دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۱، صفحه ۴۶-۳۵ (۱۳۹۵)

مطالعه تغییرات رشد، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و مقدار پروتئین با کاربرد عنصر روی در گیاه دارویی پریوش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) تحت تنش شوری

مهری عسکری[1*]، فریبا امینی[2] و لیلا حسین‌پور[3]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، ایران، پست الکترونیک: m-askary@araku.ac.ir

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۳

چکیده

تنش شوری یکی از تنش‌های عمده غیرزیستی است که اثرات زیان‌آوری بر تولید و کیفیت گیاهان می‌گذارد. آزمایشی به‌منظور بررسی اثرات کاربرد عنصر روی به‌عنوان تعدیل‌کننده تنش شوری بر آنتی‌اکسیدانت‌ها، پروتئین، اسیدآمینه پرولین و رشد گیاه دارویی پریوش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) در پاییز ۱۳۹۱ در دانشگاه اراک انجام شد. گیاهان ۴۹ روزه با غلظت‌های مختلف کلریدسدیم (۰، ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) به تنهایی و همراه با غلظت‌های مختلف سولفات روی (۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار) به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. سپس درصد بازدارندگی رادیکال دی‌فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل DPPH، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، مقدار پرولین و پروتئین و شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند که کاربرد سولفات روی ارتفاع بخش هوایی، عمق ریشه، وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی را در همه تیمارهای شوری بهبود بخشید. در نتیجه تنش شوری، درصد بازدارندگی رادیکال DPPH، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و نیز محتوای پرولین به‌ترتیب ۳۴۸/۵٪، ۴۷۵/۶٪، ۱۷۲/۷٪، ۲۰۰٪ و ۳۶۴٪ افزایش یافت، ولی محتوای پروتئین ۳۳٪ کاهش یافت. کاربرد روی محتوای پروتئین را در تیمارهای شوری تا ۱۶٪ بهبود بخشید و محتوای پرولین را در آنها تا ۳۶٪ کاهش داد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهان تیمار شده با NaCl+Zn نسبت به آنهایی که تنها با NaCl یا Zn تیمار شده بودند به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این نتایج از اثرات مثبت کاربرد عنصر روی بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی پریوش تحت تنش شوری حمایت می‌کند. عنصر روی می‌تواند به‌عنوان پاک‌کننده گونه‌های اکسیژنی واکنش‌گر به‌منظور کاهش آسیب غشاهای زیستی تحت تنش شوری عمل کند.

واژه‌های کلیدی: پرولین، تعدیل‌کننده، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز.

مقدمه

پریوش (*Catharanthus roseus*) از گیاهان مهم دارویی متعلق به خانواده خرزهره (Apocynaceae) است. این گیاه بوته‌ای و چندساله اغلب در مناطق معتدل و گرمسیری رشد می‌کند و به خشکی و گرما مقاوم است. تمام بخش‌های این گیاه دارای آلکالوئید است ولی آلکالوئیدهای ضدسرطان وین‌بلاستین (Vinblastine) و وین‌کریستین (Vincristine) در برگ و آلکالوئیدهای ضد فشار خون

آجمالیسین (Ajmalicine) و سرپنتین (Serpentine) بیشتر در ریشه این گیاه قرار دارند. به‌طوری که مقدار آلکالوئیدهای گیاه پریوش تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی مثل شوری خاک افزایش می‌یابد (Jaleel *et al*., 2008).

شوری به‌عنوان یکی از تنش‌های اصلی محیط به حضور غلظت بالای نمک‌های محلول در خاک اطراف ریشه مربوط می‌شود. غلظت‌های بالای نمک‌های محلول به‌واسطه افزایش فشار اسمزی، سمّیت یونی و با محدود کردن جذب آب توسط ریشه، رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Jouyban, 2012). تقریباً ۱۲/۵٪ از زمین‌های کشاورزی ایران درگیر شوری طبیعی یا افزایش یافته هستند (Akhani & Ghorbani, 1992). به‌طوری که تولیدات کشاورزی در اثر شوری خاک تحت تأثیر قرار می‌گیرند. بخش اصلی بازدارندگی رشد به‌وسیله تجمع Na^+ اضافی در خاک ایجاد می‌شود. مقدار کاهش رشد گیاه تحت شوری با ترکیب و غلظت نمک، مرحله فیزیولوژیکی گیاه و گونه گیاهی تغییر می‌کند (Jaleel *et al*., 2008). تولید زیاد گونه‌های اکسیژنی واکنش‌گر ROS (Reactive Oxygen Species) در طول تنش شوری ناشی از آسیب به سیستم انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری و افزایش تنفس نوری است. این رادیکال‌های آزاد ضمن راه‌اندازی واکنش‌های پراکسیداتیو، قابلیت آسیب زدن به غشاء و ماکرومولکول‌های ضروری مثل رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، نوکلئیک اسیدها و لیپیدها را دارند و منجر به تشکیل تولیدات سمّی از قبیل مالون‌دی‌آلدهید می‌شوند. تنش اکسیداتیو زمانی رخ می‌دهد که بین تولید ROS و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانتی گیاه تعادل نباشد. گیاهان با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی (مثل سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز) و غیرآنزیمی مثل پرولین به‌طور طبیعی میزان ROS درون سلول را در حد تعادل نگه می‌دارند (Tavallali *et al*., 2010).

کمبود Zn یک مشکل تغذیه‌ای مهم خاک‌های جهان است که معمولاً با مشکلات شوری مرتبط است. روی یک عنصر کم‌مصرف ضروری درگیر در فعالیت آنزیم‌های مختلف است. کربونیک نیدراز که تبدیل برگشت‌پذیر کربن دی‌اکسید و آب را به کربونیک اسید کاتالیز می‌کند، حاوی عنصر روی است و برای فعالیت به Zn نیاز دارد (Weisany *et al*., 2012). روی در متابولیسم پروتئین، بیان ژن، تمامیّت ساختاری و عملکردی غشاهای زیستی و متابولیسم فتوسنتزی کربن نقش دارد. روی در تنظیم گشودگی روزنه‌ها به‌واسطه نقشی که در حفظ تمامیّت غشاء دارد، دخالت می‌کند. در کمبود روی، محتوای K^+ سلول‌های نگهبان روزنه کاهش می‌یابد (Tester & Davenport, 2003). روی برای ساخت تریپتوفان (پیش‌ماده سنتز اکسین) ضروریست (Mousavi, 2011). مطالعات مختلف به اهمیت تغذیه روی بر بهبود تحمل تنش شوری در گیاهان اشاره دارد که مرتبط با تأثیر روی بر تمامیّت ساختاری و کنترل نفوذپذیری غشاء سلول‌های ریشه می‌باشد. تغذیه مناسب و کافی Zn، جذب سدیم اضافی را توسط ریشه تحت تنش شوری کاهش می‌دهد و تحمل گیاه را به سمّیت NaCl افزایش می‌دهد (Tavallali *et al*., 2010). هدف این مطالعه بررسی نقش روی به‌عنوان تعدیل‌کننده تنش شوری بر رشد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی گیاه پریوش می‌باشد.

مواد و روشها

کاشت بذر و اعمال تنش

پس از ضدعفونی بذرهای پریوش تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان با هیپوکلریت سدیم ۱٪ و جوانه زنی بذرها در پتری دیش، گیاهک‌ها به ۳۶ گلدان حاوی پرلیت و خاک زراعی (لومی رسی با pH=۷/۶) به نسبت ۱:۱ (وزنی/وزنی) انتقال یافتند. گیاهان تا ۴۹ روز با محلول هوگلند (Hoagland & Arnon, 1950) تغذیه شدند، گیاهان ۴۹ روزه در مرحله رشد رویشی به مدت ۳ هفته در روزهای ۴۹، ۵۶ و ۶۳ اعمال تنش شدند. آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه اراک در پاییز سال ۱۳۹۱ انجام شد. تیمار اول سطوح مختلف کلریدسدیم (۰، ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی مولار) و تیمار دوم

سطوح مختلف سولفات روی $ZnSO_4,7H_2O_2$ (۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار) بود. محلول هوگلند (Hoagland & Arnon, 1950) حاوی سدیم کلرید با غلظت‌های ۰، ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی مولار و محلول هوگلند شامل سولفات روی ($ZnSO_4$ $7H_2O_2$) با غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ میکرومولار بود. محلول‌های فوق هفته‌ای یک‌بار به خاک محتوای گیاه به میزان ۱۵۰ میلی‌لیتر داده شدند. محلول هوگلند فاقد کلریدسدیم و فاقد روی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برداشت نهایی در مرحله بلوغ گیاه (پایان رشد رویشی و قبل از گلدهی) در روز ۷۰ انجام شد.

صفات مورد ارزیابی

شاخص‌های رشد مثل ارتفاع گیاه، عمق ریشه، وزن تر و خشک بخش هوایی (ساقه و برگ) و ریشه برای سه گیاه از هر تیمار اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری محتوای پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) و اندازه‌گیری محتوای پروتئین از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. برای اندازه‌گیری کمّیت ترکیب‌های آنتی اکسیدان کل (I%) از آزمون درصد تخریب رادیکال آزاد ۱و۱دی‌فنیل-۲پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط عصاره گیاه به روش Kamkar و همکاران (۲۰۱۰) استفاده گردید. در این روش از ترکیب رادیکالی پایدار ۱و۱ دی فنیل-۲-پیکلریل هیدرازیل DPPH (۰/۵ میلی مولار) به‌عنوان معرف استفاده شد. الکترون تک رادیکال آزاد DPPH جذب قوی حداکثری در ۵۱۷nm دارد و رنگ آن بنفش است. زمانی‌که الکترون تک رادیکال DPPH با یک هیدروژن از یک ترکیب آنتی‌اکسیدان واکنش می‌دهد و فرم احیای DPPH-H را تشکیل می‌دهد رنگ بنفش به رنگ زرد تبدیل می‌شود. در واقع در این روش از بی‌رنگ شدن رنگ بنفش در اندازه‌گیری کمّی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی کل استفاده می‌شود. برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از روش Cakmak و Marschner (۱۹۹۲)، سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD (Superoxide dismutase) از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) و سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (Guaiacol peroxidase GPOX) نیز از روش Polle و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS16 و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (سطح ۵٪) و برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده گردید.

نتایج

تیمار منفرد کلریدسدیم، تیمار منفرد سولفات روی و اثر متقابل تیمار کلریدسدیم و سولفات روی بر تمامی شاخص‌های مورد بررسی گیاه پریوش ۷۰ روزه اثر معنی‌داری (جدول ۱) را نشان می‌دهند.

نتایج اثر شوری به تنهایی

با افزایش شوری، شاخص‌های رشد پریوش به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. کمترین ارتفاع بخش هوایی و عمق ریشه، وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه متعلق به گیاهان تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری بود. با افزایش شوری مقدار پرولین و پروتئین به‌ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری را نشان دادند. مقدار افزایش پرولین در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری ۳/۶۴ برابر شاهد و کمترین میزان پروتئین در همین سطح شوری با ۳۳٪ کاهش نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد (جدول ۲). درصد تخریب رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره گیاهی I% در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد ۳۴۸/۵٪ افزایش را نشان داد. بیشترین فعالیت آنزیم SOD، CAT و GPOX در گیاهان تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری به‌ترتیب با افزایش ۴۷۵/۶٪، ۱۷۲/۷٪ و ۲۰۰٪ نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه و تحلیل اثر تیمار شوری، تیمار روی و اثر متقابل آنها بر شاخص‌های رشد، مقدار پرولین، پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی کل (I%)، سوپراکسیداز دیسموتاز SOD، کاتالاز CAT و گایاکول پراکسیدار GPOX پریوش

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		بخش هوایی		ریشه			
		ارتفاع	وزن تر	وزن خشک	وزن تر	وزن خشک	عمق
تیمار شوری	۳	۴/۵۲ **	۰/۴۷ **	۰/۰۰۵ **	۰/۰۰۳ **	$۲/۸\times۱۰^{-۵}$ **	۱۳/۸۲ **
تیمار روی	۲	۱/۴۵ **	۰/۰۷ **	۰/۰۰۱ **	۰/۰۰۱ **	$۷/۴\times۱۰^{-۶}$ **	۸/۹۶ **
اثر متقابل شوری×روی	۶	۰/۰۹۵ **	۰/۰۰۳ *	$۳/۶\times۱۰^{-۵}$ *	$۱/۳\times۱۰^{-۵}$ **	$۲/۱\times۱۰^{-۷}$ **	۰/۱۹ **
اثر خطا	۲۴	۰/۰۲۶	۰/۰۰۱	$۱/۱۲\times۱۰^{-۵}$	$۱/۷\times۱۰^{-۶}$	$۲/۸۳\times۱۰^{-۸}$	۰/۰۴۱
ضریب تغییرات		۲۸	۳۰	۲۵	۳۹/۵	۳۶/۵	۲۰

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		I%	SOD	CAT	GPOX	پرولین	پروتئین
تیمار شوری	۳	۱۹۴۴ **	۵۲۳۸/۷۴ **	۰/۰۰۱ **	۰/۰۰۲ **	۲۰۱/۵ **	۰/۰۷۲ **
تیمار روی	۲	۵۳/۵۷ **	۳۷۵/۶۴ **	۰/۰۰۰۰۲ **	$۷/۸\times۱۰^{-۵}$ **	۷/۹۸ **	۰/۰۳۱ *
اثر متقابل شوری×روی	۶	۴/۸۸ **	۳۷/۲۲ **	$۱/۵\times۱۰^{-۶}$ *	$۶/۹\times۱۰^{-۶}$ **	۰/۴۲ *	۰/۰۰۱ *
اثر خطا	۲۴	۰/۱۳۷	۰/۲۷۴	$۶/۱\times۱۰^{-۷}$	$۱/۳\times۱۰^{-۶}$	۰/۱۵۸	۰/۰۰۰۱۳
ضریب تغییرات		۴۰	۳۸/۵۲	۳۰	۳۶/۵	۲۶/۵	۳۱/۸۹

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثر تیمار شوری بر شاخص‌های رشد، پرولین، پروتئین، میزان I% و فعالیت کاتالاز CAT، گایاکول‌پراکسیداز GPOX و سوپراکسید دیسموتاز SOD گیاهان ۷۰ روزه پریوش

شاخص	تیمار شوری (میلی‌مولار)			
	۰	۳۵	۷۰	۱۰۰
ارتفاع بخش هوایی (cm)	۵/۳۷ a ±۰/۵۴	۴/۴۱ b ±۰/۳۷	۴/۰۲ c ±۰/۲۳	۳/۷۴ d ±۰/۱۹
عمق ریشه (cm)	۷/۴ a ±۰/۸	۵/۶۹ b ±۰/۵۴	۵/۲ c ±۰/۹	۴/۵ d ±۰/۸۹
وزن تر بخش هوایی (g)	۰/۹۳ a ±۰/۱۱	۰/۶۱ b ±۰/۰۷	۰/۵ c ±۰/۰۴	۰/۴۱ d ±۰/۰۷
وزن خشک بخش هوایی (g)	۰/۰۹۴ a ±۰/۰۱	۰/۰۶۳ b ±۰/۰۰۷	۰/۰۵۱ c ±۰/۰۰۴	۰/۰۴۲ d ±۰/۰۰۷
وزن تر ریشه (g)	۰/۰۶ a ±۰/۰۰۰۹	۰/۰۴۴ b ±۰/۰۰۶	۰/۰۳۴ c ±۰/۰۰۶	۰/۰۱۹ d ±۰/۰۰۷
وزن خشک ریشه (g)	۰/۰۰۶ a ±۰/۰۰۱	۰/۰۰۵ b ±۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۳ c ±۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۲ d ±۰/۰۰۰۸
پرولین (µmol/g FW)	۴/۳۷ d ±۰/۴۱	۸/۶۲ c ±۰/۶۸	۱۲/۴۴ b ±۱/۱۵	۱۵/۲۶ a ±۰/۹۱
پروتئین (mg/g FW)	۰/۶۳ a ±۰/۰۴	۰/۵۱ b ±۰/۰۳	۰/۴۶ c ±۰/۰۶	۰/۴۲ d ±۰/۰۵
میانگین I%	۱۰/۰۲ d ±۰/۴۵	۲۶/۰۴ c ±۱۰/۹	۳۴/۰۳ b ±۲/۶۵	۴۴/۹۴ a ±۲/۵۸
SOD (unit mg^{-1} protein)	۱۱/۴۸ d ±۰/۸	۲۳/۶۵ c ±۵/۸۸	۴۵/۴۵ b ±۵/۱	۶۶/۰۸ a ±۷/۸۳
CAT (µmol mg^{-1} protein min^{-1})	۰/۰۱۱ d ±۰/۰۰۰۸	۰/۰۱۹ c ±۰/۰۰۲	۰/۰۲۴ b ±۰/۰۰۲	۰/۰۳ a ±۰/۰۰۱
GPOX (µmol mg^{-1} protein min^{-1})	۰/۰۲۲ d ±۰/۰۰۱	۰/۰۴۱ c ±۰/۰۰۳	۰/۰۵ b ±۰/۰۰۲	۰/۰۶ a ±۰/۰۰۴

در هر ردیف داده‌های (میانگین ۳ تکرار ±SD) دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ در آزمون دانکن ندارند.

نتایج اثر تیمار روی به تنهایی

تمامی شاخص‌های رشد مورد بررسی با افزایش تیمار روی افزایش معنی‌داری نشان دادند. به‌طوری که بیشترین مقدار شاخص‌های رشد در تیمار ۱۰ میکرومولار روی مشاهده شد. بیشترین میزان پروتئین در ۱۰ میکرومولار روی با ۲۲٪ افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد. البته مقدار پرولین در تیمار ۱۰ میکرومولار روی ۱۴/۷۹٪ کاهش را نسبت به شاهد نشان داد. به‌نحوی که بیشترین میزان I% و فعالیت آنزیم SOD، CAT و GPOX در تیمار ۱۰ میکرومولار روی مشاهده می‌شود (جدول ۳).

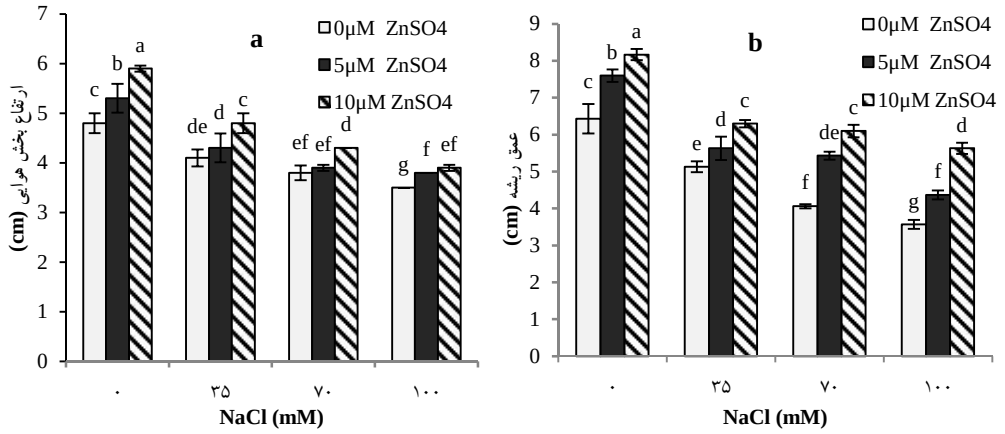
نتایج اثر متقابل تیمار شوری و روی

بیشترین شاخص‌های رشدی پریوش در تیمار ۱۰ میکرومولار روی و کمترین در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری بدون روی مشاهده شد. کاهش ۳۰/۳۵٪ ارتفاع بخش هوایی و ۳۹/۱۹٪ عمق ریشه در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد، با افزودن ۱۰ میکرومولار روی، به‌ترتیب به ۱۸/۱۲ و ۱۲/۴٪ و در ۵ میکرومولار روی به‌ترتیب به ۲۰/۸٪ و ۳۲/۰۳٪ تغییر یافت. البته بین ارتفاع بخش هوایی و عمق ریشه گیاهان در شوری ۳۵ میلی‌مولار+۱۰ میکرومولار روی و گیاهان شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود، یعنی ۱۰ میکرومولار روی سبب شده گیاهان تحت تنش شوری ۳۵ میلی‌مولار مثل گیاهان بدون تنش رشد کنند (شکل ۱). کاهش ۵۵/۹۱٪ و ۵۵/۳۱٪ وزن تر و خشک بخش هوایی در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد، با افزودن ۱۰ میکرومولار روی به‌ترتیب ۴۰/۷۴ و ۳۷/۵٪ تغییر یافت. کاهش ۶۸/۳٪ و ۶۶/۶٪ وزن تر و خشک ریشه نیز با افزودن ۱۰ میکرومولار روی ۶۰٪ محاسبه شد (شکل ۲).

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر تیمار روی بر شاخص‌های گیاه پریوش

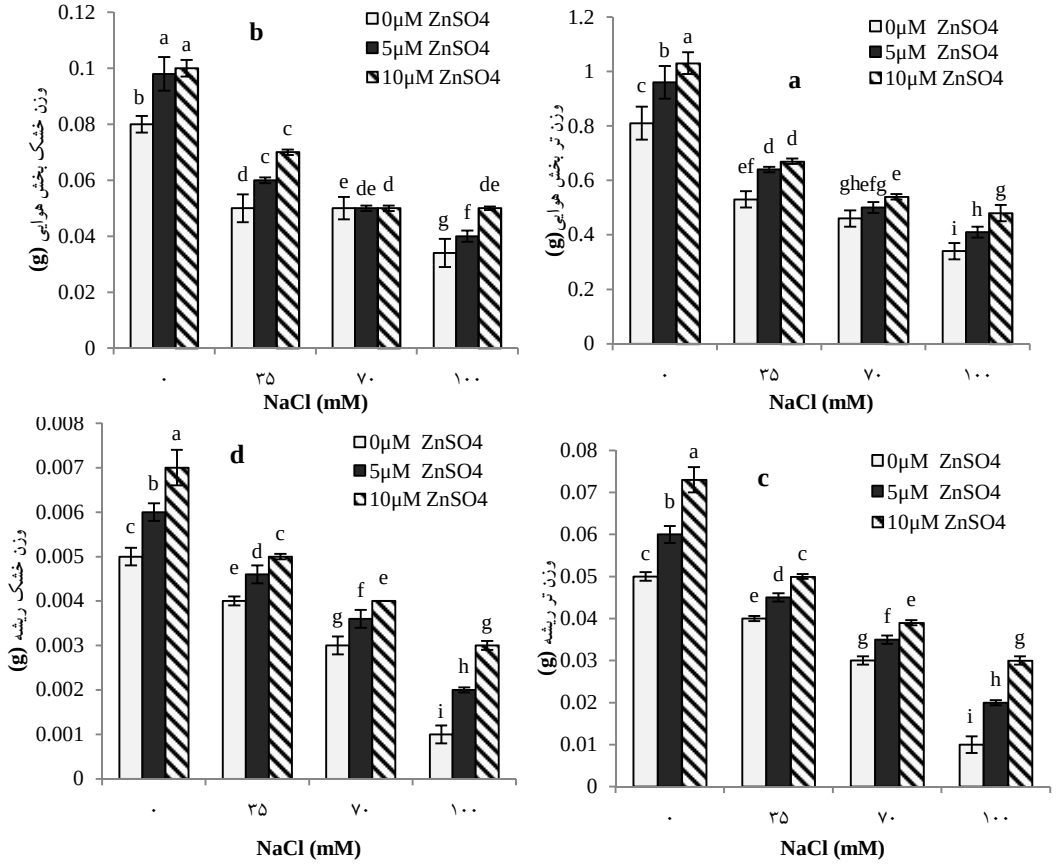
شاخص	تیمار روی (میکرومولار)		
	۰	۵	۱۰
ارتفاع بخش هوایی (cm)	۴/۰۶ c ±۰/۵۲	۴/۳۵ b ±۰/۶۵	۴/۷۵ a ±۰/۸۱
عمق ریشه (cm)	۴/۸ c ±۱/۱۶	۵/۷۶ b ±۱/۲۳	۶/۵۳ a ±۱/۰۴
وزن تر بخش هوایی (g)	۰/۵۳ c ±۰/۱۸	۰/۶۳ b ±۰/۲۲	۰/۶۸ a ±۰/۲۲
وزن خشک بخش هوایی (g)	۰/۰۵ c ±۰/۰۲	۰/۰۶ b ±۰/۰۲۳	۰/۰۷ a ±۰/۰۲۲
وزن تر ریشه (g)	۰/۰۳ c ±۰/۰۲	۰/۰۴ b ±۰/۰۲	۰/۰۵ a ±۰/۰۲
وزن خشک ریشه (g)	۰/۰۰۳ c ±۰/۰۰۲	۰/۰۰۴ b ±۰/۰۰۲	۰/۰۰۵ a ±۰/۰۰۲
پرولین (µmol/g FW)	۱۱/۰۲ a ±۴/۴۶	۱۰/۰۹ b ±۴/۳۵	۹/۳۹ c ±۴/۱۵
پروتئین (mg/g FW)	۰/۴۵ c ±۰/۰۹۵	۰/۵۲ b ±۰/۰۷۸	۰/۵۵ a ±۰/۰۷۳
بازدارندگی DPPH (I%)	۲۶/۵۹ c ±۱۲/۲	۲۸/۸۷ b ±۱۳/۳	۳۰/۸ a ±۱۴/۳۵
فعالیت سوپراکسیددیسموتاز (unit mg^{-1} protein)	۳۰/۸۴ c ±۱۹/۴۲	۳۷/۱۵ b ±۲۱/۶	۴۲ a ±۲۴/۶۱
فعالیت کاتالاز (µmol mg^{-1} protein min^{-1})	۰/۰۲ c ±۰/۰۰۷	۰/۰۲۱ b ±۰/۰۰۷	۰/۰۲۲ a ±۰/۰۰۸
گایاکول پراکسیداز (µmol mg^{-1} protein min^{-1})	۰/۰۴ c ±۰/۰۱۲	۰/۰۴۲ b ±۰/۰۱۳	۰/۰۴۵ a ±۰/۰۱۵

در هر ردیف داده‌های (میانگین ۳ تکرار ±SD) دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ در آزمون دانکن ندارند.



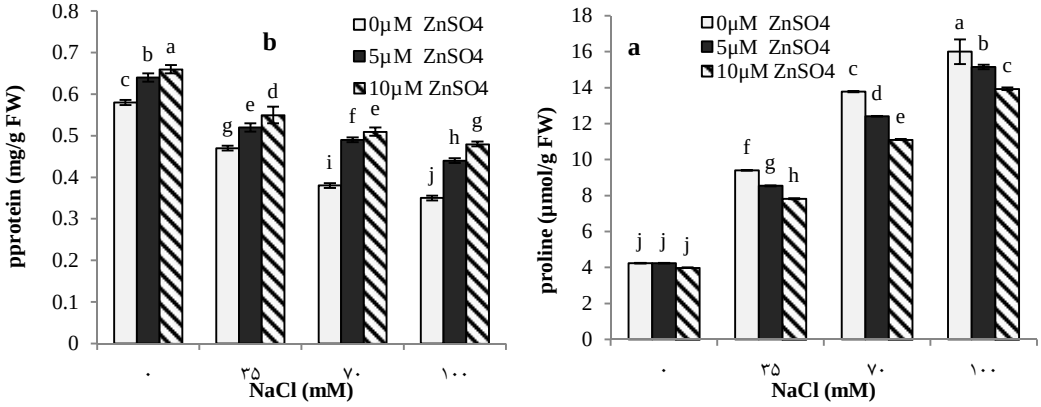
شکل ۱– مقایسه میانگین‌های اثر متقابل شوری و تیمار روی بر a) ارتفاع بخش هوایی و b) عمق ریشه پریوش

خطوط و حروف غیرمشابه به‌ترتیب نشان‌دهنده انحراف میانگین (SD) و معنی‌داربودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد.



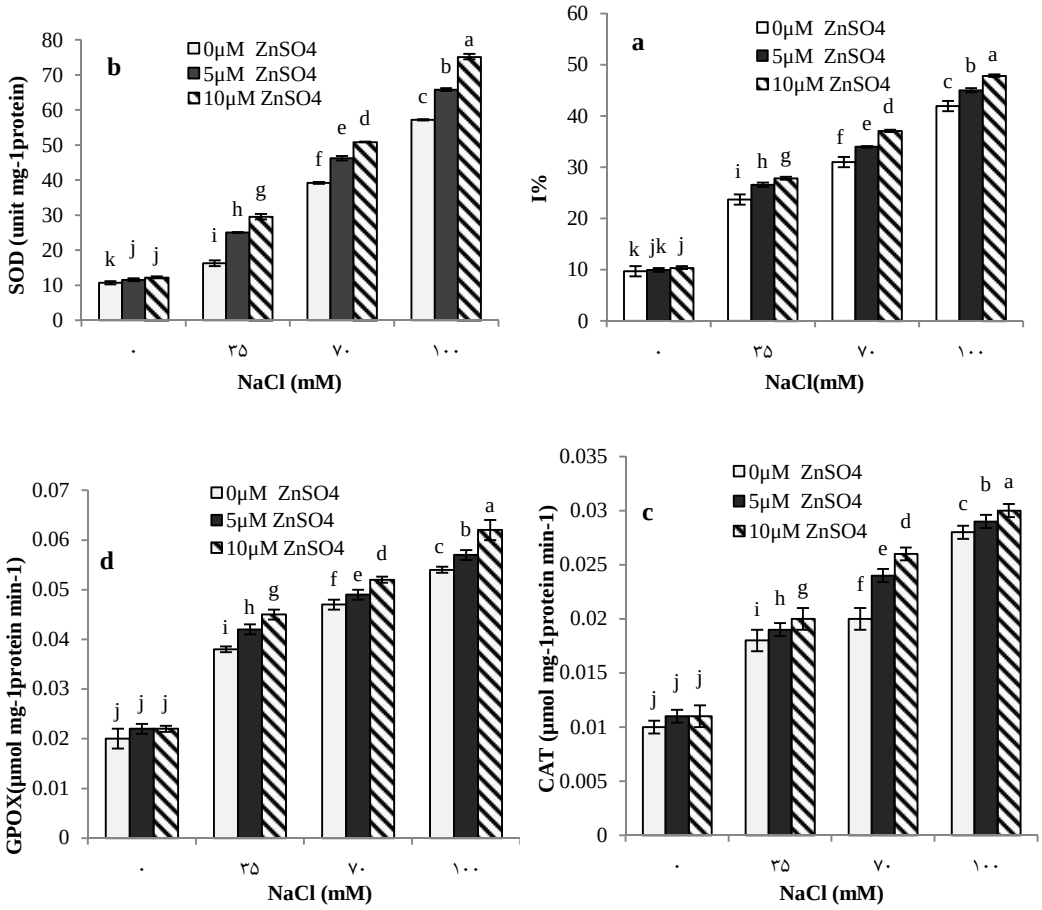
شکل ۲– مقایسه میانگین‌های اثر متقابل شوری و روی بر a) وزن تر، b) وزن خشک بخش هوایی (ساقه و برگ)، c) وزن تر، d) وزن خشک و g) ریشه پریوش

خطوط نشان‌دهنده انحراف میانگین (SD) است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها برای هر شاخص می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمار شوری و روی بر میزان a) پرولین و b) پروتئین پریوش

خطوط نشانه انحراف میانگین SD و حروف غیرمشابه نشانه معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌هاست.



شکل ۴- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمار شوری و تیمار روی بر a) درصد تخریب DPPH (I%)، b) فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، c) کاتالاز و d) گایاکول پراکسیداز پریوش

خطوط نشان‌دهنده انحراف میانگین SD و حروف غیرمشابه نشانه معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد.

بیشترین و کمترین میزان پروتئین به‌ترتیب در تیمار ۱۰ میکرومولار روی (بدون شوری) و ۱۰۰ میلی‌مولار شوری (بدون روی) مشاهده می‌شود. کاهش ۳۳٪ میزان پروتئین در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد با افزودن ۱۰ و ۵ میکرومولار روی به کاهش ۱۷/۲۴ و ۲۴/۱۳ درصدی تغییر کرد. افزایش ۳/۶۴ برابری پرولین در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار، در حضور ۱۰ و ۵ میکرومولار روی به‌ترتیب به افزایش ۳/۲۸ و ۳/۵۷ برابری تغییر کرد (شکل ۳). کمترین میزان I% (درصد تخریب رادیکال DPPH) و مقدار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز در گیاهان شاهد مشاهده می‌شود. در سطوح مختلف شوری با افزایش روی میزان I% و فعالیت هر سه آنزیم افزایش معنی‌داری می‌یابد. به‌طوری که بیشترین میزان I% و فعالیت هر سه آنزیم در گیاهان تحت شوری ۱۰۰ میلی‌مولار که به‌ترتیب ۱۰، ۵ و ۰ میکرومولار روی دریافت کرده‌اند، مشاهده می‌شود. در این تیمارها میزان I% به‌ترتیب ۳۹۲/۸۹٪، ۳۶۳/۵٪ و ۳۳۱/۹۲٪ نسبت به شاهد افزایش نشان می‌دهد. در همین تیمارها افزایش فعالیت آنزیم SOD به‌ترتیب ۶۰۳/۱۷٪، ۵۱۵/۱۴٪ و ۴۳۴/۴۸٪، افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز به‌ترتیب ۲۰۰٪، ۱۹۰٪ و ۱۸۰٪ و برای GPOX ۲۱۰٪، ۲۰۰٪ و ۱۷۰٪ نسبت به شاهد مشاهده می‌شود (شکل ۴). در سایر سطوح شوری (۳۵ و ۷۰ میلی‌مولار) نیز افزودن روی اثرات مشابهی را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار ارتفاع بخش هوایی، عمق ریشه، وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه گیاه پریوش را در معرض تنش شوری نشان داد، به‌طوری که با افزودن روی به محیط شور، شاخص‌های رشدی فوق بهبود یافتند. البته نتایج مشابه برای گیاه سویا نیز گزارش شده‌است (Weisany *et al*., 2012). کاهش رشد گیاهان تحت تنش شوری به علت تأثیر شوری بر فرایندهای بیوشیمیایی از قبیل جذب CO_2 و نیتروژن، سنتز پروتئین و یا به علت افزایش غلظت یون‌های سمّی Na و Cl می‌باشد. شوری رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، زیرا غلظت بالای نمک در محلول خاک با جذب یون‌های مغذی ضروری به‌وسیله گیاه تداخل می‌کند. از طرفی تنش شوری سنتز آبسزیک اسید را القا می‌کند و آبسزیک اسید سبب بسته شدن روزنه‌ها می‌شود. در نتیجه بسته شدن روزنه‌ها فتوسنتز کاهش می‌یابد و مهار نوری و تنش اکسیداتیو اتفاق می‌افتد (Tester & Davenport, 2003).

بهبود وضعیت تغذیه‌ای روی می‌تواند به حفاظت گیاهان در برابر سمّیت نمک کمک کند، بنابراین برای رشد گیاه در شرایط شور مهم است. این نقش حفاظتی روی به نقش این عنصر در نگهداری تمامیّت ساختاری غشاء پلاسمایی و کنترل جذب Na و یون‌های سمّی دیگر نسبت داده می‌شود (Weisany *et al*., 2012). بررسی گیاه فلفل، کاهش تولید ماده خشک بخش هوایی را تحت تنش شوری نشان داد. با کاربرد روی در این شرایط میزان این کاهش‌ها بسیار کمتر از زمانی بود که گیاهان تنها با شوری تیمار شده بودند و روی دریافت نکرده بودند (Aktas *et al*., 2006). به علت نقش روی در بیوسنتز ایندول-۳-استیک اسید از طریق پیش‌ماده تریپتوفان، افزودن روی به گیاهان تحت تنش شوری، باعث غلبه گیاه بر اثرات زیان‌آور شوری می‌شود (Mousavi, 2011). روی یکی از عناصر مهم متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌باشد. تعداد زیادی از آنزیم‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، به‌وسیله روی فعال می‌شوند. علاوه‌بر کربونیک انیدراز، آنزیم‌های فروکتوز-۱،۶-بیس‌فسفات و آلدولاز به‌وسیله روی فعال می‌شوند (Mousavi, 2011). همچنین عنصر روی ظرفیت جذب و انتقال آب را در گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهد و اثرات زیان‌آور دوره‌های کوتاه‌مدت تنش شوری و گرما را کاهش می‌دهد (Tavallali *et al*., 2010).

نتایج این بررسی افزایش معنی‌دار پرولین را همراه با افزایش سطوح شوری نشان می‌دهد. تیمار پریوش تحت تنش شوری با روی باعث کاهش محتوای پرولین گیاه تحت تنش شد. نتایج مشابه برای سویا نیز (Weisany *et al*.,

2012) گزارش شده‌است. تجمع پرولین را می‌توان به حفظ تعادل اسمزی در سطح سلولی در بسیاری از گیاهان رشد یافته در سطوح شوری بالا نسبت داد (Weisany *et al.*, 2012). سلول با سنتز و تجمع ترکیب‌های محافظ اسمزی مثل پرولین به تنش شوری بلندمدت و کوتاه‌مدت پاسخ می‌دهد. این ترکیب‌ها مولکول‌هایی کوچک و غیرسمّی هستند که پتانسیل اسمزی سلول را افزایش می‌دهند (Celik & Atak, 2012). گیاهان با افزایش پتانسیل اسمزی درون بافت‌های خود، غلظت‌های بالای نمک را تعدیل می‌کنند. سنتز پرولین در گیاهان از دو مسیر گلوتامات و اورنیتین انجام می‌شود. در شرایط تنش اسمزی، مسیر گلوتامات منبع اصلی تولید پرولین است. پرولین اکسیداز آنزیم اصلی تنظیم‌کننده تجمع اسمولیت‌ها است که پرولین را به گلوتامات تبدیل می‌کند (Celik & Atak, 2012). ارتباط بین تجمع پرولین و تحمل تنش شوری در مطالعات مختلفی گزارش شده، به‌طوری که مقدار پرولین در گیاهان مقاوم به تنش نسبت به گیاهان حساس بیشتر است (Misra & Gupta, 2005). پرولین ترکیب مهمی است که با تثبیت پروتئین‌ها و غشاء سلولی، سلول‌ها را در برابر تنش‌های اکسیداتیو نیز محافظت می‌کند (Wang & Han, 2009). بنابراین پرولین را می‌توان در فهرست آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی قرار داد که میکروب‌ها، جانوران و گیاهان برای خنثی کردن اثرات بازدارنده ROS به آن احتیاج دارند (Gill & Tuteja, 2010). کاهش محتوای پرولین با تیمار روی ممکن است به اثر رقیق‌سازی مربوط باشد (Weisany *et al.*, 2012). از آنجایی‌که ژن‌های پرولین طی تنش‌ها بیشتر بیان می‌شوند و پرولین به‌عنوان یک حفاظت‌کننده اسمزی در برابر تنش‌ها عمل می‌کند (Zhu, 2002)، بنابراین کاهش پرولین با افزودن روی نشان می‌دهد که سطوح مورد استفاده روی برای گیاه تنش محسوب نشده و روی با کاهش اثرات زیان‌آور شوری نیاز به سنتز پرولین را در گیاهان تحت تنش کم کرده‌است.

نتایج مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار محتوای پروتئین را با افزایش شوری نشان داد و تیمار گیاهان پریوش تحت تنش شوری با عنصر روی، اثرات منفی شوری بر کاهش پروتئین برگ را تا حدودی تسکین داد. البته نتایج مشابه برای پسته نیز گزارش شده‌است (Tavallali *et al.*, 2010). غلظت بالای سدیم از جذب مواد غذایی دیگر از قبیل پتاسیم جلوگیری می‌کند که می‌تواند از طریق تداخل سدیم در انتقالات غشاء پلاسمایی ریشه، از قبیل کانال‌های یونی انتخابی پتاسیم و یا کاهش رشد ریشه به‌واسطه غلظت‌های بالای سدیم باشد. میزان بالای سدیم یا نسبت بالای سدیم به پتاسیم فرایندهای آنزیماتیک متنوعی را در سیتوپلاسم مختل می‌کند. پتاسیم در سنتز پروتئین به‌عنوان متصل‌کننده tRNA به ریبوزوم‌ها عمل می‌کند، بنابراین اختلال در سنتز پروتئین آسیب اصلی سدیم است (Tester & Davenport, 2003). کاهش پروتئین در غلظت‌های بالای NaCl ممکن است به‌دلیل هیدرولیز پروتئین نیز باشد. روی عنصر ضروری برای سنتز پروتئین و حفظ تمامیّت غشاهای زیستی است. در کمبود روی سنتز پروتئین متوقف می‌شود و آمینواسیدها و آمیدها تجمع می‌یابند (Weisany *et al.*, 2012).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار شوری باعث افزایش میزان محتوای آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود. تیمار روی در این شرایط به این افزایش کمک می‌کند، بنابراین گیاهان تیمار شده با روی و شوری نسبت به آنهایی که تنها با شوری تیمار شده‌اند فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را دارند. مشابه افزایش فعالیت تخریب رادیکال آزاد DPPH در گیاه *Cakile maritime* که تحت تنش شوری (Ksouri *et al.*, 2007) گزارش شده‌است. تنش شوری به طرق مختلف منجر به تولید گونه‌های اکسیژنی واکنش‌گر در گیاهان می‌شود. گیاهان با کاهش هدایت روزنه‌ای به‌منظور جلوگیری از هدر رفت آب، به تنش شوری پاسخ می‌دهند. با این کار غلظت CO_2 درونی کاهش می‌یابد و احیای CO_2 به‌وسیله چرخه کالوین کم می‌شود (Abogadallah, 2010). این پاسخ منجر به کاهش $NADP^+$ (حالت اکسیده) که به‌عنوان پذیرنده نهایی الکترون در فتوسیستم I عمل می‌کند، می‌شود. به‌دنبال کاهش $NADP^+$ جریان الکترون به O_2 و تشکیل رادیکال O_2^- افزایش می‌یابد (Hsu & Kao, 2003). از طرفی کاهش

CO_2 درونی واکنش‌های چرخه کالوین را کم می‌کند و تنفس نوری را به‌ویژه در گیاهان C_3 القا می‌کند که منجر به تولید H_2O_2 بیشتر در پراکسی‌زوم می‌شود (Ghannoum, 2009). سوپراکسید دیسموتاز در مقاومت گیاهان به تنش‌های اکسیداتیو بسیار مهم است و اولین خط دفاعی را در برابر اثرات سمّی ایجاد شده با ROS فراهم می‌کند (Gill & Tuteja, 2010). در گیاهان تعدادی از آنزیم‌ها سطوح H_2O_2 درون سلولی را تنظیم می‌کنند. بنابراین به نظر می‌رسد آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز از مهمترین این آنزیم‌ها هستند (de Azevedo Neto *et al*., 2006).

در تیمار NaCl+Zn افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مشاهده شد که علت آن می‌تواند تنش اکسیداتیو ایجاد شده به‌وسیله NaCl و به دنبال آن القاء بیوسنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به‌وسیله روی باشد. بنابراین در شرایط تنش شوری عنصر روی با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، آسیب اکسیداتیو ایجاد شده به‌وسیله تنش شوری را تا حدود زیادی کم می‌کند. این نتایج پیشنهاد می‌کند که آسیب غشایی القاء شده به‌وسیله NaCl و تنش اکسیداتیو به‌طور کارآمدی به‌وسیله مکمل Zn کنترل می‌شود (Tavallali *et al*., 2010).

به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان گفت که به‌دلیل تأثیر عنصر روی بر ساخت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، این عنصر عامل مهمی در سیستم دفاعی گیاه در برابر گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد. بنابراین، بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه پریوش با عنصر روی به‌صورت محلول‌پاشی بر روی برگ یا همراه آبیاری، برای بقاء این گیاه تحت شرایط تنش اکسیداتیو ناشی از شوری حائز اهمیت است. با توجه به آهکی بودن خاک‌های ایران و شرایط خشک و نیمه‌خشک کشور با بارندگی کم که موجب کاهش شدید حلالیت عناصر ریزمغذی به‌ویژه روی در خاک می‌گردد و همچنین عدم رواج کودهای محتوی روی، به نظر می‌رسد که روش محلول‌پاشی مناسب‌تر باشد، از این‌رو مقایسه روش محلول‌پاشی یا آبیاری ریزمغذی عنصر روی در تحقیقات بعدی پیشنهاد می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Abogadallah, G.M., 2010. Antioxidative defense under salt stress. Plant Signaling and Behavior, 5(4): 369-374.
- Akhani, H. and Ghorbani, M., 1992. A contribution to the halophytic vegetation and flora of Iran: 35-44. In: Lieth, H. and Al Masoom, A.A., (Eds). Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 521p.
- Aktas, H., Abak, K. and Ozturk, L., 2006. The effect of zinc on growth and shoot concentrations of sodium and potassium in pepper plants under salinity stress. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 30(6): 407-412.
- Bates, L.S., Waldron, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studied. Plant and Soil, 39: 205-207.
- 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.
- Cakmak, I. and Marschner, H., 1992. Manesium deficiency and high light inensity enhance activities of superoxide dismutase, ascrobate peroxidase, and glutatione reductase in bean leaves. Plant Physiology, 98(4): 1222-1227.
- Celik, O. and Atak, C., 2012. The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties. Turkish Journal of Biology, 36(3): 339-356.
- de Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C.E.B. and Gomes-Filho, E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany, 56: 87-94.
- Ghannoum, O., 2009. C4 photosynthesis and water stress. Annals of Botany, 103: 635-644.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59(2): 309-314.
- Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48(12): 909-930.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular, 347: 1-32.
- Hsu, S.Y. and Kao, C.H., 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. Plant Growth Regulation, 39: 83-90.

- Polle, A., Otter, T. and Seifert, F., 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea Abies* L.). Plant Physiology, 106: 53-56.
- Tavallali, V., Rahemi, M., Eshghi, S., kholdebarin, B. and Ramezanian, A., 2010. Zinc alleviates salt stress and increases antioxidant enzyme activity in the leaves of pistachio (*Pistacia vera* L. Badami) seedlings. Turkish Journal Agriculture Forestry, 34(4): 349-359.
- Tester, M. and Davenport, R., 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Annual Botany, 91(5): 503-527.
- Wang, X.S. and Han, J.G., 2009. Changes in proline content, activity, and active isoforms of antioxidative enzymes in two alfalfa cultivars under salt stress. Agriculture Science in China, 8(4): 431-440.
- Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, G., Siosemardeh, A. and Ghassemi-Glezani, K., 2012. Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). Plant Omics Journal, 5(2): 60-67.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review Plant Biology, 53: 247-273.
- Jaleel, C.A., Sankar, B., Sridharan, R. and Panneerselvam, R., 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. Turkish Journal of Biology, 32: 79-83.
- Jouyban, Z., 2012. The effect of salt stress on plant growth. Technical Journal of Engineering and Applied Science, 2(1): 7-10.
- Kamkar, A., Shariatifar, N., Jamshidi, A.H. and Mohammadian, M., 2010. Study of antioxidant functional of the water, methanol and ethanol extracts of endemic *Cuminum cyminum* L. and *Cardaria draba* L. in the in-vitri systems. Horizon of Medical Sciences, 16(2): 37-44.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C. and Abdelly, C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 244-249.
- Misra, N. and Gupta, A.K., 2005. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. Plant Science, 169(2): 331-339.
- Mousavi, R.S., 2011. Zinc in crop production and interaction with phosphorus. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(9): 1503-1509.

Study of variability in growth, antioxidant defense system and protein content by zinc element application in periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) under salinity stress

M. Askary[1*], F. Amini[2] and L. Hosseinpour[3]

1*- Corresponding author, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
E-mail: m-askary@araku.ac.ir
2- Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
3- MSc. Student of Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

Received: April 2014 Revised: October 2014 Accepted: November 2014

Abstract

Salinity stress is one of the major abiotic stresses that have destructive effects on plant productivity and quality. An experiment was conducted to investigate the effects of zinc as alleviating agent under salinity stress on antioxidative system, proteins, proline and growth of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. at Arak University in 2012 autumn. A number of 49-days-old plants were treated with different concentrations of NaCl (0, 35, 70 and 100mM) alone and in combination with various $ZnSO_4$ concentrations (0, 5 and 10µm) for 21 days. Then, the inhibition percent of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and guaiacol peroxidase, proline and protein content and growth parameters were measured. Results showed that zinc application improved shoot length, root depth, root and shoot fresh and dry weight under all salinity treatments. As a result of salinity stress, the inhibition percent of DPPH radical and superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase activity and also proline content increased 348.5%, 475.6%, 172.7%, 200% and 364%, respectively but protein content was reduced 33%. Zinc application improved protein content up to 16% in plants under salinity treatment and also reduced the proline content up to 36%. The activity of antioxidant enzymes increased significantly in treated plants with NaCl+Zn as compared with those treated with NaCl or Zn alone. These results support the positive effects of Zn application on antioxidant defense system in vinca under salinity. Zinc may act as a scavenger of reactive oxygen species for mitigating the injury on biomembranes under salt stress.

Keywords: Proline, alleviator, superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase.