# بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ برنج تحت تنش شوری

**محمد یعقوبی*[1]، قربانعلی نعمت‌زاده[2]، مصطفی مدرسی[3]**

۱- کارشناس‌ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان

۲- استاد و محقق ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*Yaghubis@yahoo.com

## چکیده

جهت بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در برگ برنج تحت تنش شوری، آزمایشی در سال ۱۳۸۹ در گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان انجام گرفت. این طرح به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با دو ژنوتیپ اصلاح شده برنج (رقم قائم) و محلی (رقم سنگ‌جو) در چهار سطح شوری و در سه تکرار انجام شد. گیاهچه‌های مورد مطالعه با چهار سطح نمک کلرید سدیم، شامل صفر، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی مولار تیمار گردیدند. نمونه‌گیری از برگ‌ها جهت انجام آزمایشات آنزیمی، در پنج مرحله انجام شد. مرحله اول قبل از اعمال تیمار شوری و سایر مراحل نمونه‌گیری هر سه روز یکبار صورت گرفت. سپس فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز ( بر اساس میزان تجزیه شدن $H_2O_2$) و سوپراکسید دیسموتاز در طول موج‌های مورد نظر با روش اسپکتروفتومتری تعیین گردیدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل شوری و رقم برای آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز ($\alpha$ =۰/۰۱) و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($\alpha$ =۰/۰۵) از نظر آماری معنی‌دار شده است. فعالیت تمامی آنزیم‌های مورد بررسی در رقم سنگ جو با گذشت زمان افزایش یافت ولی در رقم قائم، میزان فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز روند مشخصی نداشته و ارتباط مشخصی بین میزان فعالیت این آنزیم و تیمارهای تنش شوری دیده نشد. با این وجود فعالیت پراکسیداز کاهش و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافته است.

**کلمات کلیدی:** آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، تنش شوری، برنج

## مقدمه

نمک موجود در محلول خاک یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده عملکرد گیاهان زراعی، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک دنیا است. در حدود ۲۰ درصد از کل زمین‌های زراعی و نیمی از زمین‌های تحت آبیاری دنیا، تحت تأثیر شوری قرار گرفته است (Hossain *et al.*, 2004). شوری تأثیر چندجانبه‌ای بر گیاهان زراعی داشته و باعث بروز تنش اسمزی، سمیت یونی و اختلال در تعادل یونی می‌شود (Munns *et al.*, 2006).

در کنار اثرات اسمزی و یونی می‌توان از اثرات تنش شوری در القای تنش اکسیداتیو نیز نام برد که می‌تواند اثرات مخربی بر رشد گیاه داشته باشد (Rio *et al.*, 2002). هنگامی‌که گیاهان در معرض تنش‌های محیطی مانند سرما، گرما، خشکی و شوری قرار می‌گیرند، تعادل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در آن‌ها بهم خورده و این وضعیت موجب تنش اکسیداتیو می‌گردد. در گیاهان ROS های[1] مختلفی (مانند پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید) در اثر احیای اکسیژن مولکولی تولید می‌شوند (Dat *et al.*, 2000; Jung, 2004). شوری با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، فرایندهای متابولیکی و فعالیت‌های آنزیمی را تغییر می‌دهد (Hameed *et al.*, 2008) جهت خنثی سازی سمیت گونه‌های فعال اکسیژن، سیستم دفاعی کارآمد آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول‌های گیاهی وجود دارد که از تشکیل این رادیکال‌ها جلوگیری و یا آن‌ها را پاکسازی می‌کند. از این آنتی-اکسیدان‌ها می‌توان به آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز اشاره کرد (Blokhina *et al.*, 2003).

برنج گیاهی حساس به تنش شوری است و گیاهان و ارقام مقاوم به تنش شوری برای مقابله یا سازگاری با این شرایط سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدانت آنزیمی خود را فعال‌تر می‌کنند. بنابراین هدف از این آزمایش بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در برگ برنج تحت تنش شوری بود.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۸۹ در گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو ژنوتیپ اصلاح شده برنج (رقم قائم) و محلی (رقم سنگ جو) در چهار سطح شوری و در سه تکرار انجام گرفت. کشت گیاهان در این آزمایش در ظروف ۱۰ لیتری انجام شد. بطوری که گیاهچه‌ها ابتدا در ظروف کاشت با آب مقطر قرار داده شدند تا بذور استقرار یابند. پس از این مدت، آب مقطر با محیط کشت یوشیدا جایگزین شد. محیط کشت یوشیدا

1- Reactive Oxygen Species

هر ۴- ۵ روز یکبار تعویض و pH محیط کشت هر روز با استفاده از هیدروکسید پتاسیم و اسید کلریدریکاسید کلریدریک یک نرمال در سطح ۵/۵ تنظیم شد. در مرحلهٔ رشد رویشی، زمانی که برگ سوم گیاه کامل گردید (حدودا ۱۶ روز پس از کاشت)، گیاهچه‌های مورد مطالعه با چهار سطح نمک کلرید سدیم، شامل صفر، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی مولار تیمار گردیدند که نمک مذکور به همراه محلول غذایی به محیط ریشه اضافه شد.

نمونه‌گیری از برگ جهت انجام آزمایشات آنزیمی، در پنج مرحله انجام گرفت. مرحله اول قبل از اعمال تیمار شوری و سایر مراحل نمونه‌گیری هر سه روز یکبار صورت گرفت. در تمامی مراحل، نمونه های تر بلافاصله با ازت مایع منجمد شده و به فریزر ۷۰ - درجه منتقل شدند. سپس فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز (بر اساس میزان تجزیه شدن $H_2O_2$ و سوپراکسید دیسموتاز در طول موج‌های مورد نظر با روش اسپکتروفتومتری تعیین گردیدند. میزان) پروتئین محلول نیز طبق روش برادفورد و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان پروتئین استاندارد اندازه‌گیری شد. در پایان، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و MSTAT تجزیه و تحلیل شد و در نهایت نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار شوری و ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که اثرات متقابل شوری و رقم برای آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال ۰/۰۱ و برای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار شده است. اما اثر تنش شوری تنها بر آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز اثر معنی‌داری داشته است ($\alpha$ =۰/۰۱). همچنین اثر بین ارقام مورد مطالعه نیز از لحاظ فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده شد که نشان دهنده روند متفاوت فعالیت این آنزیم‌ها در دو ژنوتیپ مورد مطالعه است (جدول ۱).

همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم سنگ جو با گذشت زمان افزایش یافته است و سرعت این افزایش در تیمار شوری ۱۲۰ میلی مولار Nacl بیشتر از تیمارهای دیگر بوده است. درحالیکه در رقم قائم (که در این مطالعه حساس به شوری بوده است) میزان فعالیت کاتالاز روند مشخصی نداشته و ارتباط مشخصی بین میزان فعالیت این آنزیم و تیمارهای تنش شوری دیده نمی‌شود. وایدیاناتان و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز یک راهکار مؤثر در بالابردن مقاومت برنج به تنش شوری به‌شمار می‌آید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت یکی از دلایل مقاومت بیشتر رقم سنگ جو به تنش شوری، افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش شوری باشد.

کاتالاز آنزیمی است که در پراکسی‌زوم، پراکسید هیدروژن حاصل از اکسیداسیون اسیدهای چرب و تنفس نوری را تجزیه می‌کند. تنفس نوری یکی از مکانیسم‌های حفاظتی مهم جهت محافظت از ساختار کلروپلاست و سلول به‌شمار می‌آید. این مکانیسم با آزاد نمودن مجدد دی‌اکسیدکربن تثبیت شده، سبب تعدیل پتانسیل ردوکس سلولی می‌گردد. امروزه ثابت شده است که این مکانیسم دفاعی در شرایط شوری فعال‌تر می‌گردد که در نتیجه افزایش تولید پراکسید هیدروژن را در پی دارد (Mittler, 2002). لذا با توجه به عدم افزایش فعالیت کاتالاز در رقم قائم، این متابولیت سمی در سلول تجمع می‌یابد. یکی از دلایل افزایش نیافتن میزان فعالیت آنزیم کاتالاز رقم قائم در این آزمایش را می‌توان به عدم افزایش میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت داد (شکل ۳). چرا که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن را کاتالاز می‌کند (Polle, 2001). لذا گیاه نیازی به افزایش میزان آنزیم کاتالاز جهت سم‌زدایی ندارد.

همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو رقم مورد مطالعه روند کاملا مخالفی را نشان دادند. به‌طوریکه در رقم سنگ جو با افزایش تعداد روز پس از تنش، میزان فعالیت پراکسیداز نیز افزایش یافت. این افزایش به‌طور غیر معمول حتی در تیمار شاهد که تحت تأثیر تنش نبوده نیز دیده شد. اما در رقم قائم میزان فعالیت آن روند کاهشی داشت و کمترین میزان فعالیت کاتالاز در تیمار شوری ۱۲۰ میلی مولار NaCl مشاهده گردید. در واقع می‌توان گفت که آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ مقاوم افزایش ولی در ژنوتیپ حساس کاهش یافته است. اگر چه پراکسید هیدروژن در غلظت‌های بالا سمی است و بوسیلهٔ آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز چرخهٔ آنتی اکسیدانی آسکوربات گلوتاتیون از بین می‌رود، اما در غلظت‌های پائین می‌تواند نقش پیام را در فرآیندهای انتقال پیام بازی کند و ژن‌های وابسته به مقاومت را در گیاه، فعال کند (Foyer *et al.*, 1997).

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در رقم سنگ جو نیز با گذشت زمان پس از شروع تنش روندی افزایش نشان داد. این میزان فعالیت در تیمار شوری ۱۲۰ میلی مولار NaCl به بالاترین مقدار خود رسید که نشان دهنده همبستگی بین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و افزایش میزان تنش است. در رقم قائم میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مشابه آنزیم کاتالاز، دارای روند معینی نبوده است و نمی‌توان نتیجه مشخصی از آن گرفت (شکل ۳). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از مهمترین آنزیم‌های مکانیسم‌های دفاعی است و سبب تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن می‌گردد (Mittler *et al.*, 2004) و افزایش فعالیت آن موجب مقاوم‌تر شدن گیاهان به تنش‌های محیطی می‌گردد (Alscher *et al.*, 2004). آنیون‌های سوپر اکسید بوسیله تنش شوری در سلول تولید می‌شود زیرا مهمترین تأثیر تنش شوری اخلال در وضعیت آب سلولی است که در نتیجهٔ آن رشد کاهش می‌یابد.

همچنین افزایش تنفس در این شرایط سبب تولید این یون‌های مخرب در میتوکندری سلول می‌گردد. در چنین شرایطی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به‌عنوان یک آنزیم از بین برنده یون سوپر اکسید، مشابه نتایج بدست آمده افزایش می‌یابد (دولت‌آبادیان و همکاران، ۱۳۸۷).سوپراکسید دیسموتاز نقش کلیدی در چرخه گزانتوفیل دارد که این چرخه یکی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه است (*Ort, 2001*).

همانطور که در شکل ۴ دیده می‌شود میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در هر دو رقم با گذشت تعداد روز پس از شروع تنش شوری، افزایش یافت و این افزایش در هر سه تیمار شوری در مقایسه با تیمار شاهد محسوس بوده است. این آنزیم نقش مهمی در چرخه مهلر دارد که یکی از مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در مقابله با تنش‌های محیطی است (Asada, 2000). لی و همکاران (۲۰۰۱) نیز به افزایش فعالیت آنزیم‌های مذکور گیاه تحت تنش شوری اشاره کرده و گزارش کردند بین میزان این آنزیم‌ها و تنش شوری همبستگی وجود دارد. نوکتور و فویر (۱۹۹۸) نیز نشان دادند که گیاهان در طول شرایط تنش‌زا، گیاهان سنتز آنتی اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز را افزایش می‌دهند که با نتایج این آزمایش بر روی رقم سنگ جو نیز مطابقت دارد. اما در مورد رقم قائم که به شوری حساس‌تر بوده است تنها سنتز آسکوربات پراکسیداز افزایش یافته است.

جدول همبستگی صفات مورد مطالعه (جدول ۲) نشان می‌دهد تنها بین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیدار همبستگی معنی‌داری وجود ندارد. ولی بین فعالیت سایر آنزیم‌ها با یکدیگر همبستگی مثبت و معنی‌داری دیده می‌شود ($\alpha$ =۰/۰۱).

## نتیجه‌گیری

فعالیت تمامی آنزیم‌های مورد بررسی در رقم سنگ جو با گذشت زمان افزایش یافت ولی در رقم قائم، میزان فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز روند مشخصی نداشته و ارتباط مشخصی بین میزان فعالیت این آنزیم و تیمارهای تنش شوری دیده نمی‌شود. درحالیکه فعالیت پراکسیداز کاهش و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافته است.نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که حتی بین ارقام مختلف یک گیاه زراعی نیز تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که یکی از شاخص‌های مهم تحمل تنش شوری می‌باشد، وجود دارد.

## منابع


۱. دولت‌آبادیان، آ. ، س.ع.م. مدرس ثانوی و ف. اعتمادی. ۱۳۸۷. اثر پیش تیمار اسید سالیسیلیک بر جوانه‌زنی بذر گندم (*Triticum aestivum* L.) در شرایط تنش شوری. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۱. شماره ۴: ۷۰۲-۶۹۲.

2. Alscher. R, Erturk and Heath L.S. 2002. Role of superonide dismutases (SDDS) in controlling oridative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53:1331-1341.

3. Asada, K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 355: 1419-1431.
4. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 91:179-194.
5. Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van motagu, M., Inze, D and F, Van Breusegem. 2000. Dual action of the oxygen species during plant stress responses. *Cell molecular of Life Science*. 57: 779-795.
6. -Foyer, CH., H. Lopez-Delgado., J.F. Dat and I.M. Scott. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathioneassociated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Plant Physiology*. 100: 241– 254.
7. Hameed, A., Naseer, SH., Iqbal, T., Syed, H., Haq, M. A., 2008. Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Pakistan Journal of Botany*. 40(3): 1043-1051.
8. Husain, S., S. Von Caemmerer, and R. Munns. 2004. Control of salt transport from roots to shoots of wheat in saline soil. *Functional Plant Biology*. 31: 1115-1126.
9. Jung, S. 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of Arabidopsis thaliana subjected to drought. *Plant Science*. 166: 459–466.
10. Lee, D.H., Kim, Y.S., Lee, C.B., 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice *(Oryza sativa* L.*)*. *Journal of Plant Physiology*. 158: 737–745.
11. Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 405-410.
12. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M and Breusegem FV. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9: 490-498.
13. Munns, R., R. A. James, and A. Lauchli 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1025-1043.
14. Noctor, G and CH, Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 249–279.
15. Ort, D. 2001. When there is too much light. *Plant Physiology*. 125: 29-32.
16. Polle, A. 2001. Dissecting the superoxhde dismutase-ascorbate peroxcidas- glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*. 126:445-462.
17. Rio- Gonzales, K., Erdei, L. and Lips S. H., 2002. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower as affected by salinity and different nitrogen sources. *Plant Science*. 162: 923- 930.
18. Vaidyanathan, h., Sivakumar, P., Chakrabarty, R. And Tomas, G. 2003. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl – stressed rice differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. *Plant Science*. 165: 1411-1418.

جدول ۱- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در طرح کاملا تصادفی

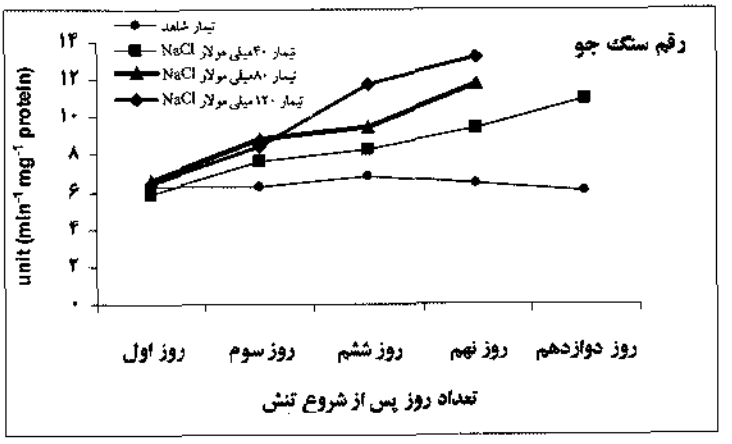
| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | کاتالاز | پراکسیداز | سوپراکساید دیسموتاز | آسکوربات پراکسیداز |
| تیمار شوری (فاکتورA) | ۳ | ۴.۰۵۲ ** | ۰.۰۰۰ ns | ۰.۰۱۲ ns | ۰.۰۰۰ ** |
| رقم (فاکتورB) | ۱ | ۰.۵۶۳ ns | ۰.۰۰۰ ** | ۰.۵۴۹۹ ** | ۰.۰۰۳ ** |
| اثرمتقابل A*B | ۳ | ۳.۱۵۴ ** | ۰.۰۰۰ ** | ۰.۰۲۱ * | ۰.۰۰۰ * |
| خطای آزمایش | ۱۶ | ۰.۲۷۱ | | | |
| کل | ۲۳ | | | | |
| ضریب تغییرات (درصد) | | ۶.۲۴ | ۸.۶۸ | ۱۲.۹۵ | ۲۱.۹۳ |

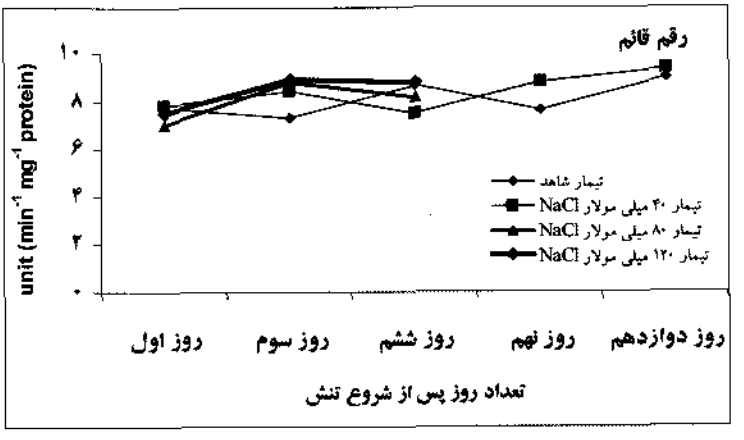
علائم * و ** به ترتیب مبین معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ می‌باشد و ns ، غیر معنی دار بودن آماری را نشان می‌دهد.

جدول ۲- جدول همبستگی صفات مورد بررسی (میزان فعالیت آنزیم‌ها) تحت تنش شوری

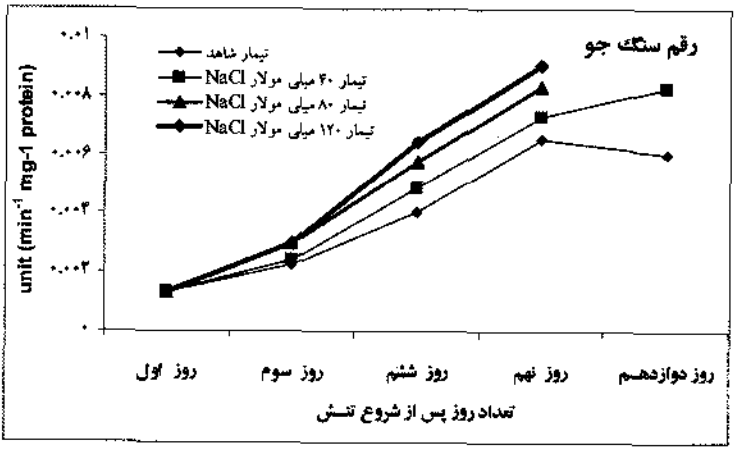
| | کاتالاز | پراکسیداز | سوپر اکسید دیسموتاز | آسکوربات پراکسیداز |
|---|---|---|---|---|
| کاتالاز | ۱ | | | |
| پراکسیداز | ۰/۲۹۲ ns | ۱ | | |
| سوپر اکسید دیسموتاز | ۰/۵۵۹ ** | ۰/۹۴۳ ** | ۱ | |
| آسکوربات پراکسیداز | ۰/۶۰۳ ** | ۰/۹۲۶ ** | ۰/۹۹۰ ** | ۱ |

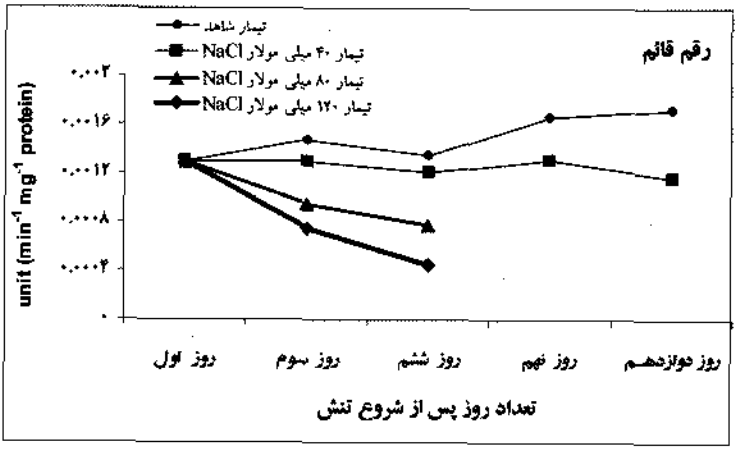
علائم * و ** به ترتیب مبین معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ می‌باشد و ns ، غیر معنی دار بودن آماری را نشان می‌دهد.



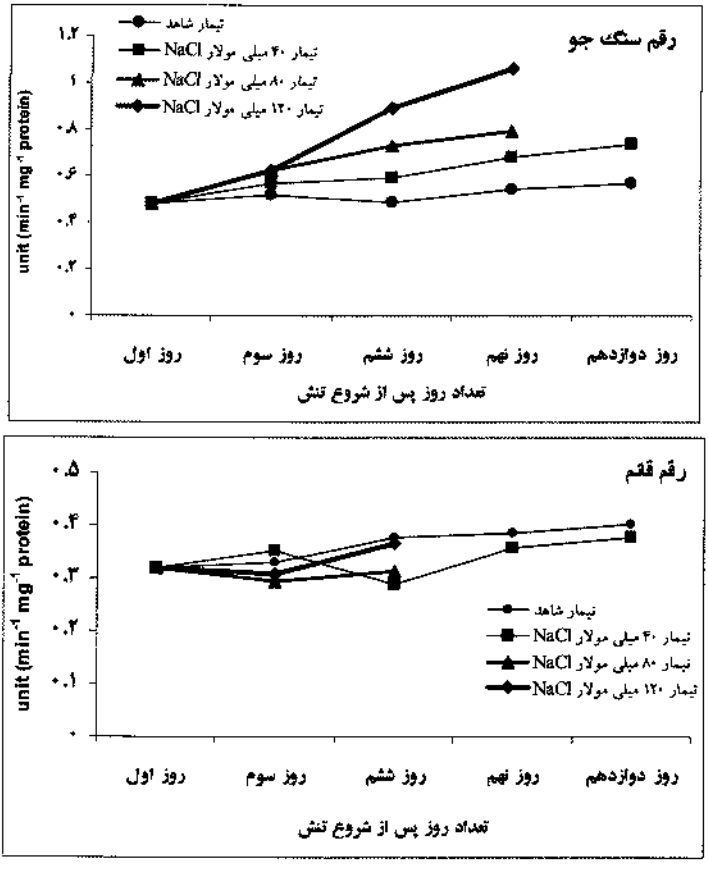




شکل ۱- منحنی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در دو ژنوتیپ برنج تحت تنش شوری

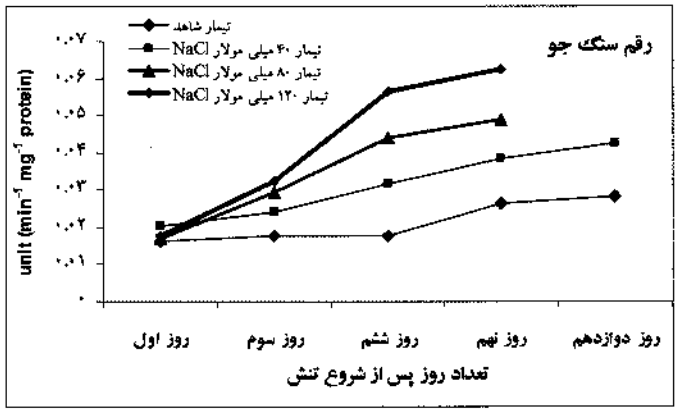


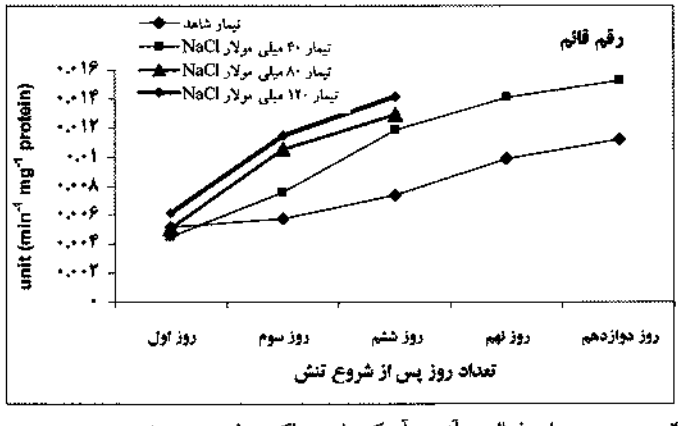




شکل ۲- منحنی میزان فعالیت آنزیم پراکسیدار در دو ژنوتیپ برنج تحت تنش شوری




شکل ۳- منحنی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در دو ژنوتیپ برنج تحت تنش شوری




شکل ۴- منحنی میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دو ژنوتیپ برنج تحت تنش شوری