

واکاوای اثر تنش خشکی بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه به‌لیمو

Lippia citriodora H.B.K.عبدل محمدی^۱، حسن ابراهیم‌زاده^{۱*}، جواد هادیان^۲ و مسعود میرمعصومی^۱^۱ تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی^۲ تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده گیاهان دارویی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۱۶

چکیده

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها در انسان بیشینه طولانی دارد. تخمین زده شده که بیش از ۱۰٪ از گونه‌های گیاهی استفاده دارویی داشته باشند. گیاهان متأثر از فاکتورهای محیطی مختلفی همانند خشکی می‌باشند. خشکی با برهم زدن توازن اسمزی گیاهان، موجب کاهش رشد و عملکرد آنها می‌شود. همچنین باعث القاء گونه‌های واکنشگر اکسیژن می‌شود که به سلول‌های گیاهی آسیب می‌رساند. هدف از اجرای این طرح بررسی تأثیر تنش خشکی بر پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گونه به‌لیمو *Lippia citriodora* از تیره Verbenaceae است. تنش خشکی با غلظت‌های مختلف PEG (پلی اتیلن گلیکول) ۰٪، ۵٪، ۱۰٪، ۲۰٪ و ۲۵٪ القاء شد. نتایج بدست آمده نشان داد که FW (وزن تر) و RWC (محتوای نسبی آب) با افزایش تنش خشکی کاهش معنی داری را نسبت به شاهد نشان دادند. طول ریشه تحت تنش خشکی تغییر معنی داری را ایجاد نمی‌کند. محتوای رنگیزه‌های گیاه تحت تنش خشکی در سطوح پایین PEG افزایش معنی داری را نشان می‌دهد، در حالیکه در سطوح بالای آن کاهش معنی داری ایجاد می‌کند. تحت تنش خشکی محتوای پروتئین، پرولین، MDA (مالون دی آلدئید) و آب اکسیژنه (H₂O₂) افزایش معنی داری را نسبت به شاهد ایجاد می‌کند. به‌طوری‌که فعالیت زیماهی‌های پاداکساینده با افزایش تنش خشکی افزایش می‌یابد. کاهش FW و RWC با تنش خشکی حساسیت گیاه را به تنش نشان می‌دهد، از طرفی گیاه با افزایش ترکیباتی مانند پرولین و H₂O₂ و همچنین افزایش فعالیت زیماهی‌های پاداکساینده به تنش خشکی پاسخ می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: به‌لیمو، پروتئین، پرولین، MDA و H₂O₂.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۳۶۳۷، پست الکترونیکی: ebizadeh@ut.ac.ir

مقدمه

لوب پهن می‌باشد. (۸). این گیاه بومی امریکای جنوبی است و در کشورهای مثل پرو، آرژانتین و شیلی گزارش شده است (۲). تنش آبی یکی از تنش‌های متداول می‌باشد که رشد و تولید مثل گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث تغییرات متابولیسمی و اکسایشی در آنها می‌شود (۹). پروتئین‌هایی که در گیاهان تحت شرایط تنشی جمع می‌شوند، ممکن است هنگامی که تنش بیش از حد باشد، شکلی از نیتروژن را فراهم کنند که مجدداً قابل استفاده باشد و یا ممکن است نقشی را در تنظیم اسمزی بر عهده

گونه به‌لیمو با نام علمی *Lippia citriodora* H.B.K. از تیره شاه‌پسند (Verbenaceae) (۱ و ۲)، درختچه‌ای است به ارتفاع ۱/۵ تا ۲ متر دارای ساقه دراز، زاویه دار و منشعب، با برگ‌های ساده، خشن، کامل، فراهم و مجتمع به تعداد ۳-۴ عدد به رنگ سبز روشن. گلها کوچک و دارای جامی است که از خارج سفید و از داخل آبی مایل به بنفش است. مجموعه گل‌های آن ظاهر هرمی شکل در حول یک محور بلند به وجود می‌آورد. کاسه گل لوله‌ای شکل، منتهی به ۴ دندان باریک و جام گل آن مرکب از ۴

زیتوده (Biomass) کافی جهت شروع تنش به مدت دو ماه با محلول غذایی هوگلند آبیاری گردیدند.

تیمار تنش با PEG (6000): تنش خشکی با محلول PEG (6000) با غلظت های ۰٪، ۵٪، ۱۰٪، ۲۰٪ و ۲۵٪ اعمال شد. تیمارها به مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از محلول هوگلند حاوی (PEG) به هر گلدان انجام شد. مدت تنش یک ماه بود و بعد از برداشت، وزن تر ریشه و برگ اندازه گیری شد و به میزان نیم گرم از بافت تر برگ در ۴ میلی لیتر بافر (Tris-HCl) با pH=6.8 سائیده و همگن حاصل در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (UV-160, Shimadzu, Tokyo, Japan) شد و روشناور را جدا کرده، سپس به منظور انجام آنالیزها در فریزر ۷۰- نگهداری شد.

اندازه گیری محتوای پروتئین: به منظور سنجش غلظت پروتئین موجود در عصاره همگن استخراج شده، از هر محلول روشناور سه تکرار تهیه شد، بدین صورت که در هر لوله مقدار ۰/۱ میلی لیتر از عصاره را ریخته و به آن ۵ میلی لیتر محلول برادفورد اضافه شد. سپس لوله ها به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد و پس از گذشت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه جذب در ۵۹۵ nm خوانده شد. مقدار پروتئین هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی: پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه گیری محتوای MDA تعیین می‌شود (۱۶). مقدار ۰/۲ گرم از بافت تر برگ را در ۵ میلی لیتر از تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد وزنی- حجمی سائیده شد و بعد در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی لیتر از روشناور، ۴ میلی لیتر از تیوباریوتیک اسید (TBA) ۵٪ حاوی (TCA) ۲۰٪ اضافه کرده، مخلوط واکنش زائد در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. بعد از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، جذب روشناور در ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-

داشته باشند. در پاسخ به تنش ممکن است پروتئین ها به صورت جدید ساخته شوند یا این که به طور نهادی در غلظت های پایین وجود داشته و هنگامی که گیاهان در معرض تنش قرار می گیرند، غلظت آنها افزایش می‌یابد (۱۰). تعدادی از مشتقات مختلف اکسیژن به عنوان ROS یا AOS تعریف می شوند. H₂O₂ پایدارترین ROS می باشد. که واکنش پذیری نسبتاً ضعیفی با بیشتر مولکول های آلی داشته و به آسانی از خلال غشاهای سلولی منتشر می شود و به محل هایی با فاصله از محل های تولید اولیه می‌رسد (۱۱). هنگامی که گیاهان در وضعیت تنش قرار می گیرند، کاهش محتوای کلروفیل باعث کاهش فعالیت فتوسنتزی می‌شود (۱۲). کاهش محتوای کلروفیل نتیجه توام کاهش سنتز مولکول های کلروفیل و افزایش تخریب آن می باشد (۱۳). میزان حساسیت گیاه و آسیب وارد شده به غشاء با اندازه گیری محتوای مالون دی آلدئید (MDA) که حاصل قرار گرفتن اسید های چرب غیر اشباع در معرض تنش است، مشخص می‌گردد. افزایش تنش با ایجاد تغییر در اسیدهای چرب غیراشباع بر ساختار و ویژگی های غشاء سلولی اثر گذاشته، و باعث افزایش ایجاد رادیکال های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها و تراوی غشاء سلولی و در نتیجه تراوایی اسمولیت ها در گیاهان حساس می‌شود (۱۴). هدف این طرح بررسی میزان مقاومت به لیمو (*citriodora Lippia*) به تنش خشکی و همچنین واکاوی تغییرات برخی پارامترهای بیوشیمیایی- فیزیولوژیکی در این گیاه تحت تنش خشکی می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه نمونه: قلمه های به لیمو از شرکت گیاهان دارویی خرمان واقع در ۲۶ کیلومتری شهرستان کوه‌دشت جمع آوری شد و بعد به گلخانه دانشکده علوم انتقال یافت و در گلدانهای با قطر ۱۸ سانتیمتر و ارتفاع ۲۸ سانتی متر کاشته شدند. نمونه ها برای رشد و حاصل شدن مقدار

گیری و بر حسب میکرومول بر گرم نمونه تر گزارش شد (۱۸).

اندازه‌گیری محتوای رنگیزه: به منظور اندازه‌گیری انواع کلروفیل (a, b و کل) و همچنین کاروتنوئید، ۰/۲ گرم بافت تر برگ را در استون ۹۰ درصد سائیده و بعد با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک محلول به دست آمده صاف شد و میزان جذب با استفاده از اسپکتروفوتومتر (UV- 160, Shimadzu, Tokyo, Japan) گزارش گردید (۱۹).

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب (RWC): RWC با استفاده از معادله زیر محاسبه شد: $RWC (\%) = 100 \times [(FW-DW) / (TW-DW)]$ در این معادله FW وزن تر، DW وزن خشک و TW وزن اشباع می‌باشد. TW با قرار گرفتن نمونه‌ها در آب و تاریکی به مدت ۲۴ ساعت بدست می‌آید، سپس این نمونه‌ها در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و DW اندازه‌گیری گردید (۲۰).

فعالیت زیمایه SOD: فعالیت این زیمایه با قابلیت آن در بازدارندگی واکنش احیایی فتوشیمیایی نیتروبلو تترازولیوم (NBT) تعیین گردید. محلول واکنش بر اساس سنجش فعالیت زیمایه در محیط محتوای بافر فسفات 50 mM با pH=۷/۵، متیونین ۱۳ mM، Na-EDTA ۰/۱ mM، نیتروبلو تترازولیوم (NBT) ۷۵ μM، ریبوفلاوین ۷۵ μM و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره می‌باشد. این روش بر اساس تبدیل NBT به فورمازان در حضور نور و تشکیل رنگ می‌باشد. در صورتی که زیمایه سوپراکسید دیسموتاز در محیط وجود داشته باشد، از انجام واکنش مذکور ممانعت کرده و تشکیل و ظهور رنگ را کاهش می‌دهد. پس از ۱۶ دقیقه جذب آنها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد (۴۳).

Photometric در مد (160, Shimadzu, Tokyo, Japan) خوانده شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ استفاده شد و در نهایت مقدار مالون دی‌آلدهید که محصول پراکسیداسیون لیپیدها است براساس میکرومول در گرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری محتوای پرولین: به منظور اندازه‌گیری محتوای پرولین، نیم گرم از بافت برگ را در ۱۰ میلی‌لیتر از سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ (w/v) سائیده و بعد همگن صاف گردید. به محلول بدست آمده ۲ میلی‌لیتر اسید نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال افزوده و به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. آنگاه به مخلوط واکنش ۴ میلی‌لیتر تولوئن افزوده و جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر گزارش شد. محتوای پرولین بر حسب میکرومول بر گرم نمونه تر محاسبه می‌شود (۱۷).

اندازه‌گیری محتوای هیدروژن پراکسید (H₂O₂): ۰/۲ گرم از بافت تر برگ درون حمام یخ در ۵ میلی‌لیتر TCA ۰/۱٪ (W/V) سائیده و با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس نیم میلی‌لیتر از روشناور را جدا کرده و به آن نیم میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH=7 و یک میلی‌لیتر پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد.

استانداردهای هیدروژن پراکسید: مقدار ۱/۱۳۴ گرم از پودر هیدروژن پراکسید را در محیط نیمه تاریک اتاق سرد به یک بالن حجمی اضافه نموده، آن را در ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر (۰/۱٪ TCA) حل کرده و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد (۱۰۰ میلی‌مولار). برای تهیه محلولهای استاندارد صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار به ترتیب مقادیر صفر، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌لیتر از شاهد را به بالن‌های حجمی در محیط سرد و نیمه تاریک اضافه نموده و حجم نهایی با آب مقطر (۰/۱٪ TCA) به ۵۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. محتوای پراکسید هیدروژن با منحنی استاندارد اندازه

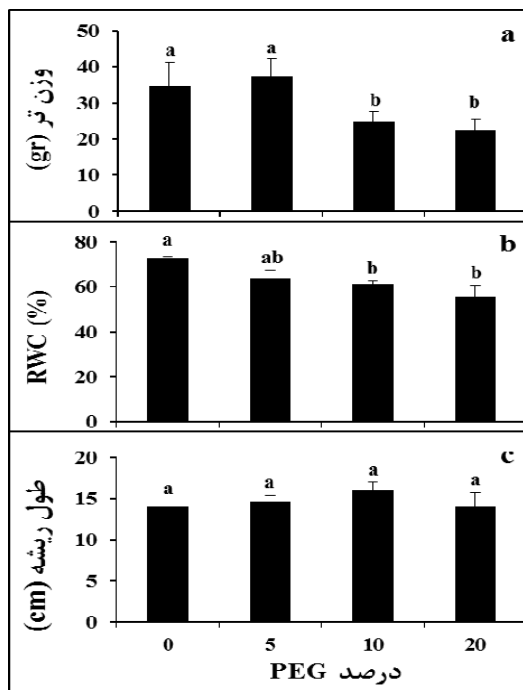
گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها در سطح خطای ۵٪
($P < 0.05$) با آزمون دانکن (DMRT) انجام شد.

نتایج

وزن تر (FW): نتایج حاصل از بررسی اثر تنش خشکی بر وزن تر گیاه در شکل (a-1) مشاهده می‌شود، به طوری که تحت تنش خشکی وزن تر گیاه کاهش معنی داری را نسبت به شاهد نشان داد.

محتوای نسبی آب (RWC): نتایج اثر تنش خشکی بر محتوای نسبی آب نشان می‌دهد با افزایش سطوح PEG و به موازات آن افزایش تنش خشکی کاهش معنی داری در RWC ایجاد شد (شکل b-1).

طول ریشه: با افزایش سطوح PEG و به موازات آن افزایش تنش خشکی تغییر معنی داری در طول ریشه ایجاد نشد (شکل c-1).



شکل ۱- تأثیر تنش خشکی بر FW، RWC و طول ریشه

محتوای رنگیزه: در شکل ۲ تأثیر تنش خشکی بر محتوای رنگیزه‌های گیاه نشان داده شده است. محتوای کلروفیل a،

فعالیت زیمايه پراکسیداز: براساس روش Abeles در یک مخلوط واکنش حاوی ۰/۴ میلی لیتر H_2O_2 ۳ درصد، ۰/۲ میلی لیتر بنزیدین ۲۰ میلی مولار، ۴ میلی لیتر بافر استات (pH= 4.8) و ۵۰ میکرولیتر عصاره زیمايه اندازه‌گیری شده است. تغییرات جذب بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر Shimadzu مد kinetic و طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت پراکسیداز بر حسب واحد زیمايه ای در میلی گرم پروتئین محاسبه گردید (۴۴).

پلی فنل اکسیداز (PPO): به این منظور مخلوطی از بافر پتاسیم فسفات ۰/۲ مولار با pH=۶/۸ ۲/۵ میلی لیتر و مقدار ۰/۲ میلی لیتر پیروگالال ۰/۰۲ مولار را با ۲۰ میکرولیتر عصاره زیمايه‌ای به یک لوله آزمایش که در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشت افزوده و بلافاصله تغییرات جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر Shimadzu و مدل UV-۱۶۰ در مد کیتیک و طول موج ۴۳۰ نانومتر رسم گردید. در نهایت میزان فعالیت زیمايه بر حسب واحد زیمايه‌ای در میلی گرم پروتئین ($Unit\ mg^{-1}\ protein$) محاسبه گردید (۴۹).

فعالیت آسکوربات پراکسیداز: به روش Nakano و Asada اندازه‌گیری شد. در ابتدا ۸۵۰ میکرولیتر از آسکوربات پراکسیداز ۰/۵ میلی مولار (محلول در بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار) به همراه ۱۵۰ میکرولیتر پر اکسید هیدروژن ۲ میلی مولار (محلول در آب مقطر دو بار تقطیر) به یک کووت کوارتز ۱ میلی لیتری اضافه شده و به عنوان شاهد در طول موج ۲۹۰ نانومتر بکار رفت. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره زیمايه استخراج شده از برگ هر تکرار به مخلوط واکنش فوق اضافه شد و فعالیت آسکوربات پراکسیداز در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه و بر حسب Abs/min ترسیم شد (۵۰). آزمایش‌های این پروژه براساس طرح فاکتوریل در قالب بلوک‌های کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از بررسیها بوسیله نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۰) مورد تحلیل قرار

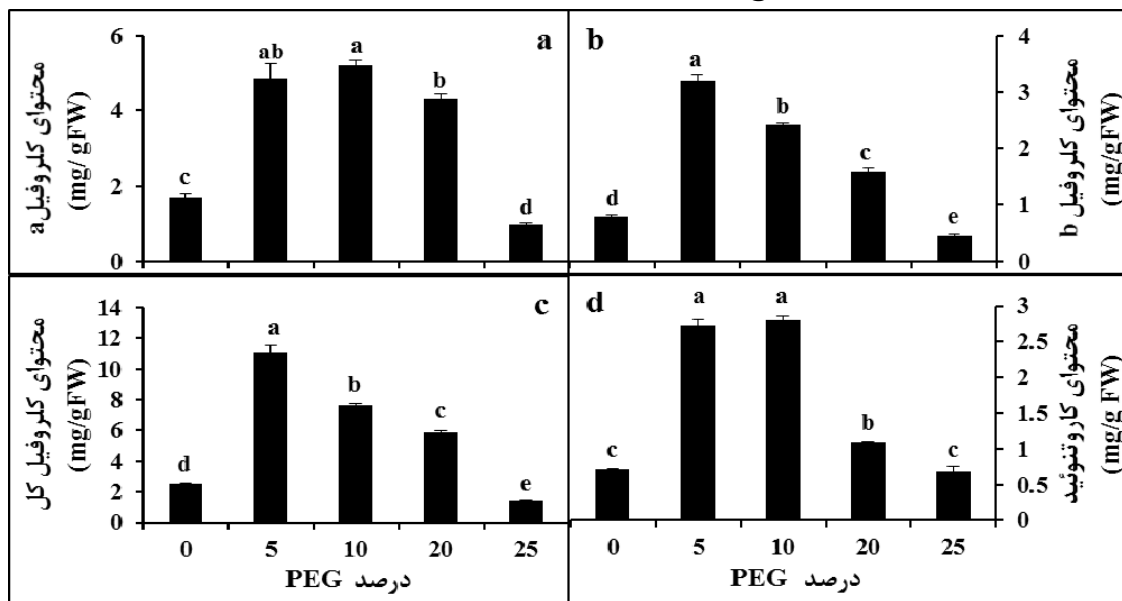
بیشترین مقدار را دارد. پرولین در تمام سطوح خشکی افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان می‌دهد.

محتوای MDA: تغییر محتوای MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی تحت تنش خشکی در شکل (۳-۳) نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود این محتوا با افزایش شدت تنش به موازات افزایش غلظت PEG اعمال شده نسبت به شاهد در تمام سطوح خشکی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. بیشترین پراکسیداسیون لیپیدی در سطح ۵ درصد PEG مشاهده می‌شود.

کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در سطوح پایین PEG افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان می‌دهند. این در حالیست که در سطح ۲۵ درصد PEG کاهش معنی‌داری در این رنگیزه‌ها نسبت به شاهد ایجاد شد.

محتوای پروتئین: تأثیر تنش خشکی بر محتوای پروتئین گیاه در شکل (۳-۴) آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود محتوای پروتئین با افزایش سطوح PEG و در نتیجه آن افزایش شدت خشکی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

محتوای پرولین: محتوای پرولین آزاد به عنوان یک اسمولیت سازگار تحت تنش خشکی در گیاه مورد آزمایش افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل (۳-۵) مشاهده می‌شود این میزان در سطح ۲۵ درصد PEG



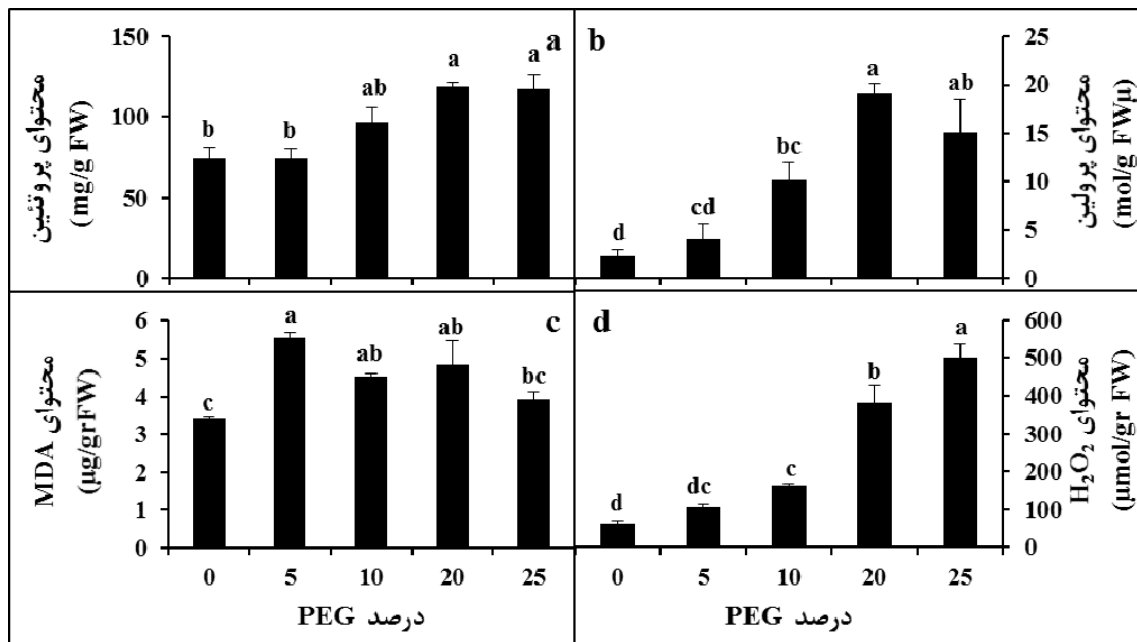
شکل ۲- تأثیر تنش خشکی بر محتوای رنگیزه‌های گیاه به‌لیمو

همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش تنش خشکی میزان فعالیت این زیمايه نسبت به نمونه کنترل افزایش پیدا کرده است. بیشترین میزان فعالیت این زیمايه در تیمار ۲۰ درصد PEG مشاهده می‌شود. بین میزان فعالیت این زیمايه در تیمار ۵، ۱۰ و ۲۵ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. میزان فعالیت با تنش روند افزایش نشان می‌دهد، این روند از تیمار ۲۰ به بعد روند نزولی پیدا می‌کند.

محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2): تأثیر تنش خشکی بر محتوای H_2O_2 در شکل (۳-۴) نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود این محتوا با افزایش غلظت PEG و در نتیجه آن افزایش تنش خشکی در تمام سطوح نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

زیمايه های پاداکساینده: تغییرات فعالیت زیمايه SOD تحت تنش خشکی در شکل (۳-۴) نشان داده شده است.

فعالیت زیمایه POX تحت تنش خشکی مطابق شکل (۴-۳) تغییر پیدا می‌کند.



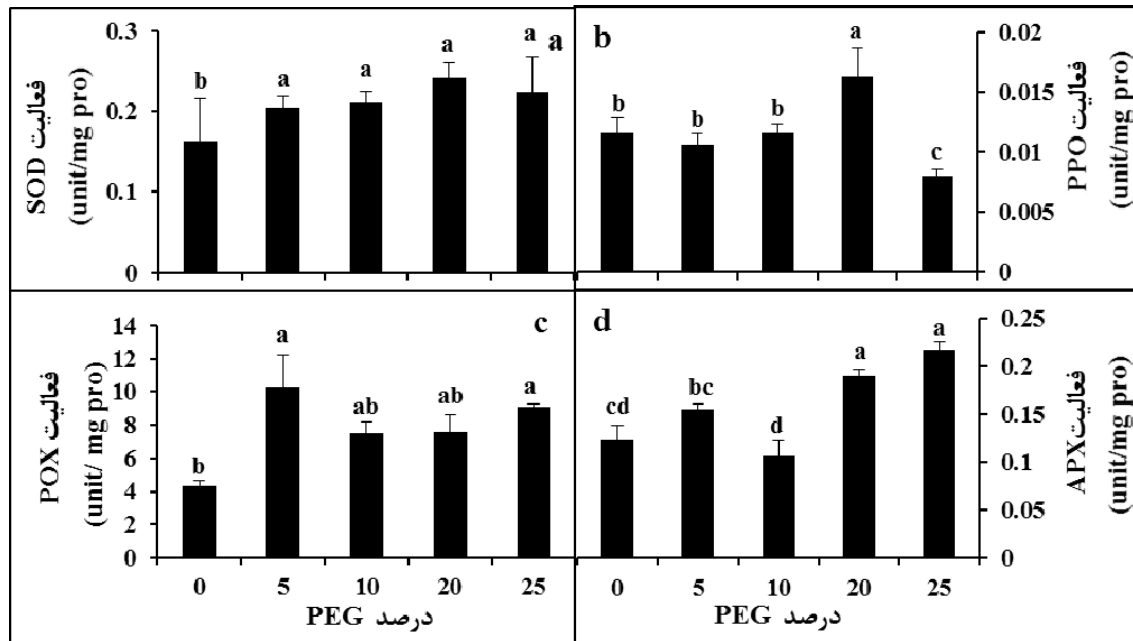
شکل ۳- تأثیر تنش خشکی بر محتوای پروتئین، پرولین، MDA و H₂O₂

وزن تر (FW): کیفیت و کمیت رشد گیاه وابسته به تقسیم سلول است. بزرگ شدن و تمایز توسط تنش کمبود آب متأثر می‌شود (۲۱). این ممکن است دلیلی برای رشد کاهش یافته گیاهان تحت تنش کمبود آب باشد. کاهش FW تحت شرایط خشکی ممکن است به دلیل سرکوب تقسیم سلول و رشد آن در نتیجه فشار تورژسانس پایین باشد. محققان بیان داشته‌اند که شوری و خشکی بالا باعث محدود شدن ترکیباتی مانند سیتوکینین‌ها و افزایش ترکیباتی مثل آبسزیک اسید می‌شود که بر تقسیم سلولی مؤثر می‌باشند (۳).

در پژوهش حاضر وزن تر گیاه در تمام سطوح خشکی نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد، این نتیجه با گزارش بدست آمده مبنی بر این که FW در گندم تحت تنش خشکی کاهش می‌یابد، مطابقت دارد (۱۹). نتایج مشابه در *Abelmoschus esculentum* گزارش شده است (۲۳).

همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش تنش خشکی فعالیت این زیمایه نسبت به شاهد در تمام سطوح خشکی افزایش پیدا کرده، به طوری که بیشترین میزان فعالیت مربوط به سطح ۵ درصد PEG می‌باشد. میزان فعالیت در ۱۰ و ۲۰ درصد خشکی با هم برابر بوده و این میزان در سطح ۲۵ مجدداً افزایش پیدا کرده است. همانطور که در شکل (۴-۳) مشاهده می‌شود فعالیت زیمایه PPO با افزایش تنش خشکی در غلظت ۲۰٪ PEG افزایش معنی‌دار و در غلظت ۲۵٪ کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان می‌دهند، در سایر غلظت‌های PEG تغییر معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان نمی‌دهند. نتایج حاصل از بررسی اثر تنش خشکی بر فعالیت زیمایه APX در شکل (۴-۴) آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود تحت تنش خشکی به موازات افزایش تنش میزان فعالیت این زیمایه افزایش پیدا کرده است.

بحث



شکل ۴- تغییر فعالیت زیمايه‌های پاداکساینده تحت تنش خشکی

تورژسانس می‌باشد و هر گونه کاهش در فشار تورژسانس که در نتیجه عدم تعادل در محتوای آب گیاه به وجود آید می‌تواند منجر به کاهش رشد در شرایط تنش خشکی شود (۲۷)، همچنین در تأیید نتایج ما گزارش شده که RWC تحت تنش خشکی کاهش (*Festuca arundinacea*) می‌یابد (۲۸).

محتوای رنگیزه: کاهش میزان کلروفیل گونه‌های حساس به تنش می‌تواند نتیجه تخریب ساختار ظریف کلروپلاست، تغییر نسبت چربی - پروتئین رنگیزه‌ها و یا افزایش فعالیت کلروفیلاز باشد (۲۹). همچنین کاهش محتوای رنگیزه در اثر تنش خشکی در *Guizotia abyssinica* نیز گزارش شده (۴۲) که در گیاه گندم رقم مقاوم به خشکی در مقایسه با رقم حساس به دلیل حفظ مقادیر بالایی از کلروفیل و کاروتنوئیدها، قدرت نورآمایی بهتری را در شرایط خشکی داراست که این تغییرات نوعی سازگاری در دستگاه نورآمایی می‌باشد (۳۰). در تجربه حاضر محتوای رنگیزه‌ها، بیشترین محتوای رنگیزه‌ها در سطوح ۵ یا ۱۰ درصد خشکی می‌باشد.

طول ریشه: زمانی که گیاه در معرض خشکی قرار می‌گیرد، حتی قبل از هر گونه کاهش در تورژسانس، انعطاف پذیری دیواره سلول‌های در حال رشد برگ‌ها و ساقه‌ها عموماً کم شده و توسعه سلول و در نتیجه رشد اندام‌ها کم می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد دیواره سلولی ریشه به تنش خشکی کمتر حساس بوده، به طوری که ممکن است وقتی که رشد اندام‌های هوایی متوقف شده باشد، رشد ریشه ادامه پیدا کند (۲۴ و ۲۵). در پژوهش حاضر طول ریشه با تنش خشکی کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان نداده است، برخلاف این نتایج بدست آمده اعلام شده که وزن ریشه *Phaseolus vulgaris* و *P. acutifolius* تحت تنش کمبود آب کاهش یافت (۲۶).

محتوای نسبی آب (RWC): در پژوهش اخیر با افزایش تنش خشکی محتوای نسبی آب به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش پیدا کرده است. اثر خشکی روی توسعه دیواره یاخته‌ای بیشتر است، زیرا لازمه طویل شدن یاخته‌ها انعطاف پذیری دیواره یاخته‌ای تحت فشار

محتوای MDA نسبت به شاهد افزایش پیدا می‌کند. این گزارش با نتایج بدست آمده مبنی بر اینکه افزایش تنش خشکی موجب افزایش MDA در *Citrus aurantifolia* (۳۶) و *Zea maize* (۷) می‌شود، مطابقت دارد. افزایش MDA نشان‌دهنده این است که تحت تنش خشکی ساختار غشاء آسیب دیده و لیپیدهای آن آزاد شده، از طرفی با وجود ترکیبات ROS که تحت تنش زیاد می‌شود این لیپیدها پراکسیده شده و MDA تولید می‌شود. وجود سیستم پاداکساینده توانمند باعث تقلیل ترکیبات ROS شده و به نوعی می‌تواند باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شود.

محتوای H_2O_2 : به عنوان یک عامل تنظیمی نقش مهمی در فعال سازی ژن‌های رمزگذاری کننده زیمايه‌ها و پروتئین‌هایی بازی می‌کند که در دفاع از تنش اکسیداتیو عمومی درگیر هستند (۳۷).

افزایش میزان هیدروژن پراکسید تحت تنش‌های مختلف افزایش می‌یابد، همچنان که مشاهده شده سطح هیدروژن پراکسید در توت با افزایش شوری (۳۸)، در خیار با تنش سرما (۳۹) و در لوبیا با تیمار باران اسیدی افزایش پیدا کرده است (۴۰). در پژوهش حاضر تحت تنش خشکی محتوای H_2O_2 افزایش پیدا می‌کند که این تغییر قبلا در *Citrus aurantifolia* و دو گونه از *Salicornia* نیز گزارش شده است (۳۶ و ۴۱).

زیمايه‌های پاداکساینده: آنیون‌های سوپراکسید به وسیله تنش شوری در سلول تولید می‌شود، زیرا مهمترین تأثیر تنش شوری اختلال در وضعیت آب سلولی است که در نتیجه آن رشد کاهش می‌یابد، همچنین افزایش تنفس در این شرایط سبب تولید این یون‌های مخرب در میتوکندری سلول می‌شود. در چنین شرایطی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به عنوان یک زیمايه از بین برنده یون سوپر اکسید، مشابه نتایج بدست آمده افزایش می‌یابد (۴۵). فعالیت زیمايه SOD تحت تنش خشکی مطابق شکل (۴)-

محتوای پروتئین: در طی تنش خشکی بیان برخی ژن‌ها افزایش می‌یابد که آنها را می‌توان به ژن‌های وابسته به متابولیسم اولیه، تنظیم اسمزی، تغییر ساختمان، تجزیه پروتئین، رفع سمیت و پروتئین‌های LEA تقسیم بندی نمود (۳۱). مطالعه حاضر نشان داد در گیاه به لیمو با افزایش تنش خشکی محتوای پروتئین زیاد شد. در رقم حساس به تنش گندم نیز افزایش محتوای پروتئین کل با اعمال تنش مشاهده شده است (۳۲).

محتوای پرولین: مقاومت به تنش خشکی به توانایی گیاه برای ادامه حیات خود در شرایطی که پتانسیل آب بافت‌های گیاهی کاهش یابد، اطلاق می‌شود. سازوکارهای مقاومت به خشکی اغلب از راه حفظ تورم یاخته‌ای (با تجمع نمک‌های محلول داخل یاخته‌ای) و یا با تحمل خشکی (به وسیله مقاومت پروتوپلاسمی) صورت می‌گیرد. از جمله مهمترین موادی که تجمع آنها در یاخته‌های گیاهی تحت تنش خشکی افزایش می‌یابد می‌توان به آمینو اسید آزاد پرولین اشاره کرد که تحت شرایط تنش، مقدار آن افزایش یافته و در حفظ پتانسیل اسمزی نقش دارد (۳۶). در مطالعه حاضر مشخص شده که با افزایش تنش خشکی محتوای پرولین گیاه افزایش می‌یابد. این نتیجه با مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های *Trigonella* (۳۴)، کلزا (۴) و گلابی آسیایی (۵) مطابقت دارد. در بررسی‌های انجام شده بر روی گون مشاهده شده که تیمار مانیتول و PEG باعث افزایش محتوای پرولین آزاد دانه رست‌های دو گونه گون گردید (۶).

محتوای MDA: این مطلب شناخته شده است که پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی که نتیجه اثرات رادیکال‌های آزاد هستند، نشان‌دهنده آسیب تنش در سطح سلولی می‌باشد. بنابراین سطح MDA حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، اغلب به عنوان یک شاخص برای آسیب اکسیداتیو به کار می‌رود (۳۵). در مطالعه حاضر مشخص شده که با افزایش درصد PEG و در نتیجه تنش خشکی

کلروپلاست انجام می‌دهد. این نقش آسکوربات پراکسیداز با نقش کاتالاز و پراکسیداز مشابه است (۵۱).

گزارش‌های قبلی نشان می‌دهد که در دانه رست های برنج فعالیت آسکوربات پراکسیداز در پاسخ به هیدروژن پراکسید ناشی از تنش کمبود آب افزایش می‌یابد (۴۷).

Zlatev و همکاران دریافتند که تحت تنش خشکی در لوبیا که پراکسیداسیون لیپیدی کمتری داشته، فعالیت آسکوربات پراکسیدازی بالاتری نسبت به سایر ارقام نشان داده است (۵۲). زیرا این زیماهی در رویشگری هیدروژن پراکسید دخیل است و از این‌رو در از بین بردن تنش اکسایشی مؤثر است (۵۳). در این پژوهش مشاهده شده که فعالیت این زیماهی با تنش خشکی افزایش پیدا کرده که با مشاهدات قبلی مطابقت دارد (۳۶).

نتیجه‌گیری: کاهش در پارامترهایی مانند وزن تر (FW) و محتوای نسبی آب (RWC) نشان‌دهنده حساسیت این گیاه به تنش خشکی می‌باشد. گیاه مورد نظر با افزایش محتوای پروتئین و پرولین به نوعی به تنش پاسخ می‌دهد. افزایش محتوای MDA حساسیت گیاه را نسبت به تنش نشان می‌دهد. همچنین افزایش محتوای H_2O_2 نشان دهنده افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاه و حساسیت آن به خشکی می‌باشد. گیاه به‌لیمو نسبت به خشکی حساسیت نشان می‌دهد، از طرفی افزایش برخی پارامترها مثلاً پرولین نشان دهنده این است که گیاه سعی در تحمل تنش دارد. در سطوح پایین PEG همانطور که از روند تغییر برخی پارامترها از جمله رنگیزه‌ها پیداست گیاه متحمل تر است، این تحمل تا سطوح حداکثر ۲۰ درصد PEG مشاهده می‌شود، از این سطح به بعد گیاه حساسیت بیشتری نشان می‌دهد.

a) افزایش پیدا می‌کند، همچنین مشاهده شده این روند در *Mentha pulegium* افزایش تنش خشکی در برگ و ریشه قبلاً نیز گزارش شده است (۴۶). در دانه رست های برنج همچنین گزارش شده که تنش کمبود آب فعالیت تمام زیماهی های جاروب کننده اکسیژن فعال را افزایش می‌دهد (۴۷). با توجه به نقش پراکسیداز در سیستم پاداکسایشی گیاه، افزایش فعالیت آن در تنش قابل پیش بینی است. اما کاهش فعالیت این زیماهی در برخی غلظت‌ها می‌تواند به دلیل تجمع بیش از حد رادیکال های آزاد اکسیژن و رادیکال های هیدروکسیل بوده که باعث جلوگیری از فعالیت این زیماهی می‌شود (۴۸). در دانه رست های برنج تحت تنش کمبود آب، افزایش فعالیت پراکسیداز که همراه با افزایش فعالیت کاتالاز است، نشان دهنده انتشار هیدروژن پراکسید از کلروپلاست‌ها می‌باشد (۴۷). پلی فنل اکسیدازها از جمله اکسیداز های شناخته شده ای هستند که نقش فیزیولوژیکی آنها در گیاهان هنوز به خوبی شناخته نشده است و این زیماهی‌ها در زیست‌آمائی دیواره سلولی، مقابله با بیماری‌ها و شرایط تنشی فعال هستند. نتایج پژوهش حاضر در گیاه به لیمو نشان می‌دهد که با افزایش تنش خشکی در نمونه‌هایی که تحت تنش خشکی بوده‌اند تا حد خاصی از خشکی فعالیت این زیماهی نسبت به شاهد افزایش پیدا می‌کند و از این حد به بعد کاهش نشان می‌دهد، که با نتایج بدست آمده در گیاه *Mentha pulegium* مطابقت دارد (۴۶). آسکوربات پراکسیداز همانند پراکسیداز در حذف پراکسید هیدروژن دخیل می‌باشد. این زیماهی سلول‌های گیاهی را در مقابل آسیب‌های اکسایشی و اکسیداسیون نوری حفاظت می‌نماید. آسکوربات پراکسیداز این عمل را با واسطه آسکوربات و از طریق جاروب کردن هیدروژن پراکسید در سیتوپلاسم و

منابع

۱. ظفریان، ولی ا...، فرهنگ اسامی گیاهان ایران. فرهنگ معاصر، ۱۳۷۵، صفحه ۳۲۵.
۲. زرگری، علی. گیاهان دارویی. چاپ پنجم. موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۷۱. جلد سوم. صفحات ۱۱۳-۷۱۱.

۳. - اصفاء، آرزو (۱۳۸۱). تاثیر شوری بر میزان رشد، املاح محتوای بافت و تولید آلکالوئید در درخت انار. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس.
۴. میرزایی، ملیحه، معینی، احمد، قناتی فائزه، (۱۳۹۲). اثر تنش خشکی بر میزان پرولین و قندهای محلول گیاهچه های کلزا (*Brassica napus*). مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۶ (۱)، صفحات ۹۰-۹۸.
۵. جواد، تیمور، ارزانی، کاظم، ابراهیم زاده، حسن، (۱۳۸۳). بررسی میزان کربوهیدراتهای محلول و پرولین در نه ژنوتیپ گلابس آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) تحت تنش خشکی. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۱۷ (۴).
۶. شاهقلی، کبری (۱۳۸۵). بررسی اثر شوری و خشکی بر فعالیت برخی آنزیم‌ها در دانه رست‌های دو گونه گون. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده زیست‌شناسی. دانشکده علوم، دانشگاه تهران.
۷. دولت‌آبادیان، آریا، مدرس‌ثانوی، سید علی محمد، شریفی، مظفر، (۱۳۸۸). اثر تنش کم‌آبی و محلول پاشی اسید آسکوربیک بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی تغییرات بیوشیمیایی در برگ ذرت دانه ای (*Zea mize L.*). مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۲ (۳)، صفحات ۴۰۷-۴۲۲.
8. Tutin, TG., 1981. Lippia In: Tutin TG. Flora Europea. Cambridge University Press. Cambridge. Vol. 13. p.123.
9. Kalefetoglu, T, Ekmekci, Y, 2005. The effects of drought on plant and tolerance mechanisms (Review). GU J Sci 18(4):723-740.
10. Ashraf, M., Hariss, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicator of salinity tolerance in plants. Plant Science, 166: 3-16.
11. Kuzniak, E., Urbaneck, H., 2000. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. Acta Physiologica Plantarum. 22(2): 195-203.
12. Jamil, M., 2007. Salinity reduced growth ps2 photochemistry and chlorophyll content in radish. Scientia Agricola. 64: 111-118.
13. Chen, C., Tao, C, Peng, H, Ding, Y, 2007. Genetic analysis of salt stress responses in Asparagus Bean (*Vigna unguiculata* (L.) ssp. Sesquipedalis verdc.). Journal of Heredity. 98(7): 655-665.
14. Elkahoui, S, Hernandez, J.e.A, Abdelly, C, Ghir, R., Limam, F, 2005. Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. Plant Science. 168: 607-613.
15. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry 72: 248-254.
16. Heath, R.L, Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, Archives in Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.
17. Bates L.S, Waldren R.P, Teare, L.D, 1973. Rapid determination tolerance in cucumber plants. Pakistan Journal of Biological Science 6 (1): 16-22.
18. Velikova, V, Yordanov, I, Edreva, A, 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci. 151: 59-66.
19. Lichtenthaler, H, 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of the photosynthetic bio membranes. Methods Enzymol 148: 350-382
20. Sairam, R. K, Srivastava, G. C, 2002. Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Sci 162: 897-904.
21. Kusaka, M, Lalusin, A. G, Fujimura, T., 2005. The maintenance of growth and turgor in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) Leeke) cultivars with different root structures and osmo-regulation under drought stress. Plant Sci 168: 1-14.
22. Rane, J, Maheshwari, M, Nagarajan, S, 2001. Effect of pre anthesis water stress on growth, photosynthesis and yield of six wheat cultivars differing in drought tolerance. Indian J. Plant. - Physiol 6: 53-60.
23. Bhatt, R.M, Srinivasa, Roa, N.K, 2005. Influence of pod load on response of okra to water stress. Indian J. Plant Physiol 10: 54-59.
24. Basra, A.S, Basra, R.K, 1997. Mechanism of environmental stress resistance in plants. Harward Academic Publisher.

25. Smith, H, 1990. Signal perception differential expression within multigene families and the molecular basis of phenotypic plasticity. *Plant, Cell and Environment* 13:585-595.
26. Ferrat, I. L, Lovat, V.J, 1999. Relation between relative water content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* and *P.acutifolius* during water deficit crop. *Crop Science*39:467-474.
27. Farooq, MWA, Kobayashi, N., Fujita, D and Basra, SM, 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain Dev* 29:185-212.
28. Jiang, Y., Huang, B, 2002. Protein alternations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. *Crop Science*. 42: 202-207.
29. Jacoby, B, 1994. Mechanism involved in salt tolerance by plants .In: Pessaraki M. (Ed).Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker Inc. New York.pp:97-123.
30. Loggini, B, Scartazza, A, Brugnoli, E, Navari-Izzo, F. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology* 119: 1091.
31. Ingram, J, Bartels, D, 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plant. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*47:347-403.
32. Ashraf, M, O Leary, J.W, 1999. Changes in soluble proteins in spring wheat stressed with sodium chloride. *Biol. Plant*. 42: 113-117.
33. Taiz, L, Zeiger, E, 2010. *Plant Physiology*, Ed Fifth. In. Sinauer Associates, USA Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 50: 571-599.
34. Niknam, V, Razavi, N, Ebrahimzadeh, H, Sharifzadeh, B, 2006. Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents, and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* species. *BIOLOGIA PLANTARUM* 50 (4): 591-596.
35. Turkan, I, Bor, M, Ozdemir, F, Koca, H, 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*. 168: 223-231.
36. Zafari,S., Niknam, V., 2012. Effect of phytoplasma infection on metabolite content and antioxidant enzyme activity in lime (*Citrus aurantifolia*). *Acta Physiol Plant*, 34:561-568.
37. Kuzniak, E, Urbanek, H, 2000. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiologica Plantarum* 22(2): 195-203.
38. Harinasut, P, Poonsopa, D, Roengmongkol, K, 2003. Salinity effect on antioxidant enzymes in *Mulberry cultivar*. *Science Asia* 29:109-113.
39. Lee, D.H, Lee C.B, 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci* 159: 75-85.
40. Velikova, V, Yordanov, I, Edreva, A, 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.*, 151: 59-66.
41. Niknam,V., Torabi, S., 2011. Effects of Iso-osmotic Concentrations of NaCl and Mannitol on some Metabolic Activity in Calluses of Two *Salicornia* species.
42. Ghane, S. G, Lokhande, V. H, 2012. Differential growth, physiological and biochemical responses of niger (*Guizotia abyssinica*Cass.) cultivars to water-deficit (drought) stress. *Acta Physiol Plant* 34:215-225
43. Giannopolitilis, C.N, Ries,S.K, 1997, Superoxide dismutase.o.purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedlings, *plant physiology*.59:315-318.
44. Abeles, F.B., Biles, C.L. (1991). Characterization of peroxidase in lignifying peach fruit endocarp. *Plant PHysiol*. 95: 269-273.
45. Dehghan,G, Rezazadeh,L, Habibi,G, 2011. Exogenous Ascorbate improves antioxidant defense system and induces salinity tolerance in soybean seedlings. *Acta Biologica Szegediensis*. 55(2):261-264.
46. Niknam,V, Hassanpour, H, 2011. Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium*L.)
47. Srivalli, B, Sharma, G, Khanna-Chopra, R, 2003. Antioxidative defence system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiology Plantarum* 119:503-512.
48. Demiral, T., Turkan, I., 2005. Comparative lipid peroxidation antioxidant defensesystems and

- proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 53: 247-257.
49. Raymond, J, Rakariyatham, N, Azanza, JL, 1993 Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds, *J Phytochem* 34:927-931.
50. Asada, K., Takahashi, M. 1987. "Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis" In: Eds. Kyle DJ, Osmond CB, Amtzen DJ, PHotoinhibition. Amsterdam: Elsevier, pp. 227-287.
51. Benavides, M. P., Marconi, P.L., Gallego, S. M., 2000, Relationship between antioxidant system and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 273 -278.
52. Zlatev, Z. S., Lidon, F.C., Ramalho, J. C., 2006, Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum* 50:389-394.
53. Jagtap, V., Bhargava, S. 1995, Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties sorghum bicolor (L.) Moench. Exposed to high light, low Water and high temperature stress. *Journal of Plant Physiology* 145: 195-197.

Study of the effect of drought stress on some biochemical and physiological parameters of *Lippia citriodora* H.B.K.

Mohammadi A.¹, Ebrahimzadeh H.¹, Hadian J.² and Mirmasoumi M.¹

¹Plant Biology Dept. and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms in Iran, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

²Agriculture Dept., Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The application of medicinal plants for the treatment diseases in humans have a long history. It is estimated that more than 10% of the thousands of plant species known to have medicinal uses. Drought causes plants osmotic imbalance and inhibits plant growth and productivity. The aim of this study was to investigate the effect of drought on some biochemical and physiological trait of *Lippia citriodora* genus of verbenaceae family. Drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) with different concentrations, 0%, 5%, 10%, 20% and 25%. Result showed that FW (Fresh Weight) and RWC (Relative Water Contents) decreased significantly under drought stress in comparison to control. Root length not show significant changes under drought stress. At low levels of PEG Pigment content under drought stress increased significantly while reduced significantly in high level of PEG. Under drought stress, protein, proline, MDA (malondialdehyd) and hydrogen peroxide (H₂O₂) contents have been increased significantly. The antioxidant enzyme activity increased under drought stress when compared with control plants. Under drought stress Decreases in some parameter such as FW and RWC indicative sensitivity of this plant to stress on the other hand it responses to stress by increases in some compounds such as prolin, H₂O₂ and also increases in antioxidant enzyme activity.

Key words: *Lippia citriodora*, protein, proline, MDA and H₂O₂