# بررسی پاسخ های دفاعی گیاهچه های آویشن (*Thymus vulgaris* L.) تحت تنش خشکی در شرایط این ویترو

رویا رضوی زاده[۱*]، فاطمه ادب آوازه[۲]، اکرم قادری سامانی[۳]

تاریخ دریافت:۹۶/۵/۹
تاریخ تصویب:۹۶/۷/۲۲

چکیده

***آویشن (Thymus vulgaris) گیاهی از تیره نعناعیان، دارای خواص متعدد دارویی، آنتی اکسیدانی و تغذیه ای است. رشد، تولیدات گیاهی و فعالیت های آنتی اکسیدانی گیاه تحت تأثیر بسیاری از عوامل محیطی از جمله خشکی تغییر می یابد. از اینرو، آزمایشی به منظور بررسی تأثیرات تنش خشکی بر رشد، انباشت متابولیت های سازگار و فعالیت های آنتی اکسیدانی گیاه آویشن، به صورت کنترل شده تحت شرایط کشت درون شیشه ای انجام گرفت. گیاهچه های آویشن به مدت ۱۴ روز در محیط کشت MS شامل غلظت های ۰، ۲ و ۴٪ مانیتول و سوربیتول به طور جداگانه، کشت داده شدند. سوربیتول و مانیتول هر دو باعث کاهش معنی دار پارامترهای رشد، رنگیزه های فتوسنتزی، افزایش محتوای پروتئین، متابولیت های ثانویه و افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز شدند. در مقایسه با شاهد، هر دو تیمار باعث کاهش در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شدند در حالیکه بین شاهد و تیمار ۲٪ تفاوت معنی داری مشاهده نشد. همچنین نتایج نشان داد که انباشت متابولیت های سازگار، پرولین و محتوای قندهای احیاکننده موجود در برگ و ریشه، با افزایش غلظت***

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
(نویسنده مسئول: razavi.roya@gmail.com )
۲ -دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور نجف آباد، اصفهان

***عوامل تنش زا در محیط به‌طور معنی داری افزایش پیدا کرد. افزایش اسمولیت هایی سازگار، متابولیت های ثانویه و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت را می توان واکنش های تدافعی این گیاه در مقابل تنش خشکی در نظرگرفت.***

***واژه های کلیدی: آنزیم های آنتی اکسیدانت، آویشن، پارامترهای فیزیولوژیکی، تنش خشکی، متابولیت های ثانویه***

**مقدمه**

آویشن (*Thymus vulgaris* L.) یک گیاه چند ساله از تیره نعناعیان و بومی مدیترانه است که به صورت بوته های پر پشت در دامنه های خشک و بین تخته سنگ های نواحی مختلف می روید (Gigord et al., 1999). از آویشن در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده متنوعی می شود. روغن آویشن دارای خواصی نظیر ضد اسپاسم، بادشکن، ضد قارچ، ضد عفونی کننده، ضد کرم، ضد رماتیسم و خلط آور می باشد. اسانس آویشن از جمله دو اسانس معروف است که دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی، آنتی اکسیدان، نگهدارنده طبیعی غذا و تاخیر دهنده پیری در پستانداران می باشد و جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد (James et al., 1992). این گونه ارزشمند دارویی در کشور ما به صورت خودرو مشاهده نشده و همه ساله در ایران کشت می شود و سطح زیر کشت این گونه نیز رو به افزایش است. از آنجا که کشور ایران به عنوان کشوری واقع در ناحیه‌ی خشک و نیمه خشک دنیا در سال های اخیر، با بحران جدی خشکسالی مواجه بوده‌و خسارت زیادی‌را در تولید محصولات زراعی و دارویی متحمل شده‌است، لذا گسترش کشت آویشن در بسیاری از مناطق کشور با کمبود آب مواجه می باشد. بنابراین واکنش گیاه به تنش آب مسأله مهمی به شمار می آید.

خشکی یکی از تأثیرگذارترین تنش های غیرزنده محیطی است که رشد گیاه و بهره وری محصول را محدود می کند و همچنین گیاه را وادار به واکنش های مختلف مورفولوژیکی مانند کاهش سطح برگ، خاری شدن و خزان زودرس، فیزیولوژیکی و متابولیکی مانند بسته شدن روزنه ها، کاهش در سرعت رشد، تجمع آنتی اکسیدانت و مواد محلول و فعالیت ژن های خاص می کند (Hughes et al., 1989). پاسخ گیاهان به تنش خشکی بستگی به نوع، شدت و مدت تنش، مرحله وقوع تنش، همچنین گونه گیاهی، سن و مرحله نموی گیاه دارد. تنظیم اسمزی به عنوان جزئی مهم از مکانیزم‌های تحمل به خشکی در گیاهان مطرح است (Pagter et al., 2005). در پاسخ به تنش، ژن های خاصی بیان شده و آنزیم های لازم برای راه اندازی برخی مسیرهای متابولیک ساخته می شوند که در

نهایت سبب افزایش غلظت مواد محلول از جمله پرولین، قند، گلیسین بتائین در سلول ها می‌شود و شرایط برای حرکت آب به درون سلول‌ها و در نتیجه افزایش تورژسانس فراهم می گردد. همچنین سلول‌های گیاهی از مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدان برخوردار هستند که مقابل خسارت‌های اکسید اتیو مورد محافظت قرار می‌گیرند (Lima et al., 2002). حفاظت در برابر فتواکسیداسیون از طریق زدودن انرژی اضافی بوسیله سیستم‌های دفاعی غیرآنزیمی (کاروتنوئیدها، اسید آسکوربیک، آنتوسیانین، گلوتاتیون، توکوفرول و فلاونوئید) و یا از طریق افزایش تجزیه انواع اکسیژن فعال بوسیله سیستم‌های دفاعی آنزیمی (آنزیم‌های آنتی اکسید اتیوی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز، آسکوربیت پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز) صورت می‌گیرد (AL-Aghabary et al., 2004).

از اینرو، بررسی واکنش های فیزیولوژیک گیاهان دارویی به تنش خشکی در شناسایی مکانیسم های مؤثر در مقاومت به خشکی برای کاشت در مناطق کم آب ضروری به نظر می رسد و همچنین ارزیابی برای تحمل خشکی یک قدم اساسی برای بهبود گیاهی به شمار می رود. امروزه به دلیل اینکه بررسی مقاومت به خشکی از طریق روش های سنتی بسیار وقت گیر است از راهکارهای فناوری زیستی از جمله کشت بافت برای بررسی گیاهان مقاوم به خشکی و سایر عوامل نامساعد استفاده می شود (Larkin and Scowcroft, 1981). در شرایط کشت درون شیشه تولید متابولیت ثانویه تحت تأثیر عوامل محیطی مختلف نظیر اقلیم، آفات، بیماری های میکروبی، تنش های فصلی و جغرافیایی قرار نمی گیرد، رشد سلول ها را می توان به صورت خودکار کنترل کرد و فرآیند های متابولیکی را تنظیم نمود؛ فرآورده های مفید را می توان تحت شرایط کنترل شده تولید کرد و محصولات خالص تر و مطمئن تر به بازار عرضه نمود. همچنین کشت سلولی می تواند راهکار مناسبی برای گیاهانی باشد که طول دوره رشدی طولانی و غیر اقتصادی دارند، از طریق آن می توان گیاهان سریع الرشد متحمل به عوامل نامساعد محیطی مختلف از قبیل خشکی، شوری، درجه حرارت های پایین و بالا، عوامل بیماری زای گیاهی، فلزات سنگین و غیره را به دست آورد (Ghasemi and Ahmadi, 2010).

مانیتول و سوربیتول از جمله اسمولیت های غیر زیستی می باشند که در محیط کشت بافت استفاده می شوند و باعث القاء تعداد زیادی از ژن های وابسته به دفاع و افزایش برخی متابولیت های ثانویه می گردند. از آنجایی که این قندها به وسیله گیاهان متابولیزه نمی شوند، به عنوان عوامل ایجادکننده تنش اسمزی در کشت بافت گیاهی و در انتخاب گیاه مقاوم به خشکی استفاده می شوند (Hassanein and Dorion, 2006). استفاده از سوربیتول برای ایجاد تنش خشکی در شرایط کشت درون شیشه کالوس و گیاهچه زنیان با نتیجه مطلوبی همراه بوده است (Razavizadeh and Aadabavazeh, 2017). همچنین، در تحقیقات

دیگری از مانیتول به عنوان مادهی ایجادکننده تنش اسمزی در محیط کشت درون شیشه بر روی رشد و پاسخهای دفاعی *Mammillaria gracilis Pfeiff* (Balen et al., 2013) و رشد کال گیاه *Brassica juncea* (L.) *Czern*. (Gangopadhyay et al., 1997) استفاده شده است. نتایج تحقیقات نشان داد حضور عوامل ایجاد کننده تنش در محیط کشت می تواند واکنش های القاء کنند ه تحمل در بافت های گیاه را نمایان سازد.

با توجه به متأثر شدن گیاهان دارویی از تنش اسمزی محیط و تأثیر آن بر رشد و فیزیولوژی و متابولیت های ثانویه آن ها، در این تحقیق سعی بر آن شد با استفاده از سوربیتول و مانیتول به عنوان اسمولیت های ایجاد کننده تنش خشکی در محیط کشت بافت، تأثیر تنش بر شاخص های مختلف فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیولوژیکی گیاهچه های آویشن به عنوان یک گیاه ارزشمند دارویی مورد بررسی قرار گیرد.

**مواد و روش‌ها**

به منظور بررسی واکنش گیاه آویشن به خشکی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. بذرهای گیاه آویشن (F2) *T. vulgaris* از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. برای انجام تمام آزمایش ها در این پژوهش از محیط کشت (MS Murashige and Skoog,1962) اســتفاده گردید. سطوح مختلف تنش خشکی از طریق حل کردن مقادیر مشخصی از سوربیتول و مانیتول (۰، ۲، ٤ و ٦%) در محیط های کشت به طور جد اگانه ایجاد شد. سپس تعدادی بذر سالم پس از شستشوی سطحی با آب مقطر و استریل سازی با الکل ۷۰ درصد و آب ژاول ۲۵ درصد به محیط های کشت مورد نظر منتقل گردید. محیط های کشت حاوی بذرها در اتاق کشت با دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی، دمای $25\pm2^{\circ}C$،شدت نور ۱۹۰-۲s-µmolm و رطوبت ۹۸-۹۵% نگهداری شد. شمارش بذرهای جوانه زده در روزهای هفتم و دهم صورت گرفت. جهت بررسی تاثیر تنش خشکی بر رشد گیاهچه ها و شاخص های مختلف فیزیولوژیکی و بیولوژیکی، گیاهچه های ۲۱ روزه رشد یافته در محیط کشت پایه به محیط های کشت حاوی غلظت های مختلف سوربیتول و مانیتول (۰، ۲، ٤ و ٦%) منتقل گردید و به مدت ١٤ روز در اتاق کشت نگهد اری شدند. از آنجایی که اغلب گیاهچه های تحت تیمار ٦% نکروزه شدند، غلظت های ۰، ۲ و ٤% به عنوان غلظت های مؤثر جهت بررسی شاخص های مورفولوژیکی، میزان رنگیزه های فتوسنتزی، متابولیت های ثانویه، اسمولیت های سازگار، فعالیت آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز درگیاهچه های آویشن تحت تنش خشکی انتخاب گردیدند.

اندازه گیری طول و وزن تر ساقه و ریشه: اندازه گیری طول ساقه و ریشه گیاهچه آوییشن با

استفاده از خطکش میلی‌متری انجام و بر اساس واحد سانتی‌متر گزارش شد. وزن تر نمونه‌ها با ترازوی دیجیتالی مدل LE623P Sartorina با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد.

سنجش مقد ار کلروفیل و کاروتنوئید: برای سنجش مقد ار کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاد ه شد. برای سنجش، برگ ها در استن ۸۰ درصد سائید ه شد. پس از صاف کردن عصاره ها، شدت جذب در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل JENWAY ۶۳۰۵ خواند ه شد. نتایج حاصل از اند ازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

سنجش میزان آنتوسیانین: سنجش میزان آنتوسیانین بر طبق روش Wagner (۱۹۷۹) انجام گردید. در این روش ۰/۰۵گرم بافت تر در هاونی که حاوی ۵ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت ۹۹ به ۱) بود، ساییده شد و همگن گردید. عصاره حاصل به لوله آزمایش در پیچ د ار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در g ۴۰۰۰ سانتریفوژ گردید و ۳ میلی لیتر از محلول رویی برای خواندن شدت جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر استفاده شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تر ارائه گردید.

سنجش ترکیبات فنلی: سنجش میزان ترکیبات فنلی بر طبق روش Sonald and laima (۱۹۹۹) انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم از برگ در ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگه د اری شد. سپس ۱ میلی لیتر از محلول روئی به ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و با آب دو بار تقطیر، حجم محلول به ۵ میلی لیتر رسانده شد. مقد ار ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین سیکالتو ۵۰ درصد و ۱ میلی لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگه د اری شد. سپس جذب هر نمونه درطول موج ۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. غلظت ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید.

سنجش میزان قند های احیاکننده: میزان قند های احیاکنند ه در برگ و ریشه با استفاده از روش Somogyi-Nelson (۱۹۵۲) اند ازه گیری شد. در این روش ۲ میلی لیتر عصاره گیاهی و ۲ میلی لیتر محلول سولفات مس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت د اده شد. پس از سرد شدن لوله‌ها، ۲ میلی لیتر محلول اسید فسفو مولیبدیک به آنها اضافه شد و پس از چند لحظه رنگ آبی پدیدار گردید. شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد، سپس با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قند های احیا کننده بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش گردید.

سنجش میزان پرولین: مقد ار پرولین در برگ و ریشه به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳)اندازه‌گیری

شد. مقدار ۰/۱ گرم بافت تر را در ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳% سائیده و به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۰۰۰ سانتریوفوژ شد. سپس ۲ میلی لیتر از محلول رویی با ۲ میلی لیتر اسید استیک و ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای c°۱۰۰ آب گرم قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در حمام آب یخ قرار گرفت و ٤ میلی لیتر تولوئن به مخلوط اضافه شد. شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین محاسبه و بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تر گزارش گردید.

استخراج عصاره پروتئینی و آنزیمی: ابتدا ۰/۱ گرم بافت برگ جداگانه درون هاون چینی (روی یخ) و با استفاد ه از ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی مولار (pH= ۷/۵) سائیده و همگن گردید و درون اپندورف‌های ۲ میلی لیتری ریخته شد. سپس عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ و در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین و فعالیت آنزیم استفاده شد.

سنجش میزان پروتئین: اندازه گیری پروتئین کل طبق روش Bradford (۱۹۷٦) با اندکی تغییر (Olson and Markwell, 2007) انجام شد. جذب هر نمونه پروتئینی در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. این آزمایش برای هر نمونه پروتئینی استاندارد و مجهول در سه تکرار انجام و در نهایت میانگین جذب به عنوان عدد اصلی برای رسم استاندارد برادفورد و به دست آوردن غلظت نمونه‌های مجهول استفاده شد و میزان پروتئین محلول کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر (mg/g FW) گزارش گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: سنجش فعالیت آنزیم SOD طبق روش Giannotolitis and Ries (1997) انجام شد. مخلوط واکنش، شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH= ۷/۵)، اتیلن د ی آمین تترا استیک اسید۰/۱ میلی مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی مولار (pH= ۱۰/۲)، ال-متیونین ۱۲ میلی مولار، ریبوفلاوین ۱ میکرومولار، نیترو بلو تترازولیوم کلرید ۷۵ میکرومولار و ۳۰۰ میکرولیتر عصاره ی آنزیمی بود. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض یک سیستم نوری شامل سه لامپ فلورسنت ۳۰ وات و در فاصله ۳۰ سانتیمتری قرار گرفتند و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ٥٦۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. همچنین از یک لوله ی آزمایش حاوی مخلوط واکنش بجز عصاره ی آنزیمی به عنوان بلانک استفاده گردید. یک واحد فعالیت SOD به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار ۵۰ درصد احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم می گردد و فعالیت آن به unit/g FW min بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Cakmak and Marschner (1992) استفاده شد. بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با بررسی کاهش مقدار پراکسید هیدروژن در طول موج ۲٤۰ نانومتر برای دو دقیقه انجام شد. مخلوط واکنش شامل

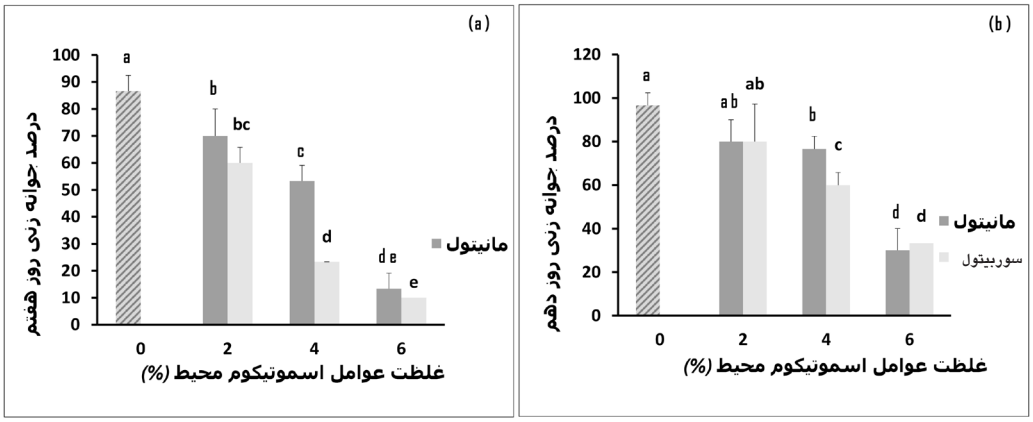
۲ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار (pH= ۷/۵) و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۷% ($H_2O_2$) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی معادل 1-1cm-mM محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسید از: سنجش فعالیت این آنزیم طبق روش Asada and Nakano (1981) انجام شد. مخلوط واکنش شامل محلول EDTA ۰/۲ مولار، محلول اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی مولار، محلول آب اکسیژنه و عصاره گیاهی بود. تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای مدت دو دقیقه ثبت گردید. میزان فعالیت آنزیم با استفاد ه از ضریب خاموشی معادل 8/2 1-cm 1-mM محاسبه شد.

محاسبات آماری: تمام آزمایشات طبق طرح کاملا تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل و با سه تکرار انجام شد و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و Excel انجام گرفت. مقایسه میانگین بر اساس آزمون Duncan و سطوح معنی دار بودن تیمارها در سطح $p\leq0.05$ انجام گرفت.

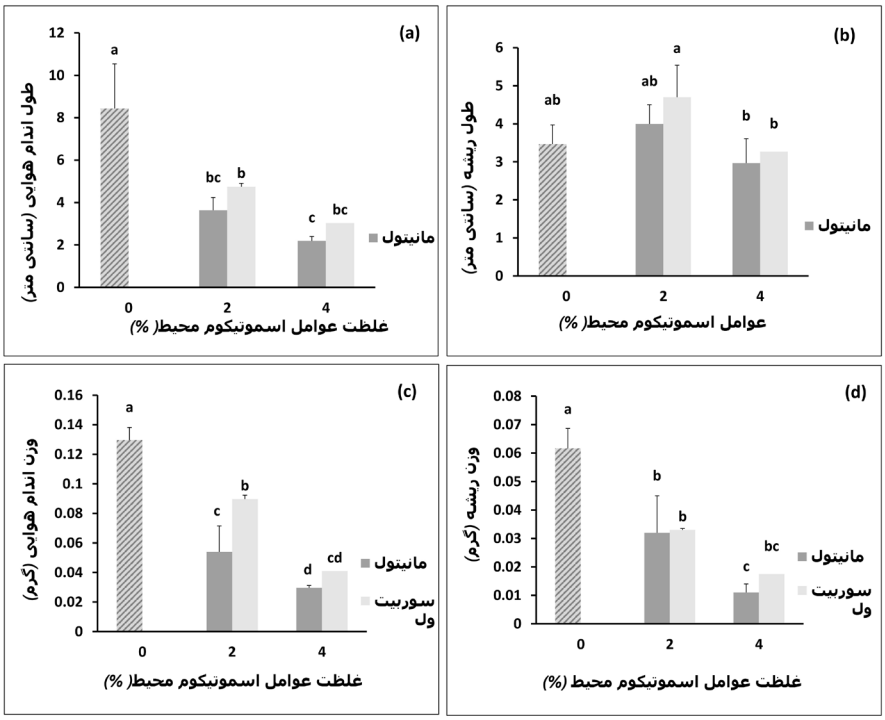
## نتایج

تأثیر تنش خشکی بر درصد جوانه زنی در روز هفتم و دهم بعد از کشت: تنش خشکی تاثیر معنی د اری بر درصد جوانه زنی نسبت به شاهد د اشت، بطوریکه با کاهش پتانسیل آب و افزایش سطوح خشکی، درصد جوانه زنی کاهش یافت. درصد جوانه زنی در روز هفتم بعد از کشت بذور، در هر سه سطح تنش کاهش معنی د اری نسبت به شاهد داشت. بیشترین درصد جوانه زنی در شاهد و کمترین در سطح ٦% مشاهده شد (شکل a١). در روز د هم میزان بذرهای جوانه زده در سطح ٢% هر دو تیمار افزایش یافت به طوریکه تفاوت چشمگیری با شاهد مشاهده نشد. با وجود افزایش بذرهای جوانه زده در سایر سطوح درصد جوانه زنی کاهش معنی داری نسبت به شاهد داشت (شکل b١).



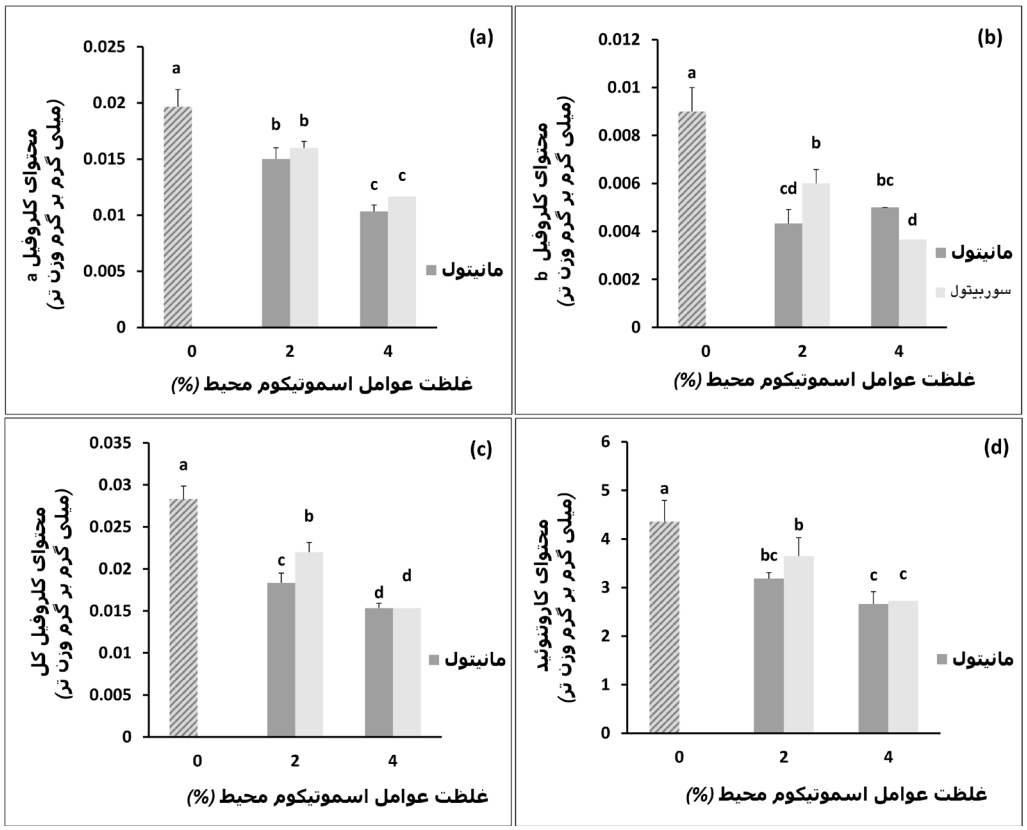

شکل ۱: اثر مانیتول و سوربیتول بر درصد جوانه زنی در روز هفتم (a) و دهم (b) پس از کشت. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد($P\leq ۰/۰۵$)

تأثیر تنش خشکی بر طول و وزن تر اندام هوایی و ریشه: سوربیتول و مانیتول اثر یکسانی بر طول اندام هوایی داشتند، با افزایش شدت آن ها در محیط، طول اندام هوایی نسبت به گیاهچه‌های شاهد به طور قابل توجهی کاهش یافت. بیشترین و کمترین طول اندام هوایی به ترتیب، به سطح بدون تنش (۰) و ٤% تعلق داشت (شکل a۲). نتایج مربوط به میانگین طول ریشه نشان داد که ایـن صفت بر خلاف طول اندام هوایی تحت تأثیر تنش خشکی قرار نگرفت و اختلاف چشمگیری بین سطوح مختلف خشکی نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل b۲). همچنین نتایج حاصل از آنالیز داد ه ها نشان داد که وزن تر اندام هوایی، تحت تاثیر تنش خشکی قرار گرفت، بطوریکه افزایش شدت تنش خشکی با کاهش این صفت همراه بود (شکل c۲). تفاوت معنی داری در هر سه سطح تنش مشاهده گردید و اثر مانیتول بر کاهش وزن تر اندام هوایی شدیدتر بود. همچنین مقایسه میانگین وزن تر ریشه گیاهچه های آویشن در سطوح مختلف تنش القا شده توسط سوربیتول و مانیتول نشان داد که بالاترین میانگین وزن تر در سطح عدم تنش بود و با افزایش شدت تنش خشکی، از وزن تر آن ها کاسته شده است (شکل d۲). بین سطوح مختلف تنش ایجاد شده با مانیتول از لحاظ وزن تر ریشه اختلاف معنی داری وجود داشت، در حالی که در مقایسه سطوح مختلف تنش ایجاد شده توسط سوربیتول، تفاوت چشمگیری بین سطح تنش ۲ و ٤% مشاهده نشد.



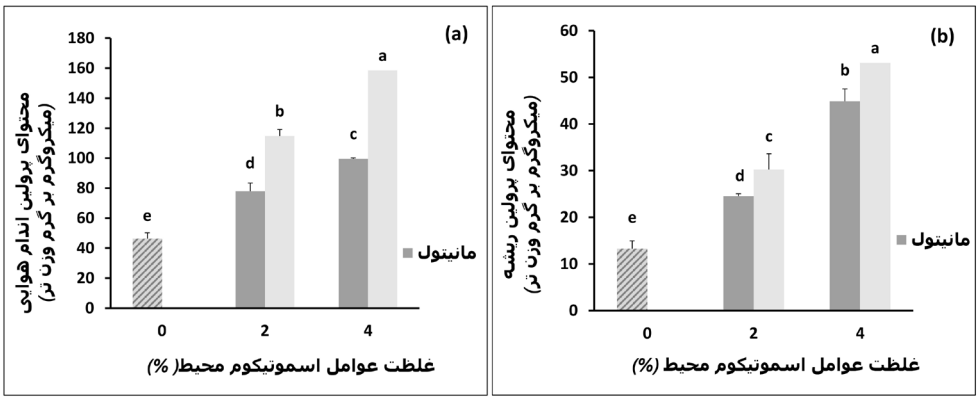

شکل ۲: اثر مانیتول و سوربیتول بر طول اندام هوایی(a) ، طول ریشه(b)، وزن تر اندام هوایی (c) و وزن تر ریشه(d) گیاهچه های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد (P≤۰/۰۵)

تأثیر تنش خشکی بر میزان رنگیزه های فتوسنتزی: میزان کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهچه های آویشن به طور قابل توجهی تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفت. با افزایش تنش خشکی میزان کلروفیل a،b ، کل و کاروتنوئید به طور معنی داری نسبت به شاهد کاهش یافت. هر دو ماده اسموتیکوم به کار برده شده در محیط اثر یکسانی بر میزان کلروفیل a داشتند، افزایش در شدت هر دو تنش، کاهش میزان غلظت کلروفیل را به همراه داشت (شکل a۳). همچنین با افزایش غلظت سوربیتول محیط روند نزولی معنی دار در میزان کلروفیل b مشاهده گردید بطوریکه در سطح ٤% کمترین میزان مشاهده شد در حالیکه تحت تأثیر مانیتول با وجود کاهش میزان کلروفیل نسبت به شاهد، تفاوت چشمگیری بین غلظت های ۲ و ٤% مشاهده نشد (شکل b۳). بیشترین میزان کلروفیل کل نیز در سطح بدون تنش مشاهده شد و با افزایش تنش خشکی میزان کلروفیل کل به طور قابل توجهی کاهش یافت (شکل c۳). با افزایش شدت تنش میزان کاروتنوئید نیز به طور قابل توجهی کاهش یافت. بین دو تیمار سوربیتول و مانیتول تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل d ۳).



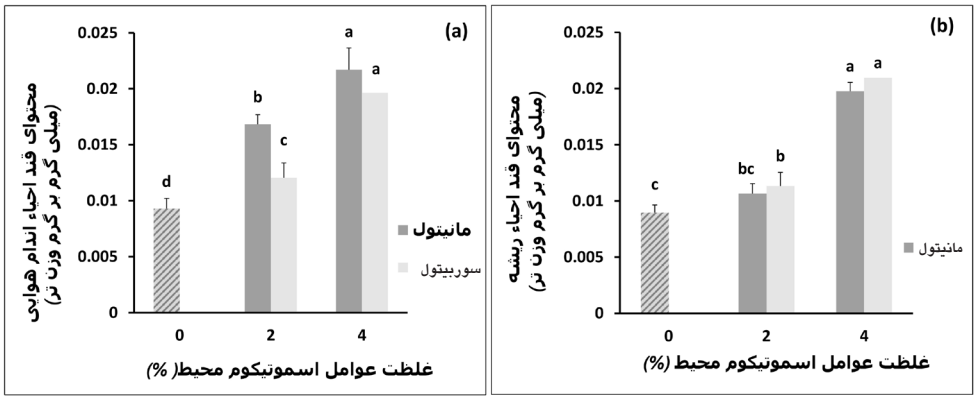

شکل ۳: اثر مانیتول و سوربیتول بر میزان کلروفیل a (a)، میزان کلروفیل b (b)، کلروفیل کل (c) و کاروتنوئید(d) گیاهچه های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد (P≤۰/۰۵)

تأثیر تنش خشکی بر میزان پرولین: مطابق با نتایج به دست آمده، تنش خشکی تأثیر معنی داری بر میزان پرولین اندام هوایی و ریشه داشت. میزان پرولین با افزایش غلظت عوامل اسموتیکم محیط به ویژه سوربیتول روند صعودی معنی داری را نسبت به شاهد طی کرد. بیشترین میزان تجمع پرولین اندام هوایی و ریشه در سطح ٤% سوربیتول مشاهده شد (شکل b و a٤). از سوی دیگر، داده های حاصل از اثر خشکی بر میزان پرولین حاکی از اختلاف معنی دار آن در اندام هوایی و ریشه است، میزان تجمع پرولین در اندام هوایی آویشن در طی تنش خشکی نسبت به ریشه بیشتر بود.




شکل ٤: اثر مانیتول و سوربیتول بر میزان پرولین اندام هوایی(a) و ریشه(b) گیاهچه های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد ($p<0.05$)

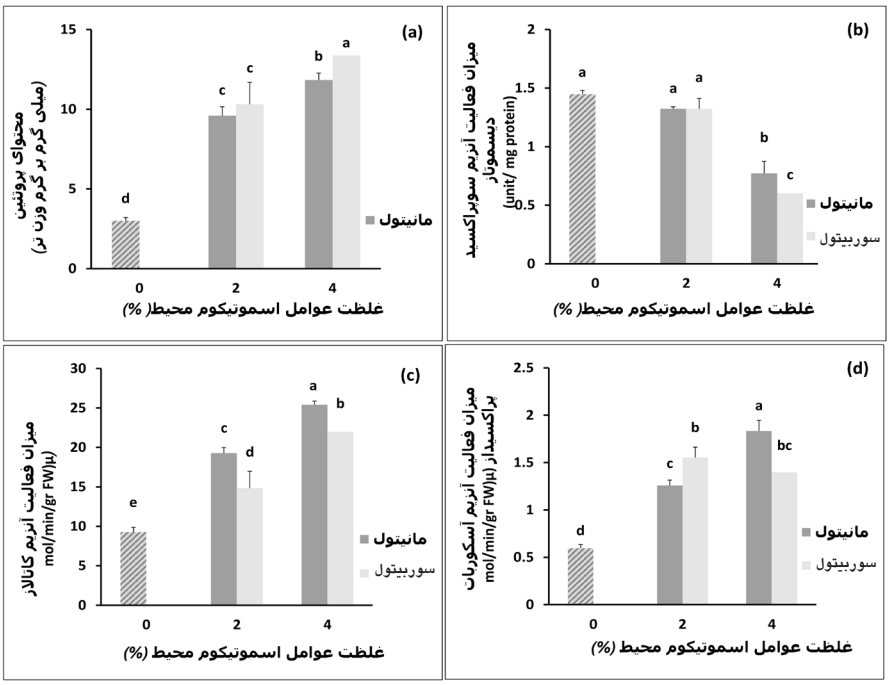
تأثیر تنش خشکی بر میزان قند احیاکننده: نتایج حاکی از این است که میانگین محتوای قندهای احیاکننده موجود در اندام هوایی و ریشه آویشن با افزایش غلظت عوامل تنش زا در محیط، به طور معنی داری افزایش پیدا کرد (شکل ٥). سوربیتول و مانیتول اثر مشابهی بر میزان قند های هر دو بخش مورد مطالعه داشتند. بیشترین میزان انباشت قند در اندام هوایی و ریشه در سطح ٤% مشاهده شد. مطابق با نتایج به دست آمده، تفاوت معنی داری در انباشت قندهای احیاکننده در اندام هوایی با ریشه مشاهده نشد.




شکل ٥: اثر مانیتول و سوربیتول بر میزان قند های احیاکنند ه اندام هوایی(a) و ریشه(b) گیاهچه های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد ($p<0.05$)

تأثیر تنش خشکی بر میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت: تغییرات میزان پروتئین کل تحت تنش خشکی در شکل a٦ نشان داده شد ه است. مانیتول و سوربیتول، اثر

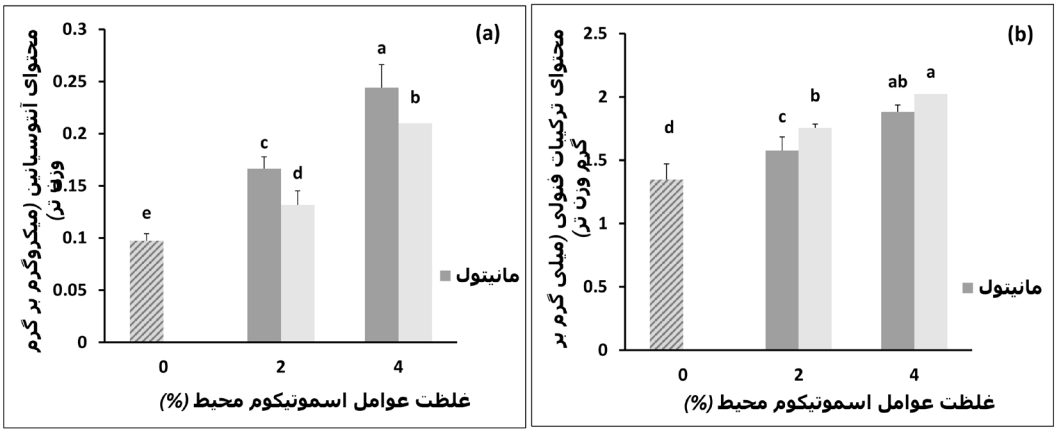
بر میزان پروتئین کل گیاهچه های آویشن داشتند و تفاوت چشمگیری بین دو تیمار مشاهده نشد، در حالیکه بین سطوح مختلف تنش، تفاوت کاملا معنی دار بود. با افزایش در میزان هر دو تیمار افزایش معنی داری در میزان پروتئین مشاهده شد. بیشترین میزان پروتئین گیاهچه ها در سطح ٤% مشاهده شد. همانطور که در شکل b٦ نشان داده شده است تنش خشکی باعث کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز[۱] شد. با افزایش تنش تا سطح ۲% تفاوت معنی داری با شاهد مشاهده نشد اما با افزایش غلظت مواد اسمزی، فعالیت آنزیم SOD کاهش چشمگیری داشت. با توجه به نتایج آماری بدست آمده، در گیاهچه های مورد مطالعه، بین تیمار سوربیتول و مانیتول از لحاظ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز[۲] تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در حضور عوامل اسموتیکوم محیط به ویژه مانیتول، فعالیت آنزیم CAT در گیاهچه های آویشن به موازات افزایش غلظت عوامل تنش زا در محیط، افزایش نشان داد. کمترین میزان فعالیت آنزیم در سطح بدون تنش و بیشترین در سطح ٤% بود (شکل c٦). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسید از[۳] تحت تأثیر عوامل اسموتیکی محیط افزایش معنی داری نشان داد. میزان فعالیت آنزیم در گیاهچه ها، تحت تأثیر مانیتول با روند صعودی معنی داری همراه بود در حالیکه تحت تأثیر تیمار سوربیتول تفاوت معنی داری بین غلظت های ۲ و ٤% مشاهده نشد (شکل d٦).




شکل ٦: اثر مانیتول و سوربیتول بر میزان پروتئین کل(a) ، فعالیت آنزیم (b) SOD، CAT (c) و APX (d) گیاهچه های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد (P≤۰/۰۵)

۱-SOD
۲-CAT
۳-APX

تأثیر تنش خشکی بر میزان آنتوسیانین و ترکیبات فنلی: در گیاهچه های آویشن ارتباط مستقیمی میان افزایش میزان آنتوسیانین و تنش خشکی مشاهده شد. نتایج نشان داد که میزان آنتوسیانین به طور معنی داری با افزایش عوامل اسموتیکم محیط در مقایسه با شاهد افزایش یافت. تجزیه و تحلیل آماری تفاوت معنی داری بین مانیتول و سوربیتول نشان نداد و با افزایش غلظت هر دو عامل اسموتیکم محیط روند صعودی معنی دار در محتوای آنتوسیانین مشاهده گردید. بیشترین افزایش آنتوسیانین در گیاهان تیمار شده با مانیتول در سطح ٤% مشاهده گردید (شکل a۷). اثر سوربیتول و مانیتول بر مقدار محتوای فنلی در گیاهچه های آویشن نیز کاملا معنی دار بود. محتوای فنلی برگ های تحت تیمار سوربیتول و مانیتول، به طور قابل توجهی نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. بیشترین میزان تجمع ترکیبات فنلی در سطح ٤% مشاهده شد (شکل b۷).




شکل ۷: اثر مانیتول و سوربیتول بر میزان محتوای آنتوسیانین (a) و ترکیبات فنلی(d) گیاهچه های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد ($p<0.05$)

## بحث و نتیجه گیری

در سراسر دنیا یکی از مهم ترین عوامل غیر زیستی و محدودکننده جوانه زنی و رشد اولیه گیاهچه ها، تنش خشکی است. یکی از پیامد های رایج ناشی از تنش خشکی، کاهش پتانسیل آب در بستر بذر می باشد. پتانسیل منفی بالای آب خصوصاً در مراحل اولیه جوانه زنی، منجر به کاهش جذب آب توسط دانه و مانع تداوم فرآیند های مربوط به جوانه زنی می شود (Boydak et al., 2003). در این پژوهش مشاهد ه گردید که میزان درصد جوانه زنی در روز هفتم در هر سه سطح تنش خشکی القا شد ه کاهش یافت. د انه ها برای انجام فرآیند جوانه زنی، بایستی به اندازه کافی آب جذب نمایند از اینرو به نظر می رسد که مواد محلول موجود در محیط (مانیتول و سوربیتول) سبب کاهش جذب آب توسط د انه و متعاقب آن تاخیر و یا توقف جوانه زنی شد ه است. در پژوهش دیگری

که بر روی چهار رقم از کلزا در شرایط کشت درون شیشه تحت تیمار مانیتول صورت گرفت، کاهش درصد جوانه زنی در تمام ارقام مورد بررسی با افزایش سطح تنش خشکی مشاهده شد (Adabavazeh and Razavizadeh, 2015). همچنین در پژوهش حاضر مشاهده شد که در روز دهم میزان بذرهای جوانه زده افزایش یافته، بطوریکه در سطح ۲% هر دو تیمار تفاوت چشمگیری با شاهد مشاهده نشد ولی در سایر سطوح تنش با وجود افزایش بذرهای جوانه زده میزان درصد جوانه زنی همچنان نسبت به شاهد کاهش معنی داری د اشت. علت آن را می توان چنین توجیه کرد که جذب آب و فعالیت متابولیکی بذرها طی تنش خشکی کاهش یافته اما مهار نشده است، در نتیجه گیاهچه توانسته است به کمبود آب مقاومت نشان دهد و با جذب آب سرانجام پوسته بذر را شکافته و از بذر خارج شود. تنش خشکی و محدودیت جذب آب توسط دانه، از طریق تاثیر بر انتقال ذخایر دانه و سنتز پروتئین ها در جنین احتمالا علت اصلی کاهش میزان جوانه زنی است (Dodd and Donovan, 1999).

همچنین در پژوهش حاضر در شرایط تنش خشکی، کاهش جذب آب توسط بذر باعث اختلال در رشد گیاهچه های آویشن شد. در محیط های تحت تنش، کاهش رشد بافت ها که ناشی از تغییر در مسیر برخی فرآیند های متابولیسمی است یک پدیده معمول می باشد. تنش آب با تأثیر روی فشار تورگر و کاهش آن، رشد و توسعه سلول را متوقف می کند و اندازه اندام محدود می‌شود و به همین دلیل است که اولین اثر محسوس کم آبی بر گیاه را می‌توان از ارتفاع گیاه تشخیص داد. از طرفی گیاه برای جذب آب و غلبه بر تنش، از مکانیسم تنظیم اسمزی بهره می گیرد و انرژی زیادی را صرف ساخت موادی همچون پرولین و گلایسین به عنوان تنظیم کننده های اسمزی می کند، که احتمالا این انرژی مصرفی برای تنظیم اسمزی می تواند باعث کاهش رشد اندام هوایی شود (Penuelas et al., 1997). همچنین وزن تر گیاهچه های آویشن نیز تحت تاثیر تنش خشکی کاهش یافت. گیاه زمانی که با خشکی مواجه می‌شود، به منظور کاهش مصرف و افزایش جذب آب، از شاخ و برگ خود که منابع اصلی تبخیر و تعرق هستند، می کاهد. با کاهش شاخ و برگ و همچنین کاهش توسعه سطح برگ که از عمده جایگاه های فتوسنتزی گیاه می باشد، میزان تولید مواد فتوسنتزی و متعاقب آن وزن گیاه کاهش می یابد. در بررسی اثر تنش خشکی بر پارامترهای مورفولوژیکی برخی از ارقام سورگوم در شرایط کشت درون شیشه نیز نتایج مشابهی گزارش گردید (Razavizadeh and Shahriyari, 2017; Mohammadi and Mojaddam, 2014).

در پژوهش حاضر، در طول ریشه آویشن در سطوح مختلف تنش خشکی تفاوت معنی داری نسبت به شاهد مشاهد ه نشد. نتایج بحث شـده نشـان مـی دهـد که سیستم ریشه ای توسعه یافته ممکن است یک راهبرد برای اجتناب از خشکسالی در گیاهچه های آویشن باشد. از اینرو به نظر می رسد

که آویشن نیز مانند سایر گیاهان در شرایط تنشی، ویژگی های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی خود را در جهت مقابله با تنش و افزایش مقاومت به تنش خشکی تغییر داده است.

یکی از پارامترهای حساس به تنش، میزان کلروفیل و کاروتنوئید می باشد. همانطور که انتظار می رفت، تیمارهای مانیتول و سوربیتول به طور قابل توجهی محتوای کلروفیل آویشن را کاهش د ادند و این اثر با افزایش شدت خشکسالی بیشتر شد. تنش خشکی به عنوان یک تنش اکسید اتیو با ایجاد اختلال در سیستم های آنزیمی کاهش د هند ه فعالیت اکسیژن فعال و افزایش پراکسید اسیون چربیها باعث خسارت به غشای سلولی، تجزیه کلروفیل ها در کلروپلاست و در نهایت کاهش شدت فتوسنتز می گردد (Anjum et al., 2014). همچنین به نظر می رسد شوک اسمزی حاصل از عوامل اسموتیکوم محیط باعث افزایش مقد ار برخی از مواد تنظیم کنند ه رشد نظیر اتیلن و اسید آبسزیک می شود که به دنبال آن فعالیت کلروفیلاز تحریک و موجب تخریب کلروفیل می گردد. کاهش غلظت کلروفیل a و b تحت تنش خشکی در *Camellia sinensis* L. (Damayanthi et al., 2010) و *Carum capticum* (Razavizadeh et al., 2017) نیز گزارش شده است.

در اکثر گیاهان، کاروتنوئید ها در شرایط تنش قادرند انرژی زیاد طول موج های کوتاه را گرفته و اکسیژن یک تایی را به سه تایی تبدیل کنند و با گرفتن رادیکال های اکسیژن تولید شده نقش آنتی اکسیدانی خود را ایفا کنند. در این پژوهش، نتایجی مغایر با آنچه که در رابطه با نقش حفاظتی کاروتنوئید گفته شد، به دست آمد. میزان کاروتنوئید در گیاهچه های آویشن در طی تنش خشکی کاهش یافت و نتوانست نقش حفاظتی خود را ایفا کند. کاهش محتوی کاروتنوئید ها می تواند به دلیل اکسید شدن آن ها توسط اکسیژن فعال و تخریب ساختار آن ها باشد (Sairam et al., 1998). کاهش کاروتنوئید با افزایش تنش خشکی در گیاه دارویی زوفا توسط Rassam و همکاران (2014) و در گیاه کتان توسط Ghorbanli و همکاران (2012) نیز گزارش گردید.

یکی از مکانیسم های دفاعی مورد بررسی در گیاهچه های آویشن تحت تیمار خشکی، انباشت اسمولیت های سازگار از جمله پرولین و کربوهیدرات های احیاکننده بود. در پژوهش حاضر گیاهچه های آویشن احتمالا برای جذب آب و غلبه بر تنش، از پرولین و قند های احیاکننده به عنوان تنظیم کننده های اسمزی بهره گرفتند و میزان تجمع اسمولیت های سازگار بر اثر تنش افزایش یافت. تجمع پرولین تحت تنش خشکی به واسطه افزایش بیان آنزیم های بیوسنتزکننده پرولین (اورنیتین امگا آمینوترانسفراز) و کاهش فعالیت آنزیم های تخریب کننده پرولین (پرولین دهیدروژناز)، می‌تواند به دلیل نقش آن به عنوان یک اسمولیت در تنظیم اسمزی، کمک به پایداری غشا، کاهش اثرات تنش بر تخریب غشای سلولی و حفاظت از بسیاری از پروتئین‌ها و آنزیم‌های سیتوپلاسمی باشد (Ashraf and Orooj, 2006). در مطالعه حاضر، پرولین بیشترین انباشت

را در اندام‌های هوایی گیاه داشت. تجمع پرولین در ریشه‌ها با تاخیر زمانی نسبت به تجمع در برگ‌ها صورت می‌گیرد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که افزایش پرولین در ریشه‌ها ناشی از انتقال آن از برگ‌ها می‌باشد (Heydari Sharifabad, 1379). تجمع پرولین در پاسخ به عوامل اسموتیکوم موجود در محیط در برخی دیگر از گیاهان دارویی نیز گزارش شده است (Sodaii zadeh, 2016; Zahedchekovary and Gasemov, 2015; Lotfi et al., 2014).

کربوهیدرات‌های احیاکننده داخل یاخته‌ها بعنوان یک ماده اسمزی در تنظیم اسمزی عمل می‌کنند تا پتانسیل آب یاخته کاهش یافته و آب بیشتری برای حفظ تورم در شرایط تنش خشکی داخل یاخته باقی بماند. افزایش قندهای احیاکننده علاوه بر تنظیم اسمزی در ارتباط با حفاظت غشاهای سلولی و زدودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن می باشد. محققان علت افزایش قند ها در گیاهان مواجه با تنش خشکی را افزایش تجزیه کربوهیدرات های نامحلول و در نتیجه بالا رفتن سطوح قند های محلول، سنتز مواد اسموتیک از مسیرهای غیر فتوسنتزی، توقف رشد، کاهش سرعت انتقال مواد و افزایش سنتز ساکارز به دلیل فعال سازی آنزیم ساکارز فسفات سنتاز می دانند (Oliviera-Neto et al., 2009). نتایج تحقیقات بر روی چهار رقم از کلزا و چهار رقم گندم نیز مشخص نمود که با افزایش اعمال تنش خشکی، بر میزان قند های احیاکننده نیز افزوده می شود که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (Saboora et al., 2016; Adabavazeh and Razavizadeh, 2015). همچنین گزارش هایی مبنی بر ارتباط بین پرولین و کربوهیدرات ها مطرح شده است(Rensburg and Kruger, 1993)، که در این پژوهش نیز یک روند افزاینده در مقدار قند های احیاکننده و همسو با آن در پرولین مشاهده شد. به طور کلی، نتایج نشان داد که تجمع پرولین و قند با کاهش پتانسیل اسمزی بافت گیاهی در سطح سلولی و تنظیم اسمزی بخشی از پاسخ های دفاعی آویشن به تنش خشکی است.

عوامل تنش زای غیر زیستی همچون سوربیتول و مانیتول، فرایند های اکسیداتیو را در سلول های گیاهی القا می کنند که این فرایند به وسیله تولید ROS ها آغاز می شود که از فعالیت نامناسب انتقال الکترون ناشی می گردد. تجمع ROS ها در سلول منجر به فعال کردن مسیرهای سیگنال دهی اختصاصی شده که سبب تنظیم بیان ژن، تغییر در سنتز و فعالیت پروتئین می شود و در نهایت سلول را برای سازگاری به شرایط جدید آماده می‌کند (Heidarvand and Maali-Amiri, 2013). پروتئین های زیاد ی در گیاهان شناخته شده اند که در تنش خشکی بیان می شوند و حتی بیان بسیاری از پروتئین های که جز متابولیسم اصلی گیاهان هستند در شرایط تنش خشکی افزایش نشان می دهند. از جمله پروتئین های که در تنش اسمزی افزایش پیدا می کنند می توان به آنزیم های آنتی اکسیدان و پروتئین های دخیل در سنتز محافظت کننده های اسمزی اشاره

کرد (Sho Vali Khan et al., 2007). بنابراین به نظر می رسد در تحقیق حاضر نیز در گیاهچه های آویشن تحت تنش خشکی، احتمالا گروه هایی از پروتئین های فوق افزایش یافته و سبب مقاومت گیاهچه ها به تنش شده اند. بررسی های انجام شد ه بر دو کولیتوار برنج نیز نشان داد که بر اثر تنش خشکی مقدار پروتئین کل در گیاهچه های برنج افزایش یافت (Sharma and Dubey, 2005). از طرفی با توجه به نقش پرولین در حفاظت پروتئین ها در برابر دناتوره شدن(Delauney and Verma., 1993)، افزایش مقدار پروتئین ها تحت تنش خشکی را می توان به افزایش پرولین نیز نسبت د اد.

با افزایش سطح تنش، میزان ROS در سلول ها افزایش می یابد و ROS ها با اکسیدکردن پروتئین های خاص و تأثیر بر عوامل رونویسی سبب تغییر الگوی بیان ژن در پاسخ به تنش ها می شوند، بدین ترتیب سیستم آنتی اکسید انی گیاه فعال می شود و شدت پاکسازی یون سوپراکسید افزایش و آسیب های حاصله از آن در گیاه کاهش می یابد. یکی از آنزیم های مورد بررسی در پاسخ به تنش های مختلف محیطی و تنش های غیر زیستی مانند شوری و خشکی، آنزیم SOD است. SOD آنزیمی است که قادر به پاکسازی یون سوپراکسید می باشد و افزایش فعالیت آن به منزله اولین سد دفاعی در مقابل حمله رادیکال های اکسیژن، در مقابل خسارت ناشی از تنش خشکی است. سیمیرنوف و کلمب ( Simirnoff and Colomb, 2000) گزارش کرده بودند که در جو تحت تنش خشکی، فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و SOD افزایش یافته ولی تغییری در میزان فعالیت آنزیم APX رخ نمی دهد در حالیکه در پژوهش حاضر کاهش فعالیت آنزیم SOD با افزایش فعالیت CAT و APX همراه بود. به نظر می رسد که این تفاوت ناشی از گونه گیاهی، مرحله رشد و نمو بافت گیاه و شرایط محیطی باشد. روند تغییر فعالیت هر یک از این آنزیم ها با نوع ماد ه ایجاد کننده تنش، غلظت ماد ه ایجاد کننده در محیط کشت، آنزیم مورد آزمایش، رقم و اندام گیاهی مورد مطالعه متفاوت است (Sharma and Dubey, 2007). همچنین گزارش شده است اختصاصیت پاسخ بیولوژیکی به ROS بـه ماهیت شیمیایی تنش، شدت سیگنال، مکان تولید، مرحله رشد سلولی، تنش های قبلی وارد شده، تداخل بـا سایر سیگنال های مولکولی، پیام رسان های لیپیدی و هورمون‌های گیاهی بستگی دارد (Tarrago et al., 2009). از اینرو در این پژوهش به نظر می رسد که در گیاهچه های آویشن تحت تنش خشکی، آنزیم SOD در مقایسه با کاتالاز و آسکوربات پراکسید از نقش کمتری در محافظت گیاه در برابر تنش خشکی داشته است. این نتیجه با گزارش اعلام شده توسط Gholami et al., 2012هم خوانی دارد.

همچنین با استفاد ه از تکنولوژی ریز آرایه cDNA مشخص شد که برخی ژن ها توسط $H_2O_2$ افزایش بیان و برخی ژن ها کاهش بیان نشان می دهند. به نظر می رسد کاتالاز و آسکوربات

پراکسید از از جمله آنزیم های هستند که بیان ژن آن، در گیاه آویشن تحت عوامل اسمزی افزایش پید ا کرده است. بالا رفتن فعالیت آنزیم CAT و APX به نوعی بیانگر فعال شدن سیستم آنزیمی آنتی اکسیدان در گیاه جهت مقابله با تولید $H_2O_2$ می باشد. CAT مولکول $H_2O_2$ را بدون نیاز به انرژی به آب و اکسیژن تجزیه می کند اما فقط در غلظت های بالای $H_2O_2$ فعال است و غلظت های پایین آن توسط APX و سایر پراکسید ازها با همکاری احیاکنند ه های قوی مانند گلوتاتیون و آسکوربات حذف می شود. این نتیجه با گزارش اعلام شد ه در مورد *Sorghum bicolor* تحت تنش خشکی در شرایط کشت درون شیشه (Singh and Sharma, 2013) و (Mirzaei et al., 2013 *Pistacia khinjuk* هم خوانی دارد. از آنجایکه آنتی اکسیدان ها توانایی واکنش مستقیم با انواع اکسیژن فعال و جمع آوری آن ها را دارند و بدین ترتیب میزان آسیب به غشاها، DNA و پروتئین را کاهش می دهند، نقش بارزی را در حفظ تعادل اکسیداتیوی سلول ها و مقاومت گیاهان به تنش های محیطی ایفا می نمایند (Esfandiari, 2007).

به غیر از فعالیت های آنزیمی و تجمع مواد محلول، تجمع متابولیت های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی و آنتوسیانین نیز به شدت تحت تأثیر تنش آب قرار می گیرد و شواهد زیاد ی نشان می دهد که در شرایط تنشی تولید برخی از آن ها تا چندین برابر افزایش می یابد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، به نظر می‌رسد که در گیاه آویشن سیستم دفاع غیرآنزیمی از جمله آنتوسیانین‌ها به طور توأم با سیستم دفاع آنزیمی همکاری می‌نمایند تا بتوانند اثر مخرب تنش را خنثی نمایند. زمانی که گیاه در معرض تنش قرار می گیرد، متابولیت های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی، فلاونوئید ها و آنتوسیانین ها برای پاک سازی گونه های فعال اکسیژن در گیاه همچون سیستم های آنزیمی افزایش می یابد. هنگام ایجاد هر گونه تثبیت، تضعیف یا افت در سیستم دفاع آنزیمی، سیستم دفاع غیرآنزیمی وظیفه پاکسازی رادیکال‌های آزاد را بر عهد ه می گیرد. آنتوسیانین‌ها از مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند. این ترکیبات نه تنها رادیکال های آزاد را از بین می برند بلکه از تولید بیشتر آن ها در گیاه جلوگیری می کنند. بیشتر مطالعات اخیر، نشان داد ه است که آنتوسیانین‌ها در پاسخ به انواع تنش سنتز شده اند. گزارش مشابهی مبنی بر افزایش مقدار آنتوسیانین در *Begonia Semperflorencs* در شرایط تنش وجود د ارد. این افزایش به علت نقش حفاظت نوری آنتوسیانین به وسیله حذف مستقیم گونه های فعال اکسیژن در طول تنش اکسیداتیو می باشد (Zhang et al., 2010).

همچنین افزایش میزان ترکیبات فنلی در اثر تنش خشکی القا شد ه در محیط، می‌تواند به دلیل عملکرد حفاظتی این ترکیبات در مقابل تنش و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن باشد. این ترکیبات، آنتی اکسیدان های نیرومندی در بافت های گیاهی تحت شرایط تنش می باشند و این

خاصیت به دلیل ساختار اسکلتی و گروه فنل این متابولیت ها می باشد. گروه های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک به وسیله جاروبگری رادیکال ها و سایر مکانیسم ها مانند فروکشی اکسیژن یکتایی و کلاته کردن فلز به وسیله باند شدن یون های سمی، آسیب های اکسیداتیو را کم کرده و به این ترتیب ساختارهای سیتوپلاسمی و کلروپلاستی را از تأثیرات منفی خشکی محافظت می کنند و همچنین با عمل لیپواکسیژناز از اکسیداسیون لیپید جلوگیری می کنند. گزارش مشابهی مبنی بر افزایش بیوسنتز ترکیبات فنلی تحت شرایط تنش توسط Mohdaly و همکاران (۲۰۰۹) ارائه گردید. در سال‌های اخیر ترکیبات فنلی به دلیل د اشتن خاصیت آنتی اکسید انی و ضد سرطانی به شدت مورد توجه قرار گرفته است. از اینرو گیاهچه های تیمار شد ه آویشن با سوربیتول و مانیتول که افزایش چشمگیری در میزان ترکیبات فنلی آنها تحت این شرایط مشاهده شد می توانند منبع مناسبی برای استخراج ترکیبات فنلی باشند. در پژوهش دیگری که بر روی گیاهچه ها و کالوس های زنیان در شرایط کشت درون شیشه تحت تنش خشکی صورت گرفت، افزایش تجمع متابولیت های ثانویه از جمله فنل و آنتوسیانین در پاسخ به تنش القا شده گزارش گردید (۲۰۱۷ ,.Razavizadeh et al).

به عنوان نتیجه نهایی می توان گفت، گیاهچه‌های آویشن تا حدودی مقاوم به تنش خشکی هستند. در مطالعه حاضر، مانیتول و سوربیتول هر دو باعث القای پاسخ های آنتی اکسیدانی و رشدی در گیاهچه های آویشن شدند. با توجه به موارد ذکر شد ه در زمینه بررسی اثرات تنش خشکی بر پارامترهای مختلف فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و متابولیت های ثانویه در گیاهچه های آویشن، کاهش پارامترهای رشد با افزایش برخی از متابولیت های ثانویه و مواد محلول همراه بود. گیاهچه های آویشن با افزایش اسمولیت های سازگار پرولین و قند به عنوان تنظیم کننده های اسمزی، افزایش مکانیسمهای آنزیمی مانند کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و غیر آنزیمی مانند افزایش ترکیبات فنلی و آنتوسیانین تحت شرایط خشکی در شرایط درون شیشه ای از خود مقاومت نشان د ادند.

## منابع

Adabavazeh , F. and Razavizadeh, R. (2015) Comparison of drought tolerance of four varieties of *Brassica napus* under in vitro culture. Advances in Environmental Biology 9(2): 135-142.

AL-Aghabary, K., Zhujun, Z. and Qinhua, S. (2004) Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities

in tomato plants under salt stress. Journal of Plant Nutrition 27: 2101-2115.

Anjum, N. A., Arena, C. and Singhgill, S. (2014) Reactive Oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROSscavengers during enviromental stress in plant. Frontiers in Environmental Science 2: 1-13.

Ashraf, M. and Orooj, A. (2006) Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in arid zone traditional medicinal plant ajwain (Trachyspermum ammi [L.] Sprague). Journal of Arid Environments 64: 209-220.

Balen, B., Tkalec, M., Rogić, T., Šimac, M., Peharec Štefanić, P., Rončević, S., Svedružić, L.P. and Krsnik-Rasol, M. (2013) Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. in vitro-grown cultures. In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant 49 (4): 421-432.

Bates, L.S., Waldern, R.P. and Teare, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Journal Plant Soil 39(1): 205-207.

Boydak, M., Dirik, H., Tilki, F. and Calikoglu, M. (2003) Effects of water stress on germination in six provenances of *Pinus brutia* seeds from different bioclimatic zones in Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 27: 91-97.

Bradford, 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.

Cakmak, I. and Marschner, H. (1992) Magnezium deficiency and high light inensity enhance activities of superoxide dismutase, ascrobate peroxidase, and glutatione reductase in Bean leaves. Plant Physiology 98(4): 1222-1227.

Damayanthi, M.M.N., Mohtti, A.J. and Nissanka, S.P. (2010) Comparison of tolerant ability of mature field grown tea (*Camellia sinensis* L.) cultivars exposed to a drought stress in Passara Area. Tropical Agricultural Research 22:66-75.

Delauney, A.J. and Verma, D.P. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal 4: 215-223.

Dodd, G.L. and Donovan, L.A. (1999) Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. American Journal of Bot-

any 86: 1146- 1153.

Esfandiari, E. (2007) Evaluation of drought tolerance in winter wheat cultivars using physiological and biochemical parameters. PhD thesis in Agronomy (Crop Physiology), Faculty of Agriculture, University of Tabriz.

Gangopadhyay, G., Basu, S. and Gupta, S. (1997) In vitro selection and physiological characterization of NaCl – and mannitol – adapted callus lines in *Brassica juncea*. Plant Cell, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 161-169.

Ghasemi Bezdi, K. and Ahmadi, A. (2010) Cell and Tissue Biotechnology (in Micropropagation and Plant Breeding). Makhtoomgholi Faraghi Pub., Gorgan, Iran 254 pp.

Gholami, M., Rahemi, M., Kholdebarin, B. and Rastegar, S. (2012) Biochemical responses in leaves of four fig cultivars subjected to water stress and recovery. Scientia Horticulturae 148: 109-117.

Ghorbanli, M., Bakhshi Khaniki, Gh. and Zakeri, A. (2012) Investigation on the effects of water stress on antioxidant compounds of *Linum usitatissimum* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 4 (27): 647-658 (in Persian).

Giannotolitis, C.N. and Ries, S.K. (1997) Superoxid dismutase: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedling. Plant Physiology 59:315-318.

Gigord, L., Lavigne, C., Shykoff, J.A. and Atlan, A. (1999) Evidence for effects of restorer genes on male and female reproductive functions of hermaphrodites in the gyndioecious species *T. vulgaris* L. Journal of Evolutionary Biology 12(3): 596-604.

Hassanein, A. and Dorion, N. (2006) High-efficiency colony formation and whole plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Pelargonium* x *hortorum* 'Panaché sud'. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 81(4): 714-720.

Heidarvand, L. and Maali-Amiri, R. (2013) Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. Journal of Plant Physiology 170(5): 459-69.

Heydari Sharifabad, H. (1379) Plant, dryness and drought. 1st ed. Research institute of forest and rangelands, Tehran (in Persian).

Hughes, S.G., Bryant, J.A. and Smirinoff, N. (1989) Molecular biology application to studies of stress tolerance. In: Plants under stress. Hamlyn, G.J., Flowers, T.J., Jonea, M.B., editors. New York: Cambridge University Press 131-135.

James, T.K., Rahman, A. and Douglas, J.A. (1991) Control of weeds in five herb crops. Proceedings of the NZ Weed and Pest Control Conference 44. 116-120.

Larkin, P. J. and Scowcroft, W.R. (1981) Somaclonal variation a novel source variability from cell culture for plant improvement. Journal of Applied Genetics 60: 197-214.

Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Lima, A.L.S., DaMatta, F.M., Pinheiro, H.A., Totola, M.R. and Loureiro, M.E. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. Environmental and Experimental Botany47:239-247.

Lotfi, M., Abbaszadeh, B. and Mirza, M. (2014) The effect of drought stress on morphology, proline content and soluble carbohydrates of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 1: 19-29 (in Persian).

Mirzaei, J. and Usefzadeh, H. (2013) Peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities of the *Pistacia khinjuk* seedlings under drought stress. Ecopersia 1: 329-337.

Mohammadi, N. and Mojaddam, M. (2014) The effect of water deficit stress on germination component of grain *Sorghum* cultivars. Journal of Fundamental and Applied Sciences 4: 284-291.

Mohdaly, A.A.A., Sarhan, M.A. and Smetank, I. (2009) Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. Journal of the Science of Food and Agriculture 90: 218-226.

Murashige, I. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay

with tobacco tissue culture. Plant Physiology 92:21-30.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22:867–880.

Oliviera-Neto, C.F., Silva-Lobato, A.K., Goncalves-Vidigal, M.C., Costa, R.C.L., Santos Filho, B.G., Alves, G.A.R., Silva-Maia, W.J.M., Cruz, F.J.R., Neres, H.K.B. and Santos Lopes, M.J. (2009) Carbon compounds and chlorophyll contents in *Sorghum* submitted to water deficit during three growth stages. Science and Technology 7:588-593.

Olson, B.J.S.C. and Markwell, J. (2007) Current protocols in protein. Science Detection and Assay Method 48: 29-34.

Pagter, M., Bragato C. and Brix, H. (2005) Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. Aquatic Botany 81: 285-299.

Penuelas, J., Isla, R., Filella, I. and Araus, J.L. (1997) Visible and near infrared reflectance assessment of salinity effects on barley. Crop Science 37: 198-202.

Rassam, Gh., Dadkhah, A. and Khoshnood Yazdi, A. (2014) Evaluation of Water Deficit on Morphological and Physiological Traits of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). Journal Agronomy Science 5(10): 1-12 (in Persian).

Razavizadeh, R. and Shahriyari, E. (2017) Comparative study of drought stress effects on physiological and defense parameters of some varieties of *Sorghum* under In vitro culture. Journal Plant Process and Function 6 (19): 163-180 (in Persian).

Razavizadeh, R., Adabavazeh, F., Rostami, F. and Teimouri, A. (2017) Comparative study of osmotic stress effects on the defense mechanisms and secondary metabolites in *Carum copticum* seedling and callus. Journal Plant Process and Function 5(18), 23-34.

Razavizadeh, R. and Adabavazeh, F. (2017) Effects of sorbitol on essential oil of *Carum copticum* L. under in vitro culture. Romanian Biotechnological Letters22 (1): 12281-12289.

Rensburg, L.V. and Kruger, G.H.J. (1993) Proline accumulation as drought tolerance selecttion criterion: it's relationship to membrane integrity and chloroplast ultra stracture in *Nicotiana tabacum* L. Journal Plant Physiology 141:188-194.

Saboora, A., Barik roo, N. and Sharifi, H. (2016) Changes in compatible osmolite contents in four wheat cultivars under water stress. Journal of Applied Biology and Biotechnology 1: 121-142 (in Persian).

Sairam, R.K., Deshmukh, P.S. and Saxna, D.C. (1998) Role of antioxidant systems in Wheat genotype tolerance to water stress. Journal of Plant Biology 41(3): 387-394.

Sharma, P. and Dubey, R.S. (2007) Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlin exposed to toxic concentration of aluminum. Plant Cell Reports 26: 2027-2038.

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 46:209-221.

Sho Vali Khan, P.S., Hoffman, L., Renaut, J. and Housman, J.F. (2007) Current initiatives in proteomic for analysis of plant salt tolerance. Current Science 93: 807-817.

Simirnoff, N. and Colombe, S.V. (2000) Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. Journal of Experimental Botany 39: 1097-1108.

Singh, G. and Sharma, N. (2013) Antioxidative response of varius cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) to drought stress. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 9: 139-153.

Sodaii zadeh, H., Shamsaie, M., Tajamoliyan, M., Mirmohammady maibody, A.M. and Hakim zadeh, M.A. (2016) The Effects of Water Stress on some Morphological and physiological Characteristics of *Satureja hortensis*. Journal of Plant Process and Function 5 (15): 1-12 (in Persian).

Somogyi-Nelson, M. (1952) Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry 195: 19- 29.

Sonald, S.F. and Laima, S.K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus.* Plant agriculture 1: 1-5.

Tarrago, L., Laugier, E. and Zaffagnini, M. (2009) Regeneration mechanisms of *Arabidopsis thaliana* methionine sulfoxide reductases by glutaredoxins and thiore-

doxins. Journal of Biological Chemistry 284(28): 18963-71.

Wagner, G.J. (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology 64: 88-93.

Zahedchekovary, S. and Gasemov, N. (2015) Study of some Microelements, proline and protein of *Brago officilalis* L. under drught stress. Crop Biotechnology 11: 65-75 (in Persian).

Zhang, K.M., Yu, H.J., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q. and Xia, X.J. (2010) Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. Plant Science 179(3): 202-208.