

اثر غلظت های مختلف یون کلر بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در سه رقم توتون (*Nicotiana tabacum*) گرمخانه ای

اکبر نورسته نیا^{۱*}، سحر باباجانی^۲، جنت سرمد^۳، مهیار مشتاقی^۴

تاریخ دریافت ۹۲/۱۰/۲۳

تاریخ تصویب ۹۴/۱۲/۲

چکیده

در این تحقیق اثرات چهار غلظت کلر آب آبیاری (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر CaCl_2 به عنوان غلظت های تنش زا بر فعالیت آنزیم های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز، محتوای مالون دآلدئید و پروتئین کل در سه رقم توتون گرمخانه ای (*Cooker, Virginia* و *Kentucky*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد افزایش غلظت کلر تا غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر موجب کاهش معنی دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم *Cooker* می شود. در کلیه ارقام مورد مطالعه بیشترین فعالیت آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۴۰ و کمترین فعالیت در غلظت ۸۰

۱ استادیار. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان (نویسنده مسئول norasteh@guilan.ac.ir)

۲ دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

۳ استادیار. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

۴ دانشجوی کارشناسی ارشد محقق مرکز تحقیقات توتون گیلان

میلی گرم بر لیتر بوده و فعالیت آسکوربات پراکسیداز در *Ken-* و *tucky* و *Virginia* در غلظت ۴۰ افزایش و در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر در هر سه رقم کاهش یافت. مقدار مالون دآلدهید در رقم *Cooker* تنها در غلظت ۲۰ افزایش یافته و در سایر غلظت ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در رقم *Kentucky* مقادیر مالون دآلدهید در کلیه تیمار ها در مقایسه با شاهد به طور معنی داری کاهش یافت. در *Virginia* در تیمار ۲۰ مقدار مالون دآلدهید کاهش یافته و در سایر تیمار ها اختلاف معنی دار مشاهده نشد. مقادیر پروتئین کل در دو رقم *Virginia* و *Kentucky* با افزایش غلظت کلر، کاهش یافت.

واژه های کلیدی: پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، توتون، کلر، مالون دآلدهید

مقدمه

توتون معمولی بانام علمی

Nictiana tobaccum L. گیاهی است یک ساله از تیره Solanaceae که به صورت بوته ای بزرگ و استوار رشد می کند و برای برداشت برگ هایش تولید می شود و از مشهور ترین و پرمصرف ترین گیاهان تخدیری است که دارای ماده مخدر نیکوتین بوده و با کیفیت های مختلف جهت مصرف به فرم های گوناگون مانند سیگار معمولی (سیگارت)، پیپ، سیگار برگ تولید می شود (Khajehpour, 1385). یون کلر به عنوان یک عنصر غذایی کم مصرف تقریباً به مقدار ۰/۳ تا ۱ میلی گرم در وزن خشک برای رشد مناسب گیاه مورد نیاز است. غلظت زیاد کلر در توتون باعث کاهش الاستیسیته در برگ ها شده و اثرات نامطلوبی بر سوزش ناشی از مصرف برگ توتون دارد. در حالی که تجمع کلر در دانه ها و میوه ها بسیار کم است، شاخ و برگ گیاه مقادیر قابل توجهی از این عنصر را مخصوصاً زمانی که میزان یون کلر در خاک زیاد است برداشت می کنند (Tso, 1990). گیاهان در معرض بسیاری از تنش های زنده و غیرزنده در محیطشان هستند که این تنش ها می توانند سلامت گیاه را تحت تاثیر قرار دهند. واکنش گیاهان به تنش شوری و سایر تنش های محیطی از جمله مباحث مهم در علوم گیاهی است. بر این اساس گیاهان با داشتن مجموعه

ای از عوامل دفاعی می توانند اثر این تنش ها را کاهش دهند. درک و دریافت تنش شوری در گیاهان و پاسخ های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن ها به عواملی مثل ژنوتیپ، سطح رشد و نمو گیاه و همچنین شدت تنش بستگی دارد (Layten & Nielson, 1999). تنش شوری مانند تنش های غیر زنده ی دیگر به علت افزایش در گونه های فعال اکسیژن (ROS) مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن و رادیکال های هیدروکسیل می تواند به سمت تنش اکسیداتیو هدایت شود. این امر ممکن است صدمات سلولی را طی اکسیداسیون لیپید ها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک موجب شده و موجب آسیب به DNA، پروتئین، کلروفیل و عملکرد های غشاء شود (Esfandiari, et al., 2007). برای کم کردن تاثیرات تنش اکسیداتیو، سلول های گیاهی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی پیچیده ای را مورد استفاده قرار می دهند. سیستم های آنتی اکسیدانی در دو شکل غیرآنزیمی و آنزیمی بررسی شده اند. توکوفرول ها، فلاونوئید ها، کاروتنوئید ها و اسید آسکوربیک از اجزاء غیرآنزیمی و سوپراکسیددیسموتاز ها، پراکسیداز ها (آسکوربات، گلوکاتایون و گایاکول)، کاتالاز ها و آنزیم هایی که آسکوربات را اکسید کرده و کاهش می دهند از انواع آنزیمی می باشند. هر دو سیستم آنتی اکسیدانی با

(قطر گلدان ۳۰ و ارتفاع آن ۴۰ سانتی متر) با گنجایش ۲۵ کیلوگرم خاک، حاوی چهار حجم از خاک باغچه و یک حجم پرلیت ریز منتقل شدند. بوته ها با آب غیر یونیزه محتوی (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر کلر) آبیاری شدند. هنگامی که گیاه در مرحله ی رسیدگی میان برگ بود نمونه های میان برگ برداشت شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافتند.

روش استخراج آنزیمی

نمونه های برگگی به مقدار لازم توزین و به کمک نیتروژن مایع پودر شدند. نیم گرم از بافت پودر شده داخل میکروتیوب ریخته شده و ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به آن اضافه شد. سپس بافر حاوی نمونه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی به میکروتیوب دیگری منتقل شد. نمونه حاصل دوباره به مدت ۵ دقیقه و به روش مرحله قبل سانتریفیوژ شد. محلول رویی به داخل میکروتیوب دیگری منتقل و نمونه های به دست آمده در فریزر 70°C - نگهداری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم ها

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش (Kalir, 1984) استفاده شد. تغییرات جذب بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر

هم همکاری می کنند و یک مکانیسم کامل را تشکیل می دهند که غلظت ROS را در ارگانیزم ها کنترل می کند (Khosravine- et al., 2008). از آنجا که امروزه افزایش غلظت کلر خاک و کلر آب آبیاری در مزارع توتون در شمال ایران به دلایل مختلف موجب خسارت و افت کیفیت محصول می شود (Mesbah, 1381)، شناخت دقیق تر غلظت های بیشینه در تحمل توتون نسبت به این یون و تعیین تفاوت های احتمالی از این منظر بین ارقام مختلف یکی از اهداف مراکز تحقیقاتی توتون می باشد که داده های مدون و مستند چندانی برای آن وجود ندارد. بر این اساس در این بررسی داده های محدود موجود مورد استفاده قرار گرفت تا دامنه تحمل ارقام بر اساس تحولات بخش آنزیمی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آن ها مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش ها

ابتدا کشت بذور سه رقم *Cooker, Vir-* و *ginia* Kentucky برای جوانه دار کردن آن ها در پتری های با قطر ۷ سانت و حاوی دو برگ کاغذ صافی (مدل What-man 0.1) در ایستگاه تحقیقات توتون انجام شد. ده روز پس از شروع جوانه زنی، نشاء این ارقام از طریق انتقال آن ها به خزانه فلوت سیستم (سیستم شناور در آب) تهیه شد. سپس نشاها به گلدان های پلاستیکی

و سایر آلدئید های حاصل از این واکنش بر اساس روش Heath and Packer (1968) اندازه گیری شد. جذب سوپرناتانت در 532nm اندازه گیری شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس (MDA-TBA) است. جذب بقیه رنگیزه های غیراختصاصی در 600 نانومتر تعیین شد و از میزان جذب در 532 نانومتر کسر شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1} \times 155$ استفاده شد و در نهایت مقدار مالون دآلدئید که محصول پراکسیداسیون لیپیدی است برحسب نانومول در گرم وزن تر محاسبه گردید.

سنجش پروتئین کل به روش برادفورد
جهت تعیین محتوای پروتئینی عصاره استخراج شده از نمونه ها، از متد-Bradford (1976) استفاده شد. در این روش سرم آلبومین گاوی (1 mg ml^{-1} BSA) به عنوان استاندارد به کار برده شد. پس از خواندن جذب نمونه ها در طول موج 595 نانومتر، غلظت پروتئین کل بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد تهیه شده با BSA به عنوان استاندارد محاسبه گردید.

الکتروفورز به روش PAGE

الکتروفورز با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ و بر اساس روش Davis (1964) انجام شد. بر اساس این روش بافرها و

(ComSpec, Single Beam, UV-Visible) در مد کینتیک و طول موج 470 نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر حسب واحد آنزیمی در میلی گرم پروتئین (1 mg^{-1} Unit) محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)
برای تعیین فعالیت آسکوربات پراکسیداز از روش Nakano and Asada (1981) استفاده شد. جذب آنزیم APX به دنبال اکسیداسیون آسکوربات به دی هیدروآسکوربات با ضریب خاموشی ($1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1} \times 2/8$) در 290 نانومتر با اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد.

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

به منظور سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش Gregory and Bendali (1966) استفاده شد. تغییرات جذب بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 430 نانومتر رسم گردید. در نهایت میزان فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی ($1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1} \times 0/001$) بر حسب واحد آنزیمی در 1 گرم بافت تازه محاسبه شد. برای آنزیم پلی فنل اکسیداز واحد آنزیمی بیانگر مقدار آنزیمی است که بتواند سوبسترا را به محصول تبدیل نماید.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی

برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید های غشاء، غلظت مالون دآلدئید (MDA)

معرف های لازم جهت انجام الکتروفورز به روش PAGE طبق فهرست زیر آماده شد: محلول پایه بافر ژل زیرین (تفکیک کننده)، محلول پایه بافر ژل فوقانی (متراکم کننده)، محلول پایه بافر الکتروود (بافر تانک)، محلول آکریلامید- بیس آکریلامید، محلول آمونیوم پر سولفات (۱۰٪)، TEMED ۱۰٪ و بافر نمونه (۵X). سوپرناتانت آنزیمی را با بافر نمونه ۵X مخلوط کرده و پس از بسته شدن ژل در تانک الکتروفورز، نمونه را درون چاهک های ژل قرار داده و عمل الکتروفورز در دمای یخچال و در ولتاژ ۱۲۰ ولت برای ژل فوقانی و ۱۴۰ ولت برای ژل تحتانی انجام گرفت.

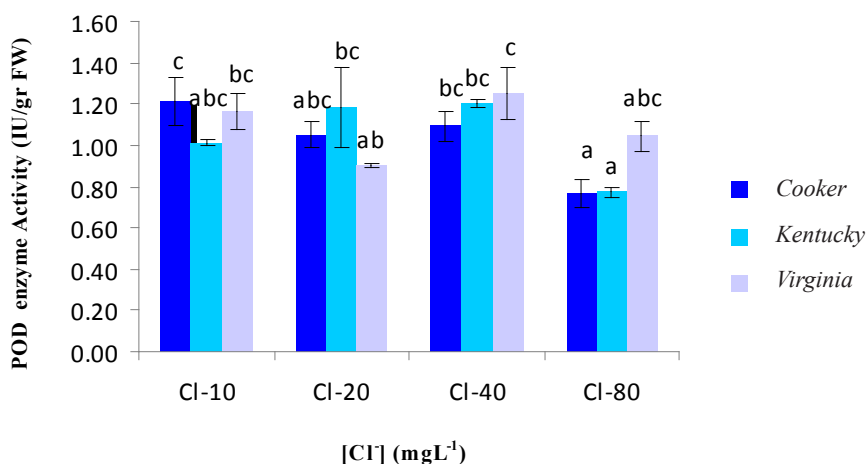
نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

در بین ارقام بررسی شده بیشترین فعالیت آنزیمی در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر در رقم *Virginia* و کمترین سطح فعالیت آنزیم در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر در رقم های *Cooker* و *Kentucky* مشاهده شد. روند فعالیت آنزیم در دو رقم *Cooker* و *Virginia* مشابه بود. به این ترتیب که ابتدا کاهش اندکی در تیمار ۲۰ میلی گرم بر لیتر کلر مشاهده شد. سپس افزایش مختصری در فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر رخ داد و در ادامه کاهش در فعالیت POD در *Cooker* و *Virginia* مشاهده شد. اما کاهش فعالیت آنزیم در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر، تنها در *Cooker* معنی دار بود. در رقم *Kentucky* افزایش معنی دار فعالیت آنزیم تا غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد

برای مشاهده فعالیت آنزیم POD در ژل، از رنگ آمیزی به روش Fielding and Hall (1978) استفاده شد. ابتدا ژل را در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه، در بافر پتاسیم فسفات ۲۵ میلی مولار قرار می دهیم. سپس ژل را در بافر پتاسیم فسفات ۲۵ میلی مولار حاوی گایاکول ۱۸ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۲۵ میلی مولار فرو برده و تا ظاهر شدن باندهای مربوط به آنزیم POD منتظر می مانیم.

نتایج

در این آزمایش، اثر غلظت های مختلف کلر آب آبیاری (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر) محلول نمکی کلرید کلسیم بر فعالیت



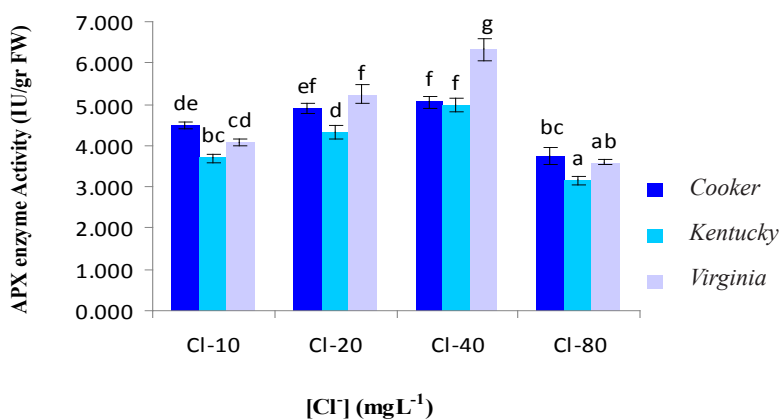
شکل ۱: اثر متقابل غلظت های مختلف کلر بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در پاسخ به غلظت های مختلف کلر در آب آبیاری در مرحله رسیدگی میان برگ ها در سه رقم توتون (میانگین \pm خطای استاندارد)

اما در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کاهش معنی دار فعالیت آنزیم نسبت به غلظت شاهد دیده شد (شکل ۱).

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:

میانگین داده های مربوط به سنجش فعالیت آنزیم APX در شکل (۲) نشان داده شده است. در بین ارقام بررسی شده بیشترین

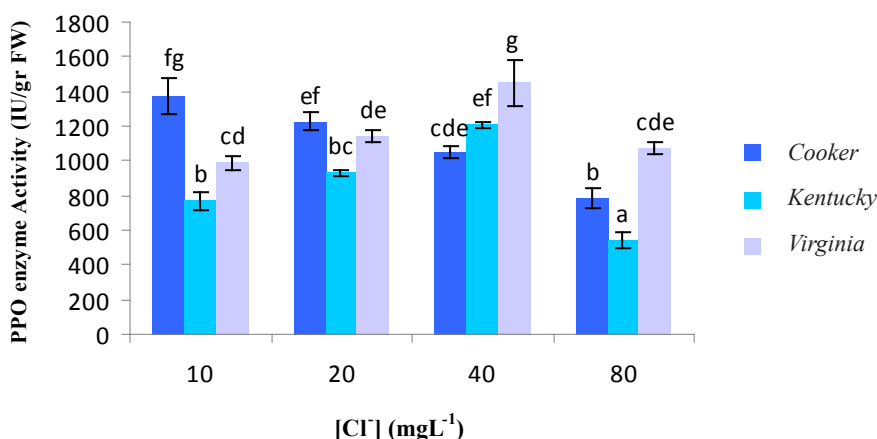
فعالیت آنزیمی در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر در رقم ویرجینیا و کمترین سطح آن در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر در رقم کنتاکی مشاهده شد. روند تغییر فعالیت آنزیم در هر سه رقم کوکر و کنتاکی و ویرجینیا مشابه بود، به این ترتیب که ابتدا فعالیت آنزیم از غلظت ۱۰ تا غلظت ۴۰ میلی



شکل ۲: اثر متقابل غلظت های مختلف کلر بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در پاسخ به غلظت های مختلف کلر در آب آبیاری در مرحله رسیدگی میان برگ ها در سه رقم توتون (میانگین \pm خطای استاندارد)

گرم بر لیتر کلر افزایش یافت و سپس در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر در آنزیم APX کاهش یافت. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز: میانگین داده های مربوط به سنجش فعالیت آنزیم PPO در (شکل ۳) نشان داده شده است. در بین ارقام بررسی شده بیشترین فعالیت آنزیمی در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر در رقم ویرجینیا و کمترین سطح

آن در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر در رقم کنتاکی مشاهده شد. فعالیت آنزیم در دو رقم کنتاکی و ویرجینیا به طور مشابه ابتدا با افزایش فعالیت آنزیم از غلظت ۱۰ تا غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر همراه بود و سپس در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر میزان فعالیت آنزیم APX کاهش یافت که در *Virginia* این کاهش نسبت به غلظت شاهد معنی دار نبود در حالیکه در *Ken-tucky* این تفاوت معنی دار می باشد. در

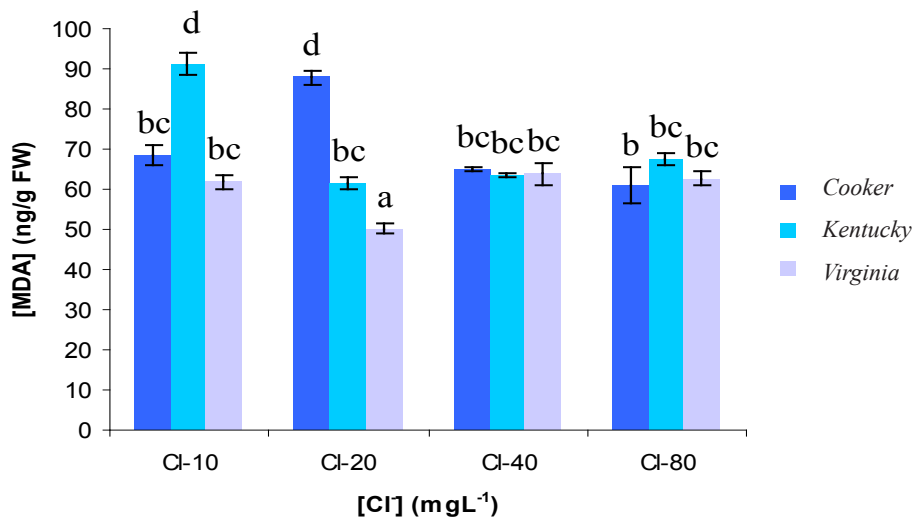


شکل ۳: اثر متقابل غلظت های مختلف کلر بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در پاسخ به غلظت های مختلف کلر در آب آبیاری در مرحله رسیدگی میان برگ ها در سه رقم توتون (میانگین \pm خطای استاندارد)

رقم کوکر با افزایش غلظت کلر از ۱۰ تا ۸۰ میلی گرم بر لیتر فعالیت آنزیم کاهش یافت. نتایج حاصل از سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی: میانگین داده های مربوط به سنجش محتوای MDA در (شکل ۴) نشان داده شده است. در بین ارقام بررسی شده بیشترین

محتوای مالون دی آلدهید در غلظت شاهد در رقم *Kentucky* و کمترین سطح آن در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر کلر در رقم *Virginia* مشاهده شد. در این جا باز هم روند تغییرات در دو رقم *Ken-tucky* و *Vir-ginia* تقریباً مشابه بود. به این ترتیب که در هر دو رقم ابتدا کاهش و سپس افزایش میزان MDA مشاهده شد. در *Kentucky*

مقدار MDA در غلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر و در *Virginia* مقدار MDA در غلظت های ۴۰ و ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر با یکدیگر برابر بودند. ولی

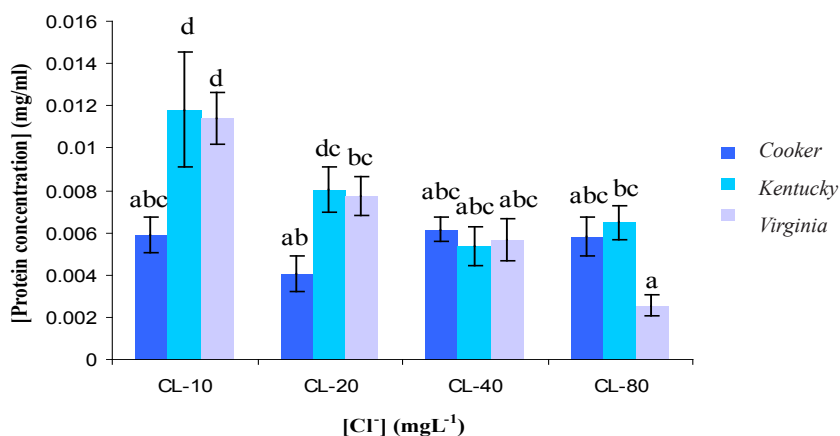


شکل ۴: اثر متقابل غلظت های مختلف کلر بر میزان مالون دآلدهید در پاسخ به غلظت های مختلف کلر در آب آبیاری در مرحله رسیدگی میان برگ ها در سه رقم توتون (میانگین ± خطای استاندارد)

رسم شد و با کمک شیب خط منحنی غلظت پروتئین کل نمونه ها محاسبه شد. میانگین داده های مربوط به سنجش غلظت پروتئین کل در (شکل ۵) نشان داده شده است. در بین ارقام بررسی شده بیشترین میزان غلظت پروتئین کل در غلظت شاهد در رقم *Ken-tucky* و کمترین سطح در غلظت ۸۰ میلی

در رقم *Cooke* مقدار MDA ابتدا دارای افزایشی در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر کلر بود و سپس روند کاهشی را طی نمود. نتایج حاصل از سنجش میزان پروتئین کل:

ابتدا منحنی استاندارد جذب (BSA (mg ml⁻¹)) بر اساس جذب های خوانده شده برای نمونه های استاندارد

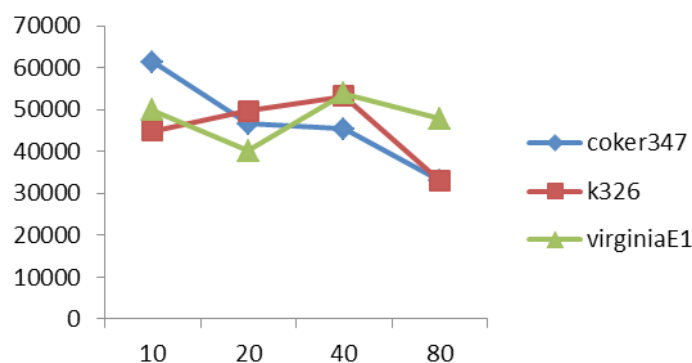


شکل ۵: اثر متقابل غلظت های مختلف کلر بر پروتئین تام در پاسخ به غلظت های مختلف کلر در آب آبیاری در مرحله رسیدگی میان برگ ها در سه رقم توتون (میانگین ± خطای استاندارد)

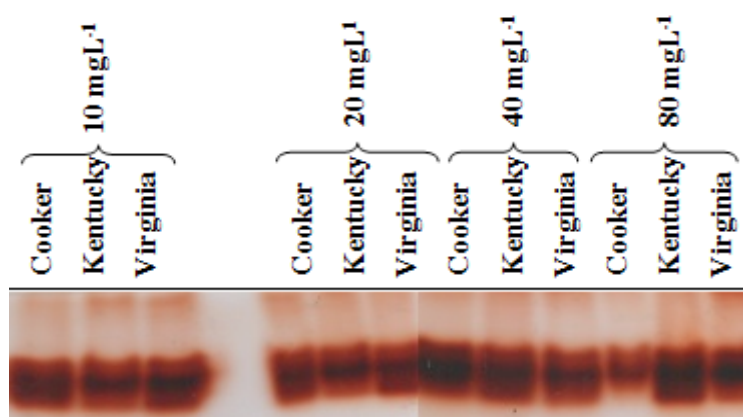
در *Kentucky* تا غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر افزایش یافته و سپس در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کاهش نشان می دهد که این نتیجه با نتایج سنجش فعالیت آنزیمی POD اندازه گیری شده با اسپکتروفتومتر در نمودار ۱ سازگار می باشد. سطح زیر منحنی ایزوآنزیم POD در *Virginia* در تیمار ۲۰ میلی گرم بر لیتر کاهش و در تیمار ۴۰ میلی گرم بر لیتر کرافزایش یافته و سپس کاهشی را در تیمار ۸۰ میلی گرم بر لیتر نشان می دهد که این اختلافات مشاهده شده محسوس نبوده و با نتایج حاصل از بررسی آنزیم توسط اسپکتروفتومتری نیز هماهنگ می باشد. زایموگرام آنزیم پراکسیداز در رقم *Cooker* نشان داد که در غلظت های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر فعالیت آنزیم کاهش یافته و در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر فعالیت آنزیم

گرم بر لیتر در رقم *Virginia* مشاهده شد. در رقم *Virginia* مقدار پروتئین کل در تمامی غلظت ها همواره روند کاهشی را طی نمود. نتایج زیموگرام آنزیم پراکسیداز با استفاده از نرم افزار Total lab

سطح زیر منحنی دو ایزوآنزیم پراکسیدازی قابل مشاهده در کلیه تیمارها و ارقام مورد مطالعه در زیموگرام (شکل ۷) با نرم افزار Total lab (ver1.10) مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که این نرم افزار با توجه به دانسیته یا تراکم رنگ در هر ستون، ژل را مورد بررسی کمی قرار می دهد و بدین ترتیب می توان ستون های مختلف را که در واقع نمونه های متفاوتند با یکدیگر مقایسه نمود. داده های حاصله با نمودار Excell رسم شد (شکل ۶). نتایج حاصل از بررسی نشان داد که سطح زیر منحنی اندازه گیری شده ایزوآنزیم POD



شکل ۶: تغییرات سطح زیر منحنی ایزوآنزیم جدا شده پراکسیدازی



شکل ۷: ژل زایموگرام مربوط به فعالیت ایزآنزیم جدا شده پراکسیدازی در غلظت های مختلف کلر

حد رادیکال های آزاد اکسیژن و رادیکال های هیدروکسیل باشد که باعث جلوگیری از فعالیت این آنزیم می شود (Dermal and Turkan (2005). بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم *Cooker* نشان داد که تیمار شاهد با غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر کلر با تیمار های آبیاری شده با غلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر دارای میزان فعالیت پراکسیدازی مشابه بوده اما در تیمار آبیاری شده با غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر، کاهش معنی داری در فعالیت آنزیم پراکسیداز مشاهده شد. در رقم *Kentucky* نیز در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر، کمترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مشاهده شد، با این تفاوت که در غلظت شاهد که مقدار کلر بسیار کمتر بود نیز شدت فعالیت مشابهی دیده شد. کاهش فعالیت پراکسیدازی را نمی توان ناشی از کاهش تنش دانست چرا که ممکن است به علت کاهش کلر و حساسیت

بسیار اندکی را نشان داد. در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر فعالیت آنزیم پراکسیداز به شدت کاهش یافت.

بحث

افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی تحت تنش شوری اغلب با مقاومت زیاد نمونه های گیاهی به تنش شوری در ارتباط می باشد (Gueta et al., 1997). علاوه بر این هر آنزیم تغییرات کمی و کیفی خاصی را تحت تنش شوری نشان می دهد. مکانیسم های مهم حذف کننده ROS در گیاهان، شامل آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز (GPX)، پلی فنل اکسیداز و کاتالاز (CAT) می باشد (Azevedo et al., 2009). با توجه به نقش پراکسیداز در سیستم آنتی اکسیدانی گیاه، افزایش فعالیت آن در تنش قابل پیش بینی است. از طرف دیگر کاهش فعالیت این آنزیم در برخی غلظت ها می تواند به دلیل تجمع بیش از

لیتر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت که این افزایش فعالیت، به ویژه در ارقام *Kentucky* و *Virginia* معنی دار است. در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر، کلیه ارقام به طور مشابه دارای فعالیت کاهش یافته (حداقل نسبت به تیمار های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر) هستند که در ارقام *Cooker* و *Kentucky* چنین است ولی در رقم *Virginia* بازگشت به سطح فعالیت مشابه با شاهد اتفاق افتاد که این نتایج با یافته های *Costa* و همکاران (۲۰۰۵) هم سو می باشد. آن ها نشان دادند که با افزایش سطوح شوری، فعالیت APX در برگ ها و ریشه های ذرت به ترتیب یا افزایش یافت و یا تحت تأثیر قرار نگرفت. به علاوه نتایج این تحقیق که حاصل بررسی فعالیت آنزیم APX در برگ های میانی توتون در مرحله رسیدگی بود کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر در هر سه رقم *Cooker*، *Kentucky* و ویرجینیا نشان داده شد. این یافته ها با نتایج حاصل از بررسی *Mitto-va* و همکاران (۲۰۰۲) روی ژنوتیپ BR5011 ذرت مطابقت دارد. همچنین فعالیت APX در گیاهان مقاوم به تنش های اکسیداتیو مانند دو وارسته ی مقاوم ذرت (Sc129, Sc13) تحت تأثیر قرار نگرفته و تحت تنش افزایش نمی یابد (Azooz et al., 2009). در رقم *Cooker* از غلظت ۱۰ تا ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر

بیشتر رقم *Kentucky* به کمبود کلر، توان این رقم در مقابله با تنش کلر در این سطح چنان کاهش یافته باشد که قدرت ارتقاء سطح فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی، به ویژه پراکسیداز را از دست داده و مطابق با نتایج Azooz و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنزیم پراکسیدازی با افزایش سطح تنش دچار کاهش شده باشد. رقم *Virginia* حساس تر می باشد زیرا تیمار این رقم با غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر کلر تنها تیماری است که در آن کاهش معنی دار فعالیت، حداقل نسبت به یکی از تیمار های مجاور مشاهده شد. در حالی که بقیه تیمار ها سطح فعالیت آنزیمی یکسانی دارند. از طرفی این موضوع می تواند به نزدیک بودن غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر کلر به غلظت بهینه اشاره داشته و از طرف دیگر مطابق با نتیجه گیری *Costa* و همکاران (۲۰۰۵) این موضوع می تواند به قابلیت مقاومت متفاوت این رقم نسبت داده شود. مطالعات نشان می دهد بیان بیش از حد ایزوآنزیم های APX با مقاومت به شوری در گیاهان در ارتباط است (Azevedo et al., 2009). در مورد آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ارقام *Cooker* و *Kentucky* یک ارتقاء فعالیت اتفاق افتاد که کاملاً معنی دار بوده و در تیمار آخری یعنی غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر کلر این فعالیت دچار افت معنی دار شد. در رقم ویرجینیا نیز هماهنگ با افزایش غلظت کلر تا ۴۰ میلی گرم بر

۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر). سطح MDA حاصل از پراکسیداسیون لیپید های غشایی، اغلب به عنوان شاخصی برای آسیب اکسیداتیو به کار می رود (Der-mal and Turkan, 2005). در رقم *Cooker* بیشترین میزان مالون دآلدهید در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر کلر مشاهده شد و تا غلظت ۸۰ میلی مولار کلر مقدار مالون دآلدهید کاهش یافت که تفاوت معنی داری با شاهد نداشت. نتایج ما با مشاهدات و آزمایشات روی گونه های ذرت مطابقت دارد. در این بررسی ها نشان داده شد که مهم ترین پاسخ در مقاومت به شوری در گونه های ذرت مقاوم به شوری (SC129, SC13) و در مقایسه با شاهد، کاهش مقدار MDA در پی افزایش سطح شوری می باشد (Ab-Kentucky dul Jaleel et al., 2007). در رقم *Kentucky* در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر کلر بیشترین مقدار مالون دآلدهید مشاهده شد و در سایر غلظت های کلر مقدار MDA در مقایسه با شاهد به کمترین میزان کاهش یافت. در رقم ویرجینیا کاهش معنی دار میزان MDA در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر کلر مشاهده شد و در سایر غلظت ها مقدار MDA تفاوت معنی داری با شاهد نداشت. پیشنهاد می شود کاهش مقدار MDA در نتیجه ی افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی است که سطوح H_2O_2 را کاهش داده و آسیب غشایی را نیز کاهش می دهند.

در آب آبیاری، فعالیت آنزیم PPO همواره روند کاهشی داشته است. در رقم *Ken-tucky* اختلاف بین غلظت ها از نظر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز معنی دار بود و در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز افزایش و در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر به کمترین میزان خود کاهش یافت. در رقم *Virginia* فعالیت آنزیم از غلظت ۱۰ تا غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر افزایش نشان داد ولی در غلظت ۸۰ کاهش یافت. افزایش در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی تحت تنش شوری می تواند نشانه ای از افزایش تولید آن ها و در نتیجه ارتقاء مکانیسم های حفاظتی در برابر آسیب اکسیداتیو ایجاد شده توسط تنش شوری باشد. (Meneguzzo et al., 2000). کاهش فعالیت آنزیمی می تواند به خاطر افزایش غلظت یونی و کاهش پتانسیل اسمزی باشد که ساختار و عملکرد آنزیم ها را تحت تاثیر قرار می دهد. رقم *Cooker* پاسخ متفاوتی داشت و از همان ابتدا فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، با افزایش مقادیر کلر کاهش یافت و در غلظت ۸۰ میلی گرم کلر به حداقل خود رسید. تفاوت در نوع پاسخ بین ارقام مختلف تا حدود زیادی به مقاومت یا حساسیت آن ها بستگی دارد و بر این اساس رقم *Cook-er* حساسیت بیشتری نشان داد و در نتیجه زودتر از سایر ارقام دچار کاهش فعالیت معنی دار آنزیم پلی فنل اکسیداز شد (غلظت

در رقم *Cooker* مقدار پروتئین کل اختلاف معنی داری را در چهار غلظت کلر مورد بررسی نشان نداد و بیشترین مقدار پروتئین کل در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر کلر مشاهده شد. به عبارت دیگر، در این غلظت مقدار پروتئین کل نسبت به شاهد افزایش یافت و در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر مقدار آن در گیاه توتون رقم *Cooker* کاهش یافت تا به کمترین مقدار خود در بین تیمارهای مختلف رسید. در رقم *Kentucky* مقدار پروتئین کل در غلظت های بالاتر کلر یعنی در غلظت های ۴۰ و ۸۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل کاهش یافت. در نهایت بررسی روی میزان پروتئین کل در رقم ویرجینا روند کاهشی پیوسته ای را از غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر (شاهد) تا غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نشان داد. اگر تنش طولانی شود می تواند روی سنتز پروتئین تأثیر بگذارد و سرانجام موجب کاهش آن شود. Ayala-Astroga and Alcaraz-Melendez, (2010)

نتایج

به نظر می رسد کلر در غلظت های پایین نه تنها اثرات تنشی و مخرب بر رشد گیاهچه های توتون ندارد بلکه در مواردی نیز پاسخ مکانیسم های ضد تنشی را تعدیل می نماید. در حالی که با افزایش مقادیر کلر در بالاترین سطوح مورد استفاده در این بررسی این پاسخ ها گاهی تشدید شده و شاخص های رشد تغییرات کاهشی را نشان می دهند و از این نظر رقم *Ken-tucky* حساس تر از دو رقم دیگر می باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان لازم می دانند از مرکز تحقیقات توتون گیلان (رشت) به خاطر تأمین بذر و از دانشگاه گیلان بابت حمایت مالی تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

- Abdul Jaleel, C., Gopi, R., Sankar, B., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sridharan, R. and Panneerselvam, R. (2007). Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. *South African Journal of Botany*. 73: 190-195.
- Ayala-Astroga, G.I. and Alcaraz-Melendez, L. (2010). Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments, and proline in *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) and *Paulownia fortune* (Seemann & Hemsley)

- grown in vitro, *Electronic Journal of Biotechnology*. 13: 1-15.
- Azevedo, H., Amorim-Silva, V. and Tavares, R. (2009). Effect of salt on ROS homeostasis, lipid peroxidation and antioxidant mechanisms in *Pinus pinaster* suspension cells. *Annals of Forest Science* 66(2): 211-211.
- Azooz, M.M., Ismail, A.M. and Abou Elhamd, M.F. (2009). Growth, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities as a Selection Criterion for the Salt Tolerance of Maize Cultivars Grown under Salinity Stress. *International Journal of Agriculture and Biology*. 11: 21-26.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Costa, P.H.A, Neto, A.D.A., Bezerra, M.A., Prisco, J.T. and Gomes-Filho, E. (2005). Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17: 353-361.
- Davis, B.J. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 121: 404-427.
- Dermal, T. and Turkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation antioxidant defense and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt systems tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 53:247-257.
- Esfandiari, E., Shekari, F. and Esfandiari, M. (2007). The effect of salt stress on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 35: 133-138.
- Fielding, J.L. and Hall, J.L. (1978). A biochemical and cytological study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*. 29: 969-981.
- Gueta, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B.A. and Ben-Hayyim, G. (1997). Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta*. 203: 460-469.
- Gregory, R.P.F. and Bendali, D.S. (1966). The Purification and some Properties of the Polyphenol Oxidase from Tea (*Camellia sinensis* L.), *Biochemical*

- Journal. 101: 569-581.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*. 125:189-198.
- Kalir, A., Ornri, G. and Poljakoff-Mayber, A. (1984). Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione Portulacoides* exposed to salinity. *Plant Physiology*. 62: 238-244.
- Khajehpour, M. R. (1385). *Industrial Plants*, 1th ed., Jahad Daneshgahi. Tehran, pp: 139-142
- Khosravinejad, F., Hedari, R. and Farboodnia, T. (2008). Antioxidant Responses of Two Barley Varieties of Saline Stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11(6): 905-909.
- Layten-Davis, D., and Nielson, M.T. (1999). *Tobacco: Production, chemistry and technology*, 1th ed., Blackwell Science Ltd. Oxford, pp: 191.
- Meneguzzo, S., Navari-Izzo, F., and Izzo, R. (2000). NaCl effects on water relations and accumulation of mineral nutrients in shoots, roots and cell sap of wheat seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 156: 711-716.
- Mesbah, M. (1381). *Quality of Tobacco*, 1th ed., Tobacco Research Center. Rasht, pp: 25-38.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. and Guy, M. (2002). Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum*. 115: 393-400.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*. 22: 867-880.
- Tso, T.C. (1990). *Production, Physiology and Biochemistry of Tobacco Plant*. Ideals Incorporation, Maryland, pp: 487-557.