

## تحلیل اثر تنش شوری و سالیسیلیک اسید بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی

مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*. Jamzad)زهرا آریان<sup>۱\*</sup>، محمد جواد مرآتی<sup>۱</sup>، حسن ابراهیم‌زاده<sup>۱</sup>، جواد هادیان<sup>۲</sup> و مسعود میرمعصومی<sup>۱</sup><sup>۱</sup> تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی<sup>۲</sup> تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۷

## چکیده

مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) یک گیاه دارویی با ارزش متعلق به تیره نعناعیان می‌باشد که در مناطق گرم و خشک جنوب‌غربی ایران می‌روید. در این پژوهش اثر غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار شوری (NaCl) و غلظت‌های ۰، ۵/۵ و ۱/۰ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (SA) در طرح فاکتوریل و به‌صورت کاملاً تصادفی با ۸ تکرار در کشت گلخانه‌ای روی پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی این گونه در بخش‌های هوایی بررسی و مقایسه شد. داده‌ها بوسیله نرم‌افزار SPSS و با آزمون دانکن آنالیز شدند. براساس نتایج؛ وزن تر (FW) و مالون دی‌آلدئید (MDA) تحت تنش شوری کاهش و مقدار پرولین افزایش یافت ولی تیمار SA تغییر معنی‌داری روی آنها نداشت. محتوای پروتئین تحت تنش شوری و تیمار SA تغییر معنی‌داری نشان نداد. فعالیت زیمايه سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و پلی فنول اکسیداز (PPO) ابتدا افزایش و بعد کاهش یافت و تحت تیمار SA کاهش نشان داد. فعالیت زیمايه پراکسیداز (POX) و مقدار پراکسید هیدروژن تحت تنش شوری و تیمار SA کاهش یافت. در کل نتایج نشان داد که دامنه مقاومت این گونه تا شوری ۱۰۰ Mm بوده و سالیسیلیک اسید تا حدی موجب بهبود اثرات تنش شد.

واژه‌های کلیدی: مرزه خوزستانی، تنش شوری، زیمايه‌های پاداکساینده، پروتئین، پرولین

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۹۶۵۱۴۲۷۷، پست الکترونیکی: zahra\_aryan2002@yahoo.com

## مقدمه

در سال‌های اخیر اهلی سازی و کشت مرزه خوزستانی برای تأمین مواد اولیه مورد نیاز صنعت آغاز شده است. با توجه به رویش این گیاه در مناطق خشک، به نظر می‌رسد مقاومت مناسبی به شرایط تنش داشته و گزینه‌ای مناسب برای کشت در مناطق تحت تنش از جمله مناطق شور و خشک باشد (۱۵).

شوری خاک یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی برای گیاهان و مهمترین عامل محیطی محدود کننده رشد و تولید گیاهی محسوب می‌شود. شوری بیش از ۶۰٪ کل مناطق خشکی جهان را تحت تأثیر خود قرار داده است.

مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) گیاهی دارویی از تیره نعناعیان و بومی مناطق گرم و خشک جنوب غرب زاگرس می‌باشد. این گیاه ابتدا در سال ۱۹۹۴ جمع‌آوری و به‌عنوان گونه جدید از سرده مرزه در ایران نام‌گذاری شد (۱۷). این گیاه به علت غنی بودن از ترکیبات فنولی به‌ویژه کارواکرول و رزمارینیک اسید دارای اثرات دارویی متعدد از جمله خاصیت ضد قارچ، ضد میکروب، ضد اسپاسم و ضد اسهال، پایین آورنده تری‌گلیسرید، پاداکساینده و غیره می‌باشد که این اثرات دارویی با بررسی‌های علمی اخیر بخوبی به اثبات رسیده است (۱۵).

غذایی هوگلند یک چهارم غلظت تیمار شدند. شرایط رشد گیاهان شامل روشنایی طول روز، شدت خورشید که به وسیله سایه بان در اطراف گلخانه تعدیل شد، دمای شب/روز ۲۳/۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۴۰-۴۵٪ رطوبت بود. سپس گیاهان به مدت یک ماه، یک روز در میان تحت تنش شوری NaCl با غلظت های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار قرار گرفتند. مقدار ۱۵۰ میلی لیتر محلول هوگلند و (NaCl) به هر گلدان داده شد. همچنین تیمار SA با سه غلظت ۰، ۵/۰ و ۱/۰ میلی مولار در دو هفته آخر تنش شوری به تعداد دو بار و با فاصله زمانی ده روز اعمال شد و چهار روز پس از آخرین تیمار گیاهان برای بررسی برداشت شدند. وزن تر اندام های هوایی اندازه گیری شد و به منظور انجام آنالیزها، نمونه ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

**استخراج پروتئین:** ۰/۵ گرم ماده گیاهی در ۴ میلی لیتر بافر (Tris-HCl) با pH=۶/۸ ساییده و بعد سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن روشناور، حجم آن اندازه گیری شد.

**سنجش میزان پروتئین:** به منظور تعیین محتوای پروتئین از روش برادفورد استفاده گردید (۱۲). بدین منظور عصاره پروتئینی استخراج و از هر محلول روشناور سه تکرار تهیه شد، بدین صورت که در هر لوله مقدار ۰/۱ سی سی عصاره ریخته و بدان ۵ میلی لیتر محلول برادفورد اضافه شد. سپس لوله ها به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و پس از گذشت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه جذب آنها در nm ۵۹۵ خوانده شد. برای تهیه منحنی استاندارد از آلبومین سرم گاوی استفاده شد.

**اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی:** پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه‌گیری محتوای MDA تعیین می‌شود (۱۳). ۰/۲ گرم از ماده گیاهی در ۵ میلی لیتر از تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد وزنی- حجمی ساییده شده و بعد در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی لیتر از روشناور، ۴ میلی لیتر از تیوباربیوتیک

این تنش بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی اثر می‌گذارد که از آن جمله می‌توان تنظیم اسمزی، سنتز پروتئین‌ها، اسمولیت‌های سازگار، سنتز و فعالیت برخی زیماپه‌ها را نام برد. تنش‌های محیطی باعث خسارت‌های اکسایشی به غشا می‌شوند. این خسارت‌ها ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) همانند رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشد. به‌منظور مقابله با این اثرات زیان‌بار ترکیبات ROS، سلول‌های گیاهی سیستم‌های پاداکساینده‌ای را ایجاد کرده‌اند که زیماپه‌های پاداکساینده مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) از جمله آنها می‌باشند (۸ و ۹). سالیسیلیک اسید (SA) ترکیب فنولی است که جزء فیتوهورمون‌ها به‌شمار می‌آید و در میان ترکیبات فنولیک مشتقات بنزوئیک و سینامیک اسیدها دارای اثراتی بر روی متابولیسم و بیوسنتز و همچنین فعالیت‌های اکسایشی فعالیت‌های زیستی مانند رشد و نمو، فتوسنتز، تنفس، جذب و انتقال یون‌ها، تغییر فعالیت برخی زیماپه‌های مهم و ساختار کلروپلاست می‌باشد (۱۲، ۱۳، ۱۹). سالیسیلیک اسید زمانی که گیاه تحت تنش قرار می‌گیرد به‌عنوان بهبود دهنده اثرات منفی تنش را کاهش داده و گیاه را برای مقابله با تنش آماده می‌کند. مطالعه مشابهی روی درمنه کوهی توسط رضایتمندی و همکاران انجام شده است. در این تحقیق تأثیر تنش شوری و سالیسیلیک اسید بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرزه خوزستانی بررسی شده است.

## مواد و روشها

نشا‌های مرزه خوزستانی از شرکت داروسازی خرمان واقع در شهرستان خرم‌آباد تهیه شدند. تمام نمونه‌های مورد آزمایش از کلون A78 این گیاه بودند. نشاها در گلدان‌هایی با قطر ۱۸ سانتیمتر و ارتفاع ۲۸ سانتی‌متر و بستر کشت پرلیت کشت شدند و به‌منظور به دست آوردن مقدار زی توده مناسب به مدت دو ماه، یک روز در میان با محلول

شد. در نهایت محتوای پراکسید هیدروژن نمونه‌ها با ضریب خاموشی  $0.28 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  براساس میکرومول پراکسید هیدروژن به ازای گرم وزن تر محاسبه گردید.

**سنجش فعالیت پراکسیداز:** سنجش فعالیت سینتیکی پراکسیداز طبق روش Abeles (۱۹۹۱) Biles انجام شد. بدین منظور ۴ میلی لیتر بافر استات ( $\text{pH}=4/8$ ،  $0.2\text{M}$ )، ۴۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه و ۲۰۰ میکرولیتر بنزیدین در یک لوله آزمایش با هم مخلوط شده و بعد ۱۰ میکرولیتر عصاره زیمايه‌ای به آن اضافه شد. تغییرات جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu، مد kinetic و طول موج  $530$  نانومتر خوانده شد. فعالیت پراکسیداز بر حسب واحد زیمايه‌ای در میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

**سنجش فعالیت زیمايه پلی فنول اکسیداز:** به منظور سنجش فعالیت سینتیکی زیمايه پلی فنل اکسیداز از روش Raymond و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد. در این روش  $2/5$  میلی لیتر بافر فسفات ( $0.2\text{M}$ ،  $\text{pH}=6/8$ )،  $2/0$  میلی لیتر پیروگالول ( $0.2\text{M}$ ) و  $100$  میکرولیتر عصاره زیمايه‌ای را در یک لوله آزمایش که در دمای  $40$  درجه سانتی‌گراد قرار داشت، مخلوط کرده و بلافاصله تغییرات جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-160 در مد Kinetic و طول موج  $430$  نانومتر رسم گردید (Raymond و همکاران، ۱۹۹۳). در نهایت میزان فعالیت زیمايه بر حسب واحد زیمايه‌ای در میلی گرم پروتئین ( $\text{Unit mg}^{-1} \text{ protein}$ ) محاسبه گردید. برای زیمايه پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز واحد زیمايه‌ای بیانگر مقدار زیمايه‌ای است که بتواند گهرمايه را به محصول تبدیل نماید.

**بررسی‌های آماری:** داده‌های حاصل از بررسی‌ها بوسیله نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۰) مورد تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها در سطح خطای  $5\%$  ( $p < 0.05$ ) با آزمون دانکن (Duncans Multiple Range Test) انجام

اسید (TBA)  $5$  درصد در  $20$  TCA درصد اضافه گردید. مخلوط واکنش در  $95$  درجه سانتیگراد به مدت  $30$  دقیقه حرارت داده شد. پس از سانتریفیوژ در  $10000$  دور در دقیقه به مدت  $15$  دقیقه، جذب روشن‌آور در  $532$  و  $600$  نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-160 و مد Photometric خوانده شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی برابر  $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  استفاده شد و در نهایت مقدار مالون دی‌آلدئید که محصول پراکسیداسیون لیپیدها است براساس میکرومول در گرم وزن تر محاسبه گردید.

**سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز:** فعالیت این زیمايه با قابلیت آن در بازدارندگی واکنش احیایی فتوشیمیایی نیتروبلوترازولیوم (NBT) تعیین گردید. محلول واکنش بر اساس سنجش فعالیت زیمايه شامل بافر فسفات  $50$  mM با  $\text{pH}=7/5$ ، متیونین  $13$  mM،  $1$  mM Na-EDTA،  $0.1$  mM، نیتروبلوترازولیوم ( $75 \mu\text{M}$  NBT)، ریوفلاوین  $75 \mu\text{M}$  و مقدار  $100$  میکرولیتر از عصاره می‌باشد. این روش بر اساس تبدیل NBT به فورمازان در حضور نور و تشکیل رنگ است. در صورتی که سوپراکسید دیسموتاز در محیط وجود داشته باشد، از انجام واکنش مذکور ممانعت کرده و تشکیل و ظهور رنگ را کاهش می‌دهد. پس از  $16$  دقیقه جذب آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-160 در مد Photometric و طول موج  $560$  نانومتر خوانده شد (۱۴).

**سنجش هیدروژن پراکسید:** براساس روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰)،  $1$  گرم بافت تر در حمام یخ با  $5$  میلی لیتر  $1/0.1$  TCA (w/v) هم‌وزن‌نیزه شد و بعد بر حسب گرم در  $12000$  rpm به مدت  $15$  دقیقه سانتریفیوژ شد.  $0.5$  میلی لیتر از محلول روشن‌آور به  $0.5$  میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات  $10$  mM با  $\text{pH}=7$  و  $1$  میلی لیتر پتاسیم یدید اضافه شد و بعد جذب آن در  $390$  نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از پراکسید هیدروژن رسم

داد (شکل C. 2). اما در کل همبستگی معنی‌داری نشان ندادند (جدول ۱). فعالیت زیمايه پراکسیداز (POX) با افزایش غلظت نمک کاهش یافت که بیانگر همبستگی منفی و معنی‌دار بین این دو است (جدول ۱) و تیمار SA این کاهش را تا حدودی افزایش داد (شکل D. ۲). فعالیت زیمايه سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با افزایش شوری تغییر چندانی نداشت اما تحت تیمار SA با غلظت ۰/۵mM کاهش و با غلظت ۱/۰mM افزایش یافت (شکل C. ۲) (جدول ۲) که در کل حاکی از همبستگی غیر معنی‌دار است (جدول ۱).

### بحث

شوری خاک، یک تنش غیر زیستی و متداول برای گیاهان است. مهار رشد یک پاسخ رایج به شوری بوده و یکی از مهمترین شاخص‌های کشاورزی در تحمل شوری است (۲۵). گونه‌های فعال اکسیژن عامل اصلی پراکسیداسیون لیپیدی هستند (۲۹).

رادیکالهای سوپر اکسید ایجاد شده تحت تنش شوری باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء (۲۶) و افزایش میزان MDA و در نتیجه آسیب سلولی در طی تنش شوری می‌شود (۱۵). پراکسیداسیون لیپیدها که باعث آسیب رساندن به عملکرد غشاء می‌شود، می‌توان آن را اندازه‌گیری کرد (۲۷). شواهد نشان می‌دهد که مالون دی‌آلدئید محصول تجزیه اسیدهای چرب غیر اشباع است که به‌عنوان یک نشانگر زیستی برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۴). پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه‌گیری محتوای مالون دی‌آلدئید در بخش‌های هوایی سنجیده شد. نتایج جدول ۱ نشان داد همبستگی منفی و معنی‌دار میان مقدار پراکسیداسیون لیپیدی و تنش شوری دیده شد. اما تحت تیمار SA همبستگی معنی‌داری یافت نشد (۲۲) (شکل ۲. A). این نتیجه می‌تواند بیانگر این باشد که گونه‌های فعال سوپراکسید تأثیری بر پراکسیداسیون لیپیدی نداشته است.

شد. همچنین برای یافتن ضریب همبستگی بین تیمارهای شوری و سالیسیلیک اسید با پارامترهای مذکور، داده‌ها پس از ثبت و مرتب‌سازی به روش‌های اسپیرمن، کندال و پیرسون آنالیز شدند که بهترین نتایج از روش پیرسون حاصل شد.

### نتایج

**پارامترهای فیزیولوژیکی:** با افزایش غلظت NaCl، وزن تر گیاه کاهش پیدا کرد و در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار به کمترین میزان خود رسید که همبستگی منفی و معنی‌داری بین این دو نشان داد (جدول ۱)، همچنین سالیسیلیک اسید تغییر معنی‌داری در مقدار وزن تر گیاه ایجاد نکرد (شکل 1.A) (جدول ۲).

**پارامترهای بیوشیمیایی:** پراکسیداسیون لیپید: براساس مقدار مالون دی‌آلدئید اندازه‌گیری شد که میزان پراکسیداسیون لیپیدی با غلظت‌های مختلف NaCl همبستگی منفی و معنی‌داری نشان داد ولی تحت تأثیر SA تغییر چندانی نکرد (شکل 1.B) (جدول ۱ و ۲).

**محتوای پروتئین:** محتوای پروتئین با بالا رفتن سطح شوری و حتی با اعمال تیمار SA تغییر معنی‌داری نشان نداد (شکل A. ۲). (جدول ۱ و ۲).

**محتوای پرولین:** تحت تیمار شوری مقدار پرولین همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد اما غلظت‌های مختلف SA باعث تغییر معنی‌داری در آن نشد (شکل 1. C) (جدول ۱ و ۲).

**میزان پراکسید هیدروژن H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** مقدار آن با میزان شوری و تحت تیمار SA همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد (شکل 1.D) (جدول ۱ و ۲).

**فعالیت زیمايه‌های پاداکساینده:** فعالیت زیمايه پلی‌فنول اکسیداز (PPO) با افزایش شوری تا غلظت ۱۰۰ mM نمک افزایش و بعد کاهش یافت و SA نیز آن را کاهش

همچنین افزایش فعالیت زیمايه سوپراکسید دیسموتاز تا فعال اکسیژن می باشد.  
سطح شوری ۱۰۰ mM دلایلی بر کاهش غلظت گونه های

جدول ۱- تعیین ضریب همبستگی با روش 2-tailed

ضریب همبستگی

Parameters	Salt	SA	PPO activity	POX activity	SOD activity	H2O2 content	Proline content	MDA content	Protein content	FW
Salt Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	1									
SA Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	.000 1.000	1								
PPO activity Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-.046 .764	-.193 .204	1							
POX activity Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-.298* .047	-.074 .629	-.307* .040	1						
SOD activity Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	.010 .948	-.010 .947	.791** .000	-.034 .822	1					
H2O2 content Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-.414** .005	-.327* .028	-.271 .072	.485** .001	-.216 .153	1				
Proline content Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	.909** .000	.264 .080	-.162 .289	-.251 .097	-.096 .532	-.460** .001	1			
MDA content Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-.442** .002	.101 .507	-.257 .089	-.180 .236	-.480** .001	.108 .480	-.369* .013	1		
Protein content Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-.175 .250	.087 .572	-.554** .000	-.165 .279	-.726** .000	.223 .141	-.116 .449	.562** .000	1	
FW Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	-.485** .001	-.256 .090	-.060 .695	.326* .029	-.042 .784	.605** .000	-.585** .000	.047 .759	.259 .086	1

\* همبستگی در سطح ۰٫۰۵ (P<0.05) معنی دار می باشد.

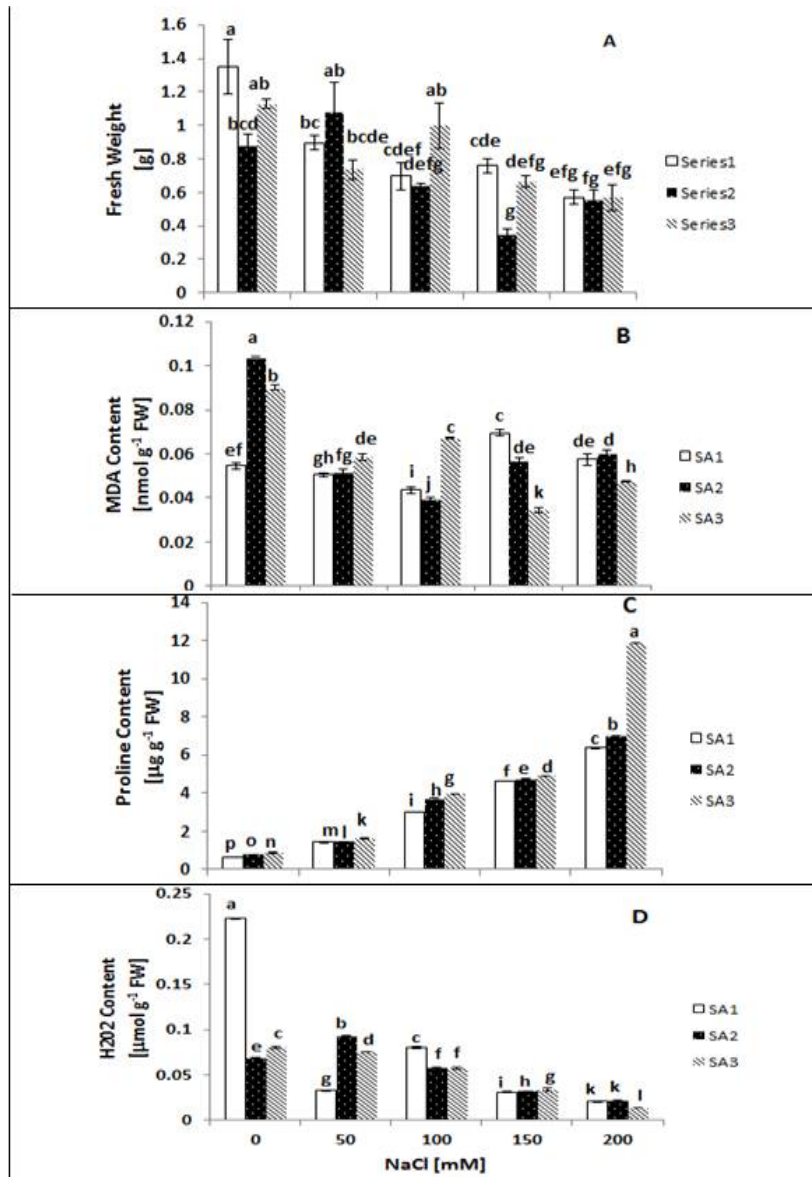
\*\* همبستگی در سطح ۰٫۰۱ (P<0.01) معنی دار می باشد.

- نشان دهنده همبستگی منفی و + نشان دهنده همبستگی مثبت بین پارامترهای مختلف می باشد.

جدول ۲- تغییرات وزن تر، محتوای مالون دی‌آلدهید، پرولین، آب اکسیژنه، پروتئین کل و میانگین فعالیت سوپراکسیددیسموتاز، پلی فنواکسیداز و پراکسیداز در غلظت‌های مختلف شوری، SA1، SA2 و SA3 به ترتیب نمایانگر غلظت‌های ۰، ۰.۵ و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید می‌باشد.

NaCl (mM)	SA(mM)	FW (g)	MDA (nmol g <sup>-1</sup> FW)	Prol (μg g <sup>-1</sup> FW)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μg g <sup>-1</sup> FW)	Pro (mg g <sup>-1</sup> FW)	SOD (unit mg <sup>-1</sup> FW)	PPO (unit mg <sup>-1</sup> FW)	POX (unit mg <sup>-1</sup> FW)
Control	Control	9.44 ± 0.4 i	0.054 ± 0.001 f	0.611 ± 0.0019 a	0.222 ± 0.0002 k	160.5 ± 1.50 g	0.064 ± 0.00004 ab	0.0040 ± 0.0002 a	0.063 ± 0.010 g
	0.5	4.10 ± 0.4 cd	0.104 ± 0.000 k	0.755 ± 0.0003 b	0.068 ± 0.0003 e	174.4 ± 1.69 h	0.046 ± 0.0005 a	0.0085 ± 0.0002 b	0.014 ± 0.0000 b
	1.0	5.33 ± 0.6 ef	0.09 ± 0.001 j	0.87 ± 0.01 c	0.080 ± 0.0088 f	194.5 ± 2.86 i	0.061 ± 0.0001 ab	0.013 ± 0.0002 c	0.0055 ± 0.0001 a
50	Control	4.32 ± 0.05 cde	0.050 ± 0.0008 d	1.41 ± 0.030 d	0.032 ± 0.0004 e	68.3 ± 1.77 a	0.078 ± 0.0006 abcd	0.015 ± 0.0002 d	0.0099 ± 0.0000 abc
	0.5	8.0 ± 0.6 gh	0.051 ± 0.001 e	1.45 ± 0.003 e	0.092 ± 0.0003 h	95.8 ± 1.77 d	0.155 ± 0.0006 g	0.017 ± 0.0002 f	0.010 ± 0.0000 abc
	1.0	6.15 ± 0.2 f	0.058 ± 0.001 g	1.60 ± 0.03 f	0.075 ± 0.0001 f	87.26 ± 1.41 c	0.129 ± 0.00045 efg	0.018 ± 0.0000 f	0.015 ± 0.0025 bcde
100	Control	7.28 ± 0.2 g	0.043 ± 0.001 c	2.99 ± 0.000 g	0.080 ± 0.0011 g	173.8 ± 2.39 h	0.074 ± 0.0004 abc	0.016 ± 0.000 e	0.0081 ± 0.000 ab
	0.5	3.85 ± 0.2 cd	0.039 ± 0.0008 b	3.73 ± 0.0009 h	0.057 ± 0.0008 d	116.5 ± 4.78 e	0.126 ± 0.0001 efg	0.016 ± 0.000 e	0.024 ± 0.0001 efg
	1.0	7.76 ± 0.3 gh	0.067 ± 0.000 i	3.97 ± 0.01 k	0.057 ± 0.0010 d	201.8 ± 1.68 j	0.117 ± 0.0004 cdefg	0.021 ± 0.0001 h	0.019 ± 0.0001 defg
150	Control	8.76 ± 0.1 hi	0.069 ± 0.001 g	4.60 ± 0.00092 j	0.031 ± 0.0002 j	154.1 ± 2.15 g	0.087 ± 0.0003 abcd	0.019 ± 0.0004 g	0.010 ± 0.0001 abc
	0.5	3.37 ± 0.1 bc	0.056 ± 0.001 a	4.73 ± 0.02 k	0.032 ± 0.0000 i	124.6 ± 0.080 f	0.119 ± 0.0100 defg	0.019 ± 0.0003 g	0.017 ± 0.0002 cdef
	1.0	4.46 ± 0.1 ab	0.034 ± 0.001 g	4.91 ± 0.01 n	0.033 ± 0.0014 c	79.33 ± 0.23 b	0.148 ± 0.0013 fg	0.015 ± 0.0003 d	0.027 ± 0.0001 g
200	Control	3.26 ± 0.1 bc	0.047 ± 0.002 h	6.35 ± 0.015 m	0.020 ± 0.0005 b	117.2 ± 2.90 e	0.105 ± 0.0004 bcdef	0.015 ± 0.0005 d	0.025 ± 0.0002 fg
	0.5	2.46 ± 0.1 ab	0.060 ± 0.001 h	6.99 ± 0.005 n	0.020 ± 0.0010 b	129.2 ± 2.45 f	0.065 ± 0.050 ab	0.013 ± 0.0002 c	0.016 ± 0.0001 bcdef
	1.0	2.04 ± 0.03 a	0.047 ± 0.0003 d	11.88 ± 0.000 o	0.013 ± 0.0001 a	154.2 ± 1.15 g	0.076 ± 0.0000 abcd	0.013 ± 0.0001 c	0.011 ± 0.0000 abcd

MDA: malondialdehyde, FW: fresh weight, SA: salicylic acid, Prol: proline, Pro: protein, SOD: superoxide dismutase, PPO: poly phenol oxidase, POX: proxidase



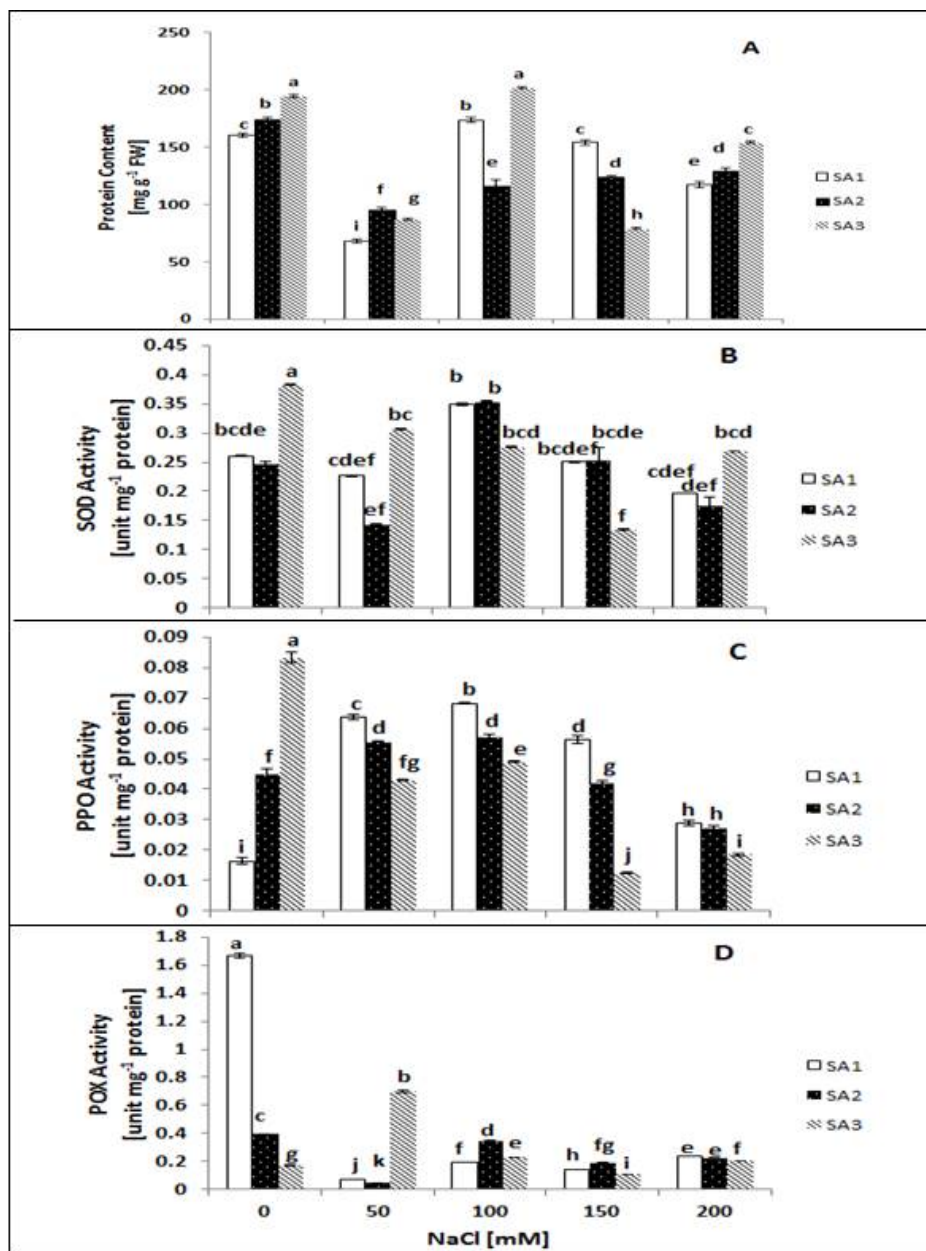
شکل ۱- تغییرات وزن تر، محتوای مالون دی آلدئید (MDA)، محتوای پرولین و محتوای  $H_2O_2$  در غلظت‌های مختلف  $NaCl$ . SA1، SA2 و SA3 به ترتیب غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید را نشان می‌دهند.

به‌عنوان مخزن ذخیره ای نیتروژن و یا ماده محلولی که پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم را کاهش می‌دهد عمل می‌نماید و گیاه را در تحمل به تنش یاری می‌کند (۹). پرولین، پروتئین‌ها و غشاهای سلولی را از آسیب غلظت‌های زیاد یون‌ها محافظت می‌نماید. در این تحقیق محتوای پرولین با شوری افزایش یافته است (جدول ۱) که با نتایج مطالعات مشابه مطابقت دارد (۱۰ و ۲۸) و احتمالاً نشان‌دهنده این است که با افزایش مقدار پرولین و کاهش

پرولین یک آمینو اسید قابل حل در آب بوده که دارای دو نقش اساسی در شرایط تنش است. ۱: افزایش سنتز و تجمع آن به‌عنوان یک پاسخ متابولیسمی در گیاهان در شرایط تنش می‌باشد. ۲: افزایش پرولین محلول به‌عنوان یک نشانه برای سازگاری و افزایش مقاومت گیاهان به شرایط نامساعد است. همچنین پرولین در تنظیم روابط آب درون سلولی نقش دارد. در شرایط تنش غلظت پرولین نسبت به سایر اسیدهای آمینه افزایش می‌یابد، پرولین



پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم، گیاه را در تحمل تنش یاری کرده است (شکل ۱. C).



شکل ۲- تغییرات محتوای پروتئین و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پلی فنول اکسیداز (PPO) و پراکسیداز در غلظت‌های مختلف شوری. (POX): SA1، SA2 و SA3 به ترتیب نمایانگر غلظت‌های ۰، ۵، ۱ و ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید می‌باشد.

فعالیت پراکسیداز تحت تأثیر تنش شوری منجر به کاهش تخریب غشاهای سلولی و آسیب‌دیدگی گیاه پنبه شد. در شرایط تنش شوری یکی از ترکیبات سمی تولید شده ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسید هیدروژن

اشرف و علی (۷) مشاهده نمودند که تنش شوری سبب افزایش فعالیت پراکسیداز در برگ کلزا و کاهش اثرات مخرب تنش شوری شد. ملونی و همکاران (۲۰) با مطالعه پنبه در شرایط تنش شوری مشاهده نمودند که افزایش



است (۲۵). با توجه به نتایج این بررسی، تحت تنش شوری و تیمار SA، مقدار آن کاهش یافت (۲۶) (شکل ۱). D که طبق نتایج جدول ۱ همبستگی منفی و معنی‌داری را نشان داد.

آنیون‌های سوپر اکسید به وسیله تنش شوری در سلول تولید می‌شود، زیرا مهمترین تأثیر تنش شوری اختلال در وضعیت آب سلولی است که در نتیجه آن رشد کاهش می‌یابد. همچنین افزایش تنفس در این شرایط سبب تولید این یون‌های مخرب در میتوکندری سلول می‌شود. در چنین شرایطی فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز به‌عنوان یک زیمایه از بین برنده یون سوپر اکسید، مشابه نتایج به دست آمده، افزایش می‌یابد. با افزایش فعالیت این زیمایه سمیت زدایی یون سوپر اکسید افزایش و آسیب‌های حاصل از آن در گیاه کاهش می‌یابد، چون کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید مقاومت به تنش شوری و خشکی را در گیاهان افزایش می‌دهد (۳۰). در این مطالعه فعالیت زیمایه‌های سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز و مقدار پراکسید هیدروژن تا سطح شوری ۱۰۰mM افزایش (به جز شاهد) و بعد کاهش یافته است (شکل ۲. B و D). با توجه به مقدار کم پراکسید هیدروژن و فعالیت پایین زیمایه پراکسیداز، مقدار رادیکال‌های آزاد تبدیل شده به پراکسید هیدروژن توسط زیمایه سوپر اکسید دیسموتاز کم بوده، کما اینکه فعالیت آن تغییر چندانی نداشته است. تیمار سالیسیلیک اسید بر فعالیت این دو زیمایه اثر معنی‌داری نشان نداد اما همبستگی منفی و معنی‌داری با مقدار پراکسید هیدروژن داشت (جدول ۱). بنابراین چنین به نظر می‌رسد که هر دو غلظت ۰/۵ و

## منابع

- ۱- زرگری، ع. ۱۳۶۸. گیاهان داروئی جلد دوم. انتشارات دانشگاه تهران.
- ۲- میر حیدر، ح. ۱۳۷۳. معارف گیاهی و کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها. دفتر نشر فرهنگ اسلامی.
- ۳- زرگری، ع. ۱۳۶۸. گیاهان داروئی جلد سوم. انتشارات دانشگاه تهران.
- ۴- مجاب، ف.، جاوید نیا، ک.، رزقی، ا. و یار محمدی، م.، ۱۳۸۱. بررسی ترکیبات شیمیائی اسانس گیاه به. ۴۱-۴۵. فصلنامه گیاهان داروئی

۱۰۰mM سالیسیلیک اسید از طریق تأثیر در سیستم آنپاداکسایدنگی سبب کاهش اثر سمی و مخرب تنش شوری شده است. دانشمندان معتقدند که پراکسیداز در فریندهای متابولیکی مانند کاتابولیسیم هورمون، دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا، اکسیداسیون فنل، ایجاد پیوند با پروتئین‌های ساختاری سلول و پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی نقش دارد (۱۱).

قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی اغلب به دنبال صدمه دیدن آنها ایجاد می‌گردد و عموماً نتیجه آن نیز از بین رفتن نمونه مورد کشت می‌باشد. به‌طور کلی قهوه‌ای شدن در گیاهان به وسیله پلی‌فنل اکسیداز (PPO) انجام می‌شود (۱۷) که در پلاست‌های سلول‌های گیاهی قرار دارد. پیش‌ماده فنولی این زیمایه در واکوئل‌های سلول‌های گیاهی ذخیره می‌شود و بدین وسیله حضور جداگانه این مواد در واکوئل‌ها از واکنش قهوه‌ای شدن جلوگیری می‌نمایند. در صورت آسیب دیدن سلول‌های گیاهی، این زیمایه و پیش‌ماده آن با هم مخلوط می‌شوند و قهوه‌ای شدن در بافت رخ می‌دهد. اگر میزان این زیمایه کاهش یابد، از میزان قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی نیز کاسته می‌شود. در اینجا فعالیت این زیمایه تا سطح شوری ۱۰۰mM افزایش (۲۳) و بعد کاهش یافت، که با هر دو تیمار سالیسیلیک اسید کاهش یافته است (شکل ۲. C). این نتیجه می‌تواند بیانگر این باشد که رادیکال‌های آزاد توسط این زیمایه به سمت اکسیداسیون ترکیبات فنلی در جهت سنتز لیگنین و مقاوم‌سازی دیواره سلولی به کار رفته باشد (۱۲).

- 5- Abeles, F.B., Biles, C.L. 1991. Characterization of peroxidase in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiology*. 95: 269-273.
- 6- Ariano, S., Bartolomeo, D., Cristos X. and Andras, M. 2005. Antioxidant defenses in Olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*. 32: 45-53.
- 7- Ashraf, M., and Q. Ali. 2008. Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 63: 266– 273.
- 8- Benedetti, C.E. and P. Arruda. 2002. Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic Arabidopsis caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. *Plant Physiol*. 128: 1255–1263.
- 9- Bian, Y. M., S.Y. Chen, S. K Liu and MY. Xie. 1988. Effects of HF on praline of some plants. *Plant Physiol. Commun*. 6: 19-21.
- 10- Celic, O., Atak. C. 2012. The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties. *Turk J. Biol*. 36: 339-356; 2012.
- 11- Christensen J.H., Bauw G., Welinder K.G., Montagu M.V., and Boerjan W. 1998. Purification and characterization of peroxides correlated with signification in poplar xylem. *Plant Physiology*. 118: 125-135.
- 12- Flott, BE., Mberschbacher, BM., Resener, H. 1989. Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stemrust infection. *New Phytologist* 111: 413-421
- 13- Glass, A. D. M. 1973a. Influence of phenolic acids on ion uptake I. inhibition of phosphate uptake. *Plant Physiology*. 51, 1037-1041.
- 14- Glass, A. D. M. 1973b. Influence of phenolic acids on ion uptake II. Depolarization of membrane potentials. *Plant Physiology*. 54, 855-858
- 15- Gunes, A, Inal, A, Alpaslan, M, Eraslan, F, Bagci, EG, Cicek, N, 2007, Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity, *J Plant Physiol* 164:728-736.
- 16- Hadian J., Mirjalili M.H., Kanani M.R., Salehnia A., Ganjipoor P., 2011. Phytochemical and morphological characterization of *Satureja khuzistanica* Jamzad populations from Iran. *Chemist. And Biodiver*. 8, 902–915 19,308–310
- 17- Jagtap, V. and S. Bhargava. 1995. Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. exposed to high light, low water and high temperature stress. *J. Plant Physiol*. 145: 195-197.
- 18- Jamzad, Z. 1994: A new species of the genus *Satureja* (Labiatae) from Iran.- *Iran. Journ. Bot*. 6 (2): 215-218.
- 19- Marks, T., and Simpson, S. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *J. Hortic. Sci*. 65: 103-111.
- 20- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P. M. and Karpinski, S. 2006. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany*. 57, 1795-1807.
- 21- Meloni, D. A., M. A. Oliva, C. A. Martinez and J. Cambraia. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 15 (2): 12-21.
- 22- Hassanuzzaman, M., Alamm, M., Nahar, K. 2014. Exogenous salicylic acid alleviates salt stress-induced oxidative damage in *Brassica napus* by enhancing the antioxidant defense and glyoxalase systems. *AJCS* 8(4): 631-639.
- 23- Merati, M.J., Niknam, V., Hassanpour, H., Mirmasoumi, M. 2015. Comparative effects of salt stress on growth and antioxidant responses in different organs of pennyroyal (*mentha pulegium* L.). *Iranian Journal of Biology*. 28: 1097-1107.
- 24- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*. 7:405–410.
- 25- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S. A., Khan, N. 2010. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivar, *Plant Physiology*. 168 (2011) 807–815.
- 26- Noctor, G. and CH. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under

- control. Annu. Rev of Plant Physiol and Plant Mol. Biol. 49: 249-279.
- 27- Parida A.K., Das A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effect on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 60: 324-349
- 28- Rahimi-Tashi, T., Niknam, V. 2015. Evaluation of salicylic acid pretreatment and salinity stress on some physiological and biochemical parameters in *Triticum aestivum*. *Iranian Journal of Biology*. 28: 297-306.
- 29- Raymond, J., Pakariyathan, N., Azanza, J.L. 1993. Purification and some properties of polyphenol oxidase from sunflowers seeds. *Phytochemistry*. 34: 927-931.
- 30- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. and Saxena, D. C. 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biological Plantarum*. 41: 384-394.
- 31- Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163: 1037-1046.
- 32- Tari, I, Csiszár J, Szalai G, Horváth F, Pécsváradi A, Kiss G, Szepesi Á, Szabó M, Erdei L 2002. Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pretreatment. *Acta Biol Szeged*. 46(3-4):55-56.
- 33- Upadhyaya, H. and S.K Panda. 2004. Responses of *Camellia sinensis* to drought and rehydration. *Biologiae Plantarum*. 48: 597-600.
- 34- Velikova V, Yordanov I, Edreva A .2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci.*, 151: 59-66.

## **Analysis of the effect of salt stress and salicylic acid on some biochemical and physiological features of Savory (*Satureja khuzistanica* .Jamzad)**

**Aryan Z.<sup>1</sup>, Merati M.J.<sup>1</sup>, Ebrahimzadeh H.<sup>1</sup>, Hadian J.<sup>2</sup> and Mirmassoumi M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Plant Biology Dept., School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

### **Abstract**

Savory (*Satureja khuzistanica*) is an important medicinal plant of the *Labiatae* family. This species grows in warm and dry areas of the southwest in Iran. In present study, the effect of salinity consist of 0, 50, 100, 150 and 200 (Mm) (NaCl) with SA treatments consist of 0, 0.5 and 1.0 (mM) in Factorial plan and quite random in 8 repeat was cultured in greenhouse to investigate and to compare activity of some biochemical and physiological features of this species in aerial parts. Data was analysed by SPSS statistic software and Duncan test. Results showed that fresh weight (FW) and malondialdehyde (MDA) decreased by sodium chloride but treatment of salicylic acid (SA) was not significantly changed. The amount of protein content was not significantly. The proline content increased by NaCl. The first, SOD and PPO activities enhanced significantly up to 100 Mm NaCl and then decreased and POX activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content decreased by NaCl and SA treatment. Totally results showed that range of tolerance this species was up to 100 mM NaCl and SA treatment decreased effect of stress and partly improve them.

**Key words:** *Satureja khuzistanica*, Salt stress, Antioxidant enzymes, Total protein, Proline.