

اثر پرتوهای UV-B و UV-C بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) و تأثیر سالیسیلیک اسید در تخفیف تنش ناشی از پرتوهای فرابنفش

لطیفه پوراکیبر* و مهدی عابدزاده

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

آثار ناشی از نازک شدن لایه اوزون و افزایش تابش پرتو فرابنفش توسط بسیاری از پژوهشگران بررسی شده است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر پرتوهای UV-B و UV-C روی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) و تأثیر سالیسیلیک اسید در کاهش آثار زیانبار این پرتوها بر این گیاه است. گیاه بادرنجبویه در شرایط گلخانه‌ای در اتاقک کشت و دمای متوسط 28 ± 2 درجه سانتیگراد و شدت نور 150 میکرو اینشتین بر متر مربع بر ثانیه به مدت 60 روز کشت یافتند. دوره شبانه‌روزی روشنایی و تاریکی به ترتیب $16:8$ ساعت بود. تیمار پرتو فرابنفش پس از مرحله 6 برگی اعمال شد و پرتو UV-B به مدت 15 روز به صورت یک روز در میان و هر بار به مدت 20 دقیقه و پرتو UV-C به مدت 15 روز، به صورت یک روز در میان و هر بار به مدت 8 دقیقه اعمال گردید. سالیسیلیک اسید نیز پس از مرحله 6 برگی با غلظت 1 میلی مولار به مدت یک هفته روی گیاهان افشانه شد. نتایج نشان داد که پرتوهای UV-B و UV-C باعث کاهش وزن تر و خشک، رشد طولی ریشه و اندام هوایی می‌شود. میزان مالون‌دی‌آلدهید و فنیل آلانین آمونیا لیاژ تحت تأثیر پرتوهای UV-B و UV-C افزایش داشت. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز و گاپاکول پراکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نیز مشاهده شد. بررسی نتایج نشان داد تیمار با سالیسیلیک اسید باعث تخفیف آسیب‌های ناشی از اعمال پرتوهای UV-B و UV-C در گیاه شد و توانست عواملی که در اثر تابش‌های فرابنفش تغییر یافته بودند را جبران کند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرتو فرابنفش، سالیسیلیک اسید، گیاه بادرنجبویه، مالون‌دی‌آلدهید

مقدمه

(UV) در سطح زمین شده و مشکلاتی را برای

موجودات زنده به وجود آورده است (Buchholz et

al., 1995). پرتو ماورای بنفش 8 تا 9 درصد طیف

کاهش ضخامت لایه اوزون در اثر فعالیت‌های

صنعتی انسان باعث افزایش میزان پرتو ماورای بنفش

(Chen *et al.*, 2007). گزارش شده است که سالیسیلیک اسید باعث فعال شدن سیستم مقاومت اکتسابی سیستمیک و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌گردد (Chen *et al.*, 2007). همچنین، کاربرد بیرونی آن در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان نظیر: فتوسنتز، تبخیر، تعرق، باز و بسته شدن روزنه‌ها، جذب مواد، تقسیم میتوز، بیوسنتز و عمل سایر هورمون‌های گیاهی دخالت دارد. سالیسیلیک اسید باعث کاهش آثار ناشی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی مانند: UV، خشکی، شوری، گرما، سرما و فلزات سنگین می‌شود. این ماده با تأثیر بر متابولیت‌هایی همچون آسکوربیک اسید (Borsanio *et al.*, 2001)، گلوکاتیون و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز (Tari *et al.*, 2002) آثار ناشی از تنش را کاهش می‌دهد.

بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* L. گیاهی از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) و از گیاهان دارویی است که از مهم‌ترین خواص دارویی آن می‌توان به آرام‌بخشی، تقویت اعصاب، ضد نفخ و تقویت کننده حافظه اشاره کرد (Kennedy *et al.*, 2006). با توجه به تهیه عرق از این گیاه و استفاده از آن در تهیه انواع شربت‌ها و شیرینی‌جات، بادرنجبویه در سطح وسیعی در استان آذربایجان شرقی و غربی به ویژه در مزارع شهر ارومیه کشت می‌شود. به علت کوهستانی و بادخیز بودن منطقه آذربایجان میزان پرتو ماورای بنفش رسیده به سطح زمین نسبت به مناطق دیگر بیشتر است. لذا احتمال داده می‌شود که گیاهان کشت شده در این منطقه به نوعی تحت تنش پرتو ماورای بنفش باشند. از سوی دیگر، نقش سالیسیلیک اسید در رشد گیاهی نسبت به

خورشید را شامل می‌شود و به سه طیف: UV-A (۳۲۰-۴۰۰ نانومتر)، UV-B (۲۸۰-۳۲۰ نانومتر) و UV-C (۲۰۰-۲۸۰ نانومتر) تقسیم می‌شود که به دلیل داشتن طول موج پایین نسبت به نور مرئی دارای انرژی زیادی برای نفوذ به بافت‌ها هستند. در بین موجودات زنده، گیاهان به دلیل احتیاج اجتناب‌ناپذیرشان به نور برای انجام فتوسنتز بیشتر تحت تأثیر پرتوهای UV قرار می‌گیرند و آسیب‌پذیرتر هستند (Booji-James *et al.*, 2000).

پروتئین‌ها، DNA، رنگیزه‌های فتوسنتزی، غشاهای زیستی، فتوسیستم‌ها و هورمون‌های گیاهی از اهداف بالقوه پرتو UV هستند (Allen *et al.*, 1998). پرتو UV باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند آنیون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود (Costa *et al.*, 2002) که بسیار فعال هستند و می‌توانند با درشت مولکول‌های زیستی نظیر لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها واکنش داده، اعمال طبیعی سلول را مختل سازند (Bischof *et al.*, 2002). القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بخشی از پاسخ‌های دفاعی است و در بسیاری از گونه‌ها علاوه بر این نوع پاسخ، سنتز برخی از ترکیبات جاذب UV نظیر فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و تجمع در بافت‌های اپیدرمی مانع نفوذ پرتو به بافت‌های داخلی می‌شود (Turcsanyi and Vass, 2000).

سالیسیلیک اسید یا ارتوهیدروکسی بنزوئیک اسید به گروهی از ترکیبات فنولی تعلق دارد و از نام گیاه *Salix* مشتق شده است (Popova *et al.*, 1997). سالیسیلیک اسید از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی است که نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاهی ایفا می‌کند

موج ۳۱۲ نانومتر اعمال شد. تابش فرابنفش C از طریق لامپ فرابنفش (مدل TUV/G30T8، شرکت Philips، هلند) با میزان تابشی در حدود ۱۷/۲ کیلو ژول بر متر مربع تأمین شد. گیاهان به مدت ۱۵ روز به صورت یک روز در میان و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه در معرض تابش فرابنفش B قرار گرفتند. همچنین، تابش فرابنفش C طی ۱۵ روز به صورت یک روز در میان و هر بار به مدت ۸ دقیقه اعمال گردید. سالیسیلیک اسید پس از مرحله ۶ برگی با غلظت یک میلی‌مولار به مدت یک هفته و به طور متوالی روی برگ گیاهان افشانه شد. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۶ تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. تیمارها عبارت بودند از: الف) گیاهان شاهد؛ ب) گیاهان شاهد + محلول یک میلی‌مولار سالیسیلیک اسید؛ پ) گیاهان در معرض تابش فرابنفش B؛ ت) گیاهان در معرض تابش فرابنفش B + محلول یک میلی‌مولار سالیسیلیک اسید؛ ث) گیاهان در معرض تابش فرابنفش C؛ ج) گیاهان در معرض تابش فرابنفش C + محلول یک میلی‌مولار سالیسیلیک اسید. پس از گذشت ۶۰ روز نمونه‌ها برداشت شده و سه تکرار از هر کدام پس از جداسازی اندام هوایی از ریشه‌ها در پاکت‌های مجزا قرار داده شد و برای تعیین وزن خشک به مدت ۷۲ ساعت در آون ۸۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس وزن خشک اندام هوایی و ریشه‌ها توسط ترازویی با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گیری شد. سه تکرار دیگر از هر تیمار برای بررسی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی که نیاز به وزن تر داشتند، پس از جداسازی اندام هوایی و ریشه‌ها و توزین آنها به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل گردیدند.

هورمون‌های دیگر کمتر مطالعه شده است. لذا هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر پرتوهای UV-B، UV-C و نقش سالیسیلیک اسید به عنوان یک ماده شیمیایی در تخفیف آثار زیانبار این پرتوها بر شاخص‌های رشد، میزان مالون‌دی‌آلدهید و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه دارویی بادرنجبویه است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: ابتدا خاک و ماسه مورد استفاده جهت کشت در اتوکلاو و در شرایط دمایی ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۵ ساعت استریل شدند. خاک و ماسه به نسبت ۱ به ۴ با هم مخلوط شد. بذره‌های سالم و یکنواخت گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱۰ درصد هیپوکلریت سدیم استریل و سپس با آب مقطر کاملاً شست و شو شد و برای جوانه‌زنی در پتری‌دیش قرار گرفتند. رطوبت از طریق کاغذ صافی‌های خیس شده توسط آب مقطر تأمین شد. بذره‌های جوانه زده در ۱۸ عدد گلدان پلاستیکی و در عمق ۲ سانتی متری از خاک قرار داده شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای در اتاقک کشت و دمای متوسط 28 ± 2 درجه سانتیگراد و شدت نور ۱۵۰ میکرو ایشترین بر متر مربع بر ثانیه به مدت ۶۰ روز کشت یافتند. دوره شبانه‌روزی روشنایی و تاریکی به ترتیب ۸:۱۶ ساعت بود. گلدان‌ها به طور متناوب با محلول نیم هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) و آب مقطر آبیاری شدند. گیاهان بادرنجبویه پس از مرحله ۶ برگی در معرض تابش فرابنفش B و C قرار گرفتند. پرتو مورد نیاز برای تیمار UV-B توسط دو لامپ ۱۵ وات با طول

مطالعه شاخص‌های فیزیولوژیکی

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید: اندازه‌گیری

محتوای مالون‌دی‌آلدهید با روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. در این روش، ۱ گرم از بافت تازه گیاه در ۲ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد در هاون ساییده شد و به مدت ۲۰ با نیروی ۱۵۰۰۰ g دقیقه سانتیفیوژ شد. بعد از سانتیفیوژ، حجم مساوی از عصاره و تیوباریوتیک اسید ۰/۵ درصد در تری‌کلرو استیک اسید ۲۰ درصد به لوله آزمایش منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۹۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در پایان، لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب یخ وارد شده، به مدت ۵ دقیقه با نیروی ۱۰۰۰۰ g سانتیفیوژ شد. جذب محلول حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل S2100، شرکت Biowave، انگلستان) در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ = ضریب خاموشی).

اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2):

میزان H_2O_2 با روش Jana و Choudhuri (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم از بافت تر توزین و با ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات با اسیدیته برابر با ۶/۸ ساییده شد. همگنای حاصل به مدت ۲۵ دقیقه با نیروی ۶۰۰۰ g سانتیفیوژ شد. برای تعیین میزان H_2O_2 ، ۳ میلی‌لیتر از عصاره حاصل برداشته و روی آن ۱ میلی‌لیتر تیتانیوم کلرید ۰/۱ درصد در H_2SO_4 ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) اضافه گردید و محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با نیروی ۶۰۰۰ g سانتیفیوژ شد. جذب محلول زرد رنگ حاصل به وسیله دستگاه

اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (ضریب خاموشی = $0.28 \text{ cm}^{-1} \text{ m}^{-1}$).

اندازه‌گیری آنزیم‌ها: برای تعیین میزان فعالیت

آنزیم‌ها عصاره گیاهی از روش Kang و Saltiveit (۲۰۰۲) با اندکی تغییر تهیه شد. ۰/۵ گرم وزن تر اندام هوایی به طور جداگانه از کلیه تیمارها توزین و در هاون سرد با ۳ میلی‌لیتر محلول (شامل: بافر تریس-کلریدریک اسید ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۷/۵، MgCl_2 ۳ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار) ساییده شد. بافر استخراجی جهت فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شامل ۲ میلی‌مولار آسکوربیک اسید نیز بود. همگنای حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در سانتیفیوژ با نیروی ۵۰۰۰ g قرار گرفت. محلول رویی به عنوان عصاره خام برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و فنیل آلانین آمونیا لیاژ مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز:

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز از روش Updhyaya و همکاران (۱۹۸۵) اندازه‌گیری شد. ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱ درصد (وزنی/حجمی) و ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی مخلوط و در مرحله نهایی ۱ میلی‌لیتر گایاکول ۱ درصد به آن افزوده شد. سپس، فعالیت آنزیم در یک دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب مولی ویژه ترا گایاکول (۲۶/۶ میلی‌مولار بر سانتی‌متر) محاسبه شده است و مقادیر بر حسب H_2O_2 میکرومول بر دقیقه بیان شد.

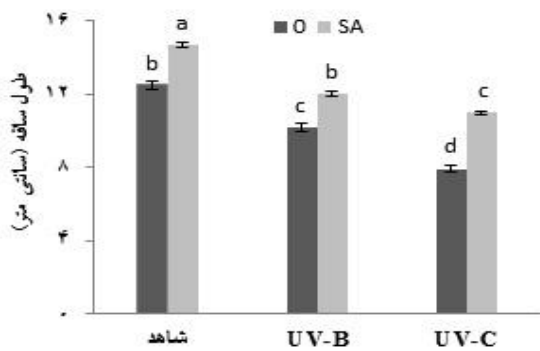
کاتالاز به صورت کاهش در جذب پراکسید هیدروژن در مدت یک دقیقه با ضریب مولی ویژه کاتالاز ۰/۰۲۶ میلی مولار بر سانتی متر در ۲۴۰ نانومتر ثبت شد. یک واحد آنزیمی برای فعالیت کاتالاز به صورت مقدار آنزیم مورد نیاز برای اکسید کردن ۱ میکرومولار پراکسید هیدروژن در هر دقیقه تعریف می‌شود.

تحلیل آماری: برای تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۱۸ و Excel استفاده گردید. در کلیه نمودارها نتایج به صورت مقادیر میانگین سه تکرار بیان شد و بارهای عمودی نشان‌دهنده \pm SE برای سه تکرار است. اختلاف بین تیمارها با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA دو طرفه و دانکن در سطح آماری $P \leq 0.05$ انجام شد.

نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده طول ریشه و ساقه تحت تأثیر پرتوهای UV-C و UV-B کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد پیدا کرد (شکل ۱). اما در نمونه‌هایی که با سالیسیلیک اسید تیمار شده بودند این کاهش طول به طور معنی‌داری کمتر بود (شکل ۱).

A



شکل ۱- تأثیر پرتوهای UV-C، UV-B و سالیسیلیک اسید بر طول ساقه (A) و ریشه (B) در گیاه بادرنجبویه. ۰ = بدون سالیسیلیک اسید و SA = به همراه سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.

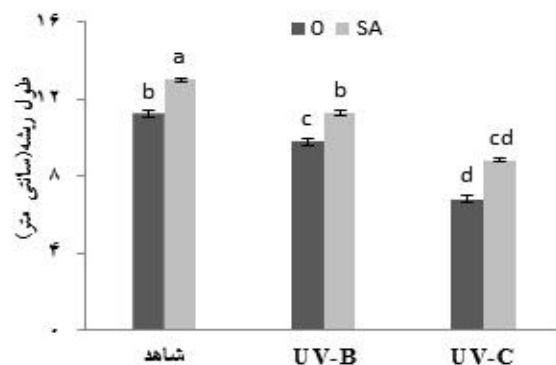
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات

پراکسیداز: فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) با اندکی تغییر اندازه گیری شد. ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷/۵ شامل EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مولار و ۰/۲ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۱ درصد (وزنی/حجمی) برداشته شد و به آن ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی استخراجی افزوده شد. سپس، فعالیت آنزیم از طریق اکسید شدن آسکوربیک اسید توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد که با کاهش جذب طی یک دقیقه فعالیت آنزیم همراه بود. ضریب مولی ویژه آسکوربات ۲/۸ میلی مولار بر سانتی متر و نتایج بر حسب تجزیه میکرومول بر دقیقه H_2O_2 بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم

کاتالاز از روش Aebi (۱۹۸۳) اندازه گیری شد. محلول واکنش کاتالاز (۳ میلی لیتر) شامل: بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷، پراکسید هیدروژن ۱ درصد (وزنی/حجمی) (۰/۲ میلی لیتر) و عصاره آنزیمی بود. واکنش با افزودن عصاره آنزیمی آغاز شد. فعالیت

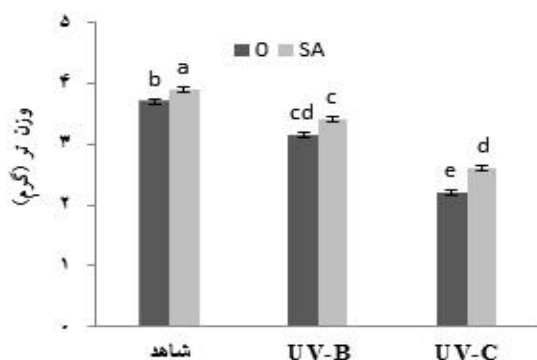
B



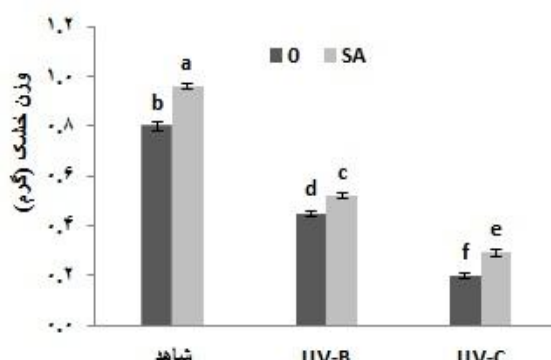
مشاهده شد. این در حالی است که تیمار با سالیسیلیک اسید کاهش معنی‌داری در سطح H_2O_2 نسبت به گیاهان تحت پرتوهای UV نشان داد.

محتوای مالون‌دی‌آلدهید: افزایش معنی‌دار سطح مالون‌دی‌آلدهید در اندام هوایی (شکل ۴-A) و ریشه (شکل ۴-B) گیاهان تحت تیمار با UV-B و UV-C نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. تیمار با سالیسیلیک اسید کاهش معنی‌داری در سطح مالون‌دی‌آلدهید در گیاهان تحت تیمار هر دو پرتو UV و سالیسیلیک اسید نسبت به گیاهان تحت تیمار به تنهایی پرتوهای UV نشان داد.

A

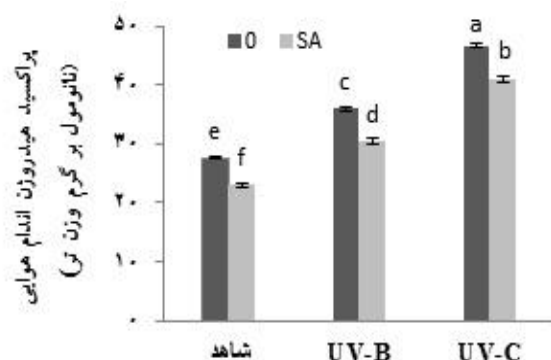


B

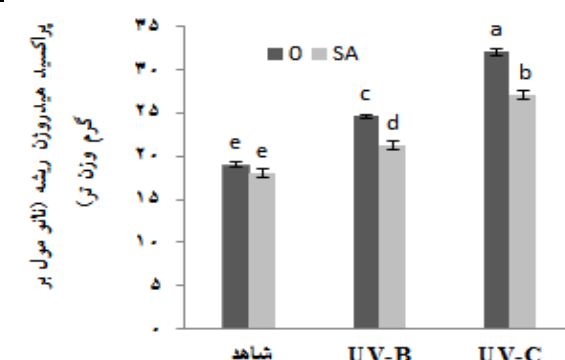


شکل ۲- تأثیر پرتوهای UV-B، UV-C و سالیسیلیک اسید بر وزن تر (A) و وزن خشک (B) در گیاه بادرنجبویه. ۰ = بدون سالیسیلیک اسید و SA = به همراه سالیسیلیک اسید ۱ میلی‌مولار. در هر ستون، میانگین‌های با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.

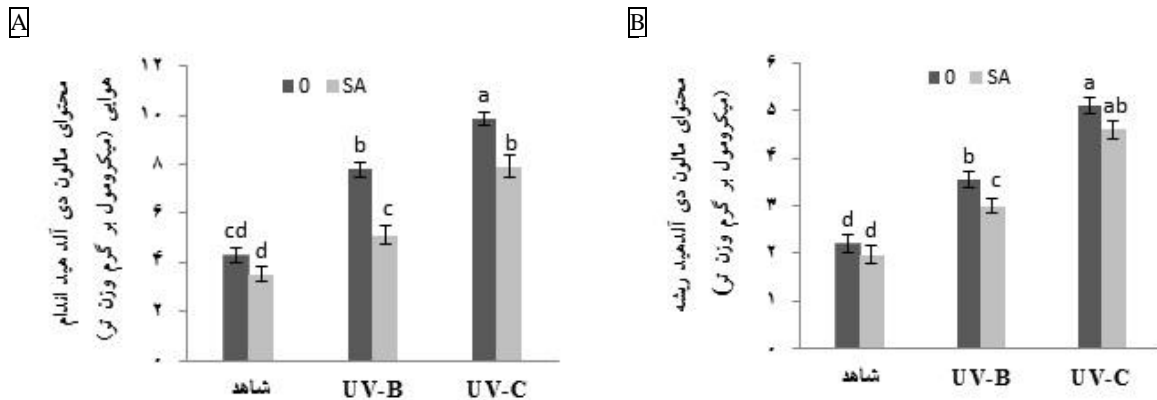
A



B



شکل ۳- تأثیر پرتوهای UV-B، UV-C و سالیسیلیک اسید بر میزان پراکسید هیدروژن در اندام هوایی (A) و ریشه (B) در گیاه بادرنجبویه. ۰ = بدون سالیسیلیک اسید و SA = به همراه سالیسیلیک اسید ۱ میلی‌مولار. در هر ستون، میانگین‌های دارای تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.



شکل ۴- تأثیر پرتوهای UV-B، UV-C و سالیسیلیک اسید بر محتوای مالون دی‌آلدئید در اندام هوایی (A) و ریشه (B) در گیاه بادرنجبویه. ۰ = بدون سالیسیلیک اسید و SA = به همراه سالیسیلیک اسید ۱ میلی‌مولار. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن هستند.

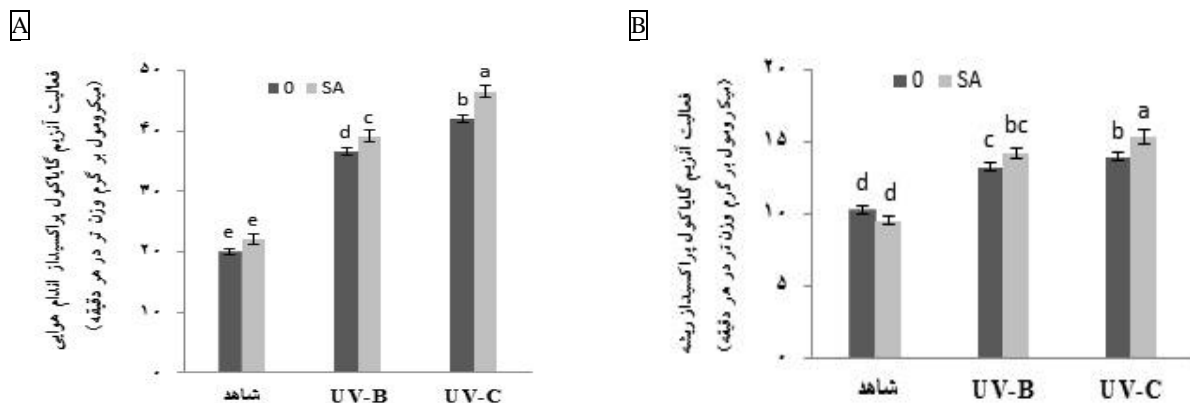
UV-B و UV-C نسبت به گیاهان شاهد افزایش داشت. در گیاهان تیمار یافته با سالیسیلیک اسید نیز افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. اعمال همزمان سالیسیلیک اسید در هر دو پرتو به افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان تحت تیمار پرتوهای UV منجر گردید.

برخلاف آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز تحت تابش پرتوهای UV-B و UV-C فعالیت آنزیم کاتالاز اندام هوایی (شکل A-۷) و ریشه (شکل B-۷) نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین، تیمار سالیسیلیک اسید کاهش بیشتر فعالیت آنزیم کاتالاز را به دنبال داشت. اعمال سالیسیلیک اسید به همراه دو نوع پرتو UV باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به اعمال به تنهایی پرتوهای UV شد که این کاهش معنی‌دار نبود.

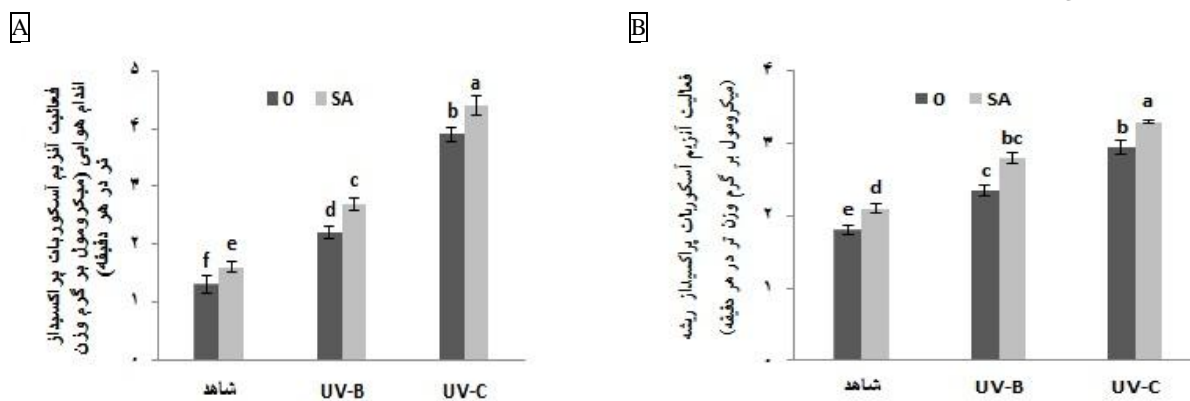
فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: بررسی نتایج

حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تنش پرتوهای UV-B و UV-C نشان داد که تابش فرابنفش باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در اندام هوایی (شکل A-۵) و ریشه (شکل A-۵) گیاهان تحت تیمار هر دو پرتو نسبت به شاهد شد. تیمار با سالیسیلیک اسید نیز باعث افزایش در فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز گردید که این افزایش معنی‌دار نبود. تیمار همزمان گیاهان با پرتوهای فرابنفش و سالیسیلیک اسید باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نسبت به گیاهان تحت تیمار هر دو پرتو گردید.

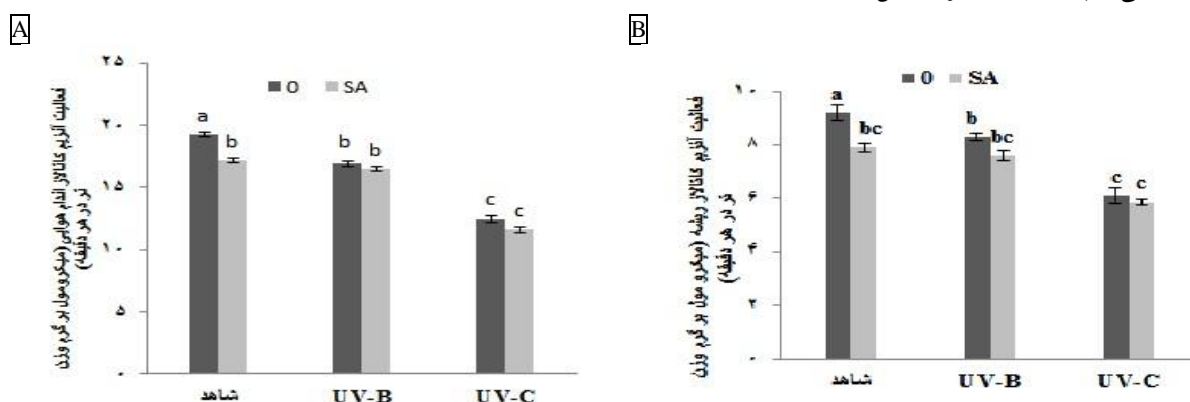
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تابش پرتوهای UV-B و UV-C نشان داد که فعالیت این آنزیم در اندام هوایی (شکل A-۶) و ریشه (شکل B-۶) به طور معنی‌داری در گیاهان تحت تیمار



شکل ۵- تأثیر پرتوهای UV-C، UV-B و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) در اندام هوایی (A) و ریشه (B) در گیاه بادرنجبویه. ۰ = بدون سالیسیلیک اسید و SA = به همراه سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.



شکل ۶- تأثیر پرتوهای UV-C، UV-B و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در اندام هوایی (A) و ریشه (B) در گیاه بادرنجبویه. ۰ = بدون سالیسیلیک اسید و SA = به همراه سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.



شکل ۷- تأثیر پرتوهای UV-C، UV-B و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در اندام هوایی (A) و ریشه (B) در گیاه بادرنجبویه. ۰ = بدون سالیسیلیک اسید و SA = به همراه سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.

بحث

همچنین گزارش شده است که سالیسیلیک اسید با افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو و نیز توان آنتی‌اکسیداتیو از اکسیداسیون پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند (Gapinska and Sklodowska, 2008).

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش افزایش می‌یابد. مالون‌دی‌آلدهید حاصل تجزیه اسیدهای چرب غیر اشباع است که به عنوان شاخص زیستی پراکسیداسیون لیپیدها زمانی که در معرض رادیکال‌های آزاد اکسیژن قرار گرفته‌اند، شناخته می‌شود (Eraslan *et al.*, 2008). پرتوهای فرابنفش باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که یکی از موارد آسیب آنها پراکسیداسیون لیپیدهای غشای پلاسمایی و سایر غشاهای درونی اندامک‌هایی نظیر کلروپلاست و میتوکندری است. افزایش تولید پراکسید هیدروژن در گیاه بادرنجبویه تحت تنش پرتوهای فرابنفش در این تحقیق نشان دهنده تنش اکسیداتیو ناشی از این پرتوها در این گیاه است. پراکسید هیدروژن می‌تواند با رادیکال سوپر اکسید وارد واکنش شود و رادیکال‌های هیدروکسیل فعال شده بیشتری را شکل دهد. رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل آغازگر واکنش‌هایی است که موجب پراکسیداسیون چربی می‌شود (Chen *et al.*, 2007). حاصل این پراکسیداسیون چربی ترکیباتی مانند مالون‌دی‌آلدهید، هپتانال، بوتانال و هگزانال است (Eraslan *et al.*, 2008). Bijami و همکاران (۲۰۱۰) نیز افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید در میوه رسیده گوجه‌فرنگی تحت تیمار پرتو UV-B را گزارش کرده‌اند. سالیسیلیک اسید باعث کاهش میزان

طبق نتایج به دست آمده پرتوهای فرابنفش باعث کاهش طول ریشه و اندام هوایی می‌شوند. احتمال داده می‌شود که علت این امر کاهش تقسیم سلولی در نتیجه تأثیر پرتوهای فرابنفش بر همانندسازی DNA باشد. پژوهش‌ها نشان داده است که رشد طولی در گیاه *Bromus catharticus* تحت تأثیر تابش UV-B کاهش می‌یابد (Deckmyn and Impnes, 1988). تیمار سالیسیلیک اسید باعث افزایش طول ریشه و اندام هوایی شد. سازوکاری که سالیسیلیک اسید رشد ریشه و اندام هوایی را در برخی گیاهان افزایش می‌دهد به خوبی شناخته نشده است، اما احتمال داده می‌شود که سالیسیلیک اسید طویل شدن و تقسیم سلولی را به همراه مواد دیگری از قبیل اکسین تنظیم می‌کند (Popova *et al.*, 1997). کاهش وزن ریشه و اندام هوایی تحت تأثیر پرتوهای UV بیانگر کاهش تولید بیوماس در این تیمارهاست و این یک پاسخ عمومی در بسیاری از گونه‌های گیاهی است. یکی از علت‌های کاهش وزن ریشه و اندام هوایی در تیمارهای UV، اختلال در بیوسنتز یا انتقال تنظیم‌کننده‌های رشد و نمو گیاهی نظیر اکسین و جیبرلیک اسید است (Krizek *et al.*, 1998). علت اصلی کاهش وزن تر و خشک گیاه در اثر تابش UV می‌تواند کاهش ظرفیت فتوسنتزی باشد. سالیسیلیک اسید با افزایش تعداد برگ‌ها افزایش سطح برگ، افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو باعث افزایش ظرفیت فتوسنتزی، افزایش تولید بیوماس و افزایش وزن گیاه می‌شود (Kaydan *et al.*, 2007). گزارش شده است که سالیسیلیک اسید باعث افزایش وزن خشک در سویا و ذرت شده است (Khan *et al.*, 2003).

(۱۹۹۷) گزارش کردند که سالیسیلیک اسید به عنوان یک مولکول پیام‌رسان، سیستم آنتی‌اکسیدان را با ممانعت از کاتالاز و تحریک پراکسیدازها تغییر می‌دهد. سالیسیلیک اسید به علت داشتن اکسیژن گروه هیدروکسیل آزاد روی حلقه بنزوئیک قادر به کلاته کردن آهن موجود در کاتالاز است (Qinghua and Zhujun, 2008). بنابراین، سالیسیلیک اسید سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز که یک تجزیه کننده H_2O_2 است خواهد شد و با کاهش فعالیت این آنزیم افزایش میزان پراکسید هیدروژن سمی در گیاه قابل انتظار است. اگرچه پراکسید هیدروژن در غلظت‌های بالا سمی است و توسط آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز چرخه آنتی‌اکسیدانی آسکوربات-گلوتاتیون از بین می‌رود اما در غلظت‌های پایین می‌تواند نقش پیام را در گیاه داشته باشد و ژن‌های وابسته به مقاومت را در گیاه فعال کند (Wang *et al.*, 2009). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تأثیر سالیسیلیک اسید در گیاه ذرت نیز گزارش شده است (Wang *et al.*, 2009).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که پرتوهای UV-B و UV-C باعث وارد آمدن آسیب‌هایی به گیاه بادرنجبویه شد و گیاه از نظر مورفولوژیک و فیزیولوژیک دچار تغییراتی شد. آسیب‌های وارد شده به گیاه تحت تأثیر پرتوهای UV-C بیشتر از پرتوهای UV-B بود. همچنین، افزایش میزان پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید نشان دهنده تنش اکسیداتیو در گیاهان بادرنجبویه تحت تیمار پرتوهای فرابنفش در

مالون‌دی‌آلدهید می‌شود که می‌توان علت آن را توانایی سالیسیلیک اسید در ممانعت از تولید رادیکال‌های آزاد دانست. نقش سالیسیلیک اسید به عنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های هیدروکسید در گیاهان پیشنهاد شده است (El-Tayeb *et al.*, 2006). کاهش محتوای مالون‌دی‌آلدهید در دو گونه چغندر که تحت تیمار شوری و سالیسیلیک اسید قرار گرفته بودند نیز گزارش شده است (Slaymarker *et al.*, 2002).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به شدت تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش قرار می‌گیرد. پرتو UV باعث افزایش میزان ROS می‌شود که باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می‌گردد (Rao *et al.*, 1996). سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو مجهز به سیستم جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد هستند، این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر: کاتالاز، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و نیز سیستم غیر آنزیمی شامل آسکوربیک اسید، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها است (Booji-James *et al.*, 2000). آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز گیاهان را در برابر تنش اکسایشی با تبدیل رادیکال‌های سوپر اکسید به پراکسید هیدروژن و تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن محافظت می‌کنند که در این فرآیند سوپر اکسید دیسموتاز باعث تبدیل رادیکال‌های سوپر اکسید به پراکسید هیدروژن و کاتالاز و پراکسیدازها باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به آب می‌شود (Scandalios *et al.*, 1993). سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شد. Rao و همکارانش

UV-B و UV-C ایجاد شده بود.

این تحقیق بود. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که به عنوان سازوکار دفاعی در برابر پرتوهای فرابنفش است، همزمان با تنش اکسیداتیو در گیاهان تحت تیمار مشاهده گردید. تیمار با سالیسیلیک اسید باعث جبران آسیب‌های فیزیولوژیک و شاخص‌های رشدی شد که در اثر تیمار با پرتوهای

سپاسگزاری

نگارندگان از مسؤول آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه بابت همکاری صمیمانه در انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

- Aebi, H. (1983) Catalase. In: Methods of enzymatic analysis 3 (ed. Bergmeyer, H.) 273-277. Weinheim, Germany.
- Allen, D. J., Noguees, S. and Baker, R. N. (1998) Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* 328: 1775-1788.
- Bijami, A., Rezanejad, F. and Sasan, H. A. (2010) The effects of post-harvest UV-B radiation on some antioxidant compounds, PAL activity and total protein contents of ripe tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Plant Biology* 2(6): 29-38 (in Persian).
- Bischof, K., Peralta, G., Krabs, G., Van de Poll, W. H., PerezLlorens, J. L. and Anneke, M. (2002) Effects of solar UV-B radiation on canopy structure of *Ulva communities* from southern Spain. *Journal of Experimental Botany* 53(379): 2411-2421.
- Booji-James, I. S., Dube, S. K., Jansen, M. A. K., Edelman, M. and Mattoo, A. K. (2000) Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutant altered in phenolic metabolism. *Plant Physiology* 124: 1275-1283.
- Borsanio, O., Valpuesta, V. and Botella, M. A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 126: 1024-1030.
- Buchholz, G., Ehmann, B. and Wellman, E. (1995) Ultraviolet light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledones (*Synapis alba* L.). *Plant Physiology* 108: 227-234.
- Chen, J., Cheng, Z. and Zhong, S. (2007) Effect of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂ metabolizing enzymes in rice seedlings lead stress. *Journal of Environmental Sciences* 19: 44-49.
- Costa, H., Gallego, S. M. and Tomaro, M. L. (2002) Effects of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science* 162(6): 939-945.
- Deckmyn, G. and Impnes, I. (1988) Effects of solar UV-B irradiation on vegetative and generative growth of *Bromus catharticus*. *Environmental and Experimental Botany* 40: 179-185.
- El-Tayeb, M. A., EL-Enany, A. E. and Ahmed, N. L. (2006) Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Growth Regulation* 50: 191-199.
- Eraslan, F., Inal, A., David, J. and Gunes, A. (2008) Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) grown under boron toxicity and salinity. *Plant Growth Regulation* 55: 207-219.
- Gapinska, M. and Sklodowska, M. (2008) Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Plant Physiology* 30: 11-18.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and

- stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. University of California, Berkeley.
- Jana, S. and Choudhuri, M. A. (1981) Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquatic Botany 12: 345-354.
- Kang, H. M. and Saltiveit, M. E. (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid. Physiologia Plantarum 115: 577-576.
- Kaydan, D., Yagmur, M. and Okut, N. (2007) Effects of salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). Tarim Bilimleri Dergisi 13(2): 114-119.
- Kennedy, D. O., Little, W., Haskell, C. and Scholey, A. B. (2006) Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced Stress. Phytotherapy Research Phytother Response 20: 96-102.
- Khan, W., Prithiviraj, B. and Smith, D. L. (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. Plant Physiology 160: 485-492.
- Krizek, D. T., Brita, S. J. and Miewcki, R. M. (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B on growth of cv. New Red Fire lettuce. Physiologia Plantarum 103: 1-7.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.
- Popova, L., Pancheva, T. and Uzonova, A. (1997) Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. Plant Physiology 23: 85-93.
- Qinghua, S. H. and Zhujun, Z. (2008) Effect of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. Environmental and Experimental Botany 63: 317-326.
- Rao, M. V., Paliyath, G. and Ormrod, D. P. (1996) Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 110: 125-136.
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ormond, P., Murr, D. P. and Watkins, C. B. (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress and H₂O₂-metabolizing enzymes. Plant Physiology 115(1): 137-149.
- Scandalios, J. G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiology 101: 7-12.
- Slaymarker, D. H., Navarre, D. A., Clark, D., Pozo, O. D., Martin, G. B. and Klessig, D. F. (2002) The tobacco salicylic acid binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exihibition antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. Proceeding of the National Academy Sciences 99(18): 11640-11645.
- Tari, I., Csiszar, J., Szalai, G., Horvath, F., Pecsvaradi, A., Kiss, G., Szepsi, A., Szabo, M. and Erdei, L. (2002) Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. Acta Biologica Szegediensis 46(3-4): 55-56.
- Turcsanyi, E. and Vass, I. (2000) Inhibition of photosynthetic electron transport by UV-A radiation targets the photosystem II complex. Photochemistry Photobiology 72: 513-520.
- Updhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T. D., Sankhla, N. and Smidth, B. N. (1985) Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Plant Physiology 121: 453-461.
- Wang, H., Feng, T. and Yan, M. (2009) Up- regulation of chloroplastic antioxidant capacity is involved in alleviation of nickel toxicity of *Zea mays* by exogenous salicylic acid. Ecotoxicology and Environmental Safety 75: 1354-1362.

Effects of UV-B and UV-C radiation on antioxidative enzymes activity of *Melissa officinalis* and influences of salicylic acid in UV-stress ameliorations

Latifeh Pourakbar * and Mehdi Abedzadeh

Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

The effects of decreased ozone and increased UV radiation have been studied by many researchers. The aim of this study was to investigate the effects of UV-B and UV-C radiations on *Melissa officinalis* L. and to study the impact of salicylic acid in reducing the harmful effects of radiation on plants. The *M. officinalis* L. plants were grown at 28 ± 2 °C temperature for about 60 days. The light intensity was $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$ and the light-dark condition was 8-16 hours. UV treatment was applied after the six-leaf stage and UV-B radiation was applied for a period of 15 days on alternative days and the time for each application was 20 minutes. But UV-C radiation was applied for 15 days and the time of each application was 8 minutes. Salicylic acid was sprayed on the plants after the six-leaf stage with a concentration of 1 mM. The results indicated that the UV-B and UV-C radiations led to reduction of the dry and fresh weight, root elongation and shoots. The radiations increased activity of antioxidant enzymes ascorbate peroxidase, and catalase activity reduction was also observed. The Malondialdehyde and H_2O_2 content were increased under the effect of UV-B and UV-C radiations. The results showed that treatment with salicylic acid reduced damage to the plants resulting from UV-B and UV-C radiations and were able to compensate for changed factors that had been changed because of ultra violet radiations.

Key words: Antioxidant enzymes, UV radiation, Salicylic acid, *Melissa officinalis* L., Malondialdehyde

* Corresponding Author: l.pourakbar@urmia.ac.ir