

مطالعه تغییرات رشد، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و مقدار پروتئین با کاربرد عنصر روی در گیاه دارویی
پریوش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) تحت تنش شوری

مهری عسکری^{۱*}، فریبا امینی^۲ و لیلا حسین‌پور^۳

*۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، ایران، پست الکترونیک: m-askary@araku.ac.ir

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، ایران

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۳

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۳

چکیده

تنش شوری یکی از تنش‌های عمده غیرزیستی است که اثرات زیان‌آوری بر تولید و کیفیت گیاهان می‌گذارد. آزمایشی به منظور بررسی اثرات کاربرد عنصر روی به‌عنوان تعدیل‌کننده تنش شوری بر آنتی‌اکسیدانت‌ها، پروتئین، اسیدآمینو پرولین و رشد گیاه دارویی پریوش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) در پاییز ۱۳۹۱ در دانشگاه اراک انجام شد. گیاهان ۴۹ روزه با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۰، ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) به تنهایی و همراه با غلظت‌های مختلف سولفات روی (۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار) به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. سپس درصد بازدارندگی رادیکال دی‌فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، مقدار پرولین و پروتئین و شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند که کاربرد سولفات روی ارتفاع بخش هوایی، عمق ریشه، وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی را در همه تیمارهای شوری بهبود بخشید. در نتیجه تنش شوری، درصد بازدارندگی رادیکال DPPH، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و نیز محتوای پرولین به‌ترتیب ۳۴۸/۵٪، ۴۷۵/۶٪، ۱۷۲/۷٪، ۲۰٪ و ۳۶۴٪ افزایش یافت، ولی محتوای پروتئین ۳۳٪ کاهش یافت. کاربرد روی محتوای پروتئین را در تیمارهای شوری تا ۱۶٪ بهبود بخشید و محتوای پرولین را در آنها تا ۳۶٪ کاهش داد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهان تیمار شده با NaCl+Zn نسبت به آنهایی که تنها با NaCl یا Zn تیمار شده بودند به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این نتایج از اثرات مثبت کاربرد عنصر روی بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی پریوش تحت تنش شوری حمایت می‌کند. عنصر روی می‌تواند به‌عنوان پاک‌کننده گونه‌های اکسیژنی واکنش‌گر به‌منظور کاهش آسیب‌های زیستی تحت تنش شوری عمل کند.

واژه‌های کلیدی: پرولین، تعدیل‌کننده، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز.

مقدمه

گرمسیری رشد می‌کند و به خشکی و گرما مقاوم است. تمام بخش‌های این گیاه دارای آلکالوئید است ولی آلکالوئیدهای ضدسرطان وین‌بلاستین (Vinblastine) و وین‌کریستین (Vincristine) در برگ و آلکالوئیدهای ضد فشار خون

پریوش (*Catharanthus roseus*) از گیاهان مهم دارویی متعلق به خانواده خرزهره (Apocynaceae) است. این گیاه بوته‌ای و چندساله اغلب در مناطق معتدل و

است. کربونیک نیدراز که تبدیل برگشت پذیر کربن دی اکسید و آب را به کربونیک اسید کاتالیز می کند، حاوی عنصر روی است و برای فعالیت به Zn نیاز دارد (Weisany et al., 2012). روی در متابولیسم پروتئین، بیان ژن، تمامیت ساختاری و عملکردی غشاهای زیستی و متابولیسم فتوسنتزی کربن نقش دارد. روی در تنظیم گشودگی روزنه ها به واسطه نقشی که در حفظ تمامیت غشاء دارد، دخالت می کند. در کمبود روی، محتوای K^+ سلول های نگهبان روزنه کاهش می یابد (Tester & Davenport, 2003). روی برای ساخت تریپتوفان (پیش ماده سنتز اکسین) ضروریست (Mousavi, 2011). مطالعات مختلف به اهمیت تغذیه روی بر بهبود تحمل تنش شوری در گیاهان اشاره دارد که مرتبط با تأثیر روی بر تمامیت ساختاری و کنترل نفوذپذیری غشاء سلول های ریشه می باشد. تغذیه مناسب و کافی Zn جذب سدیم اضافی را توسط ریشه تحت تنش شوری کاهش می دهد و تحمل گیاه را به سمیت NaCl افزایش می دهد (Tavallali et al., 2010). هدف این مطالعه بررسی نقش روی به عنوان تعدیل کننده تنش شوری بر رشد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانته گیاه پرپوش می باشد.

مواد و روشها

کاشت بذر و اعمال تنش

پس از ضد عفونی بذرهای پرپوش تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان با هیپوکلریت سدیم ۱٪ و جوانه زنی بذرها در پتری دیش، گیاهک ها به ۳۶ گلدان حاوی پرلیت و خاک زراعی (لومی رسی با pH=۷/۶) به نسبت ۱:۱ (وزنی/وزنی) انتقال یافتند. گیاهان تا ۴۹ روز با محلول هوگلند (Hoagland & Arnon, 1950) تغذیه شدند، گیاهان ۴۹ روزه در مرحله رشد رویشی به مدت ۳ هفته در روزهای ۴۹، ۵۶ و ۶۳ اعمال تنش شدند. آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه اراک در پاییز سال ۱۳۹۱ انجام شد. تیمار اول سطوح مختلف کلرید سدیم (۰، ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی مولار) و تیمار دوم

آجمالیسین (Ajmalicine) و سرپنتین (Serpentine) بیشتر در ریشه این گیاه قرار دارند. به طوری که مقدار آلکالوئیدهای گیاه پرپوش تحت تأثیر تنش های غیرزیستی مثل شوری خاک افزایش می یابد (Jaleel et al., 2008).

شوری به عنوان یکی از تنش های اصلی محیط به حضور غلظت بالای نمک های محلول در خاک اطراف ریشه مربوط می شود. غلظت های بالای نمک های محلول به واسطه افزایش فشار اسمزی، سمیت یونی و با محدود کردن جذب آب توسط ریشه، رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می دهد (Jouyban, 2012). تقریباً ۱۲/۵٪ از زمین های کشاورزی ایران درگیر شوری طبیعی یا افزایش یافته هستند (Akhami & Ghorbani, 1992). به طوری که تولیدات کشاورزی در اثر شوری خاک تحت تأثیر قرار می گیرند. بخش اصلی بازدارندگی رشد به وسیله تجمع Na^+ اضافی در خاک ایجاد می شود. مقدار کاهش رشد گیاه تحت شوری با ترکیب و غلظت نمک، مرحله فیزیولوژیکی گیاه و گونه گیاهی تغییر می کند (Jaleel et al., 2008). تولید زیاد گونه های اکسیژنی واکنش گر (Reactive Oxygen Species) ROS در طول تنش شوری ناشی از آسیب به سیستم انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری و افزایش تنفس نوری است. این رادیکال های آزاد ضمن راه اندازی واکنش های پراکسیداتیو، قابلیت آسیب زدن به غشاء و ماکرومولکول های ضروری مثل رنگدانه های فتوسنتزی، پروتئین ها، نوکلئیک اسیدها و لیپیدها را دارند و منجر به تشکیل تولیدات سمی از قبیل مالون دی آلدهید می شوند. تنش اکسیداتیو زمانی رخ می دهد که بین تولید ROS و ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانته گیاه تعادل نباشد. گیاهان با سیستم دفاع آنتی اکسیدانته های آنزیمی (مثل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گاپاکول پراکسیداز) و غیر آنزیمی مثل پرولین به طور طبیعی میزان ROS درون سلول را در حد تعادل نگه می دارند (Tavallali et al., 2010).

کمبود Zn یک مشکل تغذیه ای مهم خاک های جهان است که معمولاً با مشکلات شوری مرتبط است. روی یک عنصر کم مصرف ضروری درگیر در فعالیت آنزیم های مختلف

روش Marschner و Cakmak (۱۹۹۲)، سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD (Superoxide dismutase) از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) و سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (Guaiacol peroxidase GPOX) نیز از روش Polle و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS16 و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (سطح ۵٪) و برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده گردید.

نتایج

تیمار منفرد کلریدسدیم، تیمار منفرد سولفات روی و اثر متقابل تیمار کلریدسدیم و سولفات روی بر تمامی شاخص‌های مورد بررسی گیاه پرپوش ۷۰ روزه اثر معنی‌داری (جدول ۱) را نشان می‌دهند.

نتایج اثر شوری به تنهایی

با افزایش شوری، شاخص‌های رشد پرپوش به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. کمترین ارتفاع بخش هوایی و عمق ریشه، وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه متعلق به گیاهان تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری بود. با افزایش شوری مقدار پرولین و پروتئین به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری را نشان دادند. مقدار افزایش پرولین در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری ۳/۶۴ برابر شاهد و کمترین میزان پروتئین در همین سطح شوری با ۳۳٪ کاهش نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد (جدول ۲). درصد تخریب رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره گیاهی I% در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد ۳۴۸/۵٪ افزایش را نشان داد. بیشترین فعالیت آنزیم SOD، CAT و GPOX در گیاهان تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری به ترتیب با افزایش ۴۷۵/۶٪، ۱۷۲/۷٪ و ۲۰۰٪ نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

سطوح مختلف سولفات روی $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار) بود. محلول هوگلند (Hoagland & Arnon, 1950) حاوی سدیم کلرید با غلظت‌های ۰، ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار و محلول هوگلند شامل سولفات روی ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) با غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار بود. محلول‌های فوق هفته‌ای یک‌بار به خاک محتوای گیاه به میزان ۱۵۰ میلی‌لیتر داده شدند. محلول هوگلند فاقد کلریدسدیم و فاقد روی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برداشت نهایی در مرحله بلوغ گیاه (پایان رشد رویشی و قبل از گلدهی) در روز ۷۰ انجام شد.

صفات مورد ارزیابی

شاخص‌های رشد مثل ارتفاع گیاه، عمق ریشه، وزن تر و خشک بخش هوایی (ساقه و برگ) و ریشه برای سه گیاه از هر تیمار اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری محتوای پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) و اندازه‌گیری محتوای پروتئین از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. برای اندازه‌گیری کمی‌ت ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان کل (I%) از آزمون درصد تخریب رادیکال آزاد ۱ و ۱۰ دی‌فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) توسط عصاره گیاه به روش Kamkar و همکاران (۲۰۱۰) استفاده گردید. در این روش از ترکیب رادیکالی پایدار ۱ و ۱ دی‌فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل DPPH (۰/۵ میلی‌مولار) به عنوان معرف استفاده شد. الکترون تک رادیکال آزاد DPPH جذب قوی حداکثری در ۵۱۷nm دارد و رنگ آن بنفش است. زمانی‌که الکترون تک رادیکال DPPH با یک هیدروژن از یک ترکیب آنتی‌اکسیدان واکنش می‌دهد و فرم احیای DPPH-H را تشکیل می‌دهد رنگ بنفش به رنگ زرد تبدیل می‌شود. در واقع در این روش از بی‌رنگ شدن رنگ بنفش در اندازه‌گیری کمی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی کل استفاده می‌شود. برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از

جدول ۱- تجزیه و تحلیل اثر تیمار شوری، تیمار روی و اثر متقابل آنها بر شاخص‌های رشد، مقدار پرولین، پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانسی کل (I%)، سوپراکسیداز دیسموتاز SOD، کاتالاز CAT و گایاکول پراکسیداز GPOX پریش

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییر
ریشه		بخش هوایی					
عمق	وزن خشک	وزن تر	وزن خشک	وزن تر	ارتفاع		
۱۳/۸۲ **	۲/۸×۱۰ ^{-۵} **	۰/۰۰۳ **	۰/۰۰۵ **	۰/۴۷ **	۴/۵۲ **	۳	تیمار شوری
۸/۹۶ **	۷/۴×۱۰ ^{-۶} **	۰/۰۰۱ **	۰/۰۰۱ **	۰/۰۷ **	۱/۴۵ **	۲	تیمار روی
۰/۱۹ **	۲/۱×۱۰ ^{-۷} **	۱/۳×۱۰ ^{-۵} **	۳/۶×۱۰ ^{-۵} *	۰/۰۰۳ *	۰/۰۹۵ **	۶	اثر متقابل شوری×روی
۰/۰۴۱	۲/۸۳×۱۰ ^{-۸}	۱/۷×۱۰ ^{-۶}	۱/۱۲×۱۰ ^{-۵}	۰/۰۰۱	۰/۰۲۶	۲۴	اثر خطا
۲۰	۳۶/۵	۳۹/۵	۲۵	۳۰	۲۸		ضریب تغییرات

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییر
پروتئین	پرولین	GPOX	CAT	SOD	I%		
۰/۰۷۲ **	۲۰/۱۵ **	۰/۰۰۲ **	۰/۰۰۱ **	۵۲۳۸/۷۴ **	۱۹۴۴ **	۳	تیمار شوری
۰/۰۳۱ *	۷/۹۸ **	۷/۸×۱۰ ^{-۵} **	۰/۰۰۰۰۲ **	۳۷۵/۶۴ **	۵۳/۵۷ **	۲	تیمار روی
۰/۰۰۱ *	۰/۴۲ *	۶/۹×۱۰ ^{-۶} **	۱/۵×۱۰ ^{-۶} *	۳۷/۲۲ **	۴/۸۸ **	۶	اثر متقابل شوری×روی
۰/۰۰۰۰۱۳	۰/۱۵۸	۱/۳×۱۰ ^{-۶}	۶/۱×۱۰ ^{-۷}	۰/۲۷۴	۰/۱۳۷	۲۴	اثر خطا
۳۱/۸۹	۲۶/۵	۳۶/۵	۳۰	۳۸/۵۲	۴۰		ضریب تغییرات

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثر تیمار شوری بر شاخص‌های رشد، پرولین، پروتئین، میزان I% و فعالیت کاتالاز CAT، گایاکول پراکسیداز GPOX و سوپراکسید دیسموتاز SOD گیاهان ۷۰ روزه پریش

تیمار شوری (میلی مولار)				شاخص
۱۰۰	۷۰	۳۵	۰	
۳/۷۴ d ± ۰/۱۹	۴/۰۲ c ± ۰/۲۳	۴/۴۱ b ± ۰/۳۷	۵/۳۷ a ± ۰/۵۴	ارتفاع بخش هوایی (cm)
۴/۵ d ± ۰/۸۹	۵/۲ c ± ۰/۹	۵/۶۹ b ± ۰/۵۴	۷/۴ a ± ۰/۸	عمق ریشه (cm)
۰/۴۱ d ± ۰/۰۷	۰/۵ c ± ۰/۰۴	۰/۶۱ b ± ۰/۰۷	۰/۹۳ a ± ۰/۱۱	وزن تر بخش هوایی (g)
۰/۰۴۲ d ± ۰/۰۰۷	۰/۰۵۱ c ± ۰/۰۰۴	۰/۰۶۳ b ± ۰/۰۰۷	۰/۰۹۴ a ± ۰/۰۱	وزن خشک بخش هوایی (g)
۰/۰۱۹ d ± ۰/۰۰۷	۰/۰۳۴ c ± ۰/۰۰۶	۰/۰۴۴ b ± ۰/۰۰۶	۰/۰۶ a ± ۰/۰۰۹	وزن تر ریشه (g)
۰/۰۰۲ d ± ۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۳ c ± ۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۵ b ± ۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۶ a ± ۰/۰۰۱	وزن خشک ریشه (g)
۱۵/۲۶ a ± ۰/۹۱	۱۲/۴۴ b ± ۱/۱۵	۸/۶۲ c ± ۰/۶۸	۴/۳۷ d ± ۰/۴۱	پرولین (μmol/g FW)
۰/۴۲ d ± ۰/۰۵	۰/۴۶ c ± ۰/۰۶	۰/۵۱ b ± ۰/۰۳	۰/۶۳ a ± ۰/۰۴	پروتئین (mg/g FW)
۴۴/۹۴ a ± ۲/۵۸	۳۴/۰۳ b ± ۲/۶۵	۲۶/۰۴ c ± ۱۰/۹	۱۰/۰۲ d ± ۰/۴۵	میانگین I%
۶۶/۰۸ a ± ۷/۸۳	۴۵/۴۵ b ± ۵/۱	۲۳/۶۵ c ± ۵/۸۸	۱۱/۴۸ d ± ۰/۸	SOD (unit mg ⁻¹ protein)
۰/۰۳ a ± ۰/۰۰۱	۰/۰۲۴ b ± ۰/۰۰۲	۰/۰۱۹ c ± ۰/۰۰۲	۰/۰۱۱ d ± ۰/۰۰۰۸	CAT (μmol mg ⁻¹ protein min ⁻¹)
۰/۰۶ a ± ۰/۰۰۴	۰/۰۵ b ± ۰/۰۰۲	۰/۰۴۱ c ± ۰/۰۰۳	۰/۰۲۲ d ± ۰/۰۰۱	GPOX (μmol mg ⁻¹ protein min ⁻¹)

در هر ردیف داده‌های (میانگین ۳ تکرار ±SD) دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ در آزمون دانکن ندارند.

بدون روی مشاهده شد. کاهش ۳۰/۳۵٪ ارتفاع بخش هوایی و ۳۹/۱۹٪ عمق ریشه در شوری ۱۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد، با افزودن ۱۰ میکرومولار روی، به ترتیب به ۱۸/۱۲ و ۱۲/۴٪ و در ۵ میکرومولار روی به ترتیب به ۲۰/۸٪ و ۳۲/۰۳٪ تغییر یافت. البته بین ارتفاع بخش هوایی و عمق ریشه گیاهان در شوری ۳۵ میلی مولار+ ۱۰ میکرومولار روی و گیاهان شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود، یعنی ۱۰ میکرومولار روی سبب شده گیاهان تحت تنش شوری ۳۵ میلی مولار مثل گیاهان بدون تنش رشد کنند (شکل ۱). کاهش ۵۵/۹۱٪ و ۵۵/۳۱٪ وزن تر و خشک بخش هوایی در شوری ۱۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد، با افزودن ۱۰ میکرومولار روی به ترتیب ۴۰/۷۴ و ۳۷/۵٪ تغییر یافت. کاهش ۶۸/۳٪ و ۶۶/۶٪ وزن تر و خشک ریشه نیز با افزودن ۱۰ میکرومولار روی ۶۰٪ محاسبه شد (شکل ۲).

نتایج اثر تیمار روی به تنهایی

تمامی شاخص های رشد مورد بررسی با افزایش تیمار روی افزایش معنی داری نشان دادند. به طوری که بیشترین مقدار شاخص های رشد در تیمار ۱۰ میکرومولار روی مشاهده شد. بیشترین میزان پروتئین در ۱۰ میکرومولار روی با ۲۲٪ افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد. البته مقدار پروتئین در تیمار ۱۰ میکرومولار روی ۱۴/۷۹٪ کاهش را نسبت به شاهد نشان داد. به نحوی که بیشترین میزان I% و فعالیت آنزیم SOD، CAT و GPOX در تیمار ۱۰ میکرومولار روی مشاهده می شود (جدول ۳).

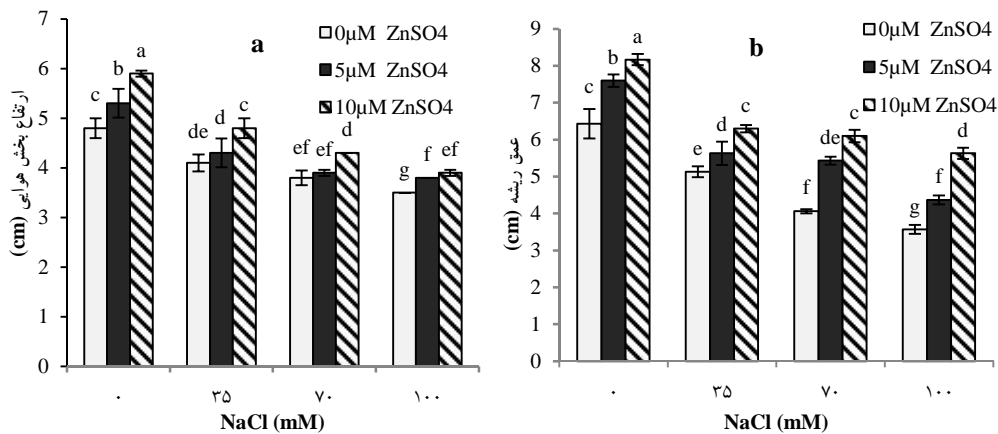
نتایج اثر متقابل تیمار شوری و روی

بیشترین شاخص های رشدی پریش در تیمار ۱۰ میکرومولار روی و کمترین در تیمار ۱۰۰ میلی مولار شوری

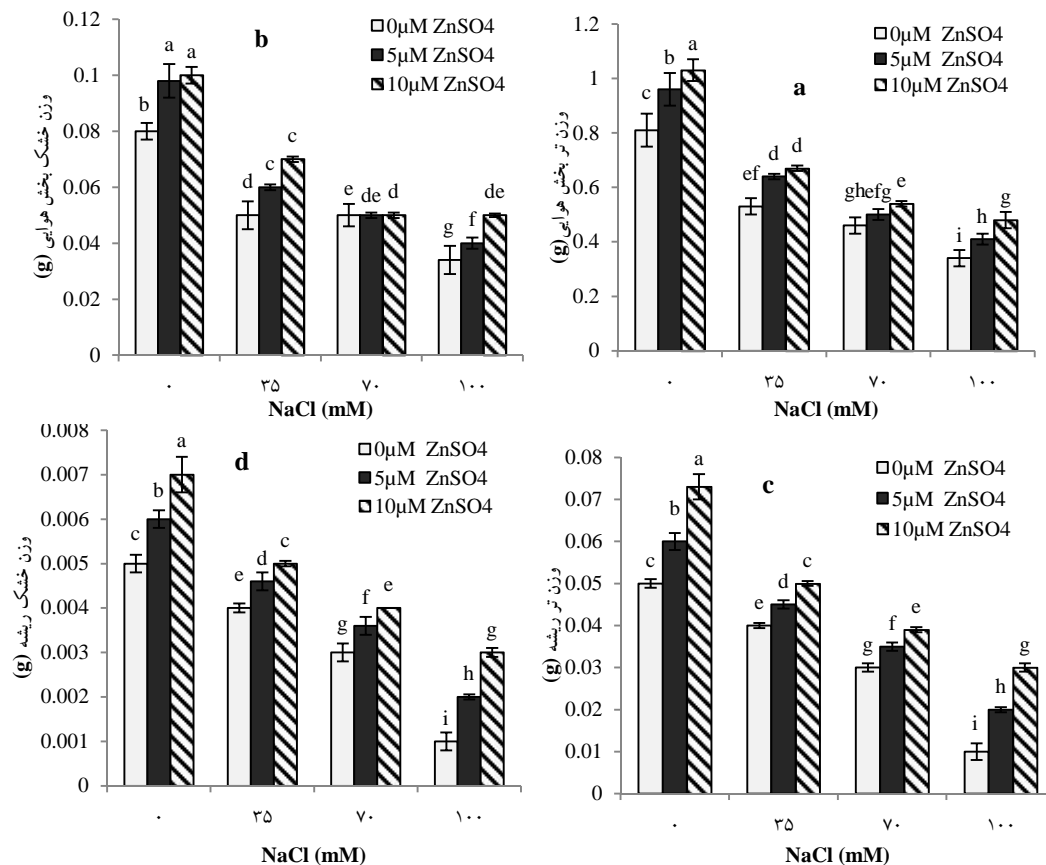
جدول ۳- مقایسه میانگین های اثر تیمار روی بر شاخص های گیاه پریش

تیمار روی (میکرومولار)			شاخص
۱۰	۵	۰	
۴/۷۵ a ± ۰/۸۱	۴/۳۵ b ± ۰/۶۵	۴/۰۶ c ± ۰/۵۲	ارتفاع بخش هوایی (cm)
۶/۵۳ a ± ۱/۰۴	۵/۷۶ b ± ۱/۲۳	۴/۸ c ± ۱/۱۶	عمق ریشه (cm)
۰/۶۸ a ± ۰/۲۲	۰/۶۳ b ± ۰/۲۲	۰/۵۳ c ± ۰/۱۸	وزن تر بخش هوایی (g)
۰/۰۷ a ± ۰/۰۲۲	۰/۰۶ b ± ۰/۰۲۳	۰/۰۵ c ± ۰/۰۲	وزن خشک بخش هوایی (g)
۰/۰۵ a ± ۰/۰۲	۰/۰۴ b ± ۰/۰۲	۰/۰۳ c ± ۰/۰۲	وزن تر ریشه (g)
۰/۰۰۵ a ± ۰/۰۰۲	۰/۰۰۴ b ± ۰/۰۰۲	۰/۰۰۳ c ± ۰/۰۰۲	وزن خشک ریشه (g)
۹/۳۹ c ± ۴/۱۵	۱۰/۰۹ b ± ۴/۳۵	۱۱/۰۲ a ± ۴/۴۶	پروئین (μmol/g FW)
۰/۵۵ a ± ۰/۰۷۳	۰/۵۲ b ± ۰/۰۷۸	۰/۴۵ c ± ۰/۰۹۵	پروتئین (mg/g FW)
۳۰/۸ a ± ۱۴/۳۵	۲۸/۸۷ b ± ۱۳/۳	۲۶/۵۹ c ± ۱۲/۲	بازدارندگی DPPH (I%)
۴۲ a ± ۲۴/۶۱	۳۷/۱۵ b ± ۲۱/۶	۳۰/۸۴ c ± ۱۹/۴۲	فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (unit mg ⁻¹ protein)
۰/۰۲۲ a ± ۰/۰۰۸	۰/۰۲۱ b ± ۰/۰۰۷	۰/۰۲ c ± ۰/۰۰۷	فعالیت کاتالاز (μmol mg ⁻¹ protein min ⁻¹)
۰/۰۴۵ a ± ۰/۰۱۵	۰/۰۴۲ b ± ۰/۰۱۳	۰/۰۴ c ± ۰/۰۱۲	گایاکول پراکسیداز (μmol mg ⁻¹ protein min ⁻¹)

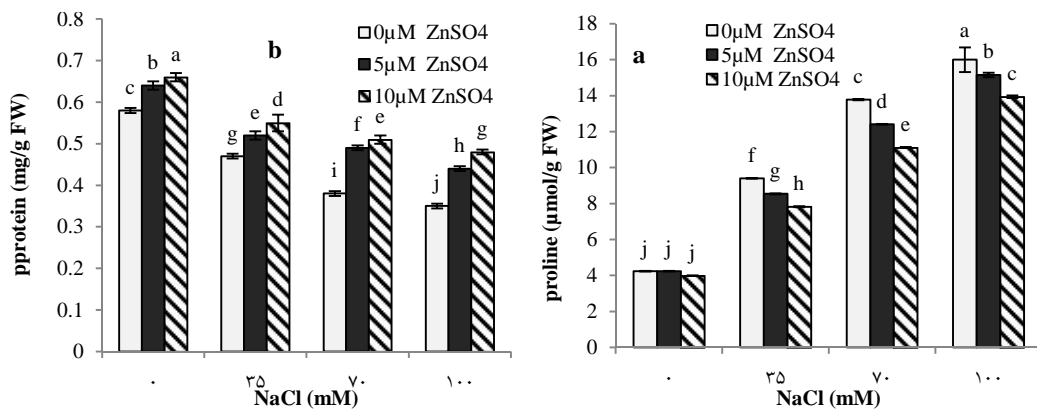
در هر ردیف داده های (میانگین ۳ تکرار ±SD) دارای حروف مشترک اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ در آزمون دانکن ندارند.



شکل ۱- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل شوری و تیمار روی بر (a) ارتفاع بخش هوایی و (b) عمق ریشه پریش خطوط و حروف غیرمشابه به ترتیب نشان‌دهنده انحراف میانگین (SD) و معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد.

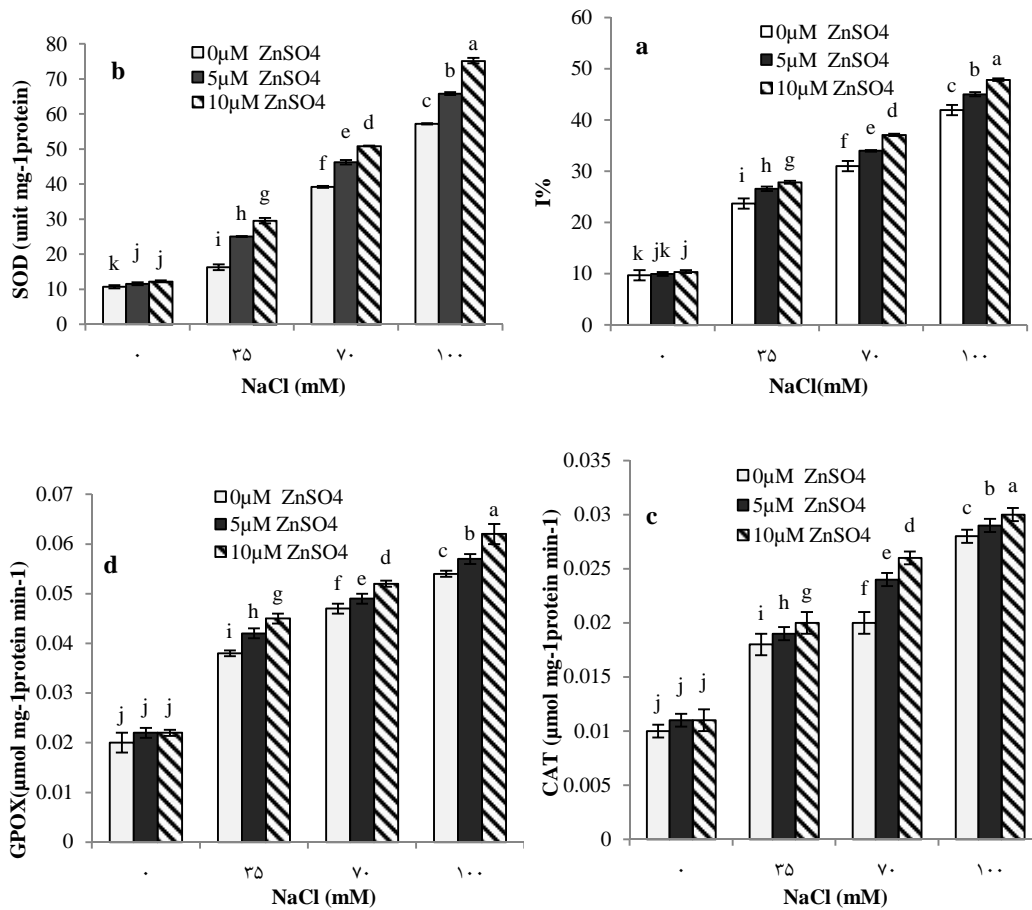


شکل ۲- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل شوری و روی بر (a) وزن تر، (b) وزن خشک بخش هوایی (ساقه و برگ)، (c) وزن تر، (d) وزن خشک و (g) ریشه پریش خطوط نشان‌دهنده انحراف میانگین (SD) است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها برای هر شاخص می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمار شوری و روی بر میزان (a) پرولین و (b) پروتئین پریش

خطوط نشانه انحراف میانگین SD و حروف غیرمشابه نشانه معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌هاست.



شکل ۴- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمار شوری و تیمار روی بر (a) درصد تخریب DPPH (%), (b) فعالیت سوپراکسید دیسموتاز،

(c) کاتالاز و (d) گایاکول پراکسیداز پریش

خطوط نشان‌دهنده انحراف میانگین SD و حروف غیرمشابه نشانه معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد.

یا به علت افزایش غلظت یون‌های Na و Cl می‌باشد. شوری رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، زیرا غلظت بالای نمک در محلول خاک با جذب یون‌های مغذی ضروری به‌وسیله گیاه تداخل می‌کند. از طرفی تنش شوری سنتز آبسزیک اسید را القا می‌کند و آبسزیک اسید سبب بسته شدن روزنه‌ها می‌شود. در نتیجه بسته شدن روزنه‌ها فتوسنتز کاهش می‌یابد و مهار نوری و تنش اکسیداتیو اتفاق می‌افتد (Tester & Davenport, 2003).

بهبود وضعیت تغذیه‌ای روی می‌تواند به حفاظت گیاهان در برابر سمیت نمک کمک کند، بنابراین برای رشد گیاه در شرایط شور مهم است. این نقش حفاظتی روی به نقش این عنصر در نگهداری تمامیت ساختاری غشاء پلاسمایی و کنترل جذب Na و یون‌های سمی دیگر نسبت داده می‌شود (Weisany *et al.*, 2012). بررسی گیاه فلفل، کاهش تولید ماده خشک بخش هوایی را تحت تنش شوری نشان داد. با کاربرد روی در این شرایط میزان این کاهش‌ها بسیار کمتر از زمانی بود که گیاهان تنها با شوری تیمار شده بودند و روی دریافت نکرده بودند (Aktas *et al.*, 2006). به علت نقش روی در بیوسنتز ایندول-۳-استیک اسید از طریق پیش‌ماده تریپتوفان، افزودن روی به گیاهان تحت تنش شوری، باعث غلبه گیاه بر اثرات زیان‌آور شوری می‌شود (Mousavi, 2011). روی یکی از عناصر مهم متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌باشد. تعداد زیادی از آنزیم‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، به‌وسیله روی فعال می‌شوند. علاوه بر کربونیک انیدراز، آنزیم‌های فروکتوز-۱،۶-بیس فسفات و آلدولاز به‌وسیله روی فعال می‌شوند (Mousavi, 2011). همچنین عنصر روی ظرفیت جذب و انتقال آب را در گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهد و اثرات زیان‌آور دوره‌های کوتاه مدت تنش شوری و گرما را کاهش می‌دهد (Tavallali *et al.*, 2010).

نتایج این بررسی افزایش معنی‌دار پرولین را همراه با افزایش سطوح شوری نشان می‌دهد. تیمار پرپوش تحت تنش شوری با روی باعث کاهش محتوای پرولین گیاه تحت تنش شد. نتایج مشابه برای سویا نیز (Weisany *et al.*,

بیشترین و کمترین میزان پروتئین به ترتیب در تیمار ۱۰ میکرومولار روی (بدون شوری) و ۱۰۰ میلی‌مولار شوری (بدون روی) مشاهده می‌شود. کاهش ۳۳٪ میزان پروتئین در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد با افزودن ۱۰ و ۵ میکرومولار روی به کاهش ۱۷/۲۴ و ۲۴/۱۳ درصدی تغییر کرد. افزایش ۳/۶۴ برابری پرولین در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار، در حضور ۱۰ و ۵ میکرومولار روی به ترتیب به افزایش ۳/۲۸ و ۳/۵۷ برابری تغییر کرد (شکل ۳). کمترین میزان I% (درصد تخریب رادیکال DPPH) و مقدار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز در گیاهان شاهد مشاهده می‌شود. در سطوح مختلف شوری با افزایش روی میزان I% و فعالیت هر سه آنزیم افزایش معنی‌داری می‌یابد. به طوری که بیشترین میزان I% و فعالیت هر سه آنزیم در گیاهان تحت شوری ۱۰۰ میلی‌مولار که به ترتیب ۱۰، ۵ و ۰ میکرومولار روی دریافت کرده‌اند، مشاهده می‌شود. در این تیمارها میزان I% به ترتیب ۳۹۲/۸۹٪، ۳۶۳/۵٪ و ۳۳۱/۹۲٪ نسبت به شاهد افزایش نشان می‌دهد. در همین تیمارها افزایش فعالیت آنزیم SOD به ترتیب ۶۰۳/۱۷٪، ۵۱۵/۱۴٪ و ۴۳۴/۴۸٪، افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز به ترتیب ۲۰۰٪، ۱۹۰٪ و ۱۸۰٪ و برای GPOX ۲۱۰٪، ۲۰۰٪ و ۱۷۰٪ نسبت به شاهد مشاهده می‌شود (شکل ۴). در سایر سطوح شوری (۳۵ و ۷۰ میلی‌مولار) نیز افزودن روی اثرات مشابهی را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار ارتفاع بخش هوایی، عمق ریشه، وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه گیاه پرپوش را در معرض تنش شوری نشان داد، به طوری که با افزودن روی به محیط شور، شاخص‌های رشدی فوق بهبود یافتند. البته نتایج مشابه برای گیاه سویا نیز گزارش شده است (Weisany *et al.*, 2012). کاهش رشد گیاهان تحت تنش شوری به علت تأثیر شوری بر فرایندهای بیوشیمیایی از قبیل جذب CO_2 و نیتروژن، سنتز پروتئین و

پروتئین برگ را تا حدودی تسکین داد. البته نتایج مشابه برای پسته نیز گزارش شده است (Tavallali et al., 2010). غلظت بالای سدیم از جذب مواد غذایی دیگر از قبیل پتاسیم جلوگیری می‌کند که می‌تواند از طریق تداخل سدیم در انتقالات غشاء پلاسمایی ریشه، از قبیل کانال‌های یونی انتخابی پتاسیم و یا کاهش رشد ریشه به واسطه غلظت‌های بالای سدیم باشد. میزان بالای سدیم یا نسبت بالای سدیم به پتاسیم فرایندهای آنزیماتیک متنوعی را در سیتوپلاسم مختل می‌کند. پتاسیم در سنتز پروتئین به‌عنوان متصل‌کننده tRNA به ریبوزوم‌ها عمل می‌کند، بنابراین اختلال در سنتز پروتئین آسیب اصلی سدیم است (Tester & Davenport, 2003). کاهش پروتئین در غلظت‌های بالای NaCl ممکن است به دلیل هیدرولیز پروتئین نیز باشد. روی عنصر ضروری برای سنتز پروتئین و حفظ تمامیت غشاهای زیستی است. در کمبود روی سنتز پروتئین متوقف می‌شود و آمینواسیدها و آمیدها تجمع می‌یابند (Weisany et al., 2012).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار شوری باعث افزایش میزان محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود. تیمار روی در این شرایط به این افزایش کمک می‌کند، بنابراین گیاهان تیمار شده با روی و شوری نسبت به آنهایی که تنها با شوری تیمار شده‌اند فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را دارند. مشابه افزایش فعالیت تخریب رادیکال آزاد DPPH در گیاه *Cakile maritime* که تحت تنش شوری (Ksouri et al., 2007) گزارش شده است. تنش شوری به طرق مختلف منجر به تولید گونه‌های اکسیژنی واکنش‌گر در گیاهان می‌شود. گیاهان با کاهش هدایت روزنه‌ای به‌منظور جلوگیری از هدر رفت آب، به تنش شوری پاسخ می‌دهند. با این کار غلظت CO₂ درونی کاهش می‌یابد و احیای CO₂ به‌وسیله چرخه کالوین کم می‌شود (Abogadallah, 2010). این پاسخ منجر به کاهش NADP⁺ (حالت اکسیده) که به‌عنوان پذیرنده نهایی الکترون در فتوسیستم عمل می‌کند، می‌شود. به‌دنبال کاهش NADP⁺ جریان الکترون به O₂ و تشکیل رادیکال O₂⁻ افزایش می‌یابد (Hsu & Kao, 2003). از طرفی کاهش

گزارش شده است. تجمع پرولین را می‌توان به حفظ تعادل اسمزی در سطح سلولی در بسیاری از گیاهان رشد یافته در سطوح شوری بالا نسبت داد (Weisany et al., 2012). سلول با سنتز و تجمع ترکیب‌های محافظ اسمزی مثل پرولین به تنش شوری بلندمدت و کوتاه‌مدت پاسخ می‌دهد. این ترکیب‌ها مولکول‌هایی کوچک و غیرسمی هستند که پتانسیل اسمزی سلول را افزایش می‌دهند (Celik & Atak, 2012). گیاهان با افزایش پتانسیل اسمزی درون بافت‌های خود، غلظت‌های بالای نمک را تعدیل می‌کنند. سنتز پرولین در گیاهان از دو مسیر گلوتامات و اورنیتین انجام می‌شود. در شرایط تنش اسمزی، مسیر گلوتامات منبع اصلی تولید پرولین است. پرولین اکسیداز آنزیم اصلی تنظیم‌کننده تجمع اسمولیت‌ها است که پرولین را به گلوتامات تبدیل می‌کند (Celik & Atak, 2012). ارتباط بین تجمع پرولین و تحمل تنش شوری در مطالعات مختلفی گزارش شده، به‌طوری که مقدار پرولین در گیاهان مقاوم به تنش نسبت به گیاهان حساس بیشتر است (Misra & Gupta, 2005). پرولین ترکیب مهمی است که با تثبیت پروتئین‌ها و غشاء سلولی، سلول‌ها را در برابر تنش‌های اکسیداتیو نیز محافظت می‌کند (Wang & Han, 2009). بنابراین پرولین را می‌توان در فهرست آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی قرار داد که میکروبیوم‌ها، جانوران و گیاهان برای خنثی کردن اثرات بازدارنده ROS به آن احتیاج دارند (Gill & Tuteja, 2010). کاهش محتوای پرولین با تیمار روی ممکن است به اثر رقیق‌سازی مربوط باشد (Weisany et al., 2012). از آنجایی که ژن‌های پرولین طی تنش‌ها بیشتر بیان می‌شوند و پرولین به‌عنوان یک حفاظت‌کننده اسمزی در برابر تنش‌ها عمل می‌کند (Zhu, 2002)، بنابراین کاهش پرولین با افزودن روی نشان می‌دهد که سطوح مورد استفاده روی برای گیاه تنش محسوب نشده و روی با کاهش اثرات زیان‌آور شوری نیاز به سنتز پرولین را در گیاهان تحت تنش کم کرده است.

نتایج مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار محتوای پروتئین را با افزایش شوری نشان داد و تیمار گیاهان پریش تحت تنش شوری با عنصر روی، اثرات منفی شوری بر کاهش

منابع مورد استفاده

- Abogadallah, G.M., 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling and Behavior*, 5(4): 369-374.
- Akhiani, H. and Ghorbani, M., 1992. A contribution to the halophytic vegetation and flora of Iran: 35-44. In: Lieth, H. and Al Masoom, A.A., (Eds). *Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 521p.
- Aktas, H., Abak, K. and Ozturk, L., 2006. The effect of zinc on growth and shoot concentrations of sodium and potassium in pepper plants under salinity stress. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 30(6): 407-412.
- Bates, L.S., Waldron, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studied. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cakmak, I. and Marschner, H., 1992. Manganese deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 98(4): 1222-1227.
- Celik, O. and Atak, C., 2012. The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties. *Turkish Journal of Biology*, 36(3): 339-356.
- de Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C.E.B. and Gomes-Filho, E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 56: 87-94.
- Ghannoum, O., 2009. C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*, 103: 635-644.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2): 309-314.
- Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347: 1-32.
- Hsu, S.Y. and Kao, C.H., 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 39: 83-90.
- CO₂ درونی واکنش‌های چرخه کالوین را کم می‌کند و تنفس نوری را به‌ویژه در گیاهان C₃ القا می‌کند که منجر به تولید H₂O₂ بیشتر در پراکسی‌زوم می‌شود (Ghannoum, 2009). سوپراکسید دیسموتاز در مقاومت گیاهان به تنش‌های اکسیداتیو بسیار مهم است و اولین خط دفاعی را در برابر اثرات سمی ایجاد شده با ROS فراهم می‌کند (Gill & Tuteja, 2010). در گیاهان تعدادی از آنزیم‌ها سطوح H₂O₂ درون سلولی را تنظیم می‌کنند. بنابراین به نظر می‌رسد آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز از مهمترین این آنزیم‌ها هستند (de Azevedo Neto *et al.*, 2006).
- در تیمار NaCl+Zn افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مشاهده شد که علت آن می‌تواند تنش اکسیداتیو ایجاد شده به‌وسیله NaCl و به دنبال آن القاء بیوسنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به‌وسیله روی باشد. بنابراین در شرایط تنش شوری عنصر روی با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، آسیب اکسیداتیو ایجاد شده به‌وسیله تنش شوری را تا حدود زیادی کم می‌کند. این نتایج پیشنهاد می‌کند که آسیب غشایی القاء شده به‌وسیله NaCl و تنش اکسیداتیو به‌طور کارآمدی به‌وسیله مکمل Zn کنترل می‌شود (Tavallali *et al.*, 2010).
- به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان گفت که به‌دلیل تأثیر عنصر روی بر ساخت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، این عنصر عامل مهمی در سیستم دفاعی گیاه در برابر گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد. بنابراین، بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه پرپوش با عنصر روی به‌صورت محلول‌پاشی بر روی برگ یا همراه آبیاری، برای بقاء این گیاه تحت شرایط تنش اکسیداتیو ناشی از شوری حائز اهمیت است. با توجه به آهکی بودن خاک‌های ایران و شرایط خشک و نیمه‌خشک کشور با بارندگی کم که موجب کاهش شدید حلالیت عناصر ریزمغذی به‌ویژه روی در خاک می‌گردد و همچنین عدم رواج کودهای محتوی روی، به نظر می‌رسد که روش محلول‌پاشی مناسب‌تر باشد، از این‌رو مقایسه روش محلول‌پاشی یا آبیاری ریزمغذی عنصر روی در تحقیقات بعدی پیشنهاد می‌گردد.

- Polle, A., Otter, T. and Seifert, F., 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea Abies* L.). *Plant Physiology*, 106: 53-56.
- Tavallali, V., Rahemi, M., Eshghi, S., kholdebarin, B. and Ramezani, A., 2010. Zinc alleviates salt stress and increases antioxidant enzyme activity in the leaves of pistachio (*Pistacia vera* L. Badami) seedlings. *Turkish Journal Agriculture Forestry*, 34(4): 349-359.
- Tester, M. and Davenport, R., 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annual Botany*, 91(5): 503-527.
- Wang, X.S. and Han, J.G., 2009. Changes in proline content, activity, and active isoforms of antioxidative enzymes in two alfalfa cultivars under salt stress. *Agriculture Science in China*, 8(4): 431-440.
- Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, G., Siosemardeh, A. and Ghassemi-Glezani, K., 2012. Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Omics Journal*, 5(2): 60-67.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review Plant Biology*, 53: 247-273.
- Jaleel, C.A., Sankar, B., Sridharan, R. and Panneerselvam, R., 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turkish Journal of Biology*, 32: 79-83.
- Jouyban, Z., 2012. The effect of salt stress on plant growth. *Technical Journal of Engineering and Applied Science*, 2(1): 7-10.
- Kamkar, A., Shariatifar, N., Jamshidi, A.H. and Mohammadian, M., 2010. Study of antioxidant functional of the water, methanol and ethanol extracts of endemic *Cuminum cyminum* L. and *Cardaria draba* L. in the in-vitro systems. *Horizon of Medical Sciences*, 16(2): 37-44.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C. and Abdelly, C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 244-249.
- Misra, N. and Gupta, A.K., 2005. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Science*, 169(2): 331-339.
- Mousavi, R.S., 2011. Zinc in crop production and interaction with phosphorus. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(9): 1503-1509.

Study of variability in growth, antioxidant defense system and protein content by zinc element application in periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) under salinity stress

M. Askary^{1*}, F. Amini² and L. Hosseinpour³

1*- Corresponding author, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
E-mail: m-askary@araku.ac.ir

2- Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

3- MSc. Student of Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

Received: April 2014

Revised: October 2014

Accepted: November 2014

Abstract

Salinity stress is one of the major abiotic stresses that have destructive effects on plant productivity and quality. An experiment was conducted to investigate the effects of zinc as alleviating agent under salinity stress on antioxidative system, proteins, proline and growth of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. at Arak University in 2012 autumn. A number of 49-days-old plants were treated with different concentrations of NaCl (0, 35, 70 and 100mM) alone and in combination with various ZnSO₄ concentrations (0, 5 and 10µm) for 21 days. Then, the inhibition percent of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and guaiacol peroxidase, proline and protein content and growth parameters were measured. Results showed that zinc application improved shoot length, root depth, root and shoot fresh and dry weight under all salinity treatments. As a result of salinity stress, the inhibition percent of DPPH radical and superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase activity and also proline content increased 348.5%, 475.6%, 172.7%, 200% and 364%, respectively but protein content was reduced 33%. Zinc application improved protein content up to 16% in plants under salinity treatment and also reduced the proline content up to 36%. The activity of antioxidant enzymes increased significantly in treated plants with NaCl+Zn as compared with those treated with NaCl or Zn alone. These results support the positive effects of Zn application on antioxidant defense system in vinca under salinity. Zinc may act as a scavenger of reactive oxygen species for mitigating the injury on biomembranes under salt stress.

Keywords: Proline, alleviator, superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase.