Archive of SID

مجله دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد 20/2 شماره 4/ سال 1389

رفتار متفاوت ریشه و برگ توده بومی خلر در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی از شوری

عزت‌اله اسفندیاری[1*]، امین عباسی[2]، واقف عنایتی[2] و سیدبهمن موسوی[3]

تاریخ دریافت : 88/12/2 تاریخ پذیرش : 89/7/18

1- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه
2- دانشجویان کارشناسی ارشد زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه
3- استادیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه
* مسئول مکاتبه: E:mail. esfand1977@yahoo.com

چکیده

با توجه به اهمیت گیاهان علوفه‌ای و ضرورت استفاده از ذخایر ژنتیکی موجود جهت غلبه بر تنش‌های محیطی از جمله شوری، بذور یکنواخت خلر (توده بومی مراغه) انتخاب و به شکل هیدروپونیک پرورش یافتند. پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله چهار تا پنج برگی، گیاهچه‌ها به مدت 10 روز در تنش شوری 200 میلی‌مولار قرار گرفتند. سپس از برگ و ریشه گیاهچه‌ها، نمونه‌برداری و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درگیر در سازوکارهای دفاعی ارزیابی شدند. نتایج ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ خلر نشان داد که علی‌رغم افزایش معنی‌دار آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز کل و گایاکول پراکسیداز ولی میزان آسیب به غشاها افزایش یافته‌است. احتمال می‌رود علت افزایش آسیب به غشاها ناشی از عدم افزایش معنی‌دار آنزیم آسکوربات پراکسیداز و آیزوزیم Cu/Zn-SOD باشد. زیرا فعالیت کم این آنزیم‌ها سبب اجرای ناکارآمد چرخه مهلر و در پی آن کاهش کارآیی چرخه گزانتوفیل و تغییر حالت تیلاکوئید می‌گردد. در نتیجه تولید انواع اکسیژن فعال بر مکانیسم‌های دفاعی گیاه غلبه نموده و سبب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در تنش شوری می‌شود. میزان آسیب به غشاهای سلولی و اندامک‌ها در ریشه و تحت شرایط تنش شوری نسبت به شاهد کاهش چشمگیری یافت که برخلاف انتظار می‌باشد. احتمال می‌رود که تغییر در ترکیب اسیدهای چرب به کار رفته در ساختار غشاها عامل بروز چنین رفتاری در ریشه باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسیداتیو، خلر، شوری، مکانیسم‌های دفاعی

www.SID.ir

Archive of SID

Different Behavior of Root and Leaf in Grass Pea Landraces in Response to Oxidative Stress Caused by Salinity

E Esfandiari[1*], A Abbasi[1], W Enayati[1] and SB Mosavi[2]

Received : 21 February 2010 Accepted : 10 October 2010
[1]Assistant Prof, Dept of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran
[2]Master of Science student, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran
[3]Assistant Prof, Dept of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran
∗ Corresponding author: Email: esfand1977@yahoo.com

Abstract

In attention to the importance of forage plants and the necessity to use genetic resources and in order to overcome the environmental stresses such as salinity, uniform grass pea seeds (landrace of Maragheh) were selected and grown in hydroponic system. At 4-5 leaves stage, seedlings were subjected to 200 mM salt stress for a period of 10 days. Sampling was done from the leaves and roots of seedlings and it used to assess the antioxidant enzymes involving in defense mechanisms. Evaluation of antioxidant enzymes in grass pea leaves showed that despite a significant increase in catalase, total superoxide dismutase and guaiacol peroxidase, injury to the membranes has been increased. Likely, the increased damage to membranes would be caused by lack of significant increase in ascorbate peroxidase and isozyme of Cu/Zn-SOD. Because the low activity of this enzymes led to inefficient implementation of Mehler cycle following by reduce efficiency of xantophyll cycle and a change in Tylakoid status. Therefore, ROS production overcomes the plant defense mechanisms leading to increased lipid peroxidation under salinity. Interestingly in the root and under salt stress, the rate of damage to cell and organelle membranes was significantly reduced compared with the control. It seems unexpected behavior of root may be due to the changes in fatty acid compositions of the membranes structure.

Key Words: Defense mechanisms, Grass pea, Oxidative stress and Salinity

مقدمه

خلـر (*Lathyrus sativus* L.) بـه تیـره لگومینوز تعلق داشته و جزو گیاهان علوفه‌ای بـه شـمار می‌آید. از این گیاه امروزه جهت تامین علوفه مورد نیـاز دام‌ها و کود سبز استفاده می‌گردد. دوره رشد آن کوتاه بوده و بسیار متحمل به خشکی است (تیاگی و همکـاران 1999). بعلاوه خلر سازگار به فـصول سـرد و یخبنـدان می‌باشد (کوکز و همکاران 2000).

www.SID.ir

Archive of SID

تنش شوری در بیش از 800 میلیون هکتار از اراضی زراعی دنیا عامل محدود کننده رشد و نمو و عملکرد گیاهان زراعی به شمار می‌آید (فائو 2008) که در حدود 6% کل سطح خشکی دنیاست. اثرات مضر شوری در گیاهان ناشی از بروز تنش یونی و اسمزی است (مونس و تستر 2008) که برآیند آنها سبب ایجاد اختلالات متابولیسمی در سلول‌ها می‌گردد. اختلالات متابولیسمی حاصل افزایش تولید انواع اکسیژن فعال مثل سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل ($HO^{\cdot}$) می‌باشد (هالی‌ول 2006 و حسین و همکاران 2008). انواع اکسیژن فعال از میل ترکیبی بسیار بالایی جهت واکنش با بیومولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک برخوردار است. آسیب به بیومولکول‌های یاد شده به ترتیب سبب تخریب پروتئین‌ها، پراکسیده شدن لیپیدها و جهش در ساختار DNA می‌گردد (کوئیلز و لوپز 2004، میتلر و همکاران 2004 و احمد و همکاران 2009). تجمع صدمات وارده به نقاط کلیدی متابولیسم توسط انواع اکسیژن فعال در نهایت مرگ سلولی را در پی دارد (اسفندیاری و همکاران 2007).

در تنش شوری، کلروپلاست اصلی‌ترین محل تولید انواع اکسیژن فعال در برگ‌ها به‌شمار می‌آید (کاوالکانتی و همکاران 2007). زیرا تعادل بین تولید اکسیژن در فاز فتوشیمیایی و مصرف $NADPH, H^+$ در چرخه کالوین از بین می‌رود که ناشی از افزایش مقاومت روزنه‌ای است. در نتیجه این عمل ناقل‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی بسته شده و تولید انواع اکسیژن فعال افزایش می‌یابد. با توجه به اهمیت فوق‌العاده زیاد کلروپلاست برای سلول‌های گیاهی، مکانیسم‌های دفاعی زیادی جهت ممانعت از تولید انواع اکسیژن فعال یا جمع‌آوری آنها در این اندامک وجود دارد. چرخه مهلر (ونگ و همکاران 2008 و آسادا 2000)، چرخه گزانتوفیل (آدامز 2003)، چرخه گلوتاتیون- آسکوربات (ادروا 2005)، تغییر تیلاکوئیدهای گرانایی به استرومایی (اسفندیاری و همکاران 1388) و مسیر آلترناتیو اکسیداز (ادروا 2005) از جمله مهمترین مکانیسم‌های دفاعی در کلروپلاست است. سلول با اجرای مکانیسم‌های دفاعی مذکور سعی بر حفظ ساختار کلروپلاست دارد. چرخه‌های مذکور از همکاری یکسری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (نظیر آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز) و آنتی‌اکسیدان (مثل آسکوربات، گلوتاتیون، توکوفرول، کاروتنوئید و فلاونوئیدها) تشکیل شده‌است (احمد و همکاران 2009).

فرآیند تنفس نوری از دیگر فرآیندهای حیاتی مهم تولید کننده انواع اکسیژن فعال در گیاهان C3 است. با قرارگیری گیاهان C3 در تنش شوری، این فرآیند بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد (فویر و نکتور 2000). افزایش تولید انواع اکسیژن فعال در فرآیند تنفس نوری ناشی از افزایش فعالیت اکسیژنازی آنزیم روبیسکو در شرایط تنش شوری است (مارتینو و همکاران 1999 و ویدیاناتان و همکاران 2003). امروزه مشخص شده‌است که فرآیند تنفس نوری سبب افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی می‌گردد. زیرا بیوسنتز آنتی‌اکسیدان بسیار مهم گلوتاتیون به اجرای این فرآیند وابسته است (نکتور و همکاران 1999). بعلاوه دی‌اکسید کربن آزاد شده در طی فرآیند تنفس نوری به باز نگهداشته شدن زنجیر انتقال الکترون کلروپلاستی و ممانعت از بازدارندگی نوری کمک قابل توجهی می‌کند (ادروا 2005). سلول با اجرای این مکانیسم‌های جایگزین، سعی می‌کند که جریان الکترون در مسیرهای مطمئن انجام پذیرفته و از تولید انواع اکسیژن فعال پیشگیری گردد. همچنین با اجرای برخی از مکانیسم‌های دفاعی در سلول، انواع اکسیژن فعال تولید شده را جمع‌آوری و خنثی می‌کند.

www.SID.ir

Archive of SID

تاکنون اکثر تحقیقات در گیاهان برروی برگ صورت گرفته‌است و در خصوص الگوی رفتاری ریشه بویژه در شرایط تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری (از نظر مسیر انتقال پیام، مکانیسم‌های آسیب رسانی و ترمیم نقاط آسیب دیده) اطلاعات کمی وجود دارد. رن و همکاران (1999) گزارش کرده‌اند که اگرچه برگ‌ها و ریشه‌ها از سیستم آنزیمی تقریبا مشابهی برخوردار هستند اما ممکن است همکاری بین فعالیت آنزیم‌ها، جریان آنتی‌اکسیدان‌ها و بیان ژن در ریشه متفاوت از برگها باشد. در خصوص عملکرد سیستم‌های آنتی‌اکسیدان سیتوسول و دیگر اندامک‌های سلول‌های ریشه در شرایط اکسیداسیون ناشی از تنش شوری اطلاعات کمی وجود دارد. با قرار گیری ریشه گیاه در معرض تنش شوری ممکن است به زنجیر انتقال الکترون میتوکندریایی آسیب برسد. در این‌صورت تولید رادیکال سوپراکسید افزایش یافته و سبب تجمع این رادیکال می‌گردد. رادیکال سوپراکسید به سرعت به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود که بطور خود به خودی یا توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز فعال در میتوکندری انجام می‌گردد. البته با اجرای مسیر آلترناتیو اکسیداز در این اندامک سلول سعی بر کاهش تولید پراکسید هیدروژن دارد (ادروا 2005). پراکسید هیدروژن حاصل به راحتی از غشای میتوکندری عبور کرده و وارد سیتوسول می‌شود که می‌تواند نقش پیام رسانی یا آسیب رسانی داشته باشد (رن و همکاران 1999). در ریشه انواع اکسیژن فعال در اثر فعالیت NAD(P)H-اکسیداز پلاسمایی نیز تولید می‌شود. در اثر فعالیت این آنزیم رادیکال سوپراکسید تولید می‌گردد که با فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز آپوپلاستی به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود. پراکسید هیدروژن نیز در حضور عناصر چند ظرفیتی مثل آهن و مس به رادیکال فوق‌العاده خطرناک هیدروکسیل تبدیل خواهد شد. این رادیکال از میل ترکیبی بسیار بالایی در واکنش با تمامی بیومولکول‌ها برخوردار است (میتلر و همکاران 2004).

شناخت مکانیسم‌های فیزیولوژیک سلول‌های گیاه در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری به منظور غلبه بر محدودیت‌های موجود در امر تولید گیاهان زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بعلاوه به دلیل استفاده از گیاهان علوفه‌ای در تغذیه دام‌ها و کود سبز به همراه ضرورت استفاده از منابع ژنتیکی موجود در راستای مقابله با تنش‌های محیطی، بذور یکنواخت گیاه خلر (توده بومی مراغه) انتخاب و به شکل هیدروپونیک پرورش یافت. با رسیدن گیاهچه‌های خلر به مرحله 5-4 برگی، گیاهچه‌ها به مدت 10 روز در تنش شوری 200 میلی‌مولار قرار گرفتند. سپس از آنها نمونه تهیه و با استفاده از آنزیم‌های درگیر در مکانیسم‌های دفاعی عکس‌العمل آنها به تنش شوری ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش بذور یکنواخت خلر (توده بومی مراغه) انتخاب و با محلول 0/1 درصد SDS به مدت 20 دقیقه ضدعفونی شد. پس از سپری شدن مدت زمان مذکور، بذور چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. بذور ضد عفونی شده در دمای 1± 25 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 2 ±60 درصد و تاریکی جوانه‌دار شدند. بذور جوانه‌دار شده به محیط هیدروپونیک منتقل گردید. ترکیب عناصر غذایی مورد استفاده در طول دوره رشد شامل عناصر پرمصرف (KH_2PO_4،$MgSO_4$،KNO_3،$Ca(NO_3)_2$) که به ترتیب در مقادیر 2/5، 3، 1/5و 0/17 میلی‌مولار) و کم مصرف ($FeSO_4$، H_3BO_3، $MnSO_4$، $ZnSO_4$، $CuSO_4$، H_2MoO_4 که به ترتیب در مقادیر 50، 23، 5، 0/4، 0/2 و 0/1 میکرومولار) بود. در ضمن سیستم کشت از نوع هیدروپونیک مایع بود که مدام با پمپ آکواریوم هوادهی می‌شد.

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهچه‌های خلر تا مرحله 3-2 برگی با محلول 50 درصد و بعد از آن با محلول غذایی کامل تغذیه شدند. به منظور حفظ تعادل عناصر غذایی، محلول‌ها هر هفته دو بار عوض می‌شدند. بعلاوه pH محلول‌ها در محدوده 5/5 – 5/2 نگهداری می‌شد. در طول دوره رشد دمای محیط 2±25 سانتی‌گراد، طول دوره روشنایی 16 ساعت و شدت نور 2500 لوکس بود. بعد از مرحله 5-4 برگی گیاهچه‌های خلر به دو گروه شاهد و تنش شوری تقسیم شد. تیمار شاهد در شرایط فوق و تیمار شوری با اعمال تنش 200 میلی‌مولار کلرید سدیم (اضافه نمودن یک‌دفعه‌ای نمک یادشده)، به مدت 10 روز در این شرایط نگهداری شد. سپس از برگ‌های جوان و کاملا بالغ و ریشه بوته‌های خلر، نمونه تهیه و بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور گشتند. نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج آنزیمی

جهت استخراج آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتازکل و آیزوزیم‌های آن، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، 0/5 گرم از نمونه برگی با استفاده از هاون چینی کاملا سرد و نیتروژن مایع هموژن شده و سپس به آن 5 میلی لیتر از بافر فسفات سرد (pH 7.5) محتوی EDTA 0/5 میلی‌مولار اضافه گشت. هموژن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در 15000×g و دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ گردید. جهت پیشگیری از اثرات مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها سوپرناتانت حاصل، به سه قسمت تقسیم و تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های فوق در دمای 20 – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (اسفندیاری و همکاران 2009).

استخراج آنزیم اسکوربات پراکسیداز نیز به روش فوق صورت گرفت و فقط به بافر استخراج آنزیم پلی وینیل پیرولیدین (5 درصد وزنی-حجمی) و اسکوربات 2 میلی‌مولار اضافه گشت (اسفندیاری و همکاران 2009).

سوپر اکسید دیسموتاز و آیزوزیم‌های آن

کمپلکس واکنشی (3 میلی لیتر) محتوی 0/1 میلی‌لیتر از کربنات سدیم 1/5 مولار، 0/2 میلی‌لیتر از متیونین 0/2 مولار، 0/1 میلی‌لیتر از EDTA 3 میلی‌مولار، 1/5 میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم 0/1 مولار و 1 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/05 میلی‌لیتر از آنزیم استخراجی بود.

واکنش با اضافه کردن 0/1 میلی‌لیتر از ریبوفلاوین 60 میکرومولار و قرار دادن لوله‌های آزمایش در زیر لامپ‌های فلورسنت (در حدود 30 وات) شروع به فعالیت می‌کند. لوله‌های آزمایش به مدت 15 دقیقه در زیر نور نگهداری و پس از اتمام زمان ذکر شده، با خاموش کردن لامپ‌ها و قرار دادن لوله‌های آزمایش در تاریکی مطلق واکنش آنزیمی متوقف گردید. از کمپلکس واکنشی بدون آنزیم که به مدت 15 دقیقه در نور قرار گرفته بود برای ارزیابی توان تولید کمپلکس سوپراکسید نیتروبلوتترازولیوم و معیار سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. همچنین از کمپلکس واکنشی کامل دیگری که از ابتدا در تاریکی مطلق قرار گرفته بود، به عنوان blank استفاده گردید. پس از توقف واکنش میزان جذب نمونه‌ها در 560 نانومتر یادداشت برداری شد (سیرم و همکاران 2002).

کاتالاز

فعالیت این آنزیم طبق روش ابی (1984) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنشی شامل 1/5 میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم 100 میلی‌مولار (pH 7)، 0/5 میلی‌لیتر از پراکسید هیدروژن 7/5 میلی‌مولار و 50 میکرولیتر از محلول آنزیمی می‌باشد که حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به 3 میلی‌لیتر رسانده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جذب کمپلکس واکنشی در طول موج 290 نانومتر یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی cm^{-1} 36/6 $mmol^{-1}$ میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد.

اسکوربات پراکسیداز

کمپلکس واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل 250 میکرولیتر از محلول بافر فسفات 100 میلی‌مولار (pH 7)، 250 میکرولیتر از اسکوربات یک میلی‌مولار، 250 میکرولیتر از EDTA 0/4 میلی‌مولار، 190 میکرولیتر آب دو بار تقطیر، 10 میکرولیتر از پراکسید هیدروژن 10 میلی‌مولار و 50 میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده‌بود. جذب کمپلکس واکنشی در طول موج 290 نانومتر یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی $mmol^{-1}\ cm^{-1}$ 2/8 میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد (سیرم و همکاران 2002).

میزان پراکسید شدن لیپیدها یا مالون دی آلدئید

این شاخص بر اساس روش استوارت و بولی (1980) اندازه گیری شد. در حدود 0/5 گرم از برگهای گندم در 10 میلی‌لیتر از محلول 0/1 درصد تری کلرواستیک اسید هموژن و به مدت 10 دقیقه در 15000 ×g سانتریفوژ گردید. 2 میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل با 4 میلی‌لیتر از محلول 20 درصد تری کلرواستیک اسید محتوی 0/5 درصد تیوباربیتوریک اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل گردید. نمونه‌ها مجددا به مدت 10 دقیقه در 10000× g سانتریفوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج 532 و 600 نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسیده شدن لیپیدها از اختلاف بین موج‌های جذبی و ضریب خاموشی $mmol^{-1}\ cm^{-1}$ 155 بدست آمد.

تجزیه آماری داده‌ها

با توجه به اینکه در این آزمایش دو تیمار، شاهد و شوری، مورد بررسی قرار گرفته است، بررسی میانگین پارامترهای اندازه‌گیری شده از طریق آزمون t استیودنت انجام شد. بدین ترتیب که پس از بررسی یکنواختی واریانس‌ها، آزمون t مناسب تعیین و مورد استفاده قرار گرفت. لازم به‌ذکر است که مقایسه پارامترها در سطح احتمال 5 درصد انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه 16 و Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل نشان داد که در برگ خلر اعمال تنش شوری 200 میلی‌مولار فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کل و آیزوزیم Fe-SOD را بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داده‌است (شکل‌های 1 و 2). اما شوری تاثیری بر فعالیت آیزوزیم‌های Mn-SOD و Cu/Zn-SOD نداشته‌است (شکل‌های 3 و 4). در بین آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن، تنها فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از اعمال تنش شوری متاثر نشده‌است (شکل 5). در حالیکه فعالیت دیگر آنزیم‌های مورد مطالعه موثر در سم‌زدایی این متابولیت سمی، گایاکول پراکسیداز (شکل 6) و کاتالاز (شکل 7)، در شرایط شوری بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داشت. بعلاوه با اعمال تنش شوری میزان پراکسیداسیون لیپیدی بطور معنی‌دار نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل 8).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریشه این گیاه نیز نشان داد که تنش شوری سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کل نسبت به شاهد شده‌است (شکل 1). در بین آیزوزیم‌های این آنزیم فعالیت Fe-SOD در ریشه بطور معنی‌داری نسبت به شاهد در اثر شوری افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

داشت (شکل 2). درحالیکه دیگر آیزوزیم‌ها آن، Cu/Zn-SOD و Mn-SOD، در اثر شوری تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نشان ندادند (شکل‌های 3 و 4). در بین آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن اندازه‌گیری شده در ریشه فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (شکل 5) و گایاکول پراکسیداز (شکل 6) در اثر شوری بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. در حالیکه فعالیت آنزیم کاتالاز، دیگر آنزیم جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن، تغییر معنی‌داری در شرایط شوری نسبت به شاهد نداشت (شکل 7). میزان پراکسیداسیون لیپیدی در ریشه خلر در اثر شوری نسبت به شاهد بطور معنی‌داری کاهش یافت که جالب‌ترین نتیجه این پژوهش به‌شمار می‌آید (شکل 8).

با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز کل (شکل 1)، آیزوزیم Fe-SOD (شکل 2)، گایاکول پراکسیداز (شکل 6) و کاتالاز (شکل 7) در برگ خلر در شرایط تنش شوری، انتظار می‌رود که همانند شرایط مطلوب محیطی بین تولید انواع اکسیژن فعال و فعالیت مکانیسم‌های دفاعی تعادل وجود داشته باشد. اما برخلاف انتظار میزان پراکسیداسیون لیپیدی (شکل 8) که بعنوان یک نشانگر جهت ارزیابی وضعیت درون سلول در شرایط تنش استفاده می‌گردد، بطور معنی‌داری افزایش یافته‌است. در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد بررسی تنها فعالیت آیزوزیم‌های Cu/Zn-SOD و Mn-SOD (شکل‌های 3 و 4) و آنزیم آسکوربات پراکسیداز (شکل 5) در شرایط تنش شوری تغییر معنی‌داری نشان ندادند. لذا احتمال می‌رود که افزایش آسیب به غشاهای سلولی ناشی از عدم کارایی موثر آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و Cu/Zn-SOD باشد. زیرا شوری بر فرآیند فتوسنتز اثر منفی داشته و سبب کاهش تثبیت دی اکسید کربن در چرخه کالوین می‌شود (مارتینو و همکاران 1999). کاهش فعالیت این چرخه افت نسبت $NADP^+/NADPH,H^+$ و افزایش تولید انواع اکسیژن فعال را در کلروپلاست در پی دارد (کاوالکانتی و همکاران 2007). گیاهان جهت مقابله با عوارض منفی کاهش فعالیت چرخه کالوین، از یکسری مکانیسم‌های دفاعی جایگزین از جمله چرخه مهلر استفاده می‌کنند (ریزسکی و همکاران 2003). در این چرخه آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش بسیار مهمی دارد. با توجه به عدم افزایش معنی‌دار این آنزیم، چرخه مذکور کارآیی لازم را در مقابله با تنش محیطی نخواهد نداشت. از دیگر دلایل ناکارآمدی چرخه مهلر، عدم افزایش معنی‌دار فعالیت آیزوزیم Cu/Zn-SOD است. این آیزوزیم در کلروپلاست در اطراف فتوسیستم I فعالیت دارد و اولین جز مکانیسم چرخه مهلر است (میتلر و همکاران 2004). با فعالیت این آیزوزیم رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود (ادروا 2005). چرخه گزانتوفیل دیگر مکانیسم دفاعی است که در آن آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش کلیدی ایفا می‌کند (آدامز 2003). اما اجرای آن بطور مستقیم به چرخه مهلر وابسته است. زیرا شرط لازم برای فعال شدن چرخه گزانتوفیل اسیدی‌تر شدن ناحیه لومن می‌باشد (لاتوسکی و همکاران 2007) که با اجرای چرخه مهلر زمینه لازم برای فعال شدن چرخه مذکور فراهم می‌گردد. لازم به ذکر است که یکی از راه‌های پیشگیری از تولید انواع اکسیژن فعال در کلروپلاست، تبدیل تیلاکوئیدهای گرانایی به استرومایی است (اسفندیاری و همکاران 1388). اجرای این مکانیسم دفاعی نیز مستلزم اجرای چرخه مهلر و اسیدی‌تر شدن ناحیه لومن تیلاکوئیدی می‌باشد (اورت 2001). تنفس نوری یکی از دیگر مکانیسم‌های دفاعی سلول جهت مقابله با تنش‌های شوری است. در تنش شوری اجرای این فرآیند افزایش می‌یابد که ناشی از بسته شدن روزنه‌ها و افزایش فعالیت اکسیژنازی آنزیم روبیسکو است (مارتینو و همکاران 1999). در پی افزایش اجرای این فرآیند تولید پراکسید هیدروژن در پراکسیزوم

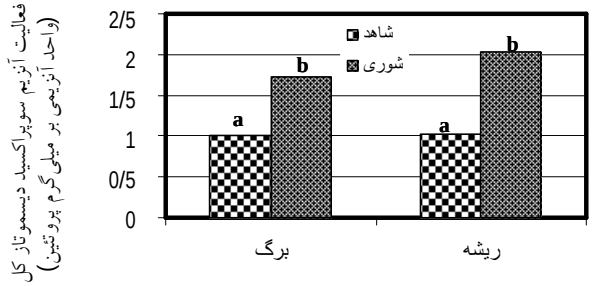
www.SID.ir

Archive of SID

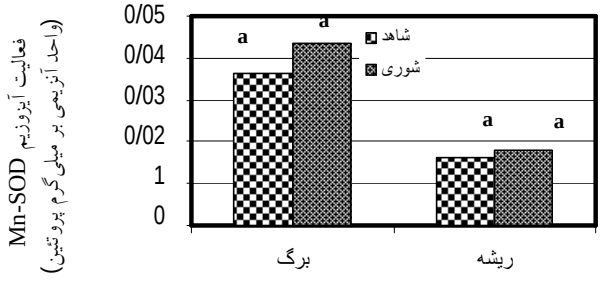
(تبدیل گلی‌کولات به گلی‌اگزالات) افزایش می‌یابد (فویر و نکتور 2000). اما افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز (آنزیم جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن در پراکسیزوم) حاکی از عدم آسیب رسان بودن این بخش می‌باشد. لذا احتمال می‌رود که عامل اصلی افزایش آسیب به غشاها و پراکسیداسیون لیپیدی علی‌رغم افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز کل و آیزوزیم Fe-SOD در برگ ناشی از عدم فعالیت کافی آنزیم آسکوربات پراکسیداز و Cu/Zn-SOD و در پی آن عدم اجرای موثر مکانیسم‌های دفاعی باشد.

در شرایط تنش شوری برخلاف برگ‌ها میزان پراکسیداسیون لیپیدی در ریشه بوته‌های خلر نسبت به شاهد کاهش چشمگیری نشان داد (شکل 8) که برخلاف انتظار بود. زیرا در شرایط تنش شوری و یا اسمزی انتظار می‌رود که میزان پراکسیداسیون لیپیدی افزایش یابد (چاپارزاده و همکاران 2004). تعدادی از محققین کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در ریشه را در شرایط تنش شوری گزارش کرده‌اند (آزودو و همکاران 2005 و کاوالکانتی و همکاران 2007). کاوالکانتی و همکاران (2007) معتقدند که دلیل اصلی بروز چنین نتیجه‌ای مشخص نیست. اما آنها احتمال می‌دهند که دلیل آن تغییر در ترکیب اسیدهای چرب تشکیل دهنده غشاها می‌باشد که محل اصلی پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل مالون دی‌آلدئید است.

به عنوان نتیجه نهایی می‌توان اظهار داشت که در برگ‌ها کلروپلاست از مهمترین محل‌های تولید انواع اکسیژن فعال است. این ویژگی حضور مکانیسم‌های دفاعی متعدد را در این اندامک تائید می‌کند. بعلاوه جهت اجرای موثر مکانیسم‌های دفاعی وجود تعادل در فعالیت آنزیم‌های درگیر الزامی است. بطوریکه احتمال می‌رود عدم افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و Cu/Zn-SOD مانع اجرای کارآمد چرخه مهلر می‌شود. به همین دلیل شرط لازم برای اجرای دیگر مکانیسم‌های دفاعی فراهم نشده و این اندامک عامل اصلی آسیب به سلول‌های برگ است. کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی سلول‌های ریشه در شرایط تنش شوری نتیجه جالب این پژوهش می‌باشد که احتمال می‌رود ناشی از تغییر در ترکیب اسیدهای چرب تشکیل دهنده غشاها باشد.



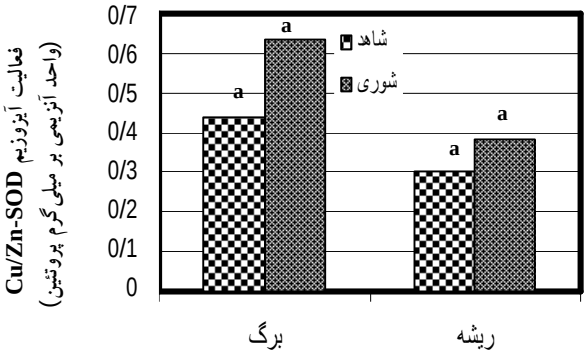
شکل 1- فعالیت سوپراکسید دیسموتاز کل در شرایط شاهد و شوری در ریشه و برگ گیاه خلر (حروف متفاوت در شکل نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).



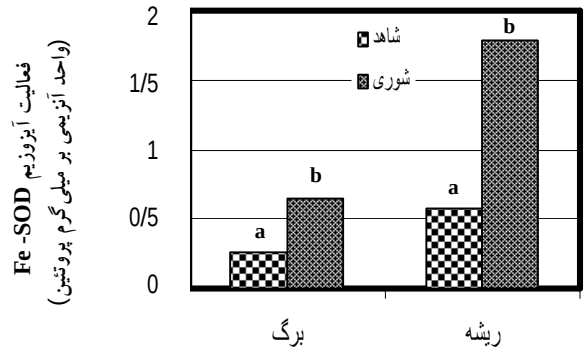
شکل 2- فعالیت آیزوزیم **Mn-SOD** در شرایط شاهد و شوری در ریشه و برگ گیاه خلر (حروف یکسان در شکل نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).

www.SID.ir

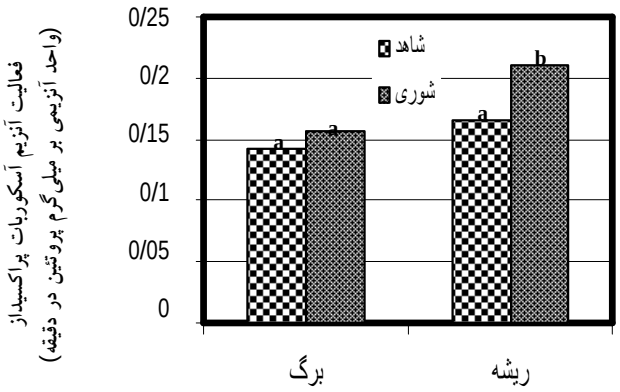
Archive of SID



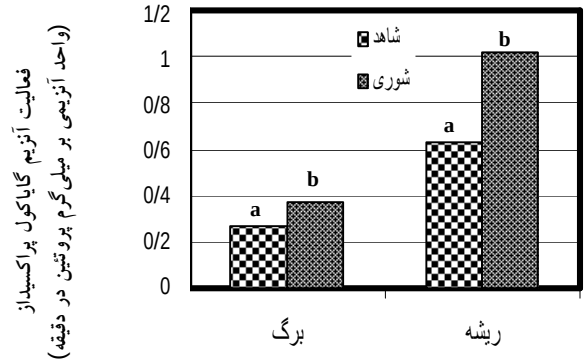
شکل 3- فعالیت آیزوزیم **Cu/Zn-SOD** در شرایط شاهد و شوری در ریشه و برگ گیاه خلر (حروف یکسان در شکل نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).



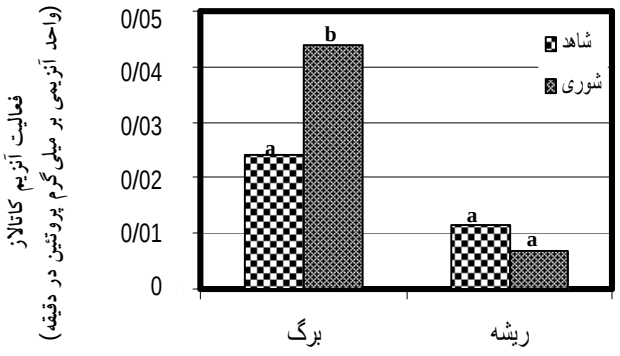
شکل 4- فعالیت آیزوزیم **Fe-SOD** در شرایط شاهد و شوری در ریشه و برگ گیاه خلر (حروف یکسان در شکل نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).



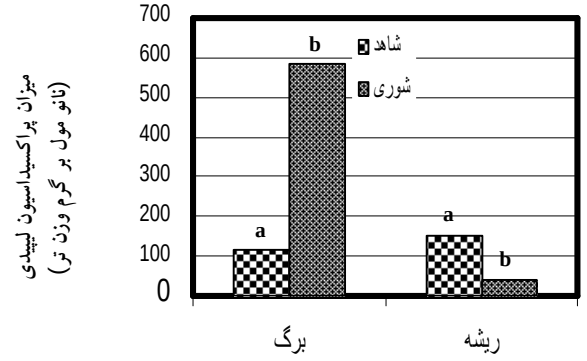
شکل 5- فعالیت آسکوربات پراکسیداز در شرایط شاهد و شوری در ریشه و برگ گیاه خلر (حروف یکسان در شکل نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).



شکل 6- فعالیت گایاکول پراکسیداز در شرایط شاهد و شوری در ریشه و برگ گیاه خلر (حروف یکسان در شکل نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).



شکل 7- فعالیت کاتالاز در شرایط شاهد و شوری در ریشه و برگ گیاه خلر (حروف متفاوت در شکل نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).



شکل 8- میزان پراکسیداسیون لیپیدی در شرایط شاهد و شوری در ریشه و برگ گیاه خلر (حروف متفاوت در شکل نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

اسفندیاری ع، محبوب س و شکاری ف، 1388. اصول فیزیولوژی گیاهی (جلد اول). انتشارات عمیدی. تبریز

Adams B, 2003. Linking the xanthophyll cycle with thermal energy dissipation. Photosynthesis Research 76: 73-80.

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

Ahmed P, Jaleel C, Azooz M and Gowher N, 2009. Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. Botany Research International 2: 11-20.

Asada K, 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Phill Trans R Soc Lond B 355: 1419-1431.

Azevedo AD, Prisco JT, Eneas J, Rolim JV and Gomes E, 2005. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt stress acclimation in maize plants. J Plant Physiology 162: 1114-1122.

Cavalcanti F, Lima J, Silva S, Viegas R and Silveira J, 2007. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. J Plant Physiology 164: 591-600.

Chaparzadeh N, D′Amico ML, Kavari-Nejad RA, Izzo R and Navari-Izzo F, 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. Plant Physiol Biochem 42: 695-701.

Cocks P, Siddiqae K and Hambury C, 2000. *Lathyrus* a new grain legume. RIRDC Publication No. 99/150.

Edreva A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. Agriculture, Ecosystems and Environment 106: 119-133.

Esfandiari E, Alavi-Kia SS, Bahmani A and Aazami MA. 2009. The effect of light on ROS-scavenging systems and lipid peroxidation under cold conditions in saffron (*Crocus sativus* L.). African Journal of Agricultural Research 4: 378-382.

Esfandiari E, Shakiba MR, Mahboob SA, Alyari H and Toorchi M. 2007. Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. Journal of Food, Agriculture & Environment 5: 48-53.

FAO, 2008. FAO land and plant nutrition management service. Available at: http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush.

Foyer CH and Noctor G, 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. New Phytol 146: 359-388.

Halliwell B, 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology 141: 312-322.

Hussain T, Chandrasekhar T, Hazara M, Sultal Z, Saleh B and Gopal G, 2008. Recent advances in salt stress biology- a review. Biotechnology and Molecular Biology Review 3: 8-13.

www.SID.ir

Archive of SID

Latowski D, Goss R, Grzyb J, Akerlund H, Burda B, Kruk J and Strzalka K, 2007. De-epoxidation of xanthophyll cycles require non-bilayer lipida for their activity. Biologia 53: 16-20.

Martino CD, Delfine S, Alvino A and Loreto F, 1999. Photorespiration rate in spinach leaves under moderate NaCl stress. Photosynthetica 36: 233-242.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M and Breusegem FV, 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Tren Plant Sci 9: 490-498.

Munns R and Tester M, 2008. Mechanism of salinity tolerance. The Annual Review of Plant Biology 59: 651-681.

Noctor G, Arisi A, Jouanin L and Foyer CH, 1999. Photorespiratory glycine enhances glutathione accumulation in both chloroplastic and cytosolic compartments. J Exp Bot 50: 1157-1167.

Ort D, 2001. When there is too much light. Plant Physiology 125: 29-32.

Quiles MJ and López NI, 2004. Photoinhibition of photosystems I and II induced by exposure to high light intensity during oat plant grown effects on the chloroplastic NADH dehydrogenase complex. Plant Science 166: 815-823.

Ren HX, Wang ZL, Chen X and Zhu YL, 1999. Antioxidative responses to different altitudes in *Plantago major*. Environ Exp Bot 42: 51-59.

Rizhsky L, Liang H and Mittler R, 2003. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. The Journal of Biological Chemistry 27: 38921-38925.

Sairam RK, Rao KV and 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.

Stewart RRC and Bewley JD, 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. Plant Physiology 65: 245-248.

Tyagi A, Santha IM and Mehta SL, 1999. Effect of water stress on proline content and transcript levels in *Lathyrus sativus*. Ndian. J Biochem. Biophys 36: 207–210.

Vaidyanathan H, Sivakumar P, Chakrabarty R and Thomas G, 2003. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-Stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. Plant Science 165: 1411-1418.

Weng XY, XU H, Yang Y and Peng H, 2008. Water-water cycle involved in dissipation of excess photon energy in phosphorus deficient rice leaves. Biologia Plantarum 52: 307-313.

www.SID.ir