بررسی فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان و پرولین در ارقام ذرت (*Zea mays* L.) تحت تنش شوری

داور ملازم و علی بشیرزاده

آستارا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آستارا، گروه کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۱

چکیده

به منظور بررسی اثرات تنش شوری بر صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی آزمایشی با چهار رقم ذرت شامل S.C302، SC700، BC662، S.C704 و چهار سطح شوری ۰، ۵۰، ۱۰۰ و۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم خالص در سه تکرار به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی اجرا شد و شاخصهای ارتفاع بوته، قطر ساقه، کلروفیل a، کلروفیل b، میزان پرولین و فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز اندازه گیری گردید. شاخص کلروفیل a در غلظتهای مختلف کلرید سدیم اختلاف معنی داری نشان داد. در شاخص کلروفیل b بین شوریهای مختلف و ارقام و اثرات متقابل اختلاف معنی داری به دست نیامد. در بین سطوح مختلف شوری اختلاف معنی داری در فعالیت آنزیم کاتالاز دیده شد. بین ارقام مورد بررسی در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز اختلاف معنی داری دیده شد. بیشترین مقدار پرولین در شوری ۱۰۰ میلی مول در رقم SC302 به دست آمد. بیشترین مقدار کلروفیل a در گیاهچه های شاهد و در S.C704 به دست آمد. بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار شوری ۵۰ میلی مول و در SC700 به دست آمد. با افزایش شوری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافته و در تنش ۱۰۰ میلی مول نمک به حداکثر رسید. بیشترین مقدار آنزیم کاتالاز در رقم BC662 در ۱۰۰ میلی مول نمک به دست آمد که با ارقام SC302 و SC700 اختلاف معنی داری نداشت. بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۵۰ میلی مول در SC302 با ۳/۷۳ واحد به دست آمد. در بین ارقام SC302 و S.C704 نسبت به شوری خاک مقاومت بیشتری نشان دادند.

واژه های کلیدی: شوری، ذرت، پرولین، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۱۵۲۵۴۹۶ ، پست الکترونیکی: d.molazem@iau-astara.ac.ir

مقدمه

بنابر پیش بینی سازمان ملل جمعیت دنیا در سال ۲۰۵۰ به ۱۴/۴ میلیارد نفر خواهد رسید(۲۵). سرعت افزایش غذا متناسب با سرعت رشد جمعیت جهانی نبوده و سرعت تولید غذا نسبت به جمعیت کمتر است(۵). در کشاورزی به علت بهره برداری گسترده از آب و خاک مسئله شوری جدی‌تر شده است(۳و۹). بیش از ۳۰ درصد زمینهای زیر کشت و حدود ۳۰-۵۰ درصد زمینهای فاریاب جهان تحت تأثیر شوری قرار دارند(۳۱). این خاکها حدوداً یک میلیارد هکتار از سطح زمین را پوشانیده‌اند و ۷۵ میلیون هکتار از آن در جنوب غربی آسیا قرار دارد. ایران با ۲۷ میلیون هکتار اراضی شور در مقام اول کشورهای این ناحیه قرار دارد و پس از آن هند و پاکستان به ترتیب با ۲۳/۸ و ۱۰/۵ میلیون هکتار مقام دوم و سوم را دارند(۳۵). بر اساس نظر فلاورز و همکاران(۲۰) در حدود دو میلیون کیلومتر مربع از ۱۵ میلیون کیلومتر مربع زمینهای زراعی دنیا و در حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد از زمینهای آبی متأثر از شوری هستند. در

سال ۱۳۵۰، حدود ۵۰ درصد از کل اراضی تحت آبیاری ایران به درجات مختلفی با مشکل شوری و قلیایی بودن و ماندابی روبرو بوده است. پیش بینی می‌شود این میزان تا ۷۵ درصد از اراضی فاریاب کشور پیشروی کند (۲ و ۴).

پرولین به عنوان یک اسمولایت مهم در تعدیل فشار اسمزی سلول تحت تنشهایی مانند شوری خاک، خشکی، دمای پایین، کمبود مواد غذایی، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین و اسیدیته بالا نقش اساسی دارد. تولید زیاد پرولین با افزایش فشار اسمز داخل سلول از تأثیر اختلالات شوری در فرآیند طبیعی سلولی ممانعت به عمل می‌آورد. این افزایش سطح پرولین، حتی پس از حذف شرایط تنش تا مدتی حدود یک ماه باقی می‌ماند . نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی نسبت به شوری و خشکی توسط محققین در گیاهان مختلف مانند ذرت (۳۶) یونجه (۲۲) و آرابیدوپسیس(۲۶) گزارش شده است. بررسیها نشان می‌دهد، گیاهان هالوفیت به واسطه انتقال مناسب یونهای سمی مانند سدیم و کلر به درون فضای واکوئلی خود قادر به تحمل شرایط تنش می شوند(۲۰) و تنظیم اسمزی در سطح سیتوپلاسم نیز با تولید حل شونده‌های سازگار و تجمع آنها در سیتوپلاسم میسر می‌شود. از این مواد می‌توان به موادی ازجمله پرولین، بتائین(مانندگلیسین بتائین)، پلیاول ها(مانندمانیتول، سوربیتول، پینیتول)، ترهالوزها، فروکتان ها، دی متیل سولفونیوپرو- پیونات(DMSP) اشاره کرد(۲۳). این مواد حل شونده، علاوه بر نقش تنظیم اسمزی، نقش محافظتی نسبت به آنزیمها و حذف رادیکالهای آزاد یا محافظت از تنش اکسیداتیو را نیز ایفاء می‌کنند. تنش اکسیداتیو توسط دامنه وسیعی از فاکتورهای محیطی از جمله شوری خاک، آلودگی هوا، حمله پاتوژنها، فعالیت علف کشها، تشعشعات، اُزن، نوسانات دمایی و کمبود اکسیژن تحریک می‌شود(۱۷، ۲۹، ۳۸). برای ممانعت از اکسیداسیون اجزای سلولی، نگهداری دائمی سلولها در سطوح پایین ROS به وسیله مکانیسمهای متنوعی از آنتی اکسیدانهای آنزیمی و غیر آنزیمی ضروری است(۱۲،۲۸) قسمت عمده خنثی سازی مقادیر بالای ROS، در گیاهان به وسیله یک سیستم حفاظتی از آنزیمهایی همچون، سوپر اکسید دیسموتاز(SOD)، اسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) صورت می‌پذیرد(۱۲).

سلومون و همکاران(۳۹) ضخیم شدن و خم شدن ریشه‌ها و کاهش قطر یقه ریشه‌ها در گیاهچه نخود و کاهش در لوله‌های آوندی را به سبب جلوگیری از فعالیت مریستمی در اثر شوری دانستند. فرح بخش و شمس‌الدین سعید(۷) در مطالعه اثر تنش شوری بر رشد و عملکرد دو رقم ذرت، نشان دادند که اکثر صفات از جمله، ارتفاع ساقه، تعداد برگ، وزن خشک و میزان کلروفیل تحت تأثیر شوری اختلاف معنی داری دارند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تعداد ردیف در بلال، تعداد دانه در ردیف، تعداد کل دانه در بلال و وزن هزار دانه نیز نشان داد که غلظتهای مختلف نمک صفات مذکور را به طور بسیار معنی داری تحت تأثیر قرار دادند.

هافمن و همکاران(۲۴) پایداری تحمل ذرت به شوری را در ایالت کالیفرنیای امریکا بررسی نمودند و گزارش کردند که میانگین شوری محلول خاک در محدوده ریشه در طول فصل رشد تا ۳/۷ دسی زیمنس بر متر باعث کاهش عملکرد نشد، ولی به ازای هر واحد افزایش بیشتر شوری عملکرد دانه به میزان ۱۴ درصد کاهش یافت. این کاهش ناشی از تراکم بوته و جرم دانه بود.

جمالی و همکاران(۱) در بررسی تنش شوری آب و خاک بر رشد ذرت سینگل کراس ۷۰۴ نشان دادند که ذرت در مرحله جوانه زنی نسبت به آب آبیاری باEC های متفاوت ۱ تا ۱۰ مقاوم است. در آزمایش گلدانی مشخص شد که پس از ۱۰ روز تقریباً کلیه بذور در شوریهای مختلف سبز شدند؛ بنابراین شوری آب نمی‌تواند در این مرحله از رشد گیاه تأثیر سوئی داشته باشد و در شرایطی که در دورانهای اولیه کاشت محدودیت آب آبیاری جدی باشد، امکان استفاده از آبهای با شوری بالا میسر است. جداول تجزیه

واریانس نشان داد که بین وزن خشک، ارتفاع بوته و طول برگ تیمارهای مختلف شوری اختلاف معنی داری وجود دارد.

با توجه به نیاز کشور برای تولید ذرت دانه ای و افزایش روزافزون خاکهای شور مطالعه مقاومت واریته های مختلف لازم می باشد. از اهداف این تحقیق اندازه گیری خصوصیات مهم فیزیولوژیکی تحمل در برابر شوری از جمله فعالیت پرولین و آنزیمهای آنتی اکسیدان و مقایسه آنها در ارقام مختلف ذرت جهت شناسایی ارقام مقاوم و استفاده از آنها در برنامه های اصلاحی بوده است.

مواد و روشها

آزمایش در سال زراعی ۸۹ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل اجرا گردید. به منظور بررسی کلیه عوامل آزمون تجزیه خاک انجام گرفت، تا عوامل محدود کننده رشد در داخل گلدان به خوبی شناسایی شده و به خصوص در مورد EC هیچ گونه محدودیت اولیه وجود نداشته باشد. چهار رقم ذرت شامل S.C302، SC700 ، Bc662، S.C704 و سطوح شوری صفر(شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم خالص در سه تکرار به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در گلدان کاشته شده و اعمال شوری بعد از آزمایش کلی خاک به منظور بررسی عوامل محدود کننده رشد، درصد عصاره اشباع آن تعیین شده و از طریق نرم افزار Saltcalc میزان نمک مورد نیاز برای رسیدن به شوریها مورد محاسبه و در تیمارهای مربوطه همزمان با کاشت اعمال شد. برای انجام آزمایش از گلدانهای پلاستیکی با ابعاد ۳۵×۲۵ استفاده شده و به نسبت ۱: ۲: ۲: ۳ به ترتیب با خاک برگ، ماسه بادی، کود دامی پوسیده و خاک زراعی پر شد. برای ممانعت از کاهش غلظت نمک، گلدانها در ظرف دیگری قرار داده شد تا نمک خارج شده دوباره با آبیاری به داخل گلدان برگردانده شود و غلظت نمک در طول آزمایش ثابت بماند. تمامی کولتیوارها در غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک خالص از بین رفتند. در مدت آزمایش صفات ارتفاع بوته و قطر ساقه یادداشت شد. اندازه گیری کلروفیل a وb، یک هفته قبل از رسیدگی کامل در آزمایشگاه بر اساس متد اشرف و همکاران (۱۳) و آرنون (۱۰) انجام گردید. میزان جذب نوری آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر قرائت شد و غلظت کلروفیل بر اساس روابط موجود تعیین شد.

میلی گرم کلروفیل a در هر گرم وزن‌تر: ۰/۵×[(جذب ۶۴۵) ×۲/۶۹ – (جذب در ۶۶۳) ×۱۲/۷]

میلی گرم کلروفیلb در هر گرم وزن‌تر: ۰/۵×[(جذب ۶۶۳) ×۴/۶۹ – (جذب در ۶۴۵) ×۲۲/۹]

برای اندازه گیری پرولین از روش باتس و همکاران (۱۶) استفاده شد. ۰/۵ گرم ماده‌تر برگ را با هاون له کرده و درون یک تیوب ریخته و ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد به آن اضافه کرده و نمونه را درون یخ قرار داده شد. تیوب را در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ نموده تا مواد اضافی از محلول جدا شود. دو میلی لیتر آن را برداشته و روی آن ۲ میلی لیتر اسید نینهیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک خالص اضافه شد و پس از قرار دادن در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه به مدت یک ساعت به آب یخ منتقل شد. ۴ میلی لیتر تولوئن به آن اضافه شده و پس از ۲۰ ثانیه تکان شدید جذب بخش رنگی بالایی در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد.

برای استخراج و اندازه گیری فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان، بافت برگ داخل هاون حاوی ازت مایع پودر گردیده و سپس استخراج آنزیمی به روش سایرام و همکاران (۳۷) انجام گردید. برای استخراج آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ۰/۵ گرم پودر در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار سرد (pH=۷/۵) حاوی ۰/۵ میلی مول EDTA به هم زده شد. برای استخراج

اسکوربات پراکسیداز ۰/۵ گرم پودر در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار سرد (pH=۷) حاوی ۰/۵ میلی مول اسید اسکوربیک به هم زده شد. مخلوط فوق با استفاده از پارچه نرم فیلتر گردیده و محلول صاف شده و به ظروف میکروتیوب مخصوص سانتریفیوژ یخچال دار منتقل گردید (تمام مراحل فوق در داخل یخچال انجام شد). محلول مورد نظر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با قدرت ۲۰۰۰۰×g سانتریفیوژ گردید. قسمت مایع شفاف (سوپر ناتانت) برای ارزیابی فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به روش جیانوپولوتیس و رایز (۲۱)، اندازه گیری شد. ۳ میلی لیتر محلول واکنش شامل ۱۳ میلی مول متیونین، ۷۵ میکرو مول نیتروبلو تترازولیوم کلراید (NBT)، ۲ میکرو مول ریبوفلاوین، ۵۰ میلی مول بافر فسفات (pH=۷/۸) و ۰ تا ۵۰ میکرو لیتر آنزیم استخراجی بود. واکنش با روشن کردن لامپ فلورسنت شروع گردید. محلول واکنش به مدت ۱۰ دقیقه زیر دو لامپ فلورسنت ۱۵ وات با ارتفاع ۲۰ سانتیمتر با شدت نور ۱۰۰۰ لوکس قرار داده شد و با خاموش کردن لامپها واکنش خاتمه یافت. سپس محلول واکنش تا اندازه گیری جذب، توسط پارچه سیاه پوشانده شد. جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با اسپکترو فتومتر SHIMADZU مدل-2۰UV-120 ساخت ژاپن اندازه گیری شد. به یکی از ظروف آنزیمی اضافه نگردید و در نتیجه حداکثر رنگ ایجاد گردید. یکی از ظروف نیز تحت تابش نور قرار نگرفته و هیچ رنگی ایجاد نشده و به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. یک واحد فعالیت SOD به عنوان مقدار آنزیم لازم برای ۵۰ درصد ممانعت از احیاء فتو شیمیایی نیترو بلو تترازولیوم کلراید در نظر گرفته شد و با روش آسادا و همکاران (۱۱) محاسبه شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش چانس و مهلی (۱۸) اندازه گیری شد. ۳ میلی لیتر محلول واکنش کاتالاز شامل ۱۵ میلی مول H_2O_2، ۵۰ میلی مول بافر فسفات (pH= ۷) و ۱۰۰ میکرو لیتر آنزیم استخراجی بود. واکنش با افزودن آنزیم شروع گردید و کاهش جذب H_2O_2 در طی ۱ دقیقه در ۲۴۰ نانو متر ثبت گردید. یک واحد کاتالاز به عنوان مقدار آنزیم لازم برای اکسید کردن ۱ میلی مول H_2O_2 در دقیقه در نظر گرفته شد.

آنزیم اسکوربات پراکسیداز طبق روش ناکانو و آسادا (۳۴) اندازه گیری گردید. ۳ میلی لیتر محلول واکنش اسکوربات پراکسیداز شامل ۵۰ میلی مول بافر فسفات (۷ =pH)، ۰/۵ میلی مول اسید اسکوربیک اسید، ۰/۱ میلی مول H_2O_2 و ۱۰۰ میکرو لیتر آنزیم استخراجی بود. فعالیت APX با کاهش جذب اسید اسکوربیک طی ۱ دقیقه در ۲۹۰ نانو متر محاسبه شد. ۱ واحد فعالیتAPX به عنوان مقدار آنزیم لازم برای اکسید کردن ۱ میلی مول اسید اسکوربیک در هر دقیقه در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیمها به صورت فعالیت ویژه (میلی گرم وزن تازه برگ/ واحد آنزیم) بیان شد.

کلیه محاسبات در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم افزارهای MSTATC وSPSS انجام شد. بعد از نرمال نمودن دادهها تجزیه واریانس برای صفات اندازه گیری شده به صورت مجزا صورت گرفته و ضریب تغییرات نیز محاسبه شد. در صورت زیاد بودن این ضریب اقدام به تبدیل داده شده و مقایسات میانگین تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

بین ارقام و اثرات متقابل شوری در رقم اختلاف معنی داری دیده نشد. برای صفات ارتفاع بوته و قطر ساقه اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد بین مقادیر مختلف شوری دیده شد(جدول ۱). بالاترین مقدار هر یک از صفات رویشی در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار

تنش شدید مشاهده شد. بین ارقام اختلاف معنی داری دیده نشد و اثرات متقابل بین رقم و شوری نیز اختلاف معنی داری نداشتند. بین دزهای مختلف شوری در صفت کلروفیل a اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد دیده شد. بین ارقام اختلاف معنی داری دیده نشد. در صفت کلروفیل b در بین شوریهای مختلف و بین ارقام و اثرات متقابل اختلاف معنی داری به دست نیامد. ارقام از نظر صفت سوپراکسید دیسموتاز اختلاف معنی داری نداشتند و سطوح مختلف شوری از نظر این صفت معنی دار نبود. آزوز و همکاران(۱۵) در بررسی فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان در سه رقم ذرت نشان دادند که در بین شاهد(بدون شوری) با غلظتهای شوری، اختلاف معنی داری در دیده می‌شود ولی بین سطوح شوری ۵۰، ۱۰۰،۱۵۰ و ۲۰۰ اختلاف معنی داری دیده نشد. غلظت‌های بالای شوری باعث از بین رفتن گیاه شده بود. مطالعات کوکا و همکاران (۲۷) و آتار و همکاران (۱۴) نشان دادند که میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در کولتیوارهای مقاوم به شوری به شدت افزایش می‌یابد. از نظر صفت فیزیولوژیکی آنزیم کاتالاز در بین سطوح مختلف شوری اختلاف معنی داری دیده شد. بین ارقام مورد بررسی از نظر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز اختلاف معنی داری دیده شد ولی پرولین در بین همه ارقام اختلاف معنی داری نشان نداد. چون تمامی ارقام در ۱۵۰ میلی مول از بین رفتند و برخی از ارقام در دز ۱۰۰ میلی مول نیز از بین رفتند بنابراین میانگین کاهش یافته و احتمال معنی دار بودن صفت کاهش یافت لذا از روش مقایسه میانگین دانکن برای پوشش این خطا استفاده گردید.

جدول۱- تجزیه واریانس(میانگین مربعات) صفات مختلف برای کولتیوارهای ذرت

منبع تغییر S.O.V	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات مورد مطالعه							
		کلروفیل A	کلروفیل B	ارتفاع بوته	قطر ساقه	کاتالاز	اسکوربات پراکسیداز	پرولین	سوپراکسید دیسموتاز
تکرار	۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۷	۰/۵۴۹	۰/۰۰۹	۰/۰۵۳	۰/۰۰۰۱	۱۵/۰۶۶	۰/۰۷۰
شوری	۲	۰/۰۱۹**	۰/۰۰۷ns	۶۵ /۰۸۹**	۲/۵۴۶ **	۰/۷۵۸**	۰/۰۳۱ns	۲۲/۱۶۰ns	۰/۰۰۲ns
ارقام	۳	۰/۰۰۳ns	۰/۰۰۱ns	۱/۹۴۰ns	۰/۳۹۱ns	۰/۲۵۰ns	۰/۰۵۸**	۱۶/۵۲۳ns	۰/۰۴۷ns
شوری × رقم	۶	۰/۰۰۲ns	۰/۰۰۲ns	۱/۰۹۶ ns	۰/۴۳۰ns	۰/۰۹۵ns	۰/۰۰۸ns	۲۷/۹۵۹ns	۰/۰۰۲ns
اشتباه آزمایشی	۲۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۲/۱۸۵	۰/۴۹۰	۰/۱۲۶	۰/۰۱۳	۲۹/۸۱۴	۰/۰۲۹
ضریب تغییرات٪		۰/۸۵	۱/۲۶	۱۴/۹۵	۱۱/۹۴	۷/۴۳	۲/۴۲	۲۹/۲۶	۳/۷۰

ns، *، ** به ترتیب به مفهوم غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ می‌باشد.

با افزایش نمک در خاک ارتفاع بوته به طور معنی داری کاهش پیدا نمود و کمترین مقدار ارتفاع بوته در شوری سوم با ۳۷/۰۸ سانتیمتر به دست آمد که با تمامی دزها اختلاف معنی داری داشت. بین ارقام از نظر قطر ساقه بین مقدار نمک صفر و ۵۰ میلی مول اختلاف معنی داری دیده نشد اما قطر ساقه کاهش یافته بود. سطح سوم نمک در خاک اختلاف معنی داری با دیگر سطحهای نمک در خاک نشان داد و کمترین مقدار قطر ساقه در این مقدار به دست آمد(جدول ۲). مقدار کلروفیل a با افزایش شوری خاک کاهش معنی داری نسبت به شاهد نشان داد. بین شوری ۵۰ با ۱۰۰ اختلاف معنی داری دیده نشد، اما کمترین مقدار کلروفیل a در شوری ۱۰۰ میلی مول با ۰/۳۸۵۰ میلی گرم کلروفیل در هر گرم وزن‌تر برگ به دست آمد. با افزایش شوری به ۵۰ میلی مول مقدار کلروفیل b افزایش نشان

داده ولی با افزایش غلظت به ۱۰۰ میلی مول کاهش دیده شد. تیونا و همکاران(۴۰) در بررسی اثر اسید جیبرلیک و شوری بر روی آنتی اکسیدانها و پارامترهای رشدی گیاه ذرت نشان دادند که با افزایش غلظت شوری کاهش معنی داری در صفات وزن خشک، مقدار کلروفیل و محتوای نسبی آب برگ دیده شد. این در حالی بود که میزان تجمع پرولین در برگها، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز افزایش پیدا نمود.

جدول ۲ – مقایسه میانگین اثر متقابل ارقام در غلظتهای مختلف شوری در صفات مورد مطالعه ذرت

شوری × واریته		ارتفاع بوته (cm)		قطرساقه (mm)		کلروفیل a mg/gfw		کلروفیل b mg/gfw	
0mM	S.C704	۱۲۶/۷	a	۲۲/۱۰	a	۱/۲۷۰	a	۰/۴۸۳۳	a
0mM	SC700	۱۲۲/۷	a	۲۲/۰۷	a	۰/۹۲۳۳	ab	۰/۳۹۳۳	a
0mM	SC302	۱۰۰/۷	ab	۲۲/۳۰	a	۰/۹۷۶۷	ab	۰/۲۱۰۰	a
0mM	BC666	۱۲۳/۷	a	۲۴/۷۳	a	۱/۱۸۳	a	۰/۷۵۶۷	a
50mM	S.C704	۹۸/۰۰	ab	۲۴/۱۷	a	۰/۳۲۳۳	c	۰/۹۹۶۷	a
50mM	SC700	۹۱/۳۳	ab	۲۲/۱۰	a	۰/۴۴۳۳	bc	۰/۳۹۶۷	a
50mM	SC302	۸۲/۳۳	abc	۲۰/۷۰	a	۰/۴۶۰۰	bc	۰/۶۶۰۰	a
50mM	BC662	۱۰۳/۰	ab	۲۳/۲۰	a	۱/۱۲۰	a	۰/۵۶۳۳	a
100mM	S.C704	۲۳/۶۷	d	۷/۰۶۷	b	۰/۱۷۳۳	c	۰/۳۶۶۷	a
100mM	SC700	۵۰/۳۳	bcd	۲۱/۷۳	a	۰/۴۶۶۷	bc	۰/۳۰۶۷	a
100mM	SC302	۳۰/۰۰	d	۱۲/۱۷	ab	۰/۳۳۶۷	c	۰/۲۰۰۰	a
100mM	BC662	۴۴/۳۳	cd	۱۷/۳۷	ab	۰/۵۶۳۳	bc	۰/۳۵۰۰	a

حروف غیر مشابه نشانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ است

ادامه جدول ۲ – مقایسه میانگین اثر متقابل ارقام در غلظتهای مختلف شوری در صفات مورد مطالعه ذرت

شوری × واریته		سوپراکسید دیسموتاز Unit/ming fw		پرولین µmol/gFw		اسکوربات پراکسیداز Unit/ming fw		کاتالاز Unit/ming fw	
0mM	S.C704	۰/۵۴۰۰	a	۳۳۹/۹	ab	۱/۰۴۱	bc	۰/۳۵۶۷	c
0mM	SC700	۱/۴۰۳	a	۲۳۷/۳	ab	۱/۱۱۱	bc	۰/۳۵۳۳	c
0mM	SC302	۲/۰۱۰	a	۲۳۶/۴	ab	۳/۰۳۷	ab	۰/۷۱۰۰	bc
0mM	BC666	۰/۳۳۳۳	a	۲۶۸/۱	ab	۱/۵۱۰	bc	۱/۲۲۷	bc
50mM	S.C704	۰/۶۲۰۰	a	۳۶۳/۸	ab	۲/۲۲۷	abc	۱/۷۰۷	abc
50mM	SC700	۲/۰۵۷	a	۳۲۵/۶	ab	۱/۴۸۰	bc	۰/۷۱۰۰	bc
50mM	SC302	۱/۹۳۰	a	۴۷۱/۸	ab	۳/۷۳۰	a	۲/۴۹۳	abc
50mM	BC666	۰/۵۵۰۰	a	۳۰۴/۴	ab	۱/۷۲۵	abc	۵/۳۳۷	abc
100mM	S.C704	۰/۷۳۶۷	a	۱۶۱/۱	b	۰/۷۷۹۳	c	۰/۹۲۶۷	bc
100mM	SC700	۱/۵۵۷	a	۳۹۷/۳	ab	۱/۶۴۷	bc	۵/۹۰۷	abc
100mM	SC302	۱/۵۴۷	a	۵۳۷/۰	a	۱/۹۹۸	abc	۷/۵۴۰	ab
100mM	BC666	۰/۶۳۶۷	a	۳۱۲/۶	ab	۱/۰۰۲	bc	۸/۳۹۷	a

حروف غیر مشابه نشانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ است

شوری خاک باعث افزایش مقدار سوپراکسید دیسموتاز گردید گرچه اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده نشد. مورات و همکاران (۳۳) در مطالعه رقم ذرت Rx ۴۷ در ۴ سطح شوری ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مول به همراه یک سطح شوری شاهد بدون نمک، دریافتند که با افزایش سطح شوری خاک، وزن خشک گیاه به غیر از سطح شاهد و ۲۵ میلی مول در بقیه سطوح کاهش معنی داری نشان می‌دهد. آنزیم کاتالاز با افزایش شوری خاک شدیداً افزایش یافت و در شوری ۱۰۰ میلی مول بیشترین مقدار آنزیم کاتالاز با ۵/۶۹۳ واحد بر دقیقه گرم وزن‌تر برگ اندازه گیری شد. البته بین شاهد و شوری ۵۰ میلی مول نمک از نظر این صفت اختلاف معنی داری دیده نشد. مقدار آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش شوری به ۵۰ میلی مول افزایش یافت اما اختلاف معنی داری در بین آنها دیده نشد. مقدار پرولین برگ با افزایش شوری افزایش یافت و در شوری ۵۰ میلی مول بیشترین مقدار پرولین با ۳۶۶/۴ میکرو مول بر گرم وزن‌تر برگ به دست آمد(جدول ۲). میرزایی و همکاران (۸)در بررسی اثر تنش خشکی بر میزان پرولین و قندهای محلول گیاهچه های کلزا (*Brassica napus*) نشان دادند که، تنش خشکی سبب افزایش غلظت پرولین در دو رقم کلزا شد. منصور و همکاران(۳۲) در مطالعه دو واریته ذرت تری هیبرید ۳۲۱ و گیزا ۲، در سه سطح شوری صفر،۷۵ و ۱۵۰ میلی مول نشان دادند که با افزایش سطح شوری در هر دو رقم مقدار پرولین در برگ گیاهان افزایش پیدا کرد. چائوم و کیردمن (۱۹) در بررسی دو کولتیوار ذرت ساکاراتا و سراتینا در ۴ سطح غلظت شوری شامل ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و۴۰۰ میلی مول به همراه یک سطح شاهد، نشان دادند که بین کولتیوارها در اکثر صفات اختلاف معنی داری دیده نشد ولی بین غلظتهای مختلف نمک در تمامی صفات اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد دیده شد. در این آزمایش با افزایش شدت شوری مقدار کلروفیل a کاهش معنی داری نشان داد. مقدار کلروفیل b نیز با افزایش شدت شوری اختلاف معنی داری نشان داد، گرچه بین سطوح شوری اختلاف معنی داری دیده نشد. مقدار کلروفیل کل با افزایش میزان شوری اختلاف معنی داری در هر دو واریته نشان داد. با افزایش سطوح شوری مقدار پرولین به شدت افزایش یافت و بیشترین مقدار پرولین در سطوح شوری بالا به دست آمد. علیزاده و همکاران (۶) در بررسی تأثیر سازگارکننده های معدنی و آلی مهم در تحمل به شوری گیاه هالوفیت آلوروپوس لگوپویدیس نشان دادند که در اندامهای هوایی محتوای پرولین با افزایش غلظت سدیم کلراید محیط به تدریج افزایش یافته و در ۹۰۰ میلی مولار به بالاترین مقدار خود می رسد. لونت و همکاران(۳۰) در بررسی اثر اسید جیبرلیک و تنش نمک بر روی فعالیت برخی از آنزیمهای آنتی اکسیدان و شاخصهای رشدی در گیاه ذرت نشان دادند که تنش نمک باعث کاهش وزن خشک، مقدار کلروفیل و مقدار آب نسبی برگ شده ولی باعث افزایش تجمع پرولین، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز می‌شود.

مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در ارقام نشان داد که اکثر ارقام اختلافات معنی داری با همدیگر نداشتند (جدول ۲). مقایسه میانگین صفت کلروفیل a با آزمون دانکن یک اختلاف معنی دار بین تیمارBc662 با سایر ارقام نشان داد. بیشترین مقدار کلروفیل a در Bc662 با ۰/۹۵۵۶ میلی گرم کلروفیل در هر گرم وزن‌تر برگ دیده شد. از نظر صفت کلروفیل b بین ارقام مورد بررسی اختلاف معنی داری دیده نشد اما بیشترین و کمترین مقدار کلروفیل b به ترتیب در Bc662 وSc302 به دست آمد. از نظر آنزیم کاتالاز اختلاف معنی داری بین ارقام مورد بررسی دیده شد. بیشترین آنزیم کاتالاز در Bc662 با ۴/۹۸۷ واحد بر دقیقه گرم وزن‌تر برگ دیده شد که با ارقام SC302 و SC700 اختلاف معنی داری نداشت. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اختلاف معنی داری بین ارقام نشان نداد. ولی بیشترین مقدار آنزیم درSC302 دیده شد. آنزیم اسکوربات پراکسیداز اختلاف معنی داری نشان داد و بیشترین مقدار این آنزیم در

SC302 با ۲/۹۲۱ واحد بر دقیقه گرم وزن‌تر برگ به دست آمد که با بقیه اختلاف معنی داری داشت. بیشترین مقدار پرولین در SC302 با ۴۱۵/۱ میکرو مول بر گرم وزن‌تر برگ به دست آمد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش تنش شوری عموماً در تمامی ارقام افزایش پیدا کرد. بیشترین آنزیم در تنش شوری ۵۰ میلی مول و در SC700 به دست آمد. کمترین آنزیم در شرایط نرمال و در BC662 دیده شد. با افزایش شوری میزان آنزیم کاتالاز افزایش یافته و در تنش ۱۰۰ میلی مول نمک به حداکثر رسید. بیشترین مقدار آنزیم کاتالاز اندازه گیری شده درBC662 در ۱۰۰ میلی مول نمک بود که با SC302 و SC700 اختلاف معنی داری نداشت. کمترین مقدار آنزیم کاتالاز در شرایط شاهد و در S.C704 وSC700 به ترتیب با ۰/۳۵۶۷ و ۰/۳۵۳۳ واحد بر دقیقه گرم وزن‌تر برگ به دست آمد. از نظر آنزیم آسکوربات پراکسیداز، بیشترین مقدار این آنزیم در غلظت شوری ۵۰ میلی مول در SC302 با ۳/۷۳ واحد بر دقیقه گرم وزن‌تر برگ به دست آمد. کمترین مقدار این آنزیم در شوری سوم و در S.C704 به دست آمد. بیشترین مقدار پرولین در شوری ۱۰۰ میلی مول در SC302 با ۵۳۷ میکرو مول بر گرم وزن‌تر برگ به دست آمد.

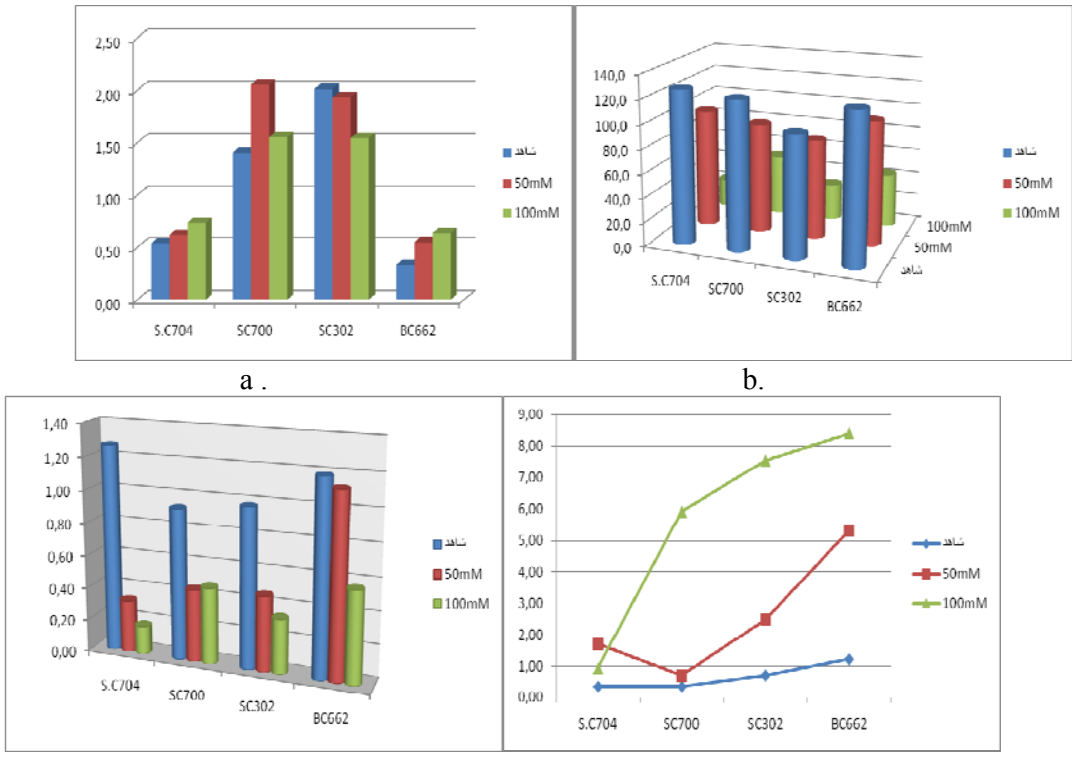
نتیجه گیری کلی

جدول تجزیه واریانس اختلافات معنی دار زیادی بین ارقام و غلظتهای مختلف کلرید سدیم نشان داد.

رقم BC662 از نظر کلروفیل برگ و فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شوری مقاومت بیشتری نشان داد.

رقم SC302 فعالیت آسکوربات پراکسیدازی و پرولین بالاتری نسبت به بقیه ارقام داشت.

با توجه به نتایج آزمایش برای توصیه، تکرار آزمایش ضروری می باشد.



نمودار-۱ فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (a)، ارتفاع بوته (b)، آنزیم کاتالاز (c) و کلروفیل a (d) و در شوریهای مختلف

منابع

۱-جمالی، م؛ ناظم السادات، س. م. ج و م، ابراهیمی. ۱۳۸۳. بررسی تنش شوری آب و خاک بر رشد ذرت. هشتمین کنگره علوم زراعت واصلاح نباتات ایران.دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان.ص ۲۳۰.

۲–حاجی زاده متقی، م. ۱۳۷۸. دستکاری ژنتیکی جهت افزایش تحمل به شوری. مجله علوم کشاورزی ایران. شماره ۲۶.ص ۵۷–۶۴.

۳–حق نیا، غ. ۱۳۷۱. راهنمای تحمل گیاهان نسبت به شوری. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۴–خورشیدی بنام، م، ب. ۱۳۶۸.اثرشوری برجوانه زنی بذور گیاهان مهم زراعی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تبریز.

۵– شکاری، ف. ۱۳۷۲. مقاومت به شوری در مرحله رشد رویشی تعدادی از گیاهان زراعی و مرتعی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

۶– علیزاده، ز؛ رضوی، خ؛ ملبوبی، م،ع؛ قناتی، ف؛ کاشانی نیا، ع و و، هدایتی . ۱۳۹۱. بررسی تاثیر سازگارکننده های معدنی و آلی مهم در تحمل به شوری گیاه هالوفیت آلوروپوس لگوپویدیس. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۵، شماره ۳، ص۳۲۹–۳۳۹

۷– فرح بخش، و، م، شمس الدین سعید. ۱۳۸۵. اثر تنش شوری بر عملکرد و برخی خصوصیات زراعی و فیزیولوژیک دو رقم ذرت در منطقه کرمان. خلاصه مقالات نهمین کنگره زراعت واصلاح نباتات ایران. دانشگاه تهران. پردیس ابوریحان ص ,۳۰۲

۸– میرزایی، م؛ معینی، ا و ف، قناتی. ۱۳۹۲. اثر تنش خشکی بر میزان پرولین و قندهای محلول گیاهچه های کلزا (*Brassica napus*). مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۶، شماره ۱.ص ۹۰–۹۸

۹– میرمحمدی میبدی، س،ع و ب، قره یاضی.۱۳۸۱. جنبه‌های فیزیولوژیک و بهنژادی تنش شوری درگیاهان. چاپ اول. دانشگاه صنعتی اصفهان.

10-Arnon. D. I.1975.copper enzymes in isolated chloroplasts;polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*.Plant Physiol.24:1-15.

11- Asada, K., Takahashi, M. and Nagate, M. 1974b. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. Agr. Biol. Chem. 38: 471-473.

12-Asada, K., and Takahashi, M. 1987. Topics in Photosynthesis.Vol. 9, Photoinhibition. In: D.J. Kyle, C.B. Osmond and C.J. Arntzen, Editors, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands , pp. 227–287.

13-Ashraf. M. Y.,Azmi,A. R. khan,A. H.,and Ala,S. A.1994. Effect of water stress on total phenols,peroxides activity and chlorophyll content in wheat.Acta Physiology plant.16(3):1-18

14-Athar, H., A. Khan and M. Ashraf, 2008. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environ. Exp. Bot*., 63: 224–231

15-Azooz, M.M., Ismail, A.M. and M.F. Abou Elhamd.2009. Growth, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities as a Selection Criterion for the Salt Tolerance of Maize Cultivars. International journal of agriculture & biology. 11–1–21–26.

16-Bates, L.1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205- 207.

17-Bowler C, Van Montagu M, Inze D .1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43:83-116

18-Chance B, Maehly C .1955. Assay of catalase and peroxidases. Methods Enzymol 11:764–775

19-Cha-um, S. and C. Kirdmanee. 2009. Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars. *Pak. J. Bot*., 41: 87-98.

20-Flowers, T.J., Hajibagheri M.A. and Clipson N.J.W.1986.Halophytes. Quart.Rev.Biol. 61:313-337.

21-Giannopolities, C. N. and S. K. Ries. 1977. Superoxide dismutase. I.Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59: 309–314.

22-Ginzberg, I., H. Stein and Y. Kapuling. 1998. Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ1- pyrroline- carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. Plant Mol. Biol. 38: 755-764.

23-Greenway, H. and Munnus R.1980.Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes.Ann.Rev.Plant Physiol.,31:141-190.

24-Hoffman, G. J. E. V.Mass, T.L. Prichard and J. L. Meyer. 1983. Salt tolerance of corn in the Sacramento-San Joaquin Delta of California. Irrig. Sci. 4:31-44.

25-karamanos, A. J., and A. Y. Paoatheohari. 1999. Assessment of drought resistance of crop genotypes by means of the water potential index. Crop Sci.39:1792-1797.

26-Kiyosue,T., Y.Yoshiba, K.Yamaguchi- Shinozald and K. Shinozaki. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. Plant Cell. 8: 1323-1335.

27-Koca, H., M. Bor, F. Özdemir and İ. Türkan. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ. Exp. Bot*., 60: 344-351.

28-Larson, R.A.1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry 27: 969-978

29-Lee, E.H and Bennett, J.H .1982.Superoxide dismutase. A possible protective enzyme against ozone injury in snap beans (*Phadeolus vulgaris* L.) Plant Physiology 69: 1444-1449

30-Levent,T.,C.Kaya ,M. Dikilitas and D. Higgs. 2007.The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities,plant growth parameters and nutritional status in maize plants. Environmental and Experimental Botany 62 (2008) 1–9

31-Mac Gregor, A. W .and R. S . Bhatty.1993. Barley chemistry and technology. A. A.C. C. Inc:4-6.

32- Mansour1 M. M. F,. K. H. A. Salama1, F. Z. M. Ali1, A. F. Abou Hadid.2005. Cell and plant responses to nacl in zea mays l. Cultivars differing in salt tolerance.gen. Appl. Plant physiology, 2005, 31(1-2), 29-41

33-Murat Ali Turan, Abdelkarim Hassan Awad Elkarim, Nilgün Taban and Suleyman Taban. 2010. Effect of salt stress on growth and ion distribution and accumulation in shoot and root of maize plant. African Journal of Agricultural Research Vol. 5(7), pp. 584-588, 4 April, 2010

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

35- Ozturk,M., Ozdemir F.,Eser B., Adiyahsi O.I. and Ilbi H.1995.Studies on the salt-hormune interactions in the germination and seedling growth of some vegetable species. In: Khan, M. A., and Ungar, I. A. (Eds.).Biology of salt tolerant plants.University of Karachi.Pakistan.59-64.

36-Rayapati, P.J. and C.R. Stewart. 1991. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize(Zea mays L.) mitochonderia. Plant Physiol. 95: 787-791.

37- Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC.1998. Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. Biologia Plantarum 41: 387-394

38-Scandalios JG .1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiology 101: 7-12

39-Solomon, M.,E.Gedulovich., A.M.Mayer,and Poljakoff Mayber. 1986.Changes induced by salinity to the anatomy and morphology of excised pea roots in culture.Ann.Bot.57:811-818.

40-Tuna,A.Levent Kaya, Cengiz Dikilitas, and David Murat Higgs. 2008. The combined effects of gibberellic acid and *salinity* on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants.Environmental & Experimental Botany; Jan2008, Vol. 62 Issue 1, p1-9, 9p

Investigation of the Antioxidant Enzymes and Proline in Varieties of Maize (*Zea mays* L.) Under Salinity Stress

Molazem D. and Bashirzadeh A.

Agriculture Dept., Astara Branch, Islamic Azad University, Astara, I.R. of Iran

Abstract

Investigate the effects of salt stress on some physiological and morphological traits in four varieties and four salinity levels, including SC302, SC700, BC662, SC704 and Zero (control), 50, 100 and 150 mM NaCl in three replicates for the factorial experiment in randomized complete block design was carried out. During the experiment, several traits including plant height, Stem diameter, chlorophyll a, chlorophyll b, proline and antioxidant enzymes were measured. Between the different salinity in the chlorophyll a was seen significant difference. In The chlorophyll b, among different salinities, genotypes and interactions between them no significant difference was found. Between different levels of salinity, a significant difference was seen in catalase. Between genotypes of the enzyme ascorbate peroxidase significant difference was seen. Highest proline was determined in 100 mM NaCl, in SC302 with 537 micro mol. The most plant height was obtained at zero salinity in S.C704 and B.C662. There was no significant difference between them. Maximum chlorophyll a in normal conditions was found in S.C704 with 1.27 mg of chlorophyll per gram fresh weight of leaves. The highest superoxide dismutase, were obtained in 50 mM NaCl in SC700. With increasing salinity, the amount of catalase increased and at 100 mM salt stress reached a maximum. Maximum catalase was measured in 100 mM salt in BC662, which with SC302 and SC700 was not significantly different. Of the enzyme ascorbate peroxidase, the enzyme in the greatest amount of salt concentration in 50 mmol in Sc302 with 3.73 was obtained.

Key words: Salinity, Maize, Proline, catalase, superoxide dismutase