تأثیر تنش شوری بر فعالیت آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و محتوای اسانس مرزنجوش بخارایی (*Origanum vulgare* L. ssp. *gracile*)

زهرا عظیم‌زاده[۱]، عباس حسنی*[۲]، بابک عبدالهی مندولکانی[۳]، ابراهیم سپهر[۴]

[۱و۲] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۳] گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۴] گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

*نویسنده مسئول: a.hassani@urmia.ac.ir

چکیده

شوری آب و خاک، بخصوص در مناطق خشک و نیمه خشک جهان باعث شده مدیریت تولید محصولات کشاورزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای مرزنجوش بدلیل داشتن ترکیبات فنولی، استفاده از این گیاه در صنایع داروسازی، غذایی و آرایشی- بهداشتی مورد توجه قرار گرفته است. بدین منظور تحقیقی با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف شوری بر فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و هم‌چنین محتوای اسانس گیاه مرزنجوش بخارایی در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل تنش شوری ناشی از کلرور سدیم در چهار سطح (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بودند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت شوری مقدار فنول کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ‌ها افزایش یافتند. در حالی‌که با افزایش سطح شوری تا ۵۰ میلی‌مولار مقدار فلاونوئید کل افزایش و در پاسخ به تنش شدید (۱۰۰ میلی‌مولار) کاهش نشان داد. هم‌چنین پایین‌ترین سطح تنش (۲۵ میلی‌مولار) منجر به افزایش محتوای اسانس و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که گیاه مرزنجوش در پاسخ به اثرات تنش اکسیداتیو ناشی از شوری، مکانیسم افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به خدمت می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، تنش شوری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، مرزنجوش

مقدمه

تغییرات اقلیمی جهان از یک سو و توسعه روزافزون زمین‌های شور و خشک شدن اراضی مورد استفاده برای کشاورزی از سوی دیگر باعث شده شوری به یک مسئله مهم در جهان تبدیل شود. شوری با کاهش پتانسیل اسمزی خاک و سمیت یونی ناشی از تجمع غلظت‌های بالایی از املاح نظیر سدیم و کلر باعث برهم زدن فرآیندهای فیزیولوژیکی، کاهش رشد و در نتیجه پیری گیاه می‌شود. در شرایط تنش شوری، به‌واسطه بسته شدن روزنه‌ها، میزان جذب دی اکسیدکربن توسط گیاه و در نتیجه استفاده از NADPH از طریق چرخه کالوین کاهش می‌یابد که این شرایط به نفع گیرنده الکترون یعنی اکسیژن مولکولی است که منجر به تجمع اشکال واکنش‌گر اکسیژن (ROS) می‌شود (Suo *et al*., 2017). تولید بیش از حد ROS با حمله به چندین مولکول زیستی مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و چربی غشاء در عملکرد سلول‌ها اختلال ایجاد می‌کند (Foyer and Noctor, 2005). گیاهان برای مقابله با پیامدهای نامطلوب ROS، سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز) و غیرآنزیمی (آسکوربات، کاروتنوئیدها، آلفا-توکوفرول، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و غیره) را بکار می‌گیرند که این آنتی‌اکسیدان‌ها در خنثی‌سازی اثرات سمی ROS نقش مهمی دارند (Gill and Tuteja, 2010). همچنین طی گزارش‌های زیادی ثابت شده است که وقتی گیاهان دارویی در شرایط نامطلوب رشدی، مانند تنش شوری قرار می‌گیرند تولید متابولیت‌های ثانویه آن‌ها از قبیل محتوی و ترکیبات اسانس، رفتارهای متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. شواهد زیادی مبنی بر افزایش این مواد تحت شرایط تنش‌های محیطی وجود دارد اما این تأثیر همیشگی نیست و در مواردی نیز کاهش میزان متابولیت‌های ثانویه تحت شرایط تنش‌های محیطی دیده می‌شود. در مطالعه Taarit و همکاران (۲۰۱۰) روی مریم‌گلی (*Salvia officinalis*)

کاهش در محتوای اسانس و در مطالعه Farsaraei و همکاران (۲۰۲۰) روی ریحان (*Ocimum basilicum*) افزایش در محتوای اسانس، با افزایش شوری گزارش شده است. با توجه به اهمیت گیاهان دارویی و استفاده‌ی وسیع از آنها در صنایع داروسازی، آرایشی–بهداشتی و غذایی، امروزه پژوهش‌های بسیاری از محققین در ارتباط با جنبه‌های مختلف کاربرد گیاهان دارویی و جایگزینی کشت آن‌ها با بسیاری از محصولات کشاورزی معطوف شده است. مرزنجوش (*Origanum*) یک گیاه چندساله، علفی و متعلق به تیره نعناع می‌باشد که شامل ۳۹ گونه در مناطق مختلف مدیترانه، اروپا–سیبری و ایرانو–تورانی است (Aligiannis *et al*., 2001). *O. vulgare* L. یکی از گونه‌های مهم جنس مرزنجوش است که در ایران سه زیرگونه از آن به نام‌های *viride*، *vulgare* و *gracile* شناسایی شده است که در شمال، شمال غربی و غرب پراکنش دارند (Moradi *et al*., 2021). مرزنجوش حاوی ترکیبات فعال بیولوژیکی از جمله گلیکوزیدهای فنلی، فلاونوئیدها، تانن‌ها، رزین‌ها، استرول‌ها و ترپنوئیدها است که مهمترین خاصیت بیولوژیکی این گیاه مربوط به اسانس آن می‌باشد. یافته‌های اخیر نشان داده که اسانس مرزنجوش دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و ضدباکتری است و به‌همین خاطر مورد توجه صنایع غذایی، آرایشی–بهداشتی و داروسازی قرار گرفته است (Charles, 2013). بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر تنش شوری بر فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و محتوای اسانس مرزنجوش بخارایی (*Origanum vulgare* L. ssp. *gracile*) انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت یک آزمایش گلدانی در طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۸ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گرفت. بذور گیاه مرزنجوش در گلدان‌های پلاستیکی کاشته شده و پس از جوانه‌زنی و سبزشدن، بوته‌ها در طی چند مرحله تنک گردیده و در نهایت در داخل هر گلدان هفت بوته نگهداری شد. گیاهان در گلخانه‌ای با رطوبت نسبی ۶۰–۵۰ درصد، دمای حداکثر و حداقل ۲±۲۸ و ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط نور طبیعی پرورش داده شدند. تیمارهای آزمایشی شامل تنش شوری ناشی از کلرور سدیم در چهار سطح (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بودند که از طریق آبیاری با آب شور و از مرحله هشت برگی شدن شروع شده و تا مرحله گلدهی اعمال گردیدند.

در شروع مرحله گلدهی نمونه‌های برگی تهیه شده و محتوای فنل کل به روش فولین سیوکالتیو (Singleton *et al*., 1999)، فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی (Chang *et al*., 2002) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوسیله درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و با روش Burits و Bucar (۲۰۰۰) اندازه‌گیری گردید. عصاره‌گیری جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) به روش Sudhakar (۲۰۰۱) با اندکی تغییرات انجام گرفت. پس از تهیه عصاره، فعالیت آنزیم SOD به روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱)، فعالیت آنزیم CAT به روش Aebi (۱۹۸۴) و فعالیت آنزیم APX به روش Nakano و Asada (۱۹۸۷) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. جهت استخراج و اندازه‌گیری محتوای اسانس، گیاهان در مرحله گلدهی کامل برداشت شده و در دمای اتاق و در شرایط سایه خشک گردیدند و سپس به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر، عمل استخراج اسانس انجام شد. محتوای اسانس برحسب میلی‌لیتر در ۱۰۰ گرم ماده خشک محاسبه و گزارش گردید. داده‌های بدست آمده از این آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

طبق نتایج تجزیه واریانس، سطوح مختلف شوری تأثیر معنی‌داری بر محتوای فنل، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و درصد اسانس داشتند. مقایسه میانگین‌ها (جدول ۱) نشان داد که محتوای فنل کل با افزایش شدت تنش شوری افزایش یافت. بیشترین مقدار فنل کل (۴/۳۷ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر) در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری مشاهده شد و کمترین مقدار آن (۳/۵۱ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر) در گیاهان شاهد بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۲۵ میلی‌مولار شوری نداشت. هم‌چنین مقدار فلانوئید کل با افزایش غلظت کلرور سدیم تا ۵۰ میلی‌مولار افزایش و در پاسخ

به تنش شدید (۱۰۰ میلی‌مولار شوری) کاهش نشان داد. بیشترین (۵۸/۵۷ درصد) و کمترین (۴۲/۴۴ درصد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ به روش مهار رادیکال DPPH به ترتیب در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری و گیاهان بدون تنش مشاهده شد (جدول ۱). بر اساس نتایج بدست آمده، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش شدت تنش شوری افزایش یافت ولی روند فعالیت سوپراکسید دیسموتاز متفاوت از دو آنزیم قبلی بود. بطوریکه بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به ترتیب در تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولار و گیاهان بدون تنش مشاهده گردید در حالیکه بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تیمار تنش ملایم (۲۵ میلی‌مولار) بدست آمد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که سطح شوری پایین (۲۵ میلی‌مولار) باعث افزایش محتوای اسانس نسبت به گیاهان بدون تنش گردید. در حالی‌که در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار محتوای اسانس نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های مربوط به تاثیر تنش شوری بر صفات مورد مطالعه مرزنجوش بخارایی.

صفات / تیمار شوری	فنل کل (میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن تر)	فلاونوئید کل (میلی گرم کوئرستین در گرم وزن تر)	فعالیت آنتی اکسیدانی کل (٪)	سوپراکسید دیسموتاز (واحد در گرم وزن تر)	کاتالاز (واحد در گرم وزن تر)	آسکوربات پراکسیداز (واحد در گرم وزن تر)	درصد اسانس
شاهد	۳/۵۱ b	۰/۲۲ c	۴۲/۴۴ d	۳۶/۰۳ d	۲/۷ c	۶/۹۱ c	۱/۶۷ b
۲۵ میلی‌مولار	۳/۷ b	۰/۲۶ ab	۵۱/۸ c	۶۲/۷۷ a	۵/۷۹ b	۷/۶۶ c	۲/۰۰ a
۵۰ میلی‌مولار	۳/۸۶ ab	۰/۲۸ a	۵۴/۸۷ b	۴۰/۵۴ c	۶/۹۴ b	۱۰/۵۸ b	۱/۶۲ bc
۱۰۰ میلی‌مولار	۴/۳۷ a	۰/۲۴ bc	۵۸/۵۷ a	۵۴/۹۳ b	۱۰/۲۳ a	۱۲/۸۲ a	۱/۳۶ c

حروف متفاوت در مقابل میانگین‌ها در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد (آزمون دانکن).

در این مطالعه مقدار فنل کل با افزایش شوری افزایش نشان داد. بنابراین افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ مرزنجوش را می‌توان به افزایش ترکیبات فنلی تحت شرایط شوری نسبت داد. ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول‌های گیاهان هستند که نقش مهمی در دفاع از تنش داشته و توانایی حذف رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را دارند (Chu *et al*., 2010). به طور کلی، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان به عنوان یک استراتژی سازگاری برای غلبه بر تنش اکسیداتیو ناشی از شرایط خشکی و شوری در نظر گرفت (Najjaa *et al*., 2018). در پژوهش حاضر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز که نقش جاروب کنندگی پراکسید هیدروژن را دارند با افزایش سطح شوری افزایش یافت تا از این طریق ترکیبات مضر گیاه را از بین برده و مقاومت گیاه به شوری را افزایش دهند. در هنگام تنش شوری به دلیل بسته شدن روزنه‌ها، کاهش تثبیت دی‌اکسید کربن و در پی آن کاهش رشد گیاه و همچنین افزایش تنفس گیاه، گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر از جمله سوپراکسید افزایش یافته و آنزیم‌هایی از جمله سوپراکسید دیسموتاز باعث تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن می‌شوند و سپس آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز قادرند پراکسید هیدروژن تولیدی را در اندامک‌ها و سیتوزل به آب و اکسیژن تبدیل کنند و اثرات مخرب آنها را کاهش دهند (Caverzan *et al*., 2016). طبق نتایج این تحقیق، با افزایش سطح شوری تا حد ۲۵ میلی‌مولار درصد اسانس افـزایش و سـپس کاهش یافت. Ozturk و همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش نمودند که کاهش محتوای اسانس در سطوح متوسط تا شدید شوری می‌تواند ناشی از کاهش سطح فتوسنتز کننده و مصرف بیش از حد انرژی برای برقراری تعادل یونی و اسمزی به‌منظور جلوگیری از سمیت یونی و تأمین آماس سلولی در شرایط شوری باشد که درنهایت به کاهش تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله اسانس می‌انجامد. از سوی دیگر افزایش محتوی اسانس در سطوح شوری ملایم ممکن است ناشی از افزایش تراکم غده‌های حاوی اسانس در برگ‌ها باشد (Heidari, 2012). به طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و فعالیت آنتی‌اکسیدانی تا حدی در سازگاری به تنش شوری در گیاه مرزنجوش نقش داشته و بنابراین می‌توانند از گیاه در برابر شرایط شوری حفاظت کنند.

منابع

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105: 121-126.

Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. and Chinou, I.B. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(9): 4168-4170.

Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44: 276-287.

Burits, M. and Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotheraphy Research, 14: 323-328.

Caverzan, A., Casassola, A. and Brammer, S.P. 2016. Antioxidant responses of wheat plants under stress. Genetics and Molecular Biology, 39(1): 1-6.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3): 178-182.

Charles, D.J. 2013. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer Science & Business Media, pp. 449-458.

Chu, J., Yao, X. and Zhang, Z. 2010. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. Biological Trace Element Research, 136(3): 355-363.

Farsaraei, S., Moghaddam, M. and Pirbalouti, A.G., 2020. Changes in growth and essential oil composition of sweet basil in response of salinity stress and superabsorbents application. Scientia Horticulturae, 271: 109465.

Foyer, C.H. and Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. The Plant Cell, 17(7): 1866-1875.

Gill, S.S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.

Heidari, M., 2012. Effects of salinity stress on growth, chlorophyll content and osmotic components of two basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes. African Journal of Biotechnology, 11(2): 379-384.

Moradi, M., Hassani, A., Sefidkon, F. and Maroofi, H., 2021. Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *gracile* as affected by different harvesting times. Journal of Agricultural Science and Technology, 23(1): 179-186.

Najjaa, H., Boubakri, A., Arfa, A.B., Zouari, N. and Neffati, M. 2018. Salinity and drought stresses improve antioxidant potential of *Allium roseum* L., an edible medicinal plant. Acta Physiologiae Plantarum, 40(11): 1-7.

Nakano, Y. and Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant and Cell Physiology, 28(1): 131–140.

Ozturk, A., Unlukara, A., Ipek, A. and Gurbuz, B. 2004. Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Pakistan Journal of Botany, 36(4): 787-792.

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299: 152-178.

Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science, 161(3): 613-619.

Suo, J., Zhao, Q., David, L., Chen, S. and Dai, S. 2017. Salinity response in chloroplasts: insights from gene characterization. International Journal of Molecular Sciences, 18(5): 1011.

Taarit, M.B., Msaada, K., Hosni, K. and Marzouk, B. 2010. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. Food Chemistry, 119(3): 951-956.

Effect of salinity stress on the activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants and the essential oil content of oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *gracile*)

Zahra Azimzadeh[1], Abbas Hassani*[2], Babak Abdollahi Mandoulakani[3] and Ebrahim Sepehr[4]
[1]Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[2]Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[3]Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[4]Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
*Corresponding Author: a.hassani@urmia.ac.ir

Abstract

Soil and water salinity, especially in arid and semi-arid regions of the world, has made the management of crop production very important. Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *gracile*) has high antioxidant properties due to its biologically active compounds such as phenols that are used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. The aim of this study was to investigate the effect of salinity stress on the activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants as well as the essential oil content of oregano in a completely randomized design with three replications. The experimental treatments included salinity stress induced by sodium chloride at four levels (0, 25, 50 and 100 mM). The results revealed that total phenol content, antioxidant activity, catalase and ascorbate peroxidase activity of leaves enhanced by increasing salinity, whereas total flavonoids content increased up to 50 mM and decreased in response to severe stress (100 mM NaCl). Furthermore, the lowest level of salt stress (25 mM) increased the essential oil content and superoxide dismutase activity. The results of this study showed that oregano uses a mechanism to increase antioxidant activity in response to the effects of oxidative stress caused by salinity.
***Keywords*:** Antioxidant activity, Essential oil, Oregano, Salinity stress, Total phenol.