پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به تنش شوری در ده رقم توت‌فرنگی

ابراهیم لطیفی‌خواه[۱]، سعید عشقی[۲]، علی قرقانی[۳]، عنایت اله تفضلی[۴] و فاطمه رزاقی[۵]

[۱] دانشجوی دوره دکتری علوم باغبانی، گرایش میوه‌کاری، بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

[۲،۳و۴] به ترتیب استاد، استادیار و استاد بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

[۵] استادیار بخش مهندسی آب دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

*نویسنده مسئول: elatifikhah@gmail.com

چکیده

یکی از مشکلات عمده برای کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان شوری آب و خاک است. شوری به دلیل تأثیر بر روی جذب آب و مواد غذایی بر روی عملکرد و کیفیت میوه‌ها اثر می‌گذارد. در این پژوهش تأثیر ۴ سطح شوری (۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار NaCl) بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ده رقم توت‌فرنگی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. آبیاری گیاهان با محلول‌های شور تا پایان دوره میوه‌دهی کامل بررسی شد. برای تیمار شاهد فقط آبیاری با محلول غذایی هوگلند انجام شد. نحوه آبیاری به‌گونه‌ای بود که حدود ۲۰٪ محلول به‌عنوان آبشویی منظور گردید و نیز یک‌بار در هر سه نوبت آبیاری عمل آبشویی گلدان‌ها با آب معمولی انجام شد. نتایج نشان داد که شوری باعث افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. بیشترین افزایش آنزیم کاتالاز در غلظت ۴۰ میلی‌مولار NaCl مربوط به رقم آروماس و پاروس و کمترین میزان این آنزیم مربوط به ۶۰ میلی مولار NaCl در دو رقم کوین الیزا و کام مشاهده شد. بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مربوط به ارقام آروماس، سلوا، کردستان و پاروس در غلظت ۴۰ میلی‌مولار نمک بوده است. کمترین افزایش در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز هم در ارقام کوئین الیزا، کام و میشنری مشاهده گردید. با افزایش غلظت NaCl میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۴۰ میلی‌مولار نمک مربوط به رقم آروماس و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در غلظت ۶۰ میلی مولار نمک مربوط به رقم کوین الیزا و میشنری است. با توجه به نتایج این آزمایش مشخص شد که غلظت ۶۰ میلی مولار نمک طعام باعث نابودی گیاه خواهد شد و گیاه نمی‌تواند با افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با تنش شوری مقابله کند. از طرف دیگر مشاهده گردید تحمل ارقام هم متفاوت است. سه رقم آروماس، پاروس و کردستان متحمل و رقم‌های کوئین‌الیزا، کام و میشنری حساس به شوری بودند.

کلمات کلیدی: **تنش شوری، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، توت‌فرنگی، محلول غذایی هوگلند**

مقدمه

گیاهان روش‌های مختلفی برای سازگاری و تحمل به شوری به کار می‌گیرند. این روش‌ها در سه گروه کلی قرار می‌گیرند که شامل تولید آنتی‌اکسیدان‌ها، استفاده از یون‌های هموستاسیس و تجمع مواد سازگار هست. آنتی‌اکسیدان‌ها که شامل چند دسته آنزیم می‌باشند، به‌طور عمده آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و چند آنزیم دیگر را در برمی‌گیرند. این آنزیم‌ها سوپر اکسیدهای تولیدشده در گیاهان در شرایط تنش را به مواد بی‌خطر تبدیل می‌کنند. استفاده از یون‌های هموستاسیس روش دیگر ایجاد تحمل در گیاهان است، این سازوکار که بر اساس نسبت K^+/Na^+ استوار است با خارج کردن سدیم از یاخته در شرایط تنش باعث ایجاد تحمل می‌گردد، این

روش تنها در مقادیر پایین شوری کاربرد دارد و در غلظت‌های بالا تأثیری ندارد. روش سوم تحمل در برابر شوری تولید مواد سازگار در شرایط تنش هست. تولید موادی با جرم مولکولی کم و قابلیت حل شدن بالا مانند پرولین، سوکروز، گلی سین و چندین ماده دیگر از این جمله است. مهم‌ترین این مواد پرولین هست که در شرایط تنش با تنظیم فشار اسمزی، تأمین کربن و نیتروژن، حفظ فعالیت نور ساخت و تنظیم فعالیت میتوکندری به تحمل گیاه در برابر تنش کمک می‌کند (Silveira *et al*., 2003; Kavikishore *et al*., 2005; Rai *et al*., 2011). این پژوهش با کاشت ده رقم توت‌فرنگی که از استان کردستان جمع‌آوری شد، با هدف‌های زیر انجام گردید:

الف- بررسی تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ده رقم توت‌فرنگی در شرایط تنش شوری. ب- مشخص نمودن وضعیت تحمل ده رقم توت‌فرنگی نسبت به شوری و امکان کشت رقم و یا ارقام متحمل در مناطقی که دارای آب و یا خاک مساعدی جهت کشت توت‌فرنگی نیستند (دارای آب و یا خاک شور می‌باشند).

مروری بر منابع

تنش شوری در توت‌فرنگی رقم سلوا باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در برگ‌ها و نیز باعث تجمع پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید در گیاه شد (Tanou et al., 2009). در توت‌فرنگی رقم 'Elsanta' در غلظت ۴۰ میلی مولار NaCl، سطوح مالون دی آلدهید به‌طور معنی‌داری شروع به افزایش کرد و نیز میزان آمینواسیدهای ضروری مانند پرولین، آسپاراژین و گلوتامین افزایش یافت (Keutgen and Pawelzik, 2008).

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شوری (۴ سطح) و رقم توت‌فرنگی (ده رقم) انجام شد. در هر تیمار ۴ تکرار یا چهار گلدان وجود داشت و در هر گلدان دو گیاه کشت شد. در این پژوهش برای مشخص کردن رفتار ده رقم توت‌فرنگی شامل ارقام 'Kurdistan', 'Paros', 'Aromas', , 'Pajero', 'Gaviota', 'Camarosa', 'Chandler', 'Kam','Selva' و'Misionnary' به شرایط شوری در شرایط گلخانه، از هر رقم چهل نشاء توت‌فرنگی از استان کردستان تهیه و در گلخانه بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز در گلدان‌های چهار کیلوگرمی حاوی محیط کشت پرلایت و کوکوپیت کشت شد. دمای گلخانه در روز ۳±۲۴ درجه سلسیوس و در شب ۳±۱۵درجه سلسیوس تنظیم شد. شرایط نور طبیعی و رطوبت نسبی ۷۰ درصد بود. آبیاری این گیاهان در ابتدا با محلول غذایی نیم هوگلند و سپس با محلول غذایی هوگلند کامل انجام شد و به‌صورت ۳ روز یک‌بار ۳۰۰ سی‌سی محلول غذایی هوگلند تا مرحله استقرار گیاه به پای هر گلدان داده شد. پس از استقرار گیاهان (مرحله چهار تا پنج برگی)، به‌منظور اعمال تنش شوری از نمک کلرید سدیم (NaCl) در محلول غذایی استفاده شد که در چهار غلظت ۰، ۲۰ ، ۴۰ و ۶۰ میلی مولار به کار رفت. نحوه اعمال شوری به این صورت بود که غلظت‌های نمک به‌تدریج در محلول غذایی بالا برده شد. برای این منظور ابتدا، دو مرتبه تیمار ۱۰ میلی مولار NaCl برای گلدان‌های مورد نظر استفاده شد و سپس تیمار ۲۰ میلی مولار به کار رفت و در نهایت به تیمار ۴۰ و ۶۰ میلی مولار از NaCl رسید. آبیاری گیاهان با محلول‌های شور تا پایان دوره میوه‌دهی کامل انجام شد. برای تیمار شاهد فقط آبیاری با محلول غذایی انجام شد. نحوه آبیاری به‌گونه‌ای بود که حدود ۲۰٪ محلول (به‌عنوان آبشویی) از انتهای گلدان‌ها خارج گردید و نیز یک‌بار در هر سه نوبت آبیاری عمل آبشویی گلدان‌ها با آب معمولی انجام شد. برای اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت پس از اعمال تنش شوری از برگ‌های کاملاً توسعه یافته توت‌فرنگی برداشت و بلافاصله اتیکت گذاری شده و در داخل فویل آلومینیوم پیچیده شد و در فلاسک نیتروژن مایع قرار دادیم و به آزمایشگاه منتقل گردید و در

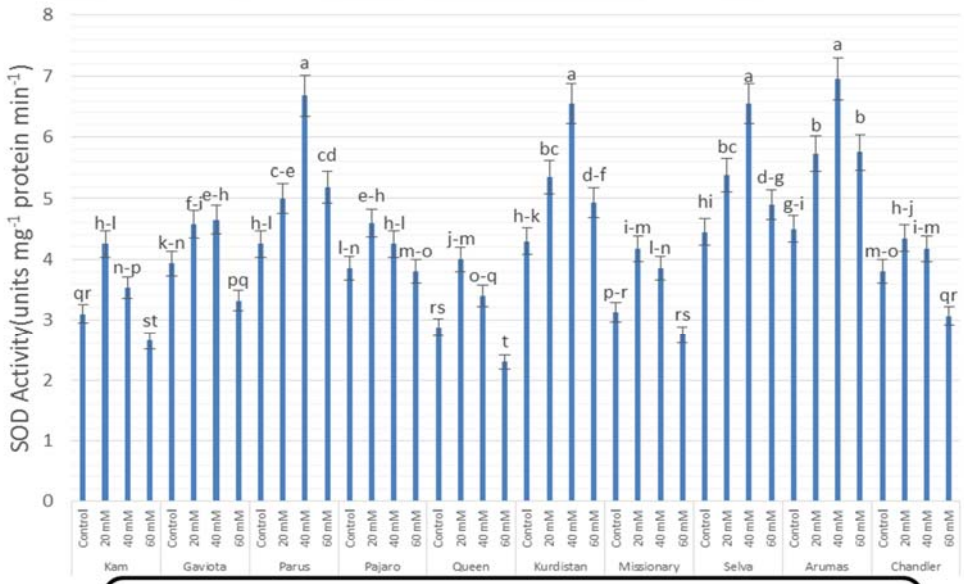
داخل یخچال با دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. ۰/۵ گرم از برگ‌های فریز شده ارقام توت‌فرنگی برای اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

تغییرات تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در واکنش به تنش شوری اندازه‌گیری شد. آنزیم‌های مورد نظر عبارت‌اند از سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربیک پراکسیداز. به این ترتیب با بررسی میزان تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی واکنش ارقام توت‌فرنگی در برابر تنش شوری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

الف- واکنش ارقام توت‌فرنگی به تنش شوری و تأثیر شوری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

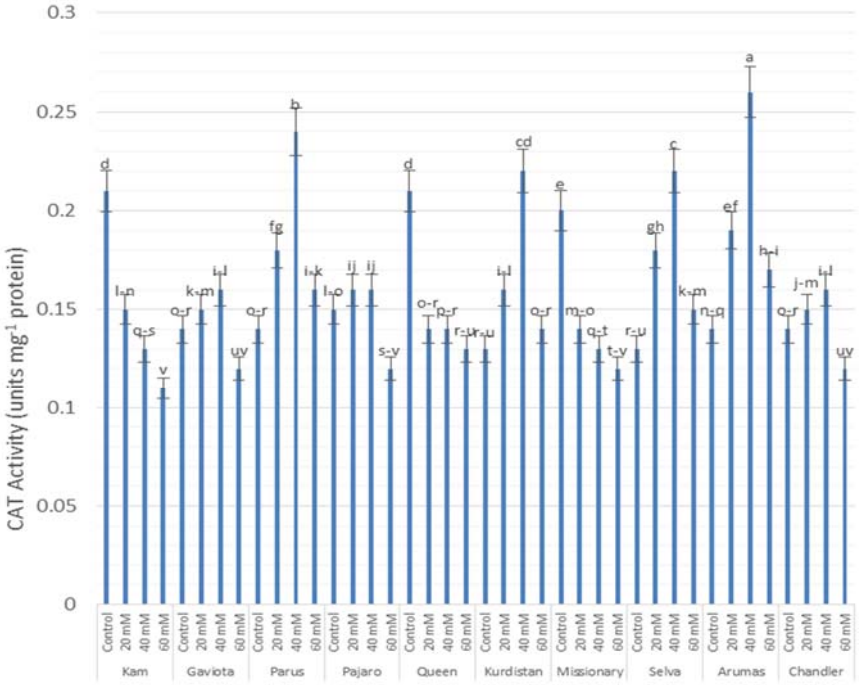
با توجه به شکل یک تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شده است به‌گونه‌ای که با افزایش در غلظت شوری فعالیت این آنزیم نیز روند افزایشی دارد. البته در غلظت ۶۰ میلی مولار نمک طعام فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز روند نزولی داشته است. بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مربوط به ارقام آروماس، سلوا، کردستان و پاروس در غلظت ۴۰ میلی مولار نمک بوده است. کمترین افزایش هم در ارقام کوئین الیزا، کام و میشنری است. رادیکال آزاد سوپراکسید (O_2^-) توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود و سپس در کلروپلاست توسط آسکوربیت پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز به آب تجزیه می‌گردد (Hausladen and Alscher, 1993).



Cultivar*Salinity Interaction. Fig. 1- Changes of SOD activity (units mg^{-1} protein min^{-1})during the experimental period, under salinity stress. Columns with the same letters are not different at 5% probability using Duncan's multiple range test.

ب- تأثیر شوری بر ارقام توت‌فرنگی و برهمکنش آن‌ها بر فعالیت آنزیم کاتالاز

بر اساس شکل ۲ تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم کاتالاز شد. بیشترین غلظت کاتالاز مربوط به دو رقم آروماس و پاروس در غلظت ۴۰ میلی مولار نمک طعام بود و کمترین غلظت کاتالاز مربوط به دو رقم کوئین‌الیزا و کام در غلظت ۶۰ میلی مولار نمک طعام بود. در گیاه *Brassica juncea* تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد (Yusuf et al., 2008) که مشابه نتایجی است که در این پژوهش به دست آمد. نتایج پژوهش Tanou و همکاران (۲۰۰۹) بر روی توت‌فرنگی رقم سلوا در شرایط شوری نشان دادند که فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت که با نتایج بدست آمده از تحقیق ما مطابقت داشت.



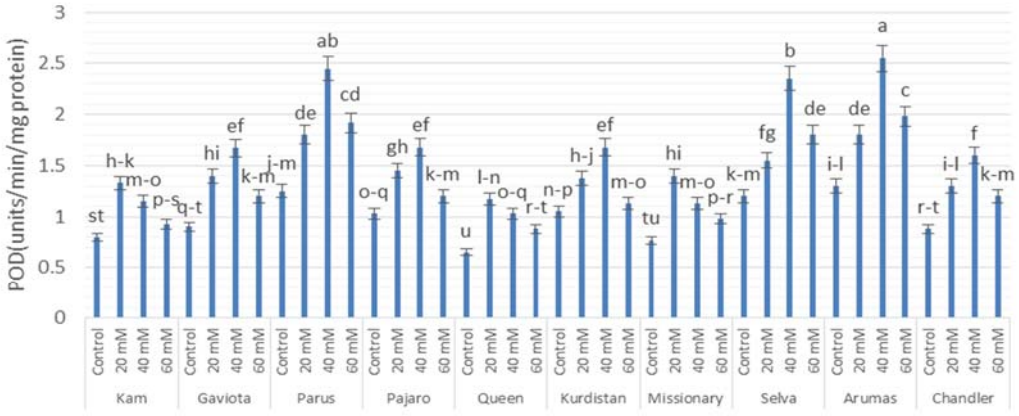
Cultivar*Salinity Interaction.Fig2-Changes of CAT activity during the experimental period, under influence of NaCl salinity. Columns with the same letters are not different at 5% probability using Duncan's multiple range test.

پ- واکنش ارقام توت‌فرنگی به تنش شوری و تأثیر تنش شوری بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌فرمایید با افزایش غلظت NaCl میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۴۰ میلی مولار نمک مربوط به رقم آروماس و کمترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به ۶۰ میلی مولار نمک در دو رقم کویین الیزا و میشنری مشاهده شد. نتایج به‌دست‌آمده با نتایج پژوهش‌های Tanou و همکاران (۲۰۰۹) در توت‌فرنگی مبنی بر این‌که تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌گردد همسویی دارد.

نتیجه‌گیری کلی و بحث

شوری همواره به‌عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های محدود کننده رشد و توسعه گیاهی در طول تاریخ بشر مطرح بوده است. پاسخ همه گیاهان به شوری بالا بستگی به غلظت سدیم ایجاد کننده سطوح شوری در بافت آن‌ها، زمان مواجهه با شوری و ترکیبات نمک متفاوت می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که شوری باعث کاهش رشد گیاه و ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه شده است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی مولار نمک طعام افزایش و در غلظت ۶۰ میلی مولار چون گیاه تحمل این تنش شوری را ندارد سریع کل گیاه نابود خواهد شد و از فعالیت آنزیم‌ها ممانعت می‌شود. تنش شوری باعث کاهش قند میوه، اسیدیته میوه، کلروفیل و غیره می‌شود. اثرات شوری بر واکنش آنزیمی متعدد و پیچیده است، هر چند که اثرات شوری بر فعالیت آنزیم‌ها به میزان زیادی به تأثیر نمک‌ها در تغییر pH سیتوسول مربوط می‌شود که میزان فعالیت آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌طور عمومی پذیرفته شده است که فعالیت آنزیم‌ها در غلظت‌های پایین یون‌ها افزایش جزیی دارد، درحالی‌که به‌تدریج در حضور غلظت‌های کلرید سدیم بیش از ۱۰۰ میلی مول از فعالیت آنزیم‌ها ممانعت می‌شود (Wu et al., 2003). برای نمونه فعالیت آنزیم DNAآز و RNAآز در دانهال‌های یونجه و عدسک آبی در حضور ۱۰۰ میلی مول کلرید سدیم ممانعت می‌شود (Yupsanis et al., 2001).



Cultivar*Salinity Interaction. Fig.3- Changes of POD activity (units mg $^{-1}$ protein) during the experimental period, under influence of NaCl salinity. Columns with the same letters are not different at 5% probability using Duncan's multiple range test.

منابع

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

Ashraf, M. Y., A.R. Azmi, A.H. Khan and S.A. Ala. (1994). Effect of water on total phenols, peroxidase activity and chlorophyl content in wheat. Acta Phsiol. Plant. 16:185- 191.

Aziz, I., and M.A. Khan. (2001). Effect of seawater on the growth, ion content and water potential of *Rhizophora mucronata* Lam. J. Plant Res. 114: 369-373.

Barrs, H. D., and P. F. Weatherley. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal of Biological Sciences, 15(3), 413-428.

Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. Curr. Opin. Cell Biology. 12:431-434.

Bohnert, H.J., and R.G. Jensen. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. Trends Biotechnol. 14: 89-97.

Epstein, E., J.D. Norlyn, and D. W. Rush. (1980). Saline culture of crops: a genetic approach. Science. 210: 399-509.

FAO. 2008. FAOSTAT. Agricultural statistics database, Retrieved from http://fao.org/pro 1289/1965856/page.htm

Iran agriculture organization (Jahad) database. (2009). Data retrieved from: http://maj. Ir/pages/ 120325/dan/data.htm

Razmjoo, K. H. O. R. S. H. I. D., Heydarizadeh, P. A. R. I. S. A., & Sabzalian, M. R. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of Matricaria chamomila. Int. J. Agric. Biol, 10(4), 451-454.

Tanou, G., Molassiotis, A., & Diamantidis, G. (2009). Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and experimental botany*, *65*(2), 270-281.

Tehranifar, A., & Sarsaefi, M. (2000). Strawberry growing in Iran. In IV International Strawberry Symposium 567 (pp. 547-549).

Turhan, E. and A. Eris. (2005). Changes of micronutrients, dry weight, and chlorophyll contents in strawberry plants under salt stress conditions. Soil Sci. Plant Anal. 36: 1021-1028.

Wu, C., Li, X., Yuan, W., Chen, G., Kilian, A., Li, J., ... & Zhang, Q. (2003). Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *The Plant Journal*, 35(3), 418-427.

Yupsanis, T., Kefalas, P. S., Eleftheriou, P., & Kotinis, K. (2001). RNase and DNase activities in the alfalfa and lentil grown in iso-osmotic solutions of NaCl and mannitol. *Journal of plant physiology*, 158(7), 921-927.

Antioxidant Enzymes Responses to Nacl Stress in 10 Cultivars of Strawberry

Ebrahim Latifikhah[1*], Saeid Eshghi[1], Ali Gharaghani[1], Enayatollah Tafazoli[1], Fatemeh Razzaghi[2]

[1] Department of Horticultural Sciences, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[2] Water Engineering Department, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[*] Corresponding Author: elatifikhah@shirazu.ac.ir

Abstract

Water and soil salinity is one of the major problems for agriculture in arid and semi-arid regions of the world. Salinity affects the yield and quality of fruit crops as the result of modifying water and nutrient uptake. In order to evaluate the influence of salinity on antioxidants enzymes on 10 cultivars of strawberry, the experiment was conducted in a completely randomized design with factorial layout. The effect of salinity (0, 20, 40 and 60 mM NaCl) on antioxidant enzymes were investigated in ten cultivars of strawberry. The plants were irrigated every two days with Hoagland's solution. At the first plants were irrigated with half-strength Hoagland's solution. Irrigation treatment was such that about 20% water soluble was removed from the bottom of the pots, this 20% of nutrient solution that drained out from small holes in the bottom of the pots approved as a leaching. The pots were irrigated every two days with 300 ml Hoagland's solution. A thorough leaching done once-weekly by adding 300 ml pure water to the pots. The results showed that the salinity increased levels of antioxidant enzymes. The largest increase Catalase at concentration of 40 mM NaCl to 'Arumas' and 'Paros' while the lowest was observed in 60 mM to 'Queen Elisa' and 'Kam'. The largest increase in superoxide dismutase activity related to 'Arumas', 'Selva', 'Kurdistan' and 'Paros' at the concentration of 40 mM NaCl but the lowest was observed in 60 mM NaCl in 'Queen Elisa' and 'Kam'. Total peroxides activity increased under NaCl salinity and the degree of elevation in the activity was salt concentration dependent. At higher NaCl concentration, peroxides activity increased in 'Arumas' cultivar under salt stress. The lowest peroxides activity belongs to 60 mM NaCl in 'Missionary' and 'Queen Elisa'. Hence, it can be concluded that all antioxidant enzymes could not cope up with rising level of salinity. According to the results it was determined that in 60 mM NaCl concentration plants were destroyed at the early stages of growth and development. In addition, our results indicated that tolerance of cultivars to salinity stress were different. Three cultivars of strawberry their names were 'Arumas', 'Paros' and 'Kurdistan' were tolerant to salinity stress but 'Queen Elisa', 'Kam' and 'Missionary' were sensitive to salinity stress.

Key Words: Salinity Stress, Antioxidant Enzymes, Strawberry, Hoagland's solution