# بررسی اثر تنش خشکی بر رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان گیاه پونه معطر (*Mentha pulegium* L.) در مرحله گلدهی

**حلیمه حسن پور[1*] و وحید نیکنام[2]**

[1]پژوهشکده سامانه‌های فضانوردی، پژوهشگاه فضایی ایران، تهران، صندوق پستی ۸۳۴-۱۴۶۶۵، ایران

[2]دانشکده زیست شناسی، و قطب تبارزائی موجودات زنده ایران، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۰۳)

**چکیده:**

**تنش خشکی یکی از مهترین عوامل محیطی محدود کننده رشد و تولیدات گیاهی در اکثر نقاط دنیا از جمله ایران است. گیاهان با استراتژی‌های مختلف از جمله تغییر در متابولیسم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان خود را با تنش‌های محیطی وفق می دهند. پونه معطر گیاهی است دارویی، معطر و متعلق به تیره نعناعیان بوده که به طور وسیعی در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر رشد، فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دو اندام ریشه و برگ، آزمایشی در شرایط کنترل شده گل‌خانه ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار در مرحله گل‌دهی انجام شد. تنش خشکی در چهار سطح ظرفیت‌های مزرعه‌ای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنش خشکی منجر به کاهش معنی‌دار پارامترهای رشد، تولیدمثلی و فتوسنتزی شد. سطح فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز تحت تنش خشکی در هر دو اندام افزایش یافته و میزان افزایش در ریشه بالاتر از برگ بود. فعالیت آنزیم کاتالاز برخلاف سایر آنزیم‌های آنتی اکسیدان با افزایش سطح تنش خشکی کاهش یافته و بیشترین فعالیت این آنزیم در برگ‌ها مشاهده شد. به نظر می‌رسد گیاه پونه معطر با اختصاص کمتر کربن برای رشد، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تنظیم پراکنش آنزیم‌ها در اندام‌های مختلف می تواند تنش خشکی را تحمل نماید.**

**واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، پونه معطر (*Mentha pulegium* L.)، تنش خشکی، رشد، فتوسنتز.**

**مقدمه:**

خشکی یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی بوده که رشد گیاهان را در نواحی خشک و نیمه خشک از جمله ایران محدود می‌کند. تأثیر تنش خشکی روی رشد و عملکرد گیاه به ژنوتیپ گیاه بستگی دارد. گیاهان سازوکار های متفاوتی را در برابر تنش خشکی بکار می‌گیرند، ولی این سازوکارها به طور کامل مشخص نشده‌اند. گیاهان با کاهش پارامترهای رشد، بسته نمودن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز، تغییر در سازوکارهای تنظیمی انتقال یون‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با تنش خشکی مقابله می‌نمایند. تنش خشکی با کاهش سطح برگی و هدایت روزنه ای می‌تواند به طور مستقیم بر فرآیندهای

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: hassanpour@ari.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

بیوشیمیایی مربوط به فتوسنتز اثر گذاشته و با کاهش ورود دی‌اکسیدکربن به داخل روزنه‌ها منجر به کاهش میزان فتوسنتز شود (Sajedi *et al*., 2012; Delfine *et al*., 2005; Hojati *et al*., 2011; Safarnejad, 2008).

تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species: ROS) از جمله اثرات دیگر تنش خشکی در گیاهان است. ترکیبات ROS شامل مولکول‌های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن یکتایی می‌باشند. این ترکیبات توسط فعالیت‌های طبیعی سلولی نظیر تنفس نوری و بتااکسیداسیون اسیدهای چرب نیز تولید می شوند، ولی میزان آن ها خیلی بالا نبوده و در پیام‌دهی نقش دارند. هنگامی که گیاهان در معرض تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند، میزان ترکیبات ROS بسیار افزایش یافته و می‌تواند نقش تخریبی داشته باشد، افزایش ROS متابولیسم سلول را تخریب نموده و در نهایت باعث مرگ سلول می‌گردد (Fu and Huang, 2001). تجمع ترکیبات ROS از راه اکسیداسیون رنگیزه‌های فتوسنتزی، لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به گیاه آسیب وارد می‌کند (Reddy *et al*., 2004). برای کاهش اثرات رادیکال‌های آزاد، سلول‌های گیاهی دارای سیستم آنتی اکسیدان شامل آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی با وزن ملکولی پائین و نیز آنتی اکسیدان‌های آنزیمی هستند. سیستم آنتی اکسیدان‌های آنزیمی یکی از سازوکارهای حفاظتی است که شامل سوپراکسید دیسموتاز است که در کده‌های مختلف سلولی می‌توان آن را یافت و در جاروب کردن رادیکال سوپراکسید نقش دارد. هیدروژن پراکسید توسط دیگر آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز و پراکسیداز محدود می‌گردد که هیدروژن پراکسید را به آب تبدیل می‌کنند. آنزیم‌های دیگری که در سیستم جاروب کنندگی ROS خیلی مهم بوده و در چرخه آسکوربات- گلوتاتیون عملکرد دارند، گلوتاتیون ردوکتاز، مونودهیدرو آسکوربات ردوکتاز و دهیدرو آسکوربات ردوکتاز هستند (Srivalli *et al*., 2003).

پونه معطر (*Mentha pulegium* L.) گیاهی است دارویی، علفی، پایا که به صورت وحشی در نواحی مرطوب ایران، گیلان و مازندران می‌روید. این گیاه به شدت معطر است و اسانس آن از نظر دارویی، غذایی و صنعتی بسیار مورد توجه است. بخش هوایی گیاه به طور سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها نظیر: سرماخوردگی، سینوزیت، صفراوی، مسمومیت غذایی، برونشیت و توبرکلوزیس استفاده می‌شود (Zargari, 1990). مطالعات اخیر نشان داده است که اسانس این گیاه دارای خواص ضدباکتری و ضدقارچ، ضد سرطان و خواص بالای آنتی اکسیدان (Mahboubi and Haghi 2008; Shahmohamadi *et al*., 2011; Shirazi *et al*., 2004). مقایسه تأثیر تنش خشکی در دو مرحله رویشی و زایشی گیاه نخود نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در دو مرحله تفاوت معنی‌داری داشته و بالاترین فعالیت این آنزیم‌ها در مرحله گل‌دهی است (Mafakheri *et al*., 2011). تأثیر تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه پونه معطر در مرحله رویشی قبلا" بررسی شده است و نتایج نشان داده‌اند که این گیاه دارای پتانسیل کشت در شرایط خشکی می‌باشد (Hassanpour *et al*., 2012; Candan and Tarhan, 2012). با توجه به اینکه در ارتباط با تأثیر تنش خشکی در گیاهان داروئی و مکانیسم‌های تحمل تنش در مرحله گل‌دهی مطالعات کمی صورت گرفته است و تاکنون گزارشی در ارتباط با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه پونه معطر در مرحله گل دهی مشاهده نشده است، بر آن شدیم تأثیر تنش خشکی بر میزان رشد، فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در مرحله گل‌دهی بررسی نمائیم.

## مواد و روش‌ها:

**کشت گیاه و اعمال تنش خشکی:** بذرهای گیاه پونه معطر از استان مازندران، روستای تازآباد شهرستان چالوس در سال ۱۳۹۱ جمع آوری شد. بذرها در پیت ترف کشت شدند و در شرایط گلخانه‌ای ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای روزانه/ شبانه (۱۸/ ۲۵ درجه سانتی

Archive of SID

www.SID.ir

گراد) و شدت نوری (۴۴۰۰ لوکس) قرار گرفتند. گیاهچه های ۶ هفته‌ای به گلدان‌های حاوی خاک لومی/شنی منتقل شده و تا مرحله گل‌دهی تحت ظرفیت‌های مزرعه‌ای مختلف ۱۰۰ (شاهد)، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد قرار گرفتند (Emam *et al*., 2010). هر گلدان دارای ۴ گیاهچه بود و برای هر تیمار ۶ گلدان گذاشته شد. تیمار تنش خشکی بر اساس درصد رطوبت وزنی اعمال شد و از طریق توزین گلدان‌ها و تأمین کسری رطوبت مورد نیاز، میزان رطوبت گلدان‌ها در طول دوره رشد به طور ثابت حفظ شد. گیاهچه‌ها چهار ماه بعد از اعمال تنش خشکی (در مرحله گل‌دهی) و ۴ نمونه برای هر تیمار برای آنالیزهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برداشت شدند.

**فتوسنتز و تعرق:** پس از اینکه گیاهان شروع به گل دهی کردند میزان فتوسنتز و تعرق با استفاده از دستگاه سنجش گاز مادون قرمز قابل حمل (IRGA, LCA4, ADC Bio. Scientific Ltd., Herfordshire, UK) اندازه‌گیری شد. آنالیز با سطح رویی برگ‌های کاملاً توسعه یافته جوان، ساعت ۱۱-۱۲ صبح، دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد و شدت نور بیش از ۱۶۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه در طول آزمایش انجام شد (Ahmed *et al*., 2002).

**پروتئین:** جهت استخراج پروتئین، یک گرم بافت برگ در حضور ۲ میلی لیتر بافر استخراج (محلول Tris-HCl یک مولار با ۶/۸pH و PVPP ۲/۵ ٪) در دمای ۴ درجه سانتیگراد هموژن گردید. سپس همگنای حاصل در یک سانتریفوژ یخچال‌دار Labfuge 400R Heraeus Instrument با شتاب g ۱۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. محلول روشناور حاصل در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده و برای سنجش محتوای پروتئین و آنزیم استفاده گردید. غلظت پروتئین موجود در هر نمونه با روش Bradford (۱۹۷۶) و سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید.

**آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (EC 1.15.1.1):** فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس بازدارندگی احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید (NBT) در طول موج ۶۵۰ نانومتر بر اساس روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) صورت گرفت. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر سولفات سدیم ۵۰ میلی مولار (pH ۷/۵)، ال-متیونین ۱۳ میلی مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میکرومول، اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ۰/۱ میلی مولار و ریبوفلاوین ۷۵ میلی مولار و ۳۰ میکرولیتر عصاره خام بود. پس از آنکه مخلوط واکنش به هم زده شد، سل‌های اسپکتروفتومتر به مدت ۱۲ دقیقه در زیر لامپ فلورسنت ۱۵ وات در فاصله ۳۰ سانتی‌متری قرار داده شد. با خاموش شدن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند تا ۵۰ درصد مانع از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید گردد. فعالیت آنزیم به صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی گرم پروتئین گزارش گردید.

**پراکسیداز** (POD) (EC 1.11.1.7): اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش Abeles و Biles (۱۹۹۱) صورت گرفت. یک میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (۶/۶ pH)، بنزیدین ۱٪ و پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد و ۳۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن بنزیدین شده در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در طول موج ۴۷۰ نانومتر تعیین گردید.

**آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC 1.11.1.1):** فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش Jebara و همکاران (۲۰۰۵) اندازه گیری شد. یک میلی لیتر از مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (۷/۸ pH) آسکوربات ۱۰ میلی مولار، پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن آسکوربات در دقیقه

Archive of SID

www.SID.ir

به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در طول موج ۲۹۰ نانومتر تعیین گردید.

**کاتالاز** (CAT) (EC 1.11.1.6): فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش Aebi (۱۹۸۴) صورت گرفت. یک میلی لیتر از مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (pH ۷/۸)، پراکسید هیدروژن یک مولار و ۵ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه شدن پراکسید هیدروژن در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین در طول موج ۲۴۰ نانومتر تعیین گردید.

**آنالیز آماری**: این آزمایش در قالب طرح های کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

## نتایج:

**پارامترهای رشد و تولید مثلی**: نتایج آنالیز آماری نشان داد که تنش خشکی منجر به کاهش معنی دار وزن تر، وزن خشک، ارتفاع گیاه، تعداد گل و قطر گل شد (P ≤ ۰/۰۵). پارامترهای رشد و تولید مثلی گیاه در ۷۵٪ ظرفیت مزرعه ای کمی افزایش یافته، سپس با افزایش شدت تنش به طور معنی‌داری کاهش یافت. مقادیر وزن تر، خشک، ارتفاع گیاه، تعداد گل و قطر گل به ترتیب ۷۳/۴۳، ۶۲/۰۳، ۶۲/۸، ۸۵/۰۶ و ۴۰/۷۴٪ کاهش را در تنش خشکی شدید (۲۵٪ ظرفیت مزرعه ای) نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۱).

**فتوسنتز** :میزان فتوسنتز تحت تنش خشکی تغییر معنی داری را نشان داد (P ≤ ۰/۰۵) (جدول ۱). مقایسه میانگین ها نشان داد که ۷۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای منجر به افزایش مقدار کم فتوسنتز شد. با افزایش شدت تنش میزان فتوسنتز کاهش یافت، به طوری که میزان فتوسنتز تقریبا ۵۶/۹٪ کاهش را در تنش شدید خشکی (۲۵٪ ظرفیت مزرعه ای) نشان داد (جدول ۱).

**تعرق**: سطح تعرق تحت تنش خشکی کاهش معنی داری را نشان داد (P ≤ ۰/۰۵) (جدول ۱). میزان تعرق با افزایش شدت تنش خشکی تا ۵۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای افزایش معنی‌داری یافته، سپس در تنش خشکی شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی) کاهش یافت. در تنش شدید خشکی کاهش ۹۳/۵۶٪ تعرق در گیاه پونه معطر در مرحله گل دهی مشاهده شد.

**پروتئین**: محتوای پروتئین هر دو اندام ریشه و برگ تحت تنش خشکی تغییر معنی داری (P ≤ ۰/۰۵) را نشان داد (شکل ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که محتوای پروتئین برگ‌ها و ریشه‌ها به ترتیب ۹/۱۲ و ۲/۰۳ میلی گرم بر گرم وزن تر در گیاهان شاهد بوده که در اندام برگ بیشتر از ریشه است. با افزایش شدت تنش خشکی محتوای پروتئین در هر دو اندام کاهش یافت. تنش شدید خشکی منجر به کاهش ۳۰/۸ و ۴۴/۷۸٪ محتوای پروتئین به ترتیب در برگ‌ها و ریشه‌ها نسبت به شاهد در مرحله گل‌دهی گیاه پونه معطر شد (شکل ۱).

**سوپراکسید دیسموتاز**: تنش خشکی منجر به تغییر معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هر دو اندام برگ و ریشه گیاه پونه معطر شد (P ≤ ۰/۰۵) (شکل a ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسیداز در اندام ریشه بیشتر از برگ است. با افزایش سطح تنش خشکی محتوای فعالیت این آنزیم در هر دو اندام افزایش یافت. تنش خشکی در سطح شدید (۲۵٪ ظرفیت مزرعه ای) منجر به افزایش ۱۴۱/۴۶ و ۱۱۷/۲٪ فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهچه‌های شاهد به ترتیب برای برگ‌ها و ریشه‌ها شد.

**پراکسیداز**: تنش خشکی منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز شد(P ≤ ۰/۰۵) (شکل b ۲). فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام ریشه بیشتر از برگ‌ها بوده و با افزایش سطح تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو اندام افزایش معنی‌داری یافت. بیشترین فعالیت این آنزیم در تنش شدید خشکی (۲۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای) بوده که نسبت به شاهد حدود ۵/۲ و ۳/۹ برابر افزایش را به ترتیب برای برگ و ریشه نشان داد.

**کاتالاز**: فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش خشکی تغییر

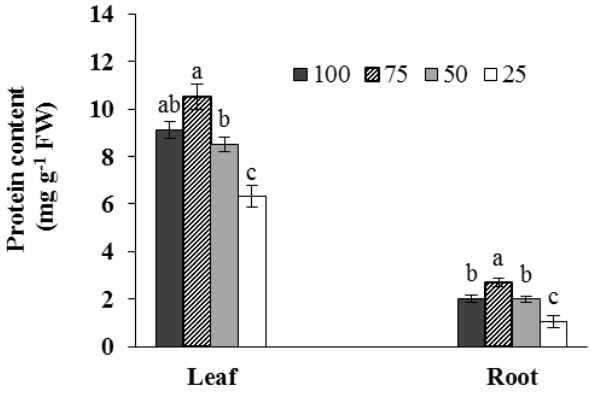
Archive of SID

www.SID.ir

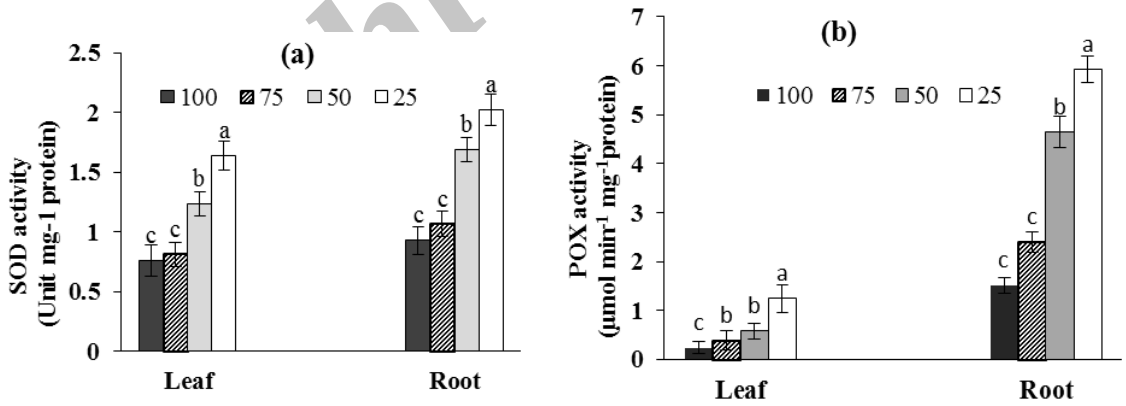
**جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر برخی پارامترهای رشد، تولیدمثلی و فتوسنتز گیاه پونه معطر (*Mentha pulegium* L.)**

| تنش خشکی (%FC) | وزن تر گیاه (g) | وزن خشک گیاه(g) | ارتفاع گیاه (cm) | تعداد گل | قطر گل (mm) | فتوسنتز ($\mu mol\ CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}$) | تنفس ($mmol\ H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱۰۰ | ۴۷/۵ ± ۵/۹ a | ۴/۳۲ ± ۰/۳۵ a | ۳۶/۴ ± ۲/۶ a | ۲۲/۱ ± ۱/۹ a | ۱/۱ ± ۰/۰۶ a | ۹/۳۲ ± ۰/۷۱ a | ۴/۰۱ ± ۰/۲۳ b |
| ۷۵ | ۴۹/۱ ± ۴/۳ a | ۵/۰۱ ± ۰/۴۲ a | ۳۴/۱ ± ۲/۱ ab | ۲۳/۵ ± ۱/۴ a | ۱/۰۴ ± ۰/۰۷ a | ۹/۸۹ ± ۴/۲۵ a | ۴/۲۵ ± ۰/۲۶ b |
| ۵۰ | ۳۷/۷ ± ۳/۹ b | ۳/۹۷ ± ۰/۳۳ a | ۳۲/۴ ± ۲/۳ b | ۱۸/۴ ± ۱/۵ b | ۰/۸۸ ± ۰/۰۵ b | ۷/۸۲ ± ۰/۶۳ b | ۴/۷۶ ± ۰/۲۹ a |
| ۲۵ | ۱۰/۷ ± ۳/۷ c | ۱/۶۴ ± ۰/۲۹ b | ۱۳/۵ ± ۱/۴ c | ۳/۲ ± ۱/۱ c | ۰/۶۴ ± ۰/۰۸ c | ۲/۲۵ ± ۰/۵۴ c | ۲/۲۸ ± ۰/۱۹ b |

**مقادیر میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد (P ≤ ۰/۰۵).**



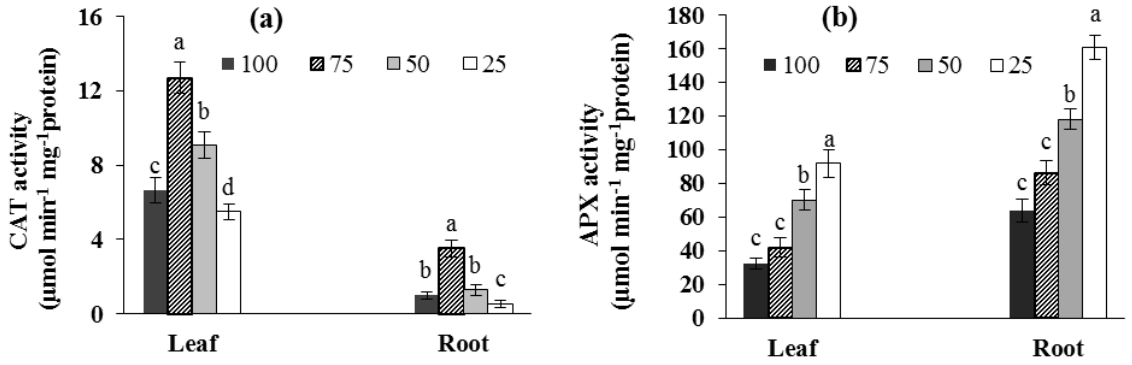

**شکل ۱- اثر سطوح مختلف تنش خشکی (۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵٪ ظرفیت مزرعه ای) بر محتوای پروتئین دو اندام برگ و ریشه گیاه پونه معطر (*M. pulegium L.*). حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد (P ≤ ۰/۰۵).**




**شکل ۲- اثر سطوح مختلف تنش خشکی (۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای) بر فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (a) و پراکسیداز (POX) (b) دو اندام برگ و ریشه گیاه پونه معطر (*M. pulegium L.*). حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد (P ≤ ۰/۰۵).**

معنی‌داری را نشان داد (P ≤ ۰/۰۵) (شکل a ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین فعالیت این آنزیم در تنش خشکی ملایم (۷۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای) می‌باشد و فعالیت این آنزیم برخلاف آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌ها

www.SID.ir




**شکل ۳- اثر سطوح مختلف تنش خشکی (۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای) بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) (a) و آسکوربات پراکسیداز (APX) (b) در دو اندام برگ و ریشه گیاه پونه معطر *(M. pulegium L.)*. حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد (P ≤ ۰/۰۵).**

بیشتر از ریشه‌ها است. با افزایش شدت تنش خشکی فعالیت این آنزیم در هر دو اندام کاهش معنی‌داری را نشان داد. کاهش ۱۷/۳ و ۴۵/۴٪ فعالیت آنزیم کاتالاز به ترتیب برای ریشه و برگ تحت تنش شدید خشکی در گیاه پونه معطر مشاهده شد.

**آسکوربات پراکسیداز:** فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش خشکی تغییر معنی‌داری را نشان داد (P ≤ ۰/۰۵) (شکل b ۳). فعالیت این آنزیم مشابه فعالیت سوپراکسیداز و پراکسیداز در برگ‌ها بالاتر از ریشه‌ها بوده و با افزایش شدت تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم افزایش معنی‌داری یافت. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شدت تنش شدید خشکی ۱۸۱/۶ و ۱۵۰/۷٪ افزایش را نسبت به شاهد نشان داد.

**بحث:**

تنش خشکی به عنوان یکی از تنش‌های محیطی بوده که می‌تواند منجر به کاهش رشد و تولیدات گیاهی شود. نحوه سازش گیاه به تنش خشکی پیچیده بوده و تحت تأثیر مکانیسم‌های تحمل تنش درونی و فاکتورهای محیطی بیرونی است (Shamim *et al.*, 2009). نتایج نشان داد که پارامترهای رشد و تولید مثلی در تنش خشکی ملایم (۷۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای) افزایش یافت و تفاوت معنی‌داری بین گیاهچه‌های شاهد و سطح تنش ملایم مشاهده نشد. به نظر می‌رسد تنش خشکی ملایم تیمار مناسبی برای رشد گیاه پونه معطر باشد. با افزایش شدت تنش خشکی از ۷۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای به بالا، پارامترهای رشد و تولید مثل به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۱). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که تنش خشکی منجر به کاهش رشد، کاهش طول ساقه و تعداد گل‌ها می‌شود (Kalefetoglu and Ekmekci, 2009; Hojati *et al*., 2011). کاهش رشد می‌تواند در ارتباط با بازدارندگی رشد و توسعه سلولی در پاسخ به کاهش فشار تورژسانس باشد (Jaleel *et al*., 2008; Ogbonnaya *et al*., 2003).

تنش خشکی شدید منجر به کاهش معنی‌دار پارامترهای فتوسنتزی و تعرق در گیاهچه‌های پونه معطر در مرحله گل‌دهی شد (جدول ۱). Ranjbarfardooei و همکاران (۲۰۰۰) گزارش نمودند که میزان فتوسنتز با افزایش شدت تنش خشکی در دو گونه گیاه پسته *Pistacia khinjuk* و *P. mutica* کاهش یافت. Pompelli و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده‌اند که شبکه فتوسنتزی و هدایت روزنه‌ای در گیاه *Jatropha curcas* تحت تنش خشکی کاهش یافت. کاهش فتوسنز طی تنش خشکی در ارتباط مستقیم با بسته شدن روزنه‌ها و تغییر نفوذ و هدایت دی اکسید کربن در سلول‌های مزوفیلی می‌باشد. تراکم کم دی‌اکسیدکربن

Archive of SID

www.SID.ir

کلروپلاست منجر به کاهش فعالیت روبیسکو و در پی آن کاهش میزان فتوسنتز و رشد گیاه می‌گردد (Flexas *et al*., 2006). بابایی و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که تحت تنش شدید خشکی با ایجاد اختلال در رشد، منبع انرژی را به سمت تولید ترکیبات ثانویه هدایت می‌کنند. به نظر می‌رسد گیاه پونه معطر با کاهش پارامتر های فتوسنتزی و اختصاص کمتر انرژی برای رشد، منبع کربن را به سمت تولید ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدان هدایت نموده تا بتواند شرایط تنش خشکی را تحمل نماید.

محتوای پروتئین کل در اندام برگ و ریشه گیاه پونه معطر تحت تنش خشکی ملایم و متوسط در گیاه پونه معطر افزایش یافت و با افزایش شدت تنش در ۲۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای مقدار پروتئین کاهش یافت (شکل ۱). افزایش محتوای پروتئین در تنش شوری ۱۵۰ و ۴۵۰ میلی مولار در گیاه *Aeluropus lagopoides* نیز مشاهده شد و با افزایش سطح شوری در ۷۵۰ میلی‌مولار محتوای پروتئین کل کاهش یافت (Sobhanian *et al*., 2009). به نظر می رسد افزایش محتوای پروتئین کل می‌تواند در ارتباط با افزایش بیوسنتز پروتئین برای سازش با شرایط جدید و تحمل تنش باشد، و کاهش پروتئین در طی تنش شدید کم آبی در ارتباط با کاهش سنتز پروتئین، کاهش دسترسی آمینواسیدها و دناتوریشن آنزیم‌ها در طی سنتز پروتئین‌ها باشد (Levitt, 1980). کاهش محتوای پروتئین کل در تنش شدید خشکی در گیاهانی نظیر ذرت (Mahmmadkhani and Heidari, 2008)، Bermudagrass (Hu *et al*., 2010) و نخود (Mafakhari *et al*., 2011) نیز مشاهده گردید.

مطالعات نشان داده است که تنش خشکی منجر به القای تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردد. گیاهان با تنظیم بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدان سبب جاروب کردن رادیکال‌های آزاد می‌شوند. این ترکیبات شامل آنتی اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و تعدادی ترکیبات غیر آنزیمی می‌باشد. سطح بالای ترکیبات آنزیمی بیانگر افزایش تحمل تنش‌های محیطی است (Tahi *et al*., 2008).

تنش خشکی منجر به افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هر دو اندام گیاه پونه معطر شد و سطح فعالیت این آنزیم در اندام ریشه بیشتر از برگ بود (شکل a ۲). آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، غلظت $H_2O_2$ و $O_2^-$ سلول را تنظیم می‌کنند و به عنوان یک عامل مهم در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته می‌شوند. این آنزیم دارای ایزوفرم‌های گوناگونی بوده که در بخش‌های مختلف سلول نظیر میتوکندری، سیتوپلاسم و کلروپلاست مستقرند. تعداد و فراوانی نسبی ایزوفرم‌های هر نوع بین گونه‌ها و بافت‌ها متغیر بوده و بسته به مراحل نموی گیاه و شرایط محیطی کنترل می‌شوند (Batkova *et al*., 2008). افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش خشکی در گیاه گندم (Turkan *et al*., 2005) نیز مشاهده شده است. سطح فعالیت این آنزیم در مرحله رویشی گیاه پونه معطر در شرایط شدید خشکی تا ۹۶٪ در برگ‌ها افزایش نشان داد (Hassanpour *et al*., 2012). در پژوهش حاضر فعالیت آنزیم به ۱۴۱ و ۱۱۷٪ به ترتیب در برگ‌ها و ریشه‌ها رسید. به نظر می‌رسد فعالیت این آنزیم در مرحله گل‌دهی بیشتر از مرحله رویشی بوده و نقش مهمی را در تعدیل تنش خشکی این گیاه دارد.

کاتالاز یک آنزیم تترامر دارای هم بوده که عمل دیسموتاسیون هیدروژن پراکسید به اکسیژن و آب را کاتالیز می کند. افزایش فعالیت کاتالاز در گیاهان یک ویژگی سازشی بوده و با کاهش میزان هیدروژن پراکسید حاصل از متابولیسم سلولی و آسیب رسیدن به بافت جلوگیری می کند (Gill and Tuteja., 2010). در مطالعه اخیر فعالیت آنزیم کاتالاز در تنش خشکی ملایم افزایش یافته، سپس با افزایش شدت تنش کاهش معنی‌داری یافت (شکل a ۳). فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله رویشی نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی، فعالیت آنزیم افزایش یافته و

Archive of SID

www.SID.ir

در تنش شدید به ماکزیمم فعالیت خود رسید (تقریبا ۷۴/۶٪ افزایش نسبت به شاهد) (Hassanpour *et al*., 2012). تفاوت در نتایج احتمالاً به دلیل عکس العمل متفاوت این آنزیم به تنش خشکی در دو مرحله زایشی (تحقیق حاضر) و رویشی می‌باشد. مطالعه فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه گندم نشان داد که فعالیت این آنزیم در مرحله زایشی نسبت به رویشی کاهش یافت (Shahandeh *et al*., 2013). فرضیه شده که کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در تنش شدید خشکی می‌تواند بدلیل غیرفعال‌سازی نوری با تجزیه سوبسترا و پیشگیری از سنتز این آنزیم در تاریکی باشد (Luna *et al.*, 2004). به نظر می‌رسد در گیاه پونه معطر در مرحله گل‌دهی این آنزیم به عنوان جاروب کننده مؤثر هیدروژن پراکسید نبوده و دیگر آنزیم‌های آنتی اکسیدان در شرایط تنش شدید خشکی نقش دارند.

آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز نقش جاروب کردن هیدروژن پراکسید را به عهده دارند، اما تمایل آسکوربات‌پراکسیداز برای هیدروژن پراکسید نسبت به پراکسیداز بالاتر بوده و می‌تواند نقش ویژه‌ای را در تنظیم میزان ROS در شرایط تنش داشته باشند (Yang *et al*., 2008). در این پژوهش فعالیت این دو آنزیم تحت تنش خشکی در هر دو اندام افزایش یافت، ولی سطح فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز خیلی بالاتر از پراکسیداز بود (شکل b ۲ و b ۳). به نظر می‌رسد در مرحله گل‌دهی آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش مهمی را در تحمل تنش خشکی گیاه پونه معطر داشته باشد. افزایش آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در مرحله زایشی نسبت به مرحله رویشی در گیاه نخود (*Cicer arientinum*) تحت تنش خشکی نیز گزارش شده است (Mafakheri *et al*., 2011).

## نتیجه گیری:

گیاهان دائما تحت تأثیر تنش‌های محیطی قرار دارند و برای سازگاری با این شرایط، تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در خود ایجاد می‌نمایند. در این پژوهش پارامترهای رشد و تولیدمثلی، فتوسنتز و محتوای پروتئین کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافته، ولی فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان بیانگر نوعی سازش و افزایش تحمل به تنش خشکی و کاهش فعالیت کاتالاز احتمالاً بیانگر اثر تخریبی تنش خشکی بر آنزیم های آنتی اکسیدان حساس‌تر می‌باشد. بررسی بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی اکسیدان در آینده می‌تواند درک عمیق‌تری از نقش این آنزیم‌ها را در چگونگی تحمل تنش گیاه پونه معطر را نشان دهد.

## سپاسگزاری:

نویسنده مقاله مراتب تشکر و قدردانی خویش را از کارشناسان آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه تهران ابراز می‌دارد.

## منابع:

بابایی، ک.، امینی دهقی، م.، مدرس ثانوی، ع. و جباری، ر. (۱۳۸۹) اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک، میزان پرولین و درصد تیمول در آویشن (*Thymus vulgaris* L.). مجله تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲: ۲۵۱-۲۳۹.

Abeles, F. B. and Biles, C. L. (1991) Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. Plant Physiology 95:269–273.

Ahmed, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y. and Sakuratani, T. (2002) Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. Plant Science 163:117-123.

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol 105:121–126.

Batkova, P., Pospısilova, J. and Synkva, H. (2008) Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during in vitro growth and *ex vitro* transfer. Biology of Plant 52:413–422.

Archive of SID

www.SID.ir

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Lakshmanan, G. M. A., Gomathinayagam. M. and Panneerselvam, R. (2008) Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of Catharanthus. Acta Physiologiae Plantarum 33:105–112.

Jebara, S., Jebara, M., Limam, F. and Elarbi Aouani, M. (2005) Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. Plant Physiology 162:929–936.

Kalefetoglu M. T. and Ekmekci, Y. (2009) Alterations in photochemical and physiological activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under drought stress. Agronomy and Crop Science 195:335–346.

Levitt, J. (1980) Responses of plants to environmental stresses. Academic, New York.

Luna, C. M., Pastori, G. M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S. and Foyer, C. H. (2004) Drought controls on $H_2O_2$ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. Experimental Botany 58:417-423.

Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C. and Sohrabi, Y. (2011) Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. Australian Journal of Crop Sience 5:1255–1260.

Mahboubi, M. and Haghi, G. (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Ethnopharmacol 19:325-327.

Mohammadkhani, N. and Heidari, R. (2008) Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. Biology 32:23–30.

Ogbonnaya, C. I., Sarr, B., Brou, C., Diouf, O., Diop, N. N. and Macauley, H. R. (2003) Selection of cowpea genotypes in hydroponics, pots, and field for drought tolerance. Crop Science 43:1114–1120.

Pompelli, M. F., Barata-Luis, R., Vitorino, H. S., Goncalves, E. R., Rolim, E. V., Santos, M. G., Almeida-Cortez, J. S., Ferreira, V. M., Lemos, E. E. and Endres, L. (2010) Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. Biomass Bioenergy 34:1207–1215.

Ranjbarfardooei, A., Samson, R., Van Damme, P. and Lemeur, R. (2000) Effects of drought stress induced by polyethylene glycol on pigment content and photosynthetic gas exchange of *Pistacia khinjuk* and *P. mutica*. Photosynthetica 38:443–447.

Reddy, A. R., Chaitanya, K. V. and Vivekanandan, M. (2004) Drought-induced responses of

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248–254.

Candan, N. and Tarhan, L. (2012) Tolerance or sensitivity responses of *Mentha pulegium* to osmotic and waterlogging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation. Environmental and Experimental Botany 75:83– 88.

Delfine, S., Loreto, F., Pinelli, P., Tognetti, R. and Alvino, A. (2005) Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. Agriculture and Ecosystem Environment 106:243–252.

Emam, Y., Shekoofa, A., Salehi, F. and Jalali, A. H. (2010) Water stress effects on two common bean cultivars with contrasting growth habits. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 9 (5): 495-499.

Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Bota, J., Galmes, J., Henkle, M., Martı´nez-Can˜ ellas, S. (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast $CO_2$ concentration. New Phytologist 172:73–82.

Fu, J. and Huang, B. (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Environmental and Experimental Botany 45:105–114.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases II. purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. Plant Physiology 59:315–318.

Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48:909-930.

Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam. V., Najafi, F. and Razavi, K. (2012) Effects of penconazole and drought stress stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). Acta Physiologiae Plantarum 34:1537–1549.

Hojati, M., Modarres-Sanavya, S. A. M., Ghanati. F. and Panahi, M. (2011) Hexaconazole induces antioxidant protection and apigenin-7-glucoside accumulation in *Matricaria chamomilla* plants subjected to drought stress. Plant Physiology 168:782-791.

Hu, L., Wang, Z., Du, H. and Huang, B. (2010) Differential accumulation of dehydrins in response to water stress for hybrid and common bermudagrass genotypes differing in drought tolerance. Plant Physiology 162:103–109.

Archive of SID

www.SID.ir

Salt Stress Responses of a Halophytic Grass *Aeluropus lagopoides* and Subsequent Recovery. Russian Plant Physiology 57(6):784–791.

Srivalli, B., Sharma, G. and Khanna-Chopra, R. (2003) Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. Plant Physiology 119:503-512.

Tahi, H., Wahbi, S., Modafar, C. E., Aganchich, A. and Serraj, R. (2008) Changes in antioxidant activities and phenol content in tomato plants subjected to partial root drying and regulated deficit irrigation. Plant Biosystems 142:550–562.

Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science168: 223–231.

Yang, Y., Han, C., Liu, Q., Lin, B. and J. Wang, J. (2008) Effect of drought and low lighton growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. Acta Physiologiae Plantarum 30: 433-440.

Zargari, A. (1990). Herbal Medicines. Tehran, Publication of Tehran University, 14-18.

photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Plant Physiology 161:1189–1202.

Safarnejad, A. (2008) Morphological and biochemical response to osmotic stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Botany 40:735-746.

Sajedi, N. A., Ferasat, M., Mirzakhani, M. and Mashhadi Akbar Boojar, M. (2012) Impact of water deficit stress on biochemical characteristics of safflower cultivars. Physiology and Molecular Biology of Plants 18:323-329.

Shahaneh, S., Imani, A. A. and Shahbazi, H. (2013) Evaluation of the antioxidant enzymes activity with drought tolerance in vegetative and reproductive growth stages. Annals of Biological Research 4(5):152-157.

Shahmohamadi, R., Sariri, R., Rasa, M., Ghafoori, H., Mahmudreza, A., Nasuti, S. and Tahery, M. (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of flowering aerial parts *Mentha Pulegium* from Gilan. Pharmacology 3: 651-659.

Shamim, A., Rashid, A., Muhammad, Y. A., Ashraf, M., Ejaz, A. W. (2009) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to drought stress at germination and seedling growth stages. Pakistan Journal of Botany 41:647–654.

Shirazi, F. H., Ahmadi, N. and Kamelinejad, M. (2004) Evaluation of northern Iran *Mentha pulegium* cytotoxicity. Daru journal 12:106–110.

Sobhanian, H., Motamed, N., Rastgar Jazii, F., Razavi, K., Niknam, V. and Komatsu S. (2010)

Archive of SID

www.SID.ir