



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>

IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY

E-ISSN: 2322-2204

Vol. 14, Issue, No. 2, Summer 2022

Document Type: Research Paper

Received: 05/03/2023

Accepted: 05/09/2023

Investigating the Effect of Different Ultraviolet (UV) Radiation Bands on Oxidative Stress Induction and Resistance Mechanisms in Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Seedlings

Maryam Mazaheri-Tirani^{1*}, Mohammad Felfelian², Soleyman Dayani³

¹ Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran

² Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran

³ Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran

Abstract

The destruction of the ozone layer leads to the penetration of some harmful solar radiation, such as ultraviolet rays into the atmosphere. These radiations have negative effects on plants' growth and development. 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 a hydroponics system under a completely randomized plan with three replicates. The seedlings, after a 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), 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-oxidant content increased under three different UV radiations. The highest increase was reported for phenolic compounds with 148-178% compared with the control. The oxidant content increased under UV-B, and UV-C indicating that the plants' anti-oxidant system was unable to sweep ROS and reduce the stress. Consequently, the radiation treatments reduced root and shoot fresh weight. Overall, the results indicated that the lemon balm plant was sensitive to UV radiation.

* Corresponding Author: mazaheri@ujiroft.ac.ir



Introduction

Plants need light for photosynthesis and respond to light through different photoreceptors. Apart from active photosynthetic rays (PAR), plants are also exposed to other rays including ultraviolet (UV) light. Ultraviolet rays are classified based on their wavelengths into UV-C (200-280 nm), UV-B (280-320 nm), and UV-A (320-390 nm). UV-C is the most dangerous range of ultraviolet light that is completely absorbed by the ozone layer. UV-B is very important because of its severe destructive effects on the growth and development of plants. UV-A radiation has less toxic effects than other wavelengths of ultraviolet radiation. Plants control growth and development changes in response to UV by creating a complex network of transcriptomes. Severe UV-B or UV-C stress leads to cell cycle arrest, chloroplast and mitochondrial dysfunction, DNA fragmentation, and finally programmed cell death (PCD). The amount of damage in plants varies depending on environmental factors, plant species, intensity of radiation, and type of radiation. Current knowledge about the eco-physiological impact of UV radiation on plants is limited. In this study, the effects of UV-A, UV-B, and UV-C on growth, induction of oxidative stress and resistance mechanisms of *Melissa officinalis* seedlings were studied.

Materials and Methods

The seeds of *Melissa officinalis* were grown in containers with perlite. After germination, plants were transferred to pots containing washed perlite and irrigated with Hoagland's nutrient solution with one-fifth dilution. The lemon balm plants were exposed to ultraviolet rays (UV-A and UV-B for 20 minutes, and UV-C for 3 minutes) for one week after the 7-leaf stage. The control plants were exposed to visible light in the growth chamber. At the end of the treatments, growth parameters (fresh weight of shoots, roots, and leaves), oxidants (ROS, H₂O₂, and MDA), and antioxidants (total antioxidants, phenolic compounds, anthocyanins, and SOD enzyme activity) were measured. The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD) with three replications (n=3). The analysis of variance (ANOVA) and SPSS 22 software were used for the statistical analysis of the data. Mean data were compared by Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$).

Results and Discussion

The results of the study revealed that there is a positive correlation of 0.9 (R^2) between oxidant indices, such as ROS, H₂O₂, and MDA in the treated plants. The amount of oxidants in seedlings treated with UV-A did not show any significant difference in comparison with the control plants. UV-B and UV-C rays increased oxidant contents. UV-B and UV-C rays lead to the transfer of electrons to O₂ and the formation of active oxygen species due to the photo-oxidation of the chloroplast membrane and mitochondria. The produced ROS are highly reactive and lead to oxidative damage to DNA, proteins, and lipid peroxidation. The antioxidant system in cells was able to remove ROS molecules.

The results of the analysis of variance obtained from the data showed that all the antioxidant indices measured in this study increased in all of the seedlings treated with UV. The increase of these organic compounds in plants was probably due to the induction effect of UV rays on the genes encoding the enzymes of relevant pathways. However, UV-B and UV-C rays led to an increase in the amount of ROS, increased lipid peroxidation, and ultimately cell damage, despite the increase in non-enzymatic

and enzymatic antioxidant system components. This system was not able to control 100% of the effects caused by these rays in plants. Therefore, it led to the reduction of biomass in UV treatments, which was a general response in many plant species under severe stress conditions.

Conclusion

Considering the result of the present study, *Melissa officinalis* seedlings showed physiological changes when exposed to ultraviolet rays. Increasing the amount of antioxidants in UV treatments allowed plants to survive under oxidative stress conditions, but it still caused damage (e.g. oxidants increase and weight decrease) to the plant. Therefore, *Melissa officinalis* was sensitive to stress caused by ultraviolet rays.

Keywords: Ultraviolet Rays, Lemongrass Plant, Ultraviolet, Reactive Oxygen Radical

مطالعه اثر باندهای مختلف پرتوهای ماورابنفش (UV) بر القای تنش اکسیداتیو و سازوکارهای مقاومت به آن در گیاهچه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)

مریم مظاهری تیرانی^{۱*}، محمد فلفلان^۲، سلیمان دیانی^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه جیرفت، جیرفت، کرمان، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

^۳ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

چکیده

تخریب لایه ازون به نفوذ برخی پرتوهای خورشیدی مخرب نظیر طیف‌های نور ماورابنفش (UV) به اتمسفر منجر می‌شود؛ این پرتوها بر رشدونمو گیاهان تأثیر منفی می‌گذارند. هدف مطالعه حاضر، بررسی تأثیر UV بر رشد، القای تنش اکسیداتیو و سازوکارهای مقاومت گیاهچه بادرنجبویه بود. پژوهش حاضر در شرایط هیدروپونیک و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. گیاهان بادرنجبویه پس از مرحله هفت برگی، به مدت یک هفته در معرض پرتوهای ماورابنفش (UV-A و UV-B به مدت ۲۰ دقیقه و UV-C به مدت ۳ دقیقه در روز) قرار گرفتند. در پژوهش حاضر، تأثیر باندهای مختلف این اشعه بر اکسیدان‌ها مانند رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، آب‌اکسیژنه (H_2O_2) و مالون‌دآلدئید (MDA) و آنتی‌اکسیدان‌ها (آنتی‌اکسیدان کل، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)) و رشد بادرنجبویه مطالعه شد. نتایج نشان دادند مقدار ROS، H_2O_2 و MDA در گیاهچه‌های تیمار شده با UV-A نسبت به گیاهان شاهد تفاوت معناداری ندارد. مقدار ROS، H_2O_2 و MDA در شرایط تیمار پرتوهای UV-B و UV-C به ترتیب حدود ۵۹-۸۹، ۱۰۴-۶۷ و ۱۰۳-۱۶۶ درصد افزایش یافت. تمام آنتی‌اکسیدان‌های مطالعه‌شده در پژوهش حاضر طی تیمار با هر سه پرتو ماورابنفش افزایش نشان دادند. بیشترین افزایش آنتی‌اکسیدان به ترکیبات فنلی با ۱۴۸ تا ۱۸۷ درصد تعلق داشت. افزایش اکسیدان در گیاهان تیمار شده با UV-B و UV-C، کارایی‌نداشتن سیستم آنتی‌اکسیدان گیاهچه بادرنجبویه در جارو کردن ROS و بهبود تنش را نشان داد. پرتوهای UV سبب کاهش وزن تر ریشه و اندام هوایی شدند. به‌طور کلی، نتایج پژوهش حاضر حساسیت گیاهچه بادرنجبویه به پرتو ماورابنفش را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: اشعه‌های ماورابنفش، گیاه بادرنجبویه، ماورابنفش، رادیکال فعال اکسیژن



مقدمه

اهمیت زیادی است. تشعشعات UV-A با حدود ۶/۳ درصد از کل تابش نسبت به سایر طول موج‌های تابش ماورابنفش، آثار سمی کمتری دارد (Nawkar et al., 2013; Yadav et al., 2020)؛ لایه اپیدرم گیاهان مقادیر بسیار زیادی از این اشعه را جذب می‌کند و مانع رسیدن آن به سایر بخش‌های گیاه می‌شود (Kakani et al., 2003; Loconsole & Santamaria, 2021).

گیاهان با داشتن گیرنده‌های نوری مختلف می‌توانند کیفیت (طول موج)، شدت، مدت (از جمله طول روز) و جهت نور را حس کنند. گیاهان با ایجاد شبکه پیچیده‌ای از ترانسکریپتوم، تغییرات رشدی (جوانه‌زنی بذری، اتیلاسیون، حرکت روزنه و رشد تولیدمثلی در زمان گل‌دهی) را در پاسخ به نور کنترل می‌کنند. بخش‌های مهم تحت تأثیر پرتو ماورابنفش در سلول‌های گیاهی عبارتند از: DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها و همچنین فرایندهای حیاتی مانند فتوسنتز (Nawkar et al., 2013). پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند تابش UV-B پاسخ‌های فنوتیپی متنوعی از جمله مهار رشد هیپوکوتیل، گسترش لپه‌ها و تحریک بیوسنتز رنگدانه‌های محافظ UV-B را در گیاهان سبب می‌شود. تغییرات فیزیولوژیکی ناشی از UV-C و UV-B از طریق پروتئین UVR8 (مقاومت در برابر اشعه ماورابنفش) به‌عنوان گیرنده نوری UV-B در سلول تنظیم می‌شود (Yadav et al., 2020; Heijde & Ulm, 2012). تنش خفیف پرتو UV-B سبب تحریک پاسخ‌های فتومورفوزن در گیاهان می‌شود؛ درحالی‌که تنش شدید UV-B یا UV-C به توقف چرخه سلولی، اختلال در عملکرد

گیاهان برای فتوسنتز به نور نیاز دارند و از طریق گیرنده‌های نوری مختلف به نور پاسخ می‌دهند. نور مراحل مختلف رشد و فرایندهای فیزیولوژیکی حیاتی در طول چرخه زندگی گیاهان را تنظیم می‌کند. گیاهان به‌جز اشعه‌های فعال فتوسنتزی (PAR، ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر)، در معرض نور ماورابنفش (UV) نیز قرار می‌گیرند که از نظر واکنش‌های شیمیایی بسیار فعال است. اشعه ماورابنفش به‌طور گسترده بر اساس طول موج به UV-C (۲۰۰ تا ۲۸۰ نانومتر)، UV-B (۲۸۰ تا ۳۲۰ نانومتر) و UV-A (۳۲۰ تا ۳۹۰ نانومتر) طبقه‌بندی می‌شود (Kakani et al., 2003; Nawkar et al., 2013; Loconsole & Santamaria, 2021).

C (خطرناک‌ترین محدوده نور ماورابنفش) آثار ناچیزی بر گیاهان دارد؛ زیرا لایه ازون این طول موج‌ها را به‌طور کامل جذب می‌کند. UV-B از طریق لایه ازون استراتوسفر فیلتر می‌شود و تنها مقدار کمی از آن به سطح زمین می‌رسد. مقدار UV-B روی سطح زمین به عواملی مانند غلظت ازون، زاویه تابش پرتوهای خورشید، مقدار رطوبت موجود در هوا و ارتفاع از سطح دریا بستگی دارد. لایه ازون، UV-A را جذب نمی‌کند و به‌طور کامل به سطح زمین می‌رسد؛ برخی مواد زیستی این اشعه را جذب می‌کنند و در نتیجه فرایندهای فیزیولوژیکی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Kakani et al., 2003). در بین سه نوع اشعه ماورابنفش، اگرچه مقادیر کمتری از UV-B (۱/۵ درصد از کل تابش) به سطح زمین می‌رسد، این اشعه آثار مخرب شدیدی بر رشد و نمو گیاهان دارد و از این رو، دارای

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 و در خزانه کشت شدند. باتوجه به وجود اندوخته در لپه‌ها، ظروف کشت تا ظهور گیاهچه‌ها (به مدت ۱۰ روز) روزانه با آب و سپس تا ظهور برگ سوم اصلی، هفته‌ای یک بار با 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 میلی‌لیتر حاوی پرلیت شسته شده در گلخانه منتقل شدند. برای هر تیمار، سه گلدان حاوی چهار گیاه در نظر گرفته شد و دو روز برای سازگاری گیاه با شرایط جدید در محلول غذایی هوگلند فرصت داده شد. پس از بهینه‌سازی اولیه زمان تیماردهی، تیمارهای UV-A، UV-B و UV-C اعمال شدند. تیمار UV در محفظه‌ای از جنس پلکسی گلاس مستطیلی شکل (۹۰×۴۰×۵۰ سانتی‌متر) 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 شد. لامپ‌های استفاده شده ساخت شرکت Philips لهستان (مدل Actinic BL) بودند. پس از بهینه‌سازی اولیه و رسیدن به مرحله هفت‌برگی، گیاهان بادرنجبویه یک هفته به‌طور روزانه در معرض پرتوهای ماورابنفش (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 در معرض تابش نور مرئی در اتاقک رشد قرار داده

کلروپلاست و میتوکندری، فعال شدن پروتئازهای شبه کاسپاز، تکه‌تکه شدن DNA الیگونوکلئوزومی و درنهایت، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (PCD) منجر می‌شود (Nawkar et al., 2013)؛ باوجود این، گیاهان، سلول‌ها و ساختمان‌های درون سلولی از طریق آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون رودکتاز و کاتالاز حفاظت می‌شوند؛ علاوه بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بسیاری از متابولیت‌ها مانند گلوکاتایون، آسکوربیک اسید، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنلی با جارو کردن رادیکال‌های آزاد سبب حفاظت گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند (Kakani et al., 2003; Loconsole & Santamaria, 2021).

گزارش شده است UVR8 سبب القای ترکیبات جذب‌کننده UV، حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و پاسخ‌های دفاعی در برابر اشعه UV می‌شود (Heijde & Ulm, 2012; Nawkar et al., 2020; Yadav et al., 2013). 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 زمینه تأثیر اکوفیزیولوژیکی اشعه ماورابنفش بر گیاهان محدود است؛ بنابراین، بررسی آثار اشعه‌های ماورابنفش بر مراحل مختلف رشد گیاهان و شدت‌های مختلف تنش اهمیت دارد. در پژوهش حاضر، آثار UV-A، UV-B و UV-C بر رشد، القای تنش اکسیداتیو و سازوکارهای مقاومت گیاهچه بادرنجبویه مطالعه شد.

شدند. 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، شاخص‌های رشدی (وزن تر اندام هوایی، ریشه و برگ) چهار گیاه هر گلدان اندازه‌گیری و میانگین آن برای هر گلدان در نظر گرفته شد؛ سپس اکسیدان‌ها (H_2O_2 ، ROS، MDA) و آنتی‌اکسیدان‌ها (آنتی‌اکسیدان کل، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم SOD) اندازه‌گیری شدند.

مقدار رادیکال‌های آزاد فعال اکسیژن

محتوای گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به روش زایلنول نارنجی تعیین شد (Bindschedler et al., 2001). به این منظور، ابتدا بافت برگ درون هاون چینی حاوی بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته $6/8$ ساییده شد. محلول همگن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (مدل universal 320 R، شرکت Hettich، آمریکا) شد. جذب نوری محلول حاصل حاوی عصاره و زایلنول نارنجی اسیدی در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. غلظت‌های مختلف H_2O_2 برای رسم منحنی استاندارد استفاده و نتایج برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه شدند.

مقدار H_2O_2

به منظور تعیین مقدار هیدروژن پراکسید، ابتدا ۰/۱ گرم از بافت برگ با ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد (W/V) درون

هاون چینی و در حمام یخ کاملاً ساییده و همگن شد؛ سپس محلول به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۷) و ۱ میلی‌لیتر یدیدپتاسیم ۱ مولار به ۵۰۰ میکرولیتر عصاره افزوده و پس از همگن شدن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UV-1601، شرکت Rayleigh، چین) تعیین شد. غلظت‌های مختلف ۳۰ درصد H_2O_2 برای رسم منحنی استاندارد استفاده شدند و مقدار هیدروژن پراکسید برحسب 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 TCA-TBA اندازه‌گیری شد (Costa et al., 2002). جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. کدورت لیپیدهای غیراختصاصی با کم کردن جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر اصلاح شد. ضریب خاموشی (ε) ۱۵۵ بر میلی‌مول بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد. محتوای MDA برحسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش شد.

آنتی‌اکسیدان کل بر اساس قدرت آنتی‌اکسیدان

احیاکنندگی یون فریک (FRAP)

به منظور تعیین آنتی‌اکسیدان کل، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (۵۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۷) درون هاون چینی روی یخ ساییده شد. محلول همگن

میلی مول بر سانتی متر بود (Wagner, 1979). نتایج برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه شدند.

فعالیت آنزیم (SOD)

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (EC (SOD) (1.15.1.1) با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر سنجش شد. فعالیت آنزیم SOD برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) محاسبه شد (Giannopolitis & Ries, 1977).

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) و در سه تکرار (n=3) انجام شدند. پیش از تجزیه و تحلیل داده‌ها، توزیع نرمالیتۀ داده‌ها بررسی شد؛ بر این اساس، تبدیل داده برای صفت‌های MDA، ROS، ترکیبات فنلی و آنتوسیانین به روش لگاریتمی، برای H_2O_2 به روش جذری و برای وزن تر اندام هوایی، ریشه و برگ به روش انعکاس انجام شد تا توزیع نرمال برقرار شود. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین با آزمون یک طرفه چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال خطای $p \leq 0.05$ از نرم افزار SPSS 22 انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها نشان داد آثار تیمارهای UV بر تمام شاخص‌های ارزیابی شده در سطح ۵ درصد معنادار است (جدول ۱).

به دست آمده به اپندورف منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سانتریفیوژ یخچال دار سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از عصاره رویی به ۹۵۰ میکرولیتر از معرف TPTZ (2- TPTZ (6-tri (2, 4, 5-triazine) - pyridyle) در تاریکی افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و تاریکی نگهداری شدند. جذب نوری نمونه‌ها (رنگ آبی) در طول موج ۵۹۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. از $FeSO_4$ برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و بلانک شامل ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (۵۰ میلی مولار، اسیدیته ۷) و ۹۵۰ میکرولیتر معرف TPTZ بود. مقدار آنتی اکسیدان کل (FRAP) هر نمونه برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش شد (Wojdyło et al., 2007).

ترکیبات فنلی

مقدار ترکیبات فنلی طبق روش Soland & Laima (1999) اندازه گیری شد؛ بر اساس این روش، گالیک اسید برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش شدند.

آنتوسیانین‌ها

به منظور اندازه گیری مقدار آنتوسیانین‌های برگ از روش واکنر استفاده شد. جذب عصاره‌های متانول اسیدی در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. بلانک، متانول اسیدی بود و برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها، ضریب خاموشی (ε) ۳۳۰۰۰ بر

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) آثار باندهای مختلف UV بر اکسیدان‌ها مانند رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، آب‌اکسیژنه (H_2O_2) و مالون‌دآلدئید (MDA) و آنتی‌اکسیدان‌ها 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 معنادار در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد

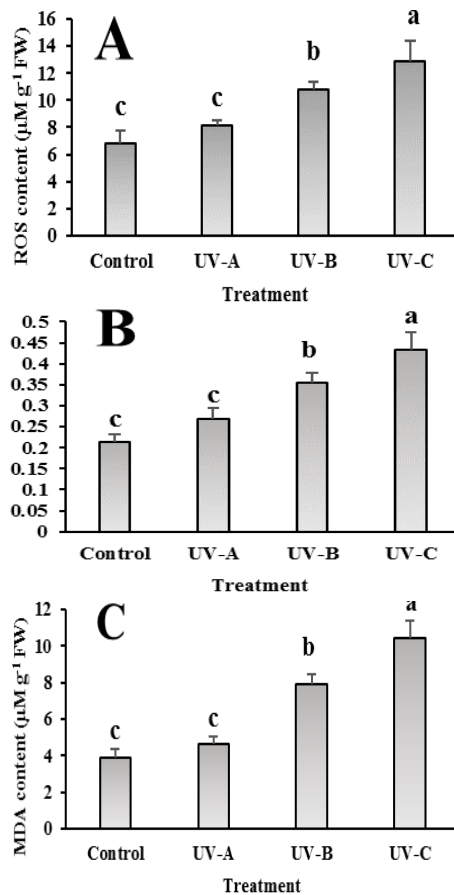
* and ** respectively significant at 5 and 1 percent probability

محتوای اکسیدان

در مطالعه حاضر، محتوای اکسیدان‌ها با تولید ROS، H_2O_2 و MDA (پراکسیداسیون لیپیدها) اندازه‌گیری شد (شکل ۱). نتایج نشان دادند بین شاخص‌های اکسیدان مانند ROS، H_2O_2 و MDA در گیاهان تیمار شده $0/9$ (R^2) 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 معناداری نشان ندادند. پرتوهای UV-B و UV-C مقادیر ROS، H_2O_2 و MDA را به‌طور معناداری افزایش دادند؛ این افزایش 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، آثار پرتوهای UV-B و UV-C بر MDA شدیدتر از ROS و H_2O_2 است.

گزارش شده است پرتوهای UV سبب افزایش اکسیدان‌ها در گیاه ماش (Rezayi Far et al., 2018) و بادرنجبویه در کشت خاکی (Pourakbar & Abedzadeh, 2014) می‌شوند. پرتوهای UV-B و UV-C به دلیل فتواکسیداسیون بخش‌های

تیلاکوئید کلروپلاست و غشای میتوکندری منجر به انتقال الکترون‌ها به O_2 و تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن مانند O_2^- ، H_2O_2 و رادیکال OH^- می‌شوند. یکی از اشکال ROS، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است که می‌تواند در تنظیم سوخت‌وساز سلول و بیان ژن‌ها نقش داشته باشد؛ بنابراین، H_2O_2 به‌عنوان مولکول پیام‌رسان برای بقای سلول‌ها اهمیت دارد، اما مقادیر زیاد آن می‌تواند به سلول‌ها آسیب برساند. H_2O_2 پایداری بیشتری نسبت به سایر گونه‌های فعال اکسیژن دارد و به‌راحتی از غشا عبور می‌کند. تابش‌های ماورابنفش سبب تحریک واکنش‌های فتوشیمیایی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نهایت، آسیب به DNA، پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌شوند؛ بنابراین پایداری غشا به‌علت جذب مستقیم اشعه یا آثار غیرمستقیم گونه‌های فعال اکسیژن به خطر می‌افتد. گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در سلول‌های گیاهی طی شرایط تنش، بسیار واکنش‌پذیر و سمی هستند و سبب آسیب اکسیداتیو DNA، پروتئین‌ها و پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شوند (Hideg et al., 2013; Nawkar et al., 2013) و واکنش‌های



شکل ۱- تأثیر باندهای مختلف اشعه ماورابنفش بر مقدار تولید ROS (A)، H₂O₂ (B) و MDA (C) در برگ گیاهچه‌های بادرنجبویه. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SD است. حروف یکسان، وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

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

پراکسیداسیون باتوجه به تعداد و موقعیت باندهای دوگانه متفاوت هستند. در مرحله ابتدایی، رادیکال‌های هیدروکسیل آزاد شده با یک اتم هیدروژن اسیدچرب واکنش می‌دهند و گروه وینیل برداشته می‌شود، سپس باقیمانده مرحله پیش با اکسیژن سه تایی واکنش می‌دهد و یک رادیکال پراکسی و آلکوکسی ایجاد می‌کند که این رادیکال با برداشتن دومین اتم هیدروژن اسیدچرب، یک لیپید هیدروپراکسی تولید می‌کند. در مراحل بعدی، انواع آلدئیدها و هیدروکربن‌ها از باقیمانده اسیدهای چرب ایجاد می‌شوند. یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدها، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) است. غالباً پراکسیداسیون لیپیدها از رادیکال‌های آزاد مربوط به اسیدهای چرب غیراشباع مانند لینولئیک اسید و لینولنیک اسید ناشی می‌شود. آثار این آسیب ناشی از تنش نوری سبب غیرقطبی شدن غشا، افزایش نفوذپذیری غشا، خروج پتاسیم، ورود یون کلر، تخریب غشای اندامک‌های درون‌سلولی و افزایش کلروز و نکروز است (Costa et al., 2002; Kakani et al., 2003; Nawkar et al., 2013).

جدول ۲- ضرایب همبستگی بین شاخص‌های اندازه‌گیری شده گیاهچه‌های بادرنجبویه در پاسخ به باندهای مختلف اشعه ماورابنفش

Table 2- Correlation matrices showing relationships between measured parameters of *Melissa 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 معنادار است.

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

محتوای آنتی‌اکسیدان

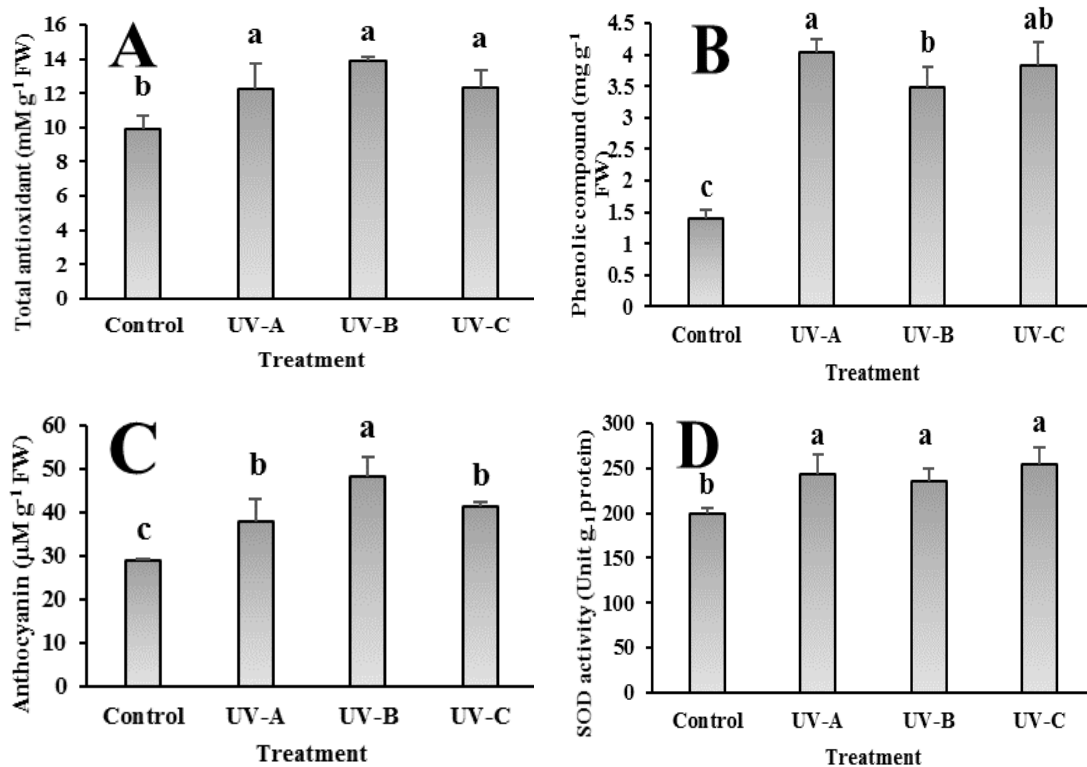
نتایج سنجش محتوای آنتی‌اکسیدان (آنتی‌اکسیدان کل بر اساس روش FRAP، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم SOD) در شکل ۲ آورده شده است. سیستم آنتی‌اکسیدانی در سلول‌ها قادر به حذف مولکول‌های ROS است. روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های گیاهی وجود دارند. اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل به روش FRAP بر اساس قدرت احیاکنندگی یون فریک و تبدیل یون فریک (Fe^{+3}) به یون فرو (Fe^{+2}) در اسیدیته کم و تغییر کمپلکس فریک- TPTZ (قهوه‌ای خیلی کم‌رنگ) به کمپلکس فرو- TPTZ (آبی‌رنگ) است (Wojdyło et al., 2007). اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم SOD نشانگر خوبی برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه است و به‌طور گسترده برای سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان در معرض تنش استفاده می‌شود (Wagner, 1979; Wojdyło et al., 2007).

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها نشان دادند تمام شاخص‌های آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری شده در پژوهش حاضر برای تمام گیاهچه‌های تیمار شده با UV افزایش نشان می‌دهند؛ هرچند در برخی موارد، الگوی تغییر شاخص‌ها متفاوت است. افزایش مشاهده شده در روش FRAP برای تیمارهای UV-A، UV-B و UV-C به ترتیب ۲۳، ۴۰ و ۲۴ درصد بود (شکل ۲A). مقدار ترکیبات فنلی تحت تأثیر UV-A، UV-B و UV-C به ترتیب ۱۸۷، ۱۴۸ و ۱۷۳ درصد افزایش یافت (شکل ۲B)؛ به طوری که 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 داشت (جدول ۲). در شرایط تنش UV، ترکیبات متفاوتی از فنولیک‌های با وزن مولکولی کم (فلاونوئیدها) تا فنولیک‌های با وزن مولکولی زیاد (تانن‌ها) تولید می‌شوند. نقش اساسی این ترکیبات، محافظت از گیاهان در برابر تنش اکسیداتیو طی رویارویی با تابش ماورابنفش است (Loconsole & Santamaria, 2021; Wojdyło et al., 2007). مقدار آنتوسیانین‌ها به ترتیب افزایش ۳۲، ۶۷ و ۴۳ درصدی را در گیاهچه‌های در معرض تیمار UV-A، UV-B و UV-C نشان داد (شکل ۲C). نتایج یاد شده با نتایج سایر پژوهشگران در زمینه گیاه گوجه‌فرنگی (Bijami et al., 2011)، سه رقم گندم (Rezayi Far et al., 2018) و کاهو (Ranjbar & Mousavi, 2018) مطابقت دارند. بسیاری از ترکیبات فنیل پروپانوید مانند مشتقات هیدروکسی سینامیک‌اسید، گلوکاتیون، آسکوربیک‌اسید، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین از غشا و ساختارهای درون‌سلولی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از UV محافظت می‌کنند (Yadav et al., 2020; Singh et al., 2023). گزارش شده است در معرض UV-B و UV-C، ترکیبات یاد شده در واکنش سلول‌های اپیدرم رویی و زیری برگ‌های بالغ بیشتر گیاهان تجمع می‌کنند. آنتوسیانین‌ها از نظر ساختمانی مشابه فلاونوئیدها هستند و گروهی از ترکیبات فنلی در گیاهان به شمار می‌آیند که با تغییر کیفیت و کمیت نور جذب شده و جارو کردن رادیکال‌های آزاد می‌توانند پرتوهای UV را فیلتر کنند و آثار این پرتوها در گیاهان را کاهش دهند. ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها از مسیر فنیل پروپانویدی سنتز می‌شوند

فعال اکسیژن در گیاهان در معرض تنش را کاهش می‌دهد (Costa et al., 2002; Rezayi Far et al., 2018). به‌طور کلی، پرتوهای UV-B و UV-C با وجود افزایش اجزای سیستم آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی و آنزیمی (نظیر SOD) سبب افزایش مقدار ROS، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، تغییر متابولیسم یون فریک، تغییر مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد و درنهایت، آسیب به سلول می‌شوند و این سیستم قادر به مهار صددرصدی آثار ناشی از پرتوها در گیاهان نیست (Costa et al., 2002; Loconsole & Santamaria, 2021).

و تعداد زیادی از آنزیم‌های کلیدی این مسیر تحت تأثیر UV فعال می‌شوند (Hideg et al., 2013; Loconsole and Santamaria, 2021; Singh et al., 2023)؛ بنابراین، افزایش این مواد آلی در گیاهان از اثر القایی پرتوهای UV بر ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسیر یادشده ناشی می‌شود. فعالیت آنزیم SOD در گیاهچه‌های تیمارشده با اشکال مختلف UV در مقایسه با گیاهان شاهد حدود ۱۸ تا ۲۸ درصد افزایش نشان داد (شکل ۲D). افزایش مقدار فعالیت آنزیم SOD در گیاهان آفتابگردان و ماش در تیمار با UV-B گزارش شده است. افزایش فعالیت آنزیم SOD، سطح گونه‌های

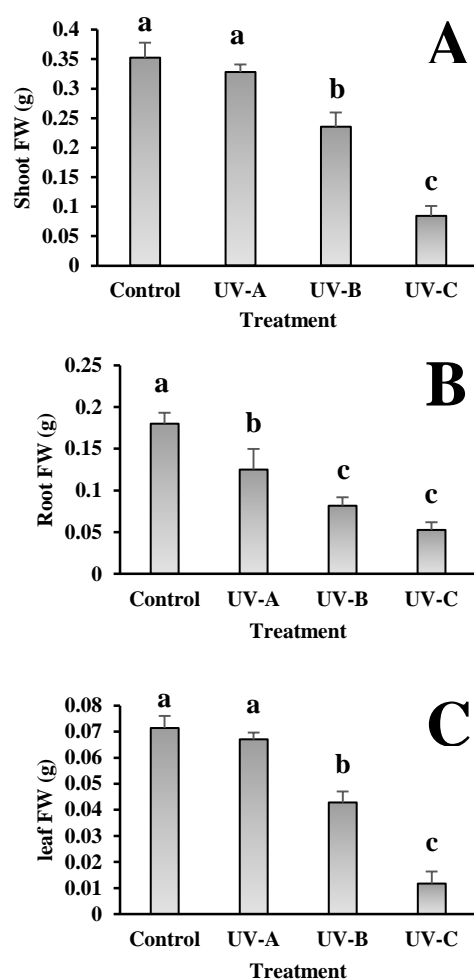


شکل ۲- تأثیر باندهای مختلف اشعه ماورابنفش بر (A) مقدار آنتی‌اکسیدان کل (FRAP)، (B) ترکیبات فنلی، (C) آنتوسیانین‌ها و (D) فعالیت SOD در گیاهچه‌های بادرنجبویه. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD است. حروف یکسان، وجودداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

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

تحت تأثیر پرتوهای UV به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم رخ می‌دهد و سبب کاهش انعطاف‌پذیری دیواره سلولی و مهار رشد گیاهان می‌شود (Yadav et al., 2020; Loconsole & Santamaria, 2021).



شکل ۳- تأثیر باندهای مختلف اشعه ماورابنفش بر مقدار وزن تر (A) اندام هوایی، (B) ریشه و (C) برگ گیاهچه‌های بادرنجبویه. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD است. حروف یکسان، وجودداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

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

بررسی تأثیر پرتوهای ماورابنفش بر وزن تر اندام هوایی نشان داد پرتوهای UV-B و UV-C وزن تر را به ترتیب ۳۳ و ۷۶ درصد نسبت به شاهد کاهش می‌دهند، اما UV-A تأثیر معناداری بر وزن تر اندام هوایی ندارد (شکل ۳A). تمام گیاهان در معرض پرتوهای مختلف UV در مقایسه با شاهد به‌طور درخور توجهی سبب کاهش وزن تر ریشه شدند. پرتوهای UV-B و UV-C به ترتیب سبب کاهش ۳۴/۶ و ۳۵/۵ درصدی وزن تر ریشه در مقایسه با UV-A شدند (شکل ۳B). تغییرات وزن تر برگ در معرض تیمارهای مختلف UV، الگویی مشابه تغییرات وزن تر اندام هوایی داشت؛ با این تفاوت که شدت کاهش وزن تر برگ تیمار شده با پرتوهای UV-B و UV-C شدیدتر بود (شکل ۳C). نتایج یادشده حساسیت بیشتر گیاهچه‌های بادرنجبویه به UV-C در مقایسه با UV-B را نشان می‌دهند. پرتوهای UV-A تغییر معناداری در مقدار وزن تر برگ ایجاد نکردند. نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های بسیاری از پژوهشگران در زمینه گیاه بامیه (Kargar Khorrami et al., 2013)، دو رقم کدو (Hagihosseini et al., 2016) و بادرنجبویه در کشت خاکی (Pourakbar & Abedzadeh, 2014) مطابقت دارند. کاهش وزن در تیمارهای UV بیان‌کننده کاهش تولید زیست‌توده است که پاسخی عمومی در بسیاری از گونه‌های گیاهی به شمار می‌آید. پرتوهای UV با تشکیل دایمرهای پریمیدین پریمیدین و پریمیدین سیکلوتان سبب کاهش همانندسازی DNA و کاهش تقسیم سلولی می‌شوند (Kakani et al., 2003; Yadav et al., 2020)؛ از سوی دیگر، کاهش مقدار اکسین

companions or loosely linked associates?
Trends in Plant Science, 18(2), 107-115.

Hothem, S. D., Marley, K. A., & Larson, R. A. (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. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7010009>

Nawkar, G. M., Maibam, P., Park, J. H., Sahi, V. P., Lee, S. Y., & Kang, C. H. (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, S. A. (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, K. K. (2023). Revisiting the role of phenylpropanoids in plant defense against UV-B stress. *Plant Stress*, 100143. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100143>

نتیجه گیری

نتایج نشان دادند گیاهچه‌های بادرنجبویه در رویارویی با پرتوهای ماورابنفش متحمل تغییرات فیزیولوژیکی می‌شوند. اگرچه افزایش مقدار آنتی‌اکسیدان در تیمارهای UV به گیاهان اجازه می‌دهد در شرایط تنش اکسیداتیو زنده بمانند، سبب آسیب (افزایش اکسیدان‌ها و کاهش وزن تر) به این گیاه شد و بنابراین، بادرنجبویه گیاهی حساس به تنش ناشی از پرتوهای ماورابنفش است.

References

Bijami, A., Rezanejad, F., & Sasan, H. A. (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, L. V., Minibayeva, F., Gardner, S. L., Gerrish, C., Davies, D. R., & Bolwell, G. P. (2001). Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca^{2+} . *New Phytologist*, 151(1), 185-194.

Costa, H., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2002). The effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science*, 162(6), 939-945.

Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309-314.

Hagihosseini, N., Hosseini Sarghein, 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, M. A., & Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable

- Soland, S., & Laima, S. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture, 1*, 1-5.
- Wagner, G. J. (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, S. K., & 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.