بررسی اثرات برهم کنش سالیسیلیک اسید و کلرید سدیم بر روی فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز در دو رقم کلزا

احسان نظربیگی[۱*] و نازنین بلوچی[۲]

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی گیاهی، دانشگاه علمی کاربردی پارسیان، ایلام، e_nazarbeygi@yahoo.com

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ترویج و آموزش کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایلام

چکیده

به منظور بررسی اثرات توأم شوری و سالیسیلیک اسید از ارقام کلزا با نام های هایولا ۴۰۱ و RGS استفاده گردید. بذر های مذکور از محل مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان لرستان تهیه گردیدند. در این آزمایش بذور اصلاح شدهٔ ارقام مورد نظر پس از استریل شدن توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد مورد استفاده قرار گرفتند. پس از کشت بذرها در محیط آزمایشگاهی ، دانه رست های سالم به محیط کشت نیم قدرت هوگلند در ظرف های با ظرفیت ۶۵۰ml انتقال داده شدند. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت تحت تیمارهای مختلف نمک و سالیسیلیک قرار گرفتند. گیاهان مذکور در اتاقک های تعیین شده در دورهٔ روشنایی و تاریکی به ترتیب ۱۶ و ۸ ساعت قرار گرفتند. گیاهان مذکور به منظور تهویه هوای ظروف هر روز به مدت ۲ ساعت مورد هوادهی قرار گرفتند. تیمارهای اعمال شده شامل شوری های ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی مولار و میزان سالیسیلیک اسید نیز ۵ μM میکرو مولار در نظر گرفته شد. پس از گذشت مدت زمان ۲۰ روز سنجش آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز در قسمت های ریشه و برگ انجام گرفت. باتوجه به نتایج به دست آمده مشخص گردید که با افزایش میزان تنش شوری، میزان آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز به طرز معنی داری افزایش می یابد که این افزایش در ریشه هر دو رقم بیشتر از برگ نشان داده شد. با افزودن سالیسیلیک اسید با غلظت ۵ μM به محیط های فوق میزان آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز افزایش نشان داد که این امر به از بین بردن اثرات مخرب شوری و تعدیل اثرات آن کمک می کند.

واژه های کلیدی: کلزا، کلرید سدیم، سالیسیلیک اسید، کاتالاز، پراکسیداز.

مقدمه

کلزا یا کانولا با نام علمی (*Brassica napus* L.) ، گیاهی علفی ، یکساله و از خانوادهٔ شب بو یا *Brassicacea* می باشد (مظفریان ، ۱۳۷۳ و دهشیری ، ۱۳۷۸). در حال حاضر کلزا به عنوان مهمترین گیاه روغنی و پروتئین یکساله در منطقه معتدله سرد و سرد مرطوب کشت شده و همچنین در مناطق نیمه گرم می‌تواند پروتئین و روغن قابل ملاحظه ای را در واحد سطح تولید نماید. (شهیدی و سپهر ،۱۳۸۱). شوری یکی از معضلات بسیار مهم در بخش کشاورزی در اغلب نقاط جهان می باشد که موجب کاهش عملکرد زراعی و مرغوبیت محصول در مناطق خشک و نیمه خشک می گردد. نمک های محلول اضافی در تمام خاک ها برای اکثر گیاهان مضر می باشد و

آدرس نویسنده مسئول: ایلام، دانشگاه علمی کاربردی پارسیان، گروه زیست شناسی گیاهی.

* دریافت: ۹۰/۵/۲۵ و پذیرش: ۹۰/۸/۲۴

Archive of SID

www.SID.ir

در واقع هیچ مادهٔ سمی ، رشد گیاه را بیشتر از نمک در مقیاس جهانی محدود نمی کند (Neumann، ۱۹۹۵). براساس تعریف shanon & Grieve (۱۹۹٤) شوری عبارت است از حضور بیش از اندازه نمک های قابل حل و عناصر معدنی در محلول آب و خاک که منجر به تجمع نمک در ناحیه ریشه شده و گیاه در جذب آب کافی از محلول خاک با اشکال روبرو می شود. یون هایی که در بروز شوری نقش دارند شامل : کلرور ، سولفات ، بیکربنات ، سدیم ، کلسیم ، منیزیم و به ندرت نیترات و پتاسیم می باشند، اما یون های سدیم و کلر از اهمیت زیادی برخوردارند (Dubey،۱۹۹٦). اسید سالیسیلیک (SA) یا اورتوهیدروکسی بنزوئیک به گروه متنوع فنول های گیاهی تعلق دارد که دارای یک حلقه آروماتیک با یک گروه هیدروکسیل می باشد و در گیاهان زیادی موجود می باشد (Weissmann، ۱۹۹۱). (SA) آزاد یک پودرکریستالی است که در دمای ۱۵۹-۱۵۷ درجه سانتی گراد ذوب می گردد و به ملایمت در آب حل می شود و به شدت در حلال های قطبی حل می گردد (Popova *et al*،۱۹۹۷). در طول سال های اخیر عمل سالیسیلیک اسید در به وجود آوردن آثار حفاظتی در گیاهان تحت اثر فاکتورهای استرسی در شرایط طبیعی مورد مطالعه قرار گرفته است که می توان به افزایش تحریک (SA) در مقاومت گیاه گندم به شوری اشاره کرد (Shakirova and Bezrukova، ۱۹۹۷). اسید سالیسیلیک موجب فعال شدن بسیاری از آنزیم های حفاظتی مانند کاتالاز ، سوپراکسید دیسموتاز ، آسکوربات پراکسیداز می گردد. این آنزیم ها ، سم زدایی از گونه های اکسیژنی فعال (ROS) را بر عهده دارند.سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدان گیاهی، شامل چندین آنزیم با وزن مولکولی پایین می‌باشد که از نظر سطح سلولی، در گیاهان مختلف، متفاوتند (Dixit *et al* ،۲۰۰۱). کاتالاز یک آنزیم گیاهی بوده که دارای گروه Heme می‌باشد و در همه موجودات یوکاریوتی هوازی یافت می‌شود که فرآیند تبدیل H_2O_2 را به آب و اکسیژن کاتالیز می‌کند. پراکسیداز نیز همو پروتئینی است که وجود هم برای فعالیت آپوپروتئین آنزیم ضرورت دارد. حذف مقادیر اضافی H_2O_2 و دخالت در تنظیم ظریف ، مقادیر مناسب H_2O_2 سلولی از وظایف این دو آنزیم محسوب می گردد (Nector and ، ۱۹۹۸ Foyer).

مواد و روش ها

بذرهای مورد استفاده در این پژوهش متعلق به جنس *Brassica napus* L. و ارقام هایولا ٤۰۱ و RGS می باشند، بذرهای مذکور از محل مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان لرستان تهیه گردیدند. ابتدا بذرهای سالم و یکنواخت انتخاب شده و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ قرار گرفتند و به صورت سطحی ضد عفونی شدند. سپس بذرها چندین بار با آب مقطر شستشو داده شدند. در مرحله بعدی بذرها به سبدهایی با منافذی به ابعاد تقریبی ۲×٤ mm و ۱×۳mm انتقال داده شدند و تا زمان رسیدن به مرحله دو برگی از این محیط استفاده شد. پس از گذشت یک هفته گیاهان یکنواخت انتخاب شده و از سبدها به ظروف تیره (٦۵۰ میلی لیتر) حاوی محلول هوگلند نیم قدرت (هیدروپونیک) انتقال یافتند. پس از گذشت مدت زمان ۲٤ ساعت تحت تیمارهای مختلف (غلظت های ۷۵ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار NaCl ، ۵ μM ، سالیسیلیک اسید) قرار گرفتند. به منظور جلوگیری از خفگی ریشه ها و رساندن اکسیژن کافی برای رشد ریشه ها هر روز به مدت ۲ ساعت از طریق پمپ هوا ، هوادهی می شدند. گیاهان برای مدت ۲۰ روز در اتاقکی با شرایط نوری مناسب در زیر ٦ عدد لامپ فلورسانت ۲۰ وات و ۲ عدد لامپ حبابی بزرگ آفتابی و در دما و رطوبت آزمایشگاه رشد کردند. طول دوره روشنایی و تاریکی به ترتیب ۱٦ و ۸ ساعت بود و PH در تمام محلول های غذایی تهیه شده در حد ٦/۵ تنظیم گردید. پس از گذشت مدت زمان ۲۰ روزه گیاهان به منظور اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و

Archive of SID

www.SID.ir

پراکسیداز برداشت شده و بدین منظور جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Maehly& Chance (۱۹۹۵) و برای اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش Koroi (۱۹۸۹) استفاده گردید. جهت سنجش آنزیم پراکسیداز ابتدا محلول عصاره‌گیری با حجم ۱۰۰ میلی لیتر PH ۷/۵ تهیه گردید، سپس با استفاده از یک گرم بافت تر گیاهی (برگ و ریشه بصورت جداگانه) ۵ میلی‌لیتر محلول عصاره، عصاره‌ی همگن بدست آمد. جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز نیز پس از تهیه عصاره گیاهی و سانتریفیوژ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار Spss و آزمون دانکن و آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

آنالیز واریانس نتایج بدست آمده از سنجش فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز در هر دو رقم هایولا ۴۰۱ و RGS نشان داد که با افزایش میزان کلرید سدیم به ترتیب از ۷۵ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار میزان آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز افزایش می یابد. کلرید سدیم سبب افزایش معنی دار ($p< ۰/۰۵$)، آنزیم پراکسیداز در برگ و ریشه در هر و رقم شد، که این افزایش در ریشه بیشتر از برگ در هر دو رقم می باشد. در رقم هایولا ۴۰۱، میزان آنزیم پراکسیداز در برگ گیاه تحت تیمارهای ۷۵ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولا کلرید سدیم افزایش نشان داد که این افزایش در تمامی تیمارهای مذکور معنی دار می باشد، در همین رقم ، میزان آنزیم پراکسیداز ریشه نیز همزمان با افزایش سطوح شوری به ترتیب در تیمارهای ۷۵ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم افزایش یافت. با افزودن ۵ μM سالیسیلیک اسید به هر کدام از تیمارهای ۷۵ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار، میزان آنزیم پراکسیداز در برگ و ریشه به صورت معنی داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافت که نشان دهنده تعدیل تنش در تیمارهای مذکور می باشد (نمودارهای ۱ و ۲). در رقم RGS میانگین آنزیم پراکسیداز در برگ گیاه تحت تیمارهای ذکر شده افزایش و در ریشه هم به همین ترتیب بود که این افزایش در ریشه بیشتر از برگ نشان داده شده شد. با کاربرد همزمان ۵ μM سالیسیلیک اسید میزان آنزیم پراکسیداز بصورت معنی داری ($p< ۰/۰۵$) افزایش یافت (نمودارهای ۳ و ٤). با مقایسه دو رقم از نظر آنزیم پراکسیداز در برگ و ریشه ، افزایش آنزیم پراکسیداز در اثر تنش کلرید سدیم در رقم هایولا ٤۰۱ بیشتر از رقم RGS بود و افزایش آنزیم پراکسیداز در اثر اعمال تیمار سالیسیلیک اسید در رقم هایولا ٤۰۱ بیشتر از RGS بود. کلرید سدیم سبب افزایش معنی دار ($p< ۰/۰۵$) ، آنزیم کاتالاز در برگ و ریشه هر دو رقم شد. در رقم هایولا ٤۰۱ ، میزان آنزیم کاتالاز در برگ گیاه در تیمارهای مذکور افزایش یافت که این افزایش برای رقم RGS نیز مشاهده گردید. میزان آنزیم کاتالاز ریشه در گیاه در رقم هایولا ٤۰۱ و RGS با افزایش شوری افزایش یافت که این افزایش در هر دو رقم معنی دار ($p< ۰/۰۵$) می باشد. میزان افزایش آنزیم کاتالاز در ریشه در هر دو رقم بیشتر از برگ می باشد. با اعمال تیمارهای سالیسیلیک اسید (۵ μM) به تیمارهای ۷۵ ،۱۰۰ و ۱۵۰میلی مولار کلرید سدیم، افزایش معنی داری ($p< ۰/۰۵$) در میزان آنزیم کاتالاز در برگ و ریشه هر دو رقم مشاهده گردید (نمودارهای ۵ و ٦ و ۷ و ۸). با مقایسه دو رقم از نظر میزان افزایش آنزیم کاتالاز این افزایش در اثر تنش شوری در رقم هایولا ٤۰۱ بیشتر از رقم RGS بود و با اعمال تیمار سالیسیلیک اسید، افزایش در میزان آنزیم کاتالاز در رقم هایولا ٤۰۱ بیشتر از رقم RGS بود.

کاتالاز ها و پراکسیداز ها از جمله آنزیم هایی به شمار می آیند که نقش بسیار مهمی در پاسخ به تنش های غیر زیستی از جمله تنش شوری دارند. پراکسیداز ها مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسیداز هیدروژن می باشند. (Shalini and Duey ،۲۰۰۳)، کاتالاز نیز یک آنزیم فراوان گیاهی دارای گروه هِم بود، که در همه موجودات یوکاریوتی هوازی یافت می شود که فرآیند تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن را کاتالیز می کند. گزارشات متعددی

Archive of SID

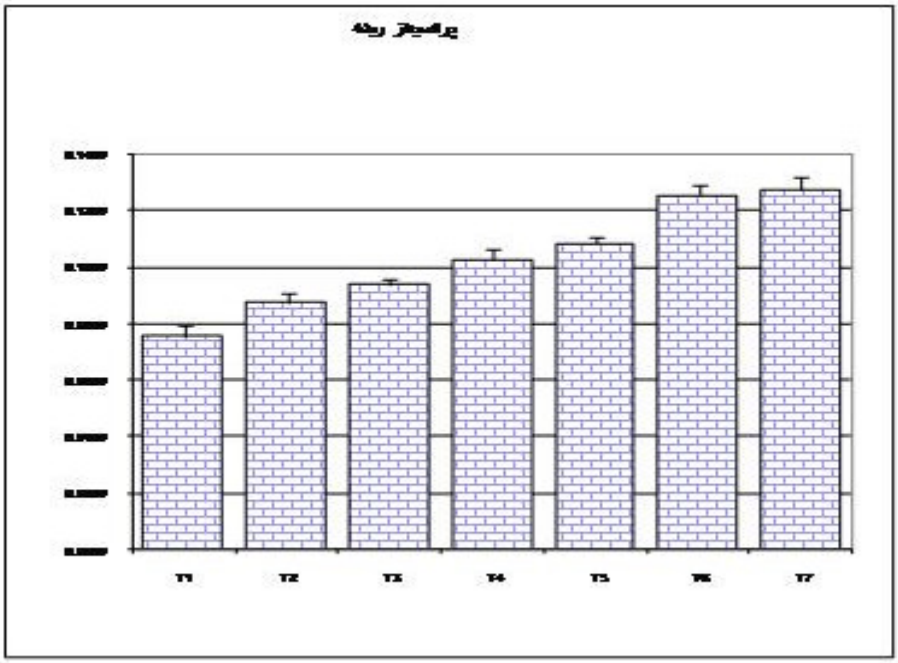
www.SID.ir

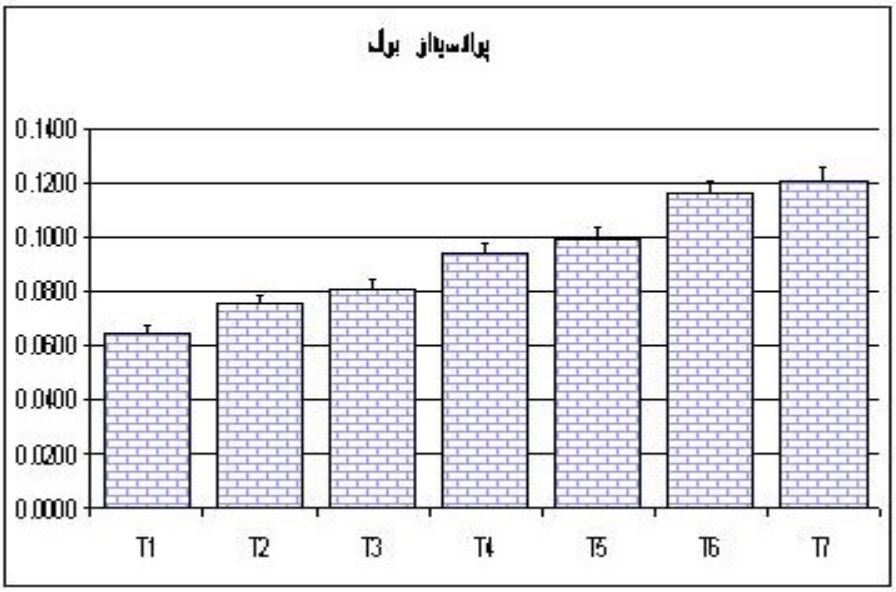
وجود دارند که حاکی از افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز تحت تنش زیستی و غیر زیستی می باشند که می توان به افزایش فعالیت پراکسیداز تحت اثر کلرید سدیم در گوجه فرنگی اشاره نمود (Ajloini *et al*، ۱۹۹۸). Sudhakar و همکاران در سال ۲۰۰۱ به بررسی اثر شوری در دو رقم توت سفید (*Morus alba* L.) پرداختند و ملاحظه نمودند که فعالیت کاتالاز و پراکسیداز تحت استرس شوری به طور معنی داری افزایش یافت، و درصد فعالیت در رقم بردبار بیشتر از رقم حساس بود. افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز در دانه رست های گندم تحت شوری توسط Sairam و همکاران در سال ۲۰۰۲ مورد بررسی قرار گرفت. Neto و همکاران در ۲۰۰۵ ضمن مطالعه اثر شوری بر ذرت گزارش کردند که تحت استرس شوری فعالیت پراکسیداز در رقم بردبار افزایش می یابد. برخی از محرک های زیستی مثل سالیسیلیک اسید (SA) موجب ساخت انتی اکسیدان ها مثل کاتالاز و پراکسیداز می شوند که با این عمل موجب پاکسازی گونه های اکسیژن فعال که در طی تنش ایجاد شده اند، می شوند. SA به طور مستقیم یا غیر مستقیم آنزیم های آنتی اکسیدان را فعال می کند که می تواند به عنوان یک سوبسترای دهنده الکترون برای کاتالاز و پراکسیداز عمل نماید و در کاهش تنش به وجود آمده نقش مهمی بازی می کند. با توجه به نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر مشخص گردید که تنش شوری باعث آزاد شدن رادیکال های آزاد و به وجود آمدن استرس اکسیداتیو می شود که منجر به افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز می گردد که این آنزیم های سم زدا در کاهش تنش به وجود آمده و حذف مقادیر اضافی H_2O_2 نقش مهمی را ایفا می نمایند. سالیسیلیک اسید نیز با افزایش تحریک آنزیم های آنتی اکسیدان در شرایط تنش باعث به وجود آمدن یک سیستم تعدیل کنندهٔ تنش در گیاه می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

Control	T1
NaCl75	T2
NaCl75+SA	T3
NaC100	T4
NaCl100+SA	T5
NaCl150	T6
NaCl150+SA	T7

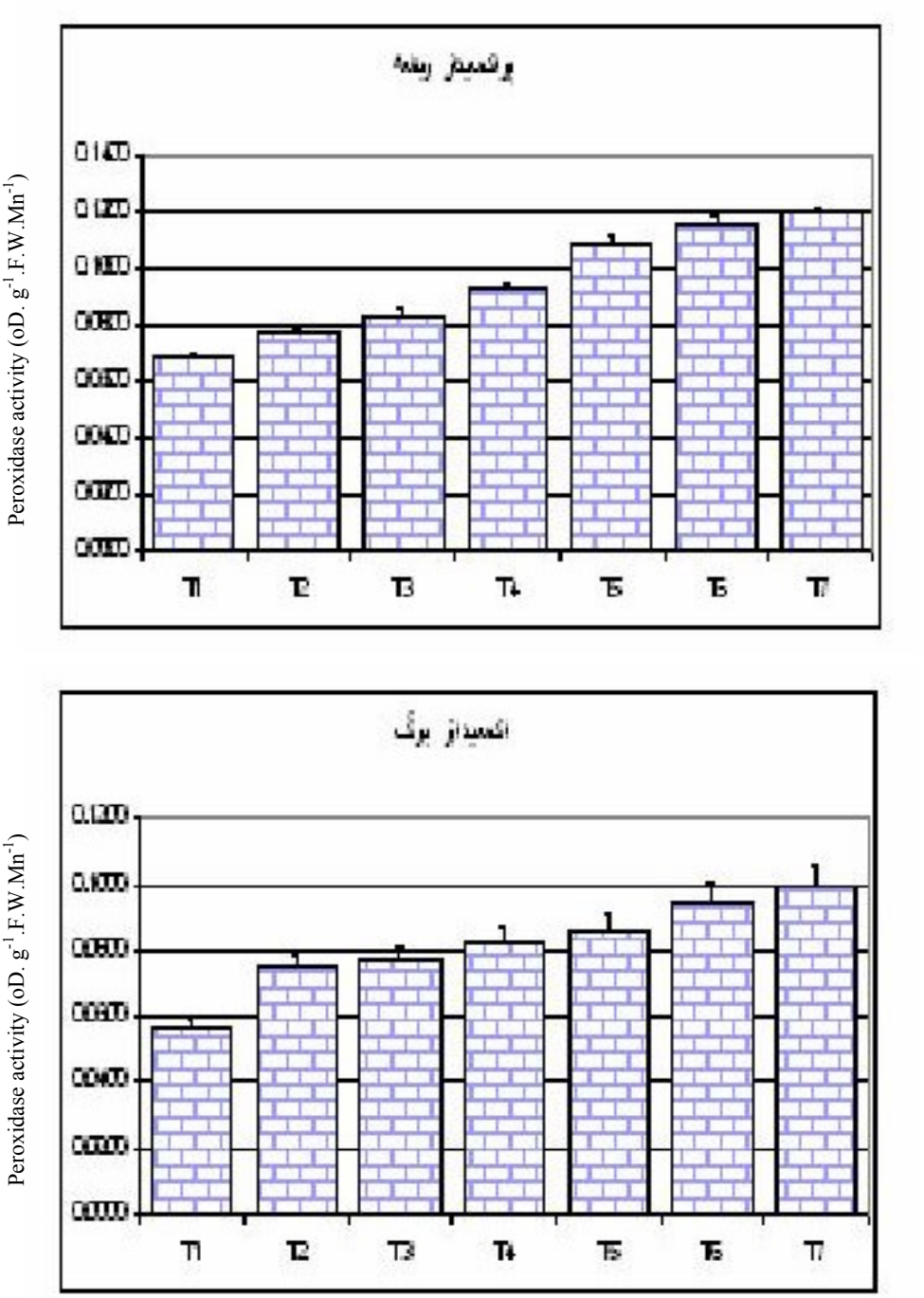




نمودارهای ۱و۲ – بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ و ریشه رقم هایولا ۴۰۱

www.SID.ir

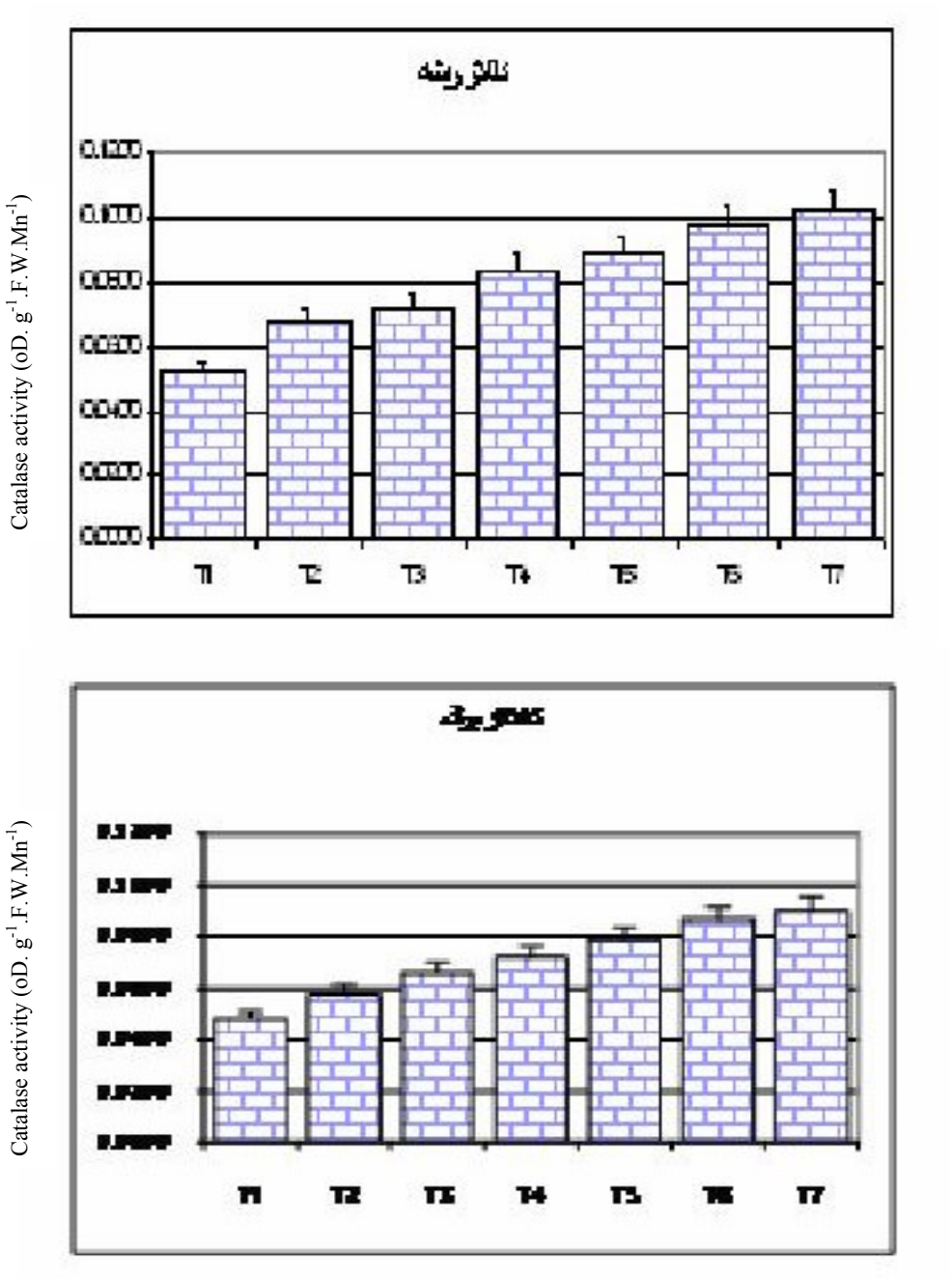
Control	T1
NaCl75	T2
NaCl75+SA	T3
NaC100	T4
NaCl100+SA	T5
NaCl150	T6
NaCl150+SA	T7



نمودارهای ۳و ٤ – بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ و ریشه رقم RGS

www.SID.ir

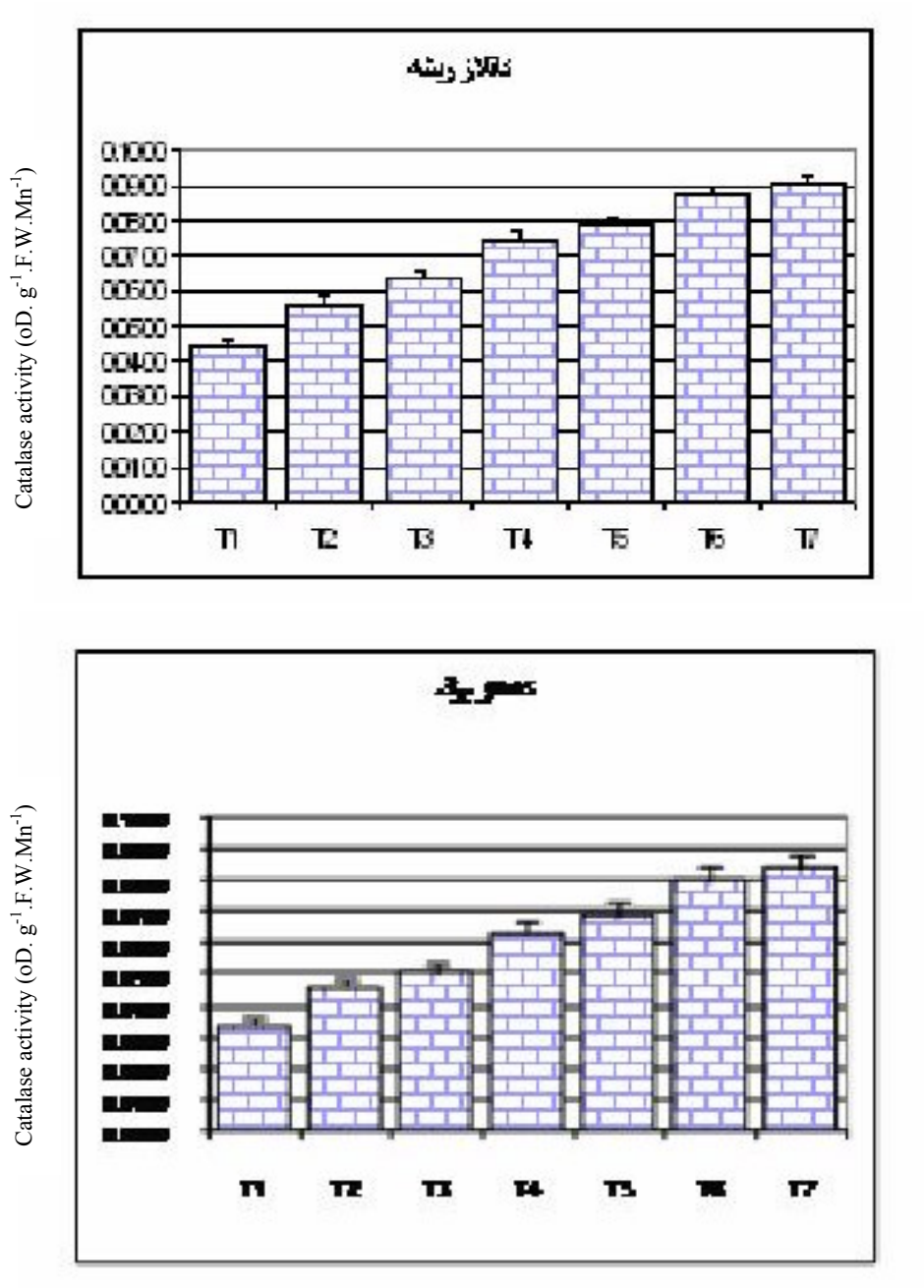
Control	T1
NaCl75	T2
NaCl75+SA	T3
NaC100	T4
NaCl100+SA	T5
NaCl150	T6
NaCl150+SA	T7



نمودارهای ۵و ٦– بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ و ریشه رقم هایولا ٤٠١

www.SID.ir

Control	T1
NaCl75	T2
NaCl75+SA	T3
NaC100	T4
NaCl100+SA	T5
NaCl150	T6
NaCl150+SA	T7



نمودارهای ۷و ۸ – بررسی اثر نمک و سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت آنزیم کاتالازدر برگ و ریشه رقم RGS

www.SID.ir

فهرست منابع

۱. دهشیری ، عباس ، ۱۳۷۸، زراعت کلزا ، انتشارات فنی دفتر تولید برنامه ها ی ترویجی وزارت جهاد کشاورزی.

۲. شهیدی، اسماعیل و سپهر، کورش، ۱۳۸۱، شته های کلزا ، انتشارات فنی معاونت ترویج وزارت جهاد کشاورزی.

۳. مظفریان، ولی ا... ، ۱۳۷۳،رده بندی گیاهی ، انتشارات نشر دانش آموز.

4.Ajlouni, M ., Mohammad , M., Nimril ., Shibli , R. (1998) Tomato root and shoot response to salt stress under different levels of phosphorus nutrition , Journal of Plant nutrition .

5.Chance, B., Maehly, C. (1995) Assay of catalase and peroxidase, Methods in Enzymol. 11:764-775.

6.Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001) Differential antioxidative responses to heavy metal in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. CV. Azad), J. of Exp. Bot-,52:(358): 1101-1109

7.Dubey, R.S. (1994) Protein synthesis by plant under stressful conditions, In Hand book, of plant and crop stress (ed.M. pessarakli)., 277-299.

8.Koroi, S.A.A.(1998) Gelek trophers tische and spectral photometris chon under change zomein fiussder temperature. And stracture peroxides iso enzyme, physiol. Veg., 20: 15-22.

9.Nector, G., Foyer, C.H. (1998) Ascorbat and glutathione: keeping active oxygen under control , Annu. Rev. Plant physiol. Plant. Mol. Biol., 49: 249-279.

10. Neto , A.D., Gomes – Filo , E. (2005) Effect of salt stress on antioxidant and lipid peroxidation in leaves and roots of salt – tolerant and salt – sensitive maize genotype , Environmental and EXP Bot., 56 (1) : 87-94 .

11. Neumann, P.M.(1995) Inhibition of root growth by salinity stress: Toxicity or on adaptive biophysical response , The Netherlands : Kluwer Academic publishers., PP: 229-304.

12. Popova, L., Pancheva . T., Uzunova, A. (1997) Salicylic acid : Properties , Biosynthesis and Physiological role , Bulge . J. Plant Physiol., 23:85-93.

13. Sairam , R.K., Srivastava , G.C. (2002) Change in antioxidant activitiy sub – cellular function of tolerant and Susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress ., 162: 897-904 .

14. Shakirova , F.M., Bezrokova , M.V. (1997) Induction of wheat resistance against environmental salinization by salicylic acid , Biology Biol Bull., 24 :109-112 .

15. Shalini ,V ., Duey , R.S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, Plant Science ., 164 : 1645-1655 .

16. Shannon , M.C., Griere , C.M., and francois , L.E.(1994) Whole plant response to salinity , Marcel Dekker , New York ., 199-244.

17. Sudhakar , C. (2001) Change in the antioxidant enzyme efficacry in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba L.*) under NaCl Salinity , Plant Science ., 161: 613-619.

Weissmann, G.(1991) Aspirin , Sci . Am. , 264:84-90 .

Archive of SID

www.SID.ir