واکنش آنزیمی گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* Parl. نسبت به تنش های مختلف شوری (NaCl)

م. مدرسی[۱]، ق. ع. نعمت زاده[۲] و ف. مرادیان[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری ۲- استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱۱

چکیده

رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) تحت شرایط تنش های زیستی و غیرزیستی از مولکول های آب داخل سلولی مشتق شده و برای متابولیسم سلولی زیان آور می باشند، اما بخشی از اثرات مضر این رادیکال ها بوسیله مکانیسم های آنزیمی و غیر آنزیمی گیاهان از جمله سیستم های آنتی اکسیدانتی چون سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز خنثی می گردند. گیاه آلروپوس لیتورالیس هالوفیتی از خانواده گندمیان است که می تواند شوری (NaCl) را تا سطح بالاتر از ۶۰۰ mM تحمل کند و به عنوان دهنده ژن های متحمل به تنش شوری در برنامه های اصلاح غلات مورد استفاده قرار گیرد. تاکنون گزارشی از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانتی این گیاه ارائه نگردیده است. بدین منظور آزمایشی در سال ۱۳۸۹ در آزمایشگاه هیدروپونیک پژوهشکده برنج و مرکبات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت این گیاه در سطوح صفر، دویست، چهارصد و ششصد میلی مولار NaCl در بازه زمانی ۲۱ روز بعد از اعمال تنش و به فاصله متناوب (۷۲ ساعت) اندازه گیری گردید. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل شوری و زمان برای آنزیم های مورد مطالعه از نظر آماری معنی دار شده است (α=۰/۰۱). همچنین نتایج نشان می دهد که فعالیت آنزیمی پراکسید از تا ۸ برابر، کاتالاز تا ۷ برابر، آسکوربات پراکسید از تا ۱۸ برابر و سوپراکساید دیسموتاز تا ۵/۳ برابر به ترتیب در تنش های ۶۰۰، ۴۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی مولار افزایش یافت. با توجه به نتایج این آزمایش و فعالیت شدید آنزیم های آنتی اکسیدانت این گیاه، شناسایی، جداسازی و انتقال ژن های موثر در تحمل شوری از گیاه Aeluropus littoralis Parl.، می تواند در تولید گیاهان تراریخته متحمل به تنش های محیطی مفید واقع گردد.

واژه های کلیدی: واکنش آنزیمی، تنش شوری، گیاه هالوفیت، آلئوروپوس لیتورالیس

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

مقدمه

عوامل نامساعد محیطی از جمله شوری، خشکی، نور و حرارت، مهمترین عوامل کاهش تولیدات گیاهان زراعی در دنیا می باشند. در میان موارد ذکر شده، شوری مهمترین عامل تهدید کننده کشاورزی در جهان به شمار می رود (۴۱). یکی از مهمترین جنبه های مطالعاتی برای مقاوم سازی گیاهان نسبت به تنش شوری، مطالعه و شناسایی فرایند فیزیولوژیکی متأثر از تنش شوری است.

شوری به صور مختلف بر مکانیسم فیزیولوژیک گیاه اثر می گذارد که عمده اینگونه اثرات شامل: ۱- غلظت های بالای نمک باعث شوک اسمزی به گیاه می شود و فعالیت شیمیایی آب در دسترس را کم می کند و باعث می شود سلول تورژسانس خود را از دست بدهد. اثر شوری در گیاه مشابه اثرات خشکی بر گیاه می باشد. ۲- کاهش حجم درونی کلروپلاست- این امر باعث تولید رادیکال های آزاد اکسیژن[1] (ROS) می گردد. این رادیکال ها خود بازدارنده فتوسنتز هستند. ROS ها می توانند به طور مستقیم در کلروپلاست با انتقال انرژی آزاد شده از کلروفیل به مواد حاوی اکسیژن و تولید اکسیژن آزاد (تک اتمی) و یا با کاهش ناقص مولکولی اکسیژن در فتوسیستم I تولید شوند و ۳- برهم زدن تعادل یونی- مقدار زیاد NaCl شایع ترین نوع تنش شوری می باشد که علاوه بر برهم زدن هومئوستازی Na^+ و Cl^-، باعث بر هم خوردن هومئوستازی K^+ و Ca^{2+} نیز می شود.

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت در کاهش انواع رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) بسیار اهمیت داشته و امروزه با روش های مهندسی ژنتیک توانسته اند بواسطه افزایش فعالیت این آنزیم ها بسیاری از گیاهان را به تنش شوری متحمل سازند. در اکثر مطالعات ارتباط مستقیمی میان فعالیت این آنزیم ها و مقاومت گیاهان نسبت به تنش های محیطی و بویژه تنش شوری مشاهده شده است (۳۲). فعالیت رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) ممکن است سبب بروز صدماتی همچون اکسید شدن لیپیدها، (که منجر به تغییر ساختار غشاء و در نتیجه از هم پاشیدگی یکپارچگی آن می شود)، تغییر ساختمان پروتئین ها و اکسید شدن گروههای سولفیدریل (SH-)، غیر فعال شدن آنزیم ها، بی رنگ شدن و یا از بین رفتن رنگدانه هائی مانند کلروفیل و سایر ترکیبات رنگیزه ای و هم چنین حمله مداوم به مولکولهای آلی مثل DNA و در نتیجه اختلال در رشته های DNA گردد (۲۵ و ۲۷). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم های دفاعی متفاوت آنزیمی با کارایی متغیر می باشند که می توانند رادیکالهای آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. این سیستم های

1- Reactive Oxygen Speices (ROS)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

دفاعی شامل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پراکسیداز (POD) می باشند. علاوه بر این سیستم های غیر آنزیمی شامل آسکوربات، توکوفرول، کاروتنوئیدها و ترکیبات متفرقه (از جمله فلاونوئیدها، مانیتولها و پلی فنها) نیز در مقابله با تنش شوری دخیل می باشند (۹).

تاکنون آزمایشات زیادی برای بررسی واکنش های گیاهان نسبت به تنش شوری انجام گرفته است (۵، ۷، ۱۰ و ۱۲). بسیاری از این آزمون ها براساس مقایسه میان گیاهان حساس و ارقام نسبتاً متحمل زراعی به تنش شوری بوده است. به عنوان مثال آنالیز رفتار متفاوت گوجه فرنگی زراعی و یک موتانت حساس به شوری آن (۱۳ و ۱۴) و یا مقایسه میان جو وحشی متحمل به شوری با گونه زراعی (۱۸ و ۳۶) را می توان نام برد. اما روش منطقی دیگر، برای یافتن مکانیسم های تحمل به شوری، بررسی گیاهان نمک دوست (Salt loving plants) یا هالوفیت ها (Halophytes) است.

گیاه *Aeluropus littoralis* (Gouan) یک هالوفیت چند ساله ریزوم دار تک لپه ای با سیستم فتوسنتزی C_4 می باشد (۳۸) که می تواند شوری (NaCl) را تا سطح بالاتر از ۶۰۰ mM تحمل کند. این گیاه می تواند به عنوان علوفه مورد استفاده قرار گیرد و در خاک های بسیار شور و در مناطق خشک با بارندگی سالانه کمتر از ۲۰۰ میلی متر یا در باتلاق های آب شور رشد کند. این گیاه همانند سایر گرامینه ها دارای ژنوم کوچک با 2n=2x=14 کروموزوم و در حدود 342 Mb (تخمین زده می شود) می باشد (۴۵).

هدف از انجام این پژوهش، بررسی فعالیت آنتی اکسیدانت های اصلی و موثر در واکنش به تنش شوری در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* می باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی و اعمال تنش: در فروردین ماه سال ۱۳۸۹ قلمه های همسان از کلون های موجود در گلخانه پژوهشکده برنج و مرکبات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انتخاب و به محیط هیدروپونیک هوگلند انتقال یافت. یک ماه پس از ریشه زایی گیاهان، تنش شوری به صورت پاساژدهی اعمال گردید، یعنی روزانه ۱۰۰ mM از نمک NaCl به محیط رشد گیاهان اضافه شد. مطالعات آنزیمی روی گیاهان تحت تنش ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی مولار NaCl و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

استخراج پروتئین: براساس روش آمور و همکاران (۲) جهت استخراج آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD)، ۰/۱ گرم برگ تازه در نیتروژن مایع (هاون های چینی از قبل سرد شده و روی یخ قرار داده شدند) ساییده و پودر گردید، آنگاه ۳/۰ میلی لیتر بافر سرد شامل: 100 mM Tris–HCl (pH 8.0) که حاوی

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

EDTA 10 mM، KCl 50 mM، $MgCl_2$ 20 mM، PMSF 0.5 mM، DTT 1 mM، Triton X-100 0.1% (v/v) و PVP 10% (w/w) می باشد، به آن اضافه گردید. برای استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) به ترکیب فوق 50 mM آسکوربات نیز اضافه گردید. مخلوط حاصل در سانتریفوژ g ۱۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سوپرناتانت حاصل به عنوان عصاره آنزیم تلقی گردید. برای بررسی کیفیت آنزیم های استخراج شده از معرف بردفورد استفاده شد. کلیه آزمون ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام گرفت.

آزمون های آنزیمی:

فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز- فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز بر طبق روش اسکبا و همکاران (۳۵) انجام گرفت. بدین منظور مقادیر ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش با حجم نهایی ۳ میلی لیتر اضافه شد. مخلوط واکنش محتوی بافر 50 mM potassium phosphate با pH 7.8 و EDTA 0.1 mM، l-methionine 13 mM، riboflavin 2 µM و همچنین NBT 75 µM می باشد. واکنش با قرار دادن مخلوط در نور فلوروسنت سفید و سرد و با شدت جریان $50\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ برای ۱۵ دقیقه شروع و سپس لوله ها با فویل آلومینیومی پوشانده و لامپها خاموش گردیدند. لوله شاهد فاقد آنزیم بیشترین رنگ را ایجاد می نماید. آنگاه نمونه ها به همراه شاهد در طول موج 560 nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردیدند.

فعالیت کاتالاز- اندازه گیری فعالیت کاتالاز براساس روش آبی (۱) که مبتنی بر کاهش ضریب جذب ناشی از مصرف پراکسید در طول موج ۲۴۰ نانومتر می باشد، انجام گرفت. ۳ میلی لیتر حجم نهایی واکنش محتوی بافر 50 mM sodium phosphate با pH 7.0 به همراه پراکسید هیدروژن می باشد، به محلول فوق 100 µl از عصاره پروتئینی اضافه شد. ثبت تغییرات جذب نوری نمونه ها هر ۲۰ ثانیه و به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. فعالیت کاتالاز براساس µmol از تجزیه پراکسید هیدروژن در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین بیان می شود.

فعالیت پراکسیداز- اندازه گیری فعالیت پراکسیداز براساس میزان اکسیداسیون o-dianisidine (3، 3′-dimethoxybenzidine) در طول موج 460 nm انجام گرفت (۳۱). محلول واکنش شامل 20 mM phosphate buffer 1 mM dianisidine, 3 mM H_2O_2 و 50 µl عصاره پروتئینی می باشد. فعالیت پراکسیداز براساس µmol از دیانیزیدین اکسید شده در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین بیان می شود.

فعالیت آسکوربات پراکسیداز- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش ناکانو و اسدا (۲۶) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش به حجم ۱ میلی لیتر شامل 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)، 0.5 mM

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

آسکوربات، 0.1 mM پراکسید هیدروژن و آنزیم در ۲۵ درجه سانتیگراد بود. با مصرف پراکسید هیدروژن توسط آسکوربیک اسید، مقدار جذب در ۲۹۰ نانومتر کاهش می یابد. میزان این کاهش در ضریب جذب $2.8\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ ضرب می گردد. فعالیت یک واحد از آسکوربات پراکسیداز براساس میزان اکسیداسیون 1 µmol در دقیقه محاسبه می گردد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزارهای آماری EXCEL و SPSS استفاده شد.

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 زمان برای آنزیم‌های مورد مطالعه در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی دار شده است. نتایج آزمایش نشان داد که فعالیت چهار آنزیم پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکساید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در چهار سطح ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی مولار NaCl، با فاصله زمانی ۷۲ ساعت و طی ۲۱ روز اندازه گیری کاملاً متغیر بوده است و تقریباً در تمامی سطوح شوری افزایش یافت.

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

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		کاتالاز	پراکسیداز	سوپراکساید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز
تیمار شوری (فاکتور A)	۳	۳۳۰۶۱۷/۳۵۲**	۹۳۳۵/۳۷۲**	۱۴۴۱/۱۲۵**	۱۲۷۸/۴۲۴**
زمان (فاکتور B)	۷	۱۶۰۹۴۱/۱۶۸**	۳۱۶۱/۸۲۱**	۷۴۴/۷۲۶**	۲۳۸/۶۱**
اثر متقابل A*B	۲۱	۴۶۹۲۸/۷۳۲**	۷۱۷/۷۰۲**	۱۰۰/۵۹۹**	۸۵/۸۳**
خطا	۶۴	۰/۰۱	۰/۹۷۹	۰/۰۱۱	۰/۴۳
کل	۹۶				
(C.V)٪		۷/۲۴	۹/۱۵	۱۱/۴۸	۹/۵۸

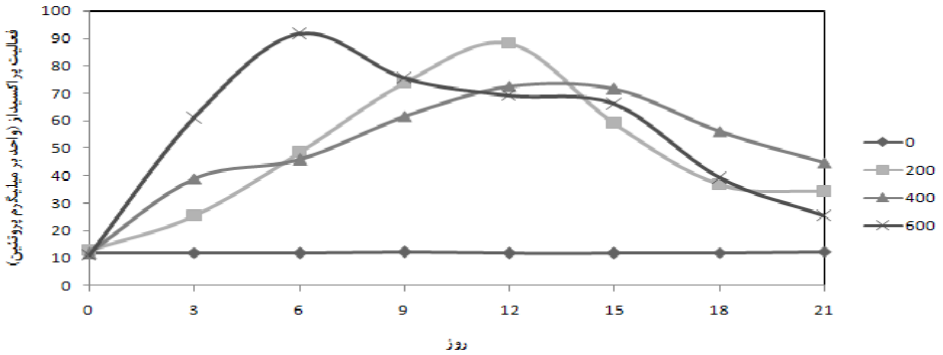
* و **: به ترتیب مبین معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ می باشد و ns: غیر معنی دار بودن آماری را نشان می دهد.

تحقیقات مختلف نشان داده است که نوعی ارتباط قوی بین تحمل به تنش های اکسیداتیو که به دلیل تنش های محیطی ایجاد می شود و افزایش در غلظت آنزیم های آنتی اکسیدان در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد (۲۹ و ۳۰).

نتایج آزمایش نشان می دهد که میزان فعالیت آنزیم های پراکسیداز پس از ۶ روز و سوپراکساید دیسموتاز پس از ۱۲ روز در سطح تنش ۴۰۰ mM به حداکثر رسید، در حالی که برای آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز

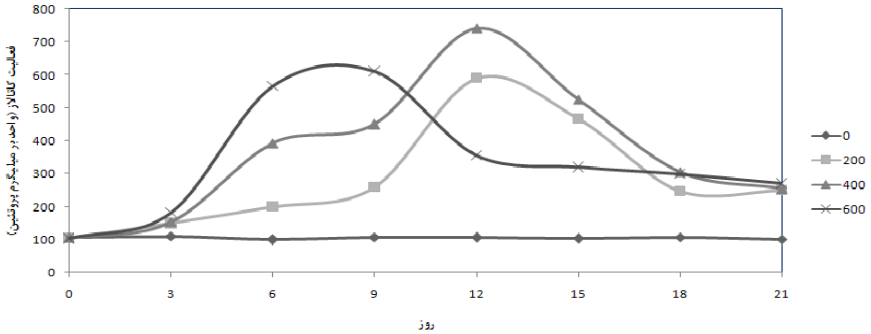
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

بیشترین فعالیت آنزیمی در روز دوازدهم و در تنش ۴۰۰mM مشاهده گردید (اشکال ۴-۱). در شرایط تنش ۲۰۰ میلی مولار میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز دوازدهم به حداکثر مقدار خود رسید و بیش از هفت برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد. میزان افزایش این آنزیم در همین روز و در تنش ۴۰۰ mM NaCl به حدود شش برابر شاهد رسید. در این روز حداکثر میزان فعالیت آنزیمی در سطوح ۲۰۰ و ۴۰۰ مشاهده شد و پس از آن فعالیت آنزیم کاهش یافت (شکل ۱).



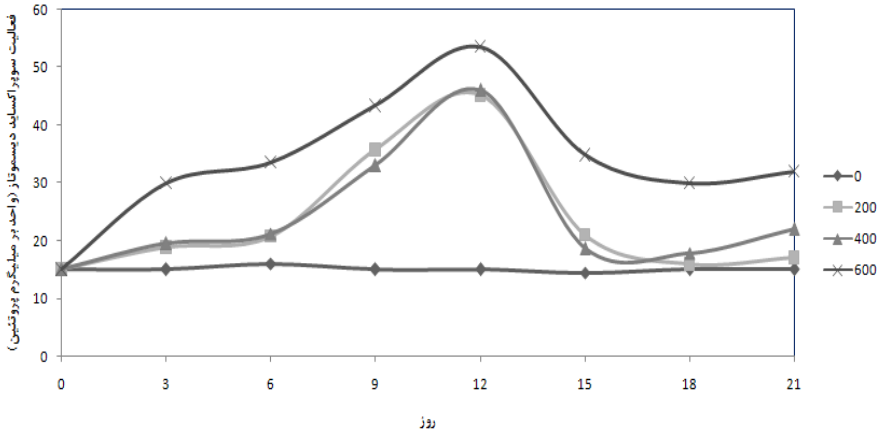
شکل ۱- تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح مختلف شوری در گیاه آلروپوس لیتورالیس.

کاتالاز نیز حداکثر فعالیت را در تنش های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار در روز دوازدهم نشان داد، به طوری که در این روز میزان فعالیت آنزیم در تنش های ۲۰۰ و ۴۰۰ به ترتیب به حدود ۵/۵ و ۷ برابر شاهد رسید (شکل ۲). سوپراکساید دیسموتاز نیزحداکثر فعالیت خود را در روز دوازدهم در تمامی سطوح تنش نشان داد. فعالیت این آنزیم در تنش های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار حدوداً ۳ و در تنش ۶۰۰ میلی مولار ۵/۳ برابر شاهد دیده شد (شکل ۳).



شکل ۲- تغییرات میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطوح مختلف شوری در گیاه آلروپوس لیتورالیس.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]



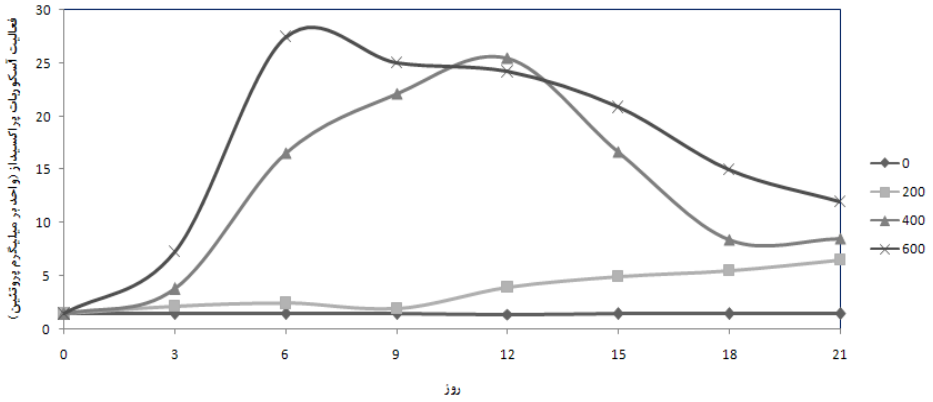
شکل ۳- تغییرات میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز در سطوح مختلف شوری در گیاه آلروپوس لیتورالیس.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت شرایط تنش ۲۰۰ میلی مولار، فعالیت کمی را نشان داد. اما در تنش های ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی مولار فعالیت آن به شدت افزایش یافت (شکل ۴). در روز دوازدهم، میزان فعالیت آنزیم تحت شرایط 400 mM NaCl به ۱۸ برابر شاهد رسید. تقریباً همین میزان افزایش نیز در تنش ۶۰۰ میلی مولار و در روز ششم ثبت شد. نقش آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تجزیه پراکسید هیدروژن در چرخه هالیول- آسادا از مدت ها قبل شناخته شده است. پیش از این محققان در پنبه (۱۶)، نخود (۱۹)، برنج (۲۳)، گیاه هالوفیت *Mesembryanthemum crystallinum* (۴۰)، گیاه *Bruguiera parviflora* (۳۰)، گیاه هالوفیت *Crithmum maritimum* (۲)، ذرت (۲۸) و جو (۳۶) نیز به یافته های مشابهی دست یافتند. این گزارش و گزارش های بالا نشان می دهند که این آنزیم نقش مهمی در مقابله با تنش های اکسیداتیو ناشی از استرس شوری دارد. در تنش mM ۶۰۰ بیشترین فعالیت پراکسیداز در روز ششم و به میزان ۸ برابر شاهد مشاهده گردید. در اینجا نیز با گذشت زمان از شدت فعالیت آنزیم کاسته شد (شکل ۱). پراکسیداز از مهمترین آنزیم های تجزیه کننده پراکسید هیدروژن در کلروپلاست است (۴). سکین و همکاران (۳۶) نیز با بررسی دو رقم متحمل و حساس جو نسبت به تنش شوری ۱۵۰ mM NaCl افزایش حدود ۴ برابری فعالیت آنزیمی پراکسیداز را پس از هفت روز در رقم متحمل گزارش نمودند، این در حالی بود که میزان افزایش فعالیت پراکسیداز در رقم حساس به هنگام مواجهه با تنش ۱۵۰ میلی مولار بسیار کمتر بود. در مطالعات بن آمور و همکاران (۲)، نیز فعالیت این آنزیم در گیاه هالوفیت، *Crithmum maritimum* دو ماه پس از اعمال تنش شوری، ۱۳۵٪ افزایش را نشان داد. به نظر

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

می رسد در گیاهان هالوفیت مکانیسم های سازگاری، توانایی کاستن از اثرات تنش و در نتیجه کاهش رادیکال های آزاد اکسیژن را دارا می باشند. شاید دلیل کاهش تدریجی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت، ناشی از کم شدن ماده اولیه مورد نیاز آنها، یعنی رادیکال های آزاد اکسیژن در طی زمان و سازگاری این گیاهان باشد. آنزیم کاتالاز در تنش ۶۰۰ میلی مولار بیشترین فعالیت آنزیمی را در روز نهم نشان داد، در اینجا نیز افزایشی حدود ۵/۵ برابر شاهد مشاهده گردید (شکل ۲). به نظر می رسد واکنش مشابه کاتالاز و پراکسیداز ناشی از افزایش مقادیر پراکسید هیدروژن در سلول و تلاش آنزیم های تجزیه کننده آن برای جلوگیری از تخریب اجزای سلولی باشد. همچنین میزان افزایش در فعالیت این آنزیم در سه روز اول پس از اعمال تنش بسیار جزئی بوده است. این مسئله در مورد آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز صادق است، اما فعالیت آنزیم پراکسیداز در این مدت به شدت افزایش یافت. ممکن است در این گیاه مقابله با پراکسید هیدروژن در مراحل ابتدایی تنش بر عهده آنزیم پراکسیداز باشد. در گیاه هالوفیت *Crithmum maritimum* نیز دو ماه پس از القای تنش ۱۵۰ mM NaCl افزایش ۲۲۵ درصدی در مقادیر آنـزیم کـاتالاز برگ هـا مـشاهده شـد. در گـیاه*Solanum pennellii* پس از اعمال ۱۵ روز تنش ۱۵۰ میلی مولار، افزایش ۸۱ درصدی در فعالیت این آنزیم مشاهده شد (۱۴). این عوامل نشان دهنده نقش این آنزیم در مقابله با تنش شوری است. همانگونه که پیشتر ذکر شد، آنزیم سوپراکساید دیسموتاز نیز حداکثر فعالیت خود را در روز دوازدهم در تمامی سطوح تنش نشان داد (شکل ۳). در گیاه هالوفیت *Crithmum maritimum* نیز افزایش فعالیت ۲۴۰ درصدی پس از ۲ ماه اعمال تنش شوری مشاهده گردید (۲). در جو نیز، تفاوت میزان افزایش فعالیت سوپراکساید دیسموتاز در ارقام متحمل و حساس جو بسیار فاحش بود (۲۸). این نتایج در پنبه (۱۶)، نخود (۱۹)، گوجه فرنگی (۳۸ و ۳۹)، سورگوم (۹) و در جو (۳۶) نیز مشاهده گردید. اشرف (۵) پیشنهاد نمود که از آنتی اکسیدانت هایی چون سوپراکساید دیسموتاز به عنوان مارکری برای پی بردن به حساسیت یا تحمل گیاهان نسبت به تنش ها استفاده گردد. در گیاهان به هنگام مواجه با تنش شوری، فعالیت آنتی اکسیدانت ها افزایش می یابد (۲۹). پیش از این، رابطه میان میزان فعالیت آنتی اکسیدانت ها و تحمل نسبت به تنش شوری در تعدادی از هالوفیت ها مانند *Crithmum maritimum*، *C. maritime* و *Plantago genus* (۲، ۳ و ۳۷) و همچنین گلیکوفیت هایی مانند پنبه (۱۶)، مرکبات (۱۷)، گندم (۲۴)، نخود (۱۹ و ۳۴)، چغندر قند (۸)، برنج (۱۰ و ۱۱)، گوجه فرنگی وحشی (۲۱)، گل مینا (۱۵) و کنجد (۲۰ و ۲۲) بررسی گردیده است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]



شکل ۴- تغییرات میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف شوری در گیاه آلروپوس لیتورالیس.

وجود تفاوت و تنوع طبیعی در این صفات، اطلاعات و مواد اولیه مورد نیاز در برنامه های اصلاح نباتات برای بهبود تحمل به شوری را فراهم می کند. دستورزی و انتقال ژن های آنزیم های آنتی اکسیدانت، باعث بالا رفتن توانایی دفاعی گیاهان به ویژه در گونه های C_3 بر علیه رادیکال های آزاد اکسیژن و متعاقب آن افزایش تحمل آنها نسبت به شوری و خشکی می شود (۲۷ و ۴۲). گیاه هالوفیت آلروپوس لیتورالیس از خانواده گندمیان بوده و بدلیل توانایی تحمل تنش های مختلف از جمله خشکی و شوری، می تواند به عنوان منبعی از ژن های مفید مورد استفاده قرار بگیرد. تاکنون گزارش هایی از کاربرد این گیاه در برنامه های اصلاحی ارائه گردیده است، به عنوان مثال وی و همکاران (۴۳) با استفاده از روش دورگ گیری سوماتیکی نامتقارن، موفق به تولید گندم متحمل به شوری گردیدند. از آن زمان تاکنون نیز شناسایی و انتقال تک ژن های مؤثر در تحمل به شوری و خشکی از این گیاه در حال انجام می باشد. به عنوان مثال انتقال ژن Na^+/H^+ antiporter از این گیاه به توتون (۴۴) باعث افزایش تحمل به شوری و یا انتقال ژن A20/AN1 zinc-finger به توتون (۶) باعث افزایش تحمل به شوری و خشکی گردیده است. هرچند به تازگی توالی ژن های کدکننده تعدادی از آنزیم های آنتی اکسیدانت این گیاه شناسایی شده، ولی تاکنون گزارشی از انتقال این ژن ها به گیاهان زراعی انجام نگرفته است. از آنجایی که این گیاه توانایی تحمل تنش شوری را در سطوح بسیار بالا دارد و همینطور با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می گردد نسبت به شناسایی سایر ژن های دخیل و همچنین انتقال این ژن ها به گیاهان زراعی برای حصول افزایش تحمل آنها نسبت به تنش ها، اقدام گردد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت مالی پژوهشکده برنج و مرکبات در اجرای این پروژه تقدیر و تشکر به عمل می آید.

منابع:

1. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro, Method Enzymol. 105: 121-126.
2. Amor, N.B., K.B. Hamed, A. Debez, C. Grignon and C. Abdelly. 2005. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. Plant Sci., 168: 889-899.
3. Amor, N.B., A. Jimenez, W. Megdiche, M. Lundqvist, F. Sevilla and C. Abdelly. 2007. Kinetics of the anti-oxidant response to salinity in the halophyte Cakile maritima. J. Integr. Plant Biol., 49(7): 1-11.
4. Asada, K. and M. Takahashi. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In Photoinhibition: topics in photosynthesis (ed. C. J. Arntzen), Elsevier, 227-287.
5. Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotech. Adv., 27: 84-93.
6. Ben Saad, R., N. Zouari and W. Ben Ramdhan. 2010. Improved drought and salt stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing a novel A20/AN1 zinc-finger □AlSAP□ gene isolated from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. Plant Mol. Biol., 72: 171-190.
7. Blokhina, O., E. Virolainen and K.V. Fagerstedt. 2003. Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annual Botany, 91: 179-194.
8. Bor, M., F. Ozdemir and I. Turkan. 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: 77-84.
9. Da Costa, P.H.A., A.D.A. Neto, M.A. Bezerra, J.T. Prisco and E. Gomez-Filho. 2005. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. Braz. J. Plant Physiol., 17(4): 353-361.
10. Demiral, T. and I. Tu¨rkan. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environ. Exp. Bot., 53: 247-257.
11. Demiral, T. and I. Turkan. 2004. Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment J. Plant Physiol., 161(10): 1089-1100.
12. Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot*., 55: 307-319.
13. Flowers, T.J., M.A. Hajibagheri and N.J.W. Clipson. 1986. Halophytes. Quart. Rev. Biol., 61: 313-337.
14. Fray, A., D. Göl, D. Keleş, B. Okmen, H. Pinar, H.O. Siğva, A. Yemenicioğlu and S. Doğanlar. 2010. Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. BMC Plant Biology, 10(58): 1-16.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

15. Geissler, S. and H.W. Hussin Koyro. 2009. Interactive effects of NaCl salinity and elevated atmospheric CO_2 concentration on growth, photosynthesis, water relations and chemical composition of the potential cash crop halophyte *Aster tripolium* L. Env. Exp. Bot. 65(2-3): 220-231.
16. Gosset, D.R., E.P. Millhollon and M.C. Lucas. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. Crop Sci., 34: 706-714.
17. Gueta-Dahan, Y., Z. Yaniv, B.A. Zilinskas and G. Ben-Hayyim. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. Planta 203, 460-469.
18. Hellebust, J.A. 1976. Osmoregulation. Annu. Rev. Plant Physiol., 27: 485-505.
19. Hern´andez, J.A., A. Jim´enez, P. Mullineaux and F. Sevilla. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. Plant Cell Environ. 23: 853-862.
20. Koca, H., M. Bor, F. Ozdemir and I. Turkan. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Environ. Exp. Bot., 60: 344-351.
21. Koca, H., F. Ozdemir and I. Turkan. 2006. Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and L. pennellii. Biol. Plant. 50: 745-748.
22. Ksouri, R., M. Wided, K. Hans-Werner and A. Chedly. 2010. Responses of halophytes to environmental stresses with special emphasis to salinity. Advances in botanical research, 53: 1-29.
23. Lin, C.C. and C.H. Kao. 2000. Effect of NaCl on H_2O_2 metabolism in rice leaves Plant Growth Regulation, 30: 151-155.
24. Meneguzzo, S., F. Navari-Izzo and R. Izzo. 1999. Antioxidative responses of shoots and roots of wheat to increasing NaCl concentrations. J. Plant Physiol. 155: 274-280.
25. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci., 7, 405-410.
26. Nakano, Y. and K. Asada. 1981 .Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts .Plant Cell Physiol., 22: 867-880.
27. Nayyar, H. and D. Gupta. 2006. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. Environmental and Experimental Botany 58: 106-113.
28. Neto, A.D.A. 2006 .Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environ. Exp. Bot., 56: 87-94.
29. Noreen, Z. and M. Ashraf. 2009. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. Journal of plant physiol. 166(16): 1764-1774.
30. Parida, A.K., A.B. Das and P. Mohanty. 2004. Defense potentials to NaCl in a mangrove, Bruguiera parviflora:dierential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. J. Plant Physiol., 161: 531-542.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

31. Ranieri, A., F. Petacco, A. Castagna and G.F. Soldatini. 2000. Redox state and peroxidase system in sunflower plants exposed to ozone, Plant Sci., 159: 159-168.
32. Rengasamy, P. 2006. World salinization with emphasis on Australia. J. Exp. Bot. 57: 1017-1023.
33. Sairam, R.K. and G.C. Srivastava. 2001. Water stress tolerance of wheat *Triticum aestivum* L. Variation in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activiy in tolerant and susceptible genotype. J. Agronomy and Crop Science, 186: 63-70.
34. Sairam, R.K., G.C. Srivastava. 2002. Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Science, 162: 897-904.
35. Scebba, F., L. Sebastiani and C. Vitagliano. 1999. Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: responses to cold acclimation, J. Plant Physiol., 155: 762-768.
36. Seckin, B., I. Turkan, A.H. Sekmen and C. Ozfidan. 2010. The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds (sea barley grass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). Environ. Exp. Bot,. 69: 76-85.
37. Sekmen, A.H., I. Tu¨rkan and S. Takio. 2007. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant Plantago maritime and salt-sensitive Plantago media. Physiol. Plant. 131: 399-411.
38. Shalata, A. and M. Tal. 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*, Physiol. Plant 104: 169-174.
39. Shouliangn, C. and S.M. Phillips. 2006. Aeluropus. Flora of China, 22: 458-459.
40. Slesak, I., Z. Miszalski, B. Karpinska, E. Niewiadomska, R. Ratajczak and S. Karpinski. 2002. Redox control of oxidative stress responses in the C3-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol. Biochem., 40: 669-677.
41. Takahashi, H., Z.X. Chen, H. Du, Y.D. Liu and D.F. Klessig. 1997. Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. The Plant Journal 11: 993-1005.
42. Tester, M. and R. Davenport. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Ann. Bot., 91: 503-527.
43. Wei, Y., X. Guangmin, Z. Daying and C. Huimin. 2001. Transfer of salt tolerance from *Aeleuropus littorulis* sinensis to wheat (*Triticum aestivum* L.) via asymmetric somatic hybridization. Plant Science, 161: 259-266.
44. Zhang, G.H., Q. Su, L.J. An and S. Wu. 2008. Characterization and expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus littoralis*. Plant Physiology and Biochemistry. 46: 117-126.
45. Zouari, N., R. Ben Saad, T. Legavre, J. Azaza, X. Sabau, M. Jaoua, K. Masmoudi and A. Hassairi. 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. Gene., 404: 61-69.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

Enzyme Assay of *Aeluropus littoralis* Parl. Regarding to the Salt (NaCl) Stresses

M. Modarresi[1], G.A. Nematzadeh[2] and F. Moradian[3]

1- Former M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) release from cellular water molecules under abiotic and biotic stresses which are harmful for cellular metabolism. Although, some of radical injuries neutralize via plant enzymatic and nonenzymatic reactions like antioxidant system such as superoxide dismutase, catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase. *Aeluropus littoralis* Parl. is a halophyte plant belongs to Poaceae family can tolerate over 600 mM NaCl stress, thus it can be as genetic source for transfer gene to crop resulting cereal improvement under salt stress condition. There is not any report about antioxidant assay in this plant up to now. This research have studied in rice and citrus research institute, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University's hydroponic labs in 1389. Antioxidant enzymes assay have performed in four levels, 0, 200, 400 and 600 mM NaCl during 21 days and periodically 72 hours sampling. Statistical analysis indicated reciprocal effects of time and salt treatment for enzyme was significant (α= 0.01). The results determined the enzymes activity increase up to 8, 7, 18 and 5.3 for POX, CAT, APX and SOD respectively in 400 and 600 mM NaCl treatment. In respect to results as well as antioxidant enzymes high activity, identification, isolation and transfer of genes involve in salt tolerance from *Aeluropus littoralis* Parl. can be benefit for production of transgenic plant tolerant to environmental stresses.

Keywords: Enzymatic activity, Salt stress, *Aeluropus littoralis* Parl.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]