

مطالعه اثر باندهای مختلف پرتوهای ماوراءبنفش (UV) بر القا تنش اکسیداتیو و مکانیسم‌های مقاومت به آن در گیاهچه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)

چکیده:

تخریب لایه اوزون منجر به نفوذ برخی پرتوهای خورشیدی و مخرب نظیر طیف‌های نور ماوراءبنفش (UV) به اتمسفر می‌گردد. این پرتوها بر رشد و نمو گیاهان تأثیر منفی می‌گذارد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر UV بر رشد، القا تنش اکسیداتیو و مکانیسم‌های مقاومت گیاهچه بادرنجبویه بود. این پژوهش در شرایط هیدروپونیک در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. گیاهان بادرنجبویه بعد از مرحله ۷ برگی، به مدت یک هفته در معرض پرتوهای ماوراءبنفش (UV-A و UV-B به مدت ۲۰ دقیقه، و UV-C به مدت ۳ دقیقه در روز) قرار گرفتند. در این تحقیق تأثیر باندهای مختلف این اشعه بر اکسیدان‌ها مانند رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، آب اکسیژنه (H_2O_2) و مالون‌دآلدئید (MDA)، آنتی‌اکسیدان (آنتی‌اکسیدان کل، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)) و رشد بادرنجبویه مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج نشان داد گیاهچه‌های تیمار شده با UV-A مقدار ROS، H_2O_2 و MDA در مقایسه با گیاهان شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. تحت تیمار پرتوهای UV-B و UV-C مقدار ROS، H_2O_2 و MDA به ترتیب حدود ۵۹-۸۹، ۶۷-۱۰۴ و ۱۰۳-۱۶۶ درصد افزایش یافت. تمام آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه در این پژوهش در تیمار با هر سه پرتو ماوراءبنفش افزایش نشان دادند. بیشترین افزایش آنتی‌اکسیدان به ترکیبات فنلی با ۱۴۸-۱۸۷ درصد تعلق داشت. افزایش اکسیدان در گیاهان تحت تیمار UV-B و UV-C، بیانگر عدم کارایی سیستم آنتی‌اکسیدان گیاهچه بادرنجبویه در جاروب کردن ROS و بهبود تنش بوده است. در نهایت این پرتوها سبب کاهش وزن تر ریشه و اندام هوایی شده‌اند. به طور کلی نتایج بیانگر حساسیت گیاهچه بادرنجبویه به پرتو ماوراءبنفش است.

کلمات کلیدی: اشعه‌های ماوراءبنفش، گیاه بادرنجبویه، ماورای بنفش، رادیکال فعال اکسیژن

مقدمه:

گیاهان برای فتوسنتز نیازمند نور بوده و از طریق گیرنده‌های نوری مختلف به نور پاسخ می‌دهند. نور مراحل مختلف رشد و فرآیندهای فیزیولوژیکی حیاتی را در طول چرخه زندگی گیاهان تنظیم می‌کند. گیاهان به غیر از اشعه‌های فعال فتوسنتزی (PAR؛ ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر)، در معرض نور UV نیز قرار می‌گیرند که از لحاظ واکنش‌های شیمیایی بسیار فعال است. اشعه ماوراءبنفش به طور گسترده بر اساس طول موج UV-C (۲۰۰-۲۸۰ نانومتر)، UV-B (۲۸۰-۳۲۰ نانومتر) و UV-A (۳۲۰-۳۹۰ نانومتر) طبقه بندی می‌شود (Nawkar et al. 2013; Kakani et al. 2003; Loconsole and Santamaria 2021). UV-C (خطرناک ترین محدوده نور ماوراءبنفش) اثرات ناچیزی بر گیاهان دارد، زیرا این طول موج‌ها به طور کامل توسط لایه اوزون جذب می‌شوند. UV-B از طریق لایه اوزون استراتوسفر فیلتر می‌شود و تنها مقدار کمی به سطح زمین می‌رسد. مقدار UV-B روی سطح زمین به عواملی مانند غلظت اوزون، زاویه تابش پرتوهای خورشید، مقدار رطوبت موجود در هوا، ارتفاع از سطح دریا بستگی دارد. UV-A توسط لایه اوزون جذب نمی‌شود و به طور کامل به سطح زمین می‌رسد. این اشعه توسط برخی مواد بیولوژیکی جذب شده و می‌تواند فرآیندهای فیزیولوژیکی را تحت تأثیر قرار دهد (Kakani et al. 2003). در بین این سه نوع اشعه ماوراءبنفش، UV-B علیرغم رسیدن مقادیر کمتر آن به سطح زمین (۱/۵ درصد از کل تابش) به دلیل اثرات مخرب شدید آن بر رشد و نمو گیاهان از اهمیت بالایی برخوردار است. تشعشعات

UV-A با حدود ۶/۳ درصد از کل تابش نسبت به سایر طول موج‌های تابش ماوراءبنفش اثرات سمی کمتری دارد (Nawkar et al. 2013; Yadav et al. 2020). لایه اپیدرم گیاهان مقادیر بسیار زیادی از این اشعه را جذب نموده و مانع رسیدن آن به سایر بخش‌های گیاهان می‌شوند (Kakani et al. 2003; Loconsole and Santamaria 2021).

گیاهان به دلیل وجود گیرنده‌های نوری مختلف، قادرند کیفیت (طول موج)، شدت، مدت (از جمله طول روز) و جهت نور را حس کنند. گیاهان با ایجاد شبکه پیچیده از ترانسکریپتوم تغییرات رشدی (جوانه‌زنی بذر، اتیلاسیون، حرکت روزنه و رشد تولیدمثلی در زمان گلدهی) را در پاسخ به نور کنترل می‌کنند. بخش‌های مهم تحت تاثیر پرتو ماوراءبنفش در سلول‌های گیاهی DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها و همچنین فرآیندهای حیاتی مانند فتوسنتز می‌باشد (Nawkar et al. 2013). تحقیقات مختلف نشان داده‌اند تابش UV-B پاسخ‌های فوتویی متنوعی از جمله مهار رشد هیپوکوتیل، گسترش لپه‌ها و تحریک بیوسنتز رنگدانه‌های محافظ UV-B را در گیاهان سبب می‌شود. تغییرات فیزیولوژیکی UV-C و UV-B از طریق پروتئین UVR8 (مقاومت در برابر اشعه ماوراءبنفش) به عنوان گیرنده نوری UV-B در سلول تنظیم می‌شود (Yadav et al. 2020; Heijde and Ulm 2012). تنش خفیف پرتو UV-B باعث تحریک پاسخ‌های فتومورفوز در گیاهان می‌شود در حالی که تنش شدید UV-B یا UV-C منجر به توقف چرخه سلولی، اختلال در عملکرد کلروپلاست و میتوکندری، فعال شدن پروتئین‌های شبه کاسپاز، تکه تکه شدن DNA الیگونوکلئوزومی و در نهایت مرگ برنامه ریزی شده سلولی (PCD) می‌شود (Nawkar et al. 2013). با این حال گیاهان، سلول‌ها و ساختمان‌های درون سلولی از طریق آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون رودکتاز و کاتالاز حفاظت می‌شود. علاوه بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بسیاری از متابولیت‌ها مانند گلوکاتایون، آسکوربیک اسید، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنلی با جاروب کردن رادیکال‌های آزاد موجب حفاظت گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند (Kakani et al. 2003; Loconsole and Santamaria 2021).

گزارش شده است UVR8 سبب القا ترکیبات جذب‌کننده UV، حذف ROS و پاسخ‌های دفاعی در مقابل با اشعه UV می‌شود (Nawkar et al. 2013; Yadav et al. 2020; Heijde and Ulm 2012). میزان خسارت در گیاهان زراعی و دارویی ممکن است بسته به عوامل محیطی، نوع گیاه، شدت تابش و نوع تابش متفاوت باشد. دانش کنونی در مورد تاثیر اکوفیزیولوژیکی اشعه ماوراءبنفش بر گیاهان محدود است بنابراین بررسی اثرات اشعه‌های ماوراءبنفش بر مراحل رشد گیاهان و شدت‌های مختلف تنش حائز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش اثرات UV-A، UV-B و UV-C بر رشد، القا تنش اکسیداتیو و مکانیسم‌های مقاومت گیاهیچه بادرنجبویه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

بذر گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرها در ظرف‌های حاوی پرلیت درشت: متوسط و ریز (۲:۱:۱) شسته شده و در خزانه کشت شدند. به دلیل وجود اندوخته در لپه‌ها، تا ظهور گیاهیچه‌ها (به مدت ۱۰ روز) ظروف کشت روزانه با آب آبیاری شدند. سپس هفته‌ای یک بار به گیاهان تا ظهور

برگ سوم اصلی محلول غذایی هوگلند با رقت یک پنجم آبیاری شدند (Hothem et al. 2003). پس از کامل شدن برگ دوم گیاهان به گلدان‌هایی به حجم ۷۰۰ میلی‌لیتری حاوی پرلیت شسته شده در گلخانه منتقل شدند. برای هر تیمار سه گلدان حاوی چهار گیاه در نظر گرفته شد و ۲ روز برای سازگاری گیاه با شرایط جدید در محلول غذایی هوگلند فرصت داده شد. تیمارهای UV-A، UV-B و UV-C (پس از بهینه‌سازی اولیه زمان تیماردهی) اعمال گردیدند. تیمار UV در محفظه‌ای از جنس پلکسی‌گلاس مستطیل شکل (۵۰×۴۰×۹۰ cm) حاوی لامپ‌های UV-C (با طول موج ۲۵۴ نانومتر)، UV-B (با طول موج ۳۱۲ نانومتر) و UV-A (با طول موج ۳۶۵ نانومتر) با توان ۸ وات و از هر لامپ دو عدد اعمال گردید. لامپ‌های استفاده شده ساخت شرکت Philips لهستان (مدل Actinic BL) بودند. پس از بهینه‌سازی اولیه، گیاهان بادرنجبویه بعد از مرحله ۷ برگی در مدت یک هفته روزانه در معرض پرتوهای ماوراءبنفش (UV-A و UV-B به مدت ۲۰ دقیقه، و UV-C به مدت ۳ دقیقه) در فاصله ۳۰ سانتی‌متری از لامپ‌های UV قرار گرفتند. گیاهان شاهد تحت تابش نور مرئی در اتاقک رشد قرار داده شده، کشت گیاهان در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی و دمای 17 ± 2 درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۵۰ درصد انجام شد. پس از پایان تیمارها، پارامترهای رشدی (وزن تر اندام هوایی، ریشه و برگ) از چهار گیاه هر گلدان اندازه‌گیری و میانگین آن برای هر گلدان لحاظ شد. سپس اکسیدان‌ها (ROS، H_2O_2 و MDA) و آنتی‌اکسیدان (آنتی‌اکسیدان کل، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم SOD) اندازه‌گیری شد.

مقدار رادیکال‌های آزاد فعال اکسیژن

محتوای گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) با روش زایلنول نارنجی تعیین شد (Bindschedler et al. 2001). برای این منظور ابتدا بافت برگ درون هاون چینی بافر فسفات سدیم ۵۰ mM با $pH=6/8$ ساییده شد. محلول همگن حاصل مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm در $4^\circ C$ در سانتریفیوژ مدل Hettich universal 320 R، آمریکا سانتریفیوژ گردید. جذب نوری محلول حاصل حاوی عصاره و زایلنول اورنج اسیدی در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. از غلظت‌های مختلف H_2O_2 برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج حاصل بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

مقدار H_2O_2

در این روش ابتدا ۰/۱ گرم از بافت برگ با ۱ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد (W/V) به کمک هاون چینی در حمام یخ کاملاً ساییده و همگن شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به ۵۰۰ میکرولیتر عصاره، ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۱۰۰ mM، $pH=7$) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. پس از همگن شدن جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۶۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید. از غلظت‌های مختلف ۳۰ درصد H_2O_2 برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و مقدار هیدروژن پراکسید بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه شد (Zlatev et al. 2006).

مقدار پراکسیداسیون چربی‌ها

مقدار پراکسیداسیون چربی‌ها به وسیله غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) توسط TBA-TCA اندازه‌گیری شد (Costa et al. 2002). جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Rayleigh, UV-1601) اندازه‌گیری شد. کدورت لیپیدهای غیر اختصاصی با کم کردن جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر اصلاح شد. ضریب خاموشی (ϵ) $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ در نظر گرفته شد. محتوای MDA به صورت $\mu\text{M g}^{-1} \text{ FW}$ گزارش شد.

آنتی‌اکسیدان کل براساس قدرت آنتی‌اکسیدان احیاءکنندگی یون فریک (FRAP)

برای این منظور مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (50 mM با $\text{pH} = 7$) در هاون چینی روی یخ سائیده شد. محلول همگن به دست آمده به اپندروف منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در 12000 rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از سانتریفیوژ پخچالدار، سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از عصاره رویی با ۹۵۰ میکرولیتر معرف TPTZ (2, 4, 6-tri (2-pyridyle) - 1, 3, 5 triazine) در تاریکی افزوده شد. سپس نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شد. جذب نوری نمونه‌ها (رنگ آبی) در طول موج ۵۹۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در ضمن از FeSO_4 برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و بلانک شامل ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (50 mM با $\text{pH} = 7$)، ۹۵۰ میکرولیتر معرف TPTZ بود. مقدار آنتی‌اکسیدان کل (FRAP) هر نمونه بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش گردید (Wojdyło et al. 2007).

ترکیبات فنلی

مقدار ترکیبات فنلی طبق روش Soland and Laima (1999) اندازه‌گیری شد. بر اساس این روش از اسید گالیک برای رسم معادله استاندارد استفاده و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش گردید.

آنتوسیانین‌ها

برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌های برگ از روش واگنر استفاده شد. جذب عصاره‌های متانول اسیدی در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شدند. بلانک متانول اسیدی بود و برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها، ضریب خاموشی (ϵ) 33000 سانتیمتر بر مول است (Wagner 1979). نتایج حاصل بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

فعالیت آنزیم SOD

برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (EC 1.15.1.1) با استفاده از سنجش مهار احیاء نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. فعالیت آنزیم SOD بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) محاسبه شد، (Giannopolitis and Ries 1977).

آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) در سه تکرار ($n=3$) انجام شد. قبل از انجام آنالیز داده‌ها، توزیع نرمالیته داده‌ها بررسی شد و بر این اساس برای صفات ROS، MDA، ترکیبات فنلی و آنتوسیانین با روش لگاریتمی، H_2O_2 با روش جذری و وزن تر اندام هوایی، ریشه و برگ با روش انعکاس، تبدیل داده صورت

گرفت تا توزیع نرمال برقرار شود. سپس تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون یک طرفه چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال خطا $p \leq 0.05$ از نرم افزار SPSS ۲۲ صورت پذیرفت.

نتایج و بحث:

نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌ها، نشان داد که اثرات تیمارهای UV بر کلیه شاخص‌های ارزیابی شده در سطح ۵ درصد معنی دار شد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثرات باندهای مختلف UV بر اکسیدان‌ها مانند رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، آب اکسیژنه (H_2O_2) و مالون‌دآلدئید (MDA)، آنتی‌اکسیدان نظیر آنتی‌اکسیدان کل، ترکیبات فنلی (Phenolic)، آنتوسیانین‌ها (Antho) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و وزن تر (اندام هوایی، ریشه و برگ) گیاهچه‌های بادرنجبویه.

Table 1- Analysis of variance (mean square) of the effects of different UV bands on oxidants such as oxygen free radicals (ROS), hydrogen peroxide (H_2O_2) and malonaldehyde (MDA), antioxidants such as total antioxidant, phenolic compounds (Phenolic), anthocyanin (Antho) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activity and fresh weight (shoot, root and leaf) of *Melissa officinalis* seedlings.

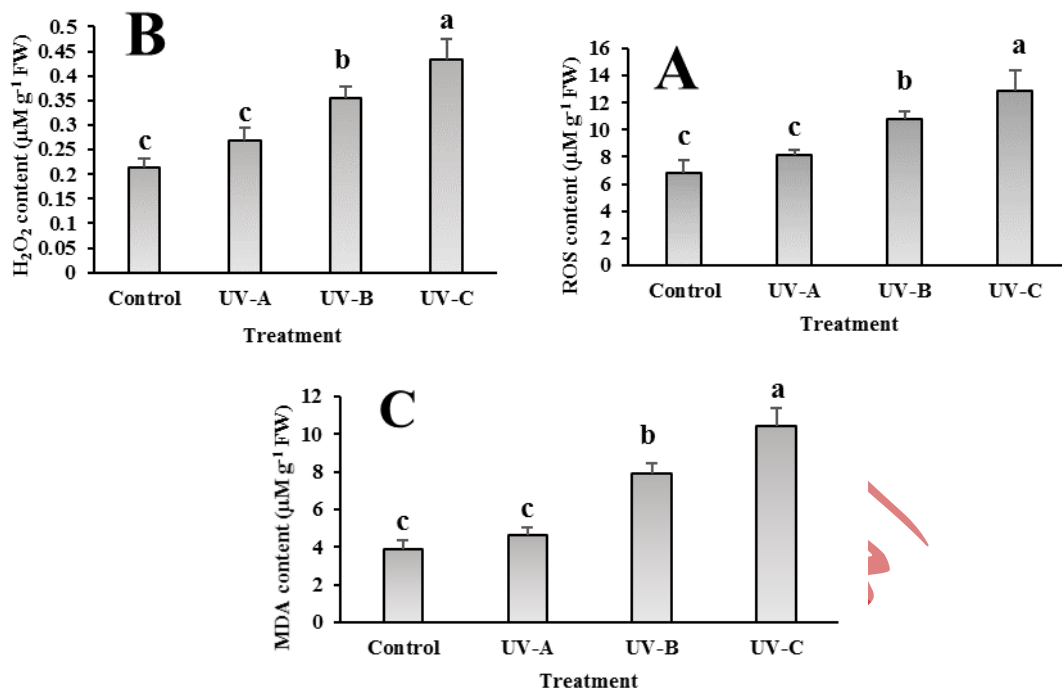
Source of variation	df	ROS	H_2O_2	MDA	Total antioxidant	Phenolic	Antho	SOD	Shoot FW	Root FW	Leaf FW
Treatment	3	65.8**	0.085**	68.0**	23.9**	13.20**	578.5**	5266.5*	0.13**	0.028**	0.002**
Error	8	7.70	0.007	4.65	8.09	0.60	97.89	277.21	0.003	0.002	0.000
CV (%)	-	12.2	14.5	11.5	14.1	10.2	5.7	11.19	1.6	7.9	3.4

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد

* and ** respectively significant at 5 and 1 percent probability.

محتوای اکسیدان

در این مطالعه محتوای اکسیدان‌ها با تولید ROS، H_2O_2 و MDA (پراکسیداسیون لیپیدها) اندازه‌گیری شد (شکل ۱). نتایج نشان داد بین شاخص‌های اکسیدان نظیر ROS، H_2O_2 و MDA در گیاهان تیمار شده $(R^2) 0/9$ همبستگی مثبت وجود دارد (جدول ۲). مقدار ROS، H_2O_2 و MDA گیاهچه‌های تیمار شده با UV-A در مقایسه با گیاهان شاهد تفاوت معنی داری نشان نداد. پرتوهای UV-B و UV-C مقادیر ROS، H_2O_2 و MDA را به طور معنی داری افزایش دادند، این افزایش‌ها در گیاهان تیمار شده با UV-B به ترتیب ۵۹، ۶۷ و ۱۰۳ درصد و در تیمار با UV-C به ترتیب ۸۹، ۱۰۴ و ۱۶۶ درصد بود. بنابراین اثرات پرتوهای UV-B و UV-C بر MDA شدیدتر از ROS و H_2O_2 است.



شکل ۱: تاثیر باندهای مختلف اشعه ماوراءبنفش بر مقدار تولید ROS (A)، H₂O₂ (B) و MDA (C) در برگ گیاهچه‌های بادرنجبویه. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

Figure 1: The effect of different bands of ultraviolet rays on (A) ROS and (B) H₂O₂ and (C) MDA content of *Melissae officinalis* seedlings. The data are mean of 3 replicates ±SD. The same letters indicate no significant difference using Duncan's test.

جدول ۲: ضرایب همبستگی بین پارامترهای اندازه‌گیری شده گیاهچه‌های بادرنجبویه در پاسخ به باندهای مختلف اشعه ماوراء بنفش.

Table 2- Correlation matrices showing relationships between measured parameters of *Melissae officinalis* seedlings in response to different bands of ultraviolet rays.

	ROS	H ₂ O ₂	MDA	FRAP	Phenolic	Anthocyanin	SOD	Shoot FW
H ₂ O ₂	.901**	1						
MDA	.898**	.891**	1					
FRAP	0.549	0.538	0.54	1				
Phenolic	.587*	.670*	.678*	.655*	1			
Anthocyanin	.655*	.723**	.608*	.865**	.696*	1		
SOD	.659*	.736**	.609*	.580*	.881**	.622*	1	
Shoot FW	-.917**	-.912**	-.932**	-0.425	-.662*	-0.518	-.601*	1
Root FW	-.858**	-.919**	-.952**	-.627*	-.756**	-.749**	-.700*	.875**

** و * همبستگی در سطوح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ معنی‌دار است.

**and * Correlation is significant at the 0.01 and 0.05 levels.

گزارش شده پرتوهای UV منجر به افزایش اکسیدان‌ها در گیاه ماش (Rezayi Far et al. 2018) و بادرنجبویه در کشت خاکی (Pourakbar and Abedzadeh 2014) شد. پرتوهای UV-B و UV-C به دلیل فتواکسیداسیون بخش‌های تیلاکوئید کلروپلاست و غشا میتوکندری منجر به انتقال الکترون‌ها به O₂ و تشکیل گونه‌های فعال

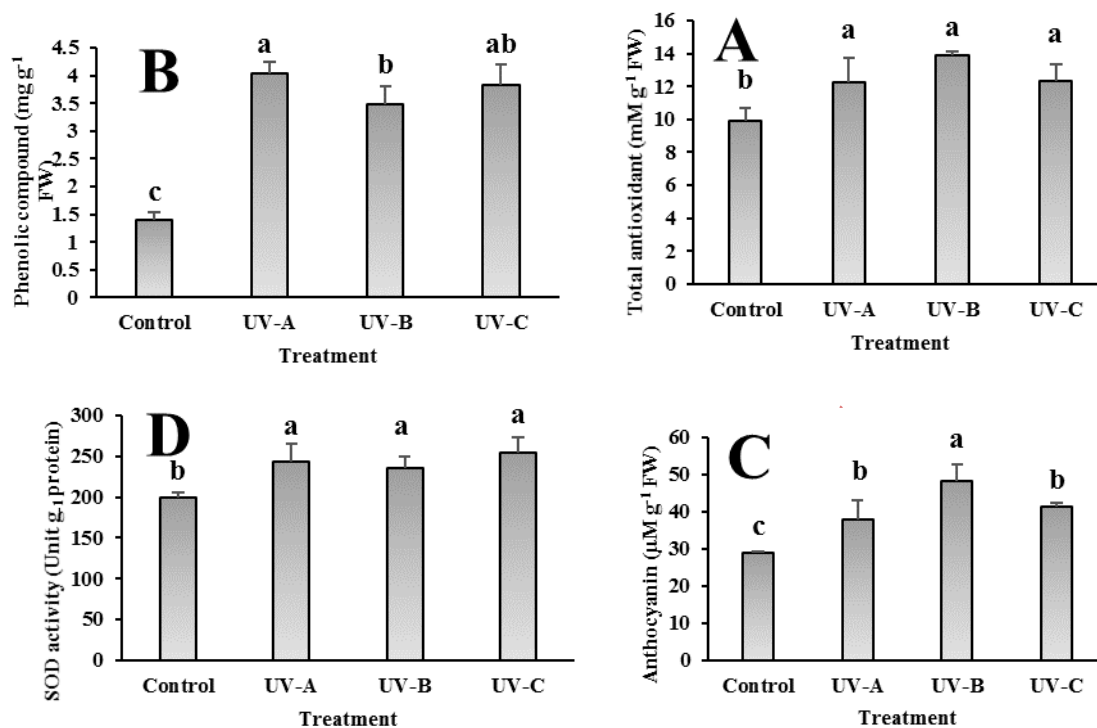
اکسیژن مانند O_2^- ، H_2O_2 و رادیکال OH می‌شود. یکی از اشکال ROS، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است که می‌تواند به عنوان تنظیم کننده سوخت‌وساز سلول و بیان ژن‌ها نقش داشته باشد. بنابراین، H_2O_2 به عنوان یک مولکول سیگنالی یا پیام‌رسان برای بقاء سلول‌ها حائز اهمیت است. اما مقادیر زیاد این ماده می‌تواند به سلول‌ها آسیب برساند. H_2O_2 پایداری بیشتری نسبت به سایر ROS ها دارد و می‌تواند به راحتی از غشاء عبور کند. تابش‌های ماوراءبنفش منجر به تحریک واکنش‌های فتوشیمیایی شده، منجر به تولید ROS و در نهایت آسیب به DNA، پروتئین‌ها، چربی‌ها گردد. بنابراین پایداری غشا به علت جذب مستقیم اشعه توسط غشاء و یا اثرات غیرمستقیم (ROS) به خطر می‌افتد. ROS تولید شده در سلول‌های گیاهی در شرایط تنش، بسیار واکنش‌پذیر و سمی بوده و منجر به آسیب اکسیداتیو به DNA، پروتئین‌ها و پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شوند (Nawkar et al. 2013; Hideg et al. 2013). واکنش‌های پراکسیداسیون با توجه به تعداد و موقعیت باندهای دوگانه متفاوت می‌باشند. در مرحله ابتدایی رادیکال‌های هیدروکسیل آزاد شده با یک مولکول هیدروژن اسید چرب واکنش داده و گروه وینیل برداشته می‌شود. سپس باقیمانده مرحله قبل با اکسیژن سه‌تایی واکنش داده و ایجاد یک رادیکال پراکسی و آلکوکسی می‌کند که این رادیکال با برداشتن دومین اتم هیدروژن اسید چرب، یک لیپید هیدروپراکسی تولید می‌کند. در مراحل بعدی انواع آلدئیدها و هیدروکربن‌ها از باقیمانده اسیدهای چرب ایجاد می‌شوند که یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدها، مالون‌دآلدئید (MDA) می‌باشد. غالباً پراکسیداسیون لیپیدها ناشی از رادیکال‌های آزاد مربوط به اسیدهای چرب غیراشباع مثل لینولئیک اسید و لینولئیک اسید می‌باشد. اثرات این آسیب ناشی از تنش نوری سبب غیرقطبی شدن غشاء، افزایش نفوذپذیری غشاء، خروج پتاسیم، ورود یون کلر، تخریب غشا اندامک‌های درون سلولی و افزایش کلروز و نکروز می‌گردد (Nawkar et al. 2013; Kakani et al. 2003; Costa et al. 2002).

محتوای آنتی‌اکسیدان

نتایج مربوط به محتوای آنتی‌اکسیدان (آنتی‌اکسیدان کل براساس روش FRAP، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم SOD) در شکل ۲ آورده شده است. سیستم آنتی‌اکسیدانی در سلول‌ها قادر به حذف مولکول‌های ROS می‌باشند. روش‌های زیادی برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های گیاهی وجود دارد. اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل به روش FRAP براساس قدرت احیاء کنندگی یون فریک تبدیل یون فریک (Fe^{+3}) به یون فرو (Fe^{+2}) در pH پایین و تغییر کمپلکس فریک-TPTZ (قهوه‌ای خیلی کم رنگ) به کمپلکس فرو-TPTZ (آبی رنگ) می‌باشد (Wojdyło et al. 2007). اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم SOD نشانگر خوبی برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه است و به طور گسترده برای سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان تحت تنش استفاده می‌گردد (Wagner 1979; Wojdyło et al. 2007).

نتایج آنالیز واریانس جاصل از داده‌ها نشان داد کلیه شاخص‌های آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری در این پژوهش در تمام گیاهچه‌های تیمار شده با UV افزایش نشان داد، اما الگوی تغییرات در شاخص‌های در برخی موارد متفاوت بود. این افزایش در روش FRAP در تیمارهای UV-A، UV-B و UV-C به ترتیب ۲۳، ۴۰ و ۲۴ درصد

بود (شکل ۲-A). درحالیکه مقدار ترکیبات فنلی تحت تاثیر UV-A، UV-B و UV-C به ترتیب ۱۸۷، ۱۴۸ و ۱۷۳ درصد افزایش یافت (شکل ۲-B). به طوریکه بین مقادیر FRAP با ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم SOD در گیاهان تیمار شده به ترتیب ۰/۶۵، ۰/۸۶ و ۰/۵۸ (R^2) همبستگی مثبت وجود دارد (جدول ۲). در شرایط تنش UV ترکیبات متفاوتی از فنولیک‌های با وزن مولکولی کم (فلاونوئیدها) تا فنولیک‌هایی با وزن مولکولی بالا (تانن‌ها) تولید می‌شود. نقش اساسی این ترکیبات محافظت از گیاهان در برابر تنش اکسیداتیو در مواجهه با تابش ماوراءبنفش می‌باشد (Loconsole and Santamaria 2021; Wojdyło et al. 2007). مقدار آنتوسیانین‌ها به ترتیب افزایش ۳۲، ۶۷ و ۴۳ درصدی را در گیاهچه‌های تیمار UV-A، UV-B و UV-C نشان داد (شکل ۲-C). این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران بر روی گیاه گوجه فرنگی (Bijami et al. 2011)، سه رقم گندم (Rezayi Far et al. 2018) و کاهو (Ranjbar and Mousavi 2018) مطابقت دارد. بسیاری از ترکیبات فنیل پروپانوید مانند مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید، گلوکاتیون، اسید اسکوربیک، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین از غشاء و ساختارهای درون سلولی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از UV محافظت می‌کنند (Singh et al. 2023; Loconsole and Santamaria 2021; Yadav et al. 2020). گزارش شده این ترکیبات تحت اثرات UV-B و UV-C در برگ‌های بالغ در واکنش سلولهای اپیدرم فوقانی و زیرین بیشتر گیاهان تجمع می‌کند. آنتوسیانین‌ها از نظر ساختمانی مشابه فلاونوئیدها بوده و یک گروه از گروه ترکیبات فنلی در گیاهان هستند. آنتوسیانین‌ها با تغییر کیفیت و کمیت نور جذب شده و جاروب کردن رادیکال‌های آزاد قادر به فیلتر کردن پرتوهای UV و کاهش اثرات این پرتوها در گیاهان می‌باشند. ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها از مسیر فنیل پروپانویدی سنتز می‌شوند، تعداد زیادی از آنزیم‌های کلیدی این مسیر تحت تاثیر UV فعال می‌شوند (Singh et al. 2023; Loconsole and Santamaria 2021; Hideg et al. 2013). بنابراین افزایش این مواد آلی در گیاهان ناشی از اثر القایی پرتوهای UV بر ژن‌های کد کننده آنزیم‌های این مسیر است. مقدار فعالیت آنزیم SOD در گیاهچه‌های تیمار شده با اشکال مختلف UV حدود ۲۸-۱۸ درصد در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش داد (شکل ۲-D). افزایش مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه آفتابگردان و ماش تحت تیمار UV-B گزارش شده است. افزایش فعالیت آنزیم SOD سطح ROS را در گیاهان تحت شرایط تنش کاهش می‌دهد (Costa et al. 2002; Rezayi Far et al. 2018). به‌طور کلی پرتوهای UV-B و UV-C با وجود افزایش اجزاء سیستم آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی و آنزیمی (نظیر SOD) منجر به افزایش مقدار ROS، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، تغییر در متابولیسم یون فریک، تغییر در مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد و در نهایت آسیب سلول شد. این سیستم قادر به مهار صد درصدی اثرات ناشی از این پرتوها در گیاهان نبودند (Costa et al. 2002; Loconsole and Santamaria 2021).



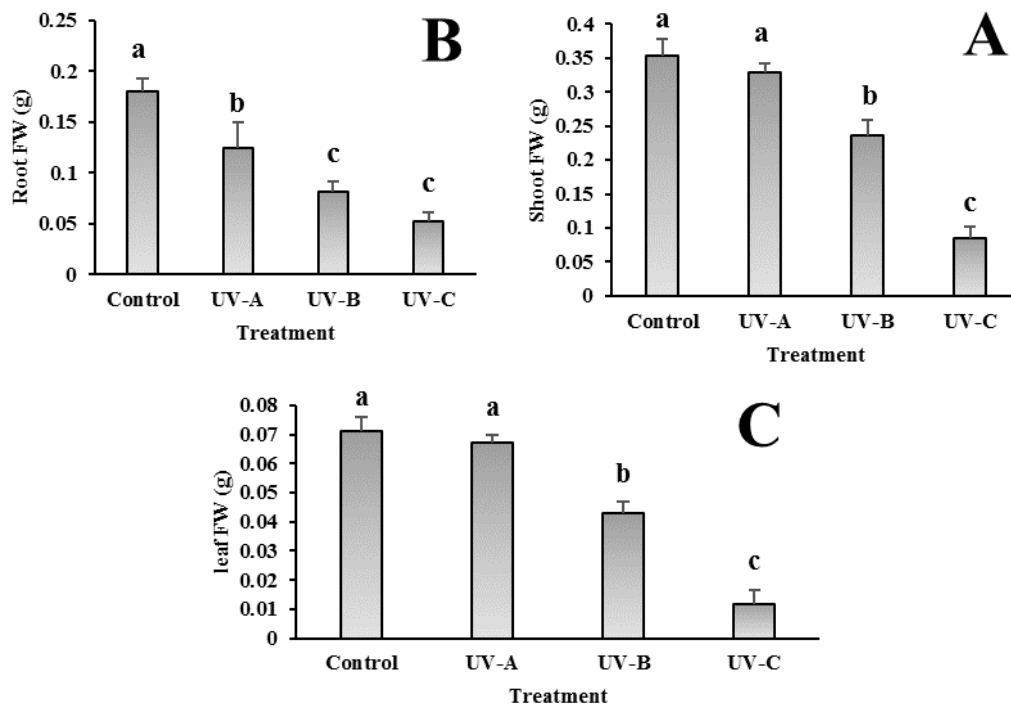
شکل ۲: تاثیر باندهای مختلف اشعه ماوراءبنفش بر (A) مقدار آنتی اکسیدان کل -FRAP، (B) ترکیبات فنلی، (C) آنتوسیانین ها و (D) فعالیت SOD در گیاهچه های بادرنجبویه. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.

Figure 2: The effect of different bands of ultraviolet rays on (A) amount of total antioxidant-FRAP, (B) phenolic compounds, (C) anthocyanin and (D) SOD activity of *Melissa officinalis* seedlings. The data are mean of 3 replicates \pm SD. The same letters indicate no significant difference using Duncan's test.

وزن تر گیاه

در این پژوهش بررسی اثرات پرتوهای مختلف ماوراءبنفش روی وزن تر اندام هوایی نشان داد پرتوهای UV-B و UV-C به ترتیب ۳۳ و ۷۶ درصد نسبت به شاهد وزن تر را کاهش داد. اما UV-A تاثیر معناداری بر وزن تر اندام هوایی نداشت (شکل A-۳). تمام غلظت های تحت تیمار پرتوهای مختلف UV در مقایسه با گروه شاهد به طور قابل توجهی منجر به کاهش وزن تر ریشه شد. پرتوهای UV-B و UV-C به ترتیب باعث کاهش ۳۴/۶ و ۳۵/۵ درصدی وزن تر ریشه در مقایسه با UV-A شدند (شکل B-۳). تغییرات مقدار وزن تر برگ تحت تیمارهای مختلف UV الگویی مشابه تغییرات مقدار وزن تر اندام هوایی داشت. با این تفاوت که شدت کاهش وزن تر برگ تحت تیمارهای پرتوهای UV-B و UV-C شدیدتر بود (شکل C-۳). همچنین این نتایج حساسیت بیشتر گیاهچه های بادرنجبویه به UV-C در مقایسه با UV-B را نشان داد. پرتوهای UV-A تغییر معناداری بر مقدار وزن تر برگ نداشت. نتایج این پژوهش با یافته های بسیاری از پژوهشگران بر روی گیاه بامیه (Kargar Khorrami et al. 2013)، دو رقم کدو (Hagihosseini et al. 2016) و بادرنجبویه در کشت خاکی (Pourakbar and Abedzadeh 2014) مطابقت دارد. کاهش وزن در تیمارهای UV بیانگر کاهش تولید بیومس است که یک پاسخ عمومی در بسیاری از گونه های گیاهی می باشد. پرتوهای UV با تشکیل دایمرهای پریمیدین پریمیدین و

پریمیدین سیکلوبوتان ، منجر به کاهش همانندسازی DNA و کاهش تقسیم سلولی می شود (Kakani et al. 2003; Yadav et al. 2020). از طرف دیگر، کاهش مقدار اکسین به طور مستقیم یا غیرمستقیم تحت تاثیر پرتوهای UV رخ داده و سبب کاهش انعطاف پذیری دیواره سلولی و مهار رشد در گیاهان می گردد (Loconsole and Santamaria 2021; Yadav et al. 2020).



شکل ۳: تاثیر باندهای مختلف اشعه ماوراءبنفش بر مقدار وزن تر اندام هوایی (A)، ریشه (B) و برگ (C) گیاهچه های بادرنجبویه. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است. Figure 3: The effect of different bands of ultraviolet rays on the fresh weight of (A) shoot, (B) root and (C) leaves of *Melissa officinalis* seedlings. The data are mean of 3 replicates \pm SD. The same letters indicate no significant difference using Duncan's test.

نتیجه گیری:

نتایج نشان داد گیاهچه های بادرنجبویه در مواجهه با پرتوهای ماوراءبنفش متحمل تغییرات فیزیولوژی شد. افزایش مقدار آنتی اکسیدان در تیمارهای UV به گیاهان اجازه می دهد تا در شرایط تنش اکسیداتیو زنده بمانند؛ اما همچنان سبب آسیب (افزایش اکسیدان ها و کاهش وزن تر) به این گیاه شد. بنابراین بادرنجبویه گیاهی حساس به تنش ناشی از پرتوهای ماوراءبنفش است.

Studying of the effect of different ultraviolet (UV) radiation bands on oxidative stress induction and resistance mechanisms in lemon balm (*Melissa officinalis*) seedlings

Abstract

The destruction of the ozone layer leads to the penetration of some harmful solar radiations such as ultraviolet light into the atmosphere. These radiations have a negative effect on the growth and development of plants. The current study investigated the effect of three UV radiation bands on plant growth, oxidative stress induction and defense mechanisms in *Melissa officinalis* seedlings. The experiment was conducted in hydroponics system under Completely Randomized Plan with three replicates. The seedlings after seven-leaf stage were exposed to UV-A and UV-B for 20 min, and UV-C for three min daily for one week. The effect of different UV bands was reported on oxidants such as oxygen free radicals (ROS), hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA), antioxidants (total antioxidants, phenolic compounds, anthocyanin and superoxide dismutase (SOD) enzyme activity), and seedling growth. The results revealed that UV-A radiation did not induce a significant effect on ROS, H₂O₂ and MDA contents compared with those of the control. However, under UV-B and UV-C ROS, H₂O₂ and MDA contents showed 59-89, 67-104 and 103-166 % increase compared with the control. All of the studied anti-oxidants' content was increased under three different UV radiations. The highest increase was reported for phenolic compounds with 148-178% compared with the control. The oxidants content increase under UV-B and UV-C indicated that the plants anti-oxidant system was unable to sweep ROS and reduce the stress. Consequently, the radiation treatments reduced root and shoots fresh weight. Overall, the results indicated that lemon balm plant were sensitive to UV radiations.

Key words: Lemongrass plant, Reactive oxygen radical, Ultraviolet rays, Ultraviolet

منابع:

- Bijami A, Rezanejad F, Sasan HA (2011) The effects of post-harvest UV-B radiation on some antioxidant compounds, PAL activity and total protein contents of ripe red tomato (*Lycopersicon esculentum*). Iranian Journal of Plant Biology 2 (6):29-38
- Bindschedler LV, Minibayeva F, Gardner SL, Gerrish C, Davies DR, Bolwell GP (2001) Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺. New Phytologist 151 (1):185-194
- Costa H, Gallego SM, Tomaro MaL (2002) Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. Plant Science 162 (6):939-945
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant physiology 59 (2):309-314
- Hagihosseini N, Hosseini sargein S, Jamei R (2016) The study of interactive effects of UV-B Radiation and drought stress on some physiological traits of two cultivar of gourd (*Cucurbita pepo* L.). Iranian Journal of Plant Physiology and Biochemistry 1 (2):16-26
- Heijde M, Ulm R (2012) UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. Trends in plant science 17 (4):230-237

- Hideg É, Jansen MA, Strid Å (2013) UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in plant science* 18 (2):107-115
- Hothem SD, Marley KA, Larson RA (2003) Photochemistry in Hoagland's nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition* 26 (4):845-854
- Kakani V, Reddy K, Zhao D, Sailaja K (2003) Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricultural and forest meteorology* 120 (1-4):191-218
- Kargar Khorrami S, Jamei R, Hosseini Sarghein S (2013) Changes in physiological anatomical and parameters of okra (*Hibiscus esculentus* L.) under different ultraviolet radiation. *Iranian Journal of Plant Biology* 5 (16):13-26
- Loconsole D, Santamaria P (2021) UV lighting in horticulture: A sustainable tool for improving production quality and food safety. *Horticulturae* 7 (1):9
- Nawkar GM, Maibam P, Park JH, Sahi VP, Lee SY, Kang CH (2013) UV-induced cell death in plants. *International journal of molecular sciences* 14 (1):1608-1628
- Pourakbar L, Abedzadeh M (2014) Effects of UV-B and UV-C radiation on antioxidative enzymes activity of *Melissa officinalis* and influences of salicylic acid in UV-stress ameliorations. *Iranian Journal of Plant Biology* 6 (21):23-34
- Ranjbar A, Mousavi SA (2018) The effects of Enhanced Ultraviolet-B Radiation and Heavy Metal Cadmium on Some Physiological Parameters of Lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Research Journal* 30 (4):853-861
- Rezayi Far Z, Fallahi S, Gholinezhad E (2018) The effect of drought stress and Ultraviolet on antioxidant defensive system of enzyme and non-enzyme in three varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Process and Function* 7 (24):155-170
- Singh P, Singh A, Choudhary KK (2023) Revisiting the role of phenylpropanoids in plant defense against UV-B stress. *Plant Stress*:100143
- Soland S, Laima S (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1:1-5
- Wagner GJ (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology* 64 (1):88-93
- Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry* 105 (3):940-949
- Yadav A, Singh D, Lingwan M, Yadukrishnan P, Masakapalli SK, Datta S (2020) Light signaling and UV-B-mediated plant growth regulation. *Journal of Integrative Plant Biology* 62 (9):1270-1292
- Zlatev Z, Lidon F, Ramalho J, Yordanov I (2006) Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum* 50:389-394

آماده انتشار و پراکنش نشده