اثر اسید سالیسیلیک و کلرید سدیم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ برنج تحت تنش شوری

عمار بهاری اردشیری[1*]، یوسف نیک‌نژاد[2]، هرمز فلاح آملی[2]، عباس عظیم‌نژاد[3]

چکیده

به‌منظور بررسی اثر کاربرد اسید سالیسیلیک بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ برنج (رقم طارم هاشمی) تحت تنش شوری، پژوهشی در سال ١٣٩٤ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی انجام گرفت. بدین‌منظور در مرحله سه برگی، گیاهچه‌های مورد مطالعه با سه سطح نمک کلریدسدیم (شامل صفر، ٤٠ و ٨٠ میلی‌مولار NaCl) و سه سطح اسید سالیسیلیک (شامل صفر، ٠/٥ و یک میلی‌مولار) تیمار گردیدند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. مطابق نتایج، کلرید سدیم اثر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز داشت، اما اثر تیمار اسید سالیسیلیک بر آنزیم کاتالاز معنی‌دار نبود. اثرات متقابل تیمارهای کلرید سدیم و اسید سالیسیلیک نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار از لحاظ میزان آنزیم‌های یادشده بود. فعالیت این آنزیم‌ها با افزایش شوری به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. اسید سالیسیلیک ٠/٥ میلی‌مولار نیز در شرایط بدون شوری و شوری میلی‌مولار NaCl باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم‌ها گردید. به‌طورکلی، نتایج نشان داد که اسید سالیسیلیک با تشدید افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (تا حد متوسط شوری) باعث پالایش کارآمدتر انواع اکسیژن فعال گردید.

کلمات کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، اسید سالیسیلیک، برنج، کاتالاز، کلرید سدیم

١ - دانشجوی دکتری زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی. پست الکترونیک: Bahariardeshiri@yahoo.com
تلفن: ٠٩١١١٥٦٣٠١٥
٢ - استادیار گروه زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی
٣ - دانشجوی دکتری زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی

مقدمه

در تعریف تنش شوری آمده است که اگر غلظت نمک به میزانی باشد که باعث کاهش پتانسیل آب به اندازه ۰/۰۵- تا ۰/۱- مگاپاسکال گردد، به آن تنش ناشی از نمک گفته می‌شود (لیویت، ۱۹۸۰). از اثرات سوء تنش شوری می‌توان به تخریب غشای سلولی، افزایش تولید انواع اکسیژن فعال[٤] (ROS) و تولید متابولیت‌های سمی اشاره کرد. (جین و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن در گیاه باعث می‌شود که برای کاهش اثرات سمی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، مکانیسم‌های متنوعی در گیاه فعال شود. در این شرایط میزان آنتی‌اکسیدان‌ها افزایش یافته و آنزیم‌های مهارکننده ROS ها در جهت کاهش اثرات سمی ناشی از تنش، افزایش پیدا می‌کنند (حمید و همکاران، ۲۰۰۸). جهت خنثی‌سازی سمیت گونه‌های اکسیژن فعال، سیستم دفاعی کارآمد آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول‌های گیاهی وجود دارد که از تشکیل این رادیکال‌ها جلوگیری و یا آن‌ها را پاکسازی می‌کند. از این آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توان به آنزیم‌های، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز اشاره کرد (بلوخینا و همکاران، ۲۰۰۳). کاتالاز (CAT) از شناخته‌شده‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که نقش مهمی در جمع‌آوری پراکسیدهیدروژن و کاهش اثرات تخریبی آن در پراکسی‌زوم و گلی‌اکسی‌زوم (اسکین و همکاران، ۲۰۱۰) و میتوکندری (فویر و نوکتور، ۲۰۰۰) ایفاء می‌کند. آسکوربات پراکسیداز (APX) یک نقش حیاتی در مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابل تنش‌اکسیداتیو دارد. این آنزیم، پراکسید هیدروژن را در کلروپلاست، سیتوسول، میتوکندری و پراکسی‌زوم سلول‌های گیاهی از بین می‌برد (آسادا، ۲۰۰٦). اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک هورمون گیاهی مطرح شده است (راسکین، ۱۹۹۲) و کاربرد خارجی آن، مقاومت به تنش نمک و خشکی را در گیاهان افزایش می‌دهد (اسزپسی و همکاران، ۲۰۰۵). هدف از این تحقیق بررسی تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز گیاه برنج، به‌منظور بررسی نقش احتمالی اسید سالیسیلیک در تخفیف تنش شوری بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹٤ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. فاکتورهای مورد بررسی در این پژوهش شامل شوری در سه سطح (صفر، ٤۰ و ۸۰ میلی‌مولار NaCl) و اسید سالیسیلیک در سه سطح (صفر، ۰/۵ و یک میلی‌مولار) بود. کشت گیاه برنج (رقم طارم هاشمی) به صورت هیدروپونیک انجام گرفت. ابتدا گیاهچه‌ها در ظروف کاشت با آب مقطر قرار داده شدند تا بذور استقرار یابند. پس از

٤- Reactive Oxygen Species

چند روز، آب مقطر با محیط کشت یوشیدا (یوشیدا و همکاران، ۱۹۷۲) جایگزین شد. محیط کشت یوشیدا هر سه روز یک بار تعویض شد و pH محیط کشت هر روز با استفاده از هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک یک نرمال در سطح ۵/۵ تنظیم شد. گلدان‌ها در گلخانه‌ای با شرایط کنترل‌شده (دما: ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت روشنایی: ۵۰۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه، دوره روشنایی: ۱٦/۸ ساعت، رطوبت نسبی: ٤۰–٤۵ درصد) نگهداری شدند. در مرحلهٔ سه برگی، گیاهچه‌های مورد مطالعه با سه سطح نمک کلرید سدیم، شامل صفر، ٤۰ و ۸۰ میلی مولار تیمار گردیدند که نمک مذکور به همراه محلول غذایی به محیط ریشه اضافه شد. سپس، ۱٤ روز پس از اعمال شوری، نمونه‌گیری از برگ‌ها جهت انجام آزمایشات آنزیمی صورت گرفت. نمونه‌های تر بلافاصله با ازت مایع منجمد شده و به فریزر ۷۰ – درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (روش آئبی و همکاران، ۱۹۸٤) و آسکوربات پراکسیداز (یوشیمورا و همکاران، ۲۰۰۰) بر اساس میزان تجزیه شدن پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به ترتیب در طول موج‌های ۲٤۰ و ۲۹۰ نانومتر با روش اسپکتروفتومتری تعیین گردیدند. در پایان، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

مطابق جدول میانگین مربعات (جدول ۱)، تیمار کلرید سدیم اثر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز داشت. همچنین تیمار اسید سالیسیلیک اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز داشت، اما اثر آن بر آنزیم کاتالاز معنی‌دار نبود. اثرات متقابل تیمارهای شوری و اسید سالیسیلیک نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد از لحاظ میزان آنزیم‌های یادشده بود.

نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد که حداکثر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از ترکیب تیماری ٤۰ میلی‌مولار NaCl و ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک، به مقدار ۰/۰۸٤ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر ترکیب‌های تیماری (به جز ترکیب تیماری ٤۰ میلی‌مولار NaCl و یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک) نشان داد (جدول ۲). حداکثر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز معادل ۰/۱۷۹ از همین ترکیب تیماری حاصل شد که اختلاف معنی-داری با سایر تیمار ها داشت (جدول ۲).

مطابق نتایج، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش شوری به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. اسید سالیسیلیک ۰/۵ میلی‌مولار در شرایط بدون شوری و شوری ٤۰ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم‌ها گردید. کاربرد اسید سالیسیلیک یک میلی‌مولار در سطح شوری ٤۰ میلی‌مولار نیز موجب افزایش معنی‌دار در فعالیت

آنزیم‌های مذکور شد. اما کاهش معنی‌داری در میزان آنزیم‌های یاد شده با اعمال نیمارهای ۰/۵ و یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک در سطح شوری ۸۰ میلی‌مولار، مشاهده شد (جدول ۲).

افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت شرایط شوری قبلاً گزارش شده است (کوکرجا و همکاران، ۲۰۰۵؛ سایرام و همکاران، ۲۰۰۵). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش شوری در گیاهان نشان‌دهنده ارتباط سطح این آنزیم و تحمل شوری است (لی و همکاران، ۲۰۰۱؛ پاریدا و داس، ۲۰۰۵). وایدیاناتان و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز یک راهکار مؤثر در بالابردن مقاومت برنج به تنش شوری به‌شمار می‌آید. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به عنوان آنزیم نهایی چرخه گلوتاتیون – آسکوربات، از اهمیت بالایی برخوردار بوده و فعالیت زیاد آن می‌تواند مانع تجمع اکسیدان‌ها و آسیب به بیومولکول‌های حیاتی سلول گردد (فویر و همکاران، ۱۹۹٤). لی و همکاران (۲۰۰۱) نیز به افزایش فعالیت آنزیم‌های مذکور در گیاه برنج تحت تنش شوری اشاره کردند. افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با کاربرد اسید سالیسیلیک نیز قبلاً توسط پالما و همکاران (۲۰۰۹) و سید و همکاران (۲۰۱۰) تحت تنش‌های متفاوت گزارش شده است. افزایش این آنزیم‌ها، باعث پالایش بهتر انواع اکسیژن فعال می‌گردد (اسکورزینسکا–پولیت و کراپا، ۲۰۰٦).

طورکلی، نتایج نشان داد که اسید سالیسیلیک با تأثیر بر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (تا حد متوسط شوری) باعث پالایش کارآمدتر انواع اکسیژن فعال و افزایش مقاومت به تنش شوری گردید.

جدول ١- میانگین مربعات صفات فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ برنج تحت تیمار اسید سالیسیلیک و شوری

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		آنزیم کاتالاز	آنزیم آسکوربات پراکسیداز
شوری (A)	٢	٠/٠٠٢٤**	٠/٠٠٠٧**
اسید سالیسیلیک (B)	٢	٠/٠٠٠٠٧^{ns}	٠/٠٠٠٤*
A×B	٤	٠/٠٠١٩**	٠/٠٠٠٦**
خطای آزمایش	١٨	٠/٠٠٠٠٥	٠/٠٠٠٠٣
ضریب تغییرات (درصد)		٨/١	٦/٦

*و ** به ترتیب مبین معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد می‌باشد و^{ns}، غیرمعنی‌دار بودن آماری را نشان می‌دهد.

جدول ٢- مقایسه میانگین صفات فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ برنج تحت تیمار اسید سالیسیلیک و شوری

ترکیب تیماری		آنزیم کاتالاز	آنزیم آسکوربات پراکسیداز
کلریدسدیم (میلی‌مولار)	اسید سالیسیلیک (میلی مولار)	(واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه)	
صفر	صفر	٠/٠٤٢ ^{d}	٠/١٤٥ ^{d}
	٠/٥	٠/٠٥٤ ^{c}	٠/١٦٨ ^{b}
	یک	٠/٠٤٩ ^{cd}	٠/١٦ ^{c}
٤٠	صفر	٠/٠٧٣ ^{b}	٠/١٦٥ ^{bc}
	٠/٥	٠/٠٨٤ ^{a}	٠/١٧٩ ^{a}
	یک	٠/٠٧٩ ^{a}	٠/١٦٤ ^{bc}
٨٠	صفر	٠/٠٦٦ ^{b}	٠/١٧١ ^{b}
	٠/٥	٠/٠٤٣ ^{d}	٠/١٥٤ ^{cd}
	یک	٠/٠٤١ ^{d}	٠/١٥٨ ^{c}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) ندارند.

فهرست منابع

١. Aebi H. ١٩٨٤. Catalase in vitro. Method of Enzymology. ١٠٥: ١٢١-١٢٦.

٢. Asada K. ٢٠٠٦. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology.١٤١: ٣٩١-٣٩٦.

٣. Blokhina O, Virolainen E. and Fagerstedt KV. ٢٠٠٣. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann. Bot. ٩١:١٧٩-١٩٤.

٤. Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. ١٩٩٤. Photooxidativ estress inplants. Physiologia Plantarum. ٩٢:٦٩٦-٧١٧.

٥. Foyer CF. and Noctor G. ٢٠٠٠. Oxygen processing in photosynthesis regulation and signaling. New Phytologist. ٤٦: ٣٥٩-٣٨٨.

٦. Hameed A, Naseer SH, Iqbal T, Syed H, Haq MA. ٢٠٠٨. Effects of NaCl salinity on seedling growth,senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. Pak. J. Bot. ٤٠(٣): ١٠٤٣-١٠٥١.

٧. Kukreja S, Nandwal AS, Kumar N, Sharma SK, Sharma SK, Unvi V, Sharma PK. ٢٠٠٥. Plant water status, $H_٢O_٢$, scavenging enzymes, ethyleneevaluation and membrane integrity of Cicer arietinum roots as ffected bysalinity. Biologia Plantarum. ٤٩: ٣٠٥–٣٠٨.

٨. Lee DH. Kim YS, Lee CB. ٢٠٠١. The inductive responses of the antioxidant enzyme by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Plant Physiology. ١٥٨: ٧٣٧-٧٤٥.

٩. Levitt J. ١٩٨٠. Responses of plants to environmental stress.Vol. ٢, Academic Press. Newyork.

١٠. Jin ZM, Wang CH, Liu ZP, Gong WJ. ٢٠٠٧. Physiological and ecological characters studies on Aloe vera under soil salinity and seawater irrigation. Process biochemistry. ٤٢: ٧١٠-٧١٤.

١١. Palma F, Lluch C, Iribarne C, Garcia-Garrida JM, Tejera Garcia NA. ٢٠٠٩. Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. Plant Growth Regulation. ٥٨: ٣٠٧–١٦.

١٢. Parida AK, Das B. ٢٠٠٥. Salt tolerance and salinity effects on Plant: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety. ٦٠: ٣٢٤-٣٤٩.

١٣. Raskin I. ١٩٩٢. Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. ٤٣: ٤٣٩–٤٦٣.

١٤. Sairam PK, Strivastava S, Agarwal S, Meena RC. ٢٠٠٥. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. Plantarum Plantarum. ٤٩: ٨٥-٩١.

۱۵. Seckin B, Turkan I, Sekmen AH, Ozfidan C. ۲۰۱۰. The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum Huds.* (sea barleygrass) and *Hordeum vulgare L.* (cultivated barley).

۱٦. Skórzyńska-Polit E. and Krupa Z. ۲۰۰٦. Lipid peroxidation in cadmium-treated *Phaseolus coccineus* plants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. ۵۰: ٤۸۲–٤۸۷.

۱۷. Szepesi A, Csiszar J, Bajkan Sz, Gemes K, Horvath F, Erdei L, Deer A, Simon LM, Tari I. ۲۰۰۵. Role of salicylic aicd pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt- and osmotic stress. Acta Biologica Szeged. ٤۹: ۱۲۳–۱۲۵.

۱۸. Syeed S., Anjum N.A., Nazar R., Iqbal N., Masood A., Khan N.A. ۲۰۱۰. Salicylic acid-mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea L.*) cultivars differing in salt tolerance. Acta Physiologiae Plantarum. doi:۱۰,۱۰۰۷/s۱۱۷۳۸-۰۱۰-۱۲٦۱٤-۷.

۱۹. Vaidyanathan H, Sivakumar P, Chakrabarsty R, Thomas G. ۲۰۰۳. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa L.*) -differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. Plant Science. ۱٦۵: ۱٤۱۱-۱٤۱۸.

۲۰. Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez K. ۱۹۷۲. Routine methods of solutine culture for rice. PP. ۵۳-۵۷. In: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. ۲nd ed., the International Rice Research Institute, Philippines.

۲۱. Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S. ۲۰۰۰. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology. ۱۲۳(۱): ۲۲۳-۲۳۳.

The Effect of salicylic acid and sodium chloride on enzyme activity in rice leaf bearing anti oxidants and fitted under salinity stress

Ammar bahari Ardeshiri[٥] , Youssef Niknezhad[٦], Hormoz Fallah Amoli[٦], Abbas azimnezhad[٧]

Abstract

In order to evaluate the effect of salicylic acid on antioxidant enzymes in leaves of rice (Tarom Hashemi) under salinity stress in ۱۳۹٤ was conducted in Islamic Azad University, Ayatollah Amoli. For this purpose, the three-leaf stage, seedlings were studied and the three levels of sodium chloride (including zero, ٤۰ and ۸۰ mM NaCl) and three levels of salicylic acid (including zero, and a ۰,٥ and ۱ mM) were treated. Antioxidant enzymes catalase and ascorbate peroxidase activity was determined by spectrophotometry. According to the results, sodium chloride significant effect on the activity of catalase and ascorbate peroxidise , but the catalase effect of salicylic acid treatment was not significant. The activity of these enzymes with increasing salinity significantly increased compared to control. Salicylic acid ٥,۰ mM in conditions of salinity and salt mM NaCl caused a significant increase in the activity of these enzymes .In general, the results showed that salicylic acid enhances the increased activity of antioxidant enzymes catalase and ascorbate peroxidase (the average salt) causes reactive oxygen species were more efficient refining .

Keywords: ascorbate peroxidase ,salicylic acid, rice, catalase, sodium chloride

٥ – PhD student of Agriculture, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli

٦ – Department of Agriculture, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli

٧ –PhD student of Agriculture, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli

Email :Bahariardeshiri@yahoo.com Tell:۰۹۱۱۱٥٦۳۰۱٥