بررسی نقش حفاظتی سدیم نیتروپروساید (SNP) در کاهش خسارت تنش اکسیداتیو ناشی از شوری در دو رقم برنج

سمانه اسدی صنم[۱]، محسن زواره[۲]، همت‌اله پیردشتی[۳]، ابوذر هاشم‌پور[۴]
۱و۴ - دانشجوی دکترای زراعت و باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- استادیار گروه زراعت، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
samaneh2162@yahoo.com

چکیده

با هدف بررسی نقش سدیم نیتروپروساید در کاهش خسارت اکسیداتیو القاء شده باتنش شوری در برنج، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه زراعت دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: چهار سطح (CK: شاهد، S: ۵۰ میکرومول سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان دهنده نیتریک‌اکساید (NO)، N: ۵۰ میلی‌مول نمک کلریدسدیم (NaCl)، N+ S: ۵۰ میلی‌مول نمک کلریدسدیم + ۵۰ میکرومول سدیم نیتروپروساید) و دو رقم برنج خزر و رقم جدید گوهر (لاین امیدبخش SA13) بودند. میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات‌پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) مورد سنجش قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که فعالیت آنزیم SOD و POD در حضور نیتریک‌اکساید و کلریدسدیم (تیمار N+ S)، به‌ترتیب ۵۶ و ۲۵.۲ درصد بیشتر از تیمار کلریدسدیم به‌تنهایی (N) بوده است. اثر القاکننده SNP در شرایط تنش بر فعالیت آنزیم APX بیشتر از SOD و POD بود. رقم خزر پاسخ بهتری به NO از نظر فعالیت آنزیم APX و CAT نشان داد. درمجموع، به‌نظر می‌رسد که تیمار نیتریک‌اکساید خارجی می‌تواند با تأثیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های برنج، خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو القاء شده با تنش شوری را کاهش داده و موجب بهبود تحمل شوری در گیاهچه‌ها شود.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، برنج، لاین SA13، نیتریک‌اکساید

مقدمه

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی در کشاورزی امروز است که هم در اقلیم‌های مرطوب و هم در اقلیم‌های خشک وجود داشته و با افزایش سطح زیر کشت زراعت آبی بر اهمیت آن افزوده می‌شود (ماهاجان و توتجا، ۲۰۰۵). تنش شوری می‌تواند با ایجاد اثر اسمزی، برهم‌زدن توازن یونی، ایجاد سمیت در گیاه و همچنین، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ازجمله یون سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) سبب خسارت به گیاه شود (تورکان و دمیرال، ۲۰۰۹). با این‌حال، گیاهان برای کاهش این اثرات مخرب، سازوکارهای مختلفی را در خود ایجاد کرده و توسعه داده‌اند که نمونه‌ای از آن‌ها تولید آنزیم‌های حذف‌کننده ROSها است (تانو و همکاران، ۲۰۰۹).

سدیم نیتروپروساید (SNP) یک ترکیب رهاکننده نیتریک‌اکساید (NO) است که نقش آن در گیاهان موضوع

پژوهش‌های مهمی بوده است. نیتریک‌اکساید (NO)، یک گونه فعال نیتروژن است که تصور می‌شود بتواند به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان میانجی‌گری کرده و به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان، ROSها را از بین ببرد (آراسیمویز و همکاران ۲۰۰۷؛ لی و همکاران ۲۰۰۸). برای مثال، یوچیدا و همکاران (۲۰۰۲) با کاربرد غلظت ۱ میکرومولار SNP در گیاهچه‌های برنج، لی و همکاران (۲۰۰۷) با کاربرد غلظت ۰.۲ میلی‌مولار SNP در گیاهچه‌های گندم و لی و همکاران (۲۰۰۸) با کاربرد غلظت ۵۰ میکرو مولار SNP در جو، محافظت در برابر خسارت اکسیداتیو و افزایش تحمل به تنش اسمزی را گزارش کردند.

با وجود پژوهش های مختلفی که روی غلات انجام شده، گزارش مدونی روی ارقام ایرانی برنج دیده نشد. بنابراین، آزمایش حاضر با هدف بررسی نقش سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان ترکیب رهاکننده NO، در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از قرار گرفتن گیاهچه‌های برنج در شرایط شور طراحی و اجرا شد.

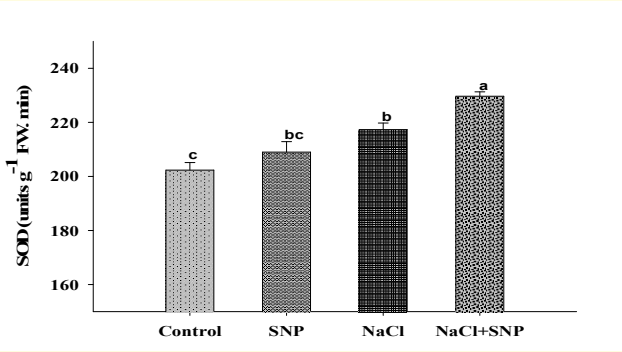
مواد و روش‌ها

این پژوهش، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه زراعت دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. پس از ضدعفونی بذرهای دو رقم برنج خزر و رقم جدید گوهر (لاین امیدبخش SA13) به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۲.۵ درصد هیپوکلریت سدیم، این بذرها در گلدان‌های حاوی پرلیت جوانه‌دار شده و در اتاقک رشد در دمای ۲۶/۲۲ درجه سلسیوس روز به شب و رطوبت نسبی ۷۰-۶۰ درصد برای ۱۵ روز رشد کردند. گیاهچه‌ها هر سه روز با ۲۰ میلی‌لیتر از محلول یوشیدا (۱۹۷۶) آبیاری شدند و اسیدیته بستر آن‌ها بین ۵.۴ تا ۵.۵ حفظ شد. پس از ۱۵ روز از رشد، گیاهچه‌های قوی و سالم برای تیمارهای آزمایشی انتخاب شدند. تیمارهای آزمایشی، شامل: چهار سطح (CK: شاهد، S: ۵۰ میکرومول سدیم نیتروپروساید (SNP؛ به‌عنوان دهنده NO)، N: ۵۰ میلی‌مول نمک کلریدسدیم (NaCl)، N+S: ۵۰ نمک کلریدسدیم + ۵۰ میکرومول سدیم نیتروپروساید) و دو رقم برنج خزر و رقم جدید گوهر بود.

۴ روز پس از شروع تیمارها، برگ‌های یکنواخت (بالاترین برگ توسعه یافته) گیاهچه‌های برنج جمع‌آوری شد تا میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات‌پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) در برگ‌ها اندازه‌گیری شود. سنجش فعالیت آنزیم SOD به‌روش گیانوپولیتیس و رایس (۱۹۷۷) در طول موج ۵۶۰ نانومتر و سنجش فعالیت آنزیم POD به‌روش قناتی و همکاران (۲۰۰۲) در طول موج ۴۷۰ نانومتر، هر دو برحسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه بیان شد. برای سنجش فعالیت آنزیم APX از روش ناکانو و آسادا (۱۹۸۱) در طول موج ۲۹۰ نانومتر و برای آنزیم CAT هم، از روش لاک (۱۹۷۴) در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد و فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد. برای تجزیه داده‌ها، از رویه‌های نرم‌افزار SAS نسخه ۹ استفاده شد و نمودارها نیز، با نرم‌افزار SigmaPlot نسخه ۱۲ رسم شدند.

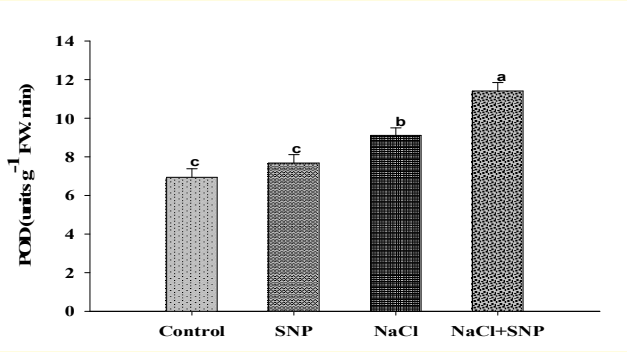
نتایج و بحث

داده‌های آزمایش حاضر، نشان داد که فعالیت آنزیم‌های SOD، POD، APX و CAT به‌طور معنی‌داری پس از تیمار شوری افزایش یافته است (نمودارهای ۱ تا ۴). در این آزمایش و ۴ روز پس از اعمال تیمار، فعالیت آنزیم SOD در حضور نیتریک‌اکساید به‌همراه نمک کلریدسدیم (تیمار N+ S)، ۵۶ درصد بیشتر از تیمار کلریدسدیم به‌تنهایی (N) بود (نمودار ۱)؛ بااین‌حال، هیچ تفاوت معنی‌داری در بین ارقام مشاهده نشد (نمودار ۱). بنابراین می توان گفت، تیمار دهنده NO با افزایش فعالیت این آنزیم، سمیت‌زدایی یون سوپراکسید را در شرایط تنش افزایش داده و سبب کاهش آسیب‌های حاصله از آن در گیاه می‌شود.



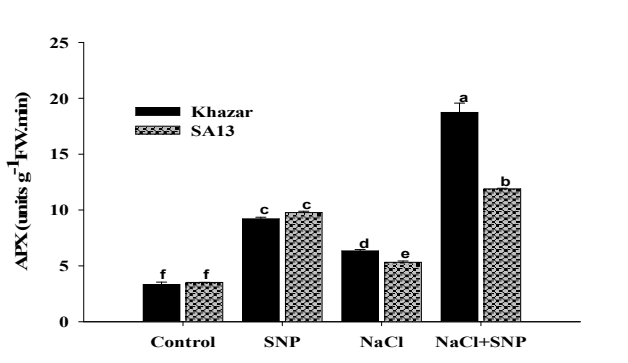
نمودار ۱. اثر ساده و ترکیبی NaCl و SNP بر فعالیت آنزیم SOD در برگ‌های برنج

بر اساس نتایج آزمایش، NO اضافی موجب تغییرات مشابهی در فعالیت آنزیم POD شد (نمودار ۲)؛ به‌طوری که، بیشینه میزان فعالیت این آنزیم ۱۱.۴۱ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه در تیمار (N+ S) ثبت شد که ۲۵.۲ درصد نسبت به تیمار کلریدسدیم به‌تنهایی (N) افزایش داشت (نمودار ۲). تیمار NO در شرایط شور، احتمالاً توانسته با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی سبب افزایش فعالیت آنزیم POD شده و با دخالت در پاکسازی یون سوپراکسید، تولید پراکسیدهیدروژن درون سلولی را کاهش دهد (لی و همکاران ۲۰۰۸).



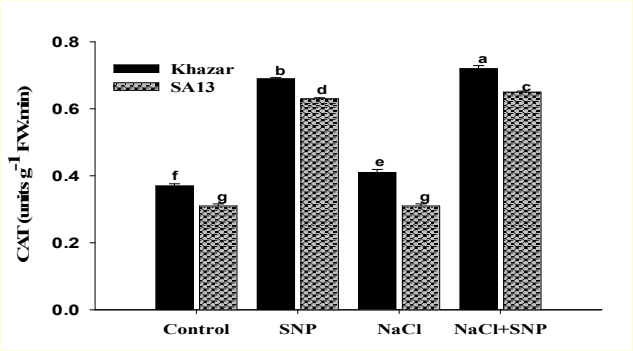
نمودار ۲. اثر ساده و ترکیبی NaCl و SNP بر فعالیت آنزیم POD در برگ‌های برنج

اثر القاکننده SNP تحت تنش، بر فعالیت آنزیم APX بیشتر از SOD و POD بوده است (نمودار ۳). برخلاف این دو آنزیم، فعالیت APX به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) در بین هر دو رقم افزایش یافت که بیانگر، نقش بیشتر این آنزیم در فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه تحت این شرایط بود (نمودار ۳).



نمودار ۳. اثر ساده و ترکیبی NaCl و SNP بر فعالیت آنزیم APX در دو رقم برنج

در تشابه با APX، تنش شوری فعالیت کاتالاز را هم در برگ‌های برنج رقم خزر نسبت به شاهد افزایش داد (نمودار ۴). با استفاده از NO خارجی فعالیت این آنزیم هم، به‌طور معنی‌داری در بین تیمارها متفاوت بود (df= ۳؛ $P<$ ۰/۰۱؛ F= ۱۹۳۸.۹) (نمودار ۴). یافته‌های این مشابه نتایجی است که روی برنج، جو و گندم به دست آمده است (لی و همکاران، ۲۰۰۸؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۰۹؛ یوچیدا و همکاران، ۲۰۰۲)؛ در این آزمایش‌ها، کارکرد نیتریک‌اکساید در کاهش تنش اکسیداتیو به القای فعالیت آنزیم‌های حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد نسبت داده شده است



نمودار ۴. اثر ساده و ترکیبی NaCl و SNP بر فعالیت آنزیم CAT در دو رقم برنج

درمجموع، تیمار نیتریک‌اکساید در شرایط شوری توانست با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، گیاهچه‌های برنج را از خسارت اکسیداتیو القاء شده با تنش شوری محافظت کرده و موجب پاکسازی بیشتر رادیکال‌های آزاد و بهبود تحمل شوری در گیاهچه‌های برنج شود. در این آزمایش، تأثیر مثبت نیتریک‌اکساید بر رقم خزر نسبت به رقم جدید گوهر (SA13) بیشتر بود. همچنین،

منابع

Arasimowicz M and Floryszak-Wieczorek J, 2007. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. Plant Science 172: 876–887.

Ghanati F, Morita A and Yokota H, 2002. Induction of suberin and increase of lignin content by exess boron in tobacco cell. Plant Nutrients 48: 357-364.

Giannopolitis C and Ries S, 1977. Superoxide dismutase. I. Occurence in higher plant. Plant Physiology 59: 309-314.

Lei Y, Yin C, Ren J and Li C, 2007. Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. Biologia Plantarum 516: 386-390.

Li QY, Niu HB, Yin J, Wang MB, Shao HB, Deng DZ, Chen XX, Ren JP and Li YC, 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*).Colloids and Surfaces B:Biointerfaces 56: 220-225.

Luck H, 1974. In**:** *Methods in Enzymatic Analysis 2 (Eds: Bergmeyer)*. Academic Press New York. p 885.

Mahajan S and Tuteja N, 2005. Cold, salinity and drought stressed: an overview. Archives of Biochemistry Biophysics 444: 139–158.

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

Tanou G, Molassiotis A and Diamantidis G, 2009. Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. Environmental and Experimental Botany 65: 270-281.

Turkan I and Demiral T, 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. Environmental and Experimental Botany 67: 2–9.

Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T, 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. Plant Science 163: 515-523.

Yoshida S, Forno AD, Cook JH and Gomes KA, 1976. Routine procedure for growing rice plants in culture solution. In: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice, 3rd ed. The International Rice Research Institute, Los Baños, Laguna, Philippines. 61–65.

Zheng C, Jiang D, Liu F, Dai T, Liu W, Jing Qi and Cao W, 2009. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. Environmental and Experimental Botany 67: 222-227.