Archive of SID

مقایسه تأثیر تنش شوری بر رشد و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در اندام های مختلف گیاه پونه معطر (*Mentha pulegium* L.)

محمد جواد مرآتی[1*]، وحید نیکنام[1]، حلیمه حسن پور[2*] و مسعود میر معصومی[1]

[1] تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، قطب تبارزائی موجودات زنده ایران

[2] تهران، پژوهشگاه هوافضا

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۵

چکیده

پونه معطر (*Mentha pulegium* L.) گیاهی دارویی، متعلق به تیره نعناعیان است. در پژوهش حاضر، تأثیر تنش شوری بر سطح برگ، طول ساقه، طول ریشه و فعالیت آنزیم‌های SOD، POD، PPO، CAT و APX مورد مطالعه قرار گرفت. بذرها در پیت کشت شدند و در شرایط گلخانه‌ای ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی، دمای روزانه و شبانه (۲۵/ ۱۸ درجه سانتیگراد) قرار گرفتند. گیاهک‌های ۶۰ روزه به گلدان‌های حاوی پرلیت منتقل شده و در محلول هوگلند با غلظت‌های مختلف شوری ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی مولار NaCl رشد کردند. گیاهچه‌ها طی ۵ زمان برداشت مختلف (۰ ، ۱۰ ، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز) برای آنالیزهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برداشت شدند. نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری طول ساقه و سطح برگ کاهش یافت، در حالیکه طول ریشه تا غلظت ۵۰ میلی مولار به طور معنی داری افزایش و بعد کاهش یافت ($P \leq ۰/۰۵$). تأخیر در زمان برداشت منجر به کاهش بیشتر سطح برگ و طول ساقه شد. با افزایش سطح شوری فعالیت همه آنزیم‌های آنتی اکسیدان در همه برداشت‌ها افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد ($P \leq ۰/۰۵$). فعالیت آنزیم‌های SOD، PPO و APX در ریشه بیشتر از سایر اندام‌ها بود، در حالیکه فعالیت CAT در برگ بیشتر از ساقه و ریشه بود. بنابراین به نظر می‌رسد پونه معطر با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریشه، ساقه و برگ، اثرات منفی تنش شوری را کاهش می‌دهد و پاسخ آنتی‌اکسیدانی این گیاه به تنش شوری رابطه مستقیم با مدت زمان تنش دارد.

واژه‌های کلیدی: پونه معطر، شوری، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اندام، زمان برداشت

[*] نویسندگان مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۲۲۰۳۳۹۶، پست الکترونیکی: mohammadjm67@yahoo.com ، hassanpour@ari.ac.ir

مقدمه

تنش های مختلف محیطی شامل تنش های زنده و غیر زنده سبب تولید رادیکال های آزاد اکسیژن می شوند، از جمله این تنش ها می توان به تنش شوری، خشکی، نور شدید و حتی عوامل بیماری‌زا اشاره کرد (۱۸). تنش شوری عاملی است که به طور جدی تولید محصولات دارویی و زراعی را در مناطق خشک و نیمه خشک محدود می‌کند. پاسخ گیاهان به تنش شوری متفاوت است و به میزان سمیت یونی، تغییرات پتانسیل اسمزی، مدت زمان تنش و نوع گونه گیاهی بستگی دارد (۹). خسارت ناشی از تنش شوری در گیاهان از طریق ایجاد تنش اسمزی بوده و منجر به کاهش میزان آب سلول، سمیت یونی و اختلال در جذب عناصر غذایی می شود (۳۶). تنش شوری مانند دیگر تنش های محیطی باعث تجمع گونه های واکنشگر اکسیژن (ROS) مانند سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال های هیدروکسیل در سلول و آسیب رساندن به لیپیدهای غشا، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک می شود (۵

www.SID.ir

Archive of SID

و ۲۹). آنزیم های آنتی اکسیدان مهمترین ترکیبات در سیستم های جاروب‌گر گونه های فعال اکسیژن (ROS) هستند و نخستین راه مقابله با تنش های اکسیداتیو می باشند (۳۱). در گیاهان عالی سیستم جاروب‌گر گونه های واکنشگر اکسیژن (ROS) از آنزیم های آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز (CAT)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پلی فنول اکسیداز (PPO) و آسکوربات پراکسیداز (APX) تشکیل شده اند، که می توانند گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط تنش را از بین ببرند. آنزیم های آنتی اکسیدان از غشاها در مقابل اثرات مخرب ROS که در برابر تنش های غیر زنده تولید می شوند، محافظت نموده و موجب مقاومت و پایداری گیاهان در برابر تنش هایی همانند شوری می‌شوند (۲۳ و ۳۶).

پونه معطر (*Mentha pulegium* L.)، گیاهی دارویی و معطر از تیره نعناعیان (Labiatae) بوده و دارای اسانس، تانن، قند، رزین، مواد پکتیکی و هسپریدین می باشد. اسانس این گیاه از نظر دارویی در پزشکی ارزشمند است. با توجه به شوری روزافزون خاک‌های زراعی و ارزش بالای خواص دارویی پونه معطر، بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این گیاه تحت تنش شوری می تواند برای بررسی پتانسیل مقاومت گیاه به تنش شوری و تولید ترکیبات باارزش در این گیاه مفید باشد. بدین منظور اثر غلظت های مختلف نمک بر طول ساقه، طول ریشه، سطح برگ و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان گیاه پونه معطر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

کشت بذرها و اعمال تنش: بذرهای گیاه پونه معطر در مرداد ماه سال ۱۳۹۱ از روستای تازآباد چالوس در استان مازندران جمع آوری شد. ابتدا بذرها در گلدان‌های حاوی پیت کشت شدند و بعد در شرایط گلخانه ای ۱۶ ساعت روشنایی/ ۹ ساعت تاریکی، دمای روزانه و شبانه (۲۵/ ۱۸ درجه سانتیگراد) قرار گرفتند. گیاهان ۶۰ روزه به گلدان های حاوی پرلیت منتقل شدند و در محلول هوگلند با غلظت های مختلف شوری ۰ (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی مولار سدیم کلرید رشد کردند. برای آنالیزهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، ۵ برداشت گیاهان در پنج مرحله مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز) انجام شد.

اندازه‌گیری سطح برگ: سطح برگ‌ها با دستگاه تعیین سطح برگ مدل MK_2 ساخت شرکت Gate House تعیین شد (۳۴).

استخراج و سنجش مقدار پروتئین های محلول: به منظور تعیین فعالیت آنزیم ها، اندام های مختلف گیاه در $4^{\circ}C$ توسط بافر استخراج Tris-HCl یک مولار (pH=۶/۸) ساییده و همگن شدند. عمل عصاره گیری به نسبت ۱:۲ (میلی لیتر بافر: گرم بافت) انجام شد. سپس همگنای حاصل در یک سانتریفوژ یخچالدار Beckman مدل J-21 با شتاب g ۱۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. روشناور حاصل در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای بررسی کمی پروتئین ها و آنزیم ها از دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-۱۶۰ استفاده شد. بررسی کمی پروتئین ها با روش برادفورد (۷) و با کمک منحنی استاندارد (با استفاده از آلبومین سرم گاوی در محدوده صفر تا ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) انجام گردید.

سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD): فعالیت این آنزیم براساس قابلیت آن در بازدارندگی واکنش احیایی فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) در ۵۶۰ نانومتر و بر اساس روش Giannopolitis و Ries (۱۲) تعیین شد. محلول واکنش شامل بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۵)، متیونین ۱۳ میلی مولار، ۰/۱Na-EDTA میلی مولار، نیتروبلو تترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۷۵ میکرومولار و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره بود. محلول واکنش به مدت ۱۴ دقیقه در معرض نور فلوئورسنت قرار داده شد و جذب آن در طول موج

www.SID.ir

Archive of SID

۵۶۰ نانومتر خوانده شد. اساس کار تبدیل NBT به فورمازان در حضور نور و ظهور رنگ بنفش می باشد که در حضور آنزیم سوپراکسید دیسموتاز واکنش مذکور مهار می‌شود و ظهور رنگ کاهش می یابد. تفاوت بین جذب محلول شاهد و محلول واجد عصاره نشان دهنده بازدارندگی واکنش توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است. یک واحد آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که احیای نوری NBT را به میزان ۵۰٪ بازدارندگی کند. بنابراین فعالیت این آنزیم بر حسب واحد آنزیم به ازای هر میلی گرم پروتئین ($Unitmg^{-1}protein$) محاسبه شد.

سنجش فعالیت پراکسیداز (POD): سنجش پراکسیداز بر اساس روش Abeles و Biles (۱) انجام شد و ترکیب محیط واکنش شامل بافر سدیم استات ۰/۲ مولار (pH=۴/۸)، آب اکسیژنه ۳٪، بنزیدین ۰/۰۲ مولار در متانل ۵۰٪ و ۲۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی بود. تغییرات جذب در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و میزان فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول بنزیدین اکسید شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO): به منظور سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش Raymond و همکاران (۳۲) استفاده شد. در این روش ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۸)، ۰/۰۲ مولار پیروگالول و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی را در یک لوله آزمایش که در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داشت، مخلوط کرده و بلافاصله تغییرات جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب هر میکرو مول پیروگالل اکسید شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

سنجش فعالیت کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم کاتالاز براساس میزان تجزیه H_2O_2 توسط اندازه گیری تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر انجام شد (۲). مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۷)، آب اکسیژنه ۳٪ و ۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود.

میزان فعالیت آنزیم بر حسب هر میکرو مول H_2O_2 تجزیه شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX): برای سنجش آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش Jebara و همکاران (۱۷) استفاده گردید. بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۷)، آب اکسیژنه ۰/۱ میلی‌مولار، آسکوربات ۵۰ میکرومولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در ۴ درجه سانتیگراد مخلوط و تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب هر میکرو مول آسکوربات اکسید شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

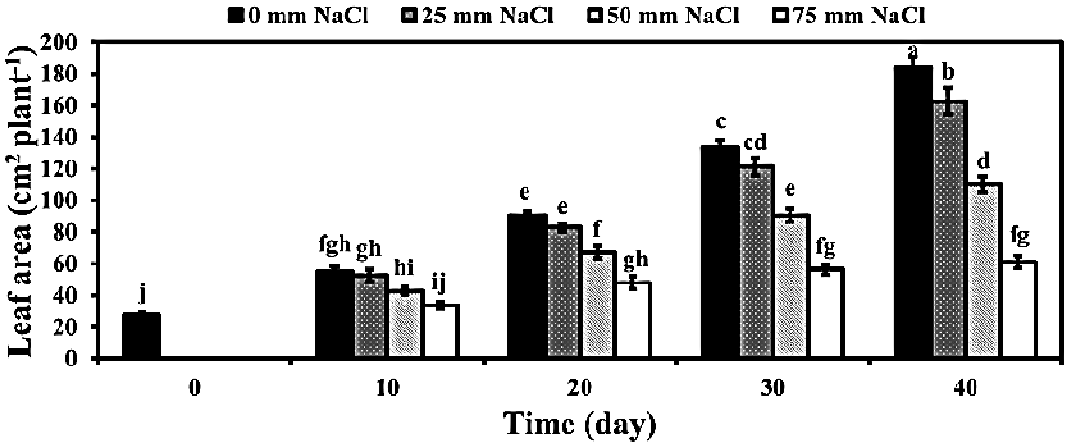
آنالیز آماری داده ها: آزمایش‌ها بر اساس طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد و آنالیزهای آماری داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه توسط نرم افزار *SPSS* نسخه ۱۸ انجام گردید و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

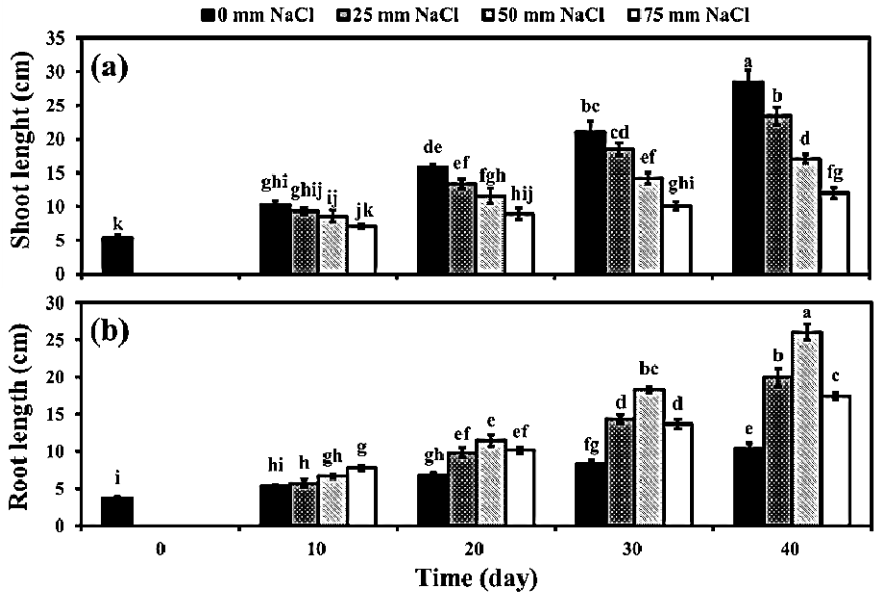
با افزایش غلظت نمک میانگین سطح برگ و طول ساقه کاهش و طول ریشه افزایش یافت (شکل‌های ۱ و ۲). با تأخیر در زمان برداشت، سطح برگ و طول ساقه درصد کاهش بیشتری را نشان دادند. همچنین در کلیه زمان‌های برداشت‌ها، تیمار ۷۵ میلی مولار NaCl کمترین میزان رشد برگ و ساقه را نشان داد. در همه برداشت ها طول ریشه گیاهان تحت تیمار نمک به طور معنی داری بیشتر از گیاهان کنترل بود و در غلظت ۵۰ میلی مولار NaCl بیشترین رشد طولی در ریشه مشاهده شد ($P \leq$ ۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- اثر غلظت های مختلف NaCl بر سطح برگ گیاه پونه معطر (*M. pulegium* L.) طی ۵ زمان برداشت مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از تنش).



شکل ۲-تغییرات طول ساقه (a) و طول ریشه (b) گیاه پونه معطر (*M. pulegium* L.) در غلظت های مختلف NaCl طی ۵ زمان برداشت مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از تنش).

تیمار NaCl منجر به افزایش فعالیت SOD در ریشه، ساقه و برگ گیاه پونه معطر گردید (شکل ۳). فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در ریشه بیشتر از ساقه و برگ بود و در همه اندام ها فعالیت این آنزیم در غلظت ۷۵ میلی مولار نمک بیشترین مقدار را نشان داد. این روند در چهار زمان برداشت (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز) مشاهده شد ولی نکته قابل توجه این بود که با افزایش زمان برداشت فعالیت SOD در گیاهان تحت تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میلی مولار NaCl سیر صعودی را نشان داد اما در تیمار ۷۵ میلی مولار نمک تا برداشت چهارم (۳۰ روز پس از تیمار) افزایش و

www.SID.ir

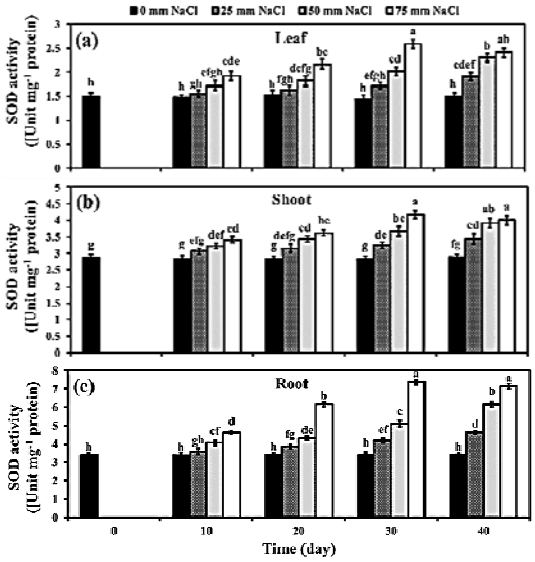
Archive of SID

بعد کاهش یافت. همچنین فعالیت SOD در گیاهان کنترل طی برداشت های مختلف تغییر معنی‌داری نشان نداد.

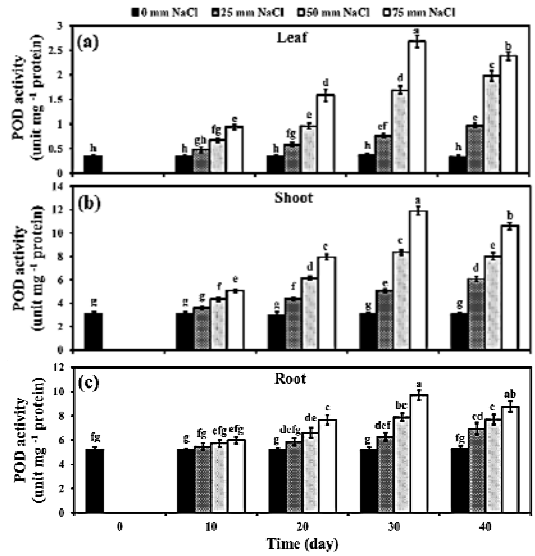
تحت تنش شوری، فعالیت POD در ریشه، ساقه و برگ گیاه پونه معطر افزایش یافت و فعالیت این آنزیم در ریشه و ساقه بیشتر از برگ بود (شکل ۴). طی چهار زمان برداشت (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز) و در همه اندام ها فعالیت این آنزیم در غلظت ۷۵ میلی مولار نمک بیشترین مقدار را نشان داد. فعالیت POD در گیاهان تحت تیمارهای ۵۰ و ۷۵ میلی مولار NaCl تا برداشت چهارم (۳۰ روز پس از تیمار) افزایش و بعد کاهش یافت، در حالیکه در ۲۵ میلی مولار تا برداشت آخر روندی صعودی را نشان داد. البته فعالیت POD در گیاهان کنترل طی برداشت های مختلف تغییر معنی‌داری نداشت.

با افزایش میزان نمک، فعالیت PPO در همه برداشت‌ها و در کلیه اندام های گیاه پونه معطر افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۵). حداکثر فعالیت پلی فنول اکسیداز در تیمار ۷۵ میلی مولار NaCl بود. همچنین عملکرد این آنزیم در ریشه به مقدار قابل توجهی بیشتر از ساقه و برگ بود. طی برداشت های مختلف فعالیت PPO در گیاهان کنترل تقریبا یکسان بود. فعالیت این آنزیم در غلظت های مختلف NaCl تا برداشت چهارم (۳۰ روز بعد از برداشت) سیر صعودی داشت ولی در برداشت آخر در برخی تیمارها ثابت شد و سایر تیمارهای دیگر حتی روندی نزولی را نشان داد.

فعالیت کاتالاز در همه اندام های گیاه پونه معطر تحت تیمار نمک در مقایسه با گیاهان کنترل افزایش پیدا کرد (شکل ۶). فعالیت این آنزیم در برگ گیاه پونه معطر بیشتر از ساقه و ریشه بود. با افزایش مدت زمان تنش فعالیت این آنزیم در کلیه اندام ها و در تیمارهای مختلف شوری افزایش پیدا کرد. البته فعالیت CAT در گیاهان کنترل طی برداشت های مختلف تغییر معنی‌داری را نشان نداد.



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت SOD در برگ (a)، ساقه (b) و ریشه (c) گیاه پونه معطر (*M. pulegium* L.) طی ۵ زمان برداشت مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از تنش)



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت POD در برگ (a)، ساقه (b) و ریشه (c) گیاه پونه معطر (*M. pulegium* L.) طی ۵ زمان برداشت مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از تنش)

تیمار NaCl منجر به افزایش فعالیت APX در ریشه، ساقه و برگ گیاه پونه معطر گردید (شکل ۷). فعالیت آسکوربات پراکسیداز در ریشه بیشتر از ساقه و برگ بود و در برداشت های مختلف فعالیت این آنزیم در غلظت ۷۵ میلی مولار نمک بیشترین مقدار را نشان داد. با افزایش زمان برداشت، فعالیت APX در ساقه و برگ گیاهان تحت

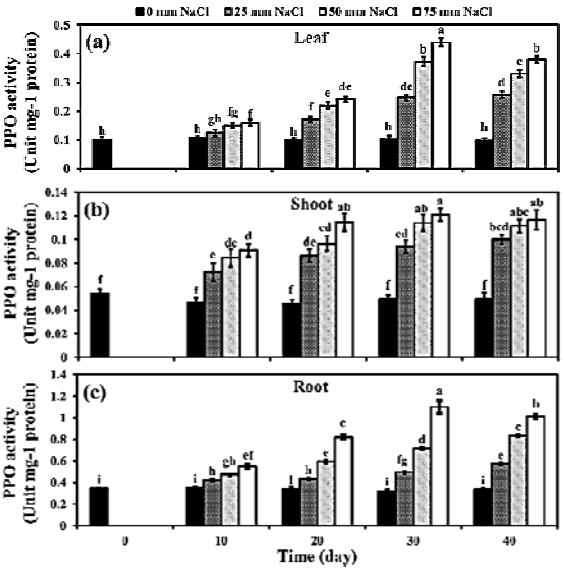
www.SID.ir

Archive of SID

تیمارهای ۲۵، ۵۰ میلی مولار NaCl سیر صعودی را نشان داد اما در تیمار ۷۵ میلی مولار نمک تا برداشت چهارم (۳۰ روز پس از برداشت) افزایش و بعد کاهش یافت. البته فعالیت APX در گیاهان کنترل طی برداشت های مختلف تغییر معنی‌داری نداشت.

بحث

تنش شوری سطح برگ و طول ساقه گیاه پونه معطر را در مقایسه با گیاهان کنترل کاهش داد و با افزایش مدت زمان تنش اندام های رویشی گیاهان تنش دیده کاهش رشد بیشتری را نسبت به گیاهان کنترل نشان دادند (شکل ۱ و شکل ۲a). این کاهش رشد توسط تنش شوری با نتایج پژوهش Tuna و همکاران (۳۸) در گوجه فرنگی و Mühling و Läuchli (۲۵) در کتان و پنبه مطابقت دارد. مهار رشد یک پاسخ رایج به شوری بوده و یکی از مهمترین شاخص های کشاورزی در تحمل شوری است (۲۶).



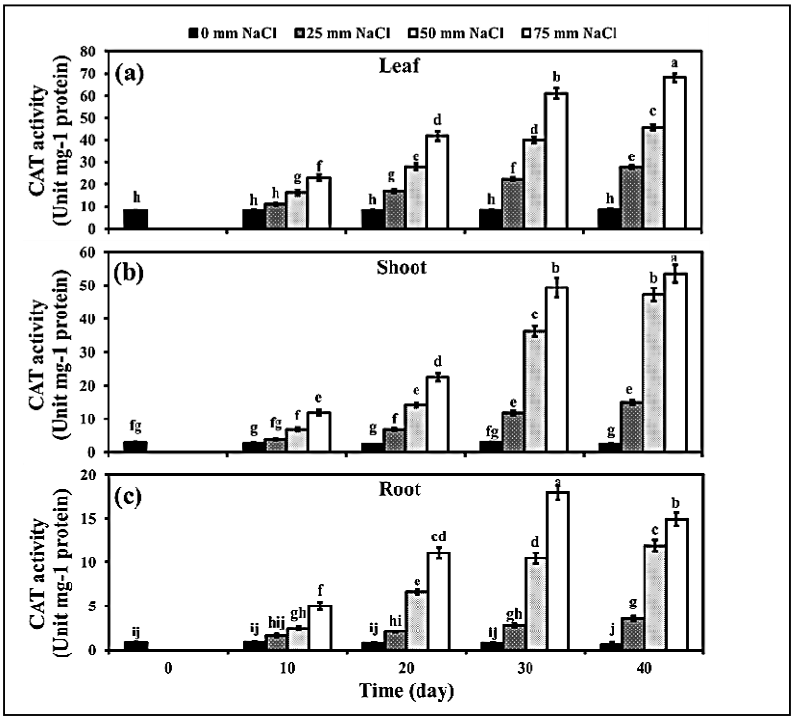
شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت PPO در برگ (a)، ساقه (b) و ریشه (c) گیاه پونه معطر (*M. pulegium* L.) طی ۵ زمان برداشت مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از تنش)

کاهش طول ساقه و سطح برگ و به عبارت دیگر کاهش رشد رویشی اندام های هوایی در اثر تیمار شوری احتمالا به دلیل کاهش سطح فتوسنتز و همچنین کاهش رنگیزه های فتوسنتزی نظیر کلروفیل a و b، جذب خالص CO_2، هدایت روزنه ای و بسته شدن روزنه ها در اثر تنش شوری می باشد (۲۹). همچنین کاهش رشد رویشی اندام های هوایی تحت تأثیر NaCl می تواند به دلیل کاهش جذب آب و بازدارندگی محصولات فتوسنتزی و سنتز کربوهیدرات ها باشد (۲۷). در مقابل طول ریشه تحت تنش شوری افزایش پیدا کرده است که با نتایج Hassanpour و همکاران (۱۳) در گیاه پونه معطر تحت تنش خشکی مطابقت دارد.

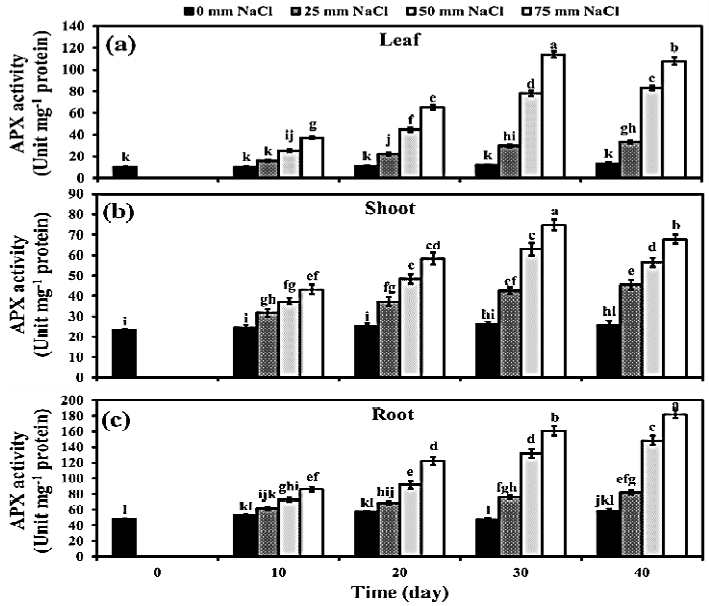
فعالیت آنزیم SOD تحت تنش شوری در ریشه، ساقه و برگ‌های گیاه پونه معطر به مقدار قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۳). نتایج مشابهی توسط Jaleel و همکاران (۱۴) و تحت تأثیر تنش شوری گزارش شده است. همچنین با افزایش طول مدت تنش فعالیت SOD نیز افزایش پیدا کرده است که با نتایج Neto و همکاران (۲۸) مطابقت دارد. آنیون های سوپر اکسید به وسیله تنش شوری در سلول تولید می شود، زیرا مهمترین تأثیر تنش شوری بسته شدن روزنه‌ها و کاهش تثبیت دی اکسید کربن است که در نتیجهٔ آن رشد کاهش می یابد. همچنین افزایش تنفس در این شرایط سبب تولید این یون های مخرب در میتوکندری سلول می شود. در چنین شرایطی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به عنوان یک آنزیم از بین برنده یون سوپر اکسید، مشابه نتایج به‌دست آمده افزایش می یابد. با افزایش فعالیت این آنزیم سمیت‌زدایی یون سوپراکسید افزایش و آسیب های حاصل از آن در گیاه کاهش می یابد (۳۵). به عبارت دیگر، در هنگام تنش SOD با بازده بسیار بالا با رادیکال های آنیون سوپر اکسید واکنش داده، آب و اکسیژن تولید می‌کند (۱۹)، بنابراین افزایش فعالیت SOD تحت تیمار NaCl می تواند یک پاسخ رایج برای مقابله با اثرات مخرب تنش شوری باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت CAT در برگ (a)، ساقه (b) و ریشه (c) گیاه پونه معطر (*M. pulegium* L.) طی ۵ زمان برداشت مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از تنش)



شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت APX در برگ (a)، ساقه (b) و ریشه (c) گیاه پونه معطر (*M. pulegium* L.) طی ۵ زمان برداشت مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از تنش)

پراکسیداز در فرایندهای متابولیکی مانند کاتابولیسم هورمون، دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا، اکسیداسیون فنل، ایجاد پیوند با پروتئین‌های ساختاری سلول و پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی نقش دارد (۸). با افزایش شوری فعالیت POD در همه اندام های پونه معطر افزایش پیدا کرد و تأخیر در برداشت باعث افزایش فعالیت POD

www.SID.ir

Archive of SID

در گیاهان تحت تأثیر تنش شد (شکل ۴). Ashraf و Ali (۴) و Meloni و همکارانش (۲۳) مشاهده کردند که تنش شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز به ترتیب در برگ کلزا و پنبه شده و در نتیجه اثرات مخرب تنش شوری را در این گیاهان کاهش داده است. نتایج مشابهی توسط Zhang و همکاران (۴۰)، Velikova و همکاران (۳۹)، Berova و همکاران (۶) تحت تنش‌های خشکی، باران اسیدی و سرما در گیاهان گندم و نخود گزارش شده است. بنابراین افزایش فعالیت پراکسیداز تحت تنش شوری در گیاه پونه معطر و گزارشهای مذکور در تنش های دیگر می تواند نقش حفاظتی این آنزیم را در مقابل تنش های مختلف پیشنهاد کند. همچنین با توجه به نقش مهم POD در حذف آنزیمی H_2O_2، کاهش مالون دی آلدهید و حفظ یکپارچگی غشای سلول، افزایش این آنزیم در گیاهان تحت تنش شوری کاملا منطقی به نظر می رسد (۱۴).

PPO در اکسیداسیون ترکیبات فنولی نقش مهمی را ایفا می نماید. فعالیت این آنزیم در ریشه، ساقه و برگ‌های گیاه پونه معطر در زمان های برداشت مختلف افزایش یافته است (شکل ۵). نتایج مشابهی توسط Manivannan و همکاران (۲۱) تحت تنش خشکی در گیاه *Vigna unguiculata* گزارش شده است. افزایش فعالیت PPO ممکن است منجر به کاهش محتوای فنول و در نتیجه حفظ محتوای اکسین شود (۱۱) که این نیز به نوبه خود می تواند سبب افزایش رشد سلول و دیواره سلولی شود. فعالیت PPO در ریشه پونه معطر بسیار بالاتر از برگ و ساقه آن بود که این موضوع می تواند ارتباط بین فعالیت بالاتر این آنزیم در ریشه و رشد بیشتر ریشه در گیاهان تحت تنش شوری را نشان دهد.

CAT در جاروب کردن H_2O_2 از سلول های گیاهی نقش مهمی را ایفا می‌کند (۱۰). فعالیت کاتالاز در برگ، ساقه و ریشه گیاهان تحت تیمار تنش شوری در مقایسه با گیاهان کنترل افزایش یافت (شکل ۶) که این نتایج با یافته‌های Jaleel و همکاران (۱۶) تحت تیمار تنش شوری مطابقت دارد. همچنین تأخیر در زمان برداشت سبب افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم در گیاهان تحت تیمار NaCl شده است که با یافته های Koca و همکاران (۱۹) در گیاه کنجد تحت تنش شوری سازگاری دارد. CAT به همراه SOD رادیکال های آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) و H_2O_2 را به آب و مولکول اکسیژن تبدیل می‌کند و خسارتهای سلولی ناشی از تنش های مختلف ازجمله شوری را کاهش می دهد (۳۳)، بنابراین افزایش این آنزیم طی تنش منجر به کاهش خسارتهای اکسیداتیو ناشی از تنش شوری می شود.

تحت تیمار نمک فعالیت APX در کلیه اندام های گیاه پونه معطر در مقایسه با گیاهان کنترل افزایش یافته است (شکل ۷). نتایج مشابهی توسط Manivannan و همکاران (۲۱) تحت تنش خشکی در گیاه *Vigna unguiculata* گزارش شده است. طول مدت زمان تنش با فعالیت APX رابطه مستقیم داشته و با افزایش زمان تأثیر تنش، فعالیت APX نیز تقویت شد که با نتایج Koca و همکاران (۱۹) همخوانی دارد. با توجه به اینکه APX موجود در اندامک ها و سیتوزول به ترتیب در حذف H_2O_2 تولید شده در اندامک ها و H_2O_2 موجود در سیتوزول و آپوپلاست نقش دارد (۳) و همچنین APX موجود در کلروپلاست، در سمیت‌زدایی H_2O_2 توسط سیستم ASA-GSH-NAPDH نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند (۲۱)، بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم تحت تنش شوری می تواند نقشی کلیدی را در حذف H_2O_2 تولید شده در خلال تنش شوری بازی کند و منجر به تحمل بیشتر تنش شوری توسط گیاه شود.

به طور کلی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در زمان‌های برداشت مختلف در گیاهان کنترل تغییر معنی‌داری را نشان ندادند ولی در گیاهان تنش دیده با تأخیر در زمان برداشت و قرارگیری بیشتر در معرض تنش شوری تا برداشت چهارم (۳۰ روز پس از برداشت) فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی افزایش یافت ولی در برداشت پنجم این روند

www.SID.ir

Archive of SID

ثابت و حتی در مواردی نزولی شد که می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که پس از قرارگیری طولانی‌مدت گیاه در معرض تنش، توانایی گیاه پونه معطر برای مقابله با اثرات مخرب تنش شوری کاهش می‌یابد. جاروب کردن ROS در گیاهان برای تحمل تنش اکسیداتیو و مقابله با اثرات مخرب آن بسیار کلیدی می‌باشد. مشخص شده که افزایش قدرت آنتی اکسیدانی باعث مقاومت در مقابل تنش شوری می شود، بنابراین افزایش فعالیت SOD، POD، PPO، CAT و APX توسط تنش شوری به خوبی نقش این آنزیم ها را برای مقابله با اثرات مضر تنش شوری و در نتیجه افزایش مقاومت گیاه به این تنش اثبات می‌کند.

از مطالب مذکور می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات ROS را حذف کرده و خسارتهای ناشی از تنش شوری را بهبود می‌بخشد. ضمنا پاسخ اکسیداتیو این گیاه به تنش شوری رابطه مستقیم با مدت زمان تنش شوری دارد.

منابع

1. Abeles F.B., Biles C.L. (1991) Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *J. Plant Physiol.* 95: 269–273.
2. Aebi H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105: 121–126.
3. Asada K. (1992) Ascorbate peroxidase a hydrogen scavenging enzyme in plants, *Physiol Plant* 85: 235–241.
4. Ashraf, M., Ali, Q. 2008. Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environ. Exp. Botany.* 63: 266–273.
5. Becana M., Moran J.F., Iturbe-Ormaetxe I. (1998) Iron dependent oxygen free radical generation in plantssubjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant. Soil.* 201: 137-147.
6. Berova M., Zlatev Z., Stoeva N. (2002) Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low-temperature stress. *J. Plant Physiol.* 28: 75–84.
7. Bradford, M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochem.* 72: 248-254.
8. Christensen J.H., Bauw G., Welinder K.G., Montagu M.V., Boerjan W. (1998) Purification and characterization of peroxides correlated with signification in poplar xylem. *Plant Physiol.* 118: 125-135.
9. Comba M.E., Benavides M.P., Tomaro M.L. (1998) Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybeanroot nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 665-671.
10. Dewir Y.H., Chakrabarty D., Ali M.B., Hahn E.J., Paek K.Y. (2006) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *J. Environ. Exp. Bot.* 58: 93–99.
11. Fletcher R., Gilley A., Davis T., Sankhla N. (2000) Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Hort. Rev.* 24: 55–138.
12. Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977) Superoxide dismutases II. purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *J. Plant Physiol.* 59: 315–318.
13. Hassanpour H., Khavari-Nejad R.A., Niknam V., Najafi F., Razavi K. (2012) Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Acta Physiol. Plant.* 34: 1537–1549.
14. Jaleel C.A., Gopi R., Kishorekumar A., Manivannan P., Sankar B., Panneerselvam R. (2008) Interactive effects of triadimefon and salt stress on antioxidative status and ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus*. *Acta Physiol. Plant.* 30: 287–292.
15. Jaleel C.A., Gopi R., Manivannan P., Panneerselvam R. (2007a) Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to paclobutrazol treatment under salinity. *Acta Physiol. Plant.* 29: 205–209.
16. Jaleel C.A., Manivannan P., Sankar B., Kishorekumar A., Gopi R., Somasundaram R., Panneerselvam R. (2007b) Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite

www.SID.ir

Archive of SID

accumulation. *J. Colloids Surf. B. Bio.* 60: 201–206.

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

18. Karpinski S., Gabrys H., Mateo A., Karpinska B., Mullineaux P.M. (2003). Light perception in plant diseasedefense signalling. *Current Opinion Plant Biol.* 6: 390–396.

19. KocaH., Bor M., zdemir F., T¨urkan I. (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 60: 344–351.

20. Lin C.C., Kao C.H. (2000) Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regul.* 30: 151–155.

21. Manivannan P., Jaleel C.A., Kishorekumar A.B., Sankar,Somasundaram R., Sridharan R., Panneerselvam R. (2007) Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. By propiconazole under water deficit stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 57: 69–74.

22. Mehlhorn H., Lelandais M., Korth H., Foyer C. (1995) Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *F.E.B.S. Lett.* 378: 203–206.

23. Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez C.A., Cambraia J. (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Brazil. J. Plant. Physiol.*15 (2): 12-21.

24. Mohammdkhani N., Heidari R. (2007) Effects of drought stress on protective enzyme activities and lipid peroxidation in two maize cultivars. *Pak. J. Biol. Scis.* 10 (21): 3835-3840.

25. Mühling K.H., Läuchli A. (2002) Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. *J. Plant Physiol.* 159:137–146.

26. Nazar R., Iqbal N., Syeed S.A., Khan N. (2011) Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivar. *Plant Physiol.* 168: 807–815.

27. Nemat Alla M.M., Younis M.E., El-Shihaby O.A., El-Bastawisy Z. M. (2002) Kinetin regulation of growthand secondary metabolism in waterlogging andsalinity treated *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *Acta Physiol Plant.* 24: 19-27.

28. Neto A..D.A., Prisco J.T., Enéas-Filho J., Abreu C.E.B., Gomes-Filho E. (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environ. Exp. Bot.* 56: 87-94.

29. Netondo G.W., Onyango J.C., Beck E. (2004)Sorghum and salinity: I. Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. *Crop Sci.* 44: 797-805.

30. Noctor G., Foyer C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev of Plant Physiol and Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.

31. Pan Y., Wu L.J., Yu Z.L. (2006) Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SODisoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* fisch). *Plant Growth Regul.* 49: 157-165.

32. Raymond J., Rakariyatham N., Azanza J.L. (1993) Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *J. Phytochem.* 34: 927–931.

33. Reddy A.R., Chaithanya K.V., Sundar D. (2000) Water stress mediated changes in antioxidant enzymes activity of mulberry (*Morus alba* L.). *J. Seric. Sci. Jpn.* 69: 169–175.

34. Romero-Aranda, R., Soria T., Cuartero J. (2001) Tomato water uptake and plant water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci.,* 160: 265-272.

35. Sairam R.K., Deshmukh P.S., Saxena D.C. (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol Plant.* 41: 384-394.

36. Shabala A.J., Al-Azawi S.K.. (2000) Occurrance of phosphate -solubilizing bacteria in some Iraqi Soils. *Plantand Soil.* 117: 135-141.

37. Tan, Y., Liang Z.S., Hongbo H.B., Du F. (2006) Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix Astragali* at graining stage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 49: 60-65.

38. Tuna A.L., KayabC., Ashraf M., Altunlu H., Yokas I., Yagmur B. (2007) The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown

www.SID.ir

Archive of SID

under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 59: 173–178.

39. Velikova V., Yordanov I., Edreva A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *J. Plant Sci.* 151: 59–66.

40. Zhang Y.J., Zhang X., Chen C.J., Zhou M.J., Wang H.C. (2010) Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazloe, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. *Pesticide Biochem and Physiol* 98: 151–157.

Comparative effects of salt stress on growth andantioxidative responses in different organs of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.)

Merati M.J.[1], Niknam V.[1], Hassanpour H.[2] and Mirmasoumi M.[1]

[1] School of Biology, College of Science, and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms in Iran, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[2] Aerospace Research Institute, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) is a medicinal plant of the Labiatae family. In this study, it was investigated the effect of salinity on leaf area, shoot length, root length,activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX) in pennyroyal species. Seeds were sown in Tref peat in greenhouse conditions with 16 h light/ 8 h dark period per 24 h and day/ night temperatures of 25/ 18 ˚C. Then,60 days seedlings transferred to pots containing perlite and grew in hoagland solution with different concentrations of 0, 25, 50, and 75 mM NaCl. Seedlingswere harvested for physiological and biochemical analyzes, after four different harvest times (10, 20, 30, and 40 days). The results showed that leaf area and shoot length decreased with increasing salinity levels, whereas root length increased to 50 mM NaCl and then decreased. Delay in harvest time caused more decrease in leaf area and shoot length. With increasing NaCl, activity of all the enzymes significantly increased at four harvest times. Activities of SOD, PPO, and APX were higher in root than that of leaf and shoot, whereasCAT activity was higher in leaf. On the basis of the obtained data, it can be concluded that pennyroyal reduced negative effects of salinity stress with increasing activities of antioxidant enzymes in leaf, shoot, and root. Antioxidative response of M pulegium has a direct relationship to salt stress time duration.

Key words: Pennyroyal, Salinity, Antioxidant enzymes, Organ, Harvest time

www.SID.ir