بررسی مقایسه‌ای پاسخ آنزیم‌های آنتی اکسیدان در دو رقم حساس و متحمل گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) نسبت به شوری

***فائزه قناتی، الهام نیری ترشیزی**

گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

در این مقاله تاثیر تنش NaCl بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی غشا در ریشه و اندام هوایی دو رقم متحمل (ماهوتی) و حساس (الموت) به شوری از گیاه گندم در مدت زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۹٦ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در اغلب موارد میزان آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در هر دو رقم، در نمونه‌های تیمار نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش نشان داد. همچنین سطح آنزیم کاتالاز ریشه رقم متحمل نسبت به رقم حساس افزایش بسیاری داشت که در تحمل بیشتر رقم ماهوتی می‌تواند نقش داشته باشد. فعالیت این آنزیم ها در ساعات اولیه تیمار (۲٤ ساعت) در رقم متحمل نسبت به رقم حساس افزایش بیشتری نشان داد. میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در نمونه‌های تیمار نسبت به نمونه‌های کنترل به ویژه در رقم متحمل افزایش کمی داشت. همچنین در میزان تجمع سدیم در دو رقم، تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد. نتایج حاصل نشان داد که تنش اکسیداتیو نقش موثری در فعالیت آنزیم‌های دو رقم حساس و متحمل به شوری دارد و میزان فعالیت آنزیم‌ها در دو رقم و در زمان‌های مختلف با هم متفاوت می‌باشد.

کلمات کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، آنزیم‌های آنتی اکسیدان، سوپراکسید دیسموتاز، شوری، کاتالاز، گندم

مقدمه

تنش NaCl یکی از تنش‌های غیرزیستی مهمی است که کیفیت و میزان تولید محصولات کشاورزی را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد. تقریبا ۲۰ درصد زمین‌های کشاورزی در جهان تحت تاثیر تنش شوری قرار دارند (Chinnusamy et al., 2005). اثر شوری بر گیاهان فرایندی پیچیده است که بر حسب نوع، غلظت نمک، ژنوتیپ گیاه، مراحل مختلف رشد و شرایط محیطی متفاوت می‌باشد (Rios-Gonzalez et al., 2002). تاثیر مخرب شوری بر رشد گیاه به دلیل تنش اسموتیکی و سمیت یونی حاصل از یون سدیم بر گیاهان می‌باشد و عدم توازن متابولیکی ناشی از این تنش‌ها سبب ایجاد تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌گردد (Chinnusamy et al., 2005). به تولید گونه‌های فعال اکسیژن در طی فرایندهای متابولیکی و انتقال الکترون انفجار اکسیداتیو[1] گفته می‌شود که ناشی از نشت الکترون به اکسیژن در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی و میتوکندریایی می‌باشد (Dat et al., 2000). اثر تخریب اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن مانند H_2O_2، O_2^- و OH° توسط عمل هماهنگ مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی کاهش داده می‌شود. بتا کاروتن، آلفا توکوفرول، آسکوربات و گلوتاتیون از جمله عوامل غیرآنزیمی موثر در حذف ROS می‌باشند.

[1]. Oxidative burst

*e.mail:Ghangia@modares.ac.ir

آنزیم‌هایی مانند APX, CAT و SOD از جمله آنزیم‌های موثر در حذف ROS می‌باشند (Azevedo Neto et al., 2005). تولید ROS و افزایش فعالیت بسیاری از آنزیم‌های آنتی اکسیدان در نتیجه‌ی تنش NaCl در مورد گیاهانی مانند پنبه (Gosset et al., 1994)، توت فرنگی (Sudhakar et al., 2001)، گندم (Sairam et al., 2002)، گوجه‌فرنگی (Mittova et al., 2002)، برنج (Vaidyanathan et al., 2003)، چغندر قند (Bor et al., 2003)، ذرت (Azevedo Neto et al., 2005) و سورگوم (Costa et al., 2005) گزارش شده است. بیشتر نتایج حاصل از این مطالعات بیان می‌کنند که بین تحمل به تنش و حضور سیستم آنتی اکسیدانی موثر در گیاهان ارتباط وجود دارد، اما هنوز مکانیسم تحمل به خوبی شناخته نشده است. اگرچه مطالعات زیادی بر روی گیاه گندم به دلیل اهمیت غذایی آن نسبت به تنش‌های مختلف خشکی، شوری و غیره صورت گرفته است، اما بر روی دو رقم مورد نظر، که از طرف سازمان نهال و بذر به عنوان دو رقم متحمل (ماهوتی) و حساس (الموت) معرفی شده‌اند، مطالعاتی انجام نگرفته است. همچنین این تحقیق پاسخ سریع و کوتاه مدت آنزیم‌های آنتی اکسیدان ریشه و اندام هوایی این دو رقم را مورد بررسی قرار داده است که در این زمینه کار زیادی صورت نگرفته است. در عین حال نقش آنزیم CAT و تفاوت سطح آن در دو رقم یاد شده مورد مقایسه قرار گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

بذرهای دو رقم ماهوتی و الموت از موسسه اصلاح نهال و بذر تهیه شد و به مدت زمان‌های ۲٤، ٤٨ و ۹٦ ساعت در محیط کشت هیدروپونیک و با ۳۰۰mM NaCl تیمار داده شد و پس از برداشت مورد آنالیزهای بیوشیمیایی قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

۰/۲ گرم از ریشه یا ساقه نمونه‌های منجمد گندم را با ۳ میلی‌لیتر از بافر HEPES-KOH با pH۷/۸ با ۰/۱ EDTA میلی مولار ساییده، عصاره‌گیری و سانتریفوژ شد. از محلول رویی آن برای سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل مواد زیر بود (ارقام، غلظت نهایی مواد را در حجم ۳ میلی‌لیتر نشان می‌دهد): بافر HEPES-KOH 50 میلی‌مولار با pH۷/۸ حاوی ۰/۱ EDTA میلی‌مولار، Na_2Co_3 ۵۰ میلی‌مولار، L-methionine ۱۲ میلی‌مولار، NBT (Nitro Blue Tetrazolium) ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۱ میکرومولار و ۱۰۰ میکرومول عصاره آنزیمی، ریبوفلاوین در آخر به لوله‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه لوله‌ها در معرض نور قرار گرفتند. جذب مخلوط واکنش در طول موج ٥٦۰nm خوانده می‌شود. یک واحد فعالیت (U) SOD به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که سبب مهار ۵۰ درصدی احیای نوری NBT می‌گردد (Giannopolitis and ries, 1977).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

۰/۲ گرم از ساقه یا ریشه نمونه‌های منجمد، با بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار با pH ٦/۸ عصاره‌گیری و سانتریفوژ گردید. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل موارد زیر بود: (غلظت نهایی مواد در حجم ۳ میلی لیتر می‌باشد): بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با H_2O_2،pH ٦/۸ ۱۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 شروع شد و تجزیه آن با کاهش جذب در طول موج ۲٤۰nm و در مدت ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم بر حسب میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (Cakmak and Horst, 1991).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

۰/۱ گرم از ساقه یا ریشه نمونه‌های منجمد بافتی، با ۳ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار، ٦ pH محتوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار عصاره‌گیری و سانتریفوژ شد. مخلوط واکنش شامل موارد زیر بود (کلیه مواد در غلظت نهایی ۳ میلی‌مولار تهیه گردید)، بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با ٦ pH محتوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، H_2O_2 ۱ میلی‌مولار، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر. واکنش به محض اضافه کردن H_2O_2 شروع شد و اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰nm و به مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغییر طول موج

به نسبتmg پروتئین عصاره محاسبه گردید (Nakano and Asada, 1981).

سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا (LPO)

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا با اندازه‌گیری مقدار مالون دی آلدهید (MDA) تولید شده به عنوان فراورده نهایی پراکسیداسیون غشا بوسیله واکنش تیو باربیتوریک اسید سنجیده شد (Heath and Packer, 1968).

۰/۵ گرم از ساقه یا ریشه نمونه‌های منجمد با ۳ میلی‌لیتر از تری کلرواستیک اسید۱۰ درصد ساییده و از کاغذ صافی عبور داده شد. به ۱ میلی‌لیتر از این عصاره، ۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد در یک لوله آزمایش اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله‌ها در دمای محیط، جذب محلول در طول موج‌های ۵۳۲nm و ۶۰۰nm به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و میزان MDA با استفاده از ضریب جذب ثابت $\varepsilon=155mM^{-1}cm^{-1}$ محاسبه گردید (De Vos et al., 1991).

سنجش سدیم

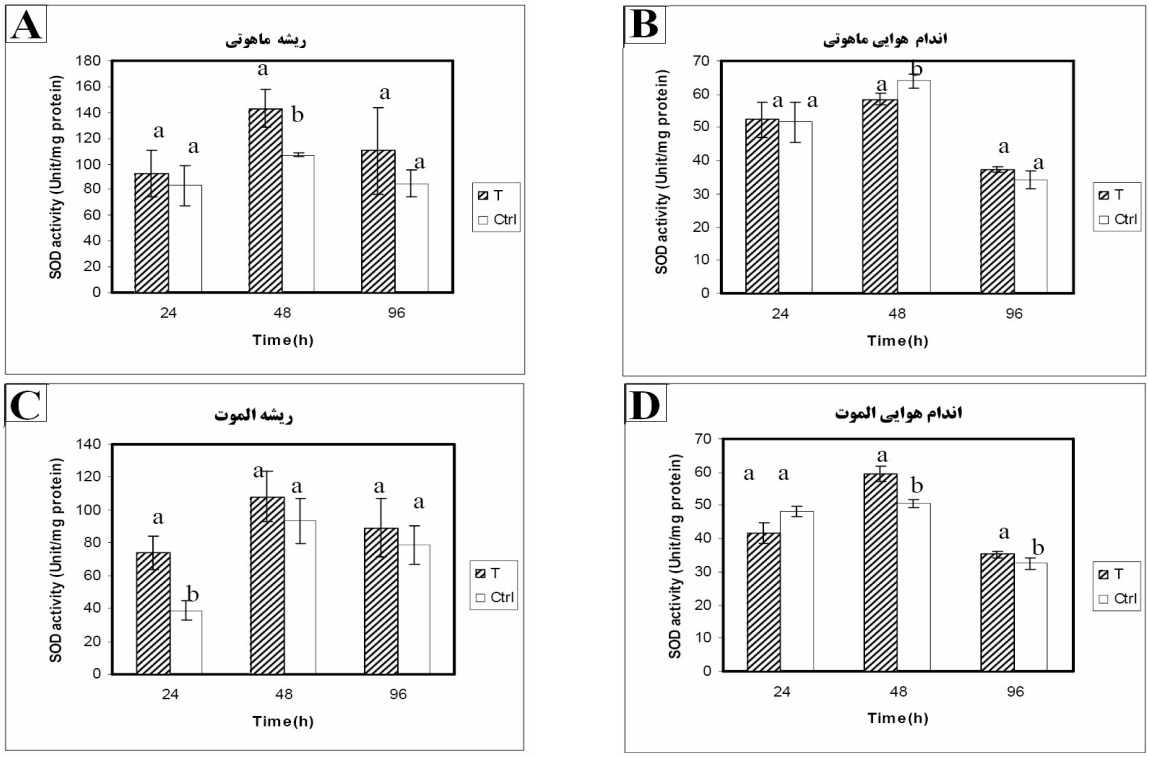
۲ گرم از ساقه و ریشه گیاهان کنترل و تیمار داده شده با NaCl (تیمار ۹۶ ساعته)، در کروزه‌های چینی توزین گردید و در کوره، در دمای ۳۵۰ و ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۲ ساعت حرارت داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها به هر کروزه به مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول HCl و آب مقطر به نسبت ۱:۱ اضافه گردید و بر روی حمام شن با درجه حرارت ۱۱۰ درجه قرار داده شد. پس از خشک شدن، به هر کروزه ۵ میلی‌لیتر از HCl یک نرمال اضافه شد. میزان سدیم نمونه‌های حاصل پس از سانتریفوژ و رقیق شدن با دستگاه جذب اتمی (Shimadzu AA- 670, Japan) اندازه‌گیری شد.

روش‌های آماری

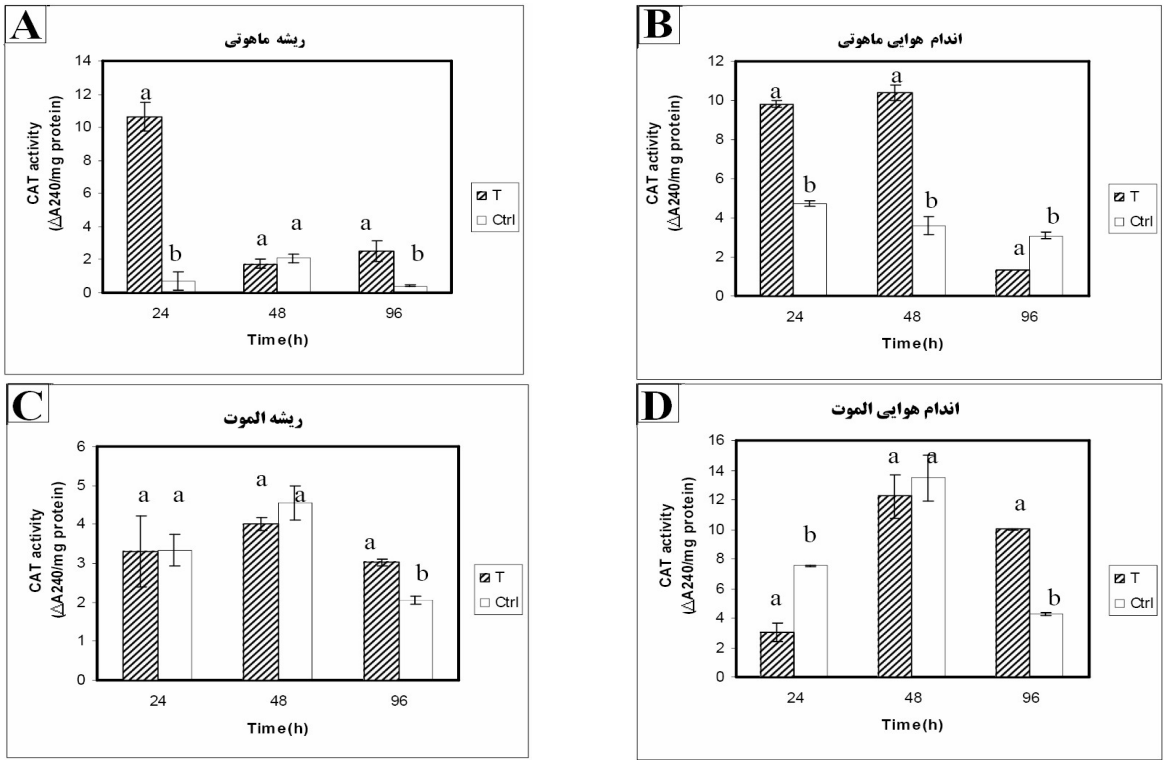
کلیه آنالیزها، با سه تکرار مستقل و هر یک با سه نمونه انجام گردید. سپس با استفاده از نرم افزار Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نمودارهای مربوطه رسم گردید. در نهایت با استفاده از آزمون t-test سطح معنی‌دار بودن یا نبودن آنها کنترل شد.

نتایج

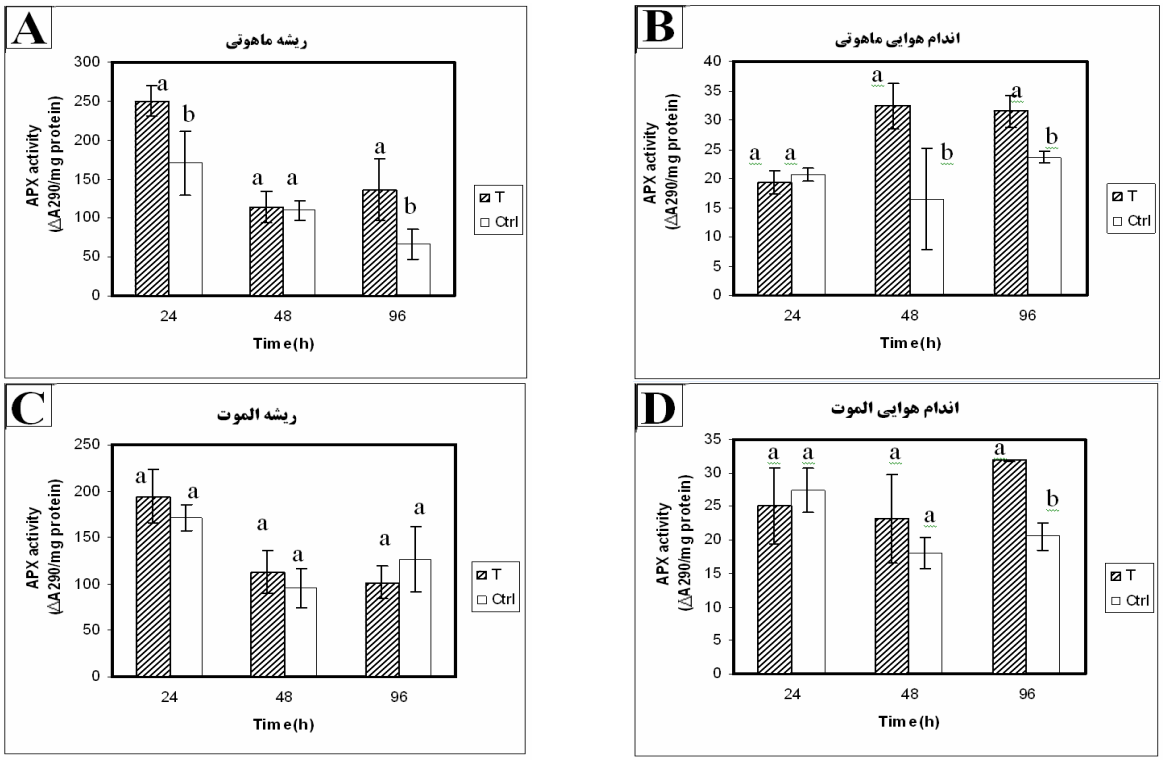
تیمار ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت سبب افزایش فعالیت SOD در ریشه رقم متحمل نسبت به گیاهان کنترل گردید. این افزایش در تیمار ۲۴ و ۹۶ ساعته NaCl در سطح ($p<۰/۰۵$) معنی‌دار نبود و در تیمارهای ۴۸ ساعته معنی‌دار بود (شکل ۱-A). فعالیت SOD در اندام هوایی رقم متحمل نسبت به گیاهان کنترل در طی ۴۸ ساعت کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۱-B). فعالیت این آنزیم در ریشه رقم الموت در هر سه زمان موردنظر افزایش داشت (شکل۱-C) و در ساقه در ۲۴ ساعت تیمار کاهش و در ۴۸ و ۹۶ ساعت تیمار افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل۱-D). فعالیت آنزیم CAT در تیمار ۲۴ و ۹۶ ساعت افزایش معنی‌داری در ریشه رقم ماهوتی نشان داد، اما تیمار ۴۸ ساعت سبب کاهش فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان کنترل شد که در سطح ($p<۰/۰۱$) معنی‌دار نبود (شکل ۲-A). در ساقه رقم ماهوتی تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت فعالیت آنزیم CAT را افزایش داد و این افزایش در سطح ($p<۰/۰۱$) معنی‌دار بود، اما تیمار ۹۶ ساعته NaCl سبب کاهش معنی‌داری در فعالیت CAT گردید (شکل ۲-B). فعالیت این آنزیم در ۲۴ ساعت تیمار در ریشه رقم الموت چندان تغییری نسبت به گیاهان کنترل نشان نداد (شکل ۲-C)، اما در ساقه کاهش معنی‌داری در سطح ($p<۰/۰۱$) نشان داد. تیمار ۴۸ ساعت سبب کاهش فعالیت این آنزیم و تیمار ۹۶ ساعت سبب افزایش فعالیت آن هم در ساقه و هم در ریشه گردید (شکل ۲-D). فعالیت آنزیم APX در ریشه در طی ۲۴ و ۹۶ ساعت افزایش معنی‌داری در سطح ($p<۰/۰۵$) نشان داد. در طی ۴۸ ساعت تیمار، در فعالیت APX افزایش کمی دیده شد (شکل۳-A). در ساقه رقم ماهوتی فعالیت APX در تیمار ۲۴ ساعت کاهش نشان داد، اما در تیمارهای ۴۸ و ۹۶ ساعت، افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان کنترل مشاهده شد (شکل۳-B)، اما در رقم الموت تیمار ۲۴ ساعت در ریشه سبب افزایش و در ساقه سبب کاهش فعالیت این آنزیم گردید.



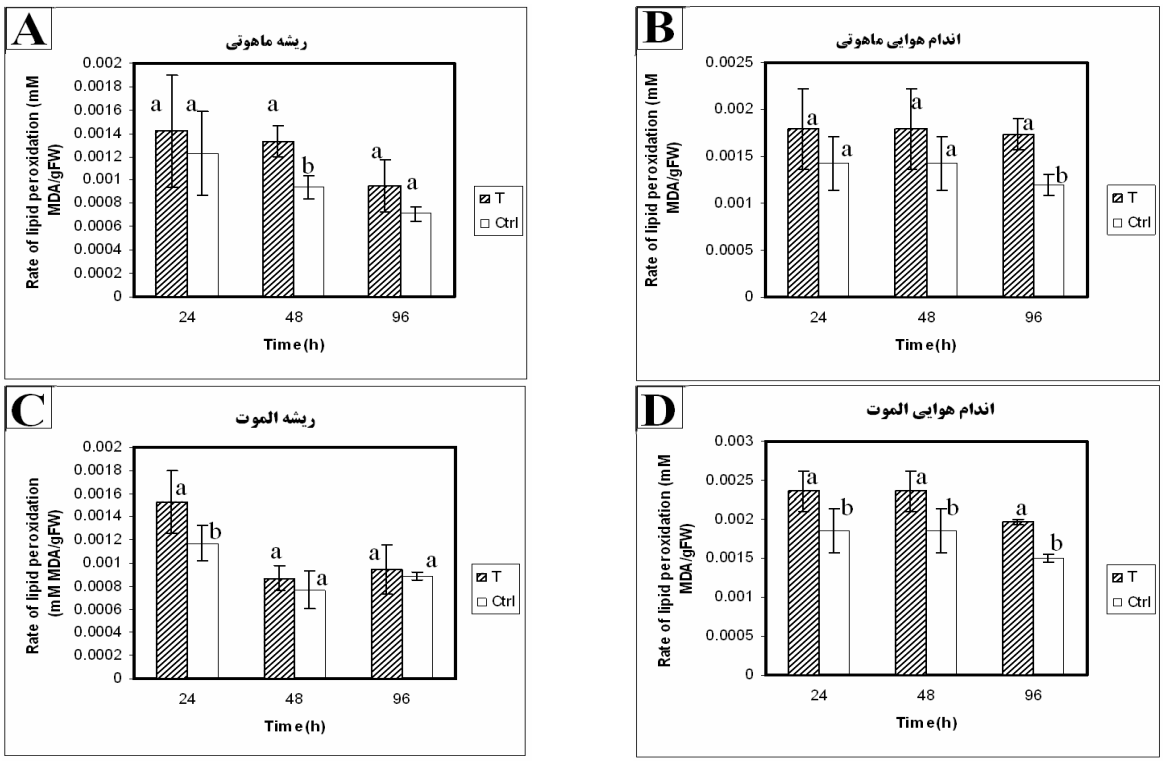
شکل ۱: فعالیت SOD در تیمارهای ۲٤، ٤٨ و ۹٦ ساعته با NaCl. تحت شرایط کنترل (Ctrl) و تیمار (T). داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان دهنده انحراف معیار می‌باشد. در هر گروه حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ است.



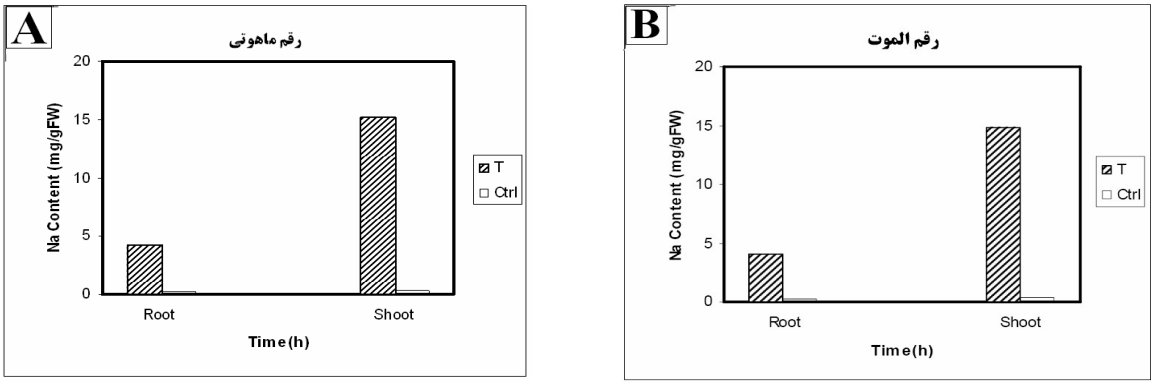
شکل ۲: فعالیت CAT در تیمارهای ۲٤، ٤٨ و ۹٦ ساعته با NaCl. تحت شرایط کنترل (Ctrl) و تیمار (T). داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان دهنده انحراف معیار می‌باشد. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۱ است.



شکل ۳: فعالیت APX در تیمارهای ۲٤، ٤۸ و ۹٦ ساعته با NaCl. تحت شرایط کنترل (Ctrl) و تیمار (T). داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان دهنده انحراف معیار می‌باشد. در هر گروه حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ است.



شکل ٤: پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در تیمارهای ۲٤، ٤۸ و ۹٦ ساعته با NaCl. تحت شرایط کنترل (Ctrl) و تیمار (T). داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان دهنده انحراف معیار می‌باشد. در هر گروه حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ است.



شکل ۵: میزان جذب سدیم در تیمارهای ۹۶ ساعته با NaCl در ریشه و اندام هوایی. تحت شرایط کنترل (Ctrl) و تیمار(T).

گرچه این تغییرات در سطح ($p<۰/۰۵$) معنی‌دار نبود. تیمار ٤٨ ساعت هم در ساقه و هم در ریشه سبب افزایش فعالیت این آنزیم گردید، اما در تیمار ۹٦ ساعت فعالیت APX در ریشه کاهش غیرمعنی‌دار و در ساقه افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل‌های ۳-C و ۳-D).

تیمارهای ٢٤ و ٤٨ و ۹٦ ساعته سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در ریشه و ساقه هر دو رقم ماهوتی و الموت نسبت به گیاهان کنترل در این رقم گردید که در بعضی زمان‌های مشخص شده در شکل در سطح ($p<۰/۰۵$) معنی‌دار بود (شکل ٤).

محتوای سدیم گیاهان مورد مطالعه قبل و بعد از ۹٦ ساعت تیمار با NaCl نشان داد که تفاوت چندانی بین میزان سدیم در دو رقم موردنظر قبل از تیمار با نمک وجود ندارد (شکل‌های ۵-A و ۵-B). همچنین برخلاف انتظار تفاوت چندانی بین میزان سدیم جذب شده بین دو رقم نیز وجود ندارد.

بحث

با توجه به مطالعات انجام شده مشخص گردید که شوری سبب القای تنش اکسیداتیو در بافتها می‌شود و گیاهان به منظور مقابله با اثرات مخرب تنش اکسیداتیو از سیستم کمپلکس آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌کنند و میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاها به عنوان یک شاخص جهت سنجش میزان تنش اکسیداتیو محسوب می‌گردد. در این زمینه مطالعات زیادی بر روی گیاهانی مانند پنبه (Gosset et al., 1994)، گوجه فرنگی (Mittova et al., 2002) و برنج (Vaidyanathan et al., 2003) انجام گرفته است. داده‌های حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نمونه‌های تیمار نسبت به نمونه‌های کنترل در دو رقم حساس و متحمل به شوری در اغلب موارد افزایش یافته‌اند. میزان فعالیت انزیم SOD ریشه و اندام هوایی نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل در هر دو رقم (به جز در ٤٨ ساعت تیمار اندام هوایی ماهوتی و ٢٤ ساعت تیمار اندام هوایی الموت) افزایش نشان می‌دهد که در واقع نقش SOD را در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و تبدیل O_2^- به H_2O_2 بیان می‌کند. افزایش سطح این آنزیم در رقم متحمل نسبت به رقم حساس کمی بالاتر است، اما قابل توجه نمی‌باشد (شکل ۱). نتایج مشابهی در مورد گیاهان توت، گوجه‌فرنگی و سورقوم (Costa et al., 2005) مشاهده گردیده است. محصول فعالیت SOD، H_2O_2 است که خود یک گونه فعال سمی است و می‌تواند در واکنش‌های بعدی به گونه فعال‌تری به نام OH تبدیل گردد.

بنابراین در گیاهان تعدادی از آنزیم‌ها هستند که با حذف H_2O_2 و تبدیل آن به H_2O و O_2 سطح داخل سلولی آن را تنظیم می‌کنند. در میان این آنزیم‌ها CAT، APX و پراکسیدازها به عنوان مهمترین آنزیم ها محسوب می‌گردند. در تحقیق حاضر میزان آنزیم کاتالاز در ماهوتی نسبت به

الموت افزایش چشمگیری نشان داده است (شکل‌های ۲-A و ۲-C)، به گونه‌ای که حتی در الموت میزان این آنزیم در نمونه‌های تیمار نسبت به نمونه‌های کنترل در بیشتر موارد کاهش نشان داده است. با توجه به اینکه CAT آنزیمی است که ظرفیت بالا و تمایل پایینی برای H_2O_2 دارد، (برخلاف APX که ظرفیت پایین و تمایل بالایی برای H_2O_2 دارد) و می‌تواند توده H_2O_2 موجود در گیاه را جمع‌آوری نماید، بیان شده است که گیاهانی که دارای میزان پایینی کاتالاز می‌باشند نسبت به تنش‌هایی مانند ازون و شوری بالا حساسیت بیشتری نشان می‌دهند (Ali and Alqurainy, 2007). تحقیق حاضر که در بین دو رقم حساس و متحمل گیاه گندم انجام شده است، نتایج بالا را تایید می‌کند. کاهش میزان CAT در ارقام حساس به شوری در مورد گیاهانی مانند برنج (Shud Hakar et al., 2007) و چغندر (Bor et al., 2003) نیز مشاهده گردیده است. همگام با این نتایج میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء نیز در نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل در هر دو رقم مقداری افزایش نشان داد که در مورد اندام هوایی الموت، این افزایش بسیار زیاد و در سطح $p<0/05$ معنی‌دار بوده است (شکل ٤-D) که با مقایسه با کاهش میزان آنزیم کاتالاز در اندام هوایی این رقم کاملا هم‌خوانی دارد. با توجه به اینکه هر آنزیمی پاسخ کمی و کیفی خاصی را به شوری نشان می‌دهد، در هر دو رقم مورد نظر افت و خیزهایی در میزان آنزیم‌های SOD, CAT, APX در ریشه و اندام هوایی در ٢٤، ٤٨ و ٩٦ ساعت تیمار مشاهده می‌گردد و می‌توان علت آن را به زمان‌ها و مکان‌های مختلف فعالیت آنزیم‌های مختلف در گیاهان و همچنین به همکاری آنها برای جاروب کردن ROS ها نسبت داد. همچنین در بین سه زمان مورد نظر، مشاهده می‌شود که در طی ٢٤ ساعت تیمار با NaCl میزان این آنزیم‌ها در مقایسه با زمان‌های دیگر افزایش بیشتری نشان می‌دهد، به ویژه در ریشه رقم متحمل (شکل‌های ۲-A و ۳-A) که نشان دهنده پاسخ سریع آنزیم‌های آنتی اکسیدان نسبت به تنش NaCl می‌باشد. نتایج مشابهی در مورد جو (Kim et al., 2005) گزارش شده است، که تاییدی بر نتایج فوق می‌باشد.

مقایسه بین آنزیم‌های SOD, CAT, APX در ریشه و اندام هوایی هردو رقم بیانگر این مطلب است که میزان آنزیم‌های SOD و APX در ریشه هر دو رقم الموت و ماهوتی بسیار بیشتر از سطح این آنزیم ها نسبت به اندام هوایی بوده است (شکل های ۱ و ۳). از آنجایی که در گلیکوفیت‌ها ریشه اولین مکان مواجهه با استرس شوری است و توانایی آن برای حفظ هموستازی یونی و پتانسیل احیایی جهت رشد طبیعی خود حیاتی است این افزایش با مقاومت نسبت به تنش NaCl کاملا ارتباط دارد. نتایج مشابهی نیز در مورد گیاه جو (Kim et al., 2005) گزارش شده است.

اندازه‌گیری میزان جذب اتمی سدیم در ریشه و اندام هوایی هر دو رقم مورد مطالعه پس از ٩٦ ساعت تیمار نشان داده است که تجمع Na^+ در نمونه‌های تیمار نسبت به نمونه‌های کنترل بسیار بالا بود، اما بین دو رقم تفاوت چندانی بین میزان تجمع سدیم مشاهده نشد (شکل‌های ٥-A و ٥-B)، اگرچه این دو رقم به عنوان ارقام حساس (الموت) و متحمل (ماهوتی) معرفی گردیده‌اند، اما در میزان ورود سدیم به گیاه در این دو رقم تفاوتی مشاهده نشده است. به عبارت دیگر رقم ماهوتی احتمالا پس از ورود سدیم از سایر مکانیزم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی جهت مقاومت استفاده کرده است، این احتمال نیز وجود دارد که با افزایش مدت زمان تیمار گیاه نتواند مقاومت نشان دهد. از طرفی تیمار موردنظر بسیار شدید است و قابلیت تحمل این گیاه نسبت به شوری ممکن است در تیمارهایی با شدت پایین‌تر مدنظر بوده باشد.

مقایسه بین میزان تجمع سدیم در اندام هوایی دو رقم ماهوتی و الموت این مطلب را نشان می‌دهد که تجمع Na^+ در اندام هوایی بسیار بیشتر از ریشه می‌باشد (حدود ٢٢٪ در ریشه و ٧٨٪ در اندام هوایی). همچنین مشاهده شد که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در ریشه عمدتاً بیشتر از اندام هوایی بوده است، این مطلب پیشنهاد می‌کند که احتمالاً سایر مسیرهای مقاومت نسبت به تنش NaCl در اندام هوایی فعالیت بیشتری داشته‌اند، زیرا همانطور که مشخص است در اندام هوایی کلروپلاست وجود دارد که محل قرارگیری انواعی از رنگیزه‌ها مانند کارتنوئید، بتاکاروتن، ویوله گزانتین، آلفا

توکوفرول می‌باشد که این ترکیبات در محافظت از دستگاه فتوسنتزی در مقابل تخریب نوری بوسیله اکسیژن نوزاد نقش دارند (Liggini et al., 1999). بنابراین یکی از دلایل پایین بودن آنزیم‌های آنتی اکسیدان در اندام هوایی نسبت به ریشه (با توجه به بالا بودن میزان تجمع سدیم در اندام هوایی) را وجود این ترکیبات در اندام هوایی می‌توان برشمرد.

در مجموع بر مبنای نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر دیده شد که در رقم معرفی شده از طرف سازمان اصلاح نهال و بذر به عنوان رقم متحمل تفاوتی در میزان تجمع سدیم نسبت به رقم حساس مشاهده نگردید اما آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این رقم نسبت به رقم حساس تا حدی افزایش نشان داده است و میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاها در آن نسبت به رقم حساس کمتر بوده است، همچنین میزان آنزیم CAT در ریشه رقم متحمل خیلی بیشتر از رقم متحمل بوده است که می‌توان یکی از دلایل تحمل بالای این گیاه را به تنش شوری در واقع میزان بالای آنزیم CAT در آن بیان نمود. همچنین با مقایسه میزان پاسخی که دو رقم موردنظر به تیمارهای ٢٤، ٤٨ و ٩٦ ساعت نشان داده‌اند مشخص می‌شود که رقم متحمل نسبت به رقم حساس به تنش شوری سریعتر پاسخ می‌دهد (در طی ٢٤ ساعت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در رقم متحمل بیشتر از رقم حساس افزایش داشته است).

اما با توجه به تجمع بالای نمک در آن، این احتمال می‌رود که تیمارهایی با شدت بالاتر یا طولانی مدت تر را نتواند تحمل کند.

نتیجه‌گیری نهایی

گرچه فیزیولوژی سمیت شوری و تحمل نسبت به آن در گیاهان هنوز بطور کامل مشخص نشده است، طبق شواهد بدست آمده در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد مکانیسم تحمل در ارقام زراعی متحمل به شوری بیش از آنکه با ممانعت از ورود آن به بافت‌های گیاهی یا دفع آن از گیاه مرتبط باشد، به ویژگی‌های ژنتیکی و توان آنزیمی گیاه در سمیت‌زدایی و ترمیم آسیب‌های ناشی از شوری مرتبط باشد. افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانت با حذف گونه‌های فعال اکسیژن و کمک به پایداری غشاهای سلولی نقش به سزایی در بروز تحمل به شوری در گیاهان دارد. نتایج تحقیق حاضر با تاکید بر نقش اساسی این آنزیم‌ها در رقم ماهوتی، همچنین پیشنهاد می‌کند که آنزیم کاتالاز در بین آنزیم‌های آنتی اکسیدانت می‌تواند به عنوان یک آنزیم کلیدی و متمایز کننده ارقام حساس و متحمل معرفی گردد.

References

Ali, A, Alqurainy, F. (2007) Activities of antioxidants in plants under environmental stress.

Asada, K (1992) Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxidescavenging enzyme in plants. Physiol. Plant. 85:235-241

Azevedo Neto, AD, Prisco, JT, Enéas-Filho, J, Abreu CEB, Gomes-Filho E (2005a) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salttolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environ. Exp.Bot. *in press*. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.01.008

Bor, M, ? zdemir, F, Türkan, I (2003) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. Plant Sci.164:77-74.

Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram *quantities* of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:246-254.

Cakmak, I., and Marschner. H. (1992). Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiol. 98:1222-1227.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.K., (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Sci. 45, 437-448.

Costa, PHA, Azevede Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Gomes-Filho E. (2005) Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance, Braz. J. Plant Physiol., 17(4):353-361, 2005

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem,F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses.Rev.CMLS 57:779-795.

De Vos, C.H.R., Schat H., De Waal M.A.D., Vooijs and Ernst W.H.O., (1991). Increased resistance to copper-induced damage of root plasma membranein copper tolerant cilene cucubalus.Physiol. Plant.82,523-528.

Giannopolitis, CN, Ries, SK (1977). Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59:309-314.

Gosset, DR, Millhollon, EP, Lucas, MC (1994) Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. Crop Sci. 34:706-714.

Heath, RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts.I. Kinetics and stochiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125:189-198.

Kim, S.Y, Lim, J, Park, M.R, Kim, Y.J, Park, T., Seo, Y.W, Choi, K.G, Yun, S.J. (2005) Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. J. Biochem. Mol. Bio. 38: 218-224.

Liggini, B., Scartazza A., Brugnoli E., Navari F. (1999) Antioxidative defense system, pigment composition photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Plant Physiol. 119:1091-1100.

Mittova, V, Tal M, Volokita M, Guy M (2002). Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. Physiol. Plant. 115:393-400.

Nakano, Y, Asada, K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22:867-880.

Rios-Gonzalez, K., Erdei, L., Lips H. (2002) The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources.Plant Sci. 192:923-930.

Sairam, RK, Rao, KV, Srivastava, GC (2002) Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Sci. 163:1037-1046.

Sudhakar, C, Lakshmi, A, Giridarakumar, S (2001) Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Sci. 161:613-619.

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

Study of Differential Responses of Anti Oxidative Enzymes of Two Sensitive and Tolerant Cultivars of Wheat (*Triticum aestivum* L.) to Salt Stress

Ghanati, F., Nayyeri Torshizi, E.
Dep. Biology. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

In this article the effects of salt stress on the activity of antioxidative anzymes and lipid peroxidation were studied in shoots and roots of two cultivars of wheat. The cultivar Mahooti and Alamoot were selected as salt-tolerant and salt-sensitive, respectively. The plants were treated for 24, 48, 96 hours. Mostly salt stress increased the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in treated plants. Also, the increase in level of CAT activity in roots was more pronounced in the salt-tolerant than in the salt-stress that is indicated the role of CAT for tolerance in Mahooti. The increase in activity of these enzymes during 24 hours of treatment with NaCl in salt-tolerant plants were more than in salt-sensitive plants. Lipid peroxidation had a little increase in treated plants, compared to those of the control ones. Salt stress had no significant effect on accumulation of Na^+ in two cultivars. The results indicated that the oxidative stress play an important role in the activity of different enzymes in salt-stress and salt-tolerant plants. Also, rate of enzyme activities showed some flactuations, which suggest the cooperation of antioxidant enzymes with each other corresponding to different times and different stages of the growth.

Keywords: Ascorbate peroxidase, Catalase, Salt stress, Superoxide dismutase, wheat.