

اثر امواج الکترومغناطیس بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و محتوای آنتی‌اکسیدانی گیاه نعنا (*Mentha piperiata* L.)

فریبا رمضانی ویشکی

استادیار گروه زیست‌شناسی، سازمان آموزش و پرورش شهر تهران، آموزش و پرورش منطقه ۸، تهران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۳۱

چکیده

به منظور بررسی اثر امواج الکترومغناطیسی بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی آنتی‌اکسیدانی گیاه نعنا، ظروف پتری حاوی بذرهایی که به مدت ۵ ساعت در آب خیس‌انده شده بودند همراه آب و بذره‌های خشک بدون آب، به فاصله هر هشت ساعت یکبار، هر بار به مدت نیم ساعت (چهار بار در یک شبانه‌روز) تحت پرتودهی امواج الکترومغناطیس با شدت یک میلی‌تسلا قرار گرفتند. بذرها پس از تیمار به خاک گلدان منتقل شدند. مطالعه بر روی برگ گیاهان ۳۰ روزه انجام شد. آنالیز شیمیایی عصاره استنی برگ بیانگر کاهش میزان کلروفیل a و b در نمونه تحت تیمار نسبت به شاهد بود. این کاهش بین نمونه‌های شاهد و تیمار مرطوب، معنی‌دار بود ولی اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های شاهد و تیمار خشک دیده نشد. میزان کاروتنوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از جمله ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و پرولین در نمونه‌های تحت تیمار نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. در مورد سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نیز افزایش معنی‌داری بین نمونه‌های تحت تیمار مرطوب نسبت به شاهد دیده شد، اما بین نمونه‌های تحت تیمار خشک و شاهد تفاوت، معنی‌دار نبود.

واژگان کلیدی: امواج الکترومغناطیس، آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، نعنا

مقدمه

تشعشع و میزان انرژی منتقل شده به سلول‌های گیاهی، عکس‌العمل گیاه متفاوت است. امواج الکترومغناطیس در فرکانس پایین می‌تواند بدون آسیب رسانی جدی در گیاه روی توان زیستی دانه‌ها تغییر ایجاد کند (Yao et al., 2006). به دلیل آن که گیاهانی نظیر نعنا به‌طور معمول از طریق بذر رویش نمی‌کند و تکثیر آن از طریق تقسیم ریشه و قلمه ساقه و پاجوش انجام می‌شود. لازم است شرایط مناسب برای جوانه‌زنی بذرها فراهم شود. پرایمینگ یکی از روش‌های بهبود بذر است که می‌تواند باعث افزایش جوانه‌زنی در شرایط تنش شود. در واقع طی این روش بذر با جذب آب، مراحل اولیه جوانه‌زنی

تنش‌های زیستی و غیرزیستی با القای تنش اکسیداتیو، اثرات مختلفی بر متابولیسم گیاهان دارند (Apel and Hirt, 2004). امواج الکترومغناطیس به دلیل آن که حامل انرژی است، می‌تواند بر موجودات زنده و از جمله گیاهان تاثیراتی داشته باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که امواج الکترومغناطیس بر جنبه‌های مختلف زندگی گیاهان از جمله نمو رویشی، زایشی و عملکرد، ساختار سلول‌های گیاهی اثر می‌گذارد. بسته به فراوانی

*نویسنده مسئول: ramezanivishki@yahoo.com

یعنی فعال شدن آنزیم را طی می‌کند، اما ریشه چه خارج نمی‌شود (آل‌اطهار و همکاران، ۱۳۸۹). از طرف دیگر امواج الکترومغناطیس نیز به دلیل عملکرد القاء‌کننده‌ای که دارد، می‌تواند از یک سو با اثر بر ژن‌های درون هسته و افزایش متابولیسم و از سوی دیگر با افزایش فعالیت آنزیم‌ها و جذب آب در دانه باعث تسریع جوانه‌زنی بذر شود (Ramezani vishki et al., 2012).

امواج الکترومغناطیس به‌عنوان یک عامل تنش‌زا نیز عمل می‌کند و با ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش تولید گونه اکسیژن واکنش‌گر، باعث ایجاد تغییراتی در محتوای شیمیایی سلول گیاهی تحت تنش می‌شوند. گیاهان با تولید و تجمع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی متنوع، به شیوه‌های مختلف سعی در خنثی کردن تنش و افزایش مقاومت خود دارند. افزایش محتوای کاروتنوئیدی نوعی پاسخ دفاعی در گیاهان تحت تنش می‌باشد. کاروتنوئیدها در واقع به‌عنوان حفاظت‌کننده تجهیزات فتوسنتزی و کلروپلاست در گیاه شناخته شده‌اند (Tevini et al., 1991). افزایش بیوسنتز کاروتنوئیدها طی تنش می‌تواند سبب کاهش اثرات مخرب امواج بر رنگیزه‌های کلروفیلی شود (Hao, 1997). گیاهان برای ارتقاء مکانیسم‌های دفاعی، به تولید و تجمع فنل‌ها در بافت‌های گیاهی و نیز تجمع فلاونوئیدها در واکوئل سلول‌های اپیدرمی برگ و ساقه، به‌عنوان جاذب امواج استفاده می‌کنند (Mittler, 2002). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با ساختار و ویژگی‌های بیوشیمیایی خاص، با مکانیسم‌های متفاوتی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد شرکت می‌کنند (Shao et al., 2008). تولید و تجمع پرولین نیز یکی از سازگاری‌های مهم در گیاهان تحت تنش است. پرولین با عملکردهای بسیار متنوع، در جاروب کردن گونه اکسیژن واکنش‌گر در سلول دخالت می‌کند. تجمع پرولین در گیاهان عالی با افزایش ROS رابطه مستقیم دارد (Maggio et al., 2002). از راهکارهای دفاعی

دیگر در گیاهان تحت تنش، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از جمله کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز است. گروه پروستتیک این آنزیم‌ها، در نابودی و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد نقش مهمی ایفا می‌کنند (al., 2002). از آنجا که گیاه نعنا دارای ترکیبات شیمیایی موثر و مفیدی است، هدف از انجام این پژوهش رسیدن به این نتیجه بود که آیا می‌توان با ایجاد تنش، تحت تاثیر امواج الکترومغناطیسی با شدت کم، بدون آسیب‌رسانی جدی به گیاه، سبب افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه شده و از آن بهره برد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، بذره‌های نعنا به‌صورت بومی از منطقه اطراف شهرستان لنگرود در استان گیلان تهیه شد. ظرف‌های پتری حاوی بذرها پس از ضدعفونی شدن، در محلول NaCl به‌عنوان اسموپرایم قرار داده شدند. به‌منظور تهیه محلول اسموپرایم، میزان ۲ گرم نمک NaCl در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد (محلول مادر)، سپس به ۱۰ میلی‌لیتر از محلول مادر، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. بذرها به مدت ۶ ساعت در محلول اسموپرایم قرار داده شدند و بعد از پرایم شدن، از محلول خارج و سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و آب اضافی آنها به‌وسیله کاغذ صافی گرفته شد و در دمای آزمایشگاه خشک شدند و برای ادامه آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. سپس تعدادی از بذرها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، به مدت ۵ ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد خیس‌انده شدند. برای انجام این پژوهش، ظرف‌های پتری حاوی بذره‌های مرطوب همراه آب و بذره‌های خشک بدون آب، مطابق شکل ۱، به‌طور افقی روی صفحه بین دو سیم پیچ کروی دستگاه مولد امواج الکترومغناطیس که بر اساس

صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. سپس ۵ میلی‌لیتر استن دیگر به آن اضافه، حجم محلول به ۱۵ میلی‌لیتر رسیده و شدت جذب آن در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاروتنوئیدها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$\text{Chl.a} = (12.25 \text{ A663} - 2.79 \text{ A646}) \times V/A$$

$$\text{Chl.b} = (21.50 \text{ A646} - 5.1 \text{ A663}) \times V/A$$

$$\text{Car} = (1000 \text{ A470} - 1.82 \text{ Chl.a} - 85.02$$

$$\text{Chl.b})/198 \times V/A$$

اندازه‌گیری محتوای فنلی: برای سنجش محتوای فنلی از روش (McDonald et al., 2001) استفاده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی با ۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو ۰/۲ نرمال، مخلوط و سپس ۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم یک مولار به آن اضافه شد و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ سی‌سی رسانده شد. محلول ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شده و سپس طیف جذبی آن در طول موج ۷۶۵ بررسی شد. برای تهیه منحنی کالیبراسیون استاندارد، از اسیدگالیک استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئیدی: سنجش عصاره متانولی برای بررسی محتوای فلاونوئیدی براساس روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ سی‌سی متانول ۹۵ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ در متانول و ۰/۱ سی‌سی استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر دی‌یونیزه مخلوط شد. جذب، پس از ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای تهیه منحنی کالیبراسیون استاندارد، از اسیدگالیک استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوای پرولین: بررسی و سنجش میزان پرولین بر اساس روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انجام شد. در این روش ۰/۵ گرم برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید ساییده شد. از مخلوط همگن پس از صاف کردن، ۲ میلی‌لیتر برداشته و پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر معرف

سیم‌پیچ هلمهولتزکویل ساخته شده بود قرار گرفته و به فاصله هر هشت ساعت یکبار، هر بار به مدت نیم ساعت (چهار بار در یک شبانه روز) تحت تاثیر امواج الکترومغناطیس با شدت یک میلی‌تسلا قرار گرفتند. بذرها شاهد در هر دو حالت مرطوب و خشک در شرایط مشابه با تیمار جز اثردهی امواج قرار گرفتند. سپس بذرها به گلدان‌های محتوی خاک شنی و مقدار زیادی ترکیبات هوموسی با pH=۶ و دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در برگ گیاه ۳۰ روزه، رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از جمله ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مثل کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز مورد سنجش قرار گرفت. مقایسه بین تیمارها و شاهد بر اساس آزمون دانکن توسط برنامه آماری SPSS 18 برای سه تکرار در سطح $P < 0/05$ صورت گرفت و نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel ترسیم شد.



شکل ۱: دستگاه مولد امواج الکترومغناطیس و نحوه اثردهی امواج

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی: سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل‌های a و b و نیز کاروتنوئیدها با استفاده از عصاره استنی برگ به روش Lichtenthaler (۱۹۸۷)، انجام شد. ۰/۲ گرم بافت تازه برگی را با ۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد به خوبی سائیده و سپس محلول حاصل توسط کاغذ

نانومتر، دو دقیقه پس از شروع واکنش محاسبه گردید. ضریب معادل $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و بر اساس فرمول $A=\epsilon bc$ فعالیت آنزیمی بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازاء هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. **سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از روش Gianopolitis and Ries (۱۹۷۷) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل $2/5$ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=7/8$ ، $0/1$ میلی‌لیتر متیونین 13 میلی‌مولار، $0/1$ میلی‌لیتر نیترو بلو تترازولیوم 75 میکرومول، $0/1$ میلی‌لیتر 2 میکرومول، $0/2$ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی بود. نمونه‌ها به مدت 15 دقیقه در معرض نور قرار داده شدند و پس از این مدت جذب آنها در طول موج 560 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در این آزمایش دو نمونه شاهد بدون عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت، نمونه اول بدون دریافت نور (به‌عنوان شاهد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر و نمونه دوم 15 دقیقه در معرض نور قرار گرفت. به دلیل وجود آنزیم احیاء نیترو بلو تترازولیوم در حضور نور به‌طور 100 درصد انجام می‌گیرد). یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار 50 درصد احیاء نوری نیترو بلو تترازولیوم می‌گردد.

نتایج

اندازه‌گیری رنگی‌های فتوستتزی در نمونه‌های تحت تیمار و شاهد، بیانگر کاهش میزان رنگی‌های کلروفیلی (a و b)، و افزایش محتوای کاروتنوئیدی در نمونه‌های تحت تیمار بود. بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های آماری، محتوای کلروفیل a و b در تیمار مرطوب نسبت به شاهد به‌ترتیب، $13/13$ و $23/27$ درصد کاهش یافت که معنی‌دار بود (شکل ۲). کاهش

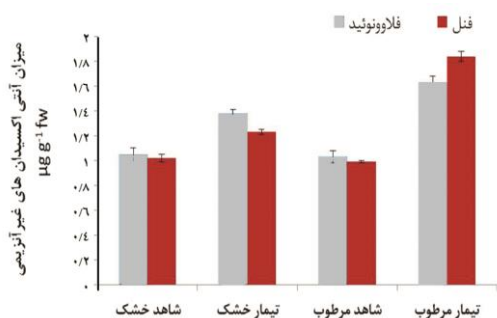
نیترو هیدرین و 2 میلی‌لیتر اسیداستیک خالص، در لوله‌های دردار، در بین ماری 100 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. پس از طی یک ساعت، برای توقف واکنش، لوله‌ها در یخ قرار داده شدند. سپس به هر یک 4 میلی‌لیتر تولوئن افزوده و به شدت تکان داده شد. جذب فاز تولوئن در 520 نانومتر خوانده شد و مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد آن به دست آمد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در 240 نانومتر و با روش Motowe و Dhindasa (۱۹۸۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل $2/87$ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ و 30 میکرولیتر آب اکسیژنه 15 میلی‌مولار می‌باشد. سپس برای شروع واکنش، 100 میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد. تغییرات جذب (یعنی تفاضل جذب در زمان شروع واکنش از جذب در زمان یک دقیقه، پس از شروع واکنش) محاسبه گردید. میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی $\epsilon=0/28 \text{ cm}^{-1} \text{ m Mol}$ و فرمول $A=\epsilon bc$ محاسبه شد که نشان‌دهنده میزان فعالیت آنزیم است. A معادل جذب خوانده شده، ϵ ضریب خاموشی، c غلظت H_2O_2 و b طول کوت (۱ سانتی‌متر) می‌باشد. فعالیت آنزیم به‌صورت مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در 100 میکرولیتر عصاره در یک دقیقه محاسبه شد.

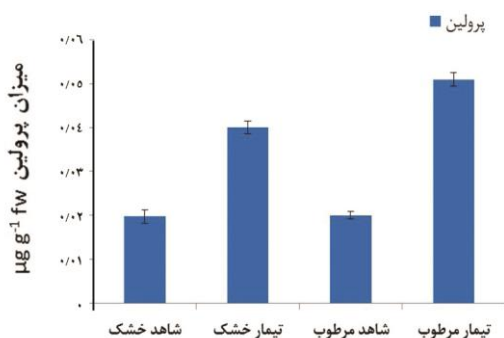
سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش Nakano and Asada (۱۹۸۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ ، آب اکسیژنه $0/15$ میلی‌مولار، EDTA $0/1$ مولار، آسکوربات $0/5$ میلی‌مولار و 50 میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به دنبال اکسید شدن آسکوربات با شروع واکنش آنزیمی کاهش جذب در طول موج 290

فلاونونوئیدی در تیمار مرطوب نسبت به شاهد شد. این افزایش در تیمار خشک نسبت به شاهد برای ترکیبات فنلی ۲۹ درصد و برای ترکیبات فلاونونوئیدی ۳۱/۴۲ درصد محاسبه شد. در هر دو گروه نمونه‌های تحت تیمار در مقایسه با شاهد، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ۴). بررسی‌های آماری نشان داد که میزان پرولین نیز در تیمارهای مرطوب و خشک نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافته است (شکل ۵).

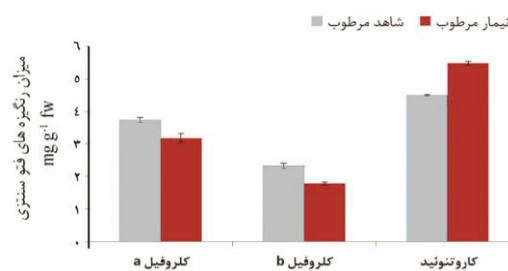


شکل ۴: مقایسه میزان فنل و فلاونونوئید در برگ گیاه نعنا در نمونه‌های شاهد و تیمار. نتایج به صورت $\bar{X} \pm SE$ در سه تکرار نشان داده شده است. میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شده و $P < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.



شکل ۵: مقایسه میزان پرولین در برگ گیاه نعنا در نمونه‌های شاهد و تیمار. نتایج به صورت $\bar{X} \pm SE$ در سه تکرار نشان داده شده است. میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شده و $P < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

محتوای کلروفیل a و b در تیمار خشک به ترتیب ۷/۴۰ و ۸/۷۵ درصد در مقایسه با شاهد به دست آمد که این اختلاف، معنی‌دار نبود (شکل ۳). مقایسه محتوای کاروتنوئیدی در هر دو نمونه تیمار مرطوب و خشک نسبت به شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داد. این افزایش در تیمار مرطوب نسبت به شاهد ۲۱/۷۷ و در تیمار خشک نسبت به شاهد ۱۵/۲۹ درصد محاسبه شد (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲: مقایسه رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ گیاه نعنا در نمونه‌های شاهد و تیمار مرطوب.

نتایج به صورت $\bar{X} \pm SE$ در سه تکرار نشان داده شده است. میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شده و $P < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.



شکل ۳: مقایسه رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ گیاه نعنا در نمونه‌های شاهد و تیمار خشک.

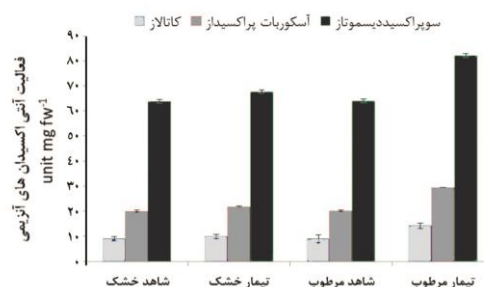
نتایج به صورت $\bar{X} \pm SE$ در سه تکرار نشان داده شده است. میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شده و $P < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

مطابق نتایج ثبت شده، امواج الکترومغناطیس در شدت و زمان مورد استفاده، سبب افزایش ۸۵ درصدی محتوای فنلی و افزایش ۵۲/۷۲ درصد محتوای

(۲۰۱۱)، گیاهان با تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موثر، به شیوه‌های مختلف در مقابل عوامل تنش‌زا مقاومت می‌کنند. از مهم‌ترین راهکارهای دفاعی گیاهان برای کنترل یا خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، القای سنتز برخی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است. امواج الکترومغناطیس از عوامل تنش‌زایی هستند که می‌توانند سبب تغییر در محتوای شیمیایی و برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاه مرزه بختیاری شوند (Ramezani vishki et al., 2012). بررسی‌ها، نشان داده است بسیاری از فرایندهای متابولیکی در گیاهان، باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یا رادیکال‌های آزاد می‌شوند، اما سازوکارهای کارآمدی مثل مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی برای از بین بردن آنها وجود دارد (Blokina et al., 2003). در شرایط معمول و غیرتنش، بین میزان تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر و ظرفیت پاکسازی این ترکیبات توسط دفاع آنتی‌اکسیدانی، تعادل وجود دارد. اما در شرایط تنش، میزان تولید رادیکال‌های آزاد از ظرفیت جاروب کردن آنها توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌شود. بنابراین برای مقابله، تغییر ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ضروری به نظر می‌رسد (Smirnoff, 1995).

در این پژوهش، کاهش محتوای کلروفیل a، b و افزایش محتوای کاروتنوئیدی در گیاهان تحت تیمار نسبت به شاهد دیده شد. به نظر Jansen و همکاران (۱۹۹۸)، کاهش کلروفیل ممکن است به دلیل مهار ژن تولیدکننده آن و یا تجزیه پیش‌سازهای کلروفیل تحت تنش امواج الکترومغناطیس صورت گرفته باشد. Caldwell و همکاران (۱۹۸۳) نیز دلیل کاهش رنگیزه‌های کلروفیلی را تخریب کلروفیل و یا تاثیر منفی اشعه بر پیش‌سازهای سنتز کلروفیل گزارش نموده‌اند. غشای فتوسنتز کننده می‌تواند به راحتی از طریق جذب مقادیر زیاد انرژی به وسیله رنگدانه‌ها، آسیب ببیند. اگر این انرژی نتواند به صورت

همانگونه که در شکل ۶ نشان داده شده است، امواج الکترومغناطیس در گیاهان تحت تیمار، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. این افزایش در تیمار مرطوب نسبت به شاهد، برای آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز به ترتیب ۵۹، ۴۴/۳۱ و ۲۸/۳۱ درصد به دست آمد که معنی‌دار بود. همین مقایسه در تیمار خشک نسبت به شاهد انجام شد و افزایش ۱۰/۴۹ درصدی برای کاتالاز، ۸/۸۵ درصدی برای آسکوربات پراکسیداز و ۶/۱۴ درصدی برای سوپر اکسید دیسموتاز به دست آمد، اما اختلاف معنی‌دار نبود.



شکل ۶: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در برگ گیاه نعنا در نمونه‌های شاهد و تیمار. نتایج به صورت $\bar{X} \pm SE$ در سه تکرار نشان داده شده است. میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شده و $P < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

بحث

گیاهان تنش‌ها را شناسایی و به آن پاسخ می‌دهند. تنش‌هایی چون امواج الکترومغناطیس سبب تحریک تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و تغییر در محتوای شیمیایی گیاه می‌شوند. افزایش میزان این ترکیبات، نشان از فعالیت سلول‌های گیاهی در جهت خنثی‌سازی یا تعدیل اثرات ناشی از تنش به شیوه‌های مختلف دارد که پیامد آن افزایش مقاومت و بردباری گیاه در برابر تنش است. گیاهان نیز همچون سایر موجودات به تنش‌ها پاسخ می‌دهند. مطابق نظر Hosseini و همکاران

واکوئل سلول‌های لایه اپیدرمی برگ و ساقه، جذب امواج و ممانعت از رسیدن امواج به اندامک‌های حساس هدف از جمله کلروپلاست‌ها را در پی داشته و از اثرات تنش اکسیداتیو می‌کاهد (Flint et al., 1985). به گزارش Sakihama و همکاران (۲۰۰۲)، تجمع مقادیر زیاد ترکیبات فنولی در سلول‌های لایه اپیدرمی و دیواره آن و نیز در کرک‌ها و واکوئل سلول‌های اپیدرمی، از آسیب سلول‌های مزوفیلی زیرین جلوگیری کرده و جهت تثبیت کربن فتوسنتزی و ارتقاء مکانیسم‌های دفاعی به‌کار می‌رود. Sakihama و همکاران (۲۰۰۲)، با استفاده از موتان‌هایی که توان ساخت ترکیبات فنلی را نداشتند، اهمیت این ترکیبات را در مقاومت گیاه برنج نسبت به تابش امواج الکترومغناطیس نشان دادند. پرولین نیز به‌عنوان یک ترکیب دفاعی موثر، از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از تنش امواج محافظت کرده و در گیاهان تحت تنش به‌عنوان یک پاسخ دفاعی یا انطباقی افزایش می‌یابد (Maggio et al., 2002). پرولین در حفظ تعادل آب، حفظ ثبات پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و ساختار سه بعدی آنها، تثبیت و پایداری غشای سلول نقش دارد و منبع ذخیره کربن و نیتروژن برای رشد بعد از رفع تنش می‌باشد. این ترکیب سبب کاهش خطرات حاصل از تولید ROS، جاروب کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، تنظیم pH سلولی و تنظیم $NADP^+/NADPH$ می‌گردد. پرولین با پیوستن به فسفولیپیدهای غشایی و تغییر در لایه هیدراته اطراف ملکول‌های زیستی، در حفظ و ثبات غشاها نقش دارد. این ترکیب با پاکسازی یا کاهش تولید رادیکال آزاد در کاهش آسیب به غشای تیلاکوئیدها نیز موثر است (Verbruggen and Hermans., 2008). پرولین به‌عنوان منبع ذخیره کربن و نیتروژن با افزایش بردباری و مقاومت گیاه در برابر تنش، نقش مهمی در ایجاد پاسخ‌های سازگارکننده و محافظتی در گیاهان ایفا می‌کند (Siripornadulsil et al., 2002). بررسی‌ها

فتوشیمیایی ذخیره شود، در این صورت به یک مکانیسم حفاظتی نیاز است. مکانیسم حفاظتی می‌تواند به عنوان یک سوپاپ اطمینان در نظر گرفته شود و انرژی اضافی را خارج کند. اگر این وضعیت برانگیخته کلروفیل به سرعت فروکش نشود، در آن صورت واکنشی با اکسیژن ملکولی اتفاق می‌افتد که منجر به تشکیل حالت برانگیخته اکسیژن یعنی اکسیژن یکتایی می‌شود (Iiao, 1997). کاروتنوئیدها در کلروپلاست‌ها سبب حفاظت از این اندامک از اثرات مخرب امواج می‌شود. این ترکیبات قادر هستند با دریافت انرژی زیاد طول موج‌های کوتاه، اکسیژن واکنش‌گر تولید شده طی تنش را غیرفعال و نقش آنتی‌اکسیدانی ایفا کنند. کاروتنوئیدها از طریق فروکش کردن سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل، از آن محافظت می‌کنند. وضعیت برانگیخته کاروتنوئیدها فاقد انرژی لازم برای تشکیل اکسیژن یکتایی است و ضمن از دست دادن انرژی به صورت گرما، به حالت اولیه بر می‌گردد (Yao et al., 2006). افزایش آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از جمله فنل، فلاونوئید و پرولین از سازوکار دفاعی دیگری است که در گیاهان تحت تنش امواج الکترومغناطیس، (مشابه آنچه در بررسی‌های ما به‌دست آمد) صورت می‌گیرد. مطابق نظر Caldwell و همکاران (۱۹۸۳)، امواج الکترومغناطیس باعث تحریک سنتز سینامیک اسید و القاء مسیر فنیل پروپانوید شده و با این شیوه گیاهان عالی، مقاومت آنتی‌اکسیدانی موثری را در مقابله با تنش ایجاد می‌کنند. به نظر می‌آید محدودیت در انتقال الکترون فتوسنتزی طی تنش، یکی از دلایل القاء سنتز فلاونوئیدها باشد. مهار مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و یا استفاده از بازدارنده‌های سنتز فنیل آلانین آمونیلایز، باعث افزایش حساسیت گیاه نسبت به امواج می‌شود. مطابق نظر Tevini و همکاران (۱۹۹۱)، فلاونوئیدها از ترکیبات مهم آنتی‌اکسیدانی هستند که ضمن خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، از تولید بیشتر آن نیز جلوگیری می‌کنند. تولید و تجمع فلاونوئیدها در

می‌گیرد (Jonsen et al., 1998). آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تحت تنش، در سیتوزول، واکوئل، کلروپلاست و آپوپلاست افزایش یافته و نقش چشمگیری در تعدیل میزان رادیکال‌های آزاد تولید شده در سلول دارند (Gao and Zhang, 2008). آسکوربات در این ترکیب به‌عنوان دهنده الکترون و عامل احیاکننده عمل می‌کند و نقش مهمی در سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن به عهده دارد (Gill and Tuteja, 2010).

نتیجه‌گیری نهایی

پرایمینگ بذرهای نعنا امکان جوانه‌زنی آنها را فراهم کرد و اثر دهی امواج الکترومغناطیس باعث تسریع فرآیند جوانه‌زنی آن شد. در گیاه نعنا در پاسخ به اثر امواج الکترومغناطیس با شدت کم، میزان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی افزایش یافت.

منابع

- آل‌اطهار، م. موسوی‌نیک، م. و یوسفی، خ. (۱۳۸۹). اثر پرایمینگ بذر بر خصوصیات جوانه‌زنی و ترکیبات بیوشیمیایی نعنا. دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان). پنجمین همایش ملی ایده‌های نو در کشاورزی.
- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S. (2002).** Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 372(9): 1331-1341.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004).** Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55(5): 373-399.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, L.D. (1973).** Rapid determination of free proline content for water stress studies. *Plant and Soil*. 39(3): 205-207.
- Blokina, O., Virolainen, E. and Fagersted, K. (2003).** Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annals of Botany*. 91(4): 179-194.

بیانگر ارتباط مستقیم بین تجمع پرولین در گیاهان عالی و افزایش ROS، می‌باشد. این افزایش ممکن است به علت تحریک ساخت پرولین از گلوتامیک اسید باشد (Hare and Cress, 1997). افزایش فعالیت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو مطابق آنچه در این پژوهش دیده شد، راهکار دفاعی دیگری است که در گیاهان تحت تنش امواج الکترومغناطیس صورت می‌گیرد. مطابق نظر Alscher و همکاران (۲۰۰۲)، گروه پروستتیک این آنزیم‌های هموپروتئینی، در نابودی رادیکال‌های آزاد در گیاه نقش مهمی دارند. سوپراکسید به‌عنوان یکی از گونه‌های اصلی اکسیژن واکنش‌گر و ترکیبی سمی در سلول سبب تغییر ماهیت آنزیم‌ها، اکسیداسیون لیپیدها و تلاشی DNA می‌شود. سوپر اکسید دیسموتاز یک آنزیم فلزی (متالوآنزیم) است که یون سوپراکسید را به هیدروژن پراکسید و اکسیژن ملکولی تجزیه و باعث کاهش اثرات مخرب این ترکیب در سلول می‌شود. این آنزیم به‌عنوان یک خط دفاع آنتی‌اکسیدانی علیه رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند، اما خود باعث تشکیل هیدروژن پراکسید به‌عنوان یک ترکیب سمی دیگر می‌شود (Alscher et al., 2002). هیدروژن پراکسید تولید شده تحت عمل سوپراکسید دیسموتاز و نیز بسیاری از مکانیسم‌های طبیعی سلول، توسط آنزیم‌هایی چون کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، خنثی و بی‌اثر می‌شود. کاتالاز با اثر مستقیم بر این ترکیب، از آن به‌عنوان سوپراکسید استفاده و با تجزیه آن به آب و اکسیژن ملکولی، اثرات مخرب آن را مهار می‌کند (Hare and Cress, 1997). پراکسیدازها نیز گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که معمولاً واکنش اکسیداسیون احیاء را بین پراکسید هیدروژن به‌عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوپراکسید مثل ترکیبات فنلی، اسیداسکوربیک، آمین‌های آروماتیک و سیتوکروم C کاتالیز می‌کنند. با افزایش سطح فعالیت این آنزیم، گیاه کمتر مورد تهاجم رادیکال‌های آزاد قرار

- Caldwell, M.M., Robberecht, R. and Flint, S.D. (1983).** Internal filters: prospects for UV acclimation in higher plants. *Physiologia Plantarum*. 58(8): 445-450.
- Change, C., Yang, M., Wen H. and Chern, J. (2002).** Stimulation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10(1): 178-182.
- Dhindsa, R.S. and Motowe, W. (1981).** Drought tolerance in two mosses: Correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*. 32(4): 79-91
- Flint, S.D., Jordan, P.W. and Caldwell, M.M. (1985).** Plant protective responses to enhanced UV- B radiation under field condition: Leaf optical properties and photosynthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 41(4): 95-99.
- Gao, Q. and Zhang, L. (2008).** Ultraviolet-B-Induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*. 22(4): 138-148.
- Giannopolitis, C. and Ries, S.K. (1977).** Superoxid dismutase. Occurrence in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. 59(2): 309-314.
- Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 132(3): 909-930.
- Hare, P.D. and Cress, W.A. (1997).** Metabolic implications of stress-induced accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*. 21(2): 79-103.
- Hosseini sarghein, S., Carapetian, J. and Khara, J. (2011).** The effects of UV radiation on some structural and ultra structural parameters in pepper (*Capsicum longom*) *Journal of Turkish Studies*. 35(8): 69-77.
- Hao, B.A. (1997).** The effects of ultraviolet-B radiation and CO₂ on growth and photosynthesis of Tomato. *Canadian Journal of Botany*. 75(2): 213-219.
- Jansen, M., gaba, V. and Greenberg, B.M. (1998).** Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and accumulation. *Trends in Plants Science*. 3(1): 131-135.
- Lichtenthaler, H.K. (1987).** Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method of enzymology*. 148 (4): 350-382.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981).** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 22(1): 867-880.
- Maggio, A., Miyazaki, S. and Veronese, P. (2002).** Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal*. 31(5): 699-712.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. and Robards, K. (2001).** Phenolic content and antioxidant activity of olive extract *Food Chemistry*. 73(9): 73-84.
- Mittler, R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7(1): 405-410.
- Ramezani vishki, F., Majd A., Nejadstattari T. and Arbabian, S. (2012).** Effects of electromagnetic field radiation on inducing physiological and biochemical changes in *Satureja bachtiarica* L. *Iranian Journal of Plant Physiology*. 2(4): 509-516.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F. Grace, S.C. and Yamasaki, H. (2002).** Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolic induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 177(9): 67-80.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., ZH, L.U. and Kang, C.M. (2008).** Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathway in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*. 4(1): 8-14.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P. and Sayre, R.T. (2002).** Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell*. 14(7): 2837-2847.
- Smirnoff, N. (1995).** Antioxidant systems and plant response to the environment; in *Environment and Plant Metabolism*. BioScientific Publishers, Oxford, United Kingdom. 111(2): 217-243.
- Tevini, M., Braun, J. and Fieser, G. (1991).** The productive function of the epidermal layer of rye seedling against ultraviolet-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 53(6): 329-333.
- Verbruggen, N., Hermans, C. (2008).** Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*. 35(2): 753-759.
- Yao, Y., Xuana, Z. and Li, Y. (2006).** Effect of Ultraviolet-B radiation on crop growth, development, yield and leaf pigment concentration of tartary buck wheat (*Fagopyrum tataricum*) under field conditions. *European journal of agronomy*. 25(7): 215-222.