اثر سولفات بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و نیترات ردوکتاز در دو بخش هوایی و زیرزمینی گیاه کلزا رقم هایولا

*مریم نیاکان[۱]، محمدحسین محمدی[۱]، ولی‌الله رامئه[۲]، عباسعلی نوری‌نیا[۳]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
۲. مرکز تحقیقات کشاورزی مرکز ساری
۳. مرکز تحقیقات کشاورزی مرکز گرگان

چکیده

در پژوهش حاضر تاثیر مقادیر مختلف سولفات آمونیوم شامل ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ کیلوگرم برهکتار در کشت مزرعه‌ای گیاه کلزا رقم هایولا ٤٠١ بررسی و میزان رنگیزه‌های کلروفیل a و b، کاروتن و گزانتوفیل، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و نیترات ردوکتاز در اندام‌های هوایی و زیرزمینی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که با افزایش میزان سولفات آمونیوم، رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a و b، کاروتن و گزانتوفیل در برگ‌های کلزا افزایش معنی‌داری یافت. در ریشه و برگ فعالیت آنزیم پراکسیداز و نیترات ردوکتاز، با افزایش میزان سولفات روند صعودی را در مقایسه با شاهد را نشان داد، در حالی که فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تاثیر مقادیر مختلف سولفات قرار نگرفت.

کلمات کلیدی: پراکسیداز ـ رنگیزه ـ سولفات ـ کاتالاز ـ کلزا ـ نیترات ردوکتاز

مقدمه

گوگرد یکی از عناصر هفده‌گانه ضروری و مورد نیاز رشد و نمو گیاهان می‌باشد. اگر چه گوگرد را به عنوان یک عنصر غذایی ثانویه به حساب می‌آورند، اما این عنصر به همراه نیتروژن، پتاسیم و فسفر، جزو چهار عنصر عمده مورد نیاز گیاهان به شمار می‌آید (Havlin et al. 1999). شکل قابل جذب گوگرد توسط ریشه‌های گیاه، سولفات می‌باشد که به صورت آمونیوم سولفات، آمونیوم تیوسولفات، تیوسولفات پتاسیم و... می‌باشند (Franzen, 1999).

مطالعات نشان داده است که پودر گوگرد و یا گل گوگرد برای رفع کمبود این عنصر در گیاه کافی نیست و لذا وجود سولفات به عنوان مهمترین منبع گوگردی برای گیاه ضروری است (Merrien & Pouzat, 1989).

وجود گوگرد در چندین ترکیب آلی مانند اسیدهای آمینه (سیستین، سیستئین، گلوتاتیون، متیونین)، پروتئین‌ها، ویتامین‌های تیامین و بیوتین، اهمیت این عنصر را برای گیاهان دو چندان نموده است.

*e.mail: mniakan@yahoo.com

گوگرد در ساختار ترکیبات مهمی از جمله کوآنزیم A شرکت می‌کند که این ترکیبات در فرایند تنفس، بویژه چرخه کربس و شکستن اسیدهای چرب نقش مهمی را ایفا می‌کنند. همچنین گوگرد در ساختار بسیاری از ترکیبات نظیر ناقلین الکترون، چه در زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی و چه در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی نیز دخالت دارد. علاوه بر این گوگرد در ترکیبی به نام گلوتاتیون نیز موجود می‌باشد. این ترکیب دارای دو اتم گوگرد بوده و در حضور یک احیاء کننده قوی به شکل دو گروه سولفید درمی‌آید، که بدین شکل می‌تواند در واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء شرکت نموده و با گرفتن و یا آزاد کردن هیدروژن، به انجام اینگونه واکنش‌ها کمک نماید (غیور و کرم‌زاده، ۱۳۸۱).

گزارش شده است که گوگرد به اندازه نیتروژن می‌تواند بر بازده محصول اثر بگذارد. همچنین گوگرد، کارایی نیتروژن را برای سنتز پروتئین افزایش می‌دهد، بدین معنا که گیاهانی که به نیتروژن زیادی نیاز دارند، جهت افزایش بکارگیری نیتروژن لازم است گوگرد مناسبی هم در اختیار داشته باشد. عنوان شده است که گروه‌های سولفیدریل (SH) در جایگاه‌های فعال آنزیم و کوآنزیم‌ها شرکت نموده و در ساختمان فضایی پروتئین‌ها نقش اساسی دارند (Tusker, 2005).

شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد گوگرد در تولید کلروفیل و فرآیند فتوسنتز نقش تعیین کننده دارد، به طوری که گفته شده است کمبود گوگرد، باعث کاهش میزان کلروفیل شده که به دنبال آن برگ‌ها زرد گشته و کلروز بین رگبرگ‌ها اتفاق می‌افتد (Thomas, 1984).

Tusker (2005) اظهار داشته است که گوگرد برای تولید کلروفیل لازم است و کمبود آن در گیاه بصورت زردی عمومی خود را نشان می‌دهد. هرچند در هنگام کمبود نیتروژن نیز رنگ گیاه به زردی می‌گراید، اما این حالت در برگ‌های مسن مشاهده می‌شود، در صورتی که در مورد کمبود گوگرد زردی در برگ‌های جوان‌تر مشاهده می‌شود. گوگرد یک عنصر ضروری برای سنتز برخی از پروتئین‌هاست. بر این اساس، کمبود این عنصر باعث کاهش پروتئین و مولکول‌های وابسته به آن نظیر کلروفیل می‌شود (Resh, 2001).

در برگ‌های سبز بیشتر پروتئین‌ها در درون کلروپلاست جا دارد که در آنجا مولکول‌های کلروفیل به همراه گروه‌های پروتئینی ترکیبات پیچیده پروتئین ـ رنگیزه را تشکیل می‌دهند. به این ترتیب، در گیاهانی که به کمبود پروتئین مبتلا هستند، میزان کلروفیل نیز کاهش می‌یابد (خلدبرین و اسلام‌زاده، ۱۳۸۰).

عنوان شده است که کمبود سولفات در گیاهان جوان و نورسته گندم در ابتدا روی تثبیت CO_2 و فعالیت آنزیم روبیسکو و فراوانی پروتئین اثر می‌گذارد (Gilbert et al. 1997). این موضوع مربوط به کاهش سنتز پروتئین جدید در شرایط محدودیت گوگرد می‌باشد که فقدان سنتز آنزیم روبیسکو و کلروز برگ‌های جوان در کاهش مقدار کلروفیل و مهار سنتز محصولات فتوسنتزی انعکاس پیدا می‌کند (Howkesford, 2000).

درباره اثر کودهای گوگردی (سولفات آمونیوم) بر روی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان، اطلاعات بسیار اندکی وجود دارد، اما درخصوص آثار SO_2 به عنوان یک ماده حاوی گوگرد، مطالعاتی صورت گرفته است. به عنوان مثال عنوان شده است که SO_2 بعد از ورود به برگ‌های گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) از طریق روزنه‌های هوایی برگ در فاز آبی دیواره سلولی هیدراته شده و به سولفیت تبدیل می‌شود و سولفیت تشکیل شده توسط پراکسیداز آپوپلاستی که در اکسیداسیون فنل‌ها نقش دارند، اکسید و به سولفات تبدیل می‌شوند و به دنبال آن مورد استفاده سلول‌های گیاهی قرار می‌گیرد

(Takahama et al. 1992). آثار دی‌اکسید گوگرد بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه آرابیدوپسیس نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده است که فعالیت آسکوربات پراکسیداز و گلیکول پراکسیداز در برگ‌ها در طی این آزمایش افزایش یافته است، در صورتی که دی‌اکسید گوگرد، اثر ناچیزی بر میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، منودهیدرو آسکوربات ردوکتاز، دهیدرو آسکوربات ردوکتاز و گلوتاتیون ردوکتاز داشته است (Kubo et al. 1995). Nandi و همکارانش (1990) نیز مشاهده نمودند میزان فعالیت پراکسیداز در گیاه لوبیای برگ پهن (*Vicia faba* L.) که تحت تاثیر SO_2 قرار گرفته بودند، افزایش یافت. Janny و همکارانش (1989) در بررسی آثار آلاینده‌ها (SO_2, O_3) بر روی نوعی گیاه لوبیا گزارش دادند که گیاهانی که در معرض SO_2 قرار گرفتند، هیچ تغییری در میزان فعالیت دی‌آمین اکسیداز و یا پراکسیداز مشاهده نشد، ولیکن میزان سولفیدریل کل در برگ‌ها، افزایش معنی‌داری یافت. Willekens و همکارانش درسال ۱۹۹٤ در گیاه توتون اثر دی‌اکسید گوگرد، ازن و اشعه ماورای بنفش نوع B را بر روی بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز، سه نوع کاتالاز (Cat1, Cat2, Cat3) و آسکوربات پراکسیداز سیتوزولی و گلوتاتیون پراکسیداز، مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این آزمایشات نشان داده است که ژن‌های آنزیم‌های مذکور به هر سه محرک (UV–B, O_3, SO_2) پاسخ تقریباً یکسانی را نشان دادند که پاسخ ژن‌ها به SO_2 ضعیف‌تر و با تاخیر بوده است، تحت تاثیر سه محرک مذکور Cat1 کاهش معنی‌داری را نشان داده است، اما میزان Cat3 در حد متوسط و در صورتی که میزان افزایش Cat2 و گلوتاتیون اکسیداز، قابل ملاحظه بود و در میزان سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز سیتوزولی تغییری مشاهده نشد.

گفته شده است که SO_2 در سلول‌ها به یون‌های بی‌سولفیت و سولفیت تبدیل می‌شود، سولفیت برای سلول‌ها سمی است، اما میزان کم آن در کلروپلاست به سولفات تبدیل می‌شود. لذا غلظت‌های پایین SO_2 در هوای آلوده، می‌تواند به عنوان یک منبع گوگردی برای گیاه محسوب گردد، در صورتی که غلظت‌های بالای SO_2 باعث تحریک ژن‌هایی می‌شود که در سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مانند کاتالاز، پراکسیدازها و...) نقش دارند (Zeiger , 2002).

گزارش شده است که کلزا به کمبود گوگرد بسیار حساس است، در صورت کمبود گوگرد میزان کلروفیل آن کاهش یافته و برگ‌ها زرد رنگ می‌شوند. فرآیند زرد شدن به کل گیاه سرایت می‌کند و یا حتی حاشیه زیرین برگ‌ها صورتی و حاشیه برگ‌های مسن ارغوانی می‌شود (Sullivan et al. 2001). همچنین تحقیقات نشان داده است که در بین سه گیاه زراعی گندم، جو و کلزا، گیاه کلزا نسبت به دو گیاه دیگر مقدار بیشتری ازگوگرد را جذب می کند (Franzen, 1999., Duane & Kent, 2002)

اگرچه پیرامون اثر گوگرد و نیز ترکیبات حاوی آن بر میزان محصول و رشد گیاهان زراعی، تحقیقاتی صورت گرفته است، ولیکن در مورد این عنصر بر رنگیزه‌های فتوسنتزی نظیر کلروفیل و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و موثر بر فتوسنتز نظیر کاروتنوئیدها و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز در گیاه حساس به آن نظیر کلزا، اطلاعات اندکی موجود می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر مقادیر مختلف سولفات آمونیوم بر میزان کلروفیل a, b، کاروتن و گزانتوفیل در برگ‌ها و نیز فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در ریشه و برگ‌های گیاه کلزا رقم هایولا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه: زمینی به ابعاد ۲۰×۴۰ مترمربع در منطقه غرب شهرستان ساری انتخاب و براساس طرح کاملاً تصادفی ۲۰ کرت (پلات) به ابعاد ۱/۵×۵ متر در چهار بلوک آماده گردید که فاصله کرت‌ها در هر بلوک از یکدیگر یک متر و فاصله بلوک‌ها از یکدیگر نیز سه متر درنظر گرفته شد. مطابق با کشت متداول در منطقه سه نوع کود، فسفات (۱۰۰ کیلوگرم در هکتار)، پتاس (۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) و اوره (۲۵۰ کیلوگرم در هکتار) قبل از کشت بطور یکسان به خاک همه کرت‌ها اضافه و به خوبی با خاک مخلوط گردید که یک سوم از کل کود اوره موردنظر در مرحله کاشت و دو سوم دیگر به عنوان کود سرک در ابتدای مرحله زایشی و ابتدای مرحله رسیدگی مورد استفاده قرار گرفت.

جهت بررسی اثر کود سولفات آمونیوم بر گیاه کلزا رقم Hyola401، پنج تیمار از کود سولفات آمونیوم (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰) کیلوگرم درنظر گرفته شد. برای هر تیمار، چهار تکرار بطور تصادفی انتخاب گردید. بعد از نشانه‌گذاری، کرت‌ها بر اساس پنج تیمار موردنظر، کود سولفات آمونیوم به خاک کرت‌ها اضافه گردید. شایان ذکر است که افزودن کود اوره به کرت‌ها طوری انجام گرفت که به همه کرت‌ها ازت یکسانی رسیده و تنها از نظر میزان سولفات متفاوت باشند. سپس بذرها درعمق یک تا سه سانتیمتری خاک به صورت دست‌پاش و ردیف کاشته شد که فاصله هر ردیف در هر کرت ۳۰ سانتیمتر درنظر گرفته شد. بعد از گذشت دو هفته از زمان رویش گیاه، عملیات تنک‌سازی صورت گرفت تا فاصله بوته‌ها از یکدیگر در هر ردیف حدود پنج سانتیمتر حفظ شود. برای از بین بردن علف‌های هرز نیز در این مرحله، عملیات وجین‌کاری و برای از بین بردن کرم‌های برگ‌خوار یک نوبت سمپاشی با سم کاربامیل ۸۵٪ انجام شد. در اواسط مرحله رویشی (بین ۸-۶ برگی) نمونه‌ها جهت انجام آنالیزهای بیوشیمیایی برداشت شدند.

آزمایش‌های بیوشیمیایی

- اندازه گیری رنگیزه های فتو سنتزی

- سنجش کلروفیل b, a

برگ‌های گیاهان تحت تیمار غلظت‌های مختلف سولفات آمونیوم و نیز شاهد پس از توزین، در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به خوبی سائیده شده و جذب نوری عصاره‌های آنها در طول موج‌های ٦٤٥ و ٦٦٣ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان کلروفیل a و b بر حسب میلی‌گرم در گرم ماده تر نمونه محاسبه گردید (Jensen, 1978).

- سنجش کاروتنوئیدها

جهت سنجش کاروتنوئیدها، محلول عصاره استنی حاوی کلروفیل در دکانتور ریخته شد و به آن اتر نفت اضافه شد. به این ترتیب رنگیزه‌ها از استون به لایه بالایی (اتر نفت) منتقل شدند. سپس متانول به محلول اتر نفت اضافه گردیده که در این مرحله دو لایه تشکیل شد. لایه بالایی (اتر نفت) به دلیل غیرقطبی بودن، کلروفیل a و کاروتن‌ها و لایه پایینی متانولی بدلیل قطبی بودن کلروفیل b و گزانتوفیل‌ها را در خود حل می‌نمایند. در مرحله بعدی محلول متانولی پس از جداسازی با دی‌اتیل اتر مخلوط گردید و به دنبال آن دو لایه تشکیل شد. لایه زیرین (به دلیل قطبیت زیاد) فاقد رنگیزه بوده و دور ریخته شد. محلول بالایی (دی اتیل اتر) محتوی کلروفیل a و گزانتوفیل‌ها بود که در این مرحله از یکدیگر جدا گردیدند. در مرحله بعد برای جدا نمودن رنگیزه‌های کلروفیلی از کاروتنوئیدها از محلول ۳۰٪ پتاس متانولی استفاده شد که منجر به تشکیل دو لایه مشخص شد. لایه بالایی شامل کاروتنوئیدها و لایه‌های پائینی حاوی کلروفیل‌های (a, b) بود که این لایه‌ها از یکدیگر جدا شده و جذب رنگیزه‌ها

در طول موج ٤٥٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومترخوانده شد. مقدار کاروتن و گزانتوفیل نمونه برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاه ارزیابی گردیدند (Jensen, 1987).

- سنجش فعالیت پراکسیداز

جهت بررسی اثر کود سولفات آمونیوم بر فعالیت آنزم پراکسیداز در برگ‌ها و در ریشه مراحل زیر انجام گردید.

الف) تهیه محلول عصاره‌گیری: ۱/۲ گرم تریس با ۲ گرم اسید اسکوربیک، ۳/۸ گرم بوراکس، ۲ گرم EDTANa2 و ۵۰ گرم پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ مخلوط و توسط آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد و رساندن حجم به ۱۰۰ میلی‌لیتر با آب مقطر (pH=۷).

ب) استخراج عصاره آنزیمی: سائیدن نمونه گیاهی با چهار میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری، سانتریفوژ محلول به مدت ۰/۵ ساعت با g٤٠٠٠، نگهداری محلول رویی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد.

ج) سنجش فعالیت آنزیم: مخلوط کردن ۱ میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار با ۰/٤ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر بنزیدین محلول در الکل ۵۰ درجه و ۰/۰۱ مولار. اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مخلوط و خواندن جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر و محاسبه فعالیت آنزیم بر حسب واحد $ODg^{-1}\ FW\ min^{-1}$ (Koroi, 1989).

سنجش فعالیت کاتالاز

تهیه ۵ میلی‌لیتر مخلوط اندازه‌گیری فعالیت آنزیم شامل ۳۰۰ میکرومول بافر فسفات با pH=٦/٨، ۱۰۰ میکرومول آب اکسیژنه و ۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی دوباره رقیق شده، قرار دادن مخلوط به مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۲ درصد (به نسبت حجمی) به مخلوط جهت توقف فعالیت آنزیم، تیتراسیون مخلوط با پرمنگنات پتاسیم ۰/۰۱ نرمال تا تشکیل رنگ صورتی کمرنگ، محاسبه فعالیت آنزیم بر حسب تجزیه یک میکرو مول آب اکسیژنه در یک دقیقه (Chance & Maehly, 1995).

- سنجش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز

جهت بررسی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز نیز دو بخش ریشه و برگ‌ها (برگ‌های سوم و چهارم) مورد آزمایش واقع شد که مراحل آن به شرح زیر می‌باشد:

در ابتدا بخش‌های موردنظر توزین و به مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در تامپون فسفات نگهداری شد. بعد از گذشت مدت زمان لازم به ۲ میلی‌متر از محلول، ۱ میلی‌لیتر گریس I, II افزوده و جذب نوری آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد.

جهت یافتن غلظت نیتریت حاصل از احیاء نیترات تحت تاثیر آنزیم نیترات ردوکتاز از منحنی استاندارد نیتریت سدیم در غلظت‌های مختلف استفاده شد و به ازاء مقدار نیتریت تولید شده در گرم ماده تر فعالیت آنزیم محاسبه شد (Sym, 1984).

نتایج و بحث

– اثر سولفات آمونیوم بر رنگیزه های فتوسنتزی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که با افزایش میزان سولفات آمونیوم، بر مقدار کلروفیل a به طور معنی‌داری افزوده شد. بین میزان کلروفیل a در تیمار ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار سولفات آمونیوم اختلاف معنی‌دار نبود، ولیکن بین شاهد و تیمارهای فوق با تیمار ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار کیلوگرم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول۱).

میزان کلروفیل b نیز با افزایش میزان سولفات آمونیوم، افزایش معنی‌داری را نشان داد. شایان ذکر است که تفاوت میزان کلروفیل b گیاهان شاهد نسبت به تیمار ۵۰ کیلوگرم بر هکتار کود سولفات آمونیوم معنی‌دار نبود، ولیکن با افزایش مقدار سولفات آمونیوم از ۱۰۰ تا ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار

به طور معنی‌داری بر مقدار این رنگیزه افـزوده شـد. همچنین مجموع کلروفیـل b و a بـا افـزایش مقـدار سولفات آمونیـوم، افـزایش معنـی‌داری را نـشان داد، ولی نسبت کلروفیل a به کلروفیل b با افزایش میزان آن، افزایش معنی‌داری نیافت (جدول۱).

همچنین نتایج حاصل از ایـن تحقیـق نـشان داد کـه میزان کاروتن با افزایش مقدار سولفات آمونیوم روند صعودی معنی‌داری را طی نمـود (شـکل ۱). تفـاوت میزان کاروتن گیاهان شـاهد نـسبت بـه تیمـار ۵۰ و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار معنـی‌دار نبـود، ولـیکن بـین شـاهد و تیمـار ۱۵۰ و ۲۰۰ کیلـوگرم در هکتـار، افزایش میزان این رنگیزه معنی‌دار بود (جدول ۱).

میزان گزانتوفیل همـراه بـا افـزایش میـزان سـولفات آمونیـوم، افـزایش یافـت. تفـاوت میـزان گزانتوفیـل گیاهان شاهد نسبت به تیمار۵۰ کیلـوگرم بـر هکتـار سـولفات آمونیـوم و نیـز بـین تیمـار ۱۰۰ و ۵۰ و همچنین ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار نیـز تفـاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل۱).

جدول ۱- اثر مقادیر متفاوت سولفات آمونیوم (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ کیلوگرم برهکتار) بر میزان کلروفیل a و b، a + b و a/b، کاروتن و گزانتوفیل در برگ گیاه کلزا رقم هایولا. اعداد نشانگر میانگین و خطای معیار هستند. اختلاف حروف در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار در $p<0/01$ و $p < 0/05$ می‌باشد.

سولفات آمونیوم (kg/h)	کلروفیل a ($mgg^{-1}FW$) (X± SE)	کلروفیل b ($mgg^{-1}FW$) (X± SE)	کلروفیل a+b ($mgg^{-1}FW$) (X± SE)	کلروفیل a/b (X± SE)	کاروتن ($mgg^{-1}FW$) (X± SE)	گزانتوفیل ($mgg^{-1}FW$) (X± SE)
۰	۱/۱۷۷±۰/۰۲۱d	۰/۷۸٤±۰/ ۱d	۱/۹٦۱±۰/۰۷۸d	۱/۵۰۱±۰/۰۱۷a	/۲۵۸±۰/۰۱٤c	۰/۱٤±۰/۰۱۸d
۵۰	۱/۳۸۳±۰/۰۲٦bc	۰/۹٦۲±۰/۰۰۸cd	۲/۳٤۵±۰/۰٦cd	۱/٤۳۸±۰/۰٤۷a	۰/۲۹۵±۰/۰۱٤c	۰/۲۲۹±۰/۰۲۱cd
۱۰۰	۱/۹۸۷±۰/۰۳۲bc	۱/۰۸۲±۰/۰۷۸c	۲/۷۵۹±۰/۲۱c	۱/۵۸۷±۰/٤۳۲a	۰/۳۲۸±۰/۰٤۵bc	۰/۲۹۳±۰/۰۳۵bc
۱۵۰	۱/٦۷۷±۰/۱۲۳b	۱/۳۳۸±۰/۰٦b	۳/۳۲۵±۰/۱۸۲b	۱/٤۸۹±۰/۰۸۵a	۰/۵۳±۰/۰٤٤ab	۰/۳۵٦±۰/۰۱۲ab
۲۰۰	۱/۹۸۷±۰/۰۳۲a	۱/٦۷٦±۰/ ۰۷٦a	٤/۰۸۳±۰/۳۵a	۱/٤٤±۰/۱٦٦a	۰/٦٤۷±۰/۰۱۵a	۰/٤۵٤±۰/۵٦a

نتـایج حاصـل از ایـن تحقیـق نـشان داد کـه میـزان سولفات آمونیوم در سـطح ۲۰۰ کیلـوگرم در هکتـار اثر قابل توجهی بـر افـزایش میـزان کلروفیـل a، b و a+b دارد. گزارش شده اسـت کـه گـوگرد در سـنتز رنگیزه‌هایی نظیر کلروفیل دخالت کرده و از ایـن راه بر فتوسنتز گیاهان اثر می گذارد (Thomas, 1984).

تحقیقـات نـشان داده اسـت کـه در مرکـز واکـنش فتوسیستم‌ها، رنگیزه‌های اصلی نظیر کلروفیل a و نیز رنگیزه‌های کمکی مانند کلروفیـل b و کاروتنوئیـدها

همراه با پروتئین‌ها کمپلکس‌هایی را تشکیل می‌دهند که کاهش در میزان هر یک از آنها سبب اختلال در عمل فتوسیستم‌ها می‌گردد (Tuckeril, 2005). همچنین عنوان شده است که کلروپلاست از جمله اندامک‌هایی است که حاوی مقادیر زیادی از پروتئین‌ها می‌باشد که بخشی از این پروتئین‌ها مربوط به کمپلکس‌های رنگیزه‌ای است. از آنجایی که گوگرد در ساختار بسیاری از پروتئین‌ها شرکت می‌کند، کمبود میزان گوگرد سبب کاهش میزان پروتئین و به دنبال آن کاهش میزان کلروفیل می‌گردد (Resh, 2001).

اثر سولفات آمونیوم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه و برگ

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه با افزایش میزان سولفات آمونیوم به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۲). تفاوت میزان فعالیت پراکسیداز ریشه گیاهان شاهد نسبت به تیمار ۵۰ کیلوگرم بر هکتار سولفات آمونیوم معنی‌دار نبود. همچنین بین تیمار ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ با افزایش سولفات آمونیوم، افزایش معنی‌داری را به نمایش گذاشت (شکل ۳). تفاوت میزان فعالیت پراکسیداز برگ گیاهان شاهد نسبت به تیمار ۵۰ کیلوگرم بر هکتار گوگرد، معنی‌دار نیست. همچنین بین تیمارهای ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ کیلوگرم بر هکتار سولفات آمونیوم، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱).

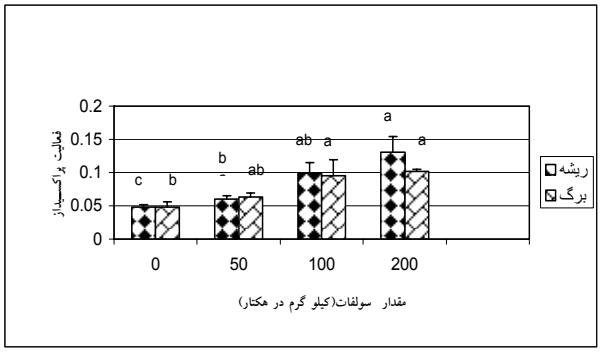
اثر سولفات آمونیوم بر فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه و برگ

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه با افزایش میزان سولفات آمونیوم، افزایش معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. همچنین تفاوت میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه گیاهان شاهد نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار نیست.

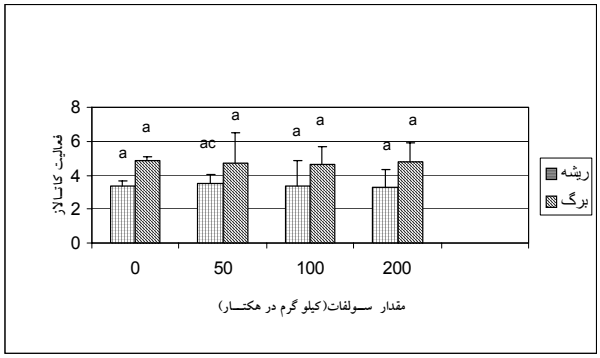
نتایج حاصل نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ نیز با افزایش میزان سولفات آمونیوم، افزایش معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ گیاهان شاهد نسبت به سایر تیمارها نیز معنی‌دار نمی‌باشد (شکل ۲).

امروزه مطالعات متعددی پیرامون عوامل موثر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز و پراکسیداز موجود می‌باشد که از آن جمله می‌توان به نقش عناصر معدنی نظیر نیتروژن، فسفر، پتاسیم و گوگرد اشاره نمود. تحقیقات نشان داده است که میزان حساسیت دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز به عناصر مختلف یکسان نیست. به عنوان مثال در گیاه آرابیدوپسیس شکل اکسید شده گوگرد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیدازی گشته، ولیکن بر فعالیت آنزیم‌های کاتالازی اثر معنی‌داری را بر جای نگذاشته است (Kubo et al. 1995). در برخی از گزارشات نیز به کاهش فعالیت ایزوزیم‌های کاتالازی و عدم تغییر آنزیم‌های پراکسیدازی اشاره شده است (Willekens et al. 1994).

عنوان شده است که غلظت‌های بالای دی اکسید گوگرد، سبب تحریک بیان ژن‌های درگیر در سنتز آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌گردد (Takahama et al. 1992).



شکل ۱- اثر مقادیر مختلف سولفات آمونیوم بر فعالیت پراکسیداز ($ODg^{-1}FWmin^{-1}$) برگ و ریشه گیاه کلزا (Hyola 401). ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین و خطای معیار هستند.

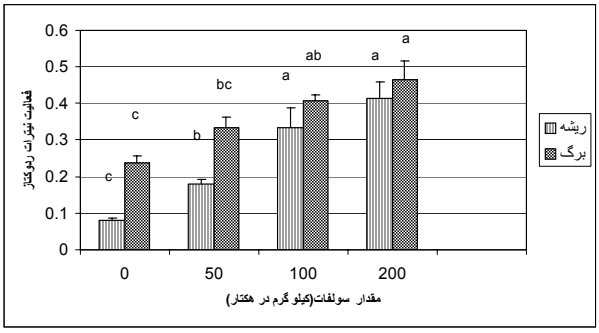


شکل ۲ – اثرمقادیر مختلف سولفات آمونیوم بر فعالیت کاتالاز (–μM H_2O_2 destroid min) برگ و ریشه گیاه کلزا (Hyola 401). ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین و خطای معیار هستند.

اثر سولفات آمونیوم بر فعالیت نیترات ردوکتاز

میزان فعالیت نیترات ردوکتاز ریشه تحت تاثیر مقادیر مختلف سولفات آمونیوم قرار گرفت. بدین‌معنی که با افزایش میزان این ترکیب بر فعالیت آنزیم به طور معنی‌داری افزوده شد. شایان ذکر است که کاربرد تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ کیلوگرم بر هکتار سولفات آمونیوم بر فعالیت آنزیم نامبرده اثر مشابه‌ای داشت (شکل ۳). در برگ‌ها نیز میزان فعالیت نیترات ردوکتاز، دستخوش تغییرات میزان کود سولفات آمونیوم واقع شد و با افزایش مقدار آن، به ویژه در غلظت‌های بالاتر (۱۰۰ و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار) در مقایسه با شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت.

آنزیم نیترات ردوکتاز، یکی از آنزیم‌های کلیدی در فرآیند احیای نیترات می‌باشد که برای فعالیت خود نیاز به ترکیبات احیاکننده نظیر NADPH (درکلروپلاست) و NADH (در میتوکندری) دارد. تحقیقات نشان داده است که ترکیباتی نظیر گلوتاتیون حاوی گوگرد به شکل دی‌سولفید می‌باشند که در حضور یک احیا کننده قوی نظیر NADPH/NADH باند دی‌سولفید خود را شکسته و به شکل دو گروه سولفید SH-SH درمی‌آیند. این ترکیب در زمان مورد نیاز به راحتی دو اتم هیدروژن خود را از دست داده و به شکل S-S تبدیل می‌شود (غیور و کرم‌زاده، ۱۳۸۱). بنابراین ترکیباتی نظیر گلوتاتیون می‌توانند در واکنش‌های متعدد اکسیداسیون و احیا شرکت کرده و به عنوان مثال ترکیبات احیا کننده مورد نیاز برای فعالیت نیترات ردوکتاز را فراهم کند



شکل ۳– اثر مقادیر مختلف سولفات آمونیوم بر فعالیت نیترات ردوکتاز ($\mu MNO_2g^{-1}h^{-1}$) برگ و ریشه گیاه کلزا (Hyola 401). ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین و خطای معیار هستند.

منابع

غیور. ا.، کرم زاده. س (۱۳۸۱) فیزیولوژی گیاهی.صفحه ٦٢. انتشارات سنجش.

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

Duan,R.B and Kent,M. (2002) Canola production NDSA Extention Service. North Dakota State University. Pp: 345.

Franzen,D.W. (1999) Fertilizing mustard and canola. SF1122, NDSU extention service. North Dkota State University.

Gilbert,S., Clarkson, D.T., Cambridge,M., Lambers, H and Hawkesford, M.J. (1997) Sulphate-deprivation has an early effect on the content of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat.Plant physiology, 115, 1231-1239.

Halvin, J.L., Beaton,J.D., TISDALE,S.L and Nelson, W.L. (1999) Soil ferriliting and fertilier2. 6th edition prentice Hall.Upper Saddle River, NJ., Pp 499

Howkesford, M.J. (2000) Plant response to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphat transporters to improve s-utilization efficiency.Journal of Enviromental Botany, 51:131-138.

Jensen, A (1978) Chlorophylls and carotenoides, In Handbook of Phycological methods, phycological and biochemical methods, Cambridge Univ.Press, 1978.

Janny, L.P., Federico, J.C and Robert,L.H (1989) Alternation of exteracellular enzymes in pinto bean leaves upon exposure to air pollutants, Ozone and sulfur dioxide. Plant Physiology. 89(1):159-164.

Koroi, S.A.A. (1989) Gel electrophers spectral photometrischoe unter uchungen zomeinfiuss der temperature duf stracture and aktritat der amylase und peroxidase isoenzyme, Physiology Vegetative, 20:15-23.

Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K., and Kondo, N. (1995) Expression of Arabidopsis cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. Plant Molcular Biology. 29(3): 479-89.

Merrien,A., and Pouzat,A. (1989) Agronomic colza Cahier Technicqua. CETIOM, Paris, France, Pp:56.

Nandi, P.K., **Agrawal, M**., **Agrawal S.B**,and **Rao D.N. (1990)** Physiological responses of Vicia faba plants to sulfur dioxide.Ecotoxicol Environ. 19(1): 64-71.

Resh, H.M. (2001) Hydroponic food production. Woodbridge press publishing, P.O.Box209, Santa Barbara, CA, ISBN 0-88006-222-9.

Sullivan, D.M., Brown, B.D., Shock,C.C., Horneck,D.A., Stevens,R.G., Pler,G.Q., and Feibert, E.B.G. (2001) Nutrient Management for onions in the pacific northwest.

Sym, G.L. (1984) Optimisation of the *invivo* assay conditions for nitrate reductase in barly. J. Science. Food.Agricalture, 35:725-730.

Takahama, U., SVeljovic-Iovanovic, S., and Heber,U. (1992) Effects of the air pollutant SO_2 on leaves inhibition of sulfite oxidation in the apoplast by ascorbate and of apoplastic peroxidase by sulfite.Plant Physiol, 100(1): 261–266.

Thomas, P. (1984) Canola grower manual, Canola Council of Canada Publication, Winnipay Canada

Tusker, M.R. (2005) Essential plant nutrients. Ncd & Cs.Agronomic Division. Ncda & Cs Miseellaneou publication (OCT 1999).

Willekens, H., Vancam, W., Vanmontague, D., Langebartels, C andSandemann, H. (1994) Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet B have similar effects on accumulation of antioxidant gene in *Nicotina plumbaginifolia* L. Plant Physiology. 89:134-143.

Zeiger, E. (2002) The Effect of Air Pollution on Plants. A companion plant physiology third edition by Lincoln Taiz and Eduarado Zeiger, University of California, Los Angeles, chapter 25.

The effect of sulphate on amount of pigments photosynthesis and activity of catalase,peroxidase and nitrate reductase in leaf and root of canola (*Brassica napus* L. *cv* Hyola 401)

Niakan, M.[1], Mohammadi, M.H.[1], Rameah, V.[2] and Nourinia, A[3].

1. Department of biology,Islamic Azad University, Gorgan-branch
2. Agricalture research center-Sari
3. Agricalture research center-Gorgan

Abstract

In this research, the effect of different amounts of ammonium sulphate as sulphate fertilizer in 0, 50, 100, 150, 200 Kg/ha under farm conditions on amount of chlorophyll a, b, carotene and xanthophyll and enzymes activity of catalase, peroxidase and nitrate reductase were evaluated. The results showed that increasing of ammounium sulphate content were ncreased amount of chl a, b, carotene and xanthophyll in leaf of canola significantly. Peroxidase and nitrate reductase activities in root of treated plants increased with increasing of sulphate in soil, while the activity of catalase in two parts of canola (root and leaf) did not have any significantly changes at different contents of sulfur in soils.

Key word: Antioxidant, Canola, Nitrate reductase, Pigment, Sulphate