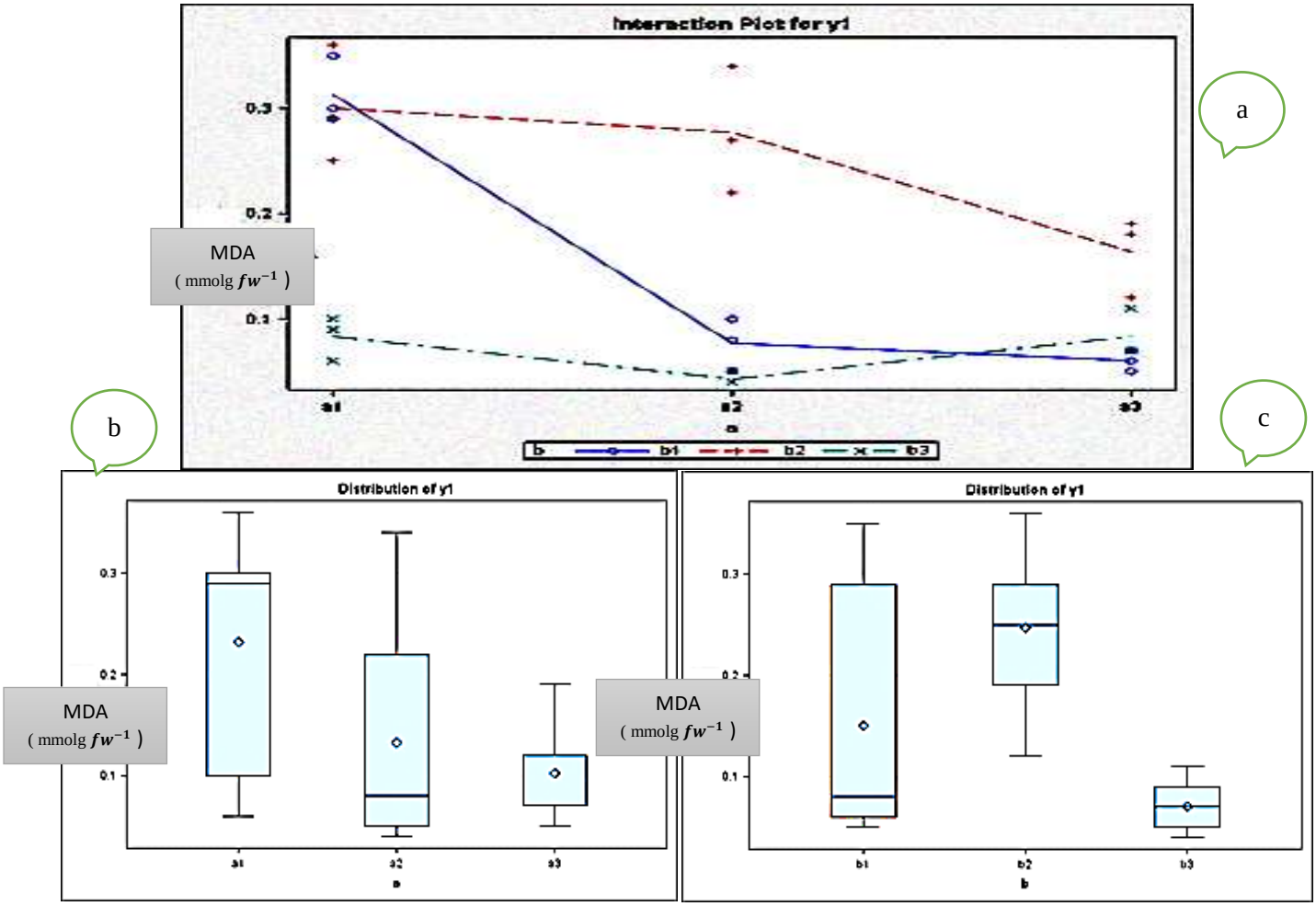
نتایج تجزیه واریانس بر طبق جدول ۱ نشان داد که در بین سه رقم آویشن *Thymus vulgaris*, *Thymus daensis* و *Thymus kotschyanus* از نظر میزان فعالیت مالون دی آلدئید اختلاف معنی‌داری ($p<0.01$) وجود دارد. همچنین با توجه به جدول تجزیه واریانس تیمارهای دمایی ۰/۹۳ از تغییرات مالون دی آلدئید در ارقام آویشن را پوشش داده است. بر طبق جدول ۲ مقایسه میانگین ارقام آویشن نشان داد که در دو رقم *kotschyanus* و *daensis* اختلاف معنی‌داری در میزان MDA وجود ندارد. مطابق جدول ۳ مقایسه میانگین ترکیب دما و گونه برای این صفت نشان می-دهد بیشترین میزان فعالیت مالون دی آلدئید در یاخته های آویشن برای گونه‌ی *vulgaris* در شرایط تنش صفر درجه-ی سانتی‌گراد با میانگین ۰/۰۰۰۷۶ ($mmolg\ \boldsymbol{fw^{-1}}$) و گونه‌ی *kotschyanus* با میانگین فعالیت۰/۰۰۰۶۹ ($mmolg\ \boldsymbol{fw^{-1}}$) در تنش دمایی صفر درجه سانتی-گراد در اولویت دوم قرار می‌گیرد. کمترین میزان فعالیت مالون دی آلدئید را گونه‌ی *kotschyanus* در تیمار دمایی شاهد با میانگین فعالیت ۰/۰۰۰۲ ($mmolg\ \boldsymbol{fw^{-1}}$) از آن خود کرده است. برهمکنش ارقام آویشن و دماهای تحت تیمار بر میزان MDA نشان می‌دهد که در دمای شاهد (۲۰ درجه سانتی‌گراد) افزایش دو برابری برای رقم *vulgaris* (P1007241)در میزان مالون دی آلدئید نسبت به سایر ارقام ایجاد شده است (شکل ۲-a). همچنین دمای صفر درجه سانتی‌گراد سبب کاهش معنی‌دار میزان مالون دی آلدئید در آویشن دنایی شده است. همچنین طبق شکل ۲-b مشاهده می‌شود که میزان MDA برای رقم *vulgaris* (P1007241) به میزان بیشتری در نوسان است. بر طبق شکل۲-c میزان تغییراتMDA در دمای شاهد نسبت به دمای تنش(صفر و ۵- درجه سانتی‌گراد) بیشتر براورد گردید. محققان در بررسی های فراوانی که انجام دادهاند افزایش MDAدر شرایط تنش را گزارش کرده اند (Zlatev and *et all* , 2006). طبق پژوهش محمدیان و همکاران (۱۳۹۱) محتوای مالون دی آلدئید در پاسخ به تنش سرما در گیاه زیتون بین دو رقم مورد مطالعه (سویلانو و فرانتوئیو) و در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری نشان داد. به طوری که میزان MDA در رقم سویلانا، تا دمای ۵ و ۰ درجه روند کاهشی و سپس تا دمای ۲۰- به طور معنی داری روند افزایشی داشت. ونینگ لیو و همکاران (2013) در مطالعه بررسی واکنش یولاف (*avena nuda L.*) به دمای پایین که خود این گونه یک گونه‌ی متحمل می‌باشد، بیان کرده است که محتوی مالون در آلدئید در گونه‌ی مذکور تحت دمای پایین در مقایسه با شرایط کنترل افزایش معنی داری پیدا کرده است.

1-Composite analysis

2- LSD

شکل۲-به ترتیب از بالا به پایین برهم‌کنش ارقام آویشن و دماهای تحت تیمار بر میزان مالون دی آلدئید و دامنه‌ی تغییرات مالون دی آلدئید در ارقام آویشن (b) و دامنه‌ی تغییرات مالون دی آلدئید در سه دمای تحت تیمار(c) می‌باشد

Figure2-Top-down interaction of thyme cultivars and treated temperatures on the amount of malondialdehyde and the the range of changes of malondialdehyde in thyme cultivars (b) and the the range of changes of malondialdehyde in the three temperatures under treatment (c), respectively.



B1:دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد (شاهد)، B2: دمای صفر درجه سانتی‌گراد، B3: دمای ۵- درجه سانتی‌گراد

(A1: *Thymus vulgaris* , A2: *Thymus kotschyanus* , A3: *Thymus daensis*)

میزان فعالیت پراکسیداز گایاکول

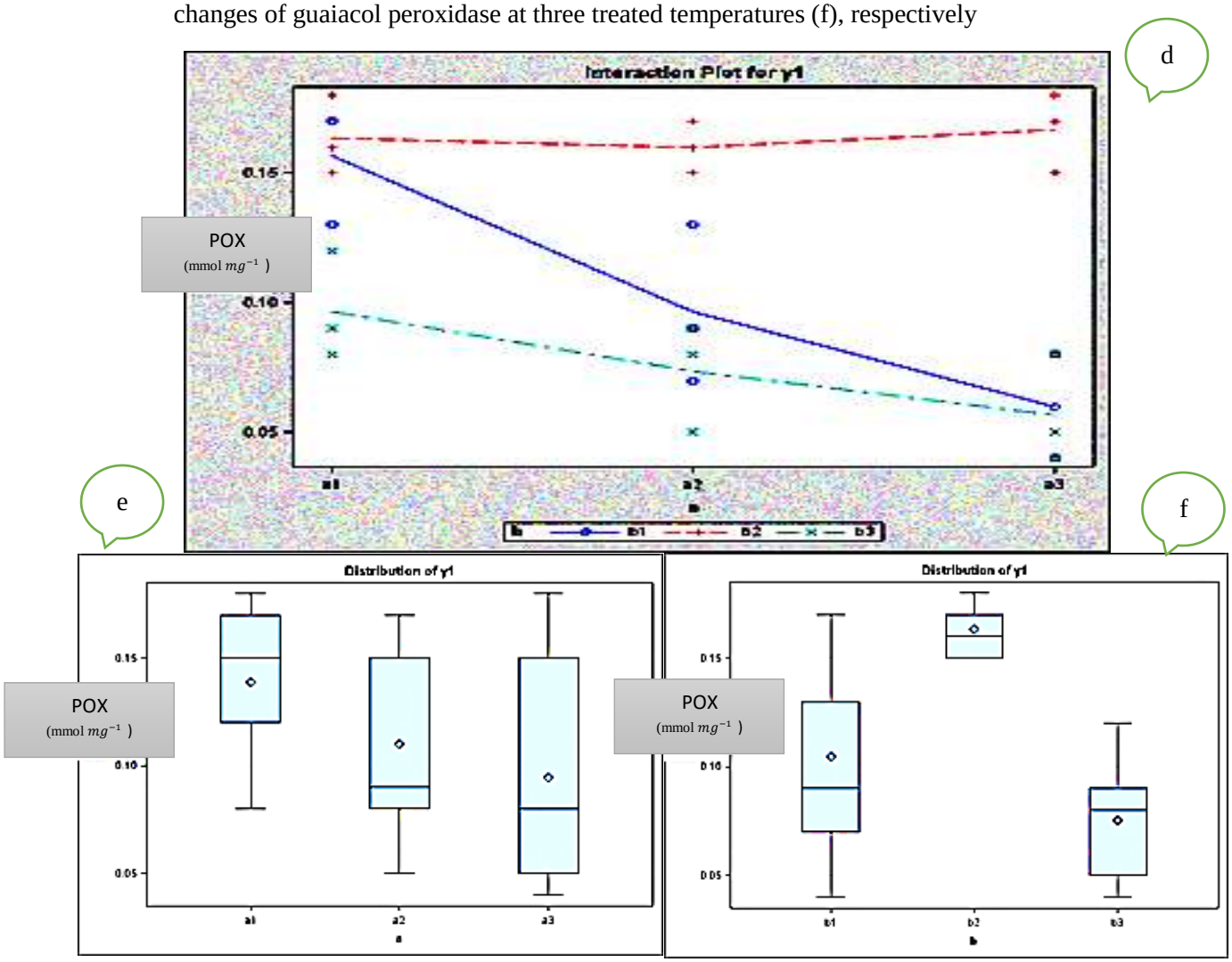
با توجه به جدول ۱ تجزیه واریانس، مشاهده می‌شود که میزان POX در ارقام آویشن در سطح ($p<0.001$) معنی دار می‌باشد. مقایسه میانگین این صفت طبق جدول ۲ نشان داد که در بین دو رقم *kotschyanus* و *daensis* به ترتیب با میانگین فعالیت ۰/۱۱ و ۰/۰۹ (mmol mg^{-1}) اختلاف معنی‌داری در میزان پراکسیداز بدست نیامده است. ضریب تغییرات در این سنجش برابر ۱۷,۳ تعیین شد که بیانگر میزان دقت آزمایش می‌باشد. مقایسه میانگین ترکیب دما و گونه-های آویشن مورد بررسی برای این صفت طبق جدول۳ نشان می‌دهد که گونه‌ی *daensis* با میانگین فعالیت ۰/۰۴۳ (mmol mg^{-1}) در تیمار دمایی صفر درجه سانتی‌گراد دارای بیشترین میزان پراکسیداز گایاکول در یاخته های خود می‌باشد. به همین ترتیب گونه‌های *vulgaris* و *kotschyanus* نیز برای بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز گایاکول در اولویت دوم و سوم قرار می گیرند. کمترین میزان

ISSN NO: 2008-8485

فعالیت پراکسیداز گایاکول را گونه‌ی*daensis* با میانگین ۰/۰۱۵ (mmol mg^{-1}) در تیمار دمایی منفی پنج درجه سانتی‌گراد از آن خود کرد. شکل۳-d نشان می‌دهد که میزان فعالیت POX از رقمی به رقم دیگر و از دمایی به دمای دیگر متفاوت است به عبارت دیگر اثر متقابل ارقام آویشن با سه دمای تحت تیمار معنی دار می‌باشد همچنین دمای شاهد (۲۰ درجه سانتی‌گراد) باعث افزایش سه برابری میزان پراکسیداز در رقم*vulgaris*(P1007241) نسبت به رقم دنایی شده است. اما میزان فعالیت پراکسیداز در دمای صفر درجه سانتی‌گراد در همین رقم آویشن دنایی به ۰/۱۷ (mmol mg^{-1}) رسیده است. بر طبق شکل۳-e دامنه تغییرات فعالیت پراکسیداز برای رقم *vulgaris*(P1007241)علیرغم نوسانات کم، سطح بیشتری از فعالیت این آنزیم را به خود اختصاص داده است. با توجه به شکل ۳-f مشاهده می‌شود که میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز در دمای صفر درجه سانتی‌گراد در سطوح بالاتر با اندازه‌ی ماکزیمم ۰/۱۷ (mmol mg^{-1}) و با نوسان کمتری صورت گرفته است. احتمالا رقم آویشن دنایی میزان سازگاری بالاتری در مواجهه با تنش دمایی صفر درجه سانتی‌گراد داشته است و در این دما میزان ترکیبات اکسنده بیشتری که بیشتر نقش حفاظتی دارند تولید می‌شود. نتایج آزمایشهای مختلف هم نشان می‌دهد که با کاهش دما فعالیت آنزیم پراکسیداز به منظور جلوگیری از آسیبهای وارده به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد(Yong Kim and *et all*, 2005) . تحقیقات نشان داده است که تغییرات فعالیت پراکسیداز در گیاهان مقاوم نسبت به گیاهان حساس شدیدتر و سریع تر است (Moerschbacher, 1992). همچنین آنزیم های پراکسیداز به دلیل حذف ROS و دخالت در مسیرهای مختلف سلولی مانند چرخه گلوتاتیون- آسکوربات، لیگنینی شدن و مسیرهای هورمونی در همکاری با سایر آنزیم های آنتی اکسیدانی به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی برای انوع تنش های زیستی و غیر زیستی استفاده می‌شوند (Ring, 2013). یانگ و همکاران (۲۰۰۸) تأثیر تنش سرما را بر توت فرنگی بررسی و گزارش کردند که ابتدا فعالیت آنزیم پراکسیداز به شدت افزایش پیدا کرد، اما با کاهش بیشتر دما، فعالیت به آرامی صورت گرفت.

شکل۳- به ترتیب از بالا به پایین برهم‌کنش ارقام آویشن و دماهای تحت تیمار بر میزان پراکسیداز گایاکول و دامنه‌ی تغییرات پراکسیداز گایاکول در ارقام آویشن (e) و دامنه‌ی تغییرات پراکسیداز گایاکول در سه دمای تحت تیمار(f) می‌باشد

Figure3- Top-down interaction of thyme cultivars and treated temperatures on the amount of guaiacol peroxidase and the range of changes of guaiacol peroxidase in thyme cultivars (e) and the range of changes of guaiacol peroxidase at three treated temperatures (f), respectively



B1: دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد (شاهد)، B2: دمای صفر درجه سانتی‌گراد، B3: دمای ۵- درجه سانتی‌گراد

(**A1: *Thymus vulgaris* , A2: *Thymus kotschyanus* , A3: *Thymus daensis***)

مجله علمی-پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات ایران
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، صفحات ۲۹-۱۵

ISSN NO: 2008-8485

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مرتبط با فعالیت های آنتی اکسیدانی گونه های آویشن

Table1- analysis of variance for studied traits in the antioxidant activity oh thyme

S.O.V	DF	مالون دی آلدئید	پراکسیداز	کاتالاز
دما	2	0.07^{**}	0.01^{**}	$1.46 \times 10^{-10**}$
تکرار (محیط)	6	0.0002	0.00045	4.77×10^{-12}
رقم	2	0.04^{**}	0.004^{**}	$4.39 \times 10^{-11**}$
رقم ×محیط	4	0.01^{**}	0.001^{*}	$8.37 \times 10^{-12\ ns}$
خطا کل	12	0.0016	0.0003	0.86×10^{-12}
CV		24.4	17.3	25.7
R^2		0.93	0.92	0.86

ns و * و ** به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد می‌باشد.

جدول۲- مقایسه میانگین ویژگی های آنتی اکسیدانی سه گونه‌ی آویشن

Table2- mean comparison of antioxidant traits in 3 species of thyme

رقم	مالون دی آلدئید (mmolg fw^{-1})	پراکسیداز (mmol mg^{-1})	کاتالاز (mmol $minute^{-1}mg^{-1}$)
Thymus vulgaris	0.23 a	0.13 a	0.00001 a
Thymus kotschyanus	0.13 b	0.11 b	0.0000076 b
Thymus daenensis	0.1 b	0.09 b	0.000008 a b
LSD	0.03	0.02	256×10^{-8}

حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی دار در بین میانگین ها می‌باشد.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

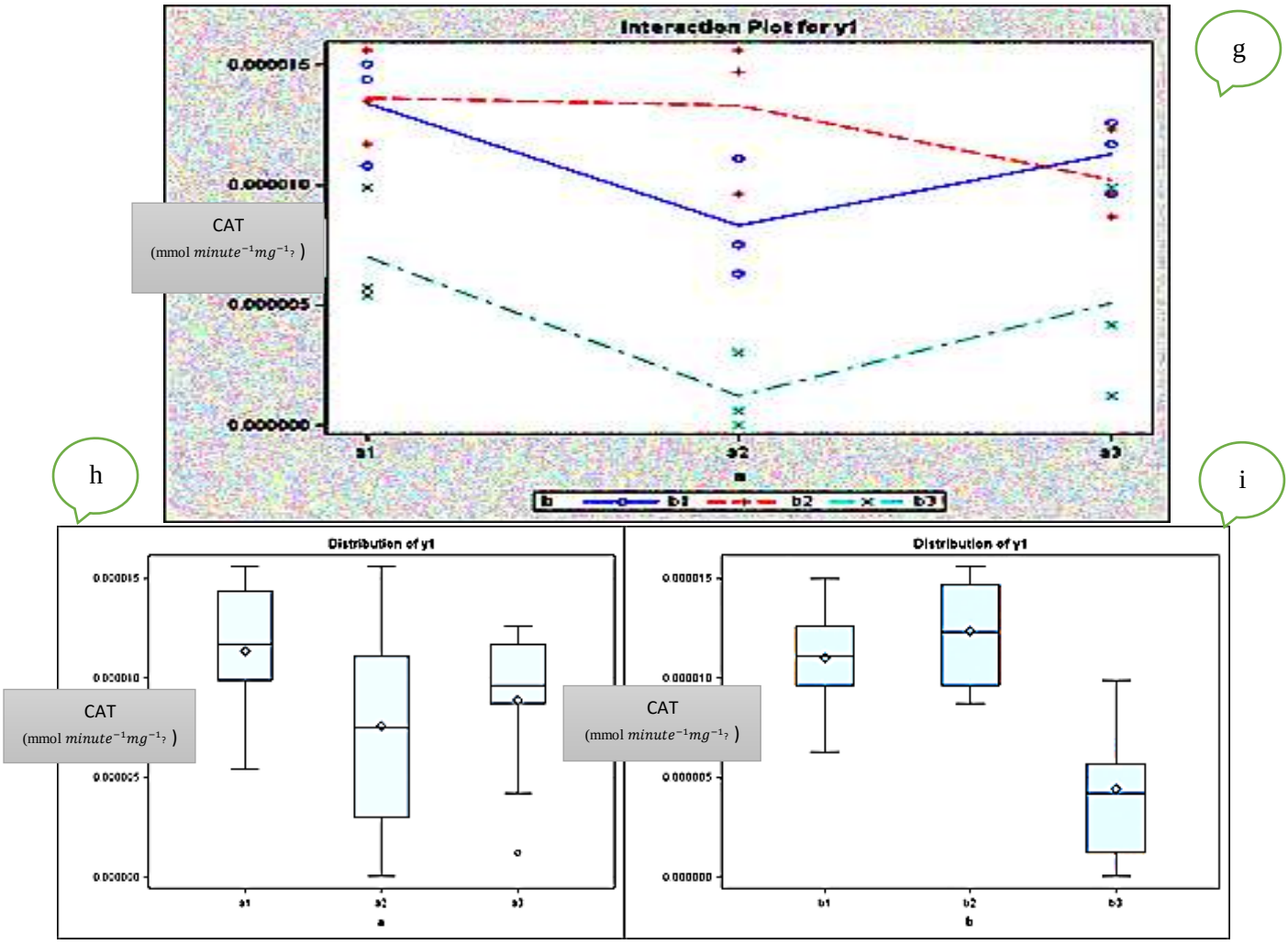
با توجه به جدول ۱ تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری در بین ارقام مطالعه شده‌ی آویشن در سطح ($p<0.05$) مشاهده می‌شود. مقایسه میانگین این صفت نشان داد که در بین دو رقم *vulgaris* و *kotschyanus* به ترتیب با میانگین فعالیت ۰/۰۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۰۷۶ (mmol $minute^{-1}mg^{-1}$) اختلاف معنی‌داری از نظر میزان آنزیم کاتالاز وجود دارد (جدول۲). با توجه به جدول ۳ مقایسه میانگین اثر متقابل گونه‌های آویشن و دماهای تحت تیمار نشان می‌دهد که دو گونه‌ی *vulgaris* (P1007241) و *kotschyanus* (P1010856) تحت تیمار تنش صفر درجه سانتی‌گراد برای بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به ترتیب با میانگین فعالیت آنزیم $۳/۴\times۱۰^{-۶}$ و $۳/۳۲\times۱۰^{-۶}$ (mmol $minute^{-1}mg^{-1}$) در یاخته های خود در یک گروه قرار می‌گیرند. کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز مربوط به گونه‌ی (P1010856) *kotschyanus* با میانگین فعالیت $۳/۰۲\times۱۰^{-۷}$ (mmol

($minute^{-1}mg^{-1}$) تحت تیمار تنش منفی پنج درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد. مطابق شکل۴-g بر همکنش ارقام آویشن با دماهای تحت تیمار بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز همین مسئله را توجیه می‌کند که عکس العمل ارقام در ۲۰ درجه سانتی‌گراد(شاهد) و صفر درجه سانتی‌گراد باهم مشابه می‌باشد. روند تغییرات آنزیم کاتالاز به نحوی است که در این دو دما ابتدا روند کاهشی، سپس افزایشی در بین ارقام داشته است. مطابق شکل۴-h میزان تغییرات آنزیم کاتالاز در ۳ رقم آویشن به گونه ای است که نوسان آنزیم در گونه‌ی *kotschyanus* (P1010856) به میزان بیشتری با اندازه-ی ماکزیمم 10^{-4} (mmol $minute^{-1}mg^{-1}$) اما در سطوح کمتر آنزیم نسبت به رقم *vulgaris*(P1007241)و حتی آویشن دنایی انجام گرفته است. با توجه به شکل۴-i مشاهده می‌شود که دامنه تغییرات آنزیم کاتالاز در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بیشتر و دارای سطح بالاتری می‌باشد. بر طبق جدول واکنش ارقام آویشن به دماهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد(شاهد) و صفر درجه سانتی‌گراد معنی‌دار نمی‌باشد بنابراین در این مسئله تنوعی مشاهده نمی-شود. کاتالاز نقش مهمی در تحمل سرما و حذف پراکسید هیدروژن در گیاهان دارد (Willekens and *et all*, 1997). طبق گزارش ژو و راجر (۲۰۰۵) فعالیت آنزیم CATدر دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ممکن است یک واکنش دفاعی به افزایش تولید H_2O_2 و سایر پراکسیداز ایجاد بکند. همچنین گزارش شده است که افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز میتوکندریایی و همچنین فعالیت POX تحت تنش سرما در گیاهان حساس نشان دهنده‌ی تنش اکسیداتیو می‌باشد (Prassad and *et all*, 1994). در مطالعه ای یک روز بعد از تنش سرمای دو درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم کاتالاز در خیار، ارزن و ذرت و سیب زمینی اندازه گیری شد. فعالیت کاتالاز طی یک روز در تمامی گیاهان ذکر شده، افزایش یافت تا اثرات مخرب فعالیت گونه‌های اکسیژن فعال را از بین ببرد(Lukatkin, 2002) . این افراد به ترتیب کاهش و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز را در شرایط تنش در گیاهان مختلف در بررسی های مختلفی گزارش کرده اند (Saglam and *et all*, 2011). اما لی و همکاران (۲۰۰۱) کاهش فعالیت این آنزیم توسط تنش های غیر زیستی دیگر مانند تنش سرما را گزارش کرده است.

ISSN NO: 2008-8485

شکل۴- به ترتیب از بالا به پایین برهم‌کنش ارقام آویشن و دماهای تحت تیمار بر فعالیت آنزیم کاتالاز و دامنه‌ی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام آویشن (h) و دامنه‌ی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در سه دمای تحت تیمار(i) می‌باشد

Figure4-Top-down interaction of thyme cultivars and treated temperatures on catalase activity and the range of changes in catalase activity in thyme cultivars (h) and the range of changes in catalase activity at three temperatures (i), respectively.



B1: دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد (شاهد)، B2: دمای صفر درجه سانتی‌گراد، B3: دمای ۵- درجه سانتی‌گراد

(A1: *Thymus vulgaris* , A2: *Thymus kotschyanus* , A3: *Thymus daensis*)

جدول۳- مقایسه میانگین اثر متقابل صفات مرتبط با فعالیت های آنزیم های آنتی‌اکسیدانی سه گونه‌ی آویشن در سه سطح دمایی

Table3- mean comparison interaction of traits related to the antioxidant enzyme activities of three thyme species at three temperature levels

ژنوتیپ	سطوح دمایی (سانتی‌گراد)	مالون دی آلدئید (mmolg fw^{-1})	پراکسیداز (mmol mg^{-1})	کاتالاز (mmol $minute^{-1}mg^{-1}$)
Thymus vulgaris	-5	0.00022 C	0.024 B	1.75×10^{-6} b
Thymus kotschyanus	-5	0.00011 C	0.019 Bc	3.02×10^{-7} cd
Thymus Daenensis	-5	0.00021 C	0.015 cd	1.27×10^{-6} bc
Thymus vulgaris	0	0.00076 a	0.042a	3.4×10^{-6} a
Thymus kotschyanus	0	0.00069 a	0.041 a	3.32×10^{-6} a
Thymus Daenensis	0	0.00041 b	0.043 a	2.55×10^{-6} ab
Thymus vulgaris	20	0.0008 a	0.04 a	3.35×10^{-6} a
Thymus kotschyanus	20	0.0002 C	0.025 B	2.07×10^{-6} b
Thymus Daenensis	20	0.00016 C	0.016 cd	2.82×10^{-6} a

در هر ستون میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ٪۵ تفاوت معنی‌داری ندارند.

نتیجه گیری

آویشن گیاهی چند ساله و از خانواده نعناعیان می‌باشد که میزان تغییرات ماده مؤثره در اندام هوایی آن به گونه، شرایط محیطی و مرحله فنولوژیکی گیاه بستگی دارد. لذا فرآیند سازگاری این گیاه نسبت به تنش سرما براساس فعالیت های آنزیم های انتی اکسیدانی قابل ارزیابی می‌باشد. این آنزیم ها نقش مهمی در پاکسازی گونه‌های اکسیژن فعال برعهده دارند و به عنوان نشانگر این اطلاعات را در اختیار می گذارند که گونه های مورد بررسی تا چه میزان در مقابل مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز) از خود مقاومت نشان می‌دهند. براساس نتایج بدست آمده میزان تنوع بسیاری از نحوه تغییرات فعالیت آنزیم ها در گونه های آویشن مورد بررسی بدست آمده است. فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که برهمکنش ارقام با دماهای تحت تیمار مخصوصا دمای ۲۰درجه سانتی گراد(شاهد) و صفر درجه معنی‌دار نبوده است که نشان دهنده‌ی برابری نحوه‌ی واکنش ارقام آویشن به دو دمای تحت تیمار می‌باشد. همچنین تغییرات هر سه آنزیم در رقم (P1007241)*vulgaris* بیشتر و با اندازه‌ی ماکزیمم نسبت آویشن دنایی و کوچیانوس بوده است.

ISSN NO: 2008-8485

فهرست منابع References

۱) **اکبری نیا ا. میرزا م. ۱۳۸۷.** شناسایی ترکیبات معطر گیاه دارویی آویشن کشت شده در قزوین. دانشگاه علوم پزشکی قزوین. دوره دوازدهم، شماره ۳ صفحات ۶۲-۵۸.

۲) **کاوه ش. ۱۳۹۲.** مقایسه خصوصیات مورفولوژیک و فیتوشیمیایی جمعیت های مختلف آویشن کوهی با نمونه هایی از آویشن باغی. فصل نامه علمی_پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۹، شماره ۱، صفحات ۱۲۹-۱۱۶.

۳) **محمدیان م. ا. رضایی ش. رمضانی ملک رودی م. ۱۳۹۱.** بررسی مقاومت دو رقم زیتون به تنش سرما. گروه زیست شناسی دانشگاه گیلان. فرآیند و کارکرد گیاهی. جلد ۱، شماره۲ صفحات ۱۱-۱.

۴) **میر محمدی میبدی م. ۱۳۸۳.** جنبه های فیزیولوژیک و به نژادی تنش های سرما و یخ زدگی گیاهان زراعی (ویرایش دوم). انتشارات گلبن، اصفهان.

5) **Agarwal, S. Pandey V. 2004.** Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassiaangustifolia*. Plant Biology 48: 555-560.

6) **Drazic, S. and S. Pavlovic. 2005.** Effect of vegetation space on productive traits of peppermint *(Mentha piperita L.)*. Institute for medicinal plants Research Dr Josif pancic, Tadusa koscuska 1, 1100 Belgrade, F.R. Yugoslavia. 31: 1-4.

7) **Jamzad Z. 2009.** Thymus and Satureja of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands press. 171p.

8) **Lee, M.H. 2001.** Low temperature tolerance in rice; the Korean experience. Increased lowland rice in the Mekong region edited by fukai and jaya basnayake. ACIAR proceeding. 101: 109-117.

9) **Lukatkin A. S. 2002.** Contribution of Oxidative Stress to the Development of Cold-Induced Damage to Leaves of Chilling-Sensitive Plants: 2. the Activity of Antioxidant Enzymes during Plant Chilling. Russian Journal of Plant Physiology 49(6): 782-788.

10) **Lukatkin S. A. Brazaityte A and Bobinas Č. 2012.** Chilling injury in Chilling-Sensitive Plants 99(2): 111-124.

11) **Moerschbacher, B.M. 1992.** Plant peroxidases involvement in response to pathogens.

12) **Narwal S.S. Bogatek R. Zagdanska B.M. Sampietro D.A. and vattuone M.A. (2009).** Plant Biochemistry. Stadium press LLC.255P.

13) **Prassad, T.K., M.D. Anderson, and C.R. stewart. 1994.** Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and regulatory role for hydrogen peroxide. Plant Cell 6: 65-74.

14) **Ring L. Yeh SY. Hücherig S. Hoffmann T. BlancoPortales R. Fouche M. Villatoro C. Denoyes B. Monfort A. Caballero JL. Muñoz-Blanco J. Gershenson J. Schwab W 2013.** Metabolic interaction between anthocyanin and lignin biosynthesis is associated with peroxidase FaPRX27 in strawberry fruit. Plant Physiology 163:43-60.

15) **Saglam, A., Saruhan, N., Terzi, R. & Kadioglu, A. 2011.** The Relations between Antioxidant Enzymes and Chlorophyll Fluorescence Parameters in Common Bean Cultivars Differing in Sensitivity to Drought Stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1), 60-68.

16) **Suzuki N. and R. Mittler. 2006.** Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. Physiol. Plant 126(1): 45-51.

17) **Wenying Liu, Kenming Yu, Tengfei He, Feifei Li, Dongxu Zhang, and Jianxia Liu, 2013.** "The Low Temperature Induced Physiological Responses of Avena nuda L., a Cold-Tolerant Plant Species," The Scientific World Journal, vol. 2013, Article ID 658793, 7 pages, doi:10.1155/2013/658793

18) **Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inze´ D., and Van Camp W. 1997.** Catalase is a sink for H2O2 and is indispensable for stress defense in C3plants. EMBO Journal 16: 4806–4816.

19) **Yong Kim SH. Lim MR. Park Y. Kim Y. Won SO. Choi KG. Yun SJ. 2005.** Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barely roots under saline stress. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 38: 218-224.

20) **Yong Z. Hao-Ru T. and Ya L. 2008.** Variation in antioxidant enzyme activities of two strawbreey cultivars with short-term low temperature stress. Journal of Agricultural Sciences 4: 456-462.

21) **Zhou and roger. 2005.** Cold indused antioxidant enzyme changes in leucanthemum maximum "silver princes". Hort Science 40(3): 546-548.

22) **Zhu J.K. 2000.** Genetic analysis of plant salttolerance using Arabidopsis, Plant Physiol 124: 941-948.

23) **Zlatev, Z.S. Lidon, F.C. Ramalho, J.C. & Yordanov, I.T. 2006.** Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. Biology Plantrum 50(3): 389-394.

مجله علمی-پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات ایران
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، صفحات ۲۹-۱۵

ISSN NO: 2008-8485

Iranian Journal of Agronomy & Plant Breeding Islamic Azad University, Karaj

The effect of cold stress on the activity of malon di-aldehyde, peroxidase and catalase enzymes in several species of thyme

M. Moshavegh*[1], S. Hooshmand[2], M. Rabiei[3]

Received date: 21 November 2021 Accepted date: 17 January 2022

Abstract

Chilling stress is an abiotic stress including meteorological dynamics that happens at low temperatures. Chilling stress was introduced as the most important limiting factor in tropical and subtropical plants. In antioxidant activity, catalase, malon di-aldehyde and peroxidase enzymes were treated at temperatures of 20 ° C (control), zero degrees and 5 ° C in three Thymus vulgaris, Thymus daensis and Thymus kotschyanus thyme cultivars. The composite analysis was carried out with 3 replications. The results showed that there was a significant variation among the Thymus cultivars in terms of how to respond to temperature stresses, and the rate of enzyme changes in each of 3 significant factors justifying the role protecting them against environmental changes. Only in the amount of activity of catalase activity, the interaction of cultivars with treated temperatures was not particularly significant at 20 ° C (control) and zero degree, indicating the equality of the mode of reaction of thyme cultivars to the two treated temperatures.

Key word: chilling stress, thyme, antioxidant enzyme activity

1 - M.Sc. graduated student of plant breeding shahre-kord university, shahre-kord., iran.*: Corresponding author: miladmoshavegh1993@gmail.com
2 - Professor Department of plant breeding, shahre-kord university, shahre-kord., iran
3 - Assistant professor Department of plant breeding, shahre-kord university, shahre-kord., iran