بررسی اثرات بر هم کنش نمک (NaCl) و سالیسیلیک اسید (SA) بر روی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در دو رقم کلزا (هایولا ۴۰۱ و RGS)

*حسین لاری یزدی[۱]، عبدالکریم حقیر چهرگانی[۲]، احسان نظربیگی[۱]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

چکیده

به منظور بررسی اثرات توأم شوری و سالیسیلیک اسید از ارقام کلزا با نام‌های هایولا ٤٠١ و RGS استفاده گردید. پس از کشت بذرها در محیط آزمایشگاهی، دانه‌رست‌های سالم به محیط کشت نیم قدرت هوگلند در ظرف‌های با ظرفیت ٦٥٠ml انتقال داده شدند. پس از گذشت مدت زمان ٢٤ ساعت، تحت تیمارهای مختلف نمک و سالیسیلیک قرار گرفتند. گیاهان مذکور در اتاقک‌های تعیین شده در دوره روشنایی و تاریکی به ترتیب ١٦ و ٨ ساعت قرار گرفتند. گیاهان مذکور به منظور تهویه هوای ظروف هر روز به مدت ٢ ساعت مورد هوادهی قرار گرفتند. تیمارهای اعمال شده شامل شوری‌های ٧٥، ١٠٠، ١٥٠ میلی‌مول بر لیتر و میزان سالیسیلیک اسید نیز ٥μM در نظر گرفته شد. پس از گذشت مدت زمان ٢٠ روز سنجش آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در قسمت‌های ریشه و برگ انجام گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده، مشخص گردید که با افزایش میزان تنش شوری، میزان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش در ریشه هر دو رقم بیشتر از برگ نشان داده شد. با افزودن سالیسیلیک اسید با غلظت ٥μM به محیط‌های فوق میزان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز افزایش نشان داد که این امر به از بین بردن اثرات مخرب شوری و تعدیل اثرات آن کمک می‌کند.

کلمات کلیدی: پراکسیداز، سالیسیلیک اسید، کاتالاز، کلزا، نمک

مقدمه

کلزا یا کانولا با نام علمی *Brassica napus* L. گیاهی علفی، یک ساله متعلق به تیره شب‌بو (Brassicaceae) می‌باشد (مظفریان، ١٣٧٣ و دهشیری، ١٣٧٨). در حال حاضر کلزا به عنوان مهمترین گیاه روغنی و پروتئین یکساله در منطقه معتدله سرد و سرد مرطوب کشت شده و همچنین در مناطق نیمه گرم می‌تواند پروتئین و روغن قابل ملاحظه‌ای را در واحد سطح تولید نماید (شهیدی و سپهر، ١٣٨١). شوری یکی از معضلات بسیار مهم در بخش کشاورزی در اغلب نقاط جهان می‌باشد که موجب کاهش عملکرد زراعی و مرغوبیت محصول در مناطق خشک و نیمه خشک می‌گردد (Neumann, 1995). نمک‌های محلول اضافی در تمام خاک‌ها برای اکثر گیاهان مضر می‌باشد و در واقع هیچ ماده سمی، رشد گیاه را بیشتر از نمک در مقیاس جهانی محدود نمی‌کند (Loveday and Rhoades, 1990).

بر اساس تعریف Shanon و Grieve (١٩٩٤) شوری عبارت است از حضور بیش از اندازه نمک‌های قابل حل و عناصر معدنی در محلول آب و خاک که منجر به تجمع نمک در ناحیه ریشه شده، گیاه در جذب آب کافی از محلول خاک با اشکال روبرو می‌شود.

یون‌هایی که در بروز شوری نقش دارند شامل: کلرور، سولفات، بیکربنات، سدیم، کلسیم، منیزیم و به ندرت نیترات

*e.mail: lariyazdi_hossein@yahoo.com

و پتاسیم می‌باشند، اما یون های سدیم و کلر از اهمیت زیادی برخوردارند (Dubey, 1996). اسید سالیسیلیک (SA) یا اورتوهیدروکسی بنزوئیک به گروه متنوع فنول‌های گیاهی تعلق دارد که دارای یک حلقه آروماتیک با یک گروه هیدروکسیل می‌باشد و در گیاهان زیادی موجود است (Weissmann, 1991).

اسید سالیسیلیک (SA) آزاد یک پودر کریستالی است که در دمای ۱۵۷ تا ۱۵۹ درجه سانتیگراد ذوب می‌گردد و به ملایمت در آب حل می‌شود و به شدت در حلال‌های قطبی حل می‌گردد (Popova et al., 1997). در طول سال‌های اخیر عمل سالیسیلیک اسید در ایجاد آثار حفاظتی در گیاهان تحت اثر فاکتورهای استرسی در شرایط طبیعی مورد مطالعه قرار گرفته است که می‌توان به افزایش تحریک اسید سالیسیلیک (SA) در مقاومت گیاه گندم به شوری اشاره کرد (Shakirova and Bezrukova, 1997). اسید سالیسیلیک موجب فعال شدن بسیاری از آنزیم‌های حفاظتی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز می‌گردد. این آنزیم‌ها، سم‌زدایی از گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) را بر عهده دارند. سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدان گیاهی، شامل چندین آنزیم با وزن مولکولی پایین می‌باشد که از نظر سطح سلولی، در گیاهان مختلف، متفاوتند (Dixit et al., 2001). کاتالاز یک آنزیم گیاهی دارای گروه Heme است و در همه موجودات یوکاریوتی هوازی یافت می‌شود که در فرآیند تبدیل H_2O_2 را به آب و اکسیژن دخالت دارد. پراکسیداز نیز آنزیم هموپروتئینی است که وجود Heme برای فعالیت آپوپروتئین آن ضروری است. از وظایف این دو آنزیم، حذف مقادیر اضافی و دخالت در تنظیم دقیق H_2O_2 سلولی است (Nector and Foyer, 1998).

مواد و روش‌ها

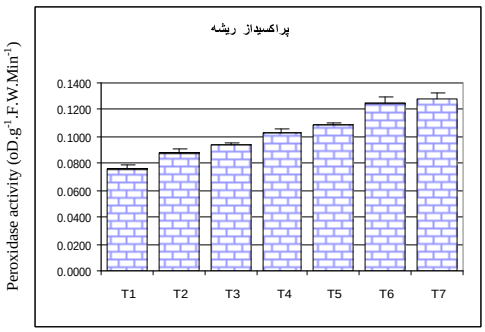
بذرهای مورد استفاده در این تحقیق متعلق به گونه *Brassica napus* L. و ارقام هایولا ٤٠١ و RGS می‌باشند، بذرهای که از محل مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان لرستان تهیه گردیدند. ابتدا بذرهای سالم و یکنواخت انتخاب شده و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ قرار گرفتند و به صورت سطحی ضدعفونی شدند. سپس بذرها چندین بار با آب مقطر شستشو داده شدند. در مرحله بعدی بذرها به سبدهایی با منافذی به ابعاد تقریبی ۲×٤mm و ۱×۳mm در تماس سطحی با آب، انتقال داده شدند و تا زمان رسیدن به مرحله دو برگی از این محیط استفاده شد. پس از گذشت یک هفته گیاهان یکنواخت انتخاب شده و از سبدها به ظروف تیره (٦٥٠ میلی‌لیتر) حاوی محلول هوگلند نیم قدرت (هیدروپونیک) انتقال یافتند. پس از گذشت مدت زمان ٢٤ ساعت تحت تیمارهای مختلف (غلظت‌های ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl، ۵μM، سالیسیلیک اسید) قرار گرفتند. به منظور جلوگیری از خفگی ریشه‌ها و رساندن اکسیژن کافی برای رشد ریشه‌ها هر روز به مدت ۲ ساعت از طریق پمپ هوا، هوادهی می‌شدند. گیاهان برای مدت ۲۰ روز در اتاقکی با شرایط نوری مناسب در زیر ٦ عدد لامپ فلورسانت ۲۰ وات و ۲ عدد لامپ حبابی بزرگ آفتابی و در دما و رطوبت آزمایشگاه رشد کردند. طول دوره روشنایی و تاریکی به ترتیب ١٦ و ٨ ساعت بود و pH در تمام محلول‌های غذایی تهیه شده در حد ٦/٥ تنظیم گردید. پس از گذشت مدت زمان ۲۰ روز برداشت گیاهان به منظور اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و از روش Chance and Maehly (۱۹۹۵) و روش Koroi (۱۹۸۹) استفاده گردید. جهت سنجش آنزیم پراکسیداز ابتدا محلول عصاره‌گیری با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر و pH ۷/۵ تهیه گردید، سپس با استفاده از یک گرم بافت تر گیاهی (برگ و ریشه به صورت جداگانه) ۵ میلی‌لیتر محلول عصاره، عصاره‌ی همگن بدست آمد. جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز نیز پس از تهیه عصاره گیاهی و سانتریفیوژ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون دانکن در سطح $p<۰/۰۵$ و آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

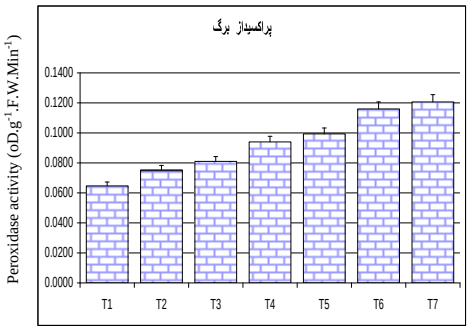
آنالیز واریانس نتایج بدست آمده از سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در هر دو رقم هایولا ٤٠١ و RGS نشان داد که با افزایش میزان کلرید سدیم به ترتیب از ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار میزان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز افزایش می‌یابد. کلرید سدیم سبب افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) آنزیم پراکسیداز در برگ و ریشه در هر و رقم شد،

که این افزایش در ریشه بیشتر از برگ در هر دو رقم می‌باشد. در رقم هایولا ٤٠١، میزان آنزیم پراکسیداز در برگ گیاه تحت تیمارهای ٧٥، ١٠٠ و ١٥٠ میلی‌مولار کلرید سدیم افزایش نشان داد که این افزایش در تمامی تیمارهای مذکور معنی‌دار می‌باشد، در همین رقم، میزان آنزیم پراکسیداز ریشه نیز همزمان با افزایش سطوح شوری به ترتیب در تیمارهای ٧٥، ١٠٠ و ١٥٠ میلی مولار کلرید سدیم افزایش یافت. با افزودن ٥μM سالیسیلیک اسید به هر کدام از تیمارهای ٧٥، ١٠٠ و ١٥٠، میزان آنزیم پراکسیداز در برگ و ریشه به صورت معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش یافت که نشان دهنده تعدیل تنش در تیمارهای مذکور می‌باشد (نمودارهای ١ و ٢).

در رقم RGS میانگین آنزیم پراکسیداز در برگ گیاه تحت تیمارهای ذکر شده افزایش و در ریشه هم به همین ترتیب بود که این مقدار افزایش در ریشه بیشتر از برگ نشان داده شده شد. با کاربرد همزمان ٥μM سالیسیلیک اسید میزان آنزیم پراکسیداز بصورت معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش یافت (نمودارهای ٣ و ٤).

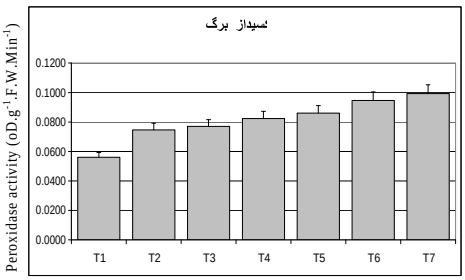


نمودار ١: بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه رقم هایولا ٤٠١



نمودار ٢: بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ رقم هایولا ٤٠١

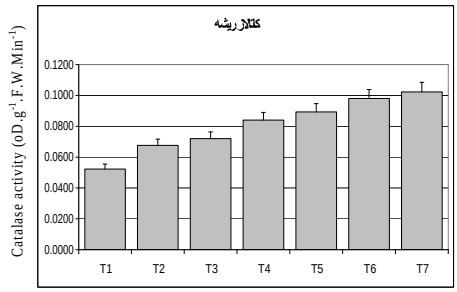
نمودار ٣: بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه رقم RGS



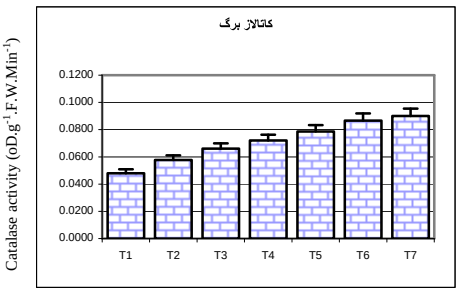
T4	NaC100	T1	Control
T5	NaCl100+SA	T2	NaCl75
T6	NaCl150	T3	NaCl75+SA
T7	NaCl150+SA		

نمودار ٤: بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ رقم RGS

با مقایسه دو رقم از نظر آنزیم پراکسیداز در برگ و ریشه، افزایش آنزیم پراکسیداز در اثر تنش کلرید سدیم در رقم هایولا ٤٠١ بیشتر از رقم RGS بود و افزایش آنزیم پراکسیداز در اثر اعمال تیمار سالیسیلیک اسید در رقم هایولا ٤٠١ بیشتر از RGS بود. کلرید سدیم سبب افزایش معنی‌دار ($p<0/05$)، آنزیم کاتالاز در برگ و ریشه هر دو رقم شد. در رقم هایولا ٤٠١، میزان آنزیم کاتالاز در برگ گیاه در تیمارهای مذکور افزایش یافت که این افزایش برای رقم RGS نیز مشاهده گردید. میزان آنزیم کاتالاز ریشه در گیاه در رقم هایولا ٤٠١ و RGS با افزایش شوری افزایش یافت که این افزایش در هر دو رقم معنی‌دار ($p<0/05$) می‌باشد. میزان افزایش آنزیم کاتالاز در ریشه در هر دو رقم بیشتر از برگ می‌باشد. با اعمال تیمارهای سالیسیلیک اسید (٥μM) به تیمارهای ٧٥،١٠٠ و ١٥٠ میلی‌مولار کلرید سدیم، افزایش معنی‌داری ($p<0/05$) در میزان آنزیم کاتالاز در برگ و ریشه هر دو رقم مشاهده گردید (نمودارهای ٥، ٦، ٧ و ٨).

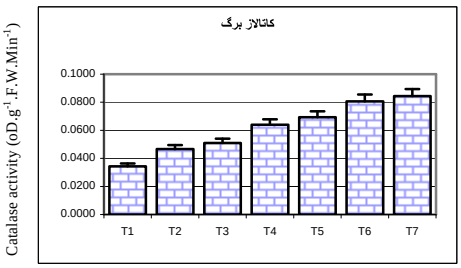


نمودار ۵: بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه رقم هایولا ۴۰۱



نمودار ٦: بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ رقم هایولا ۴۰۱

نمودار ۷: بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه رقم RGS.



نمودار ۸: بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ و ریشه رقم RGS

T4	NaC100	T1	Control
T5	NaCl100+SA	T2	NaCl75
T6	NaCl150	T3	NaCl75+SA
T7	NaCl150+SA		

با مقایسه دو رقم از نظر میزان افزایش آنزیم کاتالاز این افزایش در اثر تنش شوری در رقم هایولا ۴۰۱ بیشتر از رقم RGS بود و با اعمال تیمار سالیسیلیک اسید، افزایش در میزان آنزیم کاتالاز در رقم هایولا ۴۰۱ بیشتر از رقم RGS بود.

بحث

کاتالازها و پراکسیدازها از جمله آنزیم‌هایی به شمار می‌آیند که نقش بسیار مهمی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش شوری دارند. پراکسیدازها مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسیداز هیدروژن می‌باشند (Shalini and Duey, 2003). کاتالاز نیز یک آنزیم فراوان گیاهی دارای گروه هِم بود، که در همه موجودات یوکاریوتی هوازی یافت می‌شود که فرآیند تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند. گزارش‌های متعددی وجود دارند که حاکی از افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز تحت تنش زیستی و غیرزیستی می‌باشند که می‌توان به افزایش فعالیت پراکسیداز تحت اثر کلرید سدیم در گوجه فرنگی اشاره نمود (Ajloini et al., 1998).

Sudhakar و همکاران (۲۰۰۱) در بررسی اثر شوری در دو رقم توت سفید (*Morus alba* L.) ملاحظه نمودند که فعالیت کاتالاز و پراکسیداز تحت استرس شوری به طور معنی‌داری افزایش یافت. درصد فعالیت در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود. افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در دانه رست‌های گندم تحت شوری توسط Sairam و همکاران در سال ۲۰۰۲ مورد بررسی قرار گرفت. Neto و همکاران در ۲۰۰۵ ضمن مطالعه اثر شوری بر ذرت گزارش کردند که تحت استرس شوری فعالیت پراکسیداز در رقم بردبار افزایش می‌یابد.

برخی از محرک‌های زیستی مثل سالیسیلیک اسید (SA) موجب ساخت آنتی اکسیدان‌ها مثل کاتالاز و پراکسیداز می شوند که با این عمل موجب پاکسازی گونه‌های اکسیژن فعال که در طی تنش ایجاد شده‌اند، می‌شوند. SA به طور مستقیم یا غیرمستقیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را فعال می‌کند که می‌تواند به عنوان یک سوبسترای دهنده الکترون برای کاتالاز و پراکسیداز عمل نماید و در کاهش تنش به وجود آمده نقش مهمی بازی می‌کند (Zhinin Xie et al., 1991).

با توجه به نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر مشخص گردید که تنش شوری باعث آزاد شدن رادیکال‌های آزاد و به وجود آمدن استرس اکسیداتیو می‌شود که منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز می‌گردد. این آنزیم‌های سم‌زدا در کاهش تنش به وجود آمده و حذف مقادیر اضافی H_2O_2 نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. سالیسیلیک اسید نیز با افزایش تحریک آنزیم‌های آنتی اکسیدان در شرایط تنش باعث به وجود آمدن یک سیستم تعدیل کننده تنش در گیاه می‌گردد.

منابع

دهشیری، ع. (۱۳۷۸). زراعت کلزا. انتشارات فنی دفتر تولید برنامه‌های ترویجی وزارت جهاد کشاورزی.

شهیدی، ا. سپهر، ک. (۱۳۸۱). شته های کلزا. انتشارات فنی معاونت ترویج وزارت جهاد کشاورزی.

مظفریان، و. (۱۳۷۳). رده‌بندی گیاهی. انتشارات نشر دانش‌آموز.

Ajlouni, M., Mohammad, M., Nimril., Shibli, R. (1998). Tomato root and shoot response to salt stress under different levels of phosphorus nutrition, *Journal of Plant nutrition*. 12: 854-861.

Chance, B., Maehly, C. (1995). Assay of catalase and peroxidase, *Methods in Enzymol*., 11: 764-775.

Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001). Differential antioxidative responses to heavy metal in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. CV. Azad). *J. of Exp. Bot*., 52: (358): 1101-1109

Dubey, R.S. (1994). Protein synthesis by plant under stressful conditions, In Hand book , of plant and crop stress (*ed.M. pessarakli*)., 277-299.

Koroi, S.A.A. (1989). Gelek trophers tische and spectral photometris chon under change zomein fiussder temperature. And stracture peroxides isoenzyme, *Physiol. Veg*., 20: 15-22.

Nector, G., Foyer, C.H. (1998). Ascorbat and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant. Mol. Biol*., 49: 249-279.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در هر دو رقم کلزا (هایولا RGS و ٤٠١) تحت تیمارهای نمک و نمک همراه اسید سالیسیلیک افزایش نشان می‌دهند. فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه و برگ هایولا ٤٠١ تحت تیمارهای مختلف بیش از RGS بود. نتایج مشابهی در مورد فعالیت کاتالاز دیده شد. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که رقم هایولا ٤٠١ بردباری بیشتری نسبت به شوری و شوری همراه اسید سالیسیلیک از خود نشان می‌دهد.

Neto, A.D., Gomes–Filo, E. (2005). Effect of salt stress on antioxidant and lipid peroxidation in leaves and roots of salt – tolerant and salt – sensitive maize genotype, *Environmental and EXP Bot*., 56(1): 87-94.

Neumann, P.M. (1995). Inhibition of root growth by salinity stress: Toxicity or on adaptive biophysical response, *The Netherlands: Kluwer Academic publishers*. PP: 229-304.

Popova, L., Pancheva. T., Uzunova, A. (1997). Salicylic acid: Properties, Biosynthesis and Physiological role. *Bulge. J. Plant Physiol*., 23:85-83.

Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002). Change in antioxidant activity subcellular function of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant. Mol. Biol*, 162: 897-904.

Shakirova, F.M., Bezrokova, M.V. (1997). Induction of wheat resistance against environmental salinization by salicylic acid, *Biology Biol Bull*., 24: 109-112.

Shalini, V., Duey, R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, *Plant Science*., 164: 1645-1655.

Shannon, M.C., Griere, C.M., and Francois, L.E. (1994). Whole plant response to salinity, *Marcel Dekker*, New York., 199-244.

Sudhakar, C. (2001). Change in the antioxidant enzyme efficacry in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba L.*) under NaCl Salinity. *Plant Science*. 161: 613-619.

Weissmann, G. (1991). Aspirin. *Sci. Am*., 264: 84-90.

The study of interaction effects of salt (NaCl) and salicylic acid (SA) on activity of catalase and peroxidase enzymes in two cultivar of canola (Hayola 401 and RGS)

Lari Yazdi, H[1]., Chehregani, A[2]., Nazarbeygi, A[1].
1. Department of Biology, Islamic Azad University, Broujerd Branch, Iran
2. Department of Biology, Bou-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Abstract

In order to study of interaction effects of salt and salicylic acid, it was used two cultivars of canola (Hayola 401 and RGS). Canola seeds were provided from Lorestan Agriculture Research Center in this experiment. After culturing seeds in experimental environment, the intact seedling transferred to Hogland half-power culture in the dishes with 650ml capacity. After 24 hours, the plants were placed under different treatment with the salt and salicylic acid. Canola plants were placed in determined rooms and in the light and the dark periods 16 and 8 hours respectively in order to ventilation the dishes were airing every day. The treatments were included 75,100,150mM salt and 5μM salicylic acid. After 20 days, catalase and peroxides activity were tested in the root and leaves of plant. With respect to the results achieved in this research, it was determine that when salinity stress increased, the amount of catalase and peroxidase activity increased. This increase in the roots was more than leaves in both cultivar of canola. With adding 5μM salicylic acid in above environment, it showed the increase of catalase and peroxidase activity, so this case helps to reduce destructive effects of salinity and balance its effects.

Keywords: Canola, Catalase, Peroxidase, Salicylic acid (SA), Salinity.