# تأثیر شوری بلندمدت بر فعالیت‌های آنزیم‌های پراکسیداز و ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه چمن‌شور (*Aeluropus littoralis*)

# The Effect of Long Term Salinity Stress on Peroxidase Enzymes Activities and Physiological Characteristic of *Aeluropus littoralis*

مصطفی مدرسی[۱]، فاطمه مرادیان[۲*] و قربانعلی نعمت‌زاده[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۵/۲۲

**چکیده**

تنش شوری، منجر به تنش اکسیداتیو و افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود که برای سلول سمی می‌باشد. گیاهان از چند سیستم آنتی‌اکسیدانتی برای محافظت از سلول‌های خود علیه این سموم استفاده می‌کنند. در این مطالعه اثر تنش بلندمدت شوری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، کلروفیل، نشت غشائی و روابط آب برگ در گیاه هالوفیت چمن‌شور (*Aeluropus littoralis*) مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور ریشه و برگ گیاهان تحت ۶۰ روز تنش شوری با غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۴۵۰ و ۶۵۰ میلی‌مولار NaCl قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیدازها در برگ تمام تیمارها افزایش یافته است. فعالیت آنزیم پراکسیداز در تنش ۴۵۰ و ۶۵۰ میلی‌مولار و آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ۲۵۰ و ۴۵۰ میلی‌مولار در ریشه افزایش داشت. در ۶۵۰ میلی‌مولار میزان نشت غشایی افزایش و میزان کلروفیل و محتوای آب نسبی (RWC) کاهش پیدا کرد.

**واژه‌های کلیدی:** چمن‌شور، اکسیدازها، تنش شوری، کلروفیل، نشت غشایی

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۲. استادیار گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۳. استاد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

*: نویسنده مسوول Email: f.moradian@umz.ac.ir

## مقدمه

گیاهان با تنش‌های مختلفی چون خشکی، شوری، تغییرات محیطی، آفات و بیماری‌ها و غیره مواجه هستند. در این میان تنش‌های خشکی و شوری نقشی اساسی در کاهش عملکرد گیاهان زراعی دارند و عامل ۵۰٪ از نقصان تولید محصولات زراعی در دنیا هستند *هافسی* و همکاران (Hafsi *et al*., 2010). تنش شوری باعث کاهش تبادلات گازی و بدنبال آن محدودیت عرضه $CO_2$ برای برگ‌ها و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند اکسیژن منفرد، آنیون‌های سوپراکساید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌شود *مدرسی* و همکاران (Modarresi *et al*., 2013b). این گونه‌های آزاد اکسیژن بسیار واکنش‌گر هستند و در غیاب یک سیستم محافظتی، بسیار خطرناک بوده و با صدمه به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، در متابولیسم عادی سلول اختلال ایجاد می‌نمایند *میتلر* و همکاران (Mittler *et al*., 2002). رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، اکسیژن منفرد و رادیکال هیدروکسیل، باعث اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، رنگدانه‌ها و سایر اجزای سلول شده و می‌توانند باعث مرگ گیاه گردند. گیاهان برای مقابله با این رادیکال‌ها از مکانیسم هایی مانند سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی استفاده می‌کنند که این سیستم‌ها به دو گروه آنزیمی (مانند آنزیم‌های سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) و غیر آنزیمی (مانند کاروتنوئیدها) تقسیم می‌شوند *مدرسی* و همکاران (Modarresi *et al*., 2013c). در میان این آنتی‌اکسیدانت‌ها، آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (در کلروپلاست، سیتوسول، میتوکندری و پراکسیزوم) و پراکسیداز (واکوئول، سیتوسول و دیواره سلولی) پراکسید هیدروژن تولیدی را به آب و اکسیژن تجزیه می‌نمایند *بولر* و همکاران (Bowler *et al*., 1992). گیاهان متحمل به شوری، علاوه بر تنظیم هموستازی یون و آب، دارای سیستم آنتی‌اکسیدانتی بهتری برای از میان بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند.

هالوفیت‌ها گروهی از گیاهان هستند که به‌صورت طبیعی نسبت به مقادیر بالای شوری متحمل می‌باشند. چمن‌شور (*Aeluropus littoralis*) گیاهی هالوفیت از خانواده گرامینه می‌باشد که به‌صورت خودرو در بسیاری از نواحی خشک و کویری ایران و همچنین در نواحی باتلاقی سواحل دریای مازندران و دریای عمان می‌روید. این گیاه توانایی تحمل شوری کلریدسدیم را تا سطحی بالاتر از ۱٪ دارا می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان منبعی بومی و مفید برای ژن‌های متحمل به خشکی و شوری به‌شمار آید *بارهومی* و همکاران؛ *مدرسی* و همکاران (Barhoumi *et al*., 2007a; Modarresi *et al*., 2013a). در این تحقیق اثرات تنش بلندمدت (۶۰ روز) نمک کلریدسدیم (NaCl) روی برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و فعالیت‌های اکسیدازی گیاه هالوفیت چمن‌شور مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در اردیبهشت ۱۳۸۹ کلون‌های یکسان گیاه چمن‌شور (با منشأ سواحل میانکاله مازندران) از گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جمع‌آوری، و پس از استریل کردن به‌وسیله هیپوکلریت سدیم ۰/۲٪ (وزنی/ حجمی)، به محیط رشد هیدروپونیک هوگلند *آرنون و هگلند* (Hoagland and Arnon, 1950) با دمای شبانه روز ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۹۰-۷۰٪، زمان نوری ۸-۱۶ ساعت شب/ روز و میزان $\mu molm^{-2}s^{-1}$ ۲۵۰ تابش فعال فتوسنتزی منتقل شد. محلول غذایی به‌صورت هفتگی عوض گردید تا از تجمع سموم جلوگیری شود. ۳۰ روز پس از انتقال کلون‌ها، مقادیر صفر، ۲۵۰، ۴۵۰ و ۶۵۰ میلی‌مولار نمک NaCl به‌روش پاساژدهی (برای جلوگیری از شوک اسمزی) به طریقی که روزانه ۵۰ میلی‌مولار به محیط‌کشت اضافه گردید. پس از ۶۰ روز، برگ‌های توسعه یافته و ریشه‌های رشد یافته، جمع‌آوری شده، با استفاده از ازت مایع به سرعت منجمد شده و تا زمان مصرف در ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

### اندازه‌گیری میزان نشت غشائی

برای این منظور مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم برگ درون لوله‌های آزمایش محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه منتقل شده و پس از دو ساعت میزان هدایت الکتریکی عصاره اشباع آن قرائت شد. سپس نمونه-ها برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شده و پس از خنک کردن، هدایت الکتریکی عصاره اشباع نهایی نیز قرائت شد. محاسبات مربوطه براساس روش *فن و سوکورای* (Fan and Sokorai, 2005) با فرمول $E= (C60-C1)/CT\times100$ انجام گرفت.

### اندازه‌گیری محتوای کلروفیل

میزان کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئید براساس روش *پورا* (Porra, 2002) انجام گرفت.

### اندازه‌گیری محتوای آب نسبی برگ

برای اندازه‌گیری محتوای آب نسبی وزن خشک، وزن تر و وزن برگ‌های تازه در حالت تورژسانس، براساس روش *سایرام* و *سریواستاوا* (Sairam and Srivastava, 2002) مطابق با فرمول زیر انجام گرفت.

$$RWC = \left[\left(\frac{\text{Fresh wt.} - \text{dry wt.}}{\text{Turgid wt.} - \text{dry wt.}}\right)\right] \times 100$$

### استخراج پروتئین

یک گرم برگ و یک گرم ریشه با استفاده از نیتروژن مایع به خوبی پودر شده و سپس با بافر استخراج ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl, pH=۸ حاوی ۲۰ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱۰ میلی‌مولار EDTA، ۵۰ میلی‌مولار KCl، ۰/۵ میلی‌مولار PMSF، یک میلی‌مولار DTT، ۰/۱٪ TritonX-100 (v/v)، ۱۰٪ PVP (w/w) به‌خوبی مخلوط گردید. برای استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) به ترکیب فوق ۵۰ میلی‌مولار آسکوبارت نیز اضافه گردید. ترکیب هموژن حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس و با g ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده و محلول رویی به‌عنوان عصاره آنزیمی (پراکسیدازها) تلقی گردید *بن‌آمور* و همکاران (Ben Amor *et al.*, 2005). برای تعیین غلظت پروتئین (میزان آنزیم استخراج شده) نیز از روش برادفورد استفاده گردید *برادفورد* (Bradford, 1976).

### فعالیت پراکسیداز

اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز براساس میزان اکسیداسیون (*o*-dianisidine 3,3′-dimethoxybenzidine) در طول موج ۴۶۰ نانومتر انجام گرفت *رانی‌یری* و همکاران (Ranieri *et al.*, 2000). محلول واکنش شامل ۲۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH=۵)، ۳ میلی‌مولار $H_2O_2$، یک میلی‌مولار dianisidine و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. پس از تهیه کوکتل آنزیمی واکنش با افزودن $H_2O_2$ شروع می‌شود و جذب دیانیزیدین اکسید شده در طول موج ۴۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده می‌شود.

### فعالیت آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش *ناکانو و آسادا* (Nakano and Asada, 1981) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش به حجم ۱ میلی‌لیتر شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر پتاسم فسفات (pH=۷)، ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات، ۰/۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۰/۱ میلی‌لیتر آنزیم بود که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد واکنش انجام گرفت. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن شروع شد و میزان جذب آسکوربات اکسید شده درطول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. واحد فعالیت آنزیم برابر با میزان جذب نوری (OD) یا مصرف نیم میکرومول آسکوربات بر واحد زمان (دقیقه) و میلی‌گرم پروتئین می‌باشد.

### تجزیه و تحلیل آماری

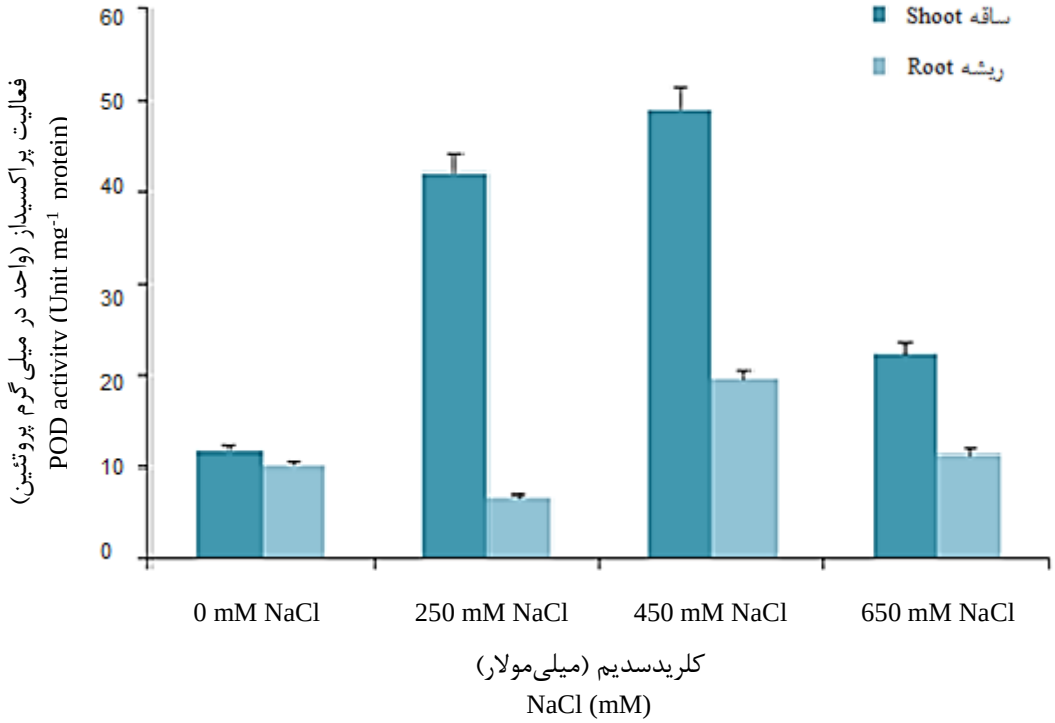
جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش از نرم‌افزارهای آماری SPSS18 و EXCEL استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها نیز به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد تعیین گردید.

### نتایج و بحث

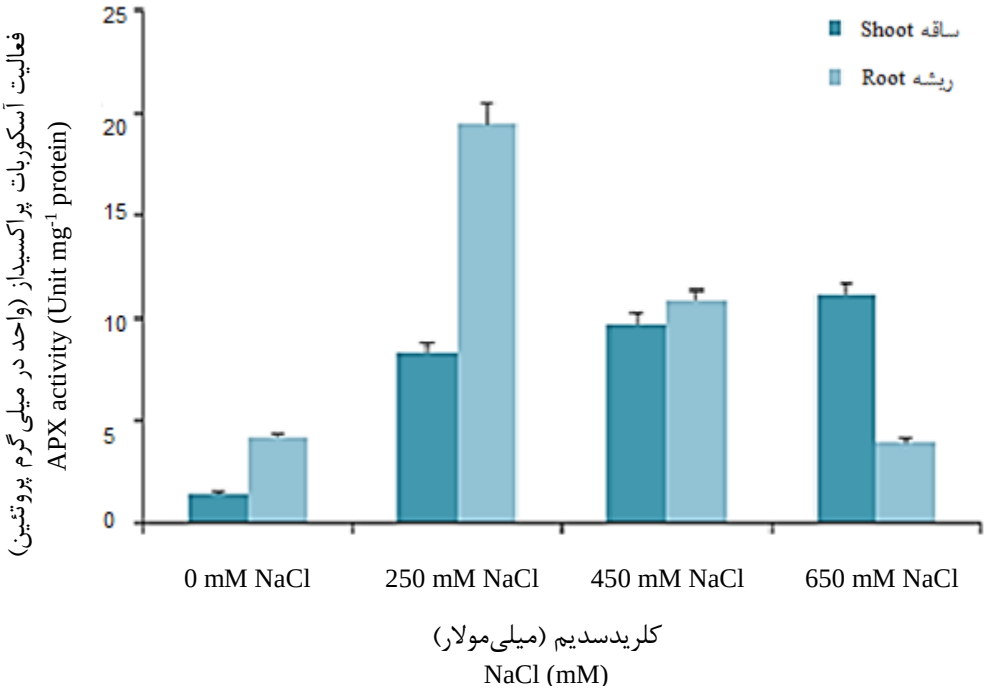
چمن‌شور هالوفیتی با سیستم فتوسنتزی $C_4$ متعلق به خانواده گندمیان است. این گیاه توانایی ترشح نمک از غدد نمکی برگ را دارد. به نظر می‌رسد که این گیاه برای ظاهر نمودن حداکثر پتانسیل رشد خود نیازمند شوری ملایمی می‌باشد *مدرسی* و همکاران (Modarresi *et al.*, 2013c). اگرچه تحمل بالای این گیاه به‌دلیل توانایی ترشح نمک آن می‌باشد، با این حال گیاهان سازگار با شرایط تنش‌های غیرزیستی، از مجموعه‌ای از مکانیسم-ها برای غلبه بر تنش شوری در سطوح سلولی و مولکولی بهره می‌برند. یکی از این مکانیسم‌ها، القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌باشد *یعقوبی* و همکاران (Yaghubi *et al.*, 2013). برای پی بردن به نقش آنتی‌اکسیدانت‌های گیاه چمن‌شور در تنش شوری، دو آنتی‌اکسیدانت اصلی که نقش محوری در مقابله گیاهان با استرس‌ها را دارند، مورد آزمایش قرار گرفتند.

### پراکسیداز

فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف نمک بررسی شد (شکل ۱). تنش شوری ۴۵۰ میلی‌مولار منجر به افزایش فعالیت پراکسیداز در ریشه و برگ به‌ترتیب ۱/۹۲ و ۴/۱۶ برابر شاهد گردید (شکل ۱). *بن‌آمور* و همکاران (Ben Amor *et al.*, 2007) افزایش فعالیت پراکسیداز را در گیاه *Cakile maritime* تا سطح شوری ۴۰۰ میلی‌مولار مشاهده نمودند. در گیاه چمن‌شور در برگ در هر سه سطح افزایش فعالیت دیده شده و در ریشه در سطح ۴۵۰ میلی‌مولار افزایش فعالیت دیده شده است که بیشترین فعالیت در ریشه و برگ در ۴۵۰ میلی‌مولار بوده است.




شکل ۱: تأثیر تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاه *آلروپوس لیتورالیس*
Fig. 1: Effect of salt treatment on peroxidase activity of *Aeluropus littoralis* plant

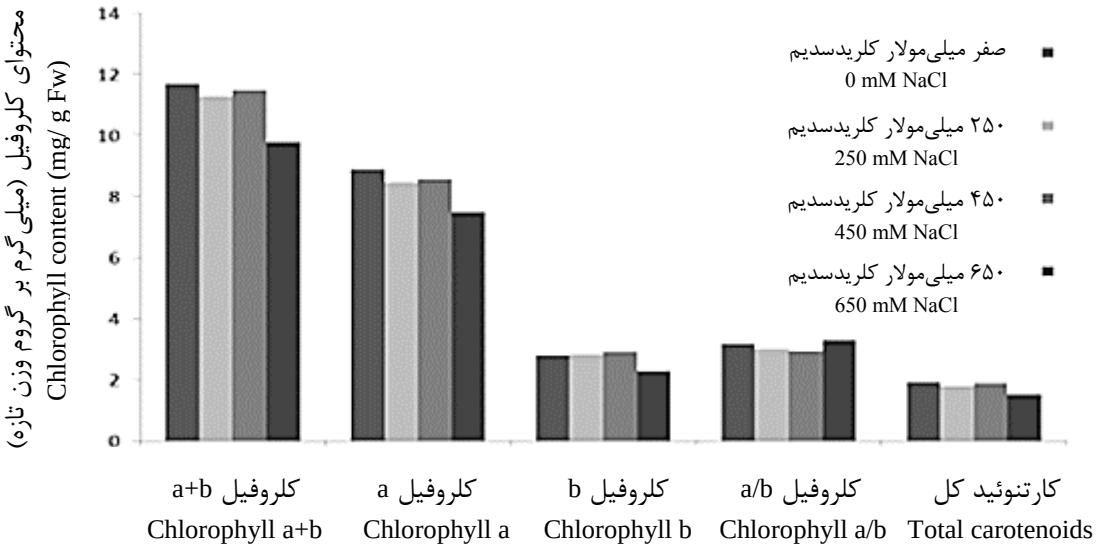



شکل ۲: تأثیر تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گیاه *آلروپوس لیتورالیس*
Fig. 2: Effect of salt treatment on ascorbate peroxidase activity of *Aeluropus littoralis* plant

**آسکوربات پراکسیداز (APX)**

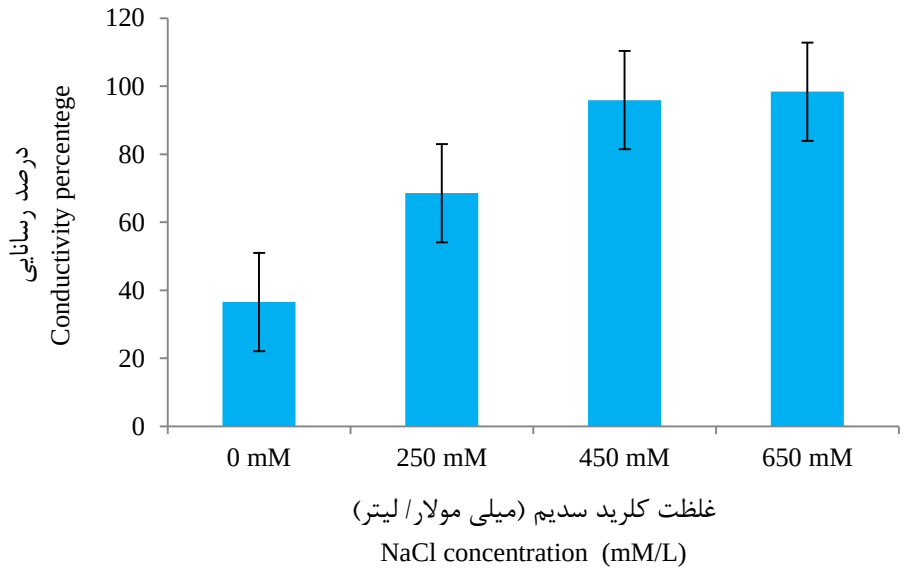
فعالیت آسکوربات پراکسیداز در غلظت‌های مختلف نمک بررسی گردید (شکل ۲). آسکوربات پراکسیداز آنزیمی کلیدی برای تجزیه پراکسیدهیدروژن در کلروپلاست و سیتوسول سلول‌های گیاهی می‌باشد *آسادا* (Asada, 1992). این آنزیم اکسیداسیون آسکوربات توسط پراکسید هیدروژن و افزایش سطح مالون‌دی‌آلدهید (MDA) را تسریع می‌کند. در برگ‌ها فعالیت این آنزیم در تمام سطوح تنش‌های ۲۵۰، ۴۵۰ و ۶۵۰ میلی‌مولار

به‌ترتیب ۶، ۷ و ۸ برابر افزایش یافت. در ریشه‌ها فعالیت این آنزیم در تنش‌های ۲۵۰ و ۴۵۰ میلی‌مولار به‌ترتیب ۴/۶ و ۲/۵ برابر افزایش یافت ولی در تنش ۶۵۰ میلی‌مولار ثابت باقی ماندکه در این غلظت نمک فعالیت آنزیم تغییری نمی‌کند و می‌تواند بیانگر این نکته باشد که فعالیت آنزیم در ریشه وابسته به غلظت نمک می‌باشد تا جایی که افزایش از سطح ۴۵۰ تا ۶۵۰ میلی-مولار دیگر تأثیری بر فعالیت آنزیم نخواهد داشت. نقش آسکوربات پراکسیداز در تحمل به شوری از طریق توتون تراریخته با حس‌گرهای علیه این آنزیم مشخص شد به این صورت که این گونه‌ها به صدمات اکسیداتیو بسیار حساس هستند *الیس و اوروار* (Örvar and Ellis, 1997).




شکل ۳: تأثیر تنش شوری بر کلروفیل و کارتنوئید گیاه *آلروپوس لیتورالیس*

Fig. 3: Salt effects on chlorophylls and carotenoids of *Aeluropus littoralis* plants




شکل ۴: تأثیر تنش شوری بر میزان نشت غشائی گیاه *آلروپوس لیتورالیس*

Fig. 4: Effect of salinity on leaf membrane permeability of *Aeluropus littoralis* plant

## محتوای کلروفیل

شوری از طریق تأثیر نامطلوب بر تبادلات گازی مانند هدایت روزنه‌ای و سرعت فوسنتز، باعث کاهش فتوسنتز می‌گردد. هرچند در این مطالعه، مقدار کلروفیل در سطوح تنش ۲۵۰ و ۴۵۰ میلی‌مولار تحت تاثیر قرار نگرفت، اما کلروفیل و کارتنوئید کل در ۶۵۰ میلی‌مولار کاهش نشان دادند (شکل ۳). این نتایج احتمالاً می‌تواند، نشان‌دهنده حفظ فعالیت‌های فتوشیمیایی در برگ گیاه چمن‌شور، همچون واریته‌های جو سکین (Seckin *et*

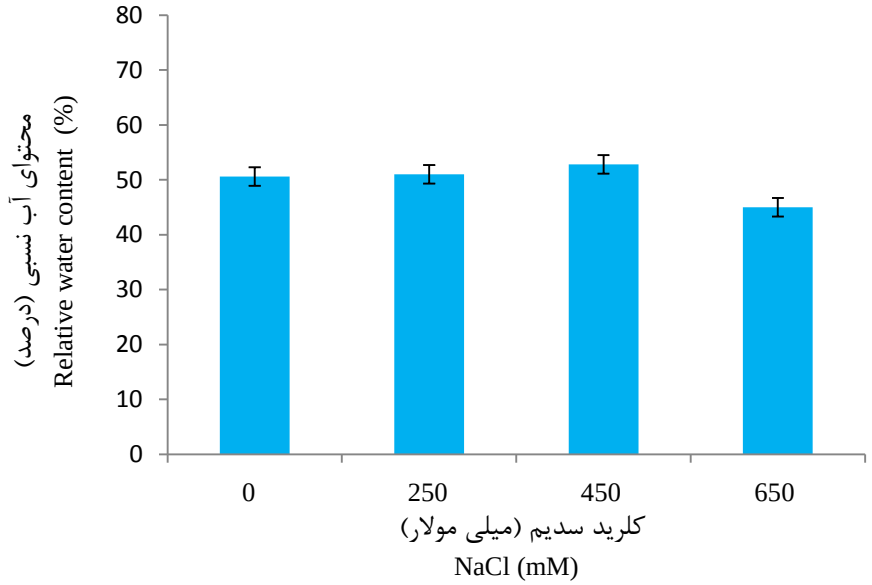
*al.*, 2010) و ذرت (Shabala *et al.*, 1998) تحت شرایط تنش شوری باشد. پیش از این *بارهومی* و همکاران (Barhoumi *et al.*, 2007b) گزارش نمودند که مقادیر کلروفیل (a+b) و کاروتنوئید در گیاه چمن‌شور تا تنش شوری ۴۰۰ میلی‌مولار تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. برای مقادیر بالاتر تنش تاکنون گزارشی ارائه نشده است. ممکن است کاهش مقادیر کلروفیل a و b در شرایط تنش ۶۵۰ میلی‌مولار، ناشی از فعالیت آنزیم‌های تخریب‌کننده کلروفیل (کلروفیلاز) و یا تخریب کلروپلاست و ناپایداری ترکیبات پروتئینی رنگدانه‌ها باشد. همچنین در تنش ۶۵۰ میلی‌مولار، نسبت کلروفیل a/b افزایش یافت. دلیل این امر می‌تواند صدمه کلروپلاست سلول‌های مزوفیل برگ گیاه چمن-شور باشد.

### اندازه‌گیری میزان نشت غشائی

اثر شوری روی صدمه به غشاء در گیاهان زیادی از طریق آزمون نشت غشاء اندازه‌گیری شده‌است. میزان صدمه به غشاء، نشانگر تمایل گونه‌های گیاهی نسبت به تنش شوری می‌باشد. در این آزمایش در تنش‌های ۴۵۰ و ۶۵۰ میلی‌مولار میزان نشت غشایی افزایش یافت (شکل ۴).

### اندازه‌گیری محتوای آب نسبی

برخلاف تنش ۶۵۰ میلی‌مولار، تغییری در RWC برگ این گیاه در تنش‌های ۲۵۰ و ۴۵۰ میلی‌مولار مشاهده نگردید (شکل ۵). پیش از این نیز *لی* و همکاران (Lee *et al.*, 2005) گزارش نمودند که در هفت گونه پاسپالوم ساحلی، RWC تا سطح تنش ۳۰۰ میلی‌مولار تغییری را نسبت به شاهد نشان نداد. بازتاب مستقیم وضعیت آبی گیاهان و کاهش آن، نشان می‌دهد که شوری باعث کمبود آب در گیاهان می‌گردد. اثر منفی بر روابط آبی گیاهان، به‌وسیله افزایش نمک‌های محلول القاء می‌گردد، که باعث کند-شدن روند جذب آب و مواد غذایی شده و باعث اثرات اسمتیک و سمیت برای گیاه می‌شود *یانگ* و همکاران (Yang *et al.*, 2009). برخلاف اکثر گیاهان در بعضی از هالوفیت‌ها RWC تحت شرایط تنش تغییری نمی‌کند و یا اینکه افزایش می‌یابد، مانند *Sauda salsa* و *Atriplex nummularia* *سیلوریا* و همکاران (Silveira *et al.*, 2009). چنانچه RWC کمتر از ۵٪ نسبت به شاهد کاهش یابد، گیاه سالم به نظر می‌رسد و تغییری در سرعت رشد آن مشاهده نمی‌شود.




شکل ۵: تأثیر تنش شوری بر محتوای آب نسبی گیاه *آلروپوس لیتورالیس*

Fig. 5: Effect of salinity on relative water content (RWC) of *Aeluropus littoralis* plants

### نتیجه‌گیری کلی

گیاهان به هنگام مواجهه با تنش‌های مختلف محیطی، ازجمله شوری واکنش‌های گوناگونی را از خود نشان می‌دهند. آگاهی از پتانسیل گیاهان متحمل به شوری خانواده گرامینه، می‌تواند به اصلاح‌گران نباتات در ایجاد واریته‌های متحمل کمک کند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گیاه چمن‌شور مورد مطالعه در این تحقیق، نسبت به تنش شوری واکنش شدیدی از خود نشان دادند. به نظر می‌رسد که پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی اساسی در فرایند زدودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارند که در تنش شوری ایجاد می‌گردند و باعث آسیب رساندن به گیاه می‌شوند. بنابراین نقش این آنزیم‌ها در دفاع از گیاه در برابر تنش‌های شوری و ایجاد رادیکال‌های آزاد

مخرب قابل توجه می‌باشد. در مقادیر بالای تنش شوری، میزان نشت غشائی افزایش یافت که این مسئله نشان‌دهنده نقش مهم آن در محافظت از غشاء سلولی و جلوگیری از آسیب‌زنی رادیکال‌ها به آن می‌باشد. کلروفیل a، b، کاروتنوئید تام و محتوای آب نسبی تا سطح تنش ۴۵۰ میلی‌مولار تغییرات معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان ندادند، اما در تنش ۶۵۰ میلی‌مولار کاهش یافتند که نشان‌دهنده تحمل بسیار بالای این گیاه و توانایی آن در سازگاری نسبت به شرایط بد محیطی در مقایسه با بسیاری از گیاهان دیگر می‌باشد. با توجه به موارد گفته شده و با توجه به گزارشات پیشین از این گیاه مدرسی و همکاران (Modarresi *et al.*, 2014) به نظر می‌رسد که این گیاه پتانسیل بالایی برای تبدیل شدن به منبع بسیار خوبی از ژن‌های مفید تحمل به شوری برای اصلاح غلات را دارا می‌باشد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۷-۱۸ متن انگلیسی مراجعه شود.