اثر شوری بر آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو در ریشه‌ها و اندام هوایی گیاه ذرت (*Zea mays* L.)

لطیفه پوراکبر[۱]، سونیا مقسومی هولاسو[۲]

تاریخ دریافت: ۹۳/٤/٤
تاریخ تصویب: ۹۳/۱۱/۲۷

چکیده

شوری یکی از مهمترین فاکتورهای محیطی است که موجب کاهش رشد، نمو و حاصلخیزی گیاهان در سراسر جهان می‌شود. موضوع تحقیق حاضر مطالعه اثر تنش شوری (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار NaCl) بر گیاهان ذرت (Zea mays L. cv. SC. 704) کشت شده به روش گلخانه‌ای و هیدروپونیک بود. بعد از یک ماه تیمار شوری، پارامترهای رشد و برخی تغییرات بیوشیمیایی در ریشه‌ها و اندام هوایی گیاهان کشت شده مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت شوری، سطح برگ و طول ریشه‌ها و اندام هوایی کاهش یافت، در صورتیکه میزان قندهای محلول، پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی افزایش یافت. میزان

[۱] استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)؛ lpourakbar@yahoo.com
[۲] دانشجوی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) در گیاهان تحت تیمار در هر دو غلظت کلرید سدیم افزایش یافت. بنابراین اعمال تیمار NaCl با افزایش تولید ROS موجب القا تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم‌های مسئول محافظت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان ذرت شد.

واژه‌های کلیدی: ذرت، شوری، پراکسیداسیون چربی، تنش اکسیداتیو، پراکسید هیدروژن، آنتی اکسیدان.

مقدمه

از ۱۵۰۰ میلیون هکتار از اراضی قابل کشت با کشاورزی دیمی، ۳۲ میلیون هکتار تحت تأثیر شوری ثانویه با درجات مختلف قرار دارد. از ۲۳۰ میلیون هکتار اراضی آبیاری شده، ٤٥ میلیون هکتار تحت تأثیر شوری هستند. زمین‌های آبیاری شده فقط ۱۵درصد از کل اراضی محسوب می‌شوند و به دلیل اینکه زمین‌های آبیاری شده حداقل دو برابر محصول نسبت به زمین‌های دیمی دارند، حدوداً یک سوم غذای جهان را تولید می‌کنند (Munns and Tester, 2008).

در طول دو قرن گذشته، علاوه بر افزایش بی‌رویه‌ی جمعیت بشری، نیاز انسان‌ها به غذا نیز افزایش یافته است (Flowers, 1999). از این رو ورود نمک به خاک‌های کشاورزی در آینده تهدیدی برای تولیدات کشاورزی در بخش‌های زیادی از جهان خواهد بود (Rus *et al.*, 2001). حدود ۱۲ درصد از کل مساحت ایران (۱۹ میلیون هکتار) به‌صورت کشت و آیش برای تولیدات کشاورزی استفاده می‌شود، که نزدیک به ۵۰ درصد این سطح زیر کشت، به درجات مختلف با مشکل شوری، قلیایی و غرقاب بودن روبه‌رو می‌باشد (میر محمدی میبدی و قره یاضی، ۱۳۸۱).

اثرات تنش شوری در گیاه به درجه‌ی شوری و مدت زمان تنش بستگی دارد (Misra *et al.*, 1997). شوری سه اثر بالقوه روی گیاه دارد: ۱) سمیت یونی خاص ۲) پتانسیل آبی پایین ۳) دخالت در جذب عناصر غذایی. مورد آخر ممکن است زیاد چشمگیر نباشد چون بعلت حضور عناصر غذایی ذخیره‌ی متحرک در گیاهان، این اثر بلافاصله تأثیر نمی‌گذارد (Flowers and Flowers, 2005).

شوری خاک یکی از تنش‌های غیرزیستی مهم است که بر جوانه زنی، رشد و حاصلخیزی محصولات اثر می‌گذارد (Sairam *et al.*, 2002). این اثرات بطور عمده به علت ازدیاد یون‌های

Na^+ و Cl^- در گیاهان می‌باشد (Shilpim and Narendra, 2005). در واقع به دلیل تجمع نمک در خاک تحت تنش شوری، گیاه به طور آشکار پژمرده می شود، چون نمک‌های خاک مانند Na^+ و Cl^- رشد و نمو طبیعی گیاه را مختل می‌کنند (Cavalcanti *et al*., 2007). انباشتگی سدیم در برگ باعث آسیب به برگ و نکروزه شدن برگهای پیر می‌شود، غلظت بالای سدیم در بخش‌های هوایی مشکلات اسمزی و متابولیکی برای گیاهان ایجاد می‌کند (Tester and Davenport, 2003).

اثر غیرمستقیم شوری روی رشد گیاه، کاهش محتوای آب گیاه است. وقتی شوری افزایش می‌یابد پتانسیل آب خاک کاهش می‌یابد. به طور کلی حضور نمک در محلول خاک، پتانسیل اسمزی خاک را کاهش می‌دهد و تنش آبی ایجاد می‌کند و این امر جذب آب کافی برای رشد گیاه را مشکل می‌کند، از این رو پتانسیل آب برگ را کاهش می‌دهد (Munns, 2002). بسیاری از فرایندهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مهم مانند توسعه‌ی برگ، باز شدن روزنه و فتوسنتز برگ بطور مستقیم بوسیله‌ی کاهش تورژسانس برگ که با از دست دادن آب از بافت‌های برگ همراه است تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Jones and Turner, 1978). جذب آب کم، پاسخ رایج گیاهان تحت تنش شوری و آبی است (Munns, 2002).

تنش شوری رشد و توسعه گیاه، نشت غشاء، تعادل یونی را در گیاهان تحت تاثیر قرار می‌دهد و پراکسیداسیون چربی را افزایش داده و تولید گونه های فعال اکسیژن مثل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل را افزایش می‌دهد (Yaser *et al*., 2008). پراکسید هیدروژن یک بخش سازنده اکسیداتیو متابولیسم گیاهی است و یک محصول عمده تولید شده در واکنش‌های اکسیداتیو کلروپلاستی و پراکسیزومی است. افزایش سطوح پراکسید هیدروژن درون‌زا موجب القای پیری و پراکسیداسیون چربی در گیاهان می‌گردد (Chen *et al*., 2007).

امروزه اغلب پذیرفته شده که گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species)، مسئول صدمات متعدد ایجاد شده در اثر تنش به ماکرومولکول‌ها و در نهایت به ساختار سلولی هستند (Noreen and Ashraf, 2009) و لازم هست که برای حفظ رشد طبیعی جاروب شوند. تحقیقات نشان داده است که برای کاهش اثرات سمی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، مکانیسم‌های متنوعی در گیاه فعال می‌شود. آنزیم‌های آنتی اکسیدان مثل آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) همراه با جاروب‌کننده‌هایی با وزن مولکولی کم مانند آسکوربات، گلوتاتیون و پرولین به عنوان دفاع اصلی در برابر ROS تولید شده در

بخش‌های مختلف سلول گیاهی عمل می‌کنند (Apel and Hirt, 2004). ظرفیت کاهش اثر مخرب اکسیژن فعال بستگی به میزان تحمل گیاه به تنش دارد (Selote and Khanna-Chopra, 2004).

با توجه به افزایش روزافزون شوری در استان آذربایجان‌غربی به ویژه شهرستان ارومیه (به علت تهدید خشکی دریاچه ارومیه) تحقیق جاری با هدف بررسی تغییرات رشد، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی پاسخ‌های بیوشیمیایی در مقابل تنش شوری کلرید سدیم، در شرایط گلخانه‌ای بر روی گیاه ذرت که یکی از عمده محصولات کشت شده در زمین‌های زراعی اطراف دریاچه ارومیه است، انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای ذرت (*Zea mays* L. cv. SC. 704) بعد از تهیه از مرکز تحقیقات کشاورزی شهر ارومیه، جهت ضد عفونی، قبل از کشت به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (وایتکس) ۱۰ درصد قرار گرفت و بعد به وسیله آب مقطر کاملاً شستشو داده شدند. سپس با استفاده از یک پنس استریل ده عدد بذر که ۱۲ ساعت قبل از کشت در داخل آب مقطر قرار گرفته بودند و دوره آماس را طی کرده بودند، در داخل پتری دیش‌ها قرار گرفتند. بعد از عمل کشت تمامی پتری دیش‌ها در داخل انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز قرار گرفتند. سپس دانه رست‌های سه روزه به داخل گلدان‌های حاوی ماسه منتقل شدند. گلدانها در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نوری Wm^{-2} ۱۵، دمای ۲۲/۲۷°C (روز/شب) و رطوبت ۸۵٪ قرار گرفتند. سه روز اول دانه رست‌ها با آب مقطر سپس با محلول هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) به مدت ۱۲ روز آبیاری شدند از این مرحله به بعد دانه رست‌های ۱۵ روزه به مدت ۱۶ روز با محلول تمام هوگلند حاوی غلظت‌های مختلف NaCl (۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) تغذیه شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و هر تیمار در ۶ تکرار انجام شد. پس از گذشت این مدت گیاهان یک ماهه ذرت که اغلب دارای ۷ برگ بودند جهت انجام آزمایش‌ها برداشت گردیدند و پس از اندازه‌گیری طول ریشه و اندام هوایی با یک خط کش تمیز، ۳ تکرار از هر تیمار برای خشک کردن نمونه‌ها جهت تعیین وزن خشک و برخی آزمایش‌ها که نیاز به وزن خشک نمونه‌ها داشت، بعد از جدا کردن ریشه و اندام هوایی در پاکت‌های مجزا قرار داده شدند و در آون ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. وزن خشک با ترازویی با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گرفته شد. ۳ تکرار از هر تیمار برای استفاده

در آزمایشاتی که نیاز به نمونه تر داشتند، برداشت شد و بعد از جداسازی ریشه‌ها از اندام هوایی، هر یک از اندام‌ها به طور جداگانه پس از بسته‌بندی مناسب در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری سطح برگ

سطح برگ توسط دستگاه اسکنر و نرم‌افزار مربوطه به نام Flachenberechnung-einer-sw-Grafik محاسبه شد.

اندازه‌گیری قندهای محلول

میزان قندهای محلول به روش فنل سولفوریک (Kochert, 1978) و بر اساس هیدرولیز اسیدی قندهای محلول و ایجاد ترکیب فورفورال که با فنل تولید یک کمپلکس رنگی می‌کند، اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم وزن تر گیاه از هر تیمار توزین شد و در داخل ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به وسیله هاون خوب له گردید سپس با تنظیف صاف شد و از عصاره گیاهی حاصله ۲ میلی‌لیتر برداشته و روی آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵٪ (w/v) ریخته شد و در نهایت به هر کدام از لوله‌ها ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه گردید، لوله‌ها به مدت ۱ ساعت به حال خود رها شدند تا رنگ ظاهر و تثبیت شود. بعداز ظهور رنگ، میزان جذب در ٤٨٥ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی استاندارد قند گلوکز، میزان قند در ریشه و اندام هوایی گیاهان شاهد و تحت تیمار بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ($mg\ g^{-1}\ FW$) محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌ها

برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌ها از روش Heath and Packer (١٩٦٨) استفاده شد. ۱ گرم بافت تر توزین و توسط ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ خوب له گردید. سپس محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه با نیروی g ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از عمل سانتریفوژ، حجم مساوی از عصاره و تیوباربیوتیک اسید ۰/۵٪ در تری‌کلرواستیک اسید ۲۰٪ به داخل لوله آزمایش منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در داخل بن ماری ٩٦ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت لوله‌ها را به مدت ۵ دقیقه وارد آب یخ نموده و بعد به مدت ۵ دقیقه با نیروی g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. جذب محلول حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ٥٣٢ نانومتر و ٦٠٠ نانومتر اندازه‌گیری گردید (ε = ۱۵۵ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ = ضریب خاموشی).

اندازه‌گیری میزان H_2O_2

میزان H_2O_2 با استفاده از روش Jana and Choudhuri (۱۹۸۱) اندازه‌گیری گردید. ۰/۵ گرم از بافت تر توزین گردید و توسط ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH =٦/٨ له شد. هموژنای حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی g ٦۰۰۰ گذاشته شد. برای تعیین میزان H_2O_2، ۳ میلی‌لیتر از عصاره حاصله برداشته و روی آن ۱ میلی‌لیتر تیتانیوم کلراید ۰/۱٪ در H_2SO_4 ۲۰٪ (v/v) اضافه گردید و محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی g ٦۰۰۰ گذاشته شد. جذب محلول زرد رنگ حاصله به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید ($0/28\ cm^{-1}m^{-1}$=ضریب خاموشی).

اندازه‌گیری آنزیم‌ها

برای تهیه عصاره گیاهی جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم‌ها از روش Kang and Saltiveit (۲۰۰۲) با اندکی تغییرات استفاده شد. برای تهیه این عصاره از برگ‌های میانی گیاه یعنی برگ‌های سوم و چهارم که کاملاً توسعه یافته بودند، استفاده گردید. ۰/۵ گرم وزن تر بافت از هر دو اندام ریشه و اندام هوایی به‌طور جداگانه از کلیه تیمارها توزین گردید و به داخل هاون سرد منتقل شد و توسط ۳ میلی‌لیتر بافر شامل (بافر تریس- HCl ۰/۰۵ مولار با pH =۷/۵، ۳ $MgCl_2$ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار) خوب ساییده شد. هموژنای حاصل سپس به مدت ۲۰ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. محلول رویی حاصله به عنوان عصاره خام برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان استفاده گردید.

فعالیت گایاکول پراکسیداز (Guaiacol peroxidase) در تمام تیمارها و تکرارها با استفاده از روش Updhyaya *et al* (۱۹۸۵) انجام گرفت. ۲/۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار برداشته و روی آن ۱ میلی‌لیتر H_2O_2 ۱٪ (W/V)، ۱ میلی‌لیتر گایاکول ۱٪ و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره آنزیم استخراجی اضافه گردید و فعالیت آنزیم را در طی یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که همراه با افزایش جذب بود ($= ٢٦/٦\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ ضریب خاموشی).

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۳) اندازه‌گیری شد. ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=7 برداشته و روی آن ۱۰ میلی‌مول H_2O_2 و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی اضافه گردید و فعالیت آنزیم در طی یک دقیقه توسط دستگاه اولترا اسپکتروفتومتر مدل LKB در طول موج ۲٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که همراه با

کاهش جذب بود (ε = ۴۳/۶ mM^{-1} cm^{-1} = ضریب خاموشی).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ (شامل ۰/۱ EDTA میلی‌مولار، آسکوربات سدیم ۱ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 ۱۰ میلی‌مولار) برداشته و روی آن ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی اضافه گردید و فعالیت آنزیم از طریق اکسید شدن آسکوربات در طی یک دقیقه توسط دستگاه اولترا اسپکتروفتومتر مدل LKB در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که همراه با کاهش جذب بود (ε = ۲/۸ mM^{-1} cm^{-1} = ضریب خاموشی).

آنالیز آماری

برای آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها از برنامه‌های رایانه‌ای SPSS و Excel استفاده گردید. در کلیه نمودارها بارهای عمودی نشان‌دهنده SE $\pm$ برای سه تکرار می باشد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و دانکن در سطح ۵ درصد، در صورت معنی‌دار بودن اثر عوامل آزمایشی انجام شد.

نتایج و بحث

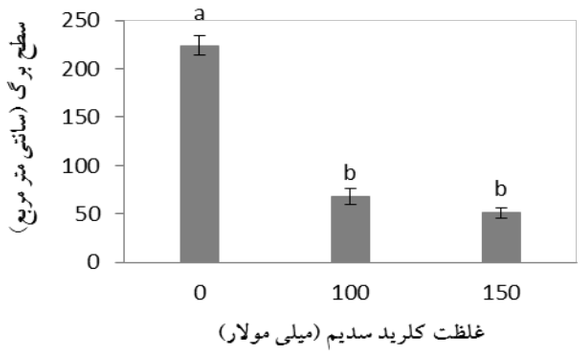
پارامترهای رشدی

نتایج آزمایش نشان داد که سطح برگ با افزایش مقدار شوری کاهش یافت و این کاهش بین گیاهان شاهد و تحت تیمار معنی‌دار بود ولی اختلاف معنی داری بین شوری ۱۰۰ میلی مولار و ۱۵۰ میلی مولار مشاهده نشد (نمودار ۱). از نظر مورفولوژیکی بیشترین علامت مشخص صدمه شوری به گیاه، رشد کم به علت ممانعت از طویل شدن یاخته است (Bandeoglu1 *et al*., 2004). محققان گزارش کرده‌اند که تجمع نمک و یون‌ها موجب تنش اسمتیک و خشکی در گیاه و در نتیجه کمبود آب و کاهش فشار تورژسانس می‌شود که تطویل یاخته‌ها و پیامد آن رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. عدم تورژسانس مناسب یاخته‌ها و تخصیص بیشتر مواد سنتز شده جهت مقابله با تنش شوری، کوتاه شدن دوره رشد گیاه و نیز مکانیسم‌های فرار از تنش همگی می‌توانند مانع از توسعه عادی یاخته‌ها و در نتیجه کاهش سطح برگ و ارتفاع گیاه شوند (Cavalcanti *et al*., 2007). هر چه غلظت نمک در خاک یا آب آبیاری بیشتر باشد کاهش رشد گیاه محسوس‌تر است و سرعت توسعه‌ی برگ به دلیل اثرات مضر سدیم و کلر کاهش می‌یابد (Misra *et al*., 1997). همچنین به نظر می‌رسد کاهش سطح برگ و

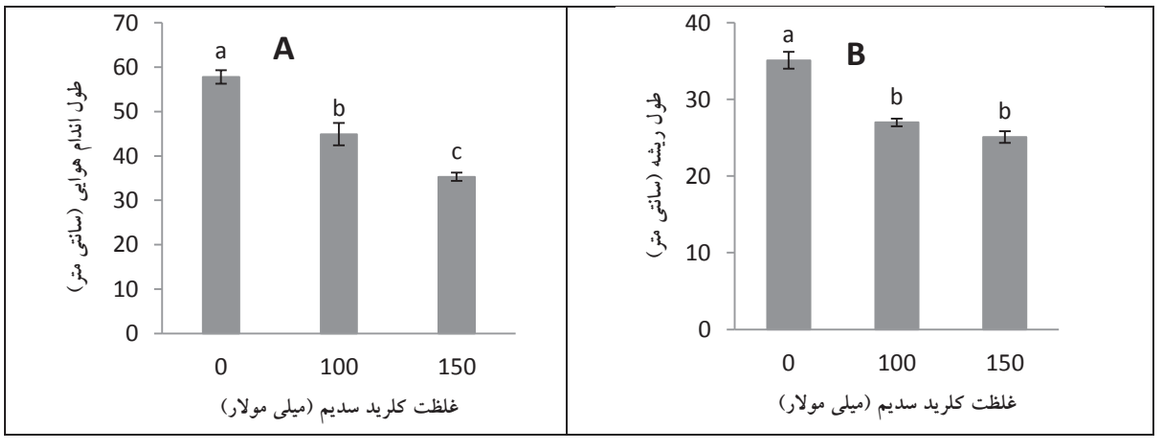
رشد سایر اندام‌های گیاهی در اثر افزایش شوری به علت کاهش میزان هورمون‌های رشد و افزایش مواد بازدارنده رشد نظیر آبسیزیک اسید باشد (Zhu, 2007).

با افزایش مقادیر شوری از صفر به ۱۵۰ میلی‌مولار از طول ریشه و اندام هوایی گیاه نیز کاسته شد و این اختلاف بین مقادیر شاهد و تیمارهای دیگر شوری معنی‌دار بود (نمودار ۲). برخی از علایم عمومی آسیب به وسیله تنش شوری عبارتند از: مهار رشد و توسعه، شتاب پیری و مرگ سلولی. مهار رشد اولین فاکتور است که منجر به علایم دیگر آسیب می‌شود و مرگ سلولی برنامه ریزی شده معمولاً در تنش‌های شدید شوری مشاهده می‌گردد (Yaser *et al*., 2008). محققان دیگر نیز کاهش رشد تحت تاثیر شوری را گزارش نموده‌اند (Razmjoo *et al*., 2008 و Nawaz and Ashraf, 2010).

تنش شوری سنتز آبسسیزیک اسید را القاء می‌کند که موجب بسته شدن روزنه‌ها و کاهش فتوسنتز می‌شود و همچنین شوری با تولید گونه‌های فعال اکسیژن، منجر به تنش اکسیداتیو درگیاهان می‌شود (Zhu, 2007). چون ریشه‌ها بطور مستقیم تحت شوری قرار می‌گیرند، نسبت به سایر قسمت‌ها بیشتر آسیب می‌بیند. تحت تنش شوری Shonjani (۲۰۰۲) در گیاهان چغندر قند، برنج، ذرت و کتان کاهش رشد را در ریشه‌ها و اندام هوایی این گیاهان گزارش نموده است. محققان گزارش کرده‌اند که تجمع نمک و یون‌ها موجب تنش اسمتیک و خشکی می‌شود که منجر به کاهش جذب آب به‌وسیله بافت‌های گیاه می‌گردد؛ کاهش محتوای آب بافت به کاهش رشد و نمو سلولی منجر شده و در نتیجه، کاهش جذب آب و پیامدهای آن یکی از مهمترین دلایل کاهش رشد ریشه و ساقه می‌باشد (Cavalcanti *et al*., 2007).



نمودار ۱: تغییرات سطح برگ در گیاه ذرت کشت شده در غلظت‌های شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد (SE ±) بوده و میزان معنی‌داری تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می باشد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.



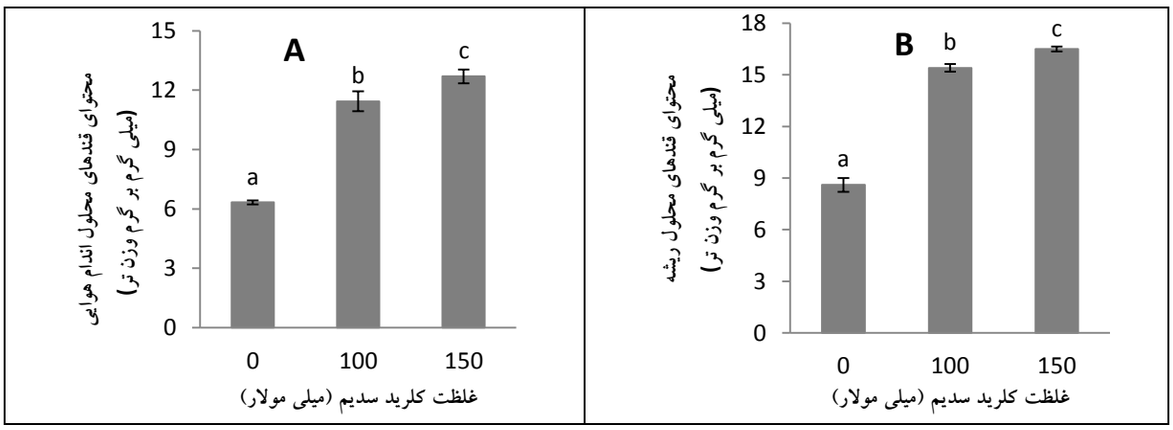
نمودار ۲: تغییرات میزان طول اندام هوایی(A) و ریشه‌ها (B) در گیاه ذرت کشت شده در غلظت‌های شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد (SE ±) بوده و میزان معنی‌داری تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می باشد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.

قندهای محلول

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش مقادیر شوری از صفر به ۱۵۰ میلی‌مولار میزان قندهای محلول کل اندام هوایی و ریشه‌ها افزایش یافت و این اختلاف بین مقادیر شاهد و تیمارهای دیگر شوری معنی‌دار بود (نمودار ۳).

تجمع قندهای محلول کل، پدیده‌ی رایجی تحت شرایط تنش است (Williams *et al.*, 2000). گزارش شده است که قندهای محلول کل با افزایش بیشتر شوری افزایش می‌یابد، که

نقش مهمی را در تنظیم اسمزی دارد (Garg *et al.*, 2002). از آنجایی که شوری، علاوه بر سمیت یونی، در نتیجه‌ی کاهش پتانسیل اسمزی ماتریک خاک، تنش اسمزی تولید می‌کند، در نتیجه گیاهان پتانسیل اسمزی خود را برای تنظیم اسمزی کاهش می‌دهند. کاهش پتانسیل اسمزی در نتیجه افزایش مواد محلول داخل سلولی است که یک مکانیسم سازگاری در گیاهان در برابر استرس خارجی است (Meloni *et al.*, 2003). این امر به گیاه اجازه می‌دهد تورژسانس را تحت تنش شوری حفظ کند. مواد محلولی که اغلب گزارش شده است شامل پرولین، گلایسین بتائین، قند و آمینواسید می‌باشد. احتمالاً افزایش غلظت قندهای محلول به سبب فعالیت بیشتر آنزیم‌هایی نظیر نشاسته فسفریلاز، ساکارز فسفات سینتاز و کاهش فعالیت اینورتاز بوده است. این افزایش در غلظت قندهای محلول می تواند یک پاسخ نسبت به تغییرات میزان محتوای نسبی آب (RWC) و پتانسیل آب‌برگ‌ها ارزیابی شود زیرا افزایش در غلظت ساکارز و قندهای محلول تحت شرایط تنش شوری به سبب بهبود وضعیت آب برگ، در القای تحمل به شوری نقشی مهم ایفا می‌نماید.



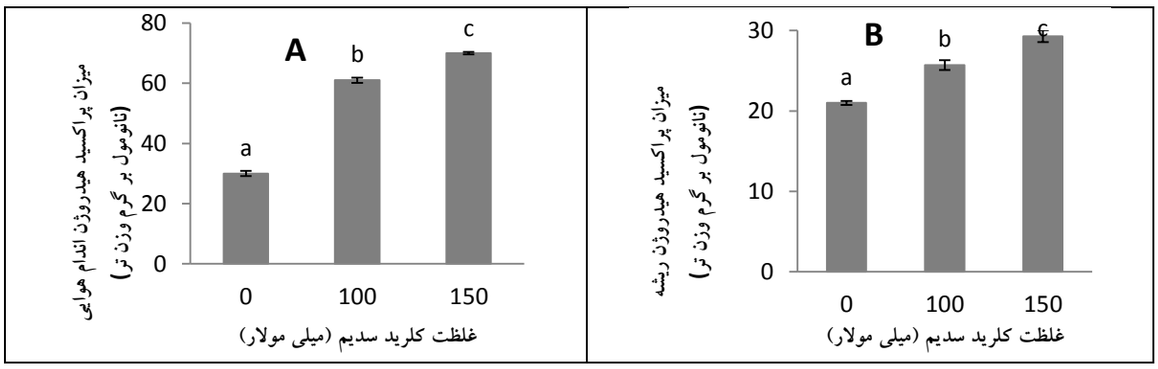
نمودار ۳: تغییرات میزان قندهای محلول کل اندام هوایی (A) و ریشه‌ها (B) در گیاه ذرت کشت شده در غلظت‌های شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد (SE ±) بوده و میزان معنی‌داری تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.

پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید

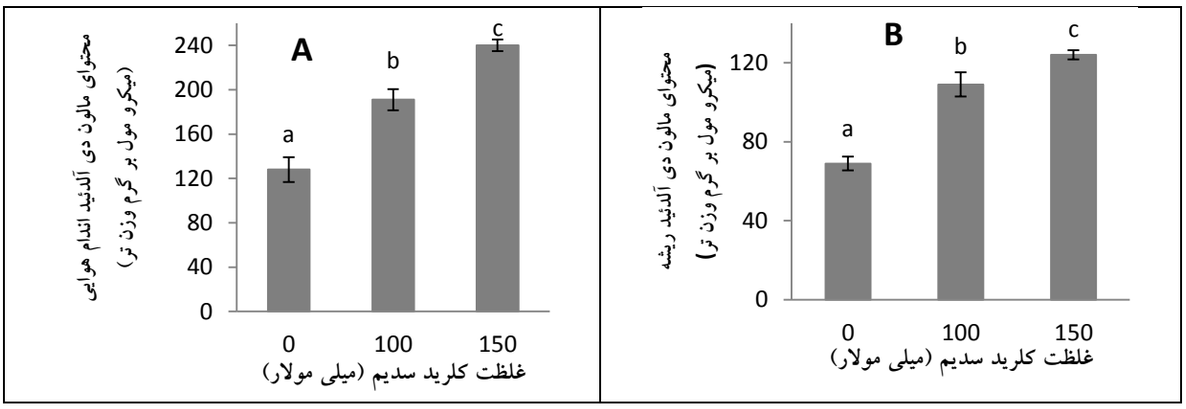
محتوای پراکسید هیدروژن (نمودار ٤) و مالون‌دی‌آلدئید (نمودار ٥) اندام هوایی و ریشه با افزایش مقادیر شوری افزایش یافت و این افزایش بین مقادیر مختلف شوری و شاهد معنی‌دار بود.

ROS ها مثل اکسیژن منفرد، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل به مولکول‌های زیستی (DNA، RNA و پروتیئن‌ها) آسیب می‌رسانند. افزایش تولید پراکسید هیدروژن در گیاه ذرت تحت تنش شوری در این تحقیق نشان دهنده تنش اکسیداتیو ناشی از شوری در این گیاه است. پراکسید هیدروژن می‌تواند با رادیکال سوپراکسید وارد واکنش شده و رادیکال‌های هیدروکسیل فعال شده بیشتری را شکل دهد. رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل آغازگر واکنش‌هایی است که موجب پراکسیداسیون چربی می‌شود (Chen *et al*., 2007).

تخمین مقدار مالون دی آلدئید (MDA) که محصول ثانویه‌ی نهایی اکسیداسیون اسیدهای چرب زنجیر بلند غیر اشباع است، عمدتاً برای اندازه‌گیری مقدار پراکسیداسیون لیپید، به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو استفاده می‌شود (Venkatesanand Sridevi, 2009). افزایش MDA با تنش شوری نشان‌دهنده آسیب‌رسانی شوری به غشای سلولی است که MDA می‌تواندبا اتصال به پروتیئن‌های غشا و آنزیم‌ها منجر به آسیب‌رسانی به ساختار و عمل غشا شود (Chen *et al*., 2007).



نمودار ۴: تغییرات میزان پراکسید هیدروژن اندام هوایی (A) و ریشه ها (B) در گیاه ذرت کشت شده در غلظت‌های شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد ($\pm$ SE) بوده و میزان معنی‌داری تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می باشد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.



نمودار ۵: تغییرات میزان مالون دی آلدئید اندام هوایی (A) و ریشه ها (B) در گیاه ذرت کشت شده در غلظت‌های شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد ($\pm$ SE) بوده و میزان معنی‌داری تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می باشد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.

فعالیت آنزیم‌ها

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز (نمودار ٦)، گایاکول پراکسیداز (نمودار ۷) و آسکوربات پراکسیداز (نمودار ۸) در اندام هوایی و ریشه با افزایش شوری افزایش معنی دار یافت.

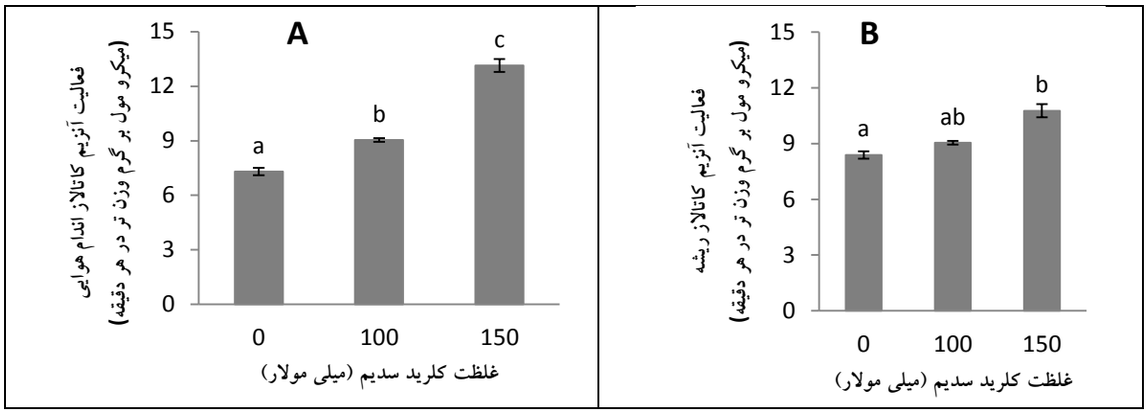
نتایج این مطالعه نشان داد که تنش شوری در گیاه ذرت موجب افزایش پراکسید هیدروژن در هر دو اندام هوایی و ریشه‌ها می‌گردد (نمودار ٤). افزایش پراکسید هیدروژن در گیاه ذرت تحت تنش شوری، تنش اکسیداتیو را در پی دارد. پراکسید هیدروژن به طور طبیعی در یاخته‌های گیاهی تولید می‌شود و براحتی از غشاها می‌تواند عبور نماید. این ماده همچنین به عنوان یک ماده علامت دهی در گیاهان تحت تنش‌های مختلف تولید می‌گردد ولی در صورت افزایش بیش از حد هم مانند گونه فعال اکسیژن عمل می‌نماید. پراکسید هیدروژن می‌تواند همچنین با رادیکال سوپراکسید وارد واکنش شود و رادیکال‌های هیدروکسیل فعال‌شده بیش‌تری را شکل دهد (Apel and Hirt, 2004).

تحقیقات نشان داده است که برای کاهش اثرات سمی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، مکانیسم‌های متنوعی در گیاه فعال می‌شود (Blokhina *et al.*, 2003). پراکسیدازها و کاتالازها دو سیستم اصلی برای دفاع آنزیمی وآسیب‌های پراکسیداتیو دیواره‌های سلولی هستند که توسط سیستم آنزیمی پراکسیداز آنتی اکسیداتیو کنترل می‌شوند (Venkatesan and Sridevi, 2009). کاتالاز آنزیمی مهم در قبال تنش اکسیداتیو است. این آنزیم می‌تواند پراکسید هیدروژن را که

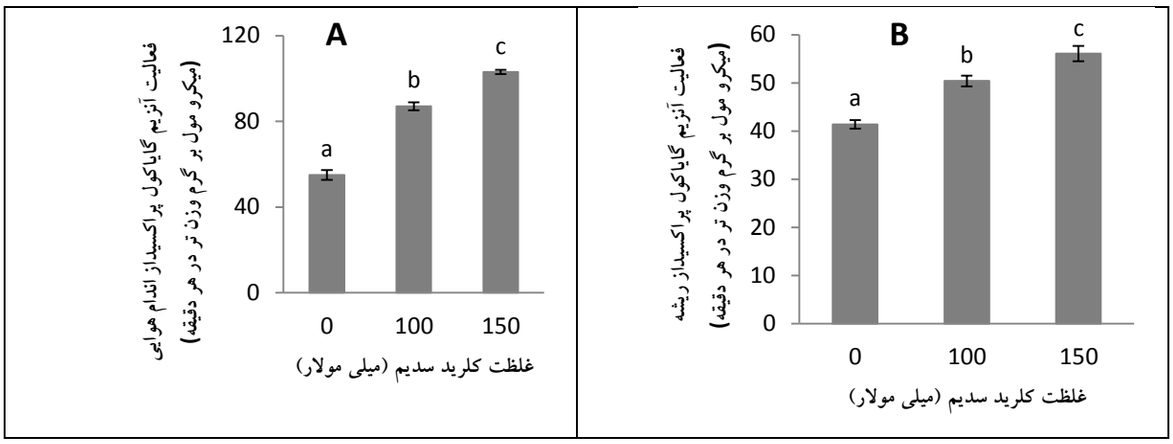
محصول عمده تولید شده به وسیله سوپراکسید دیسموتاز است، پاک سازی کند (Asada, 1992). کاتالاز یک نماینده عمومی اکسیدوردوکتاز است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه کند (Lin and Kao, 2000).

نتایج حاصل در مورد فعالیت گایاکول پراکسیداز در اثر شوری نشان می‌دهد که این آنزیم به عنوان وسیله‌ای دفاعی در مقاومت به آسیب اکسیداتیو شوری القایی در ذرت عمل می‌کند.

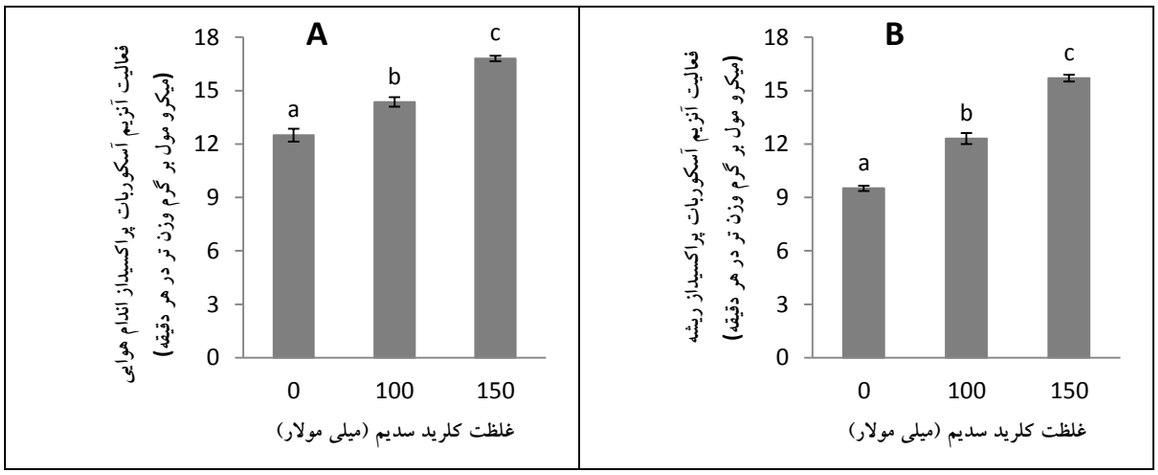
آسکوربات پراکسیداز به عنوان آنزیم جاروکننده پراکسید هیدروژن در این بررسی مورد سنجش قرار گرفت. افزایش فعالیت این آنزیم در گیاهان تیمار شده با کلرید سدیم در واقع نقش کلیدی در پاسخ گیاه به افزایش تجمع پراکسید هیدروژن است. این آنزیم عمدتاً در کلروپلاست، سیتوزول و دیگر اندامک‌های داخل سلول تولید می‌شود و برای حفظ حالت احیا در سلول‌ها مورد نیاز است (Updhyaya *et al*., 1985). تحقیقات نشان داده است که وقتی گیاهان در معرض استرس اکسیداتیو مثل شوری قرار می‌گیرند، میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدان افزایش می‌یابد (Yasar *et al*., 2007) که با نتایج این تحقیق همسویی نشان می‌دهد.



نمودار ۶: اثر شوری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی(A) و ریشه (B) گیاه ذرت کشت شده در غلظت‌های شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. ستون ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد (SE $\pm$) بوده و میزان معنی دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می باشد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.



نمودار ۷: اثر شوری بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در اندام هوایی(A) و ریشه (B) گیاه ذرت کشت شده در غلظت‌های شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. ستون ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد ($\pm$ SE) بوده و میزان معنی دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می باشد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.



نمودار ۸: اثر شوری بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی(A) و ریشه (B) گیاه ذرت کشت شده در غلظت‌های شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. ستون ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد ($\pm$ SE) بوده و میزان معنی دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون دانکن هستند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که شوری رشد گیاهان را کاهش می‌دهد که این کاهش می‌تواند به علت تنش اکسیداتیو باشد. سمیت شوری باعث آسیب فراساختاری می‌شود و چند فرایند بیوشیمیایی را نیز متاثر می‌سازد.

این صدمات می‌تواند منجر به تنش زیستی و غیرزیستی شوند. در نتیجه ROSها با شدت بیشتری تولید شده و صدمات جبران ناپذیری به ماکرومولکول‌های زیستی وارد می‌سازند. آنزیم های آنتی اکسیدانی مثل کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز می‌توانند ROSها را جاروب نمایند. از این رو افزایش فعالیت این آنزیم‌ها و بیان آنها می‌تواند در پاسخ به سمیت شوری تحریک شود. این آنزیم‌ها برای رفع صدمات ناشی از تنش شوری، افزایش می‌یابد و بنابراین گیاهانی‌که توانایی افزایش بیان و فعالیت این آنزیم‌ها را دارند، متحمل به شوری هستند. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان بیان نمود که گیاه ذرت گیاه متحمل به شوری در غلظت‌های اعمال شده است.

منابع

میرمحمدی میبدی، ع. و قره یاضی، ب.؛ (۱۳۸۱). جنبه‌های فیزیولوژیک و به‌نژادی تنش شوری گیاهان. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

Aebi, H. (1983). Catalase. In H Bergmeyer, ed, Methods of enzymatic analysis 3. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. 273-277.

Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism oxidative stress, and signaling transduction. Annu Rev Plant Biol. 55: 373–399.

Asada, K. (1992). Acorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. Plant Physiol. 85: 235-241.

Bandeoglu, E., Eyidogan, F., Yucel, M. and Avni Oktem, H. (2004). Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. Plant Growth Regul. 42: 69-77.

Blokhina, O., Virolanen, E. and Fagestedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. Ann Bot. 91: 179-194.

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

Chen, J., Zhu, C., Lin, D. and Sun, Z.X. (2007). The effect of Cd on lipid peroxidation, hydrogenperoxide content and antioxidant enzyme activities in Cd-sensitive mutant rice seedlings. Can Plant Sci. 87: 49-57.

Flowers, T.J. (1999). Salinisation and horticultural production. Sci Hortic. 78: 1-4

Flowers, T.J. and Flowers, S.A.M. (2005). Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? Agric Water Manage. 78: 15-24.

Garg, A.K., Ownes, J.K. and Wu, R.J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stress. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99: 15898-15903.

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

Hoagland, D.R., and Arnon, D.I. **(**1950). The water culture method for growing plants without soil. University of California, Berkeley, CA, USA.

Jana, S. and Choudhuri, M.A. (1981) Glycolate metabolism of three submerged aquatic anagiosperms during aging. Aquat Bot. 12: 345-354.

Jones, M.M. and Turner, N.C. (1978). Osmotic adjustment in leaves of sorghum in response to water deficits. Plant Physiol. 61: 122-126.

Kang, H.M. and Saltiveit, M.E. (2002). Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid. Physiol Plantarum. 115: 577-576.

Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. In: J.A. Hellebust and J.S. Craige, Editors, Handbook of physiological and biochemical methods, Cambridge University Press, London, Pp: 95–97.

Lin, C.C., and Kao, H. (2002). Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. Plant Growth Regul. 30: 151-155.

Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. and Cambraia, B. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. Environ Exp Bot. 49: 69-76.

Misra, A.N., Sahu, S.M. and Misra, M. **(**1997). Sodium chloride induced changes in leaf growth and pigment and protein contents in two rice cultivars. J Plant Biol. 39: 257-262.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ. 25: 659-151.

Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Annu Rev Plant Biol. 59: 651-81.

Nawaz, K., and Ashraf, M. (2010). Exogenous application of glycinebetaine modulates activities of antioxidants in maize plants subjected to salt stress. J Agron Crop Sci. 196(1): 28–37.

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

Noreen, Z. and Ashraf, M. (2009). Changes in antioxidant enzymes and some key metabolites in some genetically diverse cultivars of radish (*Raphanus sativus* L.). Environ Exp Bot. 67(2): 395-402.

Razmjoo, K., Heydarizadeh, P. and Sabzalian, M. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomila*. Int J Agr Biol. 10: 451-454.

Rus, A.M., Estan, M.T., Gisbert, C., Garcia-Sogo, B., Serrano, R., Caro, M., Moreno, V. and Bolarini, M.C. (2001). Expressing the yeast HAL1 gene in tomato increases fruit yield and enhances K^+/Na^+ selectivity under salt stress. Plant Cell Environ. 24: 875-880.

Sairam, R.K., Veerabhadra, R.K. and Srivastava, G.C. (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.

Selote, D.S. and Khanna-Chopra, R. (2004). Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defense in rice panicles. Plant Physiol. 121: 462-471.

Shilpim, M. and Narendra, T. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. Arch Biochem Biophys. 444: 139-158.

Shonjani, S (2002). Salt sensitivity of rice, maize, sugar beet and cotton. Dissertation. Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics and Environmental Management Submitted by Saeed Shonjani. Institute of Plant Nutrition Justus Liebig University, Giessen.

Tester, M. and Davenport, R. (2003). Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Ann Bot. 91 (5): 503-7.

Updhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N. and Smidth, B.N. (1985). Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Plant Physiol. 121: 453-461.

Venkatesan, A. and Sridevi, S. (2009). Response of antioxidant metabolism to NaCl stress in the halophyte *salicornia brachiata roxb*. J Phytol. 4: 242-248

Williams, L.E., Lemonie, R. and Saucer, N. (2000). Sugars transporters in higher plants: a diversity of roles and complex regulation trends. Plant Sci. 5: 283-290.

Yasar, F., Ellialtioglu, S. and Yildiz, K. (2008). Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. Russ J Plant Phys. 55(6): 782-786.

Zhu, J.K**. (**2007). Plant salt stress. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley and Suns Ltd. 1-3.