مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

سال چهارم، شماره دوم، پاییز و زمستان، ۱۳۹۷

ارزیابی پراکسید هیدروژن، پرولین، مالون دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در دو گیاه دارویی شوید (*Anethum graveolens* L.) و گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) در شرایط تنش شوری

محمد اسماعیل‌پور جهرمی*[1]، امید یونسی[2]

چکیده

تحقیق حاضر با هدف ارزیابی میزان پراکسید هیدروژن، پرولین، مالون دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دو گیاه دارویی شوید و گشنیز تحت تنش شوری در گلخانه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. آزمایش بصورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی عبارت از سه سطح تنش شوري شامل شاهد (بدون تنش)،۶۰ و ۱۲۰ میلي‌مولار نمک کلرید سدیم و دو گیاه دارویی شوید و گشنیز بود. صفات مورد ارزیابی شامل غلظت پراکسید هیدروژن، مالون دی‌آلدئید، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسیددیسمیوتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز بود. نتایج به‌دست آمده نشان دهنده اثرات افزاینده تنش شوری بر میزان پراکسید هیدروژن، مالون دی‌آلدئید و پرولین بود. به نحوی که با افزایش شدت تنش شوری غلظت آنها به میزان قابل ملاحظه‌ای در هر دو گیاه دارویی افزایش یافت. میزان این افزایش در ریشه‌ها و در گیاه شوید بیشتر بود که حاکی از حساسیت بالاتر این گیاه به تنش شوری می‌باشد. همچنین تنش شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردید. فعالیت هر سه آنزیم مورد ارزیابی در ریشه بالاتر از اندام هوایی بود. در گیاه شوید فعالیت آنزیم کاتالاز به مراتب بالاتر از گشنیز بود. با این حال دو گیاه مورد ارزیابی به لحاظ سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز و پراکسیداز تفاوت چندانی را با یکدیگر نشان ندادند.

کلمات کلیدی: پراکسیداز، پرولین، سوپراکسید دیسمیوتاز، شوری، شوید، گشنیز، مالون دی‌آلدئید

*[1] نویسنده مسئول، عضو هیات علمی دانشگاه جهرم، فارس. ایمیل: msp62@yahoo.com

[2] دکتري تخصصی فیزیولوژي گیاهان زراعی، دانشگاه تهران، تهران

مقدمه

شوری به عنوان یکی از شایعترین تنش‌های محیطی با محدود نمودن رشد و نمو گیاه، تولید موفقیت آمیز محصولات زراعی را به مخاطره انداخته است و یکی از چالش های مهم جهت تولید محصولات زراعی به ویژه در کشورهایی است که کشاورزی از طریق آبیاری انجام می-گیرد (Netodo et al., 2004). رشد گیاهان در شرایط تنش شوری به دلیل کاهش پتانسیل آب در محیط ریشه و تاثیر ویژه یون‌ها در فرایندهای متابولیکی کاهش می‌یابد (Netodo et al., 2004).

شوری همانند دیگر تنش‌های محیطی سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن نظیر پراکسید هیدروژن، سوپراکسید و رادیکال هیدرکسیل شده و تنش اکسیداسیونی گیاه را به دنبال دارد (Dat et al., 2000). آسیب رساندن به ساختارهای غشایی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و کلروفیل از عوارض تنش اکسیداسیونی است. مالون دي‌آلدئید محصول پراکسیداسیون اسیدهاي چرب اشباع نشده در فسفولیپیدها است. از میزان پراکسیداسیون لیپید به عنوان نشانه رادیکال آزاد مضر براي غشاء سلولي تحت شرایط تنش در تحقیقات مختلف استفاده شده است (Azevedo et al. 2006).

گیاهان برای کاستن از اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن سازوکارهای متفاوتی دارند که از جمله آنها می-توان به سیستم دفاع آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی اشاره کرد. آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسمیوتاز و گایاکول پراکسیداز در پاکسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند(Kumar et al., 2009). گیاهانی که سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمدتری دارند بهتر می‌توانند در برابر تنش‌های محیطی نظیر شوری مقاومت کنند (Nunez et al., 2003).

یکی از پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاهان در برابر تنش شوری تجمع مواد محلول سازگار نظیر پرولین است (Flowers, 2004). نقش این مواد در سلول، علاوه بر دخالت در تنظیم اسمزی سلول، ممانعت از تولید رادیکال آزاد، جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن، حفاظت از یکپارچگی غشا و ثبات پروتئین‌ها است (Flowers, 2004). علاوه بر این، پرولین ترکیبات سلولی را از آسیب ناشی از هدررفت آب محافظت می‌کند. افزایش غلظت پرولین، فراوان‌ترین و عمومی‌ترین پاسخی است که به محض ایجاد تنش مشاهده می‌شود. به عنوان مثال بررسی تنش روی گیاه فلفل نشان داد که مقدار پرولین در گیاه افزایش یافت (Gao et al., 2008).

امرزه تنوع گستردگی تحقیقات انجام شده در زمینه گیاهان دارویی به حدی زیاد است که نمی‌توان به صراحت سطح پیشرفت‌های علمی در این زمینه را محدود در حوزه‌های خاصی کرد. در سال‌های اخیر کاربرد گیاهان دارویی با توجه به عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیماران به این داروها و همچنین به لحاظ اثرهای جانبی شناخته شده داروهای سنتتیک افزایش یافته است. شوید و گشنیز از این دست گیاهان دارویی هستند که ترکیبات و مواد موثره این گیاهان موارد کاربردی متعددی در صنایع دارویی و غذایی دارد که از جمله می‌توان به خواص ضد اسپاسم و درد گشنیز و درمان تصلّب شرایین و ناراحتی‌هاي صفراوي توسط شوید اشاره داشت (Majnoun Hosseini and Twelve Imams, 2007).

بنابراین با توجه به مطالب مطرح شده، و با توجه به افزایش روزافزون زمین‌های شور و تاثیر تنش شوری بر پارامترهای فیزیولوژیکی هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی تاثیر تنش شوری بر شاخصه‌های آسیب ناشی از شوری و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر با هدف ارزیابی میزان پرولین، پراکسیدهیدروژن و مالون دی‌آلدئید و نیز فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیسمیوتاز و گایاکول پراکسیداز دو گیاه دارویی گشنیز و شوید تحت تنش شوری به صورت آزمون گلخانه‌ای در گلخانه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در بهار ۱۳۸۸ اجرا گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی عبارت از سه سطح تنش شوري شامل شاهد (بدون تنش)، ۶۰ و ۱۲۰ ميلي‌مولار نمک کلرید سدیم و دو گیاه دارویی گشنیز و شوید بود. تیمار شوری از طریق آب آبیاری اعمال گردید.

بذر مورد نیاز برای اجرای آزمایش (تولید سال ۱۳۸۷) از موسسه پاکان بذر اصفهان تهیه گردید و پیش از اجرای طرح، یک پیش آزمایش جهت تعیین قوه نامیه انجام شده و قوه نامیه ۱۰۰ درصد مشاهده گردید. تعداد پنج بذر شوید و گشنیز بر اساس تیمارهای مورد ارزیابی پس از ضدعفونی در گلدان‌های سفالی با قطر دهانه ۲۸ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر با وزن تقریبی ۱۸۷۵ گرم کشت گردید. خاک مورد استفاده برای اجرای طرح از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در شهرستان کرج تهیه گردید. شوری خاک مذکور برابر ۱/۲۶ دسی زیمنس بر متر، بافت خاک متوسط تا سبک (لومی شنی) و میزان فسفر و پتاسیم خاک به ترتیب برابر ۹ و ۲۸۰ پی‌پی‌ام بود (جدول ۱). پیش از اجرای آزمایش خاک مورد استفاده برای پر کردن گلدان‌ها استریل گردید.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

	بافت خاک	قدرت نگهداری آب (درصد)	شوری (ds/m)	pH	کربن آلی	ازت کل	فسفر قابل جذب (ppm)	پتاسیم قابل جذب (ppm)
نمونه خاک مزرعه	لومی شنی	۳۱	۱/۲۶	۷/۳	۱/۱۱	۰/۱۶	۹	۲۸۰

پس از استقرار کامل، بوته‌ها تنک شده و سه بوته در هر گلدان حفظ شد. با رسیدن رطوبت خاک به ۸۰ درصد ظرفیت زراعی،آبیاری گیاهان مطابق به تیمارهای شوری به صورت دستی صورت گرفت. گیاهان در گلخانه زیر نور طبیعی با میانگین دمای گلخانه در روز حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شب در حدود ۱۷ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. گیاهان رشد کرده در پایان مرحله رویشی بطور کامل از خاک خارج شدند.

برای سنجش میزان پرولین ۲ ميلي‌ليتر از عصاره اندام هوايي و ريشه تازه گياه در اسيد سولفوسالیسیلیك ۳ درصد پس از صاف شدن به همراه ۲ ميلي‌ليتر معرف نین هیدرین و ۲ ميلي‌ليتر اسيد استيك خالص در يك لوله آزمایش مخلوط شده و به مدت ۱ ساعت جوشانیده شد. به منظور توقف واکنش، نمونه‌ها سریع به ظرف محتوي آب و یخ انتقال داده شدند (به مدت ۲۰ دقیقه) و به هر نمونه ۴ ميلي‌ليتر تولوئن اضافه شده و مخلوط گردیدند. جذب بخش رويي در طول موج ۵۲۰ نانومتر بدست آمد (Bates et al.,1973)

میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از روش الکسدیوا و همکاران (Alexieva et al., 2001) بر اساس و اکنش H_2O_2 با یدید پتاسیم (KI) تعیین گردید. در این روش، ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه اندام هوایی و ریشه در ۵ میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد در حمام آب یخ ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفیوز گردید. سپس به ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار و اسیدیته ۷/۵ و ۱

میلی لیتر یدیدپتاسیم یک مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفت جذب نمونه ها نیز در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

پراکسیداسیو لیپیدی غشاء بر اساس روش استوارت و بولی(Stewart and Bewley, 1980) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۵ گرم از بافت تازه اندام هوایی و ریشه در ۱۰ میلی لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید هموژن و به مدت ۱۰ دقیقه درg ۱۵۰۰۰سانتریفیوز گردیدد. ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل با ۴ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید محتوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل شد. نمونه‌ها مجددا به مدت ۱۰ دقیقه در g۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. جدب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید و میزان پراکسید شدن لیپیدها با استفاده از اختلاف بین طول موج های جذبی و ضریب خاموشی۱۵۵ میکرومول در سانتی‌متر به دست آمد.

برای استخراج پروتئین از بافر تریس گلیسین با اسیدیته ۸/۳ استفاده شد. نمونه‌های گیاهی پس از برداشت در دمای صفر درجه سانتی‌گراد با بافر هموژن شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت در ۲۰۰۰۰ دور دقیقه سانتریفوژ گردید.

برای اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌ها از روش بردفورد (Bradford, 1976) استفاده شد. ۰/۱ میلی لیتر عصاره پروتئینی با ۵ میلی لیتر معرف بردفورد مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه باقی ماند و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و بر اساس منحنی استاندارد رسم شده غلظت پروتئین محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز به روش کک مک و هورست (Cakmak and Horst, 1991) انجام شد. برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز ، ۰/۵ گرم از بافت تازه از اندام هوایی و ریشه به صورت جداگانه در نیتروژن مایع سائیده شد و در ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار با اسیدیته ۶/۸ عصاره گیری شد. مخلوط همگن حاصل در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و سپس محلول روئی برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد. با اضافه نمودن آب اکسیژنه با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، تجزیه آب اکسیژنه با کاهش جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه پیگیری شده و فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد.

سنجش فعالیت سوپراکسید دیسمیوتاز به روش گیانوپولیتیس و راس (Giannopolitis and Ries, 1977) انجام شد. برای بررسی فعالیت آنزیمی ۰/۵ گرم از بافت تازه از اندام هوایی و ریشه به صورت جداگانه در نیتروژن مایع سائیده شد و در ۳ میلی لیتر بافر HEPES-KOH با اسیدیته ۷/۸ حاوی EDTA ۰/۱ میلی مولار عصاره‌گیری شد. همگن حاصل در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و محلول روئی برای سنجش فعالیت سوپراکسیددیسمیوتاز مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل HEPES-KOH ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات با اسیدیته ۷/۸ حاوی EDTA ۰/۱ میلی مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۱۰/۲، ال – ریبوفلاوین ۱۲ میلی مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۱ میکرومولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. مواد فوق جهت جلوگیری از نفوذ نور و آغاز واکنش در لوله-های آزمایش پوشش‌دار مخلوط شد. سپس واکنش با اضافه نمودن عصاره آنزیمی آغاز گردید. در این حالت پوشش روی لوله‌ها برداشته شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور لامپ فلورسنت ۱۵ وات قرار داده شدند و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. همچنین از یک لوله آزمایش حاوی مخلوط واکنش به

جزء عصاره آنزیمی به عنوان شاهد استفاده گردید. فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد.

سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز به روش قناتی و همکاران (Ghanati et al., 2002) انجام شد. برای بررسی فعالیت گایاکول پراکسیداز۰/۵ گرم از بافت تازه از اندام هوایی و ریشه به صورت جداگانه در نیتروژن مایع سائیده شد و در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۲ مولار و اسیدیته ۶/۸ در دمای ۴ درجه سانتی گراد عصاره‌گیری شده و سپس مخلوط همگن حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دمای ۲-۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول روئی جهت اندازگیری گایاکول پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیمی با افزودن مقادیر مناسب از عصاره آنزیمی به مخلوط بافر، گایاکول با غلظت ۲۸ میلی مولار و پراکسید هیدروژن با غلظت ۵ میلی مولار که در کوت دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته شده بود، آغاز گردید و به مدت یک دقیقه تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد.

تجزیه تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات با استفاده از نرم افزار SAS (SAS Institute Inc., 1997) انجام گردید. قبل از تجزیه واریانس داده‌ها فرض نرمال بودن آنها بررسی شد. برای نرمال بودن داده‌ها از نرم افزار MINTAB استفاده گردید. مقایسه میانگین هر صفت به کمک آزمون چند دمنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده بیانگر نقش موثر تنش شوری بر میزان پراکسید هیدروژن، میزان مالون دی‌آلدئید و غلظت پرولین و نیز میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان گایاکول پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز در دو گیاه دارویی گشنیز و شوید بود. اعمال تیمارهای شوری در این تحقیق، منجر به افزایش معنی‌دار کلیه این شاخص‌ها که نمادهای از شدت آسیب گیاه و توان دفاعی در شرایط تنش می باشند گردید.

بررسی نتایج حاصله نشان داد که بین سطوح تنش شوری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد به لحاظ میزان پراکسید هیدروژن تولید شده وجود داشت (جدول ۲).

همزمان با اعمال تنش شوری میزان پراکسید هیدروژن اندام هوایی گیاهان به نحو چشمگیری افزایش یافت و به بالاترین میزان خود در تنش شوری شدید رسید(جدول ۳). این روند افزایشی در گیاه شوید نسبت به گشنیز بالاتر بود و بیشترین غلظت پراکسید هیدروژن در اندام هوایی این گیاه در سطح شوری ۱۲۰ میلی مولار حاصل شد. در ریشه ها نیز افزایش میزان پراکسید هیدروژن با تشدید تنش شوری در هر دو گیاه مذکور مشاهده گردید. شدت افزایش پراکسید هیدروژن در ریشه ها نسبت به اندام هوایی بیشتر بود و از لحاظ این صفت اختلاف میان دو گیاه در سطح تنش شوری شدید معنی دار گردید. ریشه شوید در شرایط تنش شوری شدید از پراکسید هیدروژن بالاتری برخوردار بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر شوری بر میزان پراکسید هیدروژن، پرولین، مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دو گیاه دارویی شوید و گشنیز

صفات مورد ارزیابی	تکرار	شوری	گیاه	شوری × گیاه	خطای آزمایشی	ضریب تغییرات (درصد)
درجه آزادی	۲	۲	۱	۲	۴	
نشت یونی اندام هوایی	۱۶/۳۴۸ **	۳۱/۲۵۵ **	۱۹/۰۴۷ **	۰/۸۴۶ *	۰/۷۳	۸/۳۲
نشت یونی ریشه	۱۱/۸۳۶ *	۱۷/۰۳۴ **	۸/۳۷۸ **	۰/۶۵۳ *	۰/۹۳	۵/۹
پرولین اندام هوایی	۲۲/۱۹۷ **	۱۱/۴۸۶ **	۳۸/۸۵۶ **	۰/۹۵۴ *	۰/۴۷	۱۷/۲۵
پرولین ریشه	۲۶/۸۴۳ *	۱۸/۰۳۲ **	۲۱/۰۱۶ **	۰/۶۴۳ *	۰/۵	۱۲/۲۴
مالون دی آلدئید اندام هوایی	۳۶/۳۸۳ *	۳/۸۵۳ **	۸/۹۵۷ **	۰/۵۰۹ **	۰/۱۲۸	۶/۲۷
مالون دی آلدئید ریشه	۲۳/۸۶۴ **	۴/۷۴۳ **	۱۱/۰۴۷۴ **	۰/۶۲۴ *	۰/۶۷	۱۵/۷۸
فعالیت کاتالاز اندام هوایی	۹/۳۲۱ *	۱۱/۵۷۳ **	۶/۸۵۵ **	۰/۵۷۳ **	۲/۷۶	۱۲/۳۷
فعالیت کاتالاز ریشه	۲/۸۶۴ **	۷/۸۵۶ **	۱۴/۶۹۲ ns	۰/۷۹۳ ns	۱/۴۷	۹/۶۵
فعالیت سوپراکسید دیسمیوتاز اندام هوایی	۶/۷۶۴ *	۴/۷۵۹ **	۲۷/۲۸۶ *	۴/۸۷۹ *	۱/۲۴	۷/۳
فعالیت سوپراکسید دیسمیوتاز ریشه	۱۳/۰۶۴ **	۱۸/۷۴ **	۴/۸۵۶ ns	۰/۹۵۷ ns	۱/۳۸	۱۱/۴۴
فعالیت گایاکول پراکسیدازاندام هوایی	۲/۸۶۴ **	۲/۸۴۵ **	۹/۶۷۵ *	۲/۹۵ *	۱/۱۶	۵/۸۴
فعالیت گایاکول پراکسیدازریشه	۱۸/۴۷۲ *	۱۱/۹۵۷ **	۱۷/۰۵۳ *	۱/۹۴۴ *	۱/۰۳	۸/۵۷

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی دار.

جدول ۳- اثر تنش شوری غلظت پرولین، مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن دو گیاه دارویی شوید و گشنیز

تیمار		پرولین (میکروگرم بر گرم وزن تر)		مالون دی آلدئید (نانومول بر گرم وزن تر)		پراکسید هیدروژن (میکرومول بر گرم وزن خشک)	
		ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی
شاهد	شوید	۳/۸۷e	۲/۶۶b	۳/۲۲e	۱/۴۸c	۰/۵۶c	۰/۳۲d
	گشنیز	۲/۶۷d	۲/۵۸b	۲/۶۵f	۱/۳۲c	۰/۴۸c	۰/۱۸e
شوری متوسط	شوید	۷/۴۸b	۳/۲۱b	۵/۸۷c	۳/۶b	۰/۸۵b	۰/۶۴b
	گشنیز	۳/۱۱d	۲/۹b	۴/۱۴d	۲/۸۵b	۰/۷۹b	۰/۳۶c
شوری شدید	شوید	۱۴/۸۲a	۵/۶۴a	۸/۷۳a	۴/۹۳a	۱/۲۲a	۰/۹۵a
	گشنیز	۶/۲۹c	۵/۵۷a	۶/۴۶b	۴/۶۴a	۰/۸۷b	۰/۵۶b

برای هر صفت حروف غیرمشابه نشانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن می‌باشد.

بطور کلی پراکسید هیدروژن یکی از فرم های فعال اکسیژن می‌باشد که در شرایط عادی به عنوان محصول فرعی مسیرهای مختلف متابولیکی در مکان‌های مختلف سلول تولید می‌شود (Weisany et al., 2012). پراکسید هیدروژن در غلظت‌های پایین به وسیله سیستم آنتی اکسیدان گیاه سم زدایی می‌شود و حتی به عنوان مولکول ناقل سیگنال در سیستم‌های دفاعی گیاهان در برابر تنش عمل می‌کند (Dermiral and Turkan, 2005). اما زمانی که تعادل بین تولید و حذف پراکسید هیدروژن توسط عامل محیطی متخاصم همانند تنش شوری برهم زده شود، میزان پراکسید هیدروژن درون سلولی به صورت ناگهانی افزایش یافته و ساختار وکارکردهای اصلی سلول دچار اختلال می شود.

بر اساس نتـایج بـه دسـت آمـده در ایـن تحقیـق غلظـت پرولین در هر دو گیاه دارویی مـورد ارزیـابی تحـت تـنش شوری افزایش یافت (جدول ۲). اعمال اولین سطح شوری موجب افزایش قابل توجه پرولین در ریشه شـوید نسـبت به تیمار شاهد (عدم شوری) گردید(جدول ۳). ایـن رونـد افزایشی با تشدید تنش شوری در گیاه شوید تداوم یافـت. برخلاف شوید، تنش شوری ملایم تاثیر چندانی بر میزان پرولین ریشه گشنیز نداشت و لذا اختلاف معنی‌داری بین سطح اول شوری و تیمار شاهد به لحاظ صفت مـذکور در گیاه گشـنیز مشـاهده نگردیـد. ایـن در حـالی اسـت کـه تشدید تنش شوری و افزایش غلظت نمک به ۱۲۰ میلی-مولار میـزان پـرولین ریشـه گشـنیز را بـه میـزان قابـل توجهی افزایش داد. اختلاف غلظت پرولین ریشه دو گیـاه شوید و گشنیز در سطح شوری ۶۰ و ۱۲۰ میلـی مـولار بـه لحـاظ آمـاری در سـطح احتمـال ۵ درصـد معنـی‌دار گردید.

بررسی اثرات سطوح تنش بر میزان پـرولین انـدام هـوایی گشنیز و شـوید نشـان داد کـه بـین سـطح شـاهد (عـدم شوری) و سطح شوری ۶۰ میلی مـولار بـه لحـاظ آمـاری اختلاف معنی داری وجـود نداشـت (جـدول ۲). مقایسـه میانگین داده ها بیانگر افزایش میـزان پـرولین در شـرایط تنش شـدید شـوری در انـدام هـوایی هـر دو گیـاه مـورد ارزیابی بود (جـدول ۳). اخـتلاف دو گیـاه در هیچیـک از سطوح تنش به لحاظ میـزان پـرولین معنـی‌دار نگردیـد. احتمالا افزایش بیشتر پرولین در ریشـه نسـبت بـه انـدام هوایی بیانگر این مطلب است که ریشه مقاومـت بیشـتری از خود نشان می دهد چراکه اندام ریشه به طور مسـتقیم در معرض تنش شوری قرار دارد.

سنجش میزان پرولین معیار مهمي براي تشخیص مقاومت گیاه به تنش شوري است (Katsuharaet al., 2005). پرولین در تنظیم اسمزي گیاه نقش دارد. در بسیاري از گیاهان در شرایط نامساعد میزان پرولین افزایش مي‌یابد و نقش نگهدارنده اسمزي را در طي تنش ایفا نموده و باعث جریان یافتن آب به درون گیاه مي‌شود (Huang et al., 2005). تجمع چشمگیر پرولین در بسیاري از انواع تنش‌ها مانند تنش شوري ناشي از افزایش سنتز و کاهش تخریب پرولین مي‌باشد که این موضوع در بیشتر گیاهان به اثبات رسیده است (Koca et al., 2007) . گزارش کردند که فعالیت آنزیم‌هاي پرولین -5 - کربوکسیلات ′Δ- کربوکسیلات سنتتاز و ردوکتاز که مسئول بیوسنتز پرولین هستند در شرایط تنشي افزایش مي‌یابد، در حالي که فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز که مسئول تخریب پرولین است، کاهش مي‌یابد (Katsuharaet al., 2005).

نتایج حاصل از این تحقیق افزایش معنی‌دار غلظت مـالون دی آلدئید در ریشه و انـدام هـوایی هـر دو گیـاه دارویـی مورد ارزیابی را نشان داد (جدول ۲). افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید نشان دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیـدهای غشا در سـطوح بـالای تـنش مـی‌باشـد (Weisany et al., 2012). بررسی غلظت مالون دی‌آلدئید بافت گیاهی بیانگر میزان تخریب غشا سلولی است. زیر ا ایـن ترکیـب تحـت تأثیر تخریب و پراکسیده شدن غشا سلو لی آزاد مـی‌شـود (Weisany et al., 2012). با توجه به نتایج به دست آمده با اعمال تنش شوری به ویژه سطح شوری ۱۲۰ میلی‌مـولار میزان مالون دی آلدئید در اندام هوایی و ریشـه گشـنیز و شوید نسبت به تیمار شاهد به میان چشـمگیری افـزایش یافت (جدول ۳). در هر دو گیاه میزان مـالون دی الدئیـد در ریشه به مراتب از اندام هوایی بالاتر بـود کـه حـاکی از حساسیت بالاتر غشاهای سلولی ریشه به شوری نسبت به اندام هوایی می باشد. بالاترین میزان مالون دی الدئید در ریشه شـوید در شـرایط تـنش شـوری شـدید و کمتـرین میزان آن در اندام هوایی گشنیز شاهد (عـدم شـوری) بـه دست آمد. هر چند اختلاف میزان مالون دی آلدئید انـدام هوایی گشنیز با اندام هوایی شوید در هیچیـک از سـطوح تـنش معنـی دار نگردیـد. مـالون دي‌آلدئیـد محصـول پراکسیداسـیون اسـیدهاي چـرب اشـباع نشـده در فسـفولیپیدها اسـت (Kumar et al., 2009). از میـزان پراکسیداسیون لیپید به عنوان نشـانه رادیکـال آزاد مضـر

براي غشاء سلولي تحت شرايط تنش در تحقيقات مختلف استفاده شده است (Dermiral and Turkan, 2005). بنابراين مالون دی‌آلدئيد می‌تواند به عنوان يك معرف براي بررسي ميزان صدمات غشاء در شرايط تنش مورد استفاده قرار گيرد .

در تحقیق حاضر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسمیوتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در شرایط تنش شوری در دو گیاه دارویی گشنیز و شوید و در دو بخش اندام هوایی و ریشه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده با افزایش درجه شوری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسمیوتاز و کاتالاز به نحو چشمگیری در اندام هوایی و ریشه هر دو گیاه افزایش یافت (جدول ۴). میزان این افزایش در ریشه ها و به ویژه در شرایط تنش شوری ملایم به مراتب بالاتر از اندام هوایی بود. بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی شوید نسبت به گشنیز بالاتر بود. این در حالی است که سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز در اندام هوایی دو گیاه تنها در سطح شوری ۱۲۰ میلی مولار معنی‌دار گردید. روند تغییرات فعالیت هر دو آنزیم مورد ارزیابی در بافت ریشه هر دو گیاه مشابه بود و از این لحاظ اختلاف معنی داری مشاهده نگردید.

جدول ۴- اثر تنش شوری روی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسمیوتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز دو گیاه دارویی شوید وگشنیز

تیمار		سوپراکسید دیسمیوتاز (واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)		کاتالاز (واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)		پراکسیداز (واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)	
		ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی
شاهد	شوید	۳/۳۱c	۲/۱d	۰/۸۶c	۰/۶۳c	۰/۸۳d	۰/۶۶d
	گشنیز	۳/۱۶c	۱/۹۲d	۰/۷۵c	۰/۳۱d	۰/۵۸e	۰/۴۳d
شوری متوسط	شوید	۵/۲۵b	۳/۳۷c	۱/۴۵b	۰/۸۶b	۱/۳۷c	۱/۱e
	گشنیز	۵/۲b	۳/۱۲c	۱/۲۳b	۰/۷c	۰/۹۴d	۰/۵۱e
شوری شدید	شوید	۷/۸۳a	۶/۶۲a	۱/۹۶a	۱/۱۶a	۳/۲۷a	۲/۲۴a
	گشنیز	۷/۵۵a	۴/۳۸b	۱/۸a	۰/۹۲b	۱/۸۵b	۱/۴۳b

برای هر صفت حروف غیرمشابه نشانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن می‌باشد.

کاتالاز (Harinasut el al., 2003) اصلی‌ترین آنزیم مهار کننده پراکسید هیدروژن و از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان محسوب می‌شود و تنش شوری در بسیاری از گیاهان موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردیده است که این نتیجه در تحقیق حاضر در ارتباط با فعالیت کاتالاز اندام هوایی و ریشه مشاهده گردید. بالا بودن فعالیت کاتالاز اندام هوایی در مقایسه با ریشه شاید بر اثر کاهش فتوسنتز گیاه و تجمع میزان بیشتر پراکسید هیدروژن در مقایسه با ریشه باشد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش می‌تواند به عنوان شاخصی برای افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در نظر گرفته شود. هرچند در پاره‌ای موارد کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش گزارش شده است (Bhattacharjee and Mukherjee, 2002).

تنش شوری افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز اندام هوایی شوید را به همراه داشت (جدول ۲). این در حالی است که روند افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز اندام هوایی در گیاه گشنیز چندان محسوس نبود و اختلاف معنی‌دار سطوح تنش تنها در سطح شوری ۱۲۰ میلی مولار معنی دار گردید. ارزیابی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریشه بیانگر افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم همگام با افزایش سطح تنش شوری در هر دو گیاه مورد ارزیابی بود. هرچند سطح فعالیت آنزیم در هر دو گیاه در ریشه‌ها بالاتر از اندام هوایی بود. آنزیم گایاکول پراکسیداز گیاهی در فعالیت

های متابولیکی نظیر پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش دارد (Molazem et al., 2010). یکی از نقش‌های پراکسیداز، مشارکت در سیستم دفاعی سلول و سم‌زدایی اکسیژن‌های واکنش‌گر است که موجب حذف آب اکسیژنه تولیدی توسط عوامل تنش‌زا می‌گردد. گایاکول پراکسیدازدر مقایسه با کاتالاز میل ترکیبی بیشتری برای حذف پراکسید هیدروژن دارد (Mittler, 2002). بالا بودن میزان فعالیت پراکسیدازی گیاه ممکن است با میزان تحمل تنش‌ها در آن‌ها ارتباط داشته باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق تنش شوری موجب افزایش کلیه شاخصه‌های ناشی از آسیب گیاه و نیز آنزیم‌های سیستم دفاعی گیاه گردید. در این میان میزان آسیب وارد شده به ریشه‌ها بالاتر از اندام هوایی بود که می‌تواند به دلیل آن مواجهه مستقیم ریشه‌ها با شرایط تنش‌زا باشد. مطابق نتایج حاصل شده گیاه شوید از حساسیت بالاتری نسبت به گیاه گشنیز برخوردار بود. همچنین کارایی نسبی بالاتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این گیاه نسبت به گشنیز مشاهده گردید که نشانگر آمادگی بالاتر گیاه شوید برای مقابله با آسیب‌های ناشی از تنش شوری می‌باشد.

منابع

Azevedo Neto, D., Prisco, J. Eneas, J., De Abreu, C. and Gomes, E. (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany, 56, 87-94.

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

Bhattacharjee, S. and Mukherjee, A.K. (2002). Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. Seed Science and Technology, 30, 279-287

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities in utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 254-284.

Cakmak, I. and Horst, W. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glycine max*). Plant Physiology, 83, 463-468.

Dermiral, T. and Turkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense system and proline content in root of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental and Experimental Botany, 53(3), 247-257.

Flowers, T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, 55, 307-319.

Gao, S., Ouyang, C., Wang, S., Xu, Y., Tang, L. and Chen, E. (2008). Effect of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonialyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. Plant, Soil and Environment, 54, 374-381.

Ghanati, F., Morita, A. and Yokota, H. (2002). Induction of suberin and increase of lignin content by excess Boron in Tabacco cell. Plant Nutrition, 48, 357-364.

Giannopolitis, C. and Ries, S. (1977). Superoxide dismutase. I. Occurence in higher plant. Plant Physiology, 59, 309-314.

Giannopolitis, C. and Ries, S. (1977). Superoxide dismutase. I. Occurence in higher plant. Plant Physiology, 59, 309-314.

Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K. and Charonsataprom, R. (2003). Salinity effects on antioxidant enzymes in Mulberry cultivar. Science Asia, 29, 109-113.

Huang, C., He, W., Gua, J., Change, X., Su, P. And Zhang, L. (2005). Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. Journal of Experimental Botany, 56(422), 3041-3049.

Katsuhara, M., Otsuka, T. and Ezaki, B. (2005). Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. Plant Sciences, 169(2), 369-373.

Nunez, M., Mazzafera, P., Mazorra, L.M., Siquira, W.J. and Zullo, M.A. (2003). Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. Plant Biology, 47, 67-70.

SAS Institute. 2004. SAS/STAT user's guide. SAS Institute, Cary.

Stewart, R.R.C. and Bewley, J.D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiology, 65, 245–248.

Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, Gh., Siosemardeh, A. and Ghassemi-Golezani, K. (2012). Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). Plant Omics Journal, 5, 60-67.

Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N. and Johri, A.K. (2009). Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. Microbiology, 155, 780-790.

Majnoun Hosseini, N. and Twelve Imams, Q. (2007). Agriculture and production of some herbs and medicinal plants, Tehran University Press.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Science, 7, 405–410.

Molazem, D., Qurbanov, E.M. and Dunyamaliyev, S.A. (2010). Role of proline, Na and chlorophyll content in salt tolerance of corn (*Zea mays* L.). Aejaes, 9, 319-324.

Netodo, G.W., Onyango, J.C. and Beck, E. (2004). Sorghum and salinity: Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. Journal of Crop Science, 44(3), 806-811.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 4, No 2, Autumn & Winter 2019

Evaluation of hydrogen peroxide, proline, malondialdehyde and antioxidant enzymes activity in two medicinal plants (*Anethum graveolens* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L.) under salt stress conditions

Mohammad Esmailpoor Jahromi[1]*, Omid Younesi[2]

Abstract

The present study was carried out to evaluate the amount of hydrogen peroxide, proline, malondialdehyde and antioxidant enzymes activity of two medicinal plants. Coriander and dill plants were subjected to salinity stress in greenhouse of Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. The experiment was a factorial based on randomized complete block design with three replications. The treatments consisted of three levels of salt stress including control (no stress), 60 and 120 millimolar sodium chloride salt, and two medicinal plants (coriander and dill). The evaluated traits included the concentration of hydrogen peroxide, malondialdehyde, proline and antioxidant activity of superoxide dismutase, catalase and guaiac peroxidase. The results show that salinity stress increases the amount of hydrogen peroxide, malondialdehyde and proline. With increasing salinity stress, their concentration increased significantly in both medicinal plants. The increase in the roots and dill plants was higher, indicating higher sensitivity of this plant to salinity stress. Also, salinity stress increased the activity of antioxidant enzymes. The activity of all three enzymes evaluated in the root was higher than the shoots. In the dill plant, the activity of the catalase enzyme was much higher than the coriander. However, the two evaluated plants did not differ significantly in terms of the level of activity of the superoxide dismutase and peroxidase enzymes.

Keywords: Coriander, Dill, Dismutase superoxide, Malondialdehyde, Peroxidase, Proline, Salinity

[1]* Corresponding author: University of Jahrom, Fars, Iran. Email: msp62@yahoo.com
[2] University of Tehran, Tehran, Iran.