DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6

مقاله پژوهشی

اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و میزان آرتمیزینین گیاه درمنه دشتی (*Artemisia sieberi*)

ندا عباسی[۱]، اصغر میرزائی اصل[۱*] و لیلا خدائی[۲]

[۱] ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، گروه بیوتکنولوژی

[۲] ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۶

چکیده

تنش خشکی میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را در طیف گسترده‌ای از گیاهان افزایش می‌دهد و این ترکیبات در شرایط تنش در گیاه تجمع می‌یابند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی، نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در گیاهان دارند. آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون است که در برخی گونه‌های درمنه تولید می‌شود و یکی از موثرترین داروها برای مقابله با عامل بیماری مالاریا است. این پژوهش به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و میزان آرتمیزینین در گیاه درمنه دشتی صورت گرفت. این آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با ۴ تیمار رژیم آبیاری (شاهد، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی) در گلخانه اعمال شد. تنش خشکی دوره‌ای به مدت ۸ هفته انجام گرفت. تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم-های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، سوپر اکسیددیسموتاز و کاتالاز شد. بالاترین میزان فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار خشکی ۳۰ درصد ظرفیت زراعی بدست آمد. مقدار آرتمیزینین بین سطوح تنش خشکی و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش همه متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات با خواص دارویی نظیر آرتمیزینین نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و آرتمیزینین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۸۰۰۷۶۹، پست الکترونیکی: a.mirzaie@basu.ac.ir

مقدمه

درمنه گیاهی چند ساله از خانواده کاسنی یا گل ستاره‌ای (Astraceae) است که در نقاط مختلف کره‌ی زمین پراکنده-است. درمنه دشتی بوته‌ای به رنگ سبز متمایل به خاکستری، عمودی، با ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی متر است که در مناطق نیمه بیابانی انتشار یافته است (۵). این گیاه دارای اسانس‌های فرار و مواد موثره مانند آرتمیزیا کتون، کامفور، ۱-۸سینول، کامفن، آلفاپینن، سانتونین و موارد دیگر می‌باشد. این گیاه دارای فعالیت ضد میکروبی، ضد انگل، ضد سرفه، ضد اسپام ، ضد قارچی و هم چنین خواص آنتی اکسیدانی می‌باشد (۸).

آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون است که در گونه‌های مختلف درمنه تولید می‌شود(۲۱). این متابولیت ثانویه یکی از موثرترین داروها برای مقابله با عامل بیماری مالاریا در جهان است. علاوه بر این، از این ترکیب برای درمان هپاتیت B، سرطان‌های مختلف و شیستوزومیازیس نیز استفاده می‌شود (۳۳).

گیاهان طی دوران رشد خود با تنش‌های متعدد محیطی مواجه می‌شوند. هر یک از این تنش‌ها می‌توانند با توجه به میزان حساسیت و مرحله رشد گونه گیاهی اثرهای متفاوتی بر رشد، متابولیسم و عملکرد گیاهان داشته باشند (۱). تنش خشکی یکی از تنش‌های اصلی است که در اکثر مراحل رشد گیاهان ، تأثیر گذاشته و دستیابی به نتیجه مطلوب را

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6
مقاله پژوهشی

دشوار می‌سازد. اصطلاح خشکی به شرایطی اطلاق می‌شود که در نتیجه آن رطوبت موجود در خاک به نقطه‌ای می‌رسد که گیاه قادر به جذب آب با سرعت کافی برای جبران تعرق نباشد (۲۹). تنش خشکی علاوه بر کاهش رشد رویشی و تغییر در ساختارهای بیرونی گیاه از طریق ایجاد تنش‌های ثانویه مانند تنش اکسیداتیو سبب در تغییر در مسیرهای سنتز ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه می‌شود (۱۲). یکی ازتغییرات بیوشیمیایی گیاهان در شرایط خشکی، تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) مانند رادیکال سوپر اکسید، پراکسیدهیدروژن و رادیکال هیدروکسیل است که می‌تواند باعث ایجاد تنش اکسیداتیو شود. تنش اکسیداتیو به پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه می‌زند و باعث دناتوره شدن پروتئین‌ها، موتاسیون DNA و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. گیاهان از سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی مختلف برای مقابله با این صدمات استفاده می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیدازها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی مانند کارتنوئید، توکوفرول، آسکوربات و گلوتاتیون از جمله ترکیباتی هستند که در برابر اثرات منفی رادیکال‌های اکسیژن از سلول‌های گیاه محافظت می‌کنند (۱۱).

متابولیت‌های ثانویه نقش بسیار مهمی در سازگاری گیاهان به تغییرات محیطی در شرایط تنش دارند. در واقع اندام‌های گیاهی از متابولیت‌های ثانویه به عنوان ابزاری برای فائق آمدن بر تنش استفاده می‌کنند (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که تنش خشکی میزان تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه را در اغلب گیاهان افزایش می‌دهد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و همچنین بر میزان آرتمیزینین در گیاه درمنه دشتی انجام گرفت.

مواد و روشها

این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ در گلخانه دانشکده کشاورزی وآزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه بوعلی سینا همدان، انجام گرفت. بذر گیاهان از موسسه پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. کاشت گیاهان در اسفند ماه ۱۳۹۵ درگلخانه در گلدان‌های شش کیلویی و حاوی خاک، ماسه وکود دامی با نسبت ۱:۱:۱ انجام شد. گیاهان تا اردیبهشت ماه در گلخانه نگهداری شدند وبرای اعمال تیمارها از اردیبهشت تا مهر به فضای آزاد منتقل گردیدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی درچهار تیمار و سه تکرار انجام شد. اعمال تیمارها از دوم مردادماه شروع و به مدت هشت هفته انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل: شاهد بدون تنش، آبیاری با ۷۰ درصد ظرفیت زراعی، ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و۳۰ درصدظرفیت زراعی صورت گرفت. تنش خشکی دوره‌ای به مدت ۸ هفته انجام شد و گیاهان شاهد هر روز آبیاری گردید. برای اعمال تیمارهای رطوبتی از روش وزنی (۱۲) استفاده شد. به منظور تعیین درصد رطوبت، نمونه‌ای از خاک در آون در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و وزن ذرات جامد خاک ریخته شده درگلدان‌ها تعیین وجرم مخصوص ظاهری آن‌ها محاسبه شد. در نهایت تیمارهای خشکی بر گیاه‌های مورد نظر اعمال گردید. برای تعیین وزن گلدان در هریک از سطوح تنش به ترتیب زیر عمل شد. قبل از شروع از اعمال تنش، میزان رطوبت نمونه خاک در ظرفیت زراعی مزرعه (FC) و نقطه‌ی پژمردگی دائم (PWP)، با استفاده از نرم افزار Retc (نسخه ۶/۰۲) تعیین شد. سپس رطوبت وزنی نمونه خاک با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$Q_m = \frac{W_{s+w} - W_s}{W_s}$$ رابطه (۱)

در این رابطه Q_m = رطوبت وزنی خاک، Ws = وزن خشک نمونه و Ws+w= وزن تر نمونه می باشد. وزن خاک خشک هر گلدان (Ws) با کمک رابطه ۲ محاسبه شد.

$$W_s = \frac{W_{s+w}}{Q_m + 1}$$ رابطه (۲)

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6
مقاله پژوهشی

سپس آب قابل دسترس (AW) از تفاضل رطوبت وزنی خاک درظرفیت زراعی مزرعه و رطوبت وزنی خاک در نقطه پژمردگی دائم بدست آمد (رابطه ۳).

رابطه (۳)

رطوبت وزنی نمونه خاکPWP - رطوبت وزنی نمونه AW= FC

در ادامه برای تعیین رطوبت قابل دسترس در هر یک از سطوح تنش از رابطه ۴ استفاده شد.

$$T_a = PWP + (a \times AW) \qquad \text{رابطه (۴)}$$

در این رابطه ضریب a معادل سطح تنش مورد نظر، T_a رطوبت قابل دسترس در هر یک از سطوح تنش می‌باشد. رابطه (۵) برای محاسبه‌ی وزن خاک مرطوب گلدان در هریک از سطوح تنش مورد استفاده قرار گرفت.

$$TSW_a = W_s \times (Q_m + 1) \qquad \text{رابطه (۵)}$$

در رابطه ی فوق، TSW_a معادل وزن خاک مرطوب گلدان در سطح تنش رطوبتی a می‌باشد. در انتها وزن نهایی گلدان برای هریک از تنش های رطوبتی، از رابطه (۶) محاسبه شد.

رابطه (۶)

$$CAT\ activity = \frac{|A_{240}(t_2) - A_{240}(t_1)|}{t_2 - t_1} \times \frac{V_t}{E \times V_s}$$

که در آن: t_1 و t_2 به ترتیب، ابتدا و انتهای بازه زمانی مورد بررسی (بر حسب ثانیه)، $A_{240}(t_1)$ و $A_{240}(t_2)$ به ترتیب،مقادیر جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر در زمان‌های t_1 و t_2، V_t حجم نهایی محلول واکنش (بر حسب میلی‌لیتر)، V_s حجم عصاره آنزیمی مورد استفاده (بر حسب میلی‌لیتر) و E ضریب تجزیه H_2O_2 (عدد ثابت ۰/۰۳۶ میلی مولار بر سانتی متر) می‌باشد. لازم به ذکر است که فاصله دو نقطه در قسمت خطی منحنی جذب نور (t_1 و t_2) طول بازه زمانی مورد بررسی در نظر گرفته شد.

به تیمار $FSW_a =$

در رابطه (۶) FSW_a برابر وزن نهایی گلدان در سطح رطوبتی a می‌باشد.

در پایان دوره اعمال تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و میزان آرتمیزینین اندازه‌گیری شد.

برای عصاره‌گیری ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه تر برگ به همراه پنج میلی‌لیتر متانول ۸۵ درصد در هاون له شد. سپس عصاره به مدت یک ساعت در شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد و ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی جدا شد و برای فاز زیرین (باقی مانده) همان مراحل قبلی تکرار شد و به عنوان عصاره برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز مورد استفاده قرار گرفت (۹).

اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش برگمیر انجام گرفت (۱۰). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، با استفاده از ضریب جذب آب اکسیژنه (۰/۰۳۶ میلی مولار بر سانتی متر) در طول موج ۲۴۰ نانومتر و برحسب واحد در گرم برگ تازه طبق رابطه (۹) محاسبه گردید. هر یک واحد فعالیت آنزیم کاتالاز مقداری از آنزیم است که موجب تجزیه یک میکرومول آب اکسیژنه در هر دقیقه می‌شود.

رابطه (۷)

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز طبق روش ناکانو و آسادا انجام گرفت (۲۶). به دنبال اکسید شدن آسکوربات با شروع واکنش آنزیمی کاهش جذب در طول ۲۹۰ نانومتر، دو دقیقه پس از شروع واکنش محاسبه شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر (۲/۸ میلی مولار بر سانتی متر) بر حسب واحد در گرم وزن تازه برگ طبق رابطه (۷) محاسبه شد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6
مقاله پژوهشی

فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر اساس روش هرزوگ و فهیمی اندازه‌گیری شد (۱۷) و سپس میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب جذب آب اکسیژنه (۲۶/۶ میلی مولار بر سانتی متر) و بر حسب واحد در گرم برگ تازه محاسبه گردید (رابطه ۸). هر یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مقداری از آنزیم است که موجب اکسیده شدن یک میکرومول گایاکول در هر دقیقه می‌شود.

رابطه (۸)

$$Per\ activity = \frac{|A_{470}(t_2) - A_{470}(t_1)|}{t_2 - t_1} \times \frac{V_t}{E \times V_s}$$

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): برای سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از روش جیانوپلیتیس و ریس استفاده گردید (۱۶). مخلوط واکنش شامل: ۲/۵ میلی لیتر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۷ ، ۰/۲ میلی لیتر میتونین۱۳ میلی مولار، ۰/۱ میلی لیتر نیترو بلوتترازلیوم ۷۵ میکرو مولار، ۰/۱ میلی لیتر ریبو فلاوین ۲ میکرو مولار، ۰/۵ میلی لیتر عصاره آنزیمی بود. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور قرار داده شدند و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفومتر خوانده‌شد. در این آزمایش دو نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت که هر دو فاقد عصاره آنزیمی بودند. نمونه اول بدون دریافت نور و نمونه دوم ۱۵ دقیقه در مقابل نور قرار گرفت. زیرا به دلیل عدم وجود آنزیم، احیای نیترو بلوتترازلیوم در حضور نور به طور ۱۰۰ درصد، انجام می‌گیرد.

تعیین مقدار آرتمیزینین: برای تعیین غلظت آرتمیزینین از دستگاه HPLC (مدل KNAUER) استفاده شد. این دستگاه مجهز به تشخیص دهندهUV با طول موج ۲۱۰ نانومتر، ستون C18 دارای اندازه ذرات ۵ میکرومتر، قطر۴/۶ میلی متر بود. فاز متحرک شامل استونیتریل و اسید استیک یک درصد به نسبت (۶۰:۴۰) و با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه بود.

استخراج آرتمیزینین برای HPLC به روش پو و همکاران با کمی تغییر انجام شد (۲۸). مقدار ۱۰۰ میلی گرم از برگ خشک پودر شده و ۲۰ میلی لیتر پترولیوم اتر به آن اضافه شد و مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه تحت اولتراسونیک قرارداده شد. سپس این مخلوط با استفاده از کاغذ واتمن از فیلتر عبور داده‌شد. مخلوط بدست آمده تا تبخیر شدن پترولیوم اتر در یک ظرف شیشه‌ای نگهداری شد. باقی مانده در پنج میلی لیتر استونیتریل حل و از فیلتر ۰/۴۵ میکرو مولار عبور داده‌شد و برای تزریق به HPLC استفاده گردید. استاندارد آرتمیزینین از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد وغلظت‌های ۲۰۰ppm، ۴۰۰ppm، ۶۰۰ppm و۱۰۰۰ppm تهیه و۲۰ میکرو مولار به دستگاه تزریق شد.

ابتدا آزمون نرمالیته روی تمامی داده‌ها بدست آمده، انجام گردید و تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۲) و مقایسه میانگین به روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی: تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در سطح ۰/۰۱ تاثیر معنی‌دار نشان داد (جدول ۱).

تنش خشکی موجب افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز شد. بیشترین فعالیت این آنزیم در آبیاری با ۳۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد، در حالی که در آبیاری ۷۰ درصد ظرفیت زراعی تفاوت معنی داری با شاهد نداشت. در تنش شدید آبیاری با ۳۰ درصد ظرفیت زراعی میزان آسکوربات پراکسیداز بیش از دو برابر میزان آن در تنش متوسط ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بود.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6

مقاله پژوهشی

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر تنش خشکی برفعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه درمنه دشتی

تیمار	آسکوربات پراکسیداز (واحد/ میلی گرم)	پراکسیداز (واحد/ میلی گرم)	سوپر اکسید دیسموتاز (واحد/ میلی گرم)	کاتالاز (واحد/ میلی گرم)
شاهد	۰/۰۲^{c}	۰/۰۲^{c}	۱/۱۲۱^{d}	۰/۱۱۱^{b}
ظرفیت زراعی ۷۰٪	۰/۰۵^{c}	۰/۰۷^{bc}	۲/۶۷^{c}	۰/۱۱۸^{b}
ظرفیت زراعی ۵۰٪	۰/۱۰^{b}	۰/۱۳^{b}	۳/۲۵^{b}	۰/۱۷۴^{a}
ظرفیت زراعی ۳۰٪	۰/۲۱^{a}	۰/۳^{a}	۳/۶۶^{a}	۰/۱۷۱^{a}

حروف مشابه در هر ستون و گروه تیماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد. واحد/میلی گرم: واحد آنزیمی در میلی گرم برگ تر

اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح یک درصد نیز معنی‌دار شد. مقایسه میانگین تیمارها طبق جدول ۱ نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش آنزیم پراکسیداز شده است و با افزایش شدت تنش نیز میزان فعالیت آنزیم افزایش یافته است.

اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). تنش خشکی موجب افزایش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شده است و با افزایش شدت تنش میزان این آنزیم نیز افزایش یافته است.

نتایج نشان داد که تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را نیز افزایش داده‌است. میزان فعالیت این آنزیم در تنش شدید و متوسط معنی دار نبود.

اثر تنش خشکی بر میزان آرتمیزینین

اندازه گیری میزان آرتمیزینین گیاه درمنه دشتی با روش کروماتوگرافی با کارایی بالا در تیمارهای مختلف رژیم آبیاری انجام شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش آرتمیزینین در گیاه درمنه دشتی نشده است. مقایسه میانگین داده‌ها در جدول۲ آمده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تنش خشکی بر آتمیزینین در گیاه درمنه دشتی

تیمار	آرتمیزینین (میکرو گرم بر میلی لیتر)
شاهد	۸/۶۳^{a}
ظرفیت زراعی ۷۰٪	۹/۵۱^{a}
ظرفیت زراعی ۵۰٪	۷/۷۳^{a}
ظرفیت زراعی ۳۰٪	۱۳/۲۷^{a}

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش، تنش خشکی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی شامل آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز گردید. آسکوربات پراکسیداز با عمل احیاکنندگی خود بر روی رادیکال‌های آزاد و به خصوص پراکسید هیدروژن خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کم ترین مقدار می‌رساند. سیستم اصلی برای سم‌زادیی پراکسید هیدروژن در کلروپلاست گیاه توسط چرخه آسکوربات-گلوتاتیون اتفاق می‌افتد که در آن، آسکوربات پراکسیداز یک آنزیم کلیدی محسوب می‌شود. آنزیم آسکوربات پراکسیداز با بهره‌گیری از آسکوربات به عنوان دهنده خاص الکترون، تبدیل پراکسید هیدروژن به آب را کاتالیز می‌کند. این آنزیم در کلروپلاست، سیتوزول، میتوکندری و پراکسی‌زوم نقش مهار کردن گونه‌های فعال اکسیژن را بازی می‌کند (۷). افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز تحت تنش متوسط و شدید در استولون و برگهای گیاه شیرین بیان گزارش شده است (۲۷). در پژوهشی که توسط نجف آبادی و احسان نژاد انجام شد، افزایش بیان

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6
مقاله پژوهشی

این آنزیم در گیاه کنجد تحت تنش خشکی گزارش گردید (۲۵).

آنزیم پراکسیداز در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن به منظور جلوگیری از آسیب بیش از حد غشای پلاسمایی فعال است. مالون دی آلدئید یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپدهای غشایی است و در اثر آسیب گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود (۱۸). پراکسیداز نقش اصلی در حذف پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و مالون دی آلدئید دارد و در نتیجه باعث حفظ یکپارچگی ساختار غشای سلولی می شود. در این پژوهش، تنش خشکی موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده است. مشخص شده است که در گیاه بامیه (۲) و گیاه شیرین بیان (۲۷) نیز تنش خشکی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به گیاه شاهد شده است. اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت انزیم پراکسیداز درنمونه‌های بذری دوگونه مختلف بابونه کاذب و بابونه زرد نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر سه نمونه بذری بابونه کاذب در تنش شدید (۳۵٪ ظرفیت زراعی) شده است، اما در بابونه زرد میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تنش خشکی متوسط (۵۵٪ ظرفیت زراعی) افزایش پیدا کرده‌است (۳).

تنش خشکی موجب افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز شد. آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز نقش عمده‌ای در محافظت سلول علیه تنش اکسیداتیو بر عهده دارند، زیرا آن‌ها رادیکال سوپر اکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کنند. افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز می‌تواند به دلیل افزایش رادیکال سوپر اکسید و یا یک مکانیسم دفاعی علیه تنش اکسیداتیو در گیاهان باشد (۲۹). افزایش فعالیت این آنزیم در برنج (۲۳)، گیاه دارویی خرفه (۱۹) و کنجد (۲۵) نیز گزارش شده‌است.

تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را نیز افزایش داده‌است. آنزیم کاتالاز از دسته پروتئین‌های آهن دار محسوب می‌شود. در سلول‌های گیاهی و جانوری، زمانی که مقدار پراکسید هیدروژن در محیط زیاد باشد، این آنزیم وارد عمل می‌شود. فعالیت کاتالاز برای رفع سمیت پراکسید هیدروژن در پراکسی‌زوم توسط اکسیدازها در اکسیداسیون اسیدهای چرب و کاتابولیسم پورین نقش دارد. ادروا و همکاران بیان کردند که کاتالاز سلول‌ها را از اثرات پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند. کاتالاز پراکسید هیدروژن را به آب واکسیژن تبدیل می‌کند(۱۴). افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر تنش خشکی در گیاه داروئی گل گاوزبان (۴) و گیاه داروئی خار مریم (۳۴) گزارش شده‌است. همچنین افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر تنش خشکی روی دو گونه زیتی میخک (۳۱) مشاهده شده است که با نتایج حاضر مطابقت دارد. این در حالی است که در گیاه شیرین بیان میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در استولون و برگ‌ها کاهش بیش از دو برابری داشته است (۲۷). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی یک واکنش طبیعی معمول گیاهان به تنش خشکی گزارش شده است (۱۵). طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش ، با وجود اینکه تنش شدید خشکی باعث افزایش بیش از ۱۰ برابری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و افزایش بیش از سه برابری سوپر اکسید دیسموتاز در مقایسه با شاهد شده است، اما افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز به افزایش دو برابری نیز نمی‌رسد. فعالیت کاتالاز برای رفع سمیت پراکسید هیدروژن است و یک مولکول کاتالاز می‌تواند در یک دقیقه ۶ میلیون H_2O_2 را به آب و اکسیژن مولکولی تبدیل کند (۱۴). شاید عدم افزایش چشمگیر کاتالاز به قدرت فعالیت مولکول‌های این آنزیم مربوط باشد.

گیاه در شرایط آبیاری دوره‌ای با ۷۰ درصد ظرفیت زراعی با تنش خشکی مواجه نمی‌گردد. در نتایج بدست آمده برای آنزیم‌های آنتی اکسیدانی آسکوربات پراکسیداز،

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6
مقاله پژوهشی

پراکسیداز و کاتالاز تفاوت معنی‌داری با شاهد، مشاهده نشد (جدول ۱)، در حالی که از نظر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز این تیمار تفاوت معنی‌داری با شاهد دارد. این نتایج نشان داد که احتمالا فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، به میزان رطوبت در دسترس گیاه حساس است.

طبق نتایج پژوهش حاضر، تنش خشکی موجب افزایش یا کاهش آرتمیزینین در درمنه دشتی نشد. سونی و آبدین اثر تنش اکسیداتیو ناشی از کمبود آب را بر میزان آرتمیزینین گیاه *Artemisia annua* L. بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که تنش خشکی مقدار آرتمیزینین را در این گیاه کاهش می‌دهد (۳۰). یاداو و همکاران معتقدند تنش طولانی مدت بر میزان آرتمیزینین *Artemisia annua* L. تاثیر منفی دارد (۳۵). در حالیکه مطالعه دیگری افزایش محتوای آرتمیزینین در شرایط کمبود آب را نشان می‌دهد. مارخس و همکاران تنش خشکی ۳۸ و ۶۲ ساعت را بر میزان آرتمیزینین برگ *Artemisia annua* L بررسی کردند. فقط تنش ۳۸ ساعته باعث افزایش محتوای آرتمیزینین کل گیاه و برگ شد(۲۴). نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد تنش شوری متوسط می‌تواند باعث افزایش میزان آرتمیزینین *Artemisia annua* L شود (۶).

دربسیاری از پژوهش‌ها، تنش خشکی موجب افزایش متابولیت‌های ثانویه شده‌است. متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در سازگاری گیاهان به تغییرات محیطی در شرایط تنش دارند (۱۳). بتیاب و همکاران گزارش کردند که تنش خشکی سبب افزایش اسانس‌های مانند کامفور، ۱و۸ سینئول و آلفا توجین در گیاه مریم گلی شده‌است (۱۱). همچنین در گزارشی دیگر که بر روی گونه‌ی دیگر از مریم گلی انجام شد نشان دادکه تنش خشکی سبب افزایش رزماریک اسید شده‌است (۲۲). اثر تنش خشکی بر روی گیاه تشنه داری از خانواده میمون، باعث افزایش گلیکوزیدهای مهم شده‌است (۳۲). تنش خشکی باعث افزایش بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی تری‌ترپنوئیدها در گیاه شیرین بیان و افزایش میزان گلیسیریزین در شرایط تنش شدید می‌شود (۲۷). با این حال، گزارش‌هایی نیز مبنی بر عدم تاثیر تنش خشکی بر میزان متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. خراسانی‌نژاد و همکاران در تحقیقی که بر روی نعناع فلفلی انجام شده بود، نشان دادند که تنش خشکی باعث کاهش میزان منتول و منتول فوران شده بود (۲۰). تنش خشکی، میزان متابولیت‌های ثانویه را در بیشتر گیاهان افزایش می‌دهد اما به نظر می‌رسد برخی از متابولیت‌های ثانویه نقشی در سازگاری گیاه به شرایط خشکی ندارند.

در این پژوهش، با اعمال تنش خشکی دوره ای میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش دوره‌ای متوسط و شدید در گیاه درمنه دشتی افزایش یافت. در برخی گیاهان دارویی مشخص شده است که اعمال تنش خشکی پایان دوره، پیش از برداشت محصول و یا تنش دوره ای می‌تواند میزان متابولیت‌های ثانویه را افزایش دهد، اما در این تحقیق مشخص شد که تنش خشکی بر افزایش یا کاهش تولید ماده‌ی آرتمیزینین موثر نیست. نتایج این تحقیق می تواند در شناخت مکانیسم مقاومت به تنش خشکی کمک نماید.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر حسین بیات عضو هیات علمی گروه خاکشناسی دانشگاه بوعلی سینا به خاطر راهنمایی ارزنده در نحوه اجرای تنش خشکی، صمیمانه قدردانی می‌شود.

منابع

۱. آرزمجو، ا.، حیدری، م.، قنبری، ا.، سیاه سر، ب. و احمدیان، ا. (۱۳۸۹). تاثیر سه نوع کود بر درصد اسانس، رنگدانه های فتوسنتزی و تنظیم کننده های اسمزی در بابونه تحت تنش خشکی. مجله تنش های محیطی در علوم زراعی. ۳ (۱): ۳۳-۲۳.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6

مقاله پژوهشی

۲. باقی زاده، ا.، حاج محمدرضایی، م. و توحیدی، ز. (۱۳۹۹). بررسی اثر متقابل تنش خشکی با آسکوربات وسالیسیلیک اسید برفعالیت برخی آنزیمهای آنتی اکسیدان و فلاونوئیدها در گیاه بامیه (*Hibiscus esculentus* L.). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی(مجله زیست شناسی ایران). ۳۳(۱):۱۴۲-۱۵۲.

۳. صالحی شانجانی، پ.، ایزدپناه، م.، فلاح، ل.، رمضانی یگانه، م.، رسول زاده، ل.، کاوندی، آ.، سردابی، ف.، پهلوانی، م.، امیرخانی، م. و سیدیان، س. (۱۳۹۴). مقایسه اثر تنش خشکی بر تنظیم اسمزی، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پیگمان‌ها در نمونه‌های بذری مختلف بابونه کاذب و بابونه زرد (*Anthemis tinctoria*) و (*Tripleurospermum servanes*) بانک ژن منابع طبیعی ایران. مجله پژوهشهای گیاهی(مجله زیست شناسی ایران) ۲۸(۱):۱۳۹-۱۲۶.

۴. قلی نژاد، ر.، سیروس‌مهر، ع. و فاخری، ب. (۱۳۹۳). تأثیرتنش خشکی و کودهای آلی بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، رنگدانه‌های فتوسنتزی، پرولین و عملکرد گاوزبان (*Borago officinalis*). نشریه علوم باغبانی. ۲۸(۳): ۳۳۸-۳۴۶.

۵. مرشدی، ع.، دشتی رحمت آبادی، م.، دهقان هراتی، م.، باقری نسب، م.ع. و اسلامی، ا. (۱۳۹۰). بررسی اثر عصاره آبی- الکلی گیاه درمنه دشتی (*Artemisia sieberi* Besser) برکاهش درد نوروژنیک و التهابی در موش سوری. فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی. ۴(۴۰): ۴۸-۵۷.

6. Aftab T, M., Khan, M.M.A., Idrees, M., Naeem, M., Moinuddin, Hashmi, N. and Varshney, L. 2011. Enhancing the growth, photosynthetic capacity and artemisinin content in Artemisia annua L. by irradiated sodium alginate. Radiation Physics and Chemistry. 80(7): 833-836.

7. Basu, S., Roychoudhury, A., Saha, P. P. and Sengupta, D. N. 2010. Differential antioxidative responses of indica rice cultivars to drought stress. Plant Growth Regulation. 60(1): 51-59.

8. Behmanesh, B., Heshmati, G. A., Mazandarani, M., Rezaei, M. B., Ahmadi, A. R., Ghaemi, E. O. and Bakhshandeh Nosrat, S. 2007. Chemical composition and antibacterial activity from essential oil of *Artemisia sieberi* Besser *subsp. Sieberi* in North of Iran. Asian Journal of Plant Sciences. 6(3): 562-564.

9. Bedreag, C.F.G. Trifan, A., Bucur, L.A., Arcus, M., Tebrencu, C., Miron, A. and Costache, I.I. 2014. Chemical and antioxidant studies on *Crataegus pentagyna* leaves and flowers. Romanian Biotechnological Letters. 19(6): 9859.

10. Bergmeyer, H. U. 1955. Measurement of catalase activity. Biochemische Zeitschrift. 327(4): 255-258.

11. Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannes, W. A., Kchouk, M. E. and Marzouk, B. 2009. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. Scientia Horticultura. 120(2): 271-275.

12. Clarke, T. G. and Ferre, P. A. 2002. Methods of Soil Analysis, Part 4, Physical Method. Soil Science Society of America, Inc, Madison, Wisconsin, USA. 419-422.

13. De Herralde, F. 2000. Integral study of the eco physiological responses to water stress: Characterization of almond varieties. Nucis-Newsletter. 9: 20-21.

14. Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A., Aktaş, L. and Gesheva, E. 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. Gen Appl Plant Physiol. 34(1-2): 67-78.

15. Garratt, L. C., Janagoudar, B. S., Lowe, K. C., Anthony, P., Power, J. B. and Davey, M. R. 2002. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. Free Radical Biology and Medicine. 33(4): 502-511.

16. Giannopolitis, C. and S. Ries, 1997. Superoxid desmutase. I. Occurence in higher plant. Plant Physiol. 59: 309–314.

17. Herzog, V. and Fahimi, H. D. 1973. A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3, 3′-diaminobenzidine as hydrogen donor. Analytical Biochemistry. 55(2): 554-562.

18. Hojati, M., Modarres-Sanavy, S. A. M., Karimi, M. and Ghanati, F. 2011. Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. Acta physiologiae plantarum. 33(1): 105-112.

19. Jin, R., Wang, Y., Liu, R., Gou, J. and Chan, Z. 2016. Physiological and metabolic changes of purslane (*Portulaca oleracea* L.) in response to drought, heat, and combined stresses. Frontiers in plant science. 6: 1123. Journal of medicinal plants research.

20. Khorasaninejad, S., Mousavi, A., Soltanloo, H, Hemmati, K., Khalighi, A. 2011. The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). Journal of medicinal plants research. 5(22): 5360- 5365.

مقاله پژوهشی DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6

21. Klayman, D.L. 1985. Qinghaosu (Artemisinin) - an Antimalarial Drug from China. Science.228 (4703): 1049-1055.

22. Liu, H., Wang, X., Wang, D., Zou, Z. and Liang, Z. 2011. Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza Bunge*. Industrial Crops and Products. 33(1): 84-88.

23. Lum, M. S., Hanafi, M. M., Rafii, Y. M. and Akmar, A. S. N. 2014. Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. Journal of Animal and Plant Sciences. 24(5): 1487-1493.

24. Marchese, J.A., Ferreira, J.F.S., Rehder, V.I.G. and Osmar, R. 2010. Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*A. annua* L., Asteraceae). Brazilian journal of plant physiology. 22: 1-9.

25. Najafabadi Yosefzadeh, M. and Ehsanzadeh, P. 2017. Photosynthetic and antioxidative upregulation in drought-stressed sesame *(Sesamum indicum* L.*)* subjected to foliar-applied salicylic acid. Photosynthetica. 55(4): 611-622.

26. Nakano, Y. and Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant and cell physiology. 28(1): 131-140.

27. Nasrollahi, V., Mirzaie-Asl, A., Khodaei, L. and Jamalian, S. 2016. The Effect of Drought Stress on the Activity of Antioxidant Enzymes of *Glycyrrhiza glabra*. Journal of Functional and Environmental Botany. 6(1): 16-23.

28. Pu, G. B., Ma, D. M., Chen, J. L., Ma, L. Q., Wang, H., Li, G. F. and Liu, B. Y. 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant cell reports. 28(7): 1127-1135.

29. Sharma, P., and Dubey, R. S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant growth regulation. 46(3): 209-221.

30. Soni, P. and Abdin M.Z. 2017. Water deficit□induced oxidative stress affects artemisinin content and expression of proline metabolic genes in *Artemisia annua* L. FEBS Open Bio. 7:367-381.

31. Toscano, S., Farieri, E., Ferrante, A., and Romano, D. 2016. Physiological and biochemical responses in two ornamental shrubs to drought stress. Frontiers in plant science. 7: 645.

32. Wang, D. H., Du, F., Liu, H. Y., and Liang, Z. S. 2010. Drought stress increases iridoid glycosides biosynthesis in the roots of *Scrophularia ningpoensis* seedlings. Journal of Medicinal Plants Research. 4(24):2691-2699.

33. Weathers, P.J., Elkholy, S. and Wobbe, K.K. 2006. Artemisinin: the biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant, 42(4): 309-317.

34. Zahir, A., Abbasi, B. H., Adil, M., Anjum, S. and Zia, M. 2014. Synergistic effects of drought stress and photoperiods on phenology and secondary metabolism of *Silybum marianum*. Applied biochemistry and biotechnology. 174(2): 693-707.

35. Yadav R.K., Sangwan R.S., Sabir F., Srivastava A.K. and Sangwan N.S. 2014. Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *A. annua* L. Plant Physioly and Biochemistry. 74: 70–83.

مقاله پژوهشی DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.10.6

The effect of drought stress on antioxidant enzymes activity and artemisinin content in wormwood (*Artemisia siberi*)

Abbasi N.[1], Mirzaie-asl A.[1]* and Khodaei L.[2]

[1] **Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran**

[2] **Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Tehtan, I.R. of Iran**

Abstract

Drought stress increases production of secondary metabolites in wide ranges of plants and accumulation of these components usually occurs under stress. Secondary metabolites are natural compounds produced by plants that play different physiological roles in plants. Artemisinin is a sesquiterpene lactone, produces by some of *Artemisia* species. *This secondary metabolite* is one of the most important antimalarial drugs. This study was conducted to investigate the effect of drought stress on antioxidant enzymes activity and artimisinin content in *Artemisia siberi*. The experiment was carried out in a completely randomized design in greenhouse with four treatments of irrigation regime (control, 70, 50 and 30 percent of field capacity. intermittent drought stress was performed for 8 weeks. Drought stress caused increased the antioxidant activity of ascorbate peroxidase, peroxidase, superoxide dismutase and catalase. Highest activity for these enzymes was observed at 30% of field capacity. The amount of artemisinin were not significantly different between drought treatments and control. The results showed that drought stress does not always increase secondary metabolites and medicinal compounds such as artemisinin.

Key words: Water stress, Antioxidant enzymes and Artemisinin