

# 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 کلرید سدیم

زهرا محسنی تنکابنی<sup>۱</sup>، فاطمه مرادیان<sup>۲\*</sup> و پروانه راهداری<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> ایران، تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه علوم پایه

تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۶

## چکیده

شوری یکی از مهمترین تنش‌های غیر زنده ای است که با تولیدگونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بر روی تولید و کیفیت محصول گیاهان تاثیر می‌گذارد. گیاهان از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی 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 می‌شود. 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 و ۶۰۰ 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 کاروتنوئید با افزایش سطح شوری کاهش یافت.

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

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

## مقدمه

از آن جمله می‌توان به شکسته شدن زنجیره 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 لیپیدها که منجر به تغییر ساختار غشاء شده و در نتیجه یکپارچگی غشاء از بین می‌رود، تغییر ساختمان پروتئین‌ها و اکسید شدن گروه‌های سولفیدریل

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

برای حفظ واکنش‌های کتبولیکی 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 می‌شود. 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 می‌توانند شوری ( $\text{NaCl}$ ) را تا سطح  $500 \text{ mM}$  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 اولویت‌های 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 در گیاه اسفناج در مقاومت به تنش شوری مورد مطالعه قرار گرفت.

### مواد و روشها

(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 رشته‌های DNA گردد (۲۸، ۲۱، ۱۹).

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

در هنگام تنش، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل آسکوربات پراکسیداز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز، گلوکاتایون ردوکتاز و سوپراکسید دیسموتاز در برگ افزایش می‌یابند. البته میزان ساخته شدن این مواد به شدت و مدت تنش بستگی دارد. همچنین گونه و مرحله 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 گلوکاتایون 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 تنش اکسیداتیو دارد. این آنزیم، پراکسید هیدروژن را در کلروپلاست، سیتوسول، میتوکندری و پراکسی‌زوم سلول‌های گیاهی از بین می‌برد (۲۹، ۴). علاوه بر ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن، تنش شوری باعث برهم خوردن تعادل یونی می‌شود. وجود مقدار زیادی  $\text{NaCl}$ ، شایع‌ترین نوع تنش شوری می‌باشد که باعث به هم زدن هموستازی  $\text{Na}$  و  $\text{Cl}$  و همچنین  $\text{K}$  و  $\text{Ca}$  می‌شود. سلول‌های گیاهی

آسکوربات ۲ 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 اکسید شده بر دقیقه (unit = OD<sub>290</sub>/min) محاسبه شد (۳۶).

**تعیین فعالیت گایاکول پراکسیداز:** کمپلکس واکنشی (دو میلی‌لیتر) شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ 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 تترایاکول تشکیل شده پس از زمان یک دقیقه (unit = OD<sub>470</sub>/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 سانتی‌گراد 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-

**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 مدت ۲ 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 ۱۰۰ mM از نمک NaCl به محیط رشد گیاهان اضافه شد. مطالعات آنزیمی بر روی گیاهان تحت تنش ۰.۰ mM، ۲۰۰ mM، ۴۰۰ mM و ۶۰۰ 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 برگگی با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموزن شده و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سرد (pH=7.5) محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار اضافه گشت. هموزن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در ۱۵۰۰۰ xg 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 روش‌ها و روش‌ها را 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. به طوری که برخی از ایزوژیم‌های 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

## 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 (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک در گیاه هالوفیت اسفناج تحت تأثیر تیمار شوری

سطوح شوری (میلی مولار)	وزن تر برگ	وزن تر ریشه	وزن خشک برگ	وزن خشک ریشه
۰	324.1 <sup>b</sup>	235.1 <sup>c</sup>	55.33 <sup>b</sup>	46.89 <sup>a</sup>
۲۰۰	413.3 <sup>a</sup>	257.1 <sup>b</sup>	63.00 <sup>a</sup>	52.56 <sup>a</sup>
۴۰۰	298.1 <sup>c</sup>	302.2 <sup>b</sup>	49.78 <sup>c</sup>	51.56 <sup>a</sup>
۶۰۰	280 <sup>c</sup>	219.2 <sup>d</sup>	53.00 <sup>b</sup>	33.37 <sup>c</sup>

در این آزمایش فعالیت دو آنزیم آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در چهار سطح صفر، دوست، چهارصد و ششصد میلی مولار NaCl، طی ۲۱ روز اندازه‌گیری 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 (شکل ۱) و گایاکول پراکسیداز (شکل ۲) افزایش می‌یابد و تا سطح اول تنش افزایش یافته سپس روند کاهشی نشان می‌دهد.

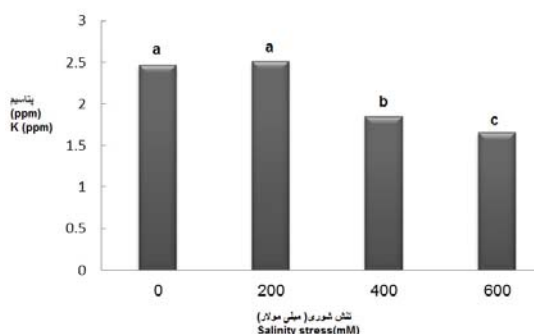
در اندازه‌گیری یون سدیم، با افزایش سطح شوری بر میزان یون سدیم در برگ افزوده شد. بیشترین میزان یون سدیم در سطح ۶۰۰ میلی مولار مشاهده شده است (شکل ۳).

ای (فلیم فوتومتر) انجام شد. محلول حاصل از عصاره گیری را به نسبت ۹+۱ 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: ۴ روز پس از اعمال تنش شوری از برگ اول هر بوته نمونه برگ‌گی 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 برگ‌گی 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 اسپکتروفوتومتر مدل (Spekol 1300, Japan)، قرائت گردید. برای محاسبه میزان کلروفیل و کاروتنوئید از فرمول‌های:  $\text{Chl a } (\mu\text{g/ml}) = 36.92A_{652.4} - 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4}$ ،  $\text{Chl b } (\mu\text{g/ml}) = 15.28A_{665.2} - 104.96\text{Chl a} / 221$ ،  $C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 1.63\text{Chl a} - 15.28A_{665.2}) / 221$ ، برای کلروفیل آ، و  $C_{(x+c)}$  برای کاروتنوئید تام و A دانسیته نوری می‌باشد (۲۲).

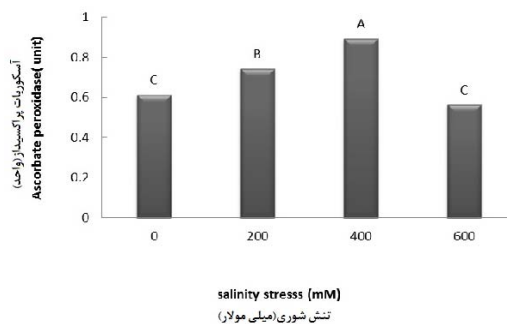
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. برای رسم نمودارها و جداول از نرم‌افزار Excel استفاده شد. آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده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

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 (شکل ۴). نتایج نشان داد که با افزایش سطوح شوری میزان یون سدیم در برگ افزایش و مقدار یون پتاسیم برگ کاهش معنی داری داشته است.

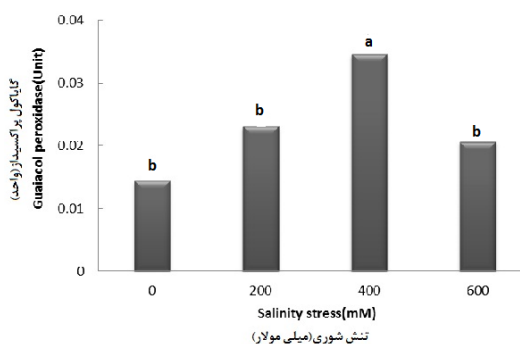


شکل ۴- میزان یون پتاسیم در تنش شوری در اسفناج. تنش شوری از ۰ میلی مولار تا ۶۰۰ میلی مولار کلرید سدیم. حروف متفاوت، تفاوت معنی دار را نشان می‌دهند ( $p < 0.05$ ).

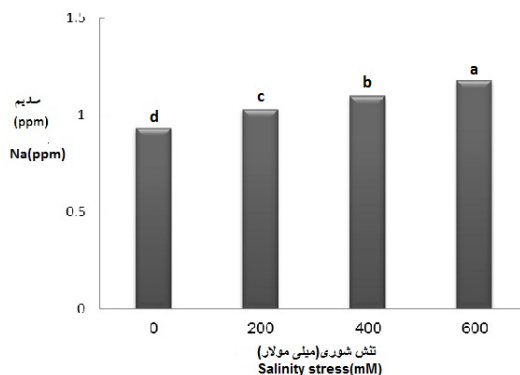
در اندازه‌گیری میزان کلروفیل، غلظت کلروفیل a با افزایش سطوح شوری کاهش یافت. در سطح ۲۰۰ میلی-مولار نسبت به سایر سطوح معنی‌دارتر بود. کمترین غلظت آن در سطح ۶۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد. غلظت کلروفیل b با افزایش سطوح شوری کاهش یافت. کمترین غلظت کلروفیل b نیز در تیمار ۶۰۰ میلی‌مولار بدست آمد. غلظت کاروتنوئید با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها، در سطوح مختلف شوری نسبت به سطح عدم تنش (صفر میلی‌مولار) کاهش یافته به طوری که 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 (جدول ۲).



شکل ۱- 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 اکسید شده بر دقیقه. حروف متفاوت، تفاوت معنی دار را نشان می‌دهند ( $p < 0.05$ ).



شکل ۲- فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تنش شوری در اسفناج. تنش شوری از صفر تا ۶۰۰ میلی مولار کلرید سدیم. واحد فعالیت آنزیم = جذب میکرومول تترآگایاکول تشکیل شده بر دقیقه. حروف متفاوت، تفاوت معنی دار را نشان می‌دهند ( $p < 0.05$ ).



شکل ۳- میزان یون سدیم در تنش شوری در اسفناج. تنش شوری از ۰ میلی مولار تا ۶۰۰ میلی مولار کلرید سدیم. حروف متفاوت، تفاوت معنی دار را نشان می‌دهند ( $p < 0.05$ ).

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

سطوح شوری (میلی مولار)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروتنوئید
	(µg/ml)		
۰	8.368 <sup>a</sup>	2.432 <sup>b</sup>	1.375 <sup>a</sup>
۲۰۰	6.117 <sup>b</sup>	3.000 <sup>a</sup>	1.162 <sup>b</sup>
۴۰۰	7.300 <sup>c</sup>	0.299 <sup>b</sup>	1.059 <sup>b,c</sup>
۶۰۰	7.199 <sup>c</sup>	2.183 <sup>b</sup>	0.988 <sup>c</sup>

## 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 می‌شود و افزایش در غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد (۲۹). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تنش شوری در چغندر قند توسط بور و همکاران (۷) و برنج توسط دیونیسوس (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 می‌یابد 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 و منجر به تحمل بیشتر گیاه در تنش شوری شود (۲۳).

پراکسیداز یک اکسیدوردوکناز 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 گلوکاتیون-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 گلوکاتیون-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  $H_2O_2$  ایفاء 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 چغندر قند نشان دادند که یون‌های معدنی، بیشتر در برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها انباشته می‌شوند و غلظت  $Cl^-$  و  $Na^+$  افزایش می‌یابد، در حالی‌که غلظت  $K^+$

به رشد گیاه تحمل کند. مطابق انتظار، میزان سدیم برگ افزایش و پتاسیم و رنگدانه‌ها کاهش پیدا کردند که نتیجه اثر تنش شوری در گیاه می‌باشد. در تنش شوری آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به آنزیم گایاکول پراکسیداز فعالیت 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 می‌تواند باعث برهم زدن تعادل یونی محیطی که آنزیم فعالیت می‌نماید و کاهش 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 می‌تواند گامی برای اصلاح و مقاوم سازی گیاهان زراعی باشد.

### سپاسگزاری

آزمایش حاضر، در سال ۱۳۹۰ در آزمایشگاه پژوهش‌شده ژنتیک طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. از پژوهش‌شده 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 می‌نمایم.

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 می‌کند. 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 به عمل می‌آید که به دنبال آن گیاه را با کمبود این عنصر ضروری روبه‌رو می‌کند. در محیط‌های شور، گیاهان مقادیر زیادی از یون سدیم را به جای یون‌های کلسیم و پتاسیم جذب می‌کنند 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 کلروفیل‌لاز در شرایط تنش شوری می‌باشد. البته برخی مواد تنظیم‌کننده رشد نظیر آبسزیک، اتیلن و هترواکسین‌ها موجب تحریک فعالیت این آنزیم می‌شوند (۲۴).

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این آزمایش، در تنش شوری این گیاه قادر است تا حد شوری ۴۰۰ میلی‌مولار را بدون آسیب جدی

### منابع

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

۱- احمدی، ع. احسان زاده، پ. و جباری، ف. ۱۳۸۳. مقدمه ای بر فیزیولوژی گیاهی. جلد اول. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه ۶۵۳.

- 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 Mulineaux, P. M. (Eds) . *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants*". CRC Press, Boca Raton, 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 tuberosus* 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, chlorophyll fluorescence and balances 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. Chlorophyll 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, L.J., 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 respiration, 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, R.J., 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<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> 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.<sup>1</sup>, Moradian F.<sup>2</sup> and Rahdari P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biology, Islamic Azad University, Tonekabon Unit, Tonekabon, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> 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"