

پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی بافت‌های مختلف گیاه آلوروپوس لیتورالیس به تنش شوری

الهام یونسی ملردی^۱، قربانعلی نعمت زاده^۲ و علی پاکدین پاریزی^{۳*}

^۱ پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۲ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۴/۰۴)

چکیده

تنش شوری از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است که کشاورزی جهان را به شدت تحت تأثیر قرار داده است. یکی از راهکارهای مقابله با این تنش بررسی مکانیسم‌های تحمل در گیاهان شورزی و بهره‌بردن از این مکانیسم‌ها در جهت بهبود گیاهان زراعی است. گیاه آلوروپوس لیتورالیس می‌تواند غلظت‌های شوری تا ۶۰۰ میلی‌مولار نمک را تحمل کند. در پژوهش حاضر به منظور بررسی سازوکار پاسخ آنتی‌اکسیدانی این گیاه به تنش شوری، گیاهچه‌های یک‌ماهه از طریق آبیاری با محلول هوگلند حاوی غلظت‌های صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید تحت تنش شوری قرار گرفتند. پس از ۷۲ ساعت، از بافت‌های ریشه، ساقه و برگ نمونه برداری شد و پاسخ هر کدام از بافت‌ها به تنش شوری مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تحلیل آماری داده‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای مقایسه‌های چندگانه استفاده شد و معنی‌داری در سطح ۵٪ گزارش شد. با افزایش شدت تنش، مقدار پروتئین در هر سه بافت مورد مطالعه به طور معنی‌دار افزایش یافت. میزان هیدروژن پراکسید در ساقه و ریشه با افزایش غلظت نمک کاهش یافت؛ اما در برگ در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک افزایش معنی‌دار نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده، الگوی کلی تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مواجهه با تنش شوری متفاوت بود. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هر سه بافت مورد مطالعه با افزایش تنش به طور معنی‌داری افزایش یافت، به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم با افزایش ۳/۷ برابری نسبت به شاهد در بافت ساقه و در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک مشاهده شد. هر چند تغییرات فعالیت دو آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز روند کلی کاهشی یا بدون تغییر معنی‌دار را نشان داد؛ به طوری که فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ و در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک تقریباً نصف شاهد و در ریشه بیش از نصف شاهد کاهش یافت. در نهایت با افزایش شدت تنش، افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در همه ارزیابی‌ها، بجز در بافت ریشه و غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار، مشاهده شد. به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان اظهار داشت توازن بین شاخص‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی منجر به نگهداری مولکول‌های مخرب مانند هیدروژن پراکسید در کمترین مقدار شده و نقش مؤثری در ایجاد تحمل به تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس بازی می‌کند.

کلمات کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، پراکسید هیدروژن، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز

مقدمه
زراعی بوده و پیش‌بینی می‌شود بیش از ۵۰٪ زمین‌های زراعی

تا سال ۲۰۵۰ به‌طور جدی با مشکل شوری روبه‌رو شوند

شوری خاک یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد گیاهان

* نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: a.pakdin@sanru.ac.ir

غلظت آن می‌تواند بیانگر میزان گسترش تنش اکسیداتیو باشد. از سوی دیگر در شرایط تنش، حضور مکانیسم احیاکنندگی آنزیمی که سمیت هیدروژن پراکسید را کاهش دهد، ضروری است (Sofa *et al.*, 2015). گیاهان به منظور افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پاک‌سازی مقادیر بالای اکسیژن فعال تولید شده، استراتژی‌های مختلفی به کار می‌گیرند، که شامل افزایش آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند فنول‌ها، فلاونوئیدها، آرکانوئیدها، آسکوربات، گلوتاتیون و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD: EC 1.15.1.1)، گاپاکول پراکسیداز (GPX: EC 1.11.1.7)، کاتالاز (CAT: EC 1.11.1.6) و آسکوربات پراکسیداز (APX: EC 1.11.1.11) است (Karuppanapandian *et al.*, 2011; Rakhmankulova *et al.*, 2015). در شرایط تنش شوری، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از کلیدی‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که O_2^- را به O_2 و هیدروژن پراکسید تبدیل کرده و شرایط طبیعی فیزیولوژیک را برقرار می‌کند (Seekin *et al.*, 2010; Deeba *et al.*, 2012). هیدروژن پراکسید تولیدشده در اندامک‌های گلی اسیزوم و پراکسیزوم با آنزیم کاتالاز و انواع مختلف پراکسیدازها با سرعت زیاد سم‌زدایی می‌شود. در کلروپلاست سم‌زدایی هیدروژن پراکسید از طریق چرخه آسکوربات - گلوتاتیون و در حضور آنزیم آسکوربات پراکسیداز انجام می‌شود (Seekin *et al.*, 2010; Mittler, 2002). این آنزیم‌ها نقش بسیار مهمی در خنثی‌کردن رادیکال‌های فعال اکسیژن داشته و میزان فعالیت آنها بسته به گونه گیاهی و شدت تنش متفاوت است (Gupta and Huang, 2014). هردو گروه گیاهان گلکوفیت و هالوفیت از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های تحمل به تنش شوری استفاده می‌کنند. در پژوهش حاضر پاسخ آنتی‌اکسیدانی گیاه آلوروپوس لیتورالیس در شدت‌های مختلف تنش شوری در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه به‌منظور روشن‌ساختن روش تعامل گیاه با شوری مورد بررسی قرار گرفته است.

(Ashraf and Wu, 1994). سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی با مکانیسم‌های سلولی مختلف کنترل می‌شوند. این مکانیسم‌ها پاسخ‌های دفاعی گیاه جهت برقراری دوباره هموستازی، محافظت و ترمیم پروتئین‌های آسیب‌دیده و غشاهای سلولی را فراهم می‌کنند (Vinocur and Altman, 2005). بررسی روش پاسخ گیاهان هالوفیت (به‌عنوان گیاهان مقاوم) به تنش شوری در شناخت راهکارهای تحمل به تنش اهمیت بسیاری دارد. آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus litoralis*) گیاهی هالوفیت، بومی ایران و از خانواده پوآسه (هم‌خانواده گیاهان مهم زراعی مانند گندم و برنج) است. این گیاه به‌دلیل دارا بودن مکانیسم دفع نمک از طریق غده‌های نمکی قابلیت تحمل شوری تا غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار را دارد (Barhoumi *et al.*, 2008). اندازه ژنوم کوچک این گیاه آن را به گزینه مناسبی برای معرفی به عنوان یک گیاه مدل تک‌لپه در بررسی‌های مکانیسم تحمل شوری مطرح کرده است (Fakhrfeshani *et al.*, 2015). تنش شوری از طریق بر هم زدن توازن یونی در سلول‌های گیاهی باعث ایجاد سمیت یونی، تنش اسمزی و علاوه بر آن تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) یا احیاگرهای اکسیژن می‌شود (Chawla *et al.*, 2013). در این تنش، روزنه‌ها به‌منظور جلوگیری از هدررفتن آب از طریق تعرق بسته شده و با کاهش دسترسی به CO_2 اتمسفری، مصرف NADPH درمدت فتوسنتز و چرخه کالوین کاهش می‌یابد. با بروز اختلال در زنجیره تبادل الکترون، تولید گونه‌های اکسیژن فعال از جمله آنیون سوپراکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-) و سموم متابولیک افزایش پیدا می‌کند. تجمع اکسیژن فعال در سلول‌های گیاهی به‌دلیل قابلیت احیای بالا و انرژی بسیار زیاد آنها منجر به آسیب‌های اکسیداتیو به پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدهای غشایی می‌شود (Abdelgawad *et al.*, 2016; Gill and Tuteja, 2010). گونه‌های اکسیژن فعال به دو گروه مولکول‌های رادیکال آزاد و بدون رادیکال تقسیم‌بندی می‌شوند. هیدروژن پراکسید درگروه مولکول‌های بدون رادیکال و نسبتاً پایدار قرار دارد و بررسی

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی و اعمال تنش: برای تهیه نمونه‌های گیاهی از تکثیر غیرجنسی (قلمه) با روش هیدروپونیک در شرایط گلخانه‌ای با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد استفاده شد. برای این منظور از یک گیاه اولیه، چندین قلمه تهیه و سپس قلمه‌های ریشه‌دار شده، در گلدان‌های حاوی محلول غذایی هوگلند (۳/۵ لیتر) کشت شدند. هوادهی با پمپ هوا انجام و محلول هوگلند هر دو هفته با محلول جدید تعویض شد. پس از گذشت یک ماه، گیاهان تحت سه تیمار شاهد (بدون نمک)، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید قرار گرفتند. برای اعمال تنش، غلظت مورد نظر شوری با حل کردن نمک سدیم کلرید در محلول هوگلند تهیه و جایگزین محلول غذایی هر کدام از گلدان‌ها شد. به‌منظور جلوگیری از وارد شدن شوک ناگهانی و آماده‌سازی گیاهان برای ورود به تنش، پاساژدهی به مدت ۶ روز و در سه نوبت با محلول هوگلند حاوی مقادیر ۷۵ میلی‌مولار نمک (برای گلدان‌های تحت تنش ۲۰۰ میلی‌مولار) و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک (برای گلدان‌های تحت تنش ۴۰۰ میلی‌مولار) انجام شد. ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش از اندام‌های مختلف گیاه (ساقه، ریشه و برگ) نمونه‌گیری شد.

سنجش میزان هیدروژن پراکسید: مقدار هیدروژن پراکسید براساس واکنش هیدروژن پراکسید با پتاسیم یدید (KI) تعیین شد. در این روش ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت‌های گیاهی فریز شده با ۱۸۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱٪ هموزن گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۱۰۰۰ میکرولیتر پتاسیم یدید یک مولار اضافه شده و جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. نتایج برحسب نانومول بر گرم وزن تر گزارش شد (Loreto and Velikova, 2001).

تهیه عصاره آنزیمی: ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های گیاهی به‌صورت جداگانه در ۱۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰

میلی‌مولار (pH = ۷) همگن شده و پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰۰ دور در دقیقه از محلول رویی به‌عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد.

سنجش پروتئین: برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل در نمونه‌های گیاهی از روش برادفورد (۱۹۷۶) و با رسم نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) در غلظت‌های ۵۰ تا ۸۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد بود. میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده و مقدار پروتئین برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر بیان شد (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با ارزیابی میزان بازدارندگی آن بر کاهش فتوشیمیایی نیترو بلو تترازولیم (NBT) مورد سنجش قرار گرفت (Giannopolitis and Ries, 1977). مخلوط واکنش برای سنجش فعالیت این آنزیم شامل بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار)، متیونین (۰/۱۳ میلی‌مولار)، EDTA (۰/۱ میلی‌مولار) و ریبولوآوین (۲ میکرومولار) بود که در تاریکی مخلوط شدند. مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بلافاصله پس از اضافه‌کردن ریبولوآوین، ۲ میلی‌لیتر از آن را درون لوله آزمایش ریخته و به هر لوله ۵۰ میکرولیتر نمونه عصاره پروتئینی اضافه شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۱۶ دقیقه در فاصله ۳۰ سانتی‌متری از منبع نور قرار گرفتند. پس از این مدت میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. با در نظر گرفتن اینکه یک واحد آنزیم یادشده برابر با میزانی از آنزیم است که ۵۰ درصد بازدارندگی نوری در NBT ایجاد کند، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس واحد آنزیمی به‌ازای هر میکروگرم پروتئین برای نمونه‌ها محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با بررسی کاهش مقدار هیدروژن پراکسید در مدت ۶۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH = ۷) و ۷۵۰

صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک) و e_{ij} اثر خطای تصادفی هستند. میانگین تیمارهای مورد نظر با آزمون چنددامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

غلظت هیدروژن پراکسید: تغییرات غلظت هیدروژن پراکسید در اندام‌های برگ، ساقه و ریشه متفاوت بود. در ریشه مقدار هیدروژن پراکسید در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار نمک با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت اما با افزایش مقدار نمک تا ۴۰۰ میلی‌مولار مقدار آن به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد. در بافت‌های ساقه و برگ در پاسخ به تنش شوری، مقدار هیدروژن پراکسید در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P < 0.05$). اما پاسخ به غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک در این دو بافت، مخالف یکدیگر بود به طوری که در بافت برگ افزایش و در بافت ساقه کاهش معنی‌دار در مقدار پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد مشاهده گردید (شکل ۱).

محتوای پروتئین: میزان تغییرات محتوای پروتئین در برگ، ساقه و ریشه گیاه آلروپوس لیتورالیس تحت تیمارهای مختلف شوری در شکل ۲ نشان داده شده است. همراه با افزایش غلظت نمک، میزان پروتئین نیز در بافت‌های برگ و ریشه گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) نشان داد. بیشترین مقدار پروتئین در تیمار ۴۰۰ میلی‌مولار نمک در بافت برگ با ۰/۲۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب ۴۶ و ۱۸ درصد بیشتر از شاهد و تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار نمک اندازه‌گیری شد. درصد میزان افزایش پروتئین در تیمار ۴۰۰ میلی‌مولار نمک در بافت ریشه نسبت به بافت برگ کمتر بود، به طوری که به‌ترتیب ۱۸ و ۴ درصد نسبت به شاهد و تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار افزایش یافت. در ساقه روش پاسخ به تنش شوری در مقایسه با دو بافت دیگر متفاوت بود. در این بافت تنها در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک افزایش معنی‌دار مقدار پروتئین نسبت به شاهد مشاهده گردید (شکل ۲).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: تنش شوری در هر

میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۱۵ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۷۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع گردید. تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به‌مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیم به‌صورت واحد آنزیمی به‌ازای هر میکروگرم پروتئین بیان گردید (Aebi, 1984).

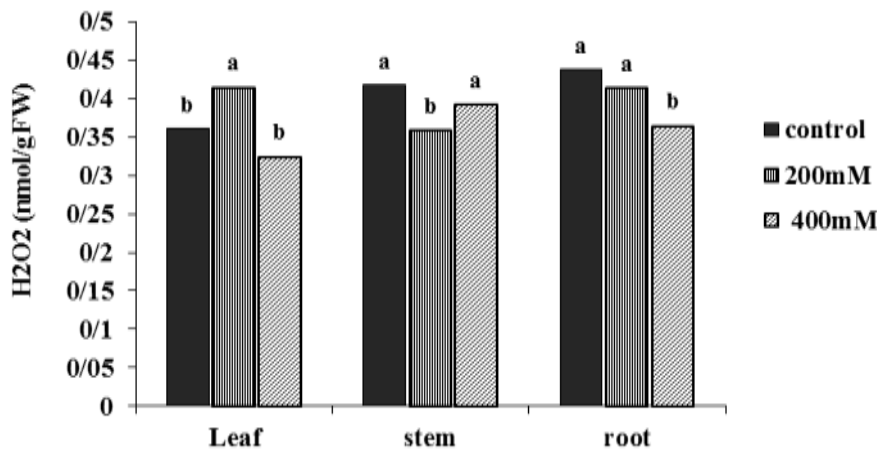
سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، مخلوط واکنش شامل بافر فسفات (۲۵۰ میلی‌مولار، $\text{pH} = 7$)، آب اکسیژنه (۱/۲ میلی‌مولار)، آسکوربیک اسید (۰/۵ میلی‌مولار) و EDTA (۰/۱ میلی‌مولار) بود. با افزودن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش، فعالیت آنزیمی آغاز شد. کاهش جذب نور به‌علت پراکسیداسیون آسکوربیک اسید در طول موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب در یک دقیقه استفاده شد (Dazy et al., 2008).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، با گایاکول و هیدروژن پراکسید به‌عنوان سوبسترا مورد ارزیابی قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل ۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار ($\text{pH} = 7$)، ۷۰۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید (۴۰ میلی‌مولار) و ۷۰۰ میکرولیتر گایاکول (۲۰ میلی‌مولار) بود. واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع شد. افزایش جذب به‌وسیله تشکیل تترآگایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به‌مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی برحسب واحد در میکروگرم پروتئین گزارش شد (Kar and Fierabend, 1984).

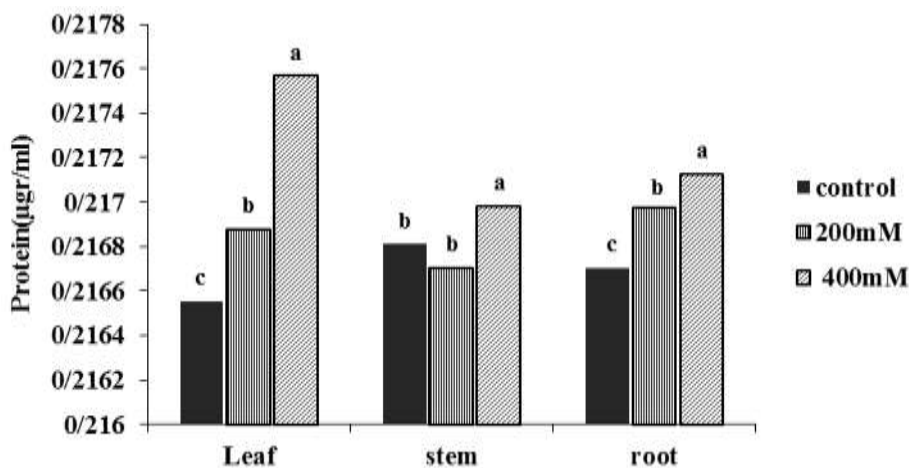
تحلیل آماری: تأثیر تیمارهای مختلف بر محتوای پروتئین، میزان هیدروژن پراکسید، تغییر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با در نظر گرفتن سه تکرار بیولوژیک و با پروسه GLM نرم‌افزار آماری SAS (SAS Institute, 1989) نسخه ۹/۱ و با مدل آماری زیر مورد بررسی قرار گرفت:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در این مدل، Y_{ij} مقدار صفت مورد نظر، μ میانگین صفت مورد نظر در جامعه، T_i اثر تیمارهای اعمال‌شده (غلظت‌های



شکل ۱- تغییرات محتوای هیدروژن پراکسید در برگ، ساقه و ریشه گیاه آلوروپوس لیئورالیس تحت تنش شوری ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید به مدت ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار نمک). میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر بافت از نظر آماری (آزمون چند دامنه‌ای دانکن) تفاوت معنی‌دار ندارند ($P < 0.05$).

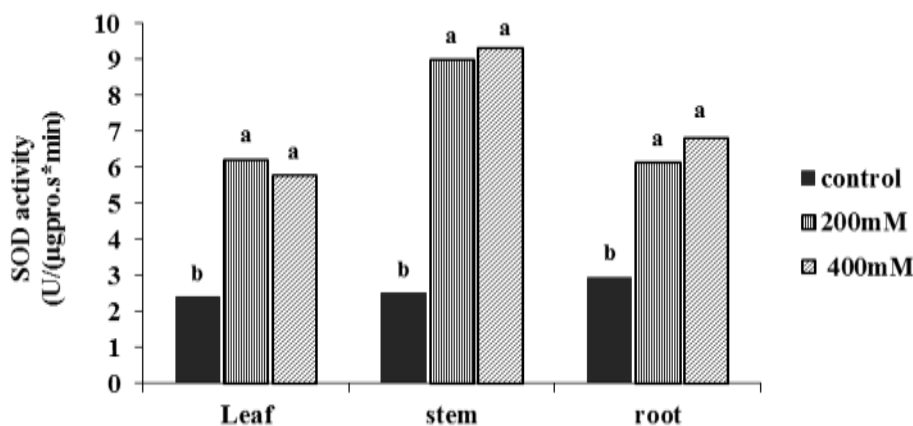


شکل ۲- تغییرات محتوای پروتئین در برگ، ساقه و ریشه گیاه آلوروپوس لیئورالیس تحت تنش شوری ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید به مدت ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار نمک). میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر بافت از نظر آماری (آزمون چند دامنه‌ای دانکن) تفاوت معنی‌دار ندارند ($P < 0.05$).

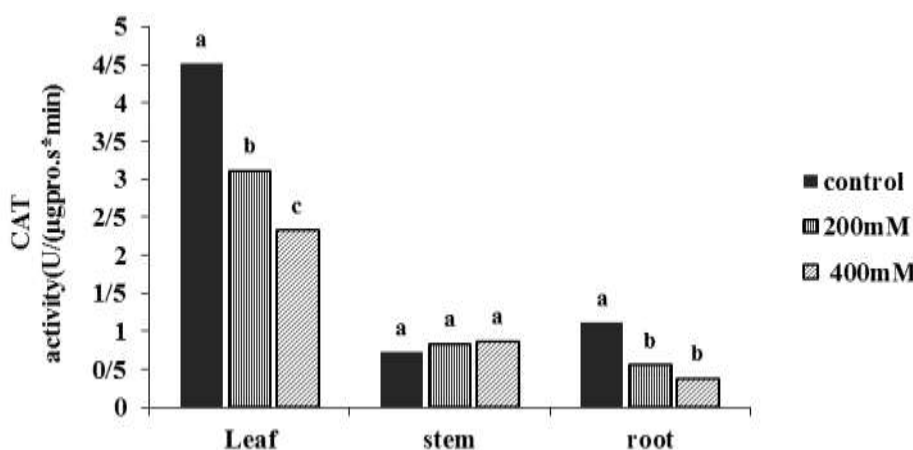
ریشه در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) نسبت به شاهد نشان داد به طوری که در این دو بافت با افزایش تنش، کاهش فعالیت این آنزیم مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت ریشه در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک با هم تفاوت معنی‌داری نداشت، اما در بافت برگ در این دو غلظت تفاوت معنی‌دار بود. تنش شوری در بافت ساقه هیچ تأثیری بر مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز نشان نداد و در تمام تیمارها میزان فعالیت آنزیم مشابه بود

سه بافت ریشه، ساقه و برگ در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به شاهد ($P < 0.05$) شد. بیشترین میزان افزایش در بافت ساقه مشاهده گردید و میزان افزایش در دو بافت دیگر تقریباً برابر بود (شکل ۳). در هر سه بافت اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بین دو سطح ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک مشاهده نشد.

فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ و



شکل ۳- تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ، ساقه و ریشه گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار نمک سدیم کلرید به مدت ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش در مقایسه با شاهد (صفر میلی مولار نمک). میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر بافت از نظر آماری (آزمون چند دامنه‌ای دانکن) تفاوت معنی‌دار ندارند ($P < 0.05$).



شکل ۴- تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ، ساقه و ریشه گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار نمک سدیم کلرید به مدت ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش در مقایسه با شاهد (صفر میلی مولار نمک). میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر بافت از نظر آماری (آزمون چند دامنه‌ای دانکن) تفاوت معنی‌داری ندارند ($P < 0.05$).

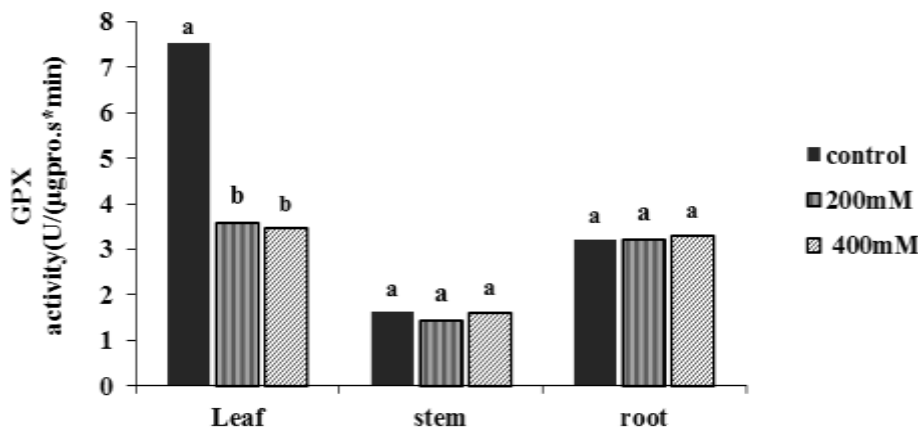
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: فعالیت آنزیم

(شکل ۴).

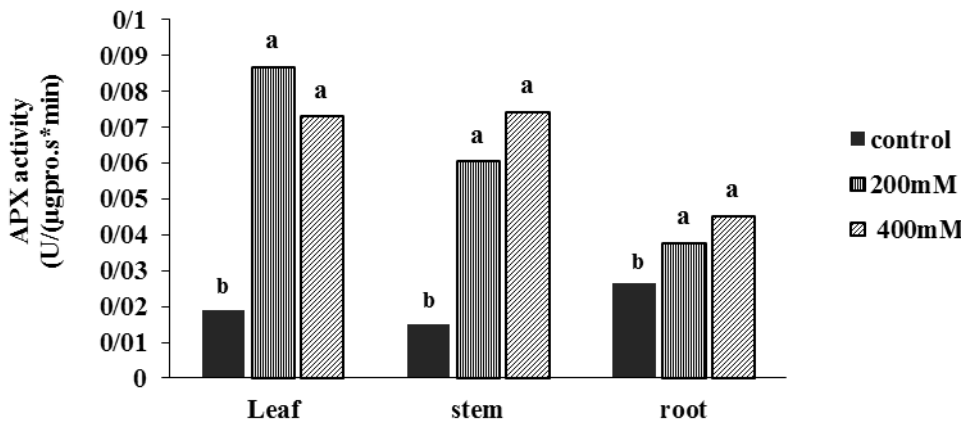
آسکوربات پراکسیداز در دو بافت برگ و ساقه در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) در مقایسه با شاهد نشان داد ولی در بافت ریشه تفاوت معنی‌داری میان شاهد و تیمار ۲۰۰ میلی مولار نمک مشاهده نشد، اما در غلظت ۴۰۰ میلی مولار افزایش فعالیت آنزیم از نظر آماری معنی‌دار ($P < 0.05$) بود (شکل ۶).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: فعالیت آنزیم گایاکول

پراکسیداز در نتیجه اعمال تنش شوری در بافت برگ روند کاهشی نشان داد اگرچه مقدار فعالیت این آنزیم در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار نمک با هم تفاوت معنی‌داری نداشت اما تفاوت آنها با شاهد معنی‌دار بود. در بافت ساقه و ریشه تغییر معنی‌دار در فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در حضور غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار نمک در مقایسه با شاهد مشاهده نشد (شکل ۵).



شکل ۵- تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز در برگ، ساقه و ریشه گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید به مدت ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار نمک). میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر بافت از نظر آماری (آزمون چند دامنه‌ای دانکن) تفاوت معنی‌دار ندارند ($P < 0.05$).



شکل ۶- تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در برگ، ساقه و ریشه گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید به مدت ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار نمک). میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر بافت از نظر آماری (آزمون چند دامنه‌ای دانکن) تفاوت معنی‌دار ندارند ($P < 0.05$).

بحث

محسوس‌تر از ریشه است (Munns, 2005). از سوی دیگر به‌طور مشخص در گیاه آلوروپوس لیتورالیس وجود غده‌های نمکی در سطح برگ، مکانیسمی کمکی و کارآمد را ایجاد می‌کند که با خارج کردن نمک از سطح برگ، غلظت نمک را در سیتوسل این سلول‌ها کاهش می‌دهد (Barhoumi *et al.*, 2008). بنابراین با وجود این تفاوت‌ها در بافت‌های مختلف و با در نظر گرفتن اینکه گیاهان در مواجهه با تنش شوری به‌دلیل شکل‌گیری انواع گونه‌های اکسیژن فعال با تنش اکسیداتیو درگیر می‌شوند. در تحقیق حاضر میزان هیدروژن پراکسید به‌عنوان یکی از اشکال اکسیژن فعال حاصل از تنش اکسیداتیو

در گیاهانی که در معرض تنش شوری قرار می‌گیرند ریشه نخستین بافتی است که تنش را درک می‌کند و پس از درک تنش، از طریق سیگنال‌های شیمیایی مختلف (مثل آبسزیک اسید) که در ریشه ایجاد می‌شود، اندام‌های هوایی نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرند و به تنش پاسخ می‌دهند (Acosta-Motos *et al.*, 2017; Munns, 2005). میزان و مکانیسم پاسخ در اندام‌های مختلف با یکدیگر متفاوت است. مثلاً از پاسخ‌های اولیه به تنش شوری، کاهش رشد در بافت‌های مختلف است؛ اما آزمایش‌ها نشان دادند که این کاهش رشد در برگ بسیار

(*al.*, 2010) گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد. علاوه بر این افزایش بسیار زیاد محتوای پروتئین در گیاه *Hordeum vulgare* L. در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار سدیم کلرید نیز گزارش شده است (Tort and Turkyilmaz, 2004). تجمع پروتئین در بافت‌های در معرض تنش شوری می‌تواند به‌عنوان منبع نیتروژن در ایجاد پایداری اسمزی نقش داشته باشد (Zhang *et al.*, 2013). به نظر می‌رسد که افزایش محتوای پروتئین همراه با افزایش غلظت نمک می‌تواند نتیجه بیوستز پروتئین‌هایی که به‌صورت جدید (*de novo*) و تنها در هنگام تنش تولید می‌شوند و یا پروتئین‌هایی که به‌طور همیشگی در غلظت‌های پایین در گیاه حضور دارند و تحت تنش، غلظتشان افزایش می‌یابد، باشد (Zhang *et al.*, 2013; Qasim *et al.*, 2003). ازجمله این پروتئین‌ها می‌توان به فاکتورهای رونویسی، کانال‌های یونی، پروتئین‌های درگیر در تنفس، فتوسنتز، سیگنالینگ، فولدینگ، سیستم‌های دفاعی و آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره کرد (Askari *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2005; Kosova *et al.*, 2013). درمدت تنش شوری در اثر تغییر متابولیسم، احتمال تولید گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌یابد. در نتیجه پروتئین‌های مربوط به مکانسیم احیاگری گونه‌های اکسیژن فعال یا همان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور نسبی افزایش می‌یابند (Kosova *et al.*, 2013).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنش شوری به‌طور متفاوت بر فعالیت چهار آنزیم آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی اثر می‌گذارد. به طوری که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سه بافت ریشه، ساقه و برگ در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد به‌طور معنی‌دار افزایش یافت و بیشترین فعالیت این آنزیم در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار در ساقه مشاهده شد (شکل ۳). در پژوهش‌های دیگر نیز افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در ریشه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری (Modaresi *et al.*, 2014)، در گیاه *Oilseed rape* تحت تنش خشکی (Abedi and Pakniat, 2010) و در برنج تحت تنش شوری (Khan and Panda, 2008) گزارش شده است. نخستین خط دفاع آنزیمی در برابر تنش اکسیداتیو،

در هر سه بافت مورد بررسی، روند کاهشی نشان داد (شکل ۱). در بافت‌های ریشه و ساقه به‌ترتیب در غلظت‌های ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک این کاهش از نظر آماری با شاهد تفاوت معنی‌دار داشت. هیدروژن پراکسید ترکیب سمی برای سلول‌ها است و باید سریعاً با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به آب و اکسیژن تبدیل شود (Guo *et al.*, 2006). در غیر این صورت می‌تواند از طریق پراکسیداسیون لیپیدها به غشاء سلولی، ساختمان پروتئین‌ها و DNA آسیب وارد کرده و از فرایند فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های دیگر جلوگیری کند (Gupta and Gupta, 2005). به‌طور معمول افزایش میزان هیدروژن پراکسید در بیشتر گیاهان تیمار شده با نمک نشان داده شده است (Sofa *et al.*, 2015). کاهش معنی‌دار در میزان هیدروژن پراکسید در گونه هالوفیت *Suaeda salsa* پس از ۷ روز اعمال تنش شوری توسط Cai-Hong و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است. آنها کاهش مقدار هیدروژن پراکسید را به‌عنوان شاخص وجود سیستم سم‌زدایی بسیار مؤثر در این گیاه معرفی کردند. گیاه آلوروپوس لیتورالیس به‌طور مؤثر و کارآمد ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری، تنش اکسیداتیو را درک و مکانیسم‌های سلولی مقابله با آن در گیاه فعال شد. نکته قابل توجه در نتایج حاصل از اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید افزایش معنی‌دار محتوای آن در برگ و در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک است. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد هیدروژن پراکسید به‌عنوان مولکول پیام‌رسان ثانویه در مسیرهای سیگنالینگ در درک تنش عمل می‌کند (Sofa *et al.*, 2015). بنابراین افزایش میزان آن در بافت برگ و در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار را می‌توان با این عملکرد مرتبط دانست. افزایش میزان هیدروژن پراکسید در گیاهان گلکوفیت مانند *Prosopis* و *Brassica oleracea strombulifera* تحت تنش شوری گزارش شده است (Reginato *et al.*, 2014; Hernandez *et al.*, 2010).

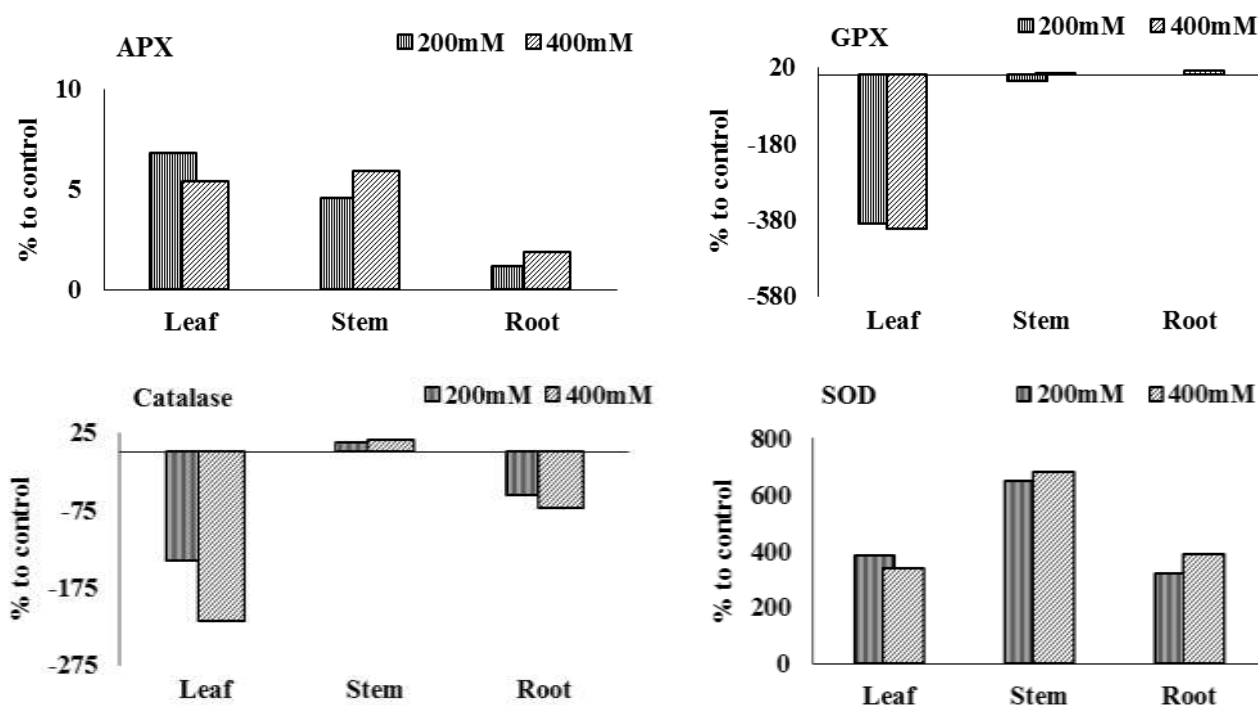
با افزایش شدت تنش، محتوای پروتئین در هر سه بافت مورد بررسی افزایش نشان داد (شکل ۲) که با نتایج پژوهش‌های دیگر که افزایش پروتئین را در *Medicago citrma* Kapoor *et al.*, 2003) و *Vigna mungo* L. (Sibole *et al.*, 2003) L.

عنوان یک پیام رسان کلیدی در فعالسازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی نقش داشته و به‌طور معنی‌داری نشت یونی و تجمع یون‌های سمی را در گیاهان کاهش می‌دهد (Zhou et al., 2009; War et al., 2011). در مطالعات مقایسه‌ای که بین گیاهان هالوفیت و گلیکوفیت انجام شده فعالیت بیشتر آنزیم کاتالاز در هالوفیت‌ها نسبت به گلیکوفیت‌ها تحت تنش شوری گزارش شده است (Jithesh et al., 2006; Sekmen et al., 2007; Bose et al., 2014).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار و در هر سه بافت روند مشابه و افزایشی را نشان داد (شکل ۶) که با نتایج Modaresi و همکاران (۲۰۱۴) در همین گیاه مطابقت دارد. اما در پاسخ بافت‌ها به تنش تفاوت مشاهده می‌شود به طوری که در ریشه در سطح متوسط شوری (۲۰۰ میلی‌مولار) فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تغییر معنی‌دار نشان نداد ولی در مقابل در ساقه و برگ و در همین شدت افزایش معنی‌دار مشاهده شد، به نظر می‌رسد برخلاف ساقه و برگ در ریشه فقط سطوح بالای شوری بر فعالیت این آنزیم اثر گذاشته و آن را افزایش می‌دهند. به طور کلی در مطالعات قبلی افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات-پراکسیداز با افزایش نمک در هر دو گروه گیاهان هالوفیت و گلیکوفیت گزارش شده است (Jithesh et al., 2006; Sekmen et al., 2008; Wang et al., 2007).

آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز هر دو وظیفه سم زدایی هیدروژن پراکسید را برعهده دارند، ولی نقش این دو آنزیم در کاهش غلظت هیدروژن پراکسید متفاوت می‌باشد. آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با کاتالاز تمایل بیشتری نسبت به هیدروژن پراکسید داشته و غلظت آن را در سطح پایین و حداقلی حفظ می‌کند در حالی که در حین تنش آنزیم کاتالاز حذف هیدروژن پراکسید اضافی را برعهده دارد (Mittler, 2004; Chaudhary, 2015). گونه‌های گیاهی مقاوم به شوری دارای یک مکانسیم کارا جهت خروج یون سدیم از سیتوسل هستند که با ممانعت از تولید گونه‌های اکسیژن فعال، نیاز به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی را کم می‌کنند (Reginato et al.,

سوپراکسید دیسموتاز است که با تبدیل آنیون سوپراکسید به هیدروژن پراکسید آن را در اختیار پراکسیدازها و کاتالاز قرار می‌دهد تا در ادامه فرایند سم‌زدایی، با تبدیل هیدروژن پراکسید به آب و اکسیژن آن را از محیط حذف کنند (Lokhande and Suprasanna, 2012). افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت‌های مورد بررسی می‌تواند نشان‌دهنده نقش حفاظتی و کارآمد این آنزیم در مواجهه با تنش شوری در گیاه آلوروپوس لیتورالیس باشد. پژوهش‌های بسیاری با هدف مقایسه تغییر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گونه‌های گلیکوفیت با گونه‌های هالوفیت تحت تنش شوری انجام شده است. در برخی از بررسی‌ها، همبستگی مثبت بین تنش شوری و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان گلیکوفیت گزارش شده است. اما برخی تحقیقات، عدم وجود همبستگی یا وجود همبستگی منفی بین این دو فاکتور را نشان داده‌اند (Maksimovic et al., 2013; Seckin et al., 2010; Bose et al., 2014). معمولاً دومین سد دفاعی در برابر تنش شوری آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز هستند (Lokhande and Suprasanna, 2012). در این تحقیق کاهش و یا عدم تغییر در فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز با افزایش سطح تنش مشاهده شد (شکل ۴ و ۵). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش‌های غیرزیستی و افزایش فعالیت سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز با تنش اکسیداتیو در هالوفیت‌ها نشان داده شده است (Shabala and Mackay, 2011). در پژوهشی Parida و همکاران (۲۰۰۴) افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در نتیجه تنش شوری در *Mangrove* را نشان داده‌اند. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت نمک در گیاه *Vinga radiates* نیز گزارش شده است (Saha et al., 2010). از سوی دیگر کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز با تجمع سالیسیلیک اسید در گیاهان تحت تنش مرتبط بوده و این مکانسیم برای غلبه بر آسیب‌های ناشی از تنش شوری ضروری می‌باشد (Shim et al., 2003). سالیسیلیک اسید به



شکل ۷- مقایسه درصد تغییرات فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX)، گاباکول پراکسیداز (GPX)، کاتالاز (Catalase) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در برگ، ساقه و ریشه گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید به مدت ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش در مقایسه با شاهد (تیمار بدون نمک).

بافت‌های مختلف گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری نسبت به شاهد (بدون تنش شوری) بررسی و ارائه شده است (شکل ۷). آگاهی و درک مکانیسم‌های پاسخ به تنش در این گیاه هالوفیت مدل می‌تواند در طراحی پروژه‌های دستورزی گیاهان زراعی متحمل به‌شوری مورد استفاده قرار گیرد.

(2014). به نظر می‌رسد در این گیاهان که حضور مکانسیم‌های کارآمد مانع تولید هیدروژن پراکسید می‌شوند؛ فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به عنوان حافظ غلظت هیدروژن پراکسید در سطح حداقلی افزایش یافته و در عین حال فعالیت آنزیم کاتالاز نیز کاهش پیدا می‌کند.

در تحقیق حاضر الگوی تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

منابع

- Abedi, T. and Pakniyat, H. (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 46:27-34.
- Abdelgawad, H., Zinta, G., Hegab, M. M., Pandey, R., Asard, H. and Abuelsoud, W. (2016) High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. Frontiers in Plant Science 8: 276.
- Acosta-Motos, J. R., Fernanda Ortuno, M., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J. and Hernandez, J. A. (2017) Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms. Agronomy 18: 12-21.
- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. Methods of Enzymology 105: 121-126.
- Ashraf, M. Y., and Wu, L. (1994) Breeding for salinity tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 13: 17-42.
- Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M. and Salekdeh, G. H. (2005) Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. Proteomics 6: 2542-2554.
- Barhouni, Z., Djebali, W., Abdelly, C., Chaibi, W. and Smaoui, A. (2008) Ultrastructure of *Aeluropus littoralis* leaf salt glands under NaCl stress. Protoplasma 233: 195-202.

- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A. and Shabala, S. (2014) ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 65: 1241-57
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cai-Hong, P., Su-Jun, Z., Zhi-Zhong, Z. and Bao-Shan, W. (2005) NaCl treatment markedly enhances H₂O₂-scavenging system in leaves of halophyte *Suaeda salsa*. *Physiologia Plantarum* 125: 490-499.
- Chaudhary, A., Singh, A., and Sengar, R. S. (2015) Antioxidant activity in rice under salinity stress: an overview. *Plant Archives* 15: 7-13.
- Chawla, S., Jain, S. and Jain, V. (2013) Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22: 27-34.
- Dazy, M., Jung, V., Ferard, J. F. and Masfarau, J. F. (2008) Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* 74: 57-63.
- Deeba, F., Pandey, A. K., Ranjan, S., Mishra, A., Singh, R., Sharma, Y. K., Shirke P. A. and Pandey, V. (2012) Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 6-18.
- Fakhrfeshani, M., Shahrriari-Ahmadi, F., Niazi, A., Moshtaghi, N. and Zare-Mehrjerdi, M. (2015) The effect of salinity stress on Na⁺, K⁺ concentration, Na⁺/K⁺ ratio, electrolyte leakage and HKT expression profile in roots of *Aeluropus littoralis*. *Journal of Plant Molecular Breeding* 3: 1-10.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases. *Plant Physiology* 59: 315-318
- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Guo, Z., Ou, W., Lu, S. and Zhong, Q. (2006) Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 828-836.
- Gupta, B. and Huang, B. (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics* 2014: 1-18.
- Gupta, S. and Gupta, N. K. (2005) High temperature induced antioxidative defense mechanism in contrasting wheat seedlings. *Indian Journal of Plant Physiology* 10: 73-75.
- Health, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hernandez, M., Fernandez-Garcia, N., Diaz-Vivancos, P. and Olmos, E. (2010) A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. *Journal of Experimental Botany* 61: 521-535.
- Jithesh, M., Prashanth, S., Sivaprakash, K. and Parida, A. (2006) Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. *Plant Cell Reports* 25: 865-876.
- Kapoor, K. and Srivastava, A. (2010) Assessment of salinity tolerance of *Vinga mungo* var. Pu-19 using *ex vitro* and *in vitro* methods. *Asian Journal of Biotechnology* 2: 73-85.
- Kar, M. and Feierabend, J. (1984) Metabolism of activated oxygen in detached wheat and rye leaves and its relevance to the initiation of senescence. *Planta* 160: 385-391 .
- Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K. and Kim, W. (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 5: 709.
- Khan, M. H., and Panda, S. K. (2008) Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 81-89.
- Kosova, K., Vitamvas, P., Urban, M. O. and Prasil, I. T. (2013) Plant proteome responses to salinity stress comparison of glycophytes and halophytes. *Functional Plant Biology* 40: 775-786.
- Lokhande, V. H. and Suprasanna, P. (2012) Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in The Ara of Climate Change* 29-56.
- Loreto, F. and Velikova, V. (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Journal of Plant Physiology* 127: 1781-1787.
- Maksimovic, J. D., Zhang, J., Zeng, F., Ziivanovic, B. D., Shabala, L., Zhou, M. and Shabala, S. (2013) Linking oxidative and salinity stress tolerance in barley: can root antioxidant enzyme activity be used as a measure of stress tolerance? *Plant and Soil* 365: 141-155.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Modarresi, M., Moradian, F., and Nematzadeh, G. A. (2014) Antioxidant responses of halophyte plant *Aeluropus littoralis* under long-term salinity stress. *Biologia* 69: 478-483

- Munns, R. (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645-63.
- Parida, A. K., Das, A. B. and Mohanty, P. (2004) Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *Journal of Plant Physiology* 161: 531-542.
- Qasim, M., Ashraf, M., Ashraf, M. Y., Rehman, S. U. and Rha, E. S. (2003) Salt-induced changes in two canola cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum* 46: 629-632.
- Rakhmankulova, Z., Shuyskaya, E., Shcherbakov, A., Fedyaev, V., Biktimerova, G., Khafisova, R. and Usmanov, I. (2015) Content of proline and flavonoids in the shoots of halophytes inhabiting the South Urals. *Russian Journal of Plant Physiology* 62: 71-76.
- Reginato, M. A., Castagna, A., Furlan, A., Castro, S., Ranieri, A., and Luna, V. (2014) Physiological responses of a halophytic shrub to salt stress by Na₂SO₄ and NaCl: oxidative damage and the role of polyphenols in antioxidant protection. *AoB Plants* 6.
- Reginato, M., Sosa, L., Llanes, A., Hampp, E., Vettorazzi, N., Reinoso, H. and Luna, V. (2014) Na₂SO₄ and NaCl determine different growth responses and ion accumulation in the halophytic legume *Prosopis strombulifera*. *Plant Biology* 16: 97-106.
- SAS Institute, Inc. (1989) A user's guide to SAS. SAS Institute, Inc. Cary, NC.
- Saha, P., Chatterjee, P. and Biswas, A. K. (2010) NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Indian Journal of Experimental Biology* 48: 593-600.
- Seckin, B., Turkan, I., Sekmen, A. H. and Ozfidan, C. (2010) The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barleygrass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). *Environmental and Experimental Botany* 69: 76-85.
- Sekmen, A. H. and Trkan, T. S. (2007) Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum* 131: 399-411.
- Shabala, S. and Mackay, A. (2011) Ion transport in halophytes. *Advances in Botanical Research* 57: 151-19
- Shim, I. S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D. W. and Usui, K. (2003) Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 39: 285-292.
- Sibole, J. V., Cabot, C., Poschenreder, C. and Barcelo, J. (2003) Efficient leaf ion partitioning, an overriding condition for abscisic acid-controlled stomatal and leaf growth responses to NaCl salinization in two legumes. *Journal of Experimental Botany* 54: 2111-2119.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. and Vitti, A. (2015) Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 13561-78.
- Tort, N. and Turkyilmaz, B. (2004) A physiological investigation on the mechanisms of salinity tolerance in some barley culture forms. *Journal of Forest Science* 27: 1-16.
- Vinocur, B. and Altman, A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123-132.
- Wang, M. C., Peng, Z. Y., Li, C. L., Li, F., Liu, C. and Xia, G. M. (2008) Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*/ *Thinopyrum ponticum*. *Proteomics* 8: 1470-1489.
- War, A. R., Paulraj, M. G. and War, M. Y. and Ignacimuthu, S. (2011) Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling and Behavior* 6: 1787-92.
- Yan, S., Tang, Z., Su, W. and Sun, W. (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice roots. *Proteomics* 5: 235-336.
- Zhang, M., Fang, Y., Ji, Y., Jiang, Z. and Wang, L. (2013) Effects of salt stress on ion content, antioxidant enzymes and protein profile in different tissues of *Broussonetia papyrifera*. *South African Journal of Botany* 85: 1-9.
- Zhou, Z. S., Guo, K., Abdou-Elbaz, A. and Yang, Z. M. (2009) Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. *Environmental and Experimental Botany* 65: 27.

Antioxidant responses of different tissues of *Aeluropus littoralis* to salinity stress

Homeyra Jamalpoor Birgani¹, Seyyed Abdullah Eftekhari², and Mokhtar Heidari³

¹ Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

² Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
(Received: 09/12/2017, Accepted: 21/07/2018)

Abstract

Salt stress is considered as one of the most important abiotic stresses which severely affects agriculture in the world. One of the strategies to deal with this stress is to investigate the mechanisms of tolerance in halophyte plants and to use them for crop improvement. The halophyte plant "*Aeluropus littoralis*" can tolerate salinity levels up to 600 mM. In this study, in order to investigate the mechanism of the antioxidant response of this plant to salinity stress, one-month seedlings were irrigated with Hoagland solution containing 0, 200 and 400 mM NaCl to induce salt stress. After 72 hours, root, stem and leaf tissues were sampled and the response of each tissue to salinity stress was evaluated. The results were compared using Duncan's multiple range test ($P < 0.05$) after ANOVA. With increasing level of stress, protein content in all three tissues increased significantly. The amount of H_2O_2 in stem and root decreased with increasing salt concentration, but increased at 200 mM salt concentration. Based on the results, the general pattern of change in the activity of antioxidant enzymes was different in response to salt stress. The activity of superoxide dismutase in all of the studied tissues increased significantly with increasing stress level, so that the highest activity of the enzyme was observed in stem tissue and at 400 mM salt concentration (3.7 times more than the control). However, the changes in the activity of catalase and guaiacol peroxidase showed a decreasing trend or no significant change, so that the catalase activity in the leaf and at 400 mM salt concentration was almost half of the control and in the root more than half of the control. Finally, with increasing levels of stress, significant increase in ascorbate peroxidase activity was observed in all treatments, except in root tissue and 200 mM salt concentration. In general, according to the results, it can be stated that the balance between the antioxidant defense indices leads to the maintenance of destructive molecules such as H_2O_2 at a minimal level and plays an effective role in salinity stress tolerance in the *A. littoralis*.

Keywords: Ascorbate peroxidase, Hydrogen peroxidase, Superoxide dismutase, Catalase, Guaiacol peroxidase

Corresponding author, Email: a.pakdin@sanru.ac.ir