# اثر غلظت های مختلف یون کلر بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی در سه رقم توتون گرمخانه ای

سحر باباجانی نیا شیروانی

**چکیده**

شوری حاصل از کلر یک عامل محدود کننده در رشد گیاه است. افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در برابر عوامل اکسید کننده به عنوان یک واکنش تدافعی گیاه در مقابله با تنش محسوب می شود و آنزیم هایی مانند پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پلی فنل اکسیداز (PPO) از جمله مهم ترین اجزاء این سیستم دفاعی می باشند. در این تحقیق اثرات چهار غلظت کلر آب آبیاری (۱۰، ۲۰، ٤٠ و ۸۰ میلی گرم در لیتر $CaCl_2$) بر روند فعالیت این سه آنزیم و محتوای مالون دآلدهید (MDA) و پروتئین کل برگ و همچنین زیموگرام آنزیم POD در سه رقم توتون گرمخانه ای به نام های کوکر۳٤۷، k326 و ویرجینیا E1 به ترتیب با روش اسپکتروفتومتری و استفاده از ژل PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش غلظت کلر تا غلظت ۸۰، فعالیت آنزیم POD در کوکر ۳٤۷ به طور معنی داری کاهش یافت. در کلیه ارقام مورد مطالعه بیشترین فعالیت APX درغلظت ٤٠ و کمترین فعالیت در غلظت ۸۰ مشاهده شد. فعالیت PPO در دو رقم k326 و ویرجینیا E1 درغلظت ٤٠ افزایش یافت. در هر سه رقم، فعالیت PPO درغلظت ۸۰ کاهش یافت. نتایج حاصل از اندازه گیری مقادیر MDA در کوکر ۳٤۷ نشان داد که بجزغلظت ۲۰ که افزایش MDA را به دنبال داشت در سایر غلظت ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در k326، مقادیر MDA در کلیه تیمار ها در مقایسه با شاهد (۱۰ میلی گرم در لیتر) به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین در رقم ویرجینیا E1 بجز تیمار ۲۰ که با کاهش معنی دار MDA همراه بود، در سایر تیمار ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد. مقادیر پروتئین کل در دو رقم k326 و ویرجینیا E1 با افزایش غلظت کلر، کاهش یافت. همچنین بررسی مقایسه ای زیموگرام آنزیم POD در سه رقم توتون گرمخانه ای یافته های حاصل از نتایج اسپکتروفتومتری را تایید کرد.

**کلمات کلیدی:** توتون گرمخانه ای، کلر، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، پروتئین کل، مالون دآلدهید، زایموگرام

# Effects of different chlorine concentrations on antioxidant enzymes activity and Lipid peroxidation in three varieties of flue-cured tobacco

Sahar Babajani nia shirvani

**Abstract**

Salt stress due to chlorine is one of the limiting factors in plant growth. An induction in anti-oxidative enzymes activity, against oxidation factors is a defensive response of salt stressed plants. Enzymes such as POD, APX and PPO are the most important part of this defensive system. In this research, the effects of four chlorine concentrations in irrigation water (10, 20, 40, 80 mg/l $CaCl_2$) on the activities of these three enzymes along with MDA content, total leaf protein, and POD zymogram in three greenhouse tobacco varieties, Coker 347, K326 and Virginia E1were investigated using spectrometry and PAGE gel analysis. The results showed that an increase in chlorine concentration up to 80 mg/l, POD enzyme activity decreased in Coker 347. The highest and lowest APX activities of all stressed varieties were seen in 40 and 80 mg/l treatments, respectively. PPO activity induced in K326 and Virginia E1 by 40 mg/l treatment. In all three varieties, PPO activity was reduced under 80 mg/l treatment. The measurement of MDA content in Coker 347 showed that there was no significant difference among all treatments, except 20 mg/l which was induced. MDA content decreased significantly in K326 in all treatments compared to control. MDA content of Virginia E1 also showed no significant difference, except 20 mg/l treatment which was reduced. Total protein content of K326 and Virginia E1 was reduced with increasing of chlorine concentration. Comparative zymogram study of POD enzyme in three greenhouse tobacco varieties confirmed the results achieved using spectrometry analysis.

**Key words:** Flue-cured tobacco,Chlorine, Peroxidase, Ascorbate peroxidase, Polyphenol Oxidase, Total protein, MDA, Zymogram.

## پیش گفتار

واکنش گیاهان به تنش شوری و سایر تنش های محیطی از جمله مباحث مهم در علوم گیاهی است. درک و دریافت تنش شوری در گیاهان و پاسخ های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن ها به عواملی مثل ژنوتیپ، سطح رشد و نموی گیاه و همچنین شدت تنش بستگی دارد. وابستگی کشاورزی مدرن به آبیاری و استفاده از کود های شیمیایی، نگرانی های زیادی در خصوص شوری حاصل از تجمع یون کلر در خاک ها و سمیت آن در گیاهان ایجاد نموده است. یون کلر به عنوان یک عنصر غذایی کم مصرف تقریبا به مقدار ۰/۳ تا ۱ میلی گرم در وزن خشک برای رشد مطلوب گیاه مورد نیاز است. 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 مخصوصا زمانی که میزان یون کلر در خاک زیاد است برداشت می کنند. تحمل به شوری به طور گسترده بین گونه های گیاهی و ارقام آن متفاوت است، برای مثال گیاهان غیر چوبی مثل گیاه توتون تحمل به کلر خوبی دارند و به فراوانی آن را از خاک جذب می کنند، در حالی که بسیاری از گیاهان چوبی مانند مرکبات به غلظت بالای کلر و سمیت حاصل از آن بسیار حساس هستند. آستانه تحمل به غلظت کلر در گونه های حساس (mg/g DM) ۷-٤ و در گونه های مقاوم (mg/g DM) ۵۰-۱۵ گزارش شده است. همچنین غلظت زیاد کلر در توتون باعث کاهش الاستیسیته در برگ ها شده و اثرات نا مطلوبی بر سوزش برگ توتون دارد. از سوی دیگر افزایش بازدهی محصولات کشاورزی در پاسخ به مصرف کود های کلر دار در بسیاری از گیاهان زراعی مانند گندم، جو، سیب زمینی، چغندر قند و توتون گزارش شده است. به نظر می رسد که افزایش رشد و تولید محصول به واسطه نقش یون کلر در بازدارندگی یا سرکوب بیماری های ریشه و برگ در گیاهان باشد. البته چنین پاسخی در غلظت های پایین تر از حد بحرانی (Critical nutrient range) کلر در گیاهان زراعی حاصل می شود. مکانیسم های توصیف کننده مقاومت به تنش شوری در گیاهان اغلب به فعالیت توام یون کلر با کاتیون همراه آن (اغلب $Na^+$) نسبت داده می شود، از این رو در خصوص اثرات اختصاصی شوری حاصل از یون کلر به ویژه در سطح سلولی اطلاعات بسیار اندک است. سریع ترین و قابل مشاهده ترین پاسخ گیاه به تنش های محیطی معمولا در سطح سلولی و مولکولی با بررسی پاسخ های بیوشیمیایی که با تغییر در مسیر های متابولیسمی گیاه همراه است انجام می شود. انجام این تحقیق در پاسخ به سوالات زیر ضروری به نظر می رسید:

۱- آیا نقش کلر به عنوان باز دارنده یا سرکوب کننده عوامل پاتوژنی و بیماری زا با القاء سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در سطح سلولی حاصل می شود؟

۲- آیا القاء سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در پاسخ به شوری حاصل از کلر به عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی مناسب در تعیین مقاومت به شوری در ارقام توتون کاربرد دارد یا خیر؟

۳- با توجه به آنکه گیاه با بهره گیری از سیستم دفاع آنتی اکسیدانی قادر به تحمل تنش می شود، آیا غلظت های مورد استفاده کلر آب آبیاری در این تحقیق موجب ایجاد تنش شدید و آسیب جدی به گیاهان توتون می شود یا خیر؟

# فصل اول

# مقدمه

# و

# کلیات

**۱-۱- تاریخچه کشت گیاه توتون**

توتون 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. تنباکو ارزش اقتصادی و مصرفی کمتری دارد و بیشتر در کشور های خاورمیانه به صورت قلیان مورد مصرف قرار می گیرد. توتون گونه های زراعی زیادی دارد. از این میان دو گونه توتون معمولی با نام علمی نیکوتیانا تاباکوم[1] و توتون شرقی با نام نیکوتیانا روستیکا[2] به عنوان گونه های زراعی اهمیت زیادی در سطح جهانی دارند. در ایران تنباکو یا توتون ایرانی با نام علمی نیکوتیانا پرسیکا[3] نیز اهمیت زراعی و اقتصادی زیادی دارد. ظاهرا توتون شرقی و توتون ایرانی از توتون معمولی مشتق شده اند. توتون معمولی گیاهی آلوتتراپلوئید (۲n=۲۸) می باشد. توتون در امریکای جنوبی و مرکزی و در ارتفاعات کم تا متوسط و حاشیه جنگل ها منشا یافته است. سابقه کشت توتون در امریکا به حدود ۳۰۰۰ سال پیش می رسد. دو گونه توتون معمولی و شرقی بیش از سایر انواع تولید می شوند. کاشفان اولیه ی قاره امریکا در اواخر قرن ۱۵ با توتون و مصرف آن آشنا شده و دنیا را با آن به عنوان یک ماده مخدر آشنا ساختند. اسپانیایی ها در قرن ۱٦ میلادی به کشت توتون در امریکا پرداختند. سابقه ی کشت توتون در اروپا و آسیای غربی به اوایل قرن ۱۷ می رسد. امروزه توتون معمولی درچین، امریکا، برزیل، زیمبابوه و هند به طور وسیعی کشت می گردد. توتون شرقی در سواحل شرقی دریای مدیترانه، دریای اژه، دریای مرمره و دریای سیاه کشت می شود. ترکیه، یونان، بلغارستان و یوگسلاوی سابق مهم ترین تولید کنندگان توتون شرقی می باشند. همچنین توتون های شرقی و نیمه شرقی در ایتالیا، آلبانی، سوریه، ایران، لبنان و کشور های اتحاد جماهیر شوروی سابق و تایلند کشت می شود. گسترش جهانی توتون شرقی بیش از توتون معمولی بوده است. این امر احتمالا به دلیل بهتر بودن رایحه و زیاد تر بودن مقدار ماده مخدر در توتون شرقی نسبت به توتون معمولی بوده است. ظاهرا توتون معمولی توسط تجار و استعمارگران در قرن ۱۷ میلادی وارد ایران شده است و کشت آن در نواحی ساحل خزر معمول شده است. کشت توتون در نواحی خشک ایران سبب پیدایش انواع سازگاری از آن به شرایط فوق گردیده است که امروزه به نام توتون ایرانی شناخته می شود. توتون از نظر رشد و نمو مشابه بسیاری از گیاهان زراعی دیگر است، اما از این لحاظ که بیشتر از طریق سوزاندن برگ مصرف می شود با بقیه متفاوت است. کیفیت مصرفی توتون صفتی بسیار پیچیده بوده و تابعی از شرایط تولید، مکان برگ روی بوته، میزان رسیدگی برگ هنگام برداشت، نحوه ی خشک کردن برگ و فرآیندسازی، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی برگ و دود حاصله از

[1]-Nicotiana tabaccum
[2]-Nicotiana rustica
[3]-Nicotiana persica

سوختن و در نهایت آن چه با چشم دیده می شود و احساس می گردد بوده و به عبارت دیگر به سلیقه مصرف کننده بستگی زیادی دارد (خواجه پور، ۱۳۸۵).

**۱-۲- گونه ها، گروه بندی و ارقام**

توتون معمولی، توتون شرقی و توتون ایرانی سه گونه مهم از جنس توتون می باشند که در ایران تولید می شوند. توتون معمولی انواع بسیار متنوعی دارد که از لحاظ سازگاری، شرایط محیطی مناسب تولید، روش خشک کردن، کیفیت مصرفی و موارد کاربرد با یکدیگر کاملا متفاوت می باشند. توتون معمولی را بر اساس روش خشک کردن به انواع گرمخانه ای، هوا خشک، آفتاب خشک و آتش خشک تقسیم می نمایند. توتون گرمخانه ای که با جریان هوای گرم خشک می شود و با نام های روشن و ویرجینیا نیز شناخته می شود دارای برگ هایی به رنگ زرد یا نارنجی با مقدار قند بالا، مزه کمی اسیدی، نیکوتین کم تا متوسط و خصوصیات سوختن ملایم می باشد. این نوع توتون با سایر انواع مخلوط شده و بیشتر در تولید سیگار معمولی و به مقدار کمی در تولید توتون پیپ، جویدنی و سیگار برگ مصرف می شود. توتون های بارلی، مریلند و بعضی انواع دیگر در هوای معمولی و بدون سیستم حرارتی خشک می شوند. این نوع توتون ها از نظر قند پایین و کمی قلیایی می باشند و توتون مریلند دارای برگ های خشک بوده و بیشتر جهت تولید سیگار برگ مصرف می شود و سهم کوچکی در تولید سیگار معمولی دارد و سطح زیر کشت آن در جهان محدود است. برای تولید نوع آتش خشک طی ۳ تا ۵ روز اول از هوای معمولی برای خشک کردن توتون استفاده می شود. بعد از آن آتش چوب برای افزایش دما و تکمیل خشک کردن استفاده می گردد. توتون آتش خشک مقدار قند کم، نیکوتین زیاد و برگ تیره داشته و برای تولید توتون چپق، جویدن و نوع خاصی سیگار برگ مصرف می شود. به طور کلی انواع آفتاب خشک و آتش خشک دارای برگ های ضخیم، سنگین، تیره، روغنی، تند و با سوختن کند می باشند (خواجه پور، ۱۳۸۵).

**۱-۳- خصوصیات گیاه شناسی**

توتون معمولی 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. ارتفاع بوته در شرایط مزرعه و بدون گل آذین تا ۱/۵ متر و همراه با گل آذین تا بیش از ۲ متر می رسد. طول دوره رشد گیاه در زمین اصلی و برای تولید برگ به نوع، رقم و شرایط تولید بستگی زیادی داشته و معمولا ۳ تا ۵ ماه می باشد. ریشه ای که از گیاهچه توتون به وجود می آید از نوع راست می باشد. اما این ریشه طی عملیات خارج سازی نشا از زمین و نشاکاری آسیب می بیند، در نتیجه ریشه های فرعی و ظریف زیادی به وجود می آیند. از ناحیه

محور زیر لپه و میانگره هایی که در جریان نشاکاری در خاک قرار می گیرند نیز ریشه های نابجای زیادی تولید می گردند (شکل ۱-۱).

شکل ۱-۱- تصویر ریشه ی اصلی و ریشه های فرعی گیاه توتون (*Google*)

بنابراین شبکه ی وسیعی از ریشه های ظریف در توتون تولید می شود که قسمت اعظم آن ها تا عمق ۳۰ تا ٤۰ سانتی متری خاک گسترده اند. عمق توسعه ریشه به ندرت از ٦۰ سانتی متر تجاوز می کند. علیرغم سطحی بودن گسترش، ریشه توان نگاه داری بوته را در مقابل بادهای شدید دارد (خواجه پور، ۱۳۸۵).

میانگره های برگ های پایینی ساقه در ابتدای دوره نمو گیاه فاقد رشد می باشند، اما میانگره ها از حدود ٤ هفته پس از نشاکاری شروع به رشد می نمایند و ساقه قوی، راست و محکمی با میانگره های کوتاه (با میانگین طول ٤ تا ٦ سانتی متر)، گرد در برش قطری و چوبی شده در ناحیه قاعده ساقه به وجود می آید. ساقه توسط کرک های ترشحی غده ای و لزج پوشیده شده است. جوانه های جانبی واقع در زاویه ی داخلی برگ های پایینی گیاه در خواب باقی می مانند، ولی رشد جوانه های واقع در برگ های فوقانی تحت غالبیت مریستم انتهایی ساقه واقع می باشد. با قطع مریستم انتهایی ساقه و یا همراه با بازشدن گل ها، این غالبیت از بین رفته و جوانه های جانبی چند برگ فوقانی به صورت شاخه های فرعی رشد می کنند و در نتیجه گیاه انشعاب می یابد. میزان ساقه دهی در ارقام مختلف فرق می کند.

برگ های ساده و بدون بریدگی، بدون دمبرگ، بزرگ، بیضی شکل طویل، با ناحیه ی راسی کشیده، با رنگ سبز روشن، شکننده، با بوی مواد مخدر، مزه تلخ و تند و با آرایش مارپیچی در روی ساقه قرار گرفته اند (شکل ۱-۲). زاویه ی برگ های نیمه فوقانی گیاه با ساقه در انواع گرمخانه ای حدود ٤٠ درجه است، اما برگ های پایینی افقی تر می باشند.

۱-۲- تصاویری از برگ توتون (*Google*)

برگ در ارقام مختلف از لحاظ اندازه، ضخامت، بافت ظاهری و برجستگی رگبرگ ها فرق می کند. در هر بوته، پتانسیل تولید ۲۰ تا ۳۰ برگ وجود دارد. طول و عرض و ضخامت برگ ها به نوع، رقم و شرایط تولید بستگی زیادی دارد. هر چه تعداد کمتری برگ بر روی ساقه نگاه داری شود، برگ های بزرگ تر و نازک تری در روی بوته به وجود می آیند. سطح برگ نیز همانند ساقه کم و بیش توسط کرک های ترشحی کمی مخاطی پوشیده شده است. در این کرک ها پیش ماده هایی وجود دارند که طی فرآیند خشک کردن تغییر یافته و باعث عطر و رایحه ی محصول خشک شده می گردند. ظاهرا این کرک ها و ترشحات در میزان مقاومت به حشرات نیز نقش دارند (خواجه پور، ۱۳۸۵).

در هر گل آذین بیش از ۱۵۰ گل کامل قیف مانند با دمگل کوتاه به وجود می آید. انتهای هر انشعاب گل آذین به یک گل ختم می شود (شکل ۱-۳). گل دهی از پایین به طرف بالای گل آذین و نیز هر انشعاب آن ادامه می یابد. دوران باز شدن گل ها به چند هفته و گاه تا ۳ ماه می رسد. کاسبرگ به هم جوش خورده، کاسه ی گل را که طول آن تا نیمه جام گل می رسد به وجود می آورد. کاسه ی گل توسط کرک های نرم سفید پوشیده شده و به ٤ و گاه به ۵ لب آزاد با طول غالبا نامساوی و نوک تیز ختم می گردد.

۱-۳- گل کامل قیف مانند با دمگل کوتاه در توتون (*Nicotiana tabaccum*) (*Google*)

جام گل از ۵ گلبرگ به هم جوش خورده با کرک هایی در سمت بیرونی تشکیل شده است. جام گل غالبا به رنگ صورتی و گاه سفید یا قرمز تند بوده و به طول حدود ۵ تا ۱۰ سانتی متر می رسد. جام گل در ناحیه ی میانی پهن و در ناحیه ی فوقانی گسترده است و به تعدادی لب نامشخص و غیر عمیق ختم می شود (خواجه پور، ۱۳۸۵).

در هر گل ۵ پرچم با میله ی بلند و بساک کوچک که به طور طولی شکاف می خورد وجود دارد. میله ی پرچم ها از نظر طول با یکدیگر متفاوت می باشند و به جام گل جوش خورده اند. تخمدان از دو برچه مستقل تشکیل گردیده و در هر برچه تا ۸۰۰۰ دانه به وجود می آید. در انتهای خامه که طویل و باریک است یک کلاله با ۲ لبه که طول آن تا دهانه جام گل می رسد وجود دارد.

میوه کپسولی دو برچه ای و تخم مرغی شکل است که توسط کاسه ی گل احاطه شده است.

برچه به صورت طولی شکافته شده و دانه های قهوه ای تیره و ریز آن آزاد می شوند. دانه بیضی شکل می باشد و بر روی آن برجستگی های کروی با فواصل منظم وجود دارد و در یک سمت بذر خط برجسته ای مشاهده می گردد (شکل ۱-٤). در هر گرم دانه حدود ۱۰۰۰۰ تا ۱۳۰۰۰ دانه وجود دارد و در هر بوته تا ۱۵۰۰۰۰ دانه به وجود می آید. بذر در بسیاری از ارقام دارای خواب بعد از برداشت است که میزان آن توسط نور قرمز (در وضعیت مرطوب بودن) و یا حداقل ۳ ماه انبارداری کاهش می یابد. چنانچه بذر توتون در شرایط مساعد نگه داری شود تا ۲۰ سال به حیات خود ادامه می دهد (خواجه پور، ۱۳۸۵).

۱-٤- بذر گیاه توتون (*Nicotiana tabaccum*) (*Google*)

**۱-٤- کلر**

کلر یک عنصر هالوژن با عدد اتمی ۱۷ و جرم اتمی میانگین ۳۵/٤٥۳ است. فراوانی طبیعی ایزوتوپ های کلر $Cl^{35}$ و $Cl^{37}$ به ترتیب ۷۵/۷۷٪ و ۲۳/۲٤٪ است. تنها حالت اکسایش پایدار کلر به صورت آنیون تک ظرفیتی $Cl^-$ است. صرف نظر از شکل شیمیایی، عبارت کلر یا Cl برای مشخص کردن عنصر و یون کلر یا $Cl^-$ برای مشخص کردن شکل یونی عنصر استفاده می شود (بوهن و همکاران، ۱۹۷۹).

**۱-۵- یون کلر درخاک ها و جذب و حرکت آن در گیاه**

میزان طبیعی کلر در خاک ها به طور عمده از آب باران، افشانه دریا و غبار و آلودگی هوا وارد می شود. به علاوه فعالیت های انسانی نظیر آبیاری و کود دهی به طور عمده در ذخیره کلر شرکت می کنند. در محلول خاک کلر عمدتاً به صورت آنیون کلر ($Cl^-$) وجود دارد. آنیون کلر به آسانی تشکیل کمپلکس نمی دهد و میل ترکیبی اندکی را در جذب سطحی با اجزای خاک نشان می دهد، بنابراین حرکت یون کلر در خاک بیشتر به وسیله ی جریان های آب تعیین می شود. کلر یک ماده غذایی کم مقدار و اساسی برای بیشتر گیاهان است. یون کلر یک حل شونده ی مهم فعال اسموتیکی در واکوئل است و در تورژسانس و تنظیم فشار اسمزی شرکت می کند. در سیتوپلاسم هم ممکن است فعالیت برخی از آنزیم های کلیدی را تنظیم کند. یون کلر از طریق ریشه ها وارد گیاهان می شود *(Guohua et al., 2000)*.

**۱-٦- ورودی های کلر به خاک**

ورودی های کلر به خاک در نتیجه ذخیره $Cl^-$ از بارش باران، استفاده از کود (KCl)، آب های آبیاری، قطرات ریز دریا، گرد و غبار و آلودگی هوا فراهم می شود. محتوی Cl آب باران بستگی به مجاورت با آب شور دارد و بسیار متغیر است. بنابراین ذخیره $Cl^-$ ممکن است در خاک های نزدیک به دریا یا دریاچه های نمک خیلی زیاد باشد. فعالیت های انسانی مانند آبیاری و کوددهی میزان ذخیره $Cl^-$ خاک را تحت تأثیر قرار می دهد به این صورت که افزودن کود اساسا $Cl^-$ خاک را افزایش می دهد *(Guohua et al., 2000)*.

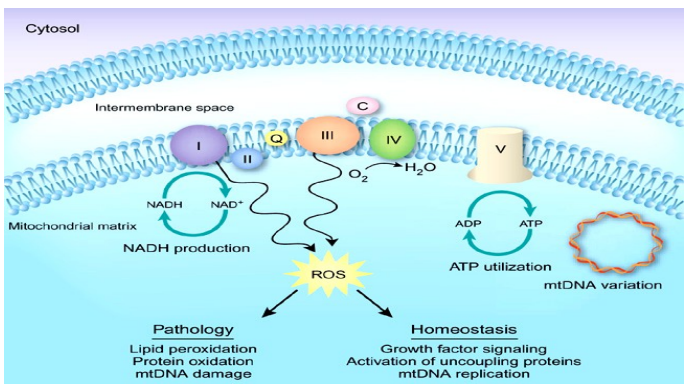
**۱-۷- دسترسی کلر در خاک**

کلر غالباً به صورت $Cl^-$ در خاک وجود دارد. آنیون $Cl^-$ به آسانی تشکیل کمپلکس نمی دهد. از آنجایی که سیلیکات های لایه ای در خاک رس غالباً بار منفی دارند، $Cl^-$ میل به دفع از سطوح مواد معدنی که محتوای بسیاری از ذرات خاک هستند را دارد، به علاوه این نیرو های دافعه سبب به وجود آمدن قسمت هایی در داخل خاک می شوند که ناتوان از انتقال و حرکت

یون کلراند. $Cl^-$ برخلاف دیگر آنیون های عمده خاک نظیر $NO_3^-$، $SO_4^{-2}$، جذب سطحی کمی را با اجزای خاک نشان می دهد و برخلاف دیگر آنیون های عمده خاک به طور شیمیایی به وسیله ارگانیسم های خاک تغییر داده نمی شود. $Cl^-$ اغلب به عنوان ردپایی برای حرکت آب در خاک استفاده می شود (*Guohua et al., 2000*).

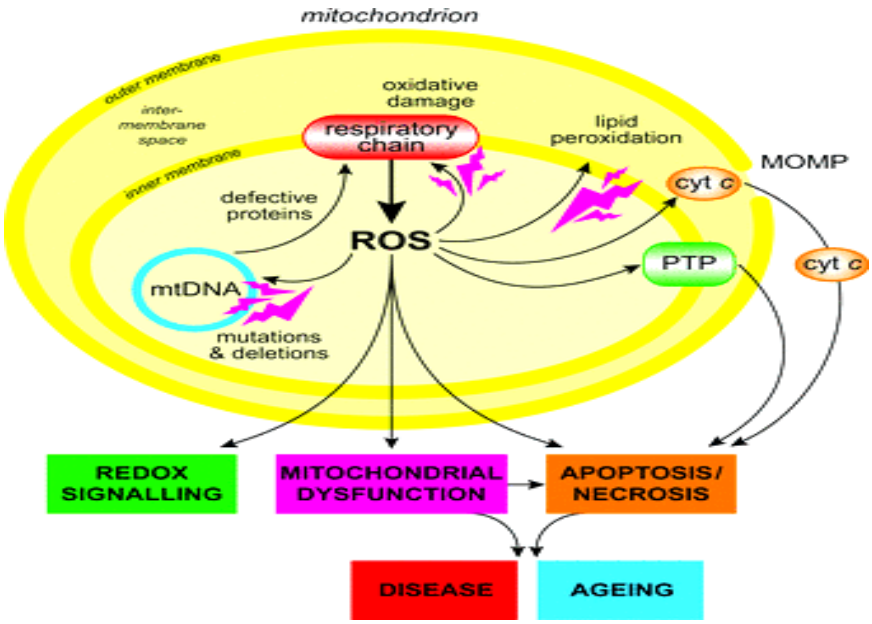
**۱-۸- اثرات تنش شوری**

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. بر این اساس گیاهان یکسری ویژگی های دفاعی دارند تا اثر این تنش ها را کاهش دهند. تنش شوری مانند تنش های غیر زنده ی دیگر می تواند به سمت تنش اکسیداتیو در طی افزایش در گونه های اکسیژنی فعال (ROS) مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) و رادیکال های هیدروکسیل هدایت شود که ممکن است صدمات سلولی را طی اکسیداسیون لیپید ها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک موجب شده و موجب صدمه DNA، پروتئین، کلروفیل و عملکرد های غشاء شوند (شکل ۱-٦). به طور معمول ROS از انتقال یک، دو و سه الکترون حاصل می شود که به ترتیب $O_2$ را به فرم سوپراکسید ($O^-_2$)، پراکسیدهیدروژن ($H_2O_2$) و رادیکال هیدروکسیل ($HO^\cdot$) تبدیل می کند (*Esfandiari, 2007*). به نظر می رسد $H_2O_2$ یک مولکول سیگنالی عمومی را تشکیل می دهد که تنش سلولی را القاء می نماید. برای کم کردن تاثیرات تنش اکسیداتیو، سلول های گیاهی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی پیچیده ای را نشان می دهند. دو نوع از سیستم های آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی و آنزیمی بررسی شده اند. توکوفرول ها، فلاونوئید ها، کاروتنوئید ها و اسید آسکوربیک از اجزاء غیرآنزیمی و سوپراکسیددیسموتاز ها، پراکسیداز ها (آسکوربات، گلوتاتیون و گایاکول)، کاتالاز ها و آنزیم هایی که آسکوربات را اکسید کرده و کاهش می دهند آنزیمی می باشند. هر دو سیستم آنتی اکسیدانی با هم همکاری می کنند و یک مکانیسم کامل را تشکیل می دهند که غلظت ROS را در ارگانیسم ها کنترل می کند (*Khosravinejad, 2000*).




۱-۵- تشکیل ROS در میتوکندری و اثرات آن (*Google*)

آنزیم های تشخیص دهنده ی ROS در بخش های سلولی مختلف به صورت ایزوآنزیم ها حضور دارند. تولید ROS و افزایش فعالیت بسیاری از آنزیم های آنتی اکسیدانی در طی تنش شوری در پنبه، توت سفید، گندم، گوجه فرنگی، برنج، چغندر قند و ذرت گزارش شده است و بسیاری از داده های حاصل از این مطالعات تحمل تنش با حضور یک سیستم آنتی اکسیدانی باکفایت و کارآمد را تایید می کند. چندین سیستم آنزیمی آنتی اکسیدانی در حذف آنزیمی ROS دخالت دارند. در این میان پراکسیداز ها (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) که ازجفت الکترون های آسکوربات و گایاکول استفاده می کنند به طور نسبی برای نقششان در دفع سمیت $H_2O_2$ درگیاهان معروف و شناخته شده می باشند. جنبه های کمی و کیفی تغییرات اغلب به سطوح مقاومت به شوری وابسته اند. در برنج واریته های مقاوم به شوری دارای پراکسیداسیون لیپیدی پایین تر از واریته های حساس به شوری می باشند. در گوجه فرنگی و مرکبات مقاومت به شوری به سمت فعالیت زیاد APX ,SOD و CAT گسترش داده شده است. مقاومت بالا به تنش شوری به وسیله ی بیان بیش از حد APX سیتوزولی اثبات شده است (*Khosravinejad, 2000*). گیاه توتون با توجه به اهمیت آن در تحقیقات علوم گیاهی موضوع جالبی برای مطالعه در این زمینه بوده است، اما متاسفانه کار های کمی روی پاسخ گیاهان توتون به شوری انجام شده است (*Flowers et al.,1986*).




۱-٦- آسیب های ROS در میتوکندری (*Google*)

درجه ی آسیب ROS به تعادل میان تولید ROS و حذف آن بوسیله ی سیستم های حذف و پاک سازی این آنتی اکسیدان ها بستگی دارد. ارگانیسم ها سیستم های آنتی اکسیدانی پیچیده را برای حفظ تعادل و عملکرد مناسب سلولی توسعه می دهند . به نظر می رسد که افزایش گونه های اکسیژنی فعال (ROS) به عنوان بیشترین پاسخ به تنش شوری می باشد.

**۱-۹- پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$)**

یک تعداد از مشتقات مختلف اکسیژن به عنوان ROS تعریف می شوند. ROS شامل رادیکال آنیون سوپراکسید ($O^-_2$)،پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل ($OH^\circ$)، رادیکال پرهیدروکسیل($OH^\circ_2$) و اکسیژن یکتائی ($^1O_2$) می باشد. اضافه کردن یک الکترون یکتا نیاز به ورود انرژی و کاهش $O_2$ به رادیکال آنیون سوپراکسید دارد.

$$O_2 + 1e \rightarrow O_2^{-\bullet}$$

رادیکال سوپراکسید نسبتا ناپایدار است و مجددا به $O_2$ تبدیل می شود یا در واکنش با یک پروتون به صورت خود به خودی یا در واکنش کاتالیز شده با آنزیم سوپراکسید دیس موتاز (SOD) به $H_2O_2$ تبدیل می شود.

$$2O_2^{-\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

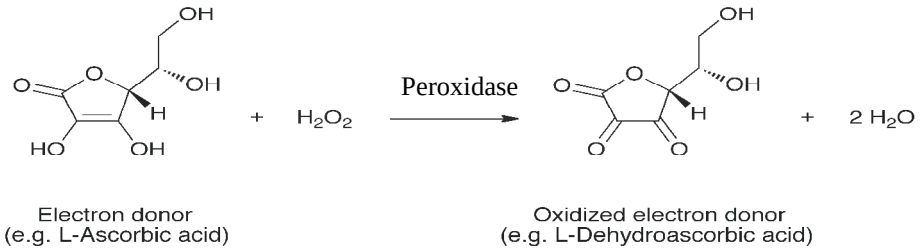
هیدروژن پراکسید از طریق کاهش $O^{-\circ}_2$ توسط یک عامل احیا کننده (X) مثل آسکوربات، تیول ها، فرودوکسین ها و ... هم تولید می شود.

$$O_2^{-\bullet} + H^+ + XH_2 \rightarrow H_2O_2 + XH$$

بنابراین سطح هیدروژن پراکسید سلولی با تولید سوپراکسید ارتباط دارد (*Slesak et al., 2007*).

**۱-۱۰- پراکسیداز (POD)**

پراکسیداز ها آنزیم های حاوی گروه هم با نقش های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متنوع در گیاهان عالی می باشند. آن ها در رشد گیاه، تمایز و مراحل نموی شرکت می کنند که این مراحل نموی کاتابولیسم اکسین، بیوسنتز اتیلن، تولید $H_2O_2$، تشکیل و ترمیم دیواره ی سلولی، لیگنینی شدن و چوب پنبه ای شدن را شامل می شوند. از فواید مخصوص نقش پراکسیداز ها، پاسخ به تنش های زنده و غیرزنده در گیاهان می باشد (*Has Schon et al., 2005*).




۱-۷- واکنش کاتالیز شده توسط آنزیم پراکسیداز در حذف پراکسید هیدروژن

تولید بیش از حد آنزیم با چوبی شدن گیاه در ارتباط می باشد که پیشنهاد می کند آنزیم پراکسیداز سازنده ی لیگنین می باشد (*Gazarian, 1996*). بالاترین افزایش پراکسیداز ها و در پروتئین های اتصال دیواره ای بافت در حال نمو اتفاق می افتد. پراکسیداز به دلیل توانایی برای اکسید کردن ۳- ایندول استیک اسید (IAA) و تشکیل دادن لیگنین در پیری گیاهان دخالت دارد. در توتون بیان بالایی از ایزوآنزیم های پراکسیدازی اسیدی بعد از جراحت یافتن و عفونت ویروس موزاییک توتون گزارش شده است که نقش پراکسیداز را به عنوان یک پروتئین دفاعی در شرایط تنش روشن می سازد. پراکسیداز های دیواره ی سلولی نقش مهمی را در متابولیسم دیواره ی سلولی ایفا می کنند که هم بر سست کردن و هم محکم کردن دیواره ی سلولی تاثیر می گذارد (*Huttova, 2006*).

**۱-۱۱- آسکوربات پراکسیداز (APX)**

APX ها مهم ترین گروه آنزیم های آنتی اکسیدانی در گیاهان هستند. به طور تقریبی ۵ ایزوفرم APX در گیاهان شناخته شده است:

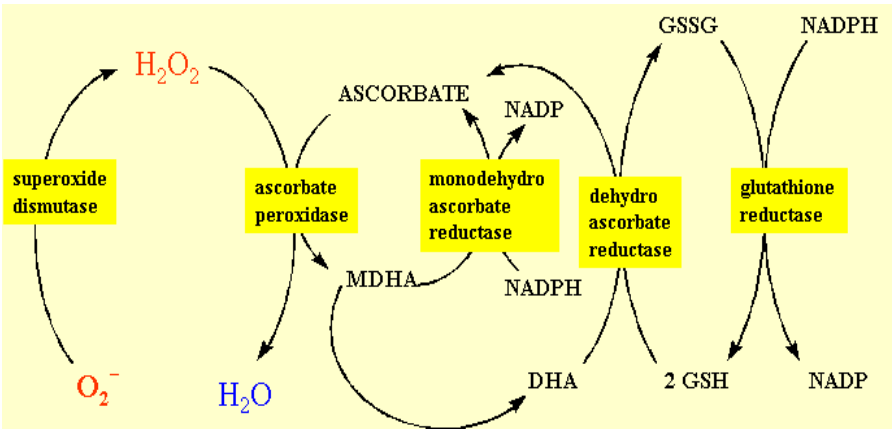
- سیتوزولی
- پراکسی زومی/ گلی اکسی زومی
- کلروپلاستی
- میتوکندریایی

به نظر می رسد که همه ی فرم های APX به عنوان حذف کننده های $H_2O_2$ عمل می کنند که به طور مداوم در سلول ها تولید می شود. بیان ژن های APX می توانند بوسیله ی فاکتور های خاصی مانند حمله ی پاتوژنی، فشار مکانیکی، جراحت،

اشعه UV-B و کمبود آب، تنش شوری، انرژی تحریکی زیاد، دما های بسیار پایین یا بسیار بالا، اکسیژن زیاد بعد از یک دوره کمبود اکسیژن، آلودگی اتمسفری (برای مثال دی اکسید سولفور، اکسید نیتروژن و دی اکسید یا اوزون)، یون های فلزی زیاد، کمبود بعضی نمک های معدنی (مانند فسفات ها) و علف کش ها فعال شوند.

**۱-۱۱-۱- مشخصه های آسکوربات پراکسیداز ها:**

آسکوربات پراکسیداز ها پروتئین های دارای گروه پروستیک هم با (EC 1.11.1.11) هستند و آهن نقش مهمی را در جایگاه کاتالیتیکی آن ها ایفا می کند. آسکوربات پراکسیداز ها بسیار به غلظت آسکوربات حساس می باشند. اگر غلظت آسکوربات خیلی پایین باشد کمتر از ۲۰ mM، آنزیم ها پایداریشان را از دست داده و فعالیتشان کاهش می یابد. در کلروپلاست ها، فرم های APX متصل شده به تیلاکوئید به صورت tAPX و استرومایی محلول به صورت sAPX نشان داده می شود.




۱-۸- نقش آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تبدیل پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) به $H_2O$ با کمک آنزیم های آنتی اکسیدانی (*Google*)

غیرفعال شدن آنزیم به وسیله ی یکی از محصولات اصلی و مهم تنش به نام $H_2O_2$، یک نشانه کم شدن مقاومت در مقابل حمله گونه های اکسیژنی فعال (ROS) می باشد (*Hiner et al., 2000*).

**۱-۱۲- پلی فنل اکسیداز**

پلی فنل اکسیداز ها، آنزیم های حاوی مس هستند که اساساً در سنتز رنگیزه ها مانند ملانین در گیاهان دخالت دارند. این گروه از آنزیم ها به طور وسیعی از باکتری تا پستانداران گسترش یافته اند. این آنزیم در طی توسعه و نمو بافتی شکل گرفته و در غشاهای تیلاکوئیدی کلروپلاست اتصال می یابد (*Stout et al., 2007*).

۳ نوع از پلی فنل اکسیداز ها کاتکول اکسیداز، لاکاز و کرسولاز هستند که ۲ نوع واکنش را کاتالیز می کنند:

۱- هیدروکسیلاسیون مونو فنول ها به o- دی فنول ها (فعالیت مونو فنولازی)

۲- اکسیداسیون o- دی فنول ها به o- کوئینون ها (فعالیت دی فنولازی)

قهوه ای شدن آنزیمی عمل اصلی پلی فنل اکسیداز در میوه جات و سبزیجات است و اغلب ناخوشایند بوده و کیفیت های نا مطلوبی را در مواد غذایی موجب می شود (شکل ۱-۹). به نظر می رسد اکسیداسیون سوبسترا های فنولی به وسیله ی پلی فنل اکسیداز اصلی رنگ قهوه ای بسیاری از میوه جات و سبزیجات باشد. درجه قهوه ای شدن در موز بعد از برش، در ارتباط با فعالیت پلی فنل اکسیداز و غلظت سوبسترا های فنولی آزاد می باشد (شکل ۱-۱۰) (*Stout et al., 2007*) .

***Top and bottom right,*** **fresh-market table grapes are vulnerable to browning of skins and flesh during harvesting, packing, storage and shelf life. Research has shown that this browning can be reduced in 'Princess' table grapes, *left*, by harvesting when soluble solids range between 16.0% and 18.0%.**

۱-۹- قهوه ای شدن رنگ میوه جات بر اثر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

۱-۱۰- قهوه ای شدن در موز و ارتباط آن با فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

پلی فنل اکسیداز ها همچنین در صنعت توتون مهم می باشند، زیرا آن ها از راه اکسیداسیون فنول ها روی رنگ و مزه برگ توتون تأثیر می گذارند.

**۱-۱۳- پراکسیداسیون لیپید ها**

در کنار پروتئین ها، لیپید ها فراوان ترین جزء غشاء ها بوده و در مقاومت سلول های گیاهی بر تنش های محیطی نقش دارند. کمبود شدید آب باعث اختلال ارتباط بین لیپید های غشاء و پروتئین ها و کاهش فعالیت آنزیم و توانایی انتقال دو لایه لیپیدی می شود. مقدار حساسیت گیاه و آسیب وارد شده به غشاء با اندازه گیری محتوی مالون دآلدهید (MDA) که حاصل قرار گرفتن اسید های چرب غیر اشباع در معرض تنش است، مشخص می گردد. افزایش تنش با ایجاد تغییر در اسید های چرب غیر اشباع بر ساختار و ویژگی های غشاء سلولی اثر گذاشته، و باعث افزایش ایجاد رادیکال های آزاد و پراکسیداسیون لیپید ها و تراوایی غشاء سلولی می شود. اسید های چرب غیر اشباع مرکب اعضای اصلی ترکیبات لیپیدی مستعد برای پراکسیداسیون هستند. گونه های فعال اکسیژن می توانند با اسیدهای چرب غیر اشباع واکنش دهند و رادیکال های پروکسی لیپیدی و هیدروکسی لیپیدی را به وجود آورند (*Azooz et al., 2009*). اکسیداسیون لیپید ها شامل سه مرحله می باشد:

۱- مرحله آغازی مرحله تشکیل رادیکال های لیپید (L) از یک لیپید می باشد. در این حالت کربن موجود در مرکز رادیکال لیپید با اکسیژن سریعا واکنش می دهد تا رادیکال پراکسیل لیپید تشکیل شود ($LOO^{\cdot}$).

۲- مرحله تکثیر رادیکال که در این مرحله پراکسیل لیپید به مولکول لیپید دیگر حمله می کند و اتم هیدروژن آن را جذب می کند تا پراکسیدهیدروژن (LOOH) ایجاد شود و این امر همچنان ادامه می یابد.

۳- که مرحله پایانی نیز نام گرفته است شامل برهم کنش دو مولکول از رادیکال های پراکسیل لیپید می باشد تا محصول بدون رادیکالی تشکیل شود (*Niki, 1987*).

**۱-۱٤- بررسی منابع**

فعالیت POD در گیاه ذرت تحت استرس NaCl بررسی شد که نشان داد فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ های ذرت گونه *Cv.Sc 155* با افزایش سطح NaCl کاهش یافت(*Azooz et al., 2009*). همچنین بررسی فعالیت POD در گیاه ذرت تحت استرس NaCl نشان داد که فعالیت POD در واریته های مقاوم به شوری افزایش یافته ولی در نوع حساس کاهش می

یابد (*Azooz et al., 2009*). می توان گفت آنزیم POD نقش کلیدی را در حذف $H_2O_2$ دارد که پیشنهاد می شود CAT و GPX مهم ترین آنزیم های حذف کننده $H_2O_2$ هستند. این آنزیم ها همچنین در مقاومت به شوری در توت سفید و کتان (*Prisco et al., 2006*) و جو (*Liang et al., 2003*) مهم هستند.

*Elstner (1982)* و *Bowler (1992)* فعالیت آنزیم POD را در گیاه ذرت بررسی کردند و نشان دادند که در واریته ی حساس به شوری فعالیت POD مهار شد که ممکن است در نتیجه ی تجمع $H_2O_2$ باشد که با $O_2$ برای تولید رادیکال های آزاد هیدروکسیل واکنش می دهد. کاهش در فعالیت POD تحت استرس شوری می تواند به دلیل عدم مقاومت به شوری باشد که توسط *Meratan (2007)* در بررسی سه گونه آکانتوفیلوم تحت استرس شوری به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت POD در گیاه ذرت که توسط *Azevedo (2006)* انجام گرفت نشان داد که CAT و GPX فعالیت پاک کنندگی بالاتری نسبت به APX در برگ ها و ریشه های گیاه ذرت استرس شوری دیده داشتند. به نظر می رسد که POD در مراحل گوناگون شامل چوبی شدن، اکسیداسیون فنولی، تنظیم طویل شدن سلولی نقش مهمی ایفا نماید (*Azooz et al., 2009*). در گیاهان یک تعداد از آنزیم ها سطوح داخل سلولی $H_2O_2$ را تنظیم می کنند اما به نظر می رسد که GPX، APX، CAT مهم ترین باشند. آسکوربات مهم ترین سوبسترای کاهش دهنده برای سم زدائی $H_2O_2$ است (*Noctor et al., 1998*). آسکوربات پراکسیداز یک خانواده چند ژنی با ایزوفرم های گوناگون است (*Asada, 1994*). بیان بیش از حد ایزو آنزیم های APX با مقاومت به شوری در ارتباط است (*Meratan A.A. et al., 2008*). دخالت APX در مکانیسم های مقاومت به شوری همچنین در سطح پروتئین قابل تحمل می باشد (*Azevedo et al., 2009*). گیاهان با ذخیره آسکوربات زیاد بوسیله چرخه آسکوربات یا ذخیره آسکوربات خارجی، قادرند تا فعالیت APX را حتی در شرایط استرس اکسیداتیو حفظ کنند (*Azooz et al., 2009*). نتایج به دست آمده از فعالیت *Prisco (2006)* نشان داد که فعالیت APX در هر دو برگ ها و ریشه های ذرت ژنوتیپ *BR5033* یا افزایش یافت و یا تحت تأثیر قرار نگرفت. فعالیت های GR و APX بوسیله استرس NaCl در برگ های برنج افزایش یافت. همچنین فعالیت APX در گیاهان مقاوم به تنش های اکسیداتیو مانند دو واریته ی مقاوم ذرت (*Sc129, Sc13*) تحت تأثیر قرار نمی گیرد و تحت تنش افزایش نمی یابد (*Azooz et al., 2009*).

قهوه ای شدن میوه جات و سبزیجات که به صورت یک کبودی تدریجی ظاهر می شود در نتیجه ی اکسیداسیون ترکیبات فنولی است (*Mathew et al., 1971*). تخریب بخش سلولی میوه به سوبسترا های فنولی اجازه می دهد که برای آنزیم پلی فنل اکسیداز قابل دسترس باشند زیرا این آنزیم ها اکسیداسیون فنول ها را کاتالیز می کنند. قهوه ای شدن رنگ پوست گیاهان