نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد نهم، شماره ۱(۳۳)، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۱۶۶-۱۵۳

تغییرات میزان رنگدانه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش شوری

سجاد محرم‌نژاد[۱*] و مصطفی ولیزاده[۲]

چکیده

به‌منظور بررسی اثر تنش شوری ناشی از NaCl بر وزن تر، میزان رنگدانه و فعالیت ایزوزیم‌های آنتی اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) در ۹ ژنوتیپ لوبیا چیتی در مقایسه با شرایط بدون تنش، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در شرایط آزمایشگاهی اجرا شد. فاکتور اول شامل آبیاری با دو سطح شوری (صفر و ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) و فاکتور دوم ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی بودند. میزان کارتنوئید در شرایط تنش شوری به‌طور معنی‌دار بیشتر از شرایط عادی بود. میزان کلروفیل a و کلروفیل کل در شرایط عادی به‌مراتب بیشتر از شرایط تنش شوری برآورد شد. شوری سبب کاهش وزن تر گیاهچه‌های لوبیا چیتی به‌میزان ۲۴/۳۱ درصد گردید. تجزیه الکتروفورزی با استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید هشت درصد افقی به عمل آمد و ایزوزیم‌های SOD، POX و CAT در یکی از لایه‌های ژل رنگ‌آمیزی شدند. برای هر نوار در روی ژل میزان "مساحت × شدت" به‌عنوان فعالیت ایزوزیمی با نرم افزار MCID ارزیابی و یادداشت گردید. سه ایزوزیم برای SOD، سه ایزوزیم برای POX، و یک ایزوزیم برای CAT شناسایی شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در حالت شوری بیشتر از شرایط بدون تنش بود. میزان افزایش SOD_1، SOD_2 و SOD_3 به‌ترتیب ۲۶/۳۱، ۱۳/۸۹ و ۱۷/۶۴ درصد، POX_1، POX_2 و POX_3 به‌ترتیب ۴۸/۳۸، ۲۱ و ۴۳/۰۲ درصد و میزان افزایش CAT_1، ۴۳/۸۵ درصد به‌دست آمد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌تواند یکی از مهم‌ترین راه‌کارها برای کاهش خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو باشد.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، تنش شوری، رنگدانه‌ها، ژل پلی‌آکریل‌آمید.

۱- دانشجوی دکترای اصلاح نباتات،دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (* نگارنده‌ی مسئول) sm.chakherlo@yahoo.com
۲- استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱
تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹

مقدمه

لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.) یکی از لگوم‌های دانه‌ای است که با توجه به دارا بودن پروتئین بالا، مناسب مصرف خوراکی است. شوری خاک یکی از مهم‌ترین مشکلات جدی در محدود کردن پایداری تولیدات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک است (Gama *et al*., 2007). لوبیا یکی از گونه‌های گیاهی بسیار حساس به شوری خاک است (Mori *et al*., 2011). بیشترین حساسیت گیاهان به تنش شوری، در مرحله جوانه‌زنی بذر و ابتدای رشد گیاهچه‌ای است (Werner and Finkelstein, 1995). تنش شوری باعث کاهش رشد گیاهچه‌ای، میزان فعالیت فتوسنتزی و ترکیبات کلروفیل می‌شود (Loggini *et al*., 1999). تحت تیمار شوری، دو مرحله در ممانعت فتوسنتزی در دو رقم گندم تشخیص داده شد به‌طوری‌که در مرحله اول کاهش فتوسنتز به‌صورت تدریجی بود و مرحله دوم کاهش سریع در فتوسنتز همراه با کاهش کارآیی تبدیل انرژی در سیستم نوری II (PSII) بود که با اثرات مضر شوری مرتبط است (Mittler, 2002). همه انواع تنش‌های غیرزیستی، از جمله شوری، تنش اکسیداتیو را القا می‌کنند (Apel and Hirt, 2004). زمانی که تنش شوری اتفاق می‌افتد میزان گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل سوپراکسید (O_2^-) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) افزایش می‌یابد. گونه‌های فعال اکسیژن به‌دلیل داشتن الکترون‌های جفت نشده در اربیتال‌های خود، از میل ترکیبی بسیار بالایی با مولکول‌های زیستی سلول برخوردار می‌باشند. رادیکال‌های حاصل از احیای ناقص اکسیژن مولکول‌های زیستی که پیش‌ساز متابولیت‌های ضروری متابولیسم می‌باشند را هدف قرار داده و به این ترتیب مانع سنتز آنها می‌شوند (Gaber, 2010). افزایش گونه‌های اکسیژن فعال سبب اکسید شدن چربی‌ها، تغییر ساختمان پروتئین‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، بی‌رنگ شدن کلروفیل و تخریب اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (Nayyar and Gupta, 2006). به‌طورکلی گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو از سیستم‌های غیرآنزیمی و آنزیمی استفاده می‌کنند (Gupta *et al*., 2005). کارتنوئیدها جزو سیستم غیرآنزیمی هستند و نقش بسیار مهمی در متابولیسم گیاه برای تحمل تنش اکسیداتیو دارند. به‌طوری‌که به‌عنوان اجزای اصلی کلروپلاست شناخته می‌شوند و در خنثی کردن اکسیژن منفرد دخالت دارند (Ashraf, 2009). سیستم آنزیمی شامل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هستند که نقش بسیار مهمی برای حفظ سلول در برابر صدمات حاصل از گونه‌های فعال اکسیژن‌ها دارند و در شرایط تنش شوری فعالیت آنزیم‌های مذکور در لوبیا افزایش می‌یابد (Jebara *et al*., 2005). ولی‌زاده و همکاران (Valizadeh *et al*., 2013) در خانواده‌های ناتنی یونجه اظهار کردند که شوری باعث افزایش فعالیت ایزوزیم‌های SOD و POX نسبت به شرایط عادی می‌شود.

این مطالعه با هدف ارزیابی اثر تنش شوری بر وزن تر، میزان رنگدانه‌ها و فعالیت ایزوزیم‌های SOD، POX و CAT در ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار تنش

به‌منظور آماده سازی بذور و اعمال تنش شوری بذور نه ژنوتیپ لوبیا چیتی (جدول ۱) توسط هیپوکلریت سدیم (۲/۵ درصد) ضد عفونی شدند. پنج روز بعد از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به داخل پلاستیک‌های خاص حاوی پرلیت انتقال داده شدند. آبیاری با محلول نیم هوگلند در شرایط آزمایشگاهی

انجام گرفت (Allen, 1968). گیاهچه¬ها در دمای ۲۶ درجه سلسیوس زیر ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی قرار داده شدند. تنش شوری بر ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی با استفاده از محلول نیم هوگلند حاوی ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به مدت ۴۸ ساعت به همراه نمونه‌های عادی اجرا شدند (Nagesh Babu and Devaraj, 2008).

اندازه‌گیری میزان رنگدانه

۰/۲ گرم از برگ‌های تازه گیاهچه‌های لوبیا برای اندازه‌گیری کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید به روش یاریورا و همکاران (Yaryura *et al*., 2009) صورت گرفت.

استخراج آنزیمی الکتروفورز

نمونه‌های برگی تازه در بافر استخراج (تریس ۵۰ میلی‌مولار، پنج درصد ساکاروز، ۵۰ میلی‌مولار اسکوربیک اسید، ۲۰ میلی‌مولار متا بی‌سولفیت سدیم و دو درصد پلی اتیلن گلیکول) با pH برابر ۷/۵ حاوی ۰/۱ درصد ۲-مرکاپتواتانول با نسبت وزنی یک از برگ و یک از بافر استخراج به خوبی هموژنیزه شد (Valizadeh *et al*., 2013) و سپس محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. عصاره آنزیمی به‌وسیله قطعات بریده شده کاغذ واتمن شماره سه و مناسب با ابعاد چاهک، جذب شده و در ژل پلی‌آکریل‌آمید هشت درصد در ابعاد ۱۵×۱۲×۰/۶ سانتی‌متر بارگذاری شد. برای خنک کردن ژل، از ظرف واجد استفاده شد تا در حین انجام الکتروفورز دمای پایین نیز حفظ شود. دستگاه الکتروفورز روی آمپراژ کمتر از ۳۰ میلی‌آمپر راه‌اندازی شد حدود چهار ساعت بعد آبی بروموفنول با حرکت هشت تا۱۰ سانتی‌متری به انتهای ژل رسیده و ژل برای برش و رنگ‌آمیزی آماده شد. ژل‌ها بعد از الکتروفورز به‌صورت افقی برش داده شدند. برای رنگ‌آمیزی POX و CAT از روش اولسن و وارنر (Olson and Varner, 1993) و برای رنگ آمیزی SOD از روش سولتیس و سولتیس (Soltis and Soltis, 1990) استفاده شد. حداقل دو تکرار از هر ژنوتیپ و شرایط رشدی (عادی و شوری) مورد مطالعه قرار گرفت. ژل¬ها بعد از رنگ‌آمیزی از آنها عکس‌برداری شد.

آنالیز آماری

از نرم‌افزار MCID برای کمّی‌سازی "مساحت × شدت" هر نوار ایزوزیمی به‌عنوان ارزیابی فعالیت آنزیمی روی ژل استفاده شد. تجزیه آماری داده‌ها پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دو تکرار اجرا شد. مقایسه میانگین به روش حداقل اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.0 انجام شد.

نتایج و بحث

اثر شوری بر وزن تر و رنگدانه‌ها

شوری سبب کاهش وزن تر گیاهچه‌های لوبیا چیتی به‌میزان ۲۴/۳۱ درصد گردید (شکل ۱). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد صفات کارتنوئید، کلروفیل a و کلروفیل کل در بین ژنوتیپ‌ها و سطوح شوری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. اثر متقابل ژنوتیپ × سطوح شوری برای صفات کارتنوئید، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و نسبت کلروفیل a/b اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

بر اساس نتایج مندرج در جدول ۳، میزان کارتنوئید در شرایط تنش شوری به‌طور معنی‌دار بیشتر از شرایط عادی است. همچنین، میزان کلروفیل a و کلروفیل کل در شرایط عادی به‌مراتب بیشتر از

شرایط شوری بود. حاجی‌بلند و ابراهیمی (Hajiboland and Ebrahimi, 2011) اظهار کردند که تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار NaCl) در گیاه توتون باعث کاهش معنی‌دار وزن تر، کلروفیل a و نسبت کلروفیل a/b گردید.

محرم‌نژاد و ولی‌زاده (Moharramnejad and Valizadeh, 2014) اظهار کردند که تنش شوری (۴۰۰ میلی‌مولار NaCl) در گیاهچه‌های لوبیا قرمز سبب کاهش وزن تر و میزان کلروفیل می‌شود ولی غلظت آنتوسیانین و کارتنوئید را افزایش می‌دهد. افزایش شوری در محیط رشد، می‌تواند میزان کلروفیل و فتوسنتز خالص را کاهش دهد، که این مورد در گیاهان حساس به‌شوری مانند یونجه (Khavaranejad and Chaparzadeh, 1998) و کلزا (Qasim *et al*., 2003) گزارش کرده‌اند. یاسر و همکاران (Yaser *et al*., 2008) اظهار کردند که شوری میزان کلروفیل را در ارقام لوبیا سبز کاهش می‌دهد.

کاهش در اسیمیلاسیون خالص دی‌اکسیدکربن در شرایط تنش شوری در گوجه‌فرنگی و گیاه آفتابگردان با کاهش هدایت روزنه‌ای و تراکم روزنه‌ای مربوط است. این کاهش به‌سبب کاهش اسیمیلاسیون دی‌اکسیدکربن همراه با کاهش در هدایت روزنه‌ای، کارآیی بهره‌وری آب و فعالیت روبیسکو و نیز انتقال کندتر الکترون از سیستم نوری II (PSII) در شرایط شدید شوری است (Rivelli *et al*., 2002; Romeroaranda *et al*., 2001). محتوای پایین کلروفیل تحت شرایط تنش خشکی و شوری از نشانه‌های وجود تنش اکسیداتیو است که ممکن است باعث اکسیداسیون نوری رنگدانه و تخریب کلروفیل شود. کاهش و یا عدم تغییر در سطح کلروفیل در طی تنش اکسیداتیو در بیشتر گونه‌ها گزارش شده است که وابسته به مدت و شدت تنش است (Giancarla *et al*., 2013). افزایش گونه‌های اکسیژن فعال تحت تنش شوری از طریق ایجاد واکنش‌های پیوسته رادیکالی سبب اکسید شدن چربی‌ها، تغییر ساختمان پروتئین‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، بی‌رنگ شدن کلروفیل و تخریب اسیدهای نوکلئیک می‌شوند. کارتنوئیدها به‌عنوان اجزای اصلی کلروپلاست شناخته می‌شوند که در خاموش کردن اکسیژن منفرد دخالت دارد (Gill and Tuteja, 2010). این قابلیت خاموش نمودن کارتنوئیدها ناشی از بازوی زنجیره‌های ایزوپرونیک با تعداد زیادی پیوند دوگانه با دی-الکترون‌های تغییر مکان یافته، امکان دریافت آسان انرژی از مولکول‌های تهییج شده و اتلاف انرژی مازاد به شکل گرما را فراهم می‌آورد (Edreva, 2005).

پاسخ آنزیم‌های آنتی اکسیدان به تنش شوری

از برانگیخته شدن اکسیژن، اکسیژن منفرد و با اخذ یک، دو و سه الکترون به‌ترتیب سوپراکسید رادیکال، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدرواکسیل حاصل می‌شود. انواع اکسیژن فعال از محصولات اجتناب ناپذیر متابولیسم سلولی است که حتی در شرایط نرمال و مطلوب محیطی نیز تولید می‌شوند (Nayyar and Gupta, 2005). از مهم‌ترین محل‌های اجرای فرآیندهای تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌تواند به کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم اشاره کرد که به‌ترتیب فرآیندهای

فتوسنتز، تنفس و تنفس نوری در آنها اجرا می‌گردد (Gill and Tuteja, 2010). تبدیل سوپراکسید به هیدروژن پراکسید، اولین پل ارتباطی در پاک‌سازی آنزیمی گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد و سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان اولین سازوکار دفاعی اصلی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن است. همچنین، پراکسیداز و کاتالاز باعث تجزیه هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود (Gaber, 2010).

شکل‌های۲ تا ۴ به‌ترتیب نمونه‌ای از الگوی نواربندی در آنزیم‌های آنتی اکسیدان SOD، POX و CAT در ژنوتیپ‌های لوبیا در شرایط عادی و تنش شوری روی ژل پلی‌آکریل‌آمید را نشان می‌دهند. برای SOD سه ایزوزیم (شکل ۲)، برای POX سه ایزوزیم (شکل ۳) و برای CAT تنها یک ایزوزیم (شکل ۴) در لوبیا مشاهده شد. سوزا و دواراج (Souza and Devaraj, 2010) سه ایزوزیم از POX و یک ایزوزیم از CAT را در گونه‌ای از لوبیا تحت تنش گزارش کردند. SOD دارای سه ایزوزیم است که بر مبنای مکان استقرار و عامل فلزی همراه آنها طبقه‌بندی می‌شوند. ایزوزیم Mn-SOD در میتوکندری، Fe-SOD در کلروپلاست و Cu/Zn-SOD در سیتوسل قرار دارند (Bolkhina *et al*., 2003). همچنین، ایزویم‌هایی از سوپراکسید دیسموتاز در گلی‌اکسی‌زوم‌ها وجود دارد (Bueno and Rio, 1992). هرناندز و همکاران (Hernandez *et al*., 1999) در مطالعه خود، چهار ایزوزیم برای SOD در نخود فرنگی تحت تنش شوری گزارش کردند.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فعالیت تمام ایزوزیم‌های SOD، POX و CAT در بین ژنوتیپ‌ها و بین سطوح شوری اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد داشت. اثر متقابل ژنوتیپ× سطوح شوری برای هیچ کدام از ایزوزیم‌ها اختلاف معنی‌دار نداشت (جدول ۴).

فعالیت دنسیومتریک SOD_1، SOD_2 و SOD_3 به‌ترتیب در شرایط شوری ۲۶/۳۱، ۱۳/۸۹ و ۱۷/۶۴ درصد نسبت به شرایط عادی افزایش نشان داد (شکل ۵). فعالیت دنسیومتریک ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی در شرایط شوری بیشتر از شرایط عادی بود. فعالیت دنسیومتریک POX_1، POX_2 و POX_3 به‌ترتیب در شرایط شوری ۴۸/۳۸، ۲۱ و ۴۳/۰۲ درصد نسبت به شرایط عادی افزایش نشان داد (شکل ۶). فعالیت دنسیومتریک CAT_1 در شرایط شوری ۴۳/۸۵ درصد نسبت به شرایط عادی افزایش نشان داد (شکل ۷). محرم‌نژاد و همکاران (Moharramnejad *et al*., 2014) سه ایزوزیم برای SOD، سه ایزوزیم برای POX و یک ایزوزیم برای CAT در ژنوتیپ‌های لوبیا سفید تحت تنش شوری گزارش کردند. همچنین، افزایش معنی‌دار فعالیت ایزوزیم‌های SOD، POX و CAT در گیاهچه‌های ژنوتیپ لوبیا سفید تحت تنش شوری گزارش کردند.

افزایش شوری به‌طور معنی‌دار فعالیت SOD و POX را در برگ‌های جوان لوبیا تحت تنش شوری (NaCl) افزایش می‌دهد (Aydin *et al*. 2011). نورین و اشرف (Noreen and Ashraf, 2009) اظهار کردند که تنش شوری (۱۲۰ میلی مولار NaCl) باعث افزایش معنی‌دار فعالیت SOD و POX در نخود

فرنگی می‌شود. همین نتیجه را اوزتورک (Ozturk *et al*., 2012) با تنش شوری در نخود گزارش کردند. سوپر اکسید تولید شده در سیستم نوری I (PSI) توسط Cu/Zn-SOD که متصل به تیلاکوئید است به هیدروژن پراکسید احیاء شده و سپس توسط آنزیم آسکوربات پراکسیداز متصل به تیلاکوئید به آب احیاء می‌شود. مولکول‌های سوپراکسید و هیدروژن پراکسید که ممکن است تحت تاثیر این فرآیند قرار نگرفته و فرار نمایند بسیار آسیب‌رسان هستند و ممکن است توسط ایزوفرم‌های استرومایی آنزیم‌های آنتی اکسیدان تجزیه شوند (Gaber, 2010). هرناندز و همکاران (Hernandez *et al*., 1999) افزایش فعالیت ایزوزیم‌های Cu/Zn-SOD و Fe-SOD در نخود تحت تنش شوری را گزارش کردند. سالام و همکاران (Saglam *et al*., 2011) در بررسی خود روی ارقام مختلف لوبیا در شرایط تنش اظهار کردند که ارقام مختلف لوبیا پاسخ‌های متفاوت و معنی‌داری به تنش اکسیداتیو می‌دهند. سان و همکاران (Sun *et al*., 2010) نشان دادند که فعالیت ایزوزیم‌های POX، CAT و SOD از یک الگوی افزایش و کاهش در مواقع مواجه شدن در برابر تنش غیرزیستی در مقایسه با حالت عادی پیروی می‌کنند. بوئنو و همکاران (Bueno *et al*., 1998) افزایش فعالیت POX را در تنش شوری (۴۰۰ میلی‌مولار NaCl) در روی توتون گزارش کردند. کاک و همکاران (Kuk *et al*., 2003) اهمیت آنزیم CAT را در فرآیند تحمل تنش در گیاه برنج معنی‌دار گزارش کردند. CAT آنزیمی مهم در تحمل به تنش و پاک کننده با حساسیت کم نسبت به پراکسیدازها در مواجهه با تنش اکسیداتیو است. فزونی H_2O_2 ممکن است مانع فعالیت پراکسیداز شود، لذا فعالیت CAT به احتمال زیاد در جهت نگهداری فعالیت پراکسیداز تحت تنش شدید مطلوب است (Cruz, 2008). نورین و اشرف (Noreen and Ashraf, 2009) فعالیت CAT را در بین ارقام مختلف نخود فرنگی تحت تنش شوری معنی‌دار گزارش کردند در حالی که این فعالیت نسبت به شرایط رشد عادی کمتر بود. ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی را در تنش اکسیداتیو برای مقابله با خسارت ناشی از آن به خود می‌گیرند. کل این سیستم بیوشیمیایی توسط بیش از ۱۵۰ ژن کنترل می‌شود (Mittler *et al*. 2004). وانگ و هان (Wang and Han, 2009) سه تیمار شوری (۷۰، ۱۴۰ و ۲۱۰ میلی مولار NaCl) در گیاهچه‌های یونجه، پنج ایزوزیم برای POX مشاهده کردند، در POX_1 و POX_2 بیشترین فعالیت را نسبت به سه ایزوزیم دیگر داشت. همچنین، تغییر فعالیت ایزوزیم‌های CAT، SOD و APX را در شرایط شوری گزارش کردند. افزایش فعالیت ایزوزیم‌های POX در تنش شوری (۴۰۰ میلی مولار NaCl) در گونه‌ای از لوبیا (Souza and Devaraj, 2010) و در لوبیا فرانسوی (Nagesh Babu and Devaraj, 2008) معنی‌دار گزارش کردند. که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری کلی

تنش شوری ۴۰۰ میلی مولار کلرید سدیم باعث کاهش وزن تر و میزان کلروفیل گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی شد. در حالی میزان کارتنوئید در شرایط شوری نسبت به شرایط عادی در گیاهچه‌های لوبیا چیتی مورد مطالعه بیشتر برآورد

شد. نتایج حاصل از تجزیه الکتروفورزی نشان داد که تنش شوری ۴۰۰ میلی مولار باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌تواند یکی از مهم‌ترین راه‌کارها برای کاهش خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو باشد.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی مورد مطالعه

Table 1- List of pinto bean genotypes in this study

کد Code	ژنوتیپ Genotype	کد Code	ژنوتیپ Genotype
1	21153	6	21329
2	21154	7	21366
3	21160	8	21526
4	21177	9	21528
5	21326	-	-

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تنش شوری (NaCl) بر وزن‌تر و رنگدانه‌ها در گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی

Table 2- ANOVA of the effect of salinity on fresh weight and pigments in pinto bean seedlings

		میانگین مربعات(MS)					
منابع تغییر S.O.V	درجات آزادی df	وزن تر Fresh weight	کارتنوئید Carotenoid	کلروفیل a Chlorophyll-a	کلروفیلb Chlorophyll-b	نسبت کلروفیل Chlorophyll a/b	کلروفیل کل Total chlorophyll
ژنوتیپ Genotype(G)	8	1.34**	1.10**	1.14**	1.02**	1.61**	2.97**
سطوح شوری Salinity(S)	1	1.09**	1.15**	1.90**	1.43**	1.23**	1.10**
ژنوتیپ×شوری G×S	8	0.03 ns	0.01 ns	0.09 ns	0.03ns	0.03 ns	0.04 ns
خطا Error	18	0.10	0.06	0.08	0.03	0.04	0.08
ضریب تغییرات (%CV)		12.59	10.01	16.25	8.05	9.56	10.83

ns و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

ns and**: non-significant and significant at 0.01 probability level, respectively

جدول ۳- مقایسه میانگین رنگدانه‌ها در گیاهچه‌های لوبیا چیتی تحت شرایط عادی و شوری (NaCl)

Table 3- Mean comparison of pigment contents in pinto bean seedlings under control and salt stress conditions

رنگدانه Pigment (μmol g^{-1} fresh weight)	**شرایط عادی** Control	**شرایط شوری** Salinity (400 mM)
کارتنوئید Carotenoid	0.106^{b}±1.110	0.184^{a}±1.166
کلروفیل a Chlorophyll-a	0.115^{a}±1.331	0.146^{b}±1.229
کلروفیل b Chlorophyll-b	0.052^{a}±0.634	0.112^{a}±0.672
نسبت کلروفیل a/b Chlorophyll a/b	0.014^{a}±2.116	0.080^{a}±1.999
کلروفیل کل Total chlorophyll	0.171^{a}±1.966	0.254^{b}±1.900

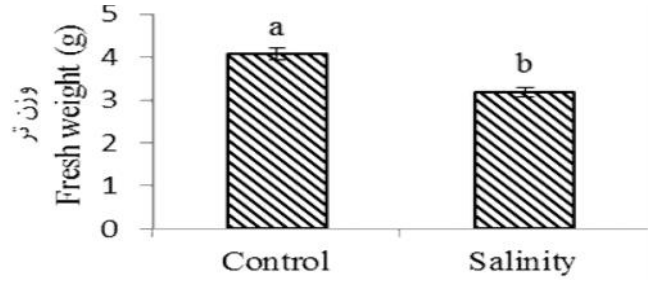
جدول ۴- تجزیه واریانس اثر تنش شوری (NaCl) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی

Table 4- ANOVA of the effect of salinity on antioxidant enzymes activities in pinto bean seedlings

منابع تغییر S.O.V	**درجات آزادی** df	**میانگین مربعات(MS)**						
		SOD_1	SOD_2	SOD_3	POX_1	POX_2	POX_3	CAT_1
ژنوتیپ Genotype(G)	8	9.05^{**}	10.44^{**}	10.31^{**}	1.50**	0.21^{**}	5.12^{**}	0.49^{**}
سطوح شوری Salinity(S)	1	2.09^{**}	1.55^{**}	2.65^{**}	20.40^{**}	9.10^{**}	11.10^{**}	8.31^{**}
ژنوتیپ×شوری G×S	8	0.12^{ns}	0.09^{ns}	0.11^{ns}	0.03^{ns}	0.01^{ns}	0.07^{ns}	0.01^{ns}
خطا Error	18	0.09	0.06	0.08	0.02	0.01	0.04	0.01
ضریب تغییرات (%CV)		5.09	4.55	5.27	8.07	7.18	7.76	6.13

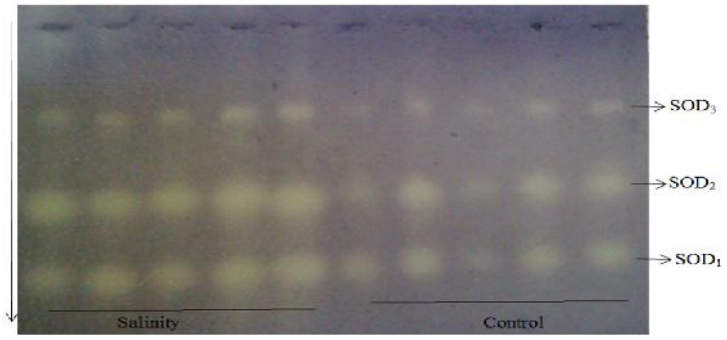
^{ns} و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

ns and**: non-significant and significant at 0.01 probability level, respectively



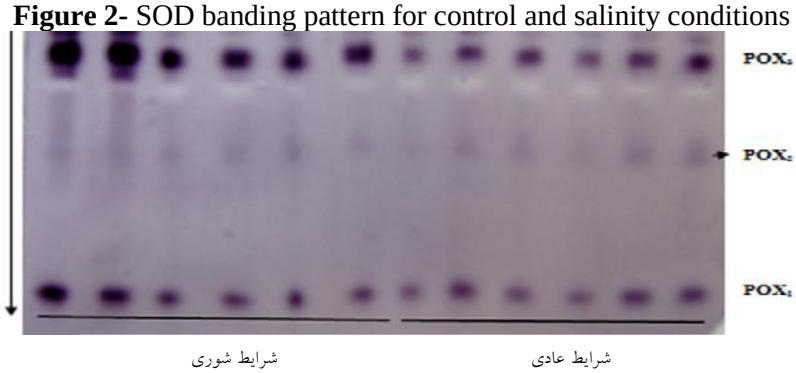
شکل ۱- تاثیر شوری بر وزن تر گیاهچه‌های لوبیا چیتی در شرایط عادی و تنش شوری

Figure 1- Effect of salinity on pinto bean seedlings fresh weight in control and salt stress



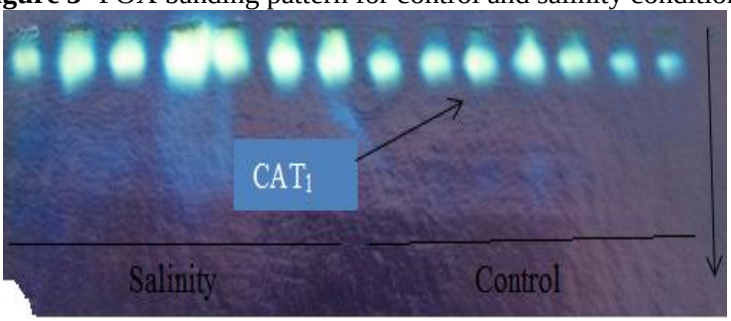
شکل ۲- الگوی ایزوزیمی SOD در گیاهچه‌های لوبیا در شرایط عادی و شرایط شوری

Figure 2- SOD banding pattern for control and salinity conditions



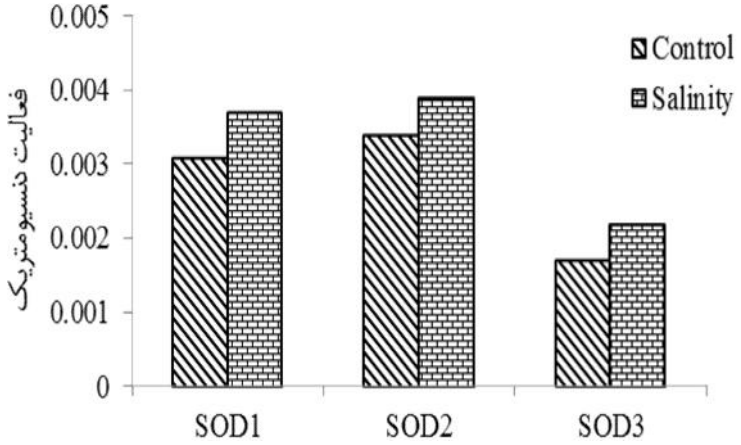
شکل ۳- الگوی ایزوزیمی POX در گیاهچه‌های لوبیا در شرایط عادی و شرایط شوری

Figure 3- POX banding pattern for control and salinity conditions



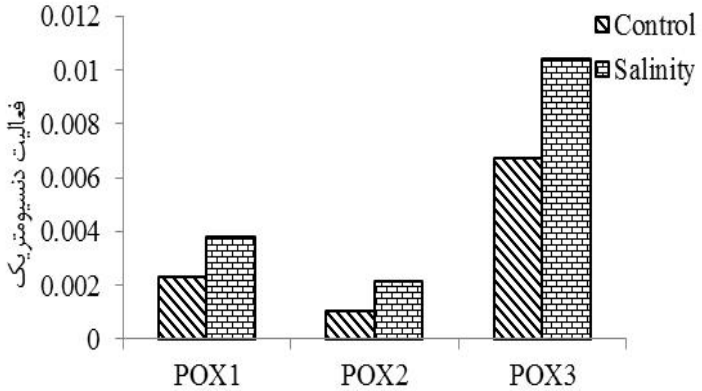
شکل ۴- الگوی ایزوزیمی CAT در گیاهچه‌های لوبیا در شرایط عادی و شرایط شوری

Figure 4- CAT banding pattern for control and salinity conditions



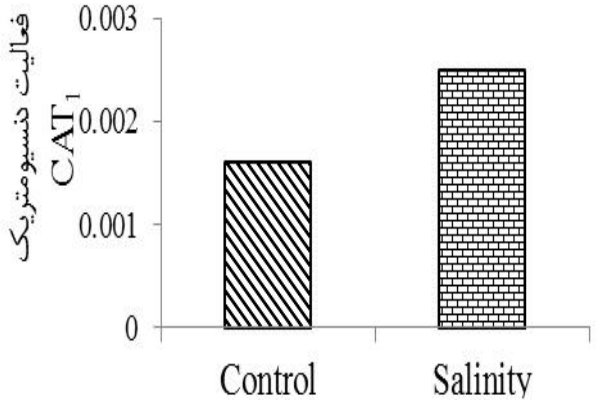
شکل ۵- میانگین فعالیت دنسیومتریک ایزوزیم‌های SOD در دو شرایط عادی و شوری

Figure 5- Mean densitomtric activity of SOD in control and salinity condition



شکل ۶- میانگین فعالیت دنسیومتریک ایزوزیم‌های POX در دو شرایط عادی و شوری

Figure 6- Mean densitomtric activity of POX in control and salinity condition



شکل ۷- میانگین فعالیت دنسیومتریک ایزوزیم CAT در دو شرایط عادی و شوری

Figure 7- Mean densitomtric activity of CAT in control and salinity condition

References منابع مورد استفاده

- Allen, M.M. 1968. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Plant Physiol*. 4: 1-4.
- Apel, K., and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*. 55: 373-399.
- Aydin, A., C. Kant, and M. Turan. 2011. Hydrogel substrate alleviates salt stress with increase antioxidant enzymes activity of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under salinity stress. *Afr. J. Agric. Res*. 6: 715-724.
- Bolkhina, O., E. Virolainen, and K.V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annu. Rev. Bot*. 91: 179-194.
- Bueno, P., and L.A. Rio. 1992. Purification and properties of glyoxisomal cuprozinc superoxide dismutase from watermelon cotyledons (*Citrullus vulgaris* Schrad.). *Plant Physiol*. 98: 331-336.
- Cruz, C.M.H. 2008. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging signaling. *Plant Sign. Behav*. 3: 156-165.
- Edreva, A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a sub molecular approach. *Agri. Ecosyst. Environ.* 106: 119-133.
- Gaber, M.A. 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Sign. Behav*. 5: 369-374.
- Gama, P.B.S., S. Lnanaga, K. Tanaka, and R. Nakazawa. 2007. Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedling to salinity stress. *Afr. J. Biot*. 6: 79-88.
- Giancarla, V., E. Madosa, S. Ciulca, R. Coradini, C. Iuliana, M. Mihaela, and A. Lazar. 2013. Influence of water stress and salt stress on the chlorophyll content in barley. *J. Horticul. Fores. Biotech.* 17: 223-228.
- Gill, S.S. and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Bio*. 48: 909-930.
- Gupta, K.J., M. Stoimenova, and W.M. Kaiser. 2005. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO. in vitro and in situ. *J Exp Bot*. 56: 2601–2609.
- Hajiboland, R., and N. Ebrahimi. 2011. Growth, photosynthesis and phenolics metabolism in tobacco plants under salinity and application of polyamines. *J. Plant Biology*. 8: 13-26. (In Persian).
- Hernandez, J.A., A. Campillo, A. Jimenez, J.J. Alarcon, and F. Sevilla. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phyto*. 141: 241-251.
- Jebara, M., E.A. Mohamed, H. Payre, and D. Jean-Jacques. 2005. Nodule conductance varied among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes under phosphorus deficiency. *J. Plant Physiol.* 162: 309–315.

- Khavarinejad, R.A., and N. Chaparzadeh. 1998. The effects of NaCl and $CaCl_2$ on photosynthesis and growth of alfalfa plants. *Photosynthesis*. 35: 461-466.
- Kuk, N.P.A., J.S. Shin, N.R. Burgos, T.E. Hwang, O. Han, S. Jung, and J.O. Guh. 2003. Antioxidant enzymes offer protection from chilling damage in rice plant. *Crop Sci*. 43: 2109-2117.
- Loggini, B., A. Scartazza, E. Brugnoli, and F. Navari Izzo. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol*. 119: 1091–1099.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, and F. Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*. 9: 490–498.
- Moharramnejad, S., and M. Valizadeh. 2014. Effect of salt stress on pigment content and catalase activity in seedling of red bean (*Phaseolus vulgaris*). *Research in Crop Ecosystems*. 2: 91-100. (In Persian).
- Moharramnejad, S., M. Valizadeh, and I. Dorani. 2014. Patterns of superoxide dismutase, catalase and peroxidase antioxidant isozymes in seedlings of white beans under salt stress. *Iranian Journal of Field Crop Sci*. 45: 161-168. (In Persian).
- Mori, M., L. Di Mola, and C.F. Qualitta. 2011 Salt stress and transplant time in snap bean. Growth and productive behavior. *Int. J. Plant Prod*. 5: 49-64.
- Nagesh Babu, R., and V.R. Devaraj. 2008. High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Aust J. Crop Sci*. 2: 40-48.
- Nayyar, H., and D. Gupta. 2006. Differential sensitivity of C_3 and C_4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *J. Exp. Bot*. 58:106-113.
- 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. *J. Plant Physiol*. 166: 1764-1774.
- Olson, P.D., and J.E. Varner. 1993. Hydrogen peroxides and lignifications. *Plant J*. 4: 887-892.
- Ozturk, L., Y. Demir, A. Unlukara, M. Nlukara, I. Karatas, A. Kurunc, and O. Duzdemir. 2012. Effects of long-term salt stress on antioxidant system, chlorophyll and proline contents in pea leaves. *Rom. Biotechnol. Let*. 17: 7227-7236.
- Qasim, M., M. Ashraf, M.A. Jamil, M.Y. Ashraf, U.R. Shafiq, and E.S. Rha. 2003. Water relations and leaf gas exchange properties in some elite canola (*Brassica napus*) lines under salt stress. *Ann. Appl. Biol.* 142: 307-316.
- Rivelli, A.R., S. Lovelli, and M. Perniola. 2002. Effects of salinity on gas exchange, water relations and growth of sunflower (*Helianthus annuus*). *Funct. Plant Biol*. 29: 1405-1415.
- Romeroaranda, R., T. Soria, and J. Cuartero. 2001. Tomato plant water uptake and plant water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci*. 160: 265-272.

- Saglam, A., N. Saruhan, R. Terzi, and A. Kadioglu. 2011. The relations between antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters in common bean cultivars differing in sensitivity to salt stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 58: 60–68.
- Soltis, D.E., and P.S. Soltis. 1990. Isozymes in plant biology. Chapman and Hall, London. pp. 259.
- Souza, M.R.D., and V.R. Devaraj. 2010. Biochemical responses of Hyacinth bean (*Lablab purpureus*) to salinity stress. *Acta Physiol. Plant*. 32: 341–353.
- Sun, C., W. Du, X. Chang, X. Xu, Y. Zhang, D. Sun, and J. Shi. 2010. The effects of drought stress on the activity of phosphatase and its protective enzymes in pigweed leaves. *Afri. J. Biotech.* 9: 825-833.
- Valizadeh, M., S. Moharamnejad, M. Ahmadi, and H. Mohammadzadehjalaly. 2013. Changes in activity profile of some antioxidant enzymes in alfalfa half-sib families under salt stress. *J. Agr. Sci. Tech*. 15: 801-809.
- Wang, X., and J. Han. 2009. Changes of proline content, activity, and active isoforms of antioxidative enzymes in two alfalfa cultivars under salt stress. *Agric. Sci. China*. 8: 431-440.
- Werner, J.E., and R.R. Finkelstein. 1995. Arabidopsis mutant with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol. Plant*. 93: 659-666.
- Yaryura, P., G. Cordon, M. Leon, N. Kerber, N. Pucheu, G. Rubio, A. Garcı´a1, and M.G. Lagorio. 2009. Effect of phosphorus deficiency on reflectance and chlorophyll fluorescence of cotyledons of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Agro. Crop Sci*. 195: 186-196.
- Yasar, F., S. Ellialtioglu, and K. Yildiz. 2008. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. *Russ. J. Plant Physiol.* 55: 782-786.

Variation of Pigment Content and Antioxidant Enzyme Activites in Pinto Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings under Salt Stress

Moharramnejad, S. [1*], and M. Valizadeh[2]

Received: June 2014, Accepted: 28 February 2015

Abstract

Effects of salt stress (NaCl) on fresh weight, pigment content and superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX), and catalase (CAT) activities in nine genotypes of pinto bean exposed to two levels of NaCl (0 and 400 mM) were studied. A factorial experiment on the basis of completely randomized design was carried out in laboratory conditions. Salinity stress increased carotenoids in the leaves while it decreased chlorophyll a and total chlorophyll significantly. Salinity reduced by 24.31% fresh weight. Electrophoretic analyses were performed by using 8% slab polyacrylamide gels. For each isozymic band the "density × area" scores onto gels were evaluated by MCID software as enzymatic activity. Three isozymes were observed for each of SOD and POX and one for CAT. Salt stress increased activities of all observed enzymes. Application of salt stress increased activities of SOD_1, SOD_2 and SOD_3. Their activity increment was estimate to be 26.31, 13.89 and 17.64 percent respectively. POX_1, POX_2 and POX_3 activity increment, were also estimated to be 48.38, 21 and 43.02 percent respectively. In the case of CAT it was 43.85 percent. Antioxidant enzymes activity increment could be important strategy for reducing the damage caused by oxidative stress.

Key words: Antioxidant enzymes, Salt stress, Pigment content, Polyacrylamide gel.

1- PhD. Student of Plant Breeding, University of Mohaggegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2-Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
**** Corresponding Author:*** *smoharramnejad@uma.ac.ir*