بررسی فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و میزان سدیم، پتاسیم و محتوای رنگدانه در گیاه هالوفیت اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) نسبت به تنش کلریدسدیم

زهرا محسنی تنکابنی[۱]، فاطمه مرادیان[۲]* و پروانه راهداری[۱]

[۱] ایران، تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه زیست شناسی

[۲] ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه علوم پایه

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

چکیده

شوری یکی از مهمترین تنش‌های غیر زنده ای است که با تولیدگونه‌های فعال اکسیژن(ROS) بر روی تولید و کیفیت محصول گیاهان تاثیر می گذارد. گیاهان از سیستم‌های آنتی اکسیدانی چون آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز برای مقابله با انواع مختلف این رادیکال‌ها استفاده می‌کنند. همچنین تنش شوری، میزان کلروفیل را تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث به هم زدن هموستازی یونهای سدیم، پتاسیم، کلر و کلسیم می شود. هدف: به همین منظور این پارامترها در گیاه اسفناج در مقاومت به تنش شوری مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه، تنش شوری در چهار سطح ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و۶۰۰ میلی مولار کلرید سدیم در بازه زمانی ۱۴ روز بعد از اعمال تنش و به فاصله متناوب ۷۲ ساعت در آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز مطابق روش استاندارد اندازه‌گیری شد. همچنین میزان یون‌های سدیم، پتاسیم و محتوای کلروفیل و کاروتنوئید اندازه‌گیری شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز معنی دار بودند. نتایج نشان داد که با افزایش سطوح شوری میزان یون سدیم و یون پتاسیم در برگ نسبت به شاهد به ترتیب افزایش و کاهش معنی داری داشته است. غلظت رنگدانه‌های کلروفیل و کارتنوئید با افزایش سطح شوری کاهش یافت.

واژه های کلیدی: اسفناج، پراکسیداز، تنش شوری، انواع اکسیژن فعال

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۳۶۸۷۶۵۵-۰۱۱، پست الکترونیکی: f.moradian@sanru.ac.ir

مقدمه

تنش‌های محیطی غیر زیستی از جمله خشکی و شوری از تنش‌های شاخص گیاهی هستند که تاثیر مهمی در تکامل و تکثیر گیاهان دارند بنابراین به طور جدی سبب از بین رفتن محصولات کشاورزی می‌شوند (۱). در میان موارد ذکر شده، شوری مهمترین تهدید کننده کشاورزی در جهان به شمار می‌رود (۳۲). در هنگام تنش‌های محیطی یک‌سری تغییرات شیمیایی و بیوشیمیایی در گیاه صورت می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به شکسته شدن زنجیرهٔ انتقال الکترون و تولید اکسیژن فعال همانند O_2^-، H_2O_2 و $OH^{\cdot}$ اشاره کرد (۱۶). فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS=Reactive oxygen species) ممکن است سبب بروز صدماتی همچون اکسید شدن لیپیدهاکه منجر به تغییر ساختار غشاء شده و در نتیجه یکپارچگی غشاء از بین می‌رود، تغییر ساختمان پروتئین‌ها و اکسید شدن گروه‌های سولفیدریل

(SH)، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، بی‌رنگ شدن و یا از بین رفتن رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و سایر ترکیبات رنگیزه‌ای و هم چنین حمله مداوم به مولکول‌های آلی مثل DNA و در نتیجه اختلال در رشته های DNA گردد(۱۹،۲۱،۲۸).

همچنین واکنش رادیکال‌های آزاد و نیمه آزاد اکسیژن می توانند در پیری مؤثر باشد (۳). مکانیسم‌های دفع سمیت انواع اکسیژن فعال که بیشتر در کلروپلاست، میتوکندری و میکروبادی‌ها به‌وجود می‌آیند، توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات‌پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) و گلوتاتیون S-ترانسفراز انجام می‌گیرد(۴،۵).

در هنگام تنش، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل آسکوربات پراکسیداز، دهیدروآسکوربات رودکتاز، گلوتاتیون رودکتاز و سوپراکسیددیسموتاز در برگ افزایش می‌یابند. البته میزان ساخته شدن این مواد به شدت و مدت تنش بستگی دارد. همچنین گونه و مرحلهٔ رشد و نمو گیاه نیز در میزان تنش و در نهایت ساخته شدن این مواد مؤثرند (۸). آنزیم گایاکول پراکسیداز در سیتوسول فعالیت داشته و از گلوتاتیون به عنوان کوفاکتور خود استفاده می‌کند (۱۱). این آنزیم پراکسید هیدروژن را تجزیه و به آب تبدیل می‌کند. افزایش فعالیت این آنزیم به همراه سایر مکانیسم‌های دفاعی در سیتوسول به حفظ پایداری در این بخش کمک شایانی می‌نماید (۲). آسکوربات پراکسیداز نقش حیاتی در مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابل تنش‌اکسیداتیو دارد. این آنزیم، پراکسید هیدروژن را در کلروپلاست، سیتوسول، میتوکندری و پراکسی‌زوم سلول‌های گیاهی از بین می‌برد(۴،۲۹). علاوه بر ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن، تنش شوری باعث بر هم خوردن تعادل یونی می‌شود. وجود مقدار زیادی NaCl، شایع ترین نوع تنش شوری می‌باشد که باعث به هم زدن هموستازی Naو Cl و همچنین K و Ca می شود. سلول‌های گیاهی برای حفظ واکنش‌های کتابولیکی نرمال خود به حفظ یون پتاسیم احتیاج دارند. همچنین تجمع یون سدیم در سیتوپلاسم سلول گیاه سمی است. یکی از مکانیسم‌های اجتناب از اثرات مضر تنش شوری دفع و کاهش یون سدیم از سیتوپلاسم سلول می‌باشد. از جمله تنش اکسیداتیو باعث کاهش میزان کلروفیل و سایر رنگدانه‌ها می شود. این کاهش باعث محدودیت فتوسنتز و رشد گیاه می‌گردد.

اسفناج (*Spinacia Oleracea L.*) که 2n=12 است یک سبزی برگی مهم است که برگ‌ها و ساقه ظریف آن به صورت تازه و یا فرآوری شده مصرف می‌شود. اسفناج به تیره اسفناجیان (Chenopodiaceae) تعلق دارد که برای تولید برگ یکساله و برای تولید دانه دو ساله است. گیاهان این جنس می توانند شوری (NaCl) را تا سطح ۵۰۰ mM تحمل کند و به‌عنوان دهنده ژن‌های متحمل به تنش شوری در برنامه‌های اصلاح سبزیجات مورد استفاده قرار گیرد(۱).

یکی از مهم‌ترین جنبه‌های مطالعاتی برای مقاوم‌سازی گیاهان نسبت به تنش شوری مطالعه و شناسایی فرآیندهای فیزیولوژیکی متأثر از تنش شوری می‌باشد. به این ترتیب بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که در خنثی‌سازی انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن درگیر می‌باشند، از اولویت-های مهم تحقیقاتی محسوب می‌شود. در اکثر مطالعات ارتباط مستقیمی میان فعالیت این آنزیم‌ها و مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی و بویژه تنش شوری مشاهده شده است. تاکنون مطالعه‌ای پیرامون واکنش آنتی‌اکسیدانی اسفناج نسبت به تنش شوری ارائه نگردیده است. به همین منظور فعالیت دو آنزیم آنتی‌اکسیدانی و میزان یون‌های سدیم و پتاسیم و محتوای کلروفیل و کارتنوئید درگیاه اسفناج در مقاومت به تنش شوری مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

آماده سازی خاک و کاشت گیاه: بذر اسفناج از بانک بذر مؤسسه تحقیقات کشاورزی ساری تهیه گردید. بذر اسفناج پس از آن که چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد به-مدت۲ ساعت برای انجام عمل خیساندن درون آب مقطر قرار داده شد. در ابتدا خاک پیت موس از گلخانه تهیه گردید و توسط دستگاه اتوکلاو استریل شد. پس از استریل خاک بذرهای اسفناج در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در گلدان کاشته شدند. سپس ۴۵ روز پس از کاشت (مرحله چهار برگی) به محیط کشت هوگلند انتقال داده شدند. چهارده روز بعد از انتقال به محیط کشت هوگلند، تنش شوری به صورت پاساژ دهی اعمال گردید، یعنی روزانه 100 mM از نمک NaCl به محیط رشد گیاهان اضافه شد. مطالعات آنزیمی بر روی گیاهان تحت تنش 0 mM، 200 mM، 400 mM و 600 mM NaCl و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

استخراج آنزیمی: جهت استخراج گایاکول پراکسیداز، ۰/۵ گرم از نمونه برگی با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموژن شده و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH=7.5) محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار اضافه گشت. هموژن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در ۱۵۰۰۰ ×g دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (Sigma 3-30K، امریکا) گردید. جهت پیشگیری از اثرات مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها روشناور حاصل، به سه قسمت تقسیم و تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های فوق در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز همانند استخراج گایاکول پراکسیداز عمل گردید. با این تفاوت که این آنزیم دوام کمی در محیط خارج از سلول دارد. به‌طوری‌که برخی از ایزوزیم‌های آن، نیمه‌عمر کمتر از ۲ دقیقه در محیط‌هایی با غلظت پائین آسکوربات دارند. به همین دلیل جهت حفظ ساختار و پایداری آن به محلول استخراج آنزیمی پلی‌وینیل‌پیرولیدین (۵ درصد) و آسکوربات۲ میلی‌مولار اضافه گشته و در سایر موارد استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز مشابه آنزیم‌های فوق می‌باشد (۲۹).

تعیین فعالیت آسکوربات پراکسیداز: کمپلکس واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر از آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. جذب واکنش آنزیمی در طول موج ۲۹۰ نانومتر در زمان شروع و پس از یک دقیقه از شروع واکنش قرائت گشت. واحد فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول آسکوربات اکسیدشده بر دقیقه ($unit = OD_{290}/min$) محاسبه شد (۳۶).

تعیین فعالیت گایاکول پراکسیداز: کمپلکس واکنشی(دو میلی لیتر) شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)،۲۵۰ میکرولیتر از EDTA۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. میزان جذب واکنش آنزیمی در طول موج ۴۷۰ نانومتر در زمان شروع واکنش و یک دقیقه پس از آن قرائت شد. واحد فعالیت آنزیمی براساس میزان تتراگایاکول تشکیل شده پس از زمان یک دقیقه ($unit= OD_{470}/min$) محاسبه شد (۳۱).

اندازه‌گیری میزان یون‌های سدیم و پتاسیم برگ‌ها: به منظور سنجش عناصر سدیم و پتاسیم ۲ گرم نمونه گیاه خشک شده توزین و در بوته چینی ریخته و در کوره تا ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت حرارت داده شد. خاکستر حاصل را با آب مقطر کمی خیس کرده و ۱۰ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۲ مولار اضافه و سپس محلول صاف شد. عصاره نهایی به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در پایان اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم به روش نشر شعله-

ای(فلیم فوتومتر) انجام شد. محلول حاصل از عصاره گیری را به نسبت ۱+۹ با کلرور سزیم رقیق کرده و جذب با دستگاه فلیم فوتومتر (شروود ۴۱۰، انگلستان) و در طول موج ۷۶۶/۵ نانومتر برای پتاسیم و ۵۸۹ نانومتر برای سدیم خوانده شد(۳۴).

اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ: ۱۴روز پس از اعمال تنش شوری از برگ اول هر بوته نمونه برگی تهیه و در فویل‌های آلومینیومی قرار گرفتند و بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شده و تا زمان اندازه‌گیری کلروفیل در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری شدند. هنگام اندازه‌گیری از هر نمونه برگی ۶ دیسک به قطر ۵ میلی‌متر برداشته و در ۸ میلی‌لیتر متانول غوطه‌ور شده در تاریکی و دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. لازم به ذکر است که به دلیل حساسیت کلروفیل به نور و تجزیه آن در شدت‌های نور بالا، در تمامی مراحل استخراج و اندازه‌گیری نمونه‌ها در شدت‌های ضعیف نور نگهداری شدند. سپس محتوی کلروفیل a، b و کاروتنوئید در طول موج‌های ۴۷۰، و ۶۵۲/۴ و ۶۶۵/۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Spekol 1300, Japan)، قرائت گردید. برای محاسبه میزان کلروفیل و کاروتنوئید از فرمول‌های: Chl a (µg/ml)= $15.28A_{665.2} - 9.16A_{652.4}$، Chl b (µg/ml)= $36.92A_{652.4} - 16.72A_{665.2}$ و $C_{(x+c)}(\mu g/ml) = (1000A_{470} - 1.63Chla - 104.96Chl\ b)/221$ استفاده شد. Chla برای کلروفیل آ ، Chl b برای کلروفیل بی، $C_{(x+c)}$ برای کارتنوئید تام و A دانسیته نوری می‌باشد (۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SASوMSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. برای رسم نمودارها و جداول از نرم‌افزار Excel استفاده شد. آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

نتایج

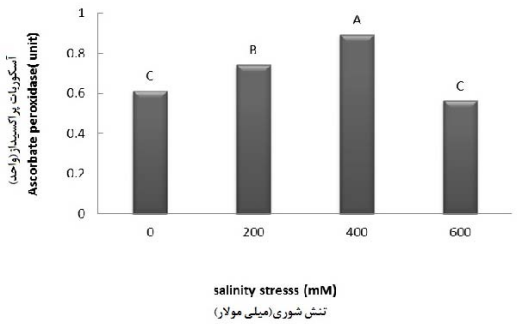
با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها با افزایش تنش شوری از میزان صفات مورفولوژیک کاسته شد. حداکثر وزن تر برگ در سطح 200 mM مشاهده شد و با افزایش سطح تنش از میزان وزن تر برگ کاسته شد. حداکثر وزن تر ریشه در سطح 400mM مشاهده شد و حداقل وزن تر ریشه در سطح 600 mM مشاهده شد. حداکثر وزن خشک برگ در سطح 200mM مشاهده شد و کمترین میزان آن نیز در سطح 400mM مشاهده گردید. بیشترین وزن خشک ریشه به سطح 200mM تعلق داشت و کمترین وزن خشک ریشه به سطح 600mM تعلق داشت(جدول۱).

جدول۱- مقایسه میانگین صفات مرفولوژیکی درگیاه هالوفیت اسفناج تحت تأثیر تیمار شوری

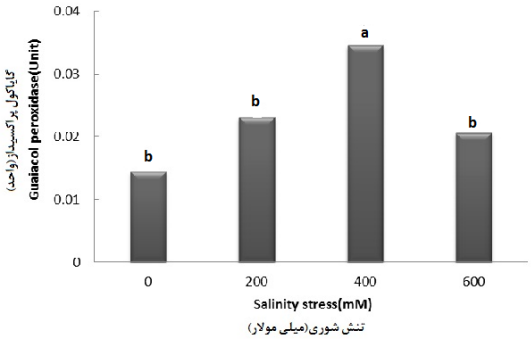
سطوح شوری(میلی مولار)	وزن تر برگ	وزن تر ریشه	وزن خشک برگ	وزن خشک ریشه
	میلی گرم در بوته			
۰	324.1^{b}	235.1^{c}	55.33^{b}	46.89^{a}
۲۰۰	413.3^{a}	257.1^{b}	63.00^{a}	52.56^{a}
٤۰۰	298.1^{c}	302.2^{a}	49.78^{c}	51.56^{a}
٦۰۰	280^{c}	219.2^{d}	53.00^{b}	33.37^{c}

در این آزمایش فعالیت دو آنزیم آسکوربات پراکسیدازو گایاکول پراکسیداز در چهار سطح صفر، دویست، چهارصد و ششصد میلی مولار NaCl، طی ۲۱ روز اندازه گیری شد. فعالیت این آنزیم‌ها تقریباً در تمامی سطوح شوری افزایش یافت. نتایج حاصل نشان دادند که با افزایش سطوح تنش شوری میزان آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز(شکل۱) و گایاکول پراکسیداز(شکل۲) افزایش می‌یابد و تا سطح اول تنش افزایش یافته سپس روند کاهشی نشان می دهد.

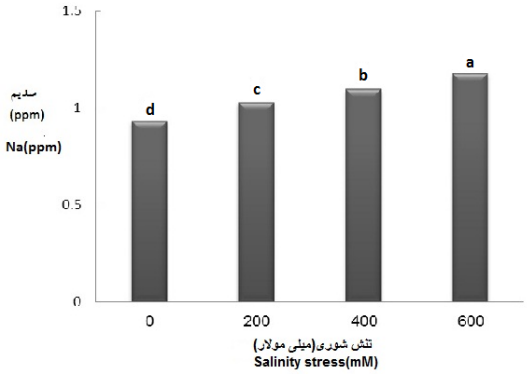
در اندازه‌گیری یون سدیم، با افزایش سطح شوری بر میزان یون سدیم در برگ افزوده شد. بیشترین میزان یون سدیم در سطح ۶۰۰ میلی مولار مشاهده شده است(شکل۳).



شکل۱- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش شوری در اسفناج. تنش شوری از صفر تا ۶۰۰ میلی مولار کلرید سدیم. واحد فعالیت آنزیم= جذب میکرومول آسکوربات اکسیدشده بر دقیقه. حروف متفاوت، تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند($p<0.05$).

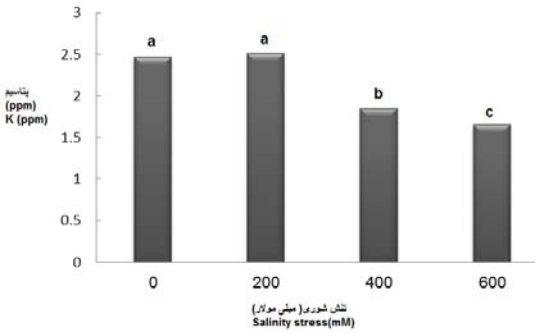


شکل۲- فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تنش شوری دراسفناج. تنش شوری از صفر تا ۶۰۰ میلی مولار کلرید سدیم. واحد فعالیت آنزیم= جذب میکرومول تتراگایاکول تشکیل شده بر دقیقه. حروف متفاوت، تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند($p<0.05$).



شکل۳- میزان یون سدیم در تنش شوری در اسفناج. تنش شوری از ۰ میلی مولار تا ۶۰۰ میلی مولار کلرید سدیم. حروف متفاوت، تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند($p<0.05$).

با افزایش سطوح شوری از میزان یون پتاسیم جذب شده در برگ کاسته شد. بیشترین میزان یون پتاسیم جذب شده در برگ در سطح ۲۰۰ میلی مولار مشاهده گردید و کمترین میزان در سطح ۶۰۰ میلی مولار مشاهده شده است (شکل۴). نتایج نشان داد که با افزایش سطوح شوری میزان یون سدیم در برگ افزایش و مقدار یون پتاسیم برگ کاهش معنی داری داشته است.



شکل ۴- میزان یون پتاسیم در تنش شوری دراسفناج. تنش شوری از ۰ میلی مولار تا ۶۰۰ میلی مولار کلرید سدیم. حروف متفاوت، تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند($p<0.05$).

در اندازه گیری میزان کلروفیل، غلظت کلروفیل a با افزایش سطوح شوری کاهش یافت. در سطح ۲۰۰ میلی-مولار نسبت به سایر سطوح معنی‌دارتر بود. کمترین غلظت آن در سطح ۶۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد. غلظت کلروفیل b با افزایش سطوح شوری کاهش یافت. کمترین غلظت کلروفیل b نیز در تیمار ۶۰۰ میلی‌مولار بدست آمد. غلظت کاروتنوئید با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها، در سطوح مختلف شوری نسبت به سطح عدم تنش (صفر میلی‌مولار) کاهش یافته به‌طوری‌که بیشترین غلظت آن در سطح صفر میلی‌مولار مشاهده شده است. همچنین بین سطوح اختلاف چشمگیری وجود نداشت. کمترین غلظت کاروتنوئید در سطح ۶۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد(جدول۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین پارامترهای رنگدانه‌ای درگیاه هالوفیت اسفناج تحت تأثیر تیمار شوری

سطوح شوری (میلی مولار)	کلروفیل a	کلروفیل b (µg/ml)	کارتنوئید
۰	8.368^{a}	2.432^{b}	1.375^{a}
۲۰۰	6.117^{b}	3.000^{a}	1.162^{b}
٤۰۰	7.300^{c}	0.299^{b}	1.059^{bc}
٦۰۰	7.199^{c}	2.183^{b}	0.988^{c}

بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان داد که با افزایش سطوح تنش شوری میزان آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز افزایش یافته و در ۶۰۰ میلی مولار کاهش می‌یابد. تحقیقات مختلف نشان داده است که یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می شود و افزایش در غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد (۲۹). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تنش شوری در چغندرقند توسط بور و همکاران (۷) و برنج توسط دیونیسیوسس (۱۰) و دمیرال و همکاران (۹) نیز گزارش شده است. حیدری و مصری (۱۷) گزارش کردند که در ارقام مختلف گندم تحت تنش شوری بر میزان فعالیت هر دو آنزیم آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز افزوده می‌شود. در بررسی ۵ رقم کلزا تحت تنش شوری کلرید سدیم تا سطح ۳۰۰ میلی‌مولار تنش، میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه افزایش یافته ولی میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز کاهش یافت(۱۸).ترابی و همکاران گزارش کردند که در گیاه زعفران اثر تنش شوری در پایین تر از ۳۰۰ میلی مولار باعث افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز می‌شود اما در ۳۰۰ میلی مولار فعالیت آنزیم کاهش می‌باید که این کاهش نشانه حساسیت گیاه نسبت به غلظت بالای شوری می‌باشد(۳۳). مرآتی و همکاران اثر تنش شوری از ۲۵ تا ۷۵ میلی مولار را در گیاه پونه معطر بررسی کردند و نشان دادند که فعالیت آسکوربات پراکسیداز همراه با افزایش غلظ شوری افزایش می‌یابد. آنها توضیح دادند که افزایش فعالیت این آنزیم می‌تواند نقش کلیدی در حذف H_2O_2 تولید شده هنگام تنش شوری بازی کند ومنجر بهتحمل بیشتر گیاه در تنش شوری شود (۲۳).

پراکسیداز یک اکسیدوردوکتاز می‌باشد که در پراکسی‌زوم-ها قرار دارد. و دارای یک هم نوع b به‌عنوان گروه پروستاتیک می‌باشد که اکسیداسیون ترکیبات پروتون‌دهنده را با H_2O_2 کاتالیز می‌کند و در نتیجه باعث تجزیه H_2O_2 می‌گردد. (۱۵، ۲۵). آنزیم آسکوربات پراکسیداز از آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون در ابتدای سیکل گلوتاتیون– آسکوربات استفاده می‌کند و نقش مهمی در سمیت‌زدایی H_2O_2 در سلول دارد (۲۶). از آنجایی‌که تجمع پراکسید هیدروژن ناشی از واکنش سوپراکسید دیسموتاز نیاز به فعالیت ترکیبی دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به‌منظور حفاظت سلول‌های گیاهی خواهد داشت، لذا این آنزیم‌ها نقش مهمی را در حذف پراکسید هیدروژن ایفاء می‌نمایند. چرخه گلوتاتیون–آسکوربات نقش مهمی در ایجاد سیستم دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو دارد و افزایش فعالیت آنزیم‌های آن باعث کاهش اثرات تنش اکسیداتیو می‌شود (۲۰). به‌طوری‌که امروزه بسیاری از محققین بر این باورند که این چرخه اصلی‌ترین نقش را در جمع‌آوری H_2O_2 ایفا می‌کند. لذا فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌عنوان آنزیم نهایی این چرخه، از اهمیت بالایی برخوردار بوده و کاهش فعالیت آن می‌تواند سبب تجمع اکسیدان‌ها گردد (۱۲).

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش سطوح تنش، میزان سدیم برگ افزایش در حالی‌که میزان یون پتاسیم کاهش می‌یابد. قولام و همکاران(۱۳) ضمن بررسی افزایش شوری در پنج رقم چغندرقند نشان دادند که یون‌های معدنی، بیشتر در برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها انباشته می‌شوند و غلظت Cl^- و Na^+ افزایش می‌یابد، در حالی‌که غلظت K^+

با تیمار شوری کاهش می‌یابد. این یافته‌ها با نتایج این پژوهش در مورد مقدار بالاتر یون‌ها به خصوص کاتیون‌ها در برگ‌ها همخوانی دارد در بررسی تنش شوری در گیاهان اندازه‌گیری یون‌های سدیم و پتاسیم می‌تواند به عنوان شاخصی از تحمل به شوری مورد استفاده قرار گیرد. تجمع سدیم در گیاه فشار اسمزی را افزایش می‌دهد و گیاه از این راه با کاهش پتانسیل اسمزی محیط ریشه مقابله می-کند. پتاسیم یک عنصر ضروری برای رشد گیاه است، با افزایش کلرید سدیم در محیط، جذب میزان یون سدیم افزایش یافته و از جذب یون پتاسیم جلوگیری به‌عمل می-آید که به‌دنبال آن گیاه را با کمبود این عنصر ضروری روبه‌رو می‌کند. در محیط‌های شور، گیاهان مقادیر زیادی از یون سدیم را به‌جای یون‌های کلسیم و پتاسیم جذب می-کنند که این امر سبب کمبود عناصر کلسیم و پتاسیم در گیاه می‌شود و رشد را کاهش می‌دهد (۳۵).

در تحقیق حاضر میزان رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید با افزایش تنش شوری کاهش یافت. شوری باعث تخریب کلروپلاست‌ها و عدم پایداری ترکیبات رنگیزه‌ای و پروتئین می‌شود. همچنین کاروتنوئیدها تحت تأثیر قرار گرفته و کاهش می‌یابد(۲۷). همچنین در اثر شوری میزان کلروفیل کاهش می‌یابد که به دلیل فعالیت بیشتر کلروفیلاز در شرایط تنش شوری می‌باشد. البته برخی مواد تنظیم-کننده رشد نظیر آبسیزیک، اتیلن و هترواکسین‌ها موجب تحریک فعالیت این آنزیم می‌شوند (۲۴).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این آزمایش، در تنش شوری این گیاه قادر است تا حد شوری ۴۰۰ میلی‌مولار را بدون آسیب جدی به رشد گیاه تحمل کند. مطابق انتظار، میزان سدیم برگ افزایش و پتاسیم و رنگدانه‌ها کاهش پیدا کردند که نتیجه اثر تنش شوری درگیاه می‌باشد. در تنش شوری آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به آنزیم گایاکول پراکسیدازفعالیت بیشتری از خود نشان داد.. با توجه به مکانیسم دفاعی گیاه برای مقاومت در برابر تنش‌های اکسیداتیو و مداخله آنزیم‌های پراکسیداز جهت دفع سمیت انواع اکسیژن فعال، میزان فعالیت این دو آنزیم تا ۴۰۰ میلی مولار افزایش یافت. پس از آن با افزایش مولاریته نمکی میزان فعالیت آنزیم‌ها کاهش پیدا کرد در نتیجه دامنه فعالیت این آنزیم‌ها تا غلظت ۴۰۰ میلی مولار بوده است و در مولاریته بالاتر غلظت نمک می تواند باعث بر هم زدن تعادل یونی محیطی که آنزیم فعالیت می‌نماید وکاهش فعالیت این آنزیم‌ها گردد. با توجه به اهمیت آنزیم‌های پراکسیداز که اولین سد دفاعی یک گیاه هالوفیت تحت شرایط تنش می‌باشند، بررسی فعالیت این آنزیم‌ها و مقایسه آنها با فعالیت همان آنزیم‌ها در گیاهان زراعی، در شرایط یکسان می‌تواندگامی برای اصلاح و مقاوم سازی گیاهان زراعی باشد.

سپاسگزاری

آزمایش حاضر، در سال۱۳۹۰ در آزمایشگاه پژوهشکده ژنتیک طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. از پژوهشکده ژنتیک و زیست فن آوری طبرستان (ساری) جهت فراهم نمودن تسهیلات و امکانات آزمایشگاهی و از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جهت فراهم نمودن تسهیلات مالی تشکر می نماییم.

منابع

۱- احمدی، ع. احسان زاده، پ. و جباری، ف. ۱۳۸۳. مقدمه ای بر فیزیولوژی گیاهی. جلد اول. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه۶۵۳.

۲- اسفندیاری، ا. و محبوب، س. و شکاری،ف. ۱۳۸۸. اصول فیزیولوژی گیاهی. انتشارات عمیدی تبریز. صفحه ۱۵۶-۱۵۹.

3- Ames, BN., Shigena, MK., Hegen, TM.,1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. Proceeding of Natural Academic USA. 90,7915-7922.

4- Asada, K.,۲۰۰۶. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, Plant Physiol,141, 391–396.

5- Blokhina, O., Fagerstedt, K.V., 2010. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation, Plant Physiology and Biochemistry .1-14.

6- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72,248-254.

7- Bor, M., Özdemir, F., Türkan, I., 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. Plant Science. 164,77–84.

8- Chaves, MM., Maroco, JP., Pereira, JS., 2003. Understanding plant responses to drought –from genes to the whole plant. Function of Plant Biology. 30,239-264.

9- Demiral, T., Turkan, I., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental and Experimental Botany. 53, 247–257.

10- Dionisio-Sese, ML., Tobita, S., 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. Plant Science (Limerick). 11135, 11–19.

11- Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J., and Edwards, R., 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. Current Opinion in Plant Biology. 1, 258-266.

12- Foyer, C.H., Harbinson, J., 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Foyer, C.H. and Mul l ineausx, P . M. (Ed s) . Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants". CRC Press, bocaraton, pp. 1-14.

13- Gholam, C., Foursy, A., Fares, K., 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. Environ. Exp. Bot. 47, 39-50.

14- Goldack, D., Li, Ch., Mohan, H.R., Probst, N., 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants unraveling the signaling networks. Frontiers in Plant Science. 5, 151-166.

15- Hasan Güngör, S., 2008. The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberous L.*). African Journal of biotechnology. 7 (13) ,2248-2253.

16- Hasanuzzaman, M., Anwar, M., Teixeira da Silva, J., Fujita, M., 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor.Springer,New York, USA, pp.261-351.

17- Heidari, M., Mesri, F., 2008. Salinity effects on compatible solutes, antioxidants enzymes and ion content in three wheat cultivars. Pakistan J Biol Sci. 11(10), 1385-1389.

18- Heidari, M., Mesri, F., Keikhah, Z., 1389. Effect of salinity stress on nucleic acid metabolism and antioxidant enzymes activity, chorophyl floursence and balnces osmo regulators of five *Canola* varieties. Journal of Crop Sciences. 3,491-502.

19- Johnson, SM., Doherty, SJ., Croy, RRD., 2003. Biphasic superoxide generation in potato tubers: a self-amplifying response to stress. Plant Physiology. 13,1440-1449.

20- Khanna-Chopra, R., Selote, DS., 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. Environmental and Experimental Botany. 60,276–283.

21- Kawano, T., 2003. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Rep. 21, 829-837.

22- Lichtenthaler, H. K., and Buschmann, C., 2001. Chlorophyl and carotenoids measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current protocols in Food Analytical Chemistry.

23- Merati, M.J., Niknam, V., Hassanpour, H. and Mirmasoumi, M. 1394. Comparative effects of salt stress on growth and antioxidative responses in different organs of pennyroyal (Mentha pulegium L.). J. Plant Research. 28 (5),1097-1107.

24- Modhan, M.M., Narayanan, S.L., Ibrahim, S. 2000. Chlorophyll stability indexes (CSI). Its impacts and salt tolerance in rice. IRRI, notes. 25, 38 – 40.

25- Mohapatra, D., Frias, M., Oliveira, R., Kerry, J., 2008. Development and validation of a model to predict enzymatic activity during storage of

cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus* spp). Journal of Food Engineering. 86, 39-48.

26- Moore, K., Roberts, LJ., 1998. Measurement of lipid peroxidation. Free Radical Research. 28, 659–71.

27- Papp, J.C, Ball, M.C., Terry, N.. 1983. A comparative study of the effects of NaCl salinity on resonation, photosynthesis and leaf extension growth in *beta vulgaris* L. plant, cell and environment. 6,675-677.

28- Peltzer, D., Dreyer, E., Polle, A., 2002. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species. Plant Physiology and biochemistry.40, 141-150.

29- Sairam, RK., Veerabhadra Rao, K., Srivastava, GC., 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.

30- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M.,Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, J. Exp. Bot. 53, 1305–1319.

31- Tang, W., Newton, RJ., 2005. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Plant Physiology and Biochemistry. 43,760-769.

32- Tester, M., Davenport, R., 2003. Na+ tolerance and Na+ Transport in higher plant. Annual Botany. 91, 503-527.

33- Torabi Pashai, S., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. and Sharifi, G.A. 1395. Comparative study of biochemical responses of different saffron (Crocus sativus) accessions to salt stress and alleviative effects of salicylic acid. J. Plant Research. 29(4), 728-740.

34- Wahing, I., Van, W., Houba, V.J.G., Vander, J.J., 1989. Soil and plant analysis a series of syllabi. Part7, Plant analysis procedure. Wageningen agriculture university.

35- Yassen, B.Y., Jurgees, G.A.. 1998. The response of sugar beet leaf growth and its ionic composition to sodium chloride. Journal Agriculture and Water Resource Research. soil and Water Resources, 7(1), 47-59.

36- Yoshimura, K., Yabute, Y., Ishikawa, T., Shigeoka, S., 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology. 123, 223-233.

The Study of Activity of Antioxidant Enzymes, Guaiacol Peroxidase and Ascorbate Peroxidase and the amount of Na, K and pigment content in Spinach oleracea L under NaCl Salinity Stress

Mohseni Z.[1], Moradian F.[2] and Rahdari P.[1]

[1] **Dept. of Biology, Islamic Azad University, Tonekabon Unit, Tonekabon, I.R. of Iran.**

[2] **Dept. of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I.R. of Iran.**

Abstract

Salinity is one of the most important abiotic stresses which with produce a reactive oxygen species affect on production and quality of herbal products. Plants are using antioxidant systems such as ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase to deal with different types of free radicals. Also, salinity stress, affect on chlorophyll content and causes ions to disrupt the homeostasis of sodium, potassium, chloride, and calcium. For this purpose, these parameters in spinach in resistance to salt stress were studied. In this study, Salinity at four levels(0,200,400 and 600 Mm) in a period of 14 days after the stress and intermittent interval (72 hours)in a factorial and completely randomized experiments with the model of base design were considered. Ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase activities were measured using standard method. Also, Ions of sodium, potassium and chlorophyll and carotenoid content in the treatment of salinity stress were measured. Data obtained from this study using the statistical software SAS and MSTATC were analyzed. Our results indicated that the effect of salinity stress on the activity of anti-antioxidant enzymes, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase was significant. The results showed that with increasing salinity level, the sodium and potassium ions in leaf compare to control has been significantly increased and reduced, respectively. The concentration of chlorophyll and carotenoid pigments decreased with increasing salinity level.

Key words: "Oxygen radicals", "peroxidase enzymes", "Spinach", " Stress"