بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه کلزا

خدیجه کیارستمی[۱]، سعیده السادات صدری[۲]، نسرین عبدالملکی[۲]، عذرا صبورا[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۹
تاریخ تصویب: ۹۳/۳/۵

چکیده

سالیسیلیک اسید یک ترکیب طبیعی است که نقش مهمی در تحمل گیاه به تنش های زیان آور زیستی و غیر زیستی دارد. با هدف بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر روی القای سیستم دفاع آنتی اکسیدان آنزیمی در گیاه کلزا، ارقام Y3000 و H420 (به ترتیب به عنوان ارقام حساس و نسبتا مقاوم به شوری) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در روستای حاجی آباد قم کاشته شدند. در مرحله چهاربرگی (دو ماه پس از کشت) پس از توسعه کامل برگ، سالیسیلیک اسید با غلظت‌های ۰، ۰/۵ و۱ میکرومولار دراوایل صبح یک بار بر روی برگ‌ها اسپری شد. آنالیز گیاهان در مرحله رویشی (۱۳۰روزگی)، انجام شد.

[۱] دانشیار، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهراء(س)؛ su_kiarostami@yahoo.com
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهراء(س)
[۳] دانشیار، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهراء(س)

تیمار با سالیسیلیک‌اسید فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را در رقم Y3000 افزایش و در رقم H420 کاهش داد. بررسی فعالیت آنزیم ها بر روی ژل های پلی آکریل آمیدی نیز نشان داد که سالیسیلیک اسید در رقم Y3000 به ویژه با غلظت ۱ میکرو مولار باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد. ایزوزیم‌های پلی فنل اکسیداز تحت تاثیر سالیسیلیک اسید قرار نگرفتند. در رابطه با سوپراکسید دیسموتاز ایزوزیم Cu/Zn-SOD فراوانترین ایزوزیم بود و در اغلب گیاهان تیمار شده ایزوزیم‌های بیشتری از آن مشاهده شد. ایزوزیم Fe-SOD در رقم Y3000 و ایزوزیم Mn-SOD در رقم H420 حضور داشت. این ایزوزیم ها فعالیت کمتری داشتند. بنابراین اکسیژن فعال در ارقام حساس و نسبتا مقاوم به شوری از مسیرهای علامت دهی متفاوتی در کده های سلولی مختلف وارد عمل می‌شود و سالیسیلیک اسید با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در رقم حساس به شوری مقاومت به تنش را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: سالیسیلیک اسید، کلزا، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش شوری.

مقدمه

تنش شوری یکی از مهمترین عوامل محدود کننده رشد و تولیدات گیاهان است (Sairan and Tyagi, 2004). در تنش شوری گونه های واکنشگرفعال اکسیژن (ROS) یعنی سوپر اکسید ($O_2^{\cdot-}$)، اکسیژن یکتایی ($O^{\cdot}$)، هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولید می شوند، که برای پروتئین‌ها ، لیپیدها، کربوئیدرات ها و نوکلئیک اسیدها مضر هستند (Smirnoff, 1993). گونه های فعال اکسیژن با اسیدهای چرب غیر اشباع واکنش داده و سبب پراکسیداسیون لیپیدهای اصلی غشای پلاسمایی یا اندامک ها شده (Karabanl et al, 2003)، و با نشت محتویات سلول موجب خشکی و مرگ سلول می شوند (Scandalious, 1993). گونه‌های واکنشگرفعال اکسیژن از طریق ایجاد آسیب مستقیم به رنگیزه‌های فتوسنتزی، اجزای زنجیره ترابری الکترون و آنزیمهای مسیر

تثبیت دی‌اکسید کربن از فتوسنتز جلوگیری نموده و باعث کاهش رشد گیاه می شوند (Kraus and Fletcher, 1994). گیاهان برای حذف یا کاهش گونه های واکنشگرفعال اکسیژن از سیستم های آنزیمی و غیر آنزیمی دفاع آنتی اکسیدان استفاده می کنند. برحسب گونه گیاهی، آنزیم های متفاوتی از سیستم آنتی اکسیدان در پاسخ گیاه به تنش کلرید سدیم شرکت می‌کنند، که مهمترین آن ها عبارتند از: پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز (Smith, 1984). در سیستم آنزیمی دفاع آنتی اکسیدان، سوپراکسید دیسموتاز رادیکال سوپراکسید را به H_2O_2 تبدیل می‌کند (Scandalious, 1993). پراکسید هیدروژن توسط کاتالاز و پراکسیداز حذف و به اکسیژن ملکولی تبدیل می شود (Scandalious, 1993,; Kono and Fridovich, 1983) درتنش های شدید ROS به میزان زیاد تولید شده و با صدمه به ملکول های زیستی موجب مرگ سلول می‌شود (Sakihama, et al, 2002).

کلزا یکی از دانه های روغنی است که در مناطق مختلف ایران کشت می شود. قسمتی از سطح زیر کشت این گیاه در استان قم قرار دارد. به علت شوری طبیعی خاک در این منطقه ، کشت این گیاه با محدودیت هائی همراه است. از جمله این محدودیت ها می‌توان کاهش رشد و عملکرد گیاه و محدودیت در انتخاب ارقام را نام برد.

یکی از راهکارهای عملی برای مقابله با اثرات تنش استفاده از برخی از ترکیبات از جمله تنظیم کننده های رشد است. این ترکیبات با تعدیل اثرات تنش به بهبود رشد و تولید گیاهان زراعی کمک می کنند و این اثر را از طریق افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و کاهش اکسیژن واکنشگرفعال اعمال می کنند (Arfan et al , 2007,; Kraus and Fletcher, 1994 ,; Yeshitella et al, 2004 ,; Hajihashemi et al 2007).

سالسیلیک‌اسید یک تنظیم کننده رشد گیاهی با ماهیت فنلی است که در فرایندهای فیزیولوژیکی متعددی از قبیل مقاومت در برابر پاتوژن ها، ایجاد گرما در گل آذین شیپوری، القای گل دهی در برخی از گیاهان، کنترل جذب یون توسط ریشه و هدایت روزنه ای شرکت می کند (Raskin ,1992). کاربرد سالیسیلیک اسید موجب افزایش مقاومت به خشکی در گوجه فرنگی (Berukova et al, 2001)، مقاومت به سرما در ذرت (Janda et al, 1999) و مقاومت به دمای پائین در لوبیا (Senaratna et al, 2000) شده است. سالیسیلیک اسید با مکانیسم های مختلف با اثرات تنش مقابله می کند. سالیسیلیک اسید با تغییر در جذب مواد غذائی (Glass, 1975)، اعمال غشاء (Glass and Dunlop, 1974) ،

روابط آب (Barkosky and Einhelling, 1993) اعمال روزنه ای (Lee, 1998)، جلوگیری از بیوسنتز اتیلن (Srivastava and Dwivedi , 2000) و افزایش رشد (Rajasekaran et al, 2002) باعث افزایش مقاومت به تنش شوری می‌شود.

در زمینه تاثیر تنش شوری بر جوانه زنی، پارامترهای رشدی، فیزیولوژیک و بیوشیمیائی گیاه کلزا گزارش هائی وجود دارد (شمس الدین سعید و همکاران ۱۳۸۶،; Bandeh- hagh et al 2008) اما در زمینه استفاده از تنظیم کننده های رشد جهت تخفیف اثرات تنش و تغییرات بیوشیمیایی انجام شده کارهای زیادی انجام نشده است. از آن جایی که شناخت مکانیسم تحمل گیاه در برابر تنش به ارائه راهکارهای مناسب برای ایجاد گیاهان متحمل به تنش و کشت آن ها در زمین های نامناسب کمک می کند، در این پژوهش با هدف افزایش رشد و مقاومت کلزا به شوری خاک ، اثر سالیسیلیک اسید بر تغییرات آنزیمی گیاه کلزا را بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

- مشخصات محل اجرای آزمایش

این آزمایش در روستای حاجی‌آباد قم با طول شرقی جغرافیایی "٦ ، '١ ، °٥١ و عرض شمالی"٣٨ ، '٣٦ ، °٣٤ و با ۹۲۰ کیلومتر ارتفاع از سطح دریا و با ۱٤۰ میلی لیتر میزان بارندگی متوسط سالیانه انجام شد. نمونه برداری از خاک جهت تعیین هدایت الکتریکی از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی متری، در دو مرحله ی قبل از کاشت و هنگام برداشت محصول انجام شد. هدایت الکتریکی این زمین ها قبل از کاشت ۷/۵۱ ds/m و هنگام برداشت محصول ۱۱/۹ds/m بود.

- عملیات زراعی

در آبان ماه بذرهای دو رقم Y3000 و Hyola 420 کلزا در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار کاشته شدند. آبیاری ۲ نوبت قبل از دوره سرما و چهار نوبت بعد از دوره سرما انجام شد.

درمرحله چهاربرگی پس از توسعه کامل برگ، سالیسیلیک اسید با غلظت های ۰، ۰/۵ و۱ میکرو مولار یک بار بر روی برگ ها اسپری شد. نمونه ها در مرحله رویشی (۱۳۰ روزگی) برداشت شده و برای بررسی‌های آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی فعالیت آنزیم ها

یک گرم بافت تر برگ با ۳ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۲ مولار با pH=7 در دمای ٤ درجه سانتیگراد هموژن شد و با استفاده از دستگاه میکروسانتریفیوژ یخچال‌دار مدل Beckman(LE_{80K}) در دمای ٤ درجه

سانتی‌گراد با سرعت rpm ۱٤۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. از روشناور حاصل برای سنجش فعالیت آنزیمی و سنجش پروتئین به روش برادفورد استفاده شد(Bradford 1976).

- پراکسیداز (POD – EC 1.11.1.7)

۰/۹۵ میلی لیتر تامپون سیترات۰/۱ مولار با pH=4.6، ۱ میلی لیتر، گایاکول ۱۵ میلی مولار، ۰/۹۵ میلی لیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شدند و ۵۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه به آن‌ها اضافه شد و جذب آن به مدت ۳ دقیقه یا بیشتر در ٤۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل CECIL1000 بررسی گردید. فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (Liu et al, 1999).

-پلی فنل اکسیداز (PPO – EC- 1.10.3.1)

۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=6.8، ۰/۲ میلی لیتر پیروگالول ۰/۰۲ مولار و ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی برگ به ترتیب به یک لوله آزمایش در دمای ٤۰ درجه سانتیگراد اضافه شده و بلافاصله تغییرات جذب در طول موج ٤۳۰ نانومتر در مدت سه دقیقه خوانده شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Raymond et al, 1993).

- سوپراکسید دیسموتاز (SOD – EC 1.15.1.1)

۱۰۰میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۲ مولار با pH=7 همراه با ۰/۰۰۲۱ گرم نیترو بلو تترازولیوم (NBT) و ۰/۰۰۲۸ گرم ریبوفلاوین و ۰/۱۹٤ گرم متیونین در یک شیشه تیره رنگ با یکدیگر مخلوط شدند. در دو کووت شاهد ۱/۵ میلی لیتر از مخلوط فوق با ۵۰ میکرولیتر آب مقطر و یا بافر سدیم فسفات (pH=6.8) به جای نمونه قرار گرفت و با آن دستگاه اسپکتروفتومتر صفر شد. سپس کووت جلویی به عنوان نمونه شاهد در معرض روشنایی سه لامپ مهتابی ۱۰۰ واتی در فاصله ۳۰ سانتی‌متری قرار داده شد. جذب نمونه شاهد در طول موج ٥٦۰ نانومتر در فواصل ۱ دقیقه‌ای خوانده شد تا به فاز خطی رسید. این زمان در حدود ۱۵ دقیقه بود. ۱/۵ میلی‌لیتر بافر مخلوط و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ازهر نمونه به مدت ۱۵ دقیقه (زمان به دست آمده برای شاهد) در زیر نور فلورسنت قرار گرفتند و سپس جذب آن ها خوانده شد. اساس کار تبدیل NBT به فورمان در حضور نور و ظهور رنگ است که در حضور آنزیم سوپراکسید دیسموتاز واکنش مذکور جلوگیری شده و ظهور رنگ کاهش می‌یابد.

تفاوت بین جذب محلول شاهد و محلول واجد عصاره نشان دهنده بازدارندگی واکنش توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است. یک واحد آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که احیای نوری NBT را به میزان ۵۰٪ بازدارندگی کند (Giannopolitis and Rie, 1977).

آشکارسازی فعالیت‌های آنزیمی بر روی ژلهای پلی‌آکریل‌آمیدی

ژل های پلی آکریل آمیدی ۱۰ درصد تهیه و برای بررسی فعالیت آنزیمی به کار رفتند (Hames and Rickwood,1981).

ـ پراکسیداز

برای ظهور پراکسیداز ژل ها در مخلوط واکنش شامل : بافر سدیم استات ۰/۲ مولار (pH=5) ۸۰ میلی‌لیتر، پراکسیدهیدروژن ۳ درصد ۸میلی‌لیتر و بنزیدین ۰/۰٤ مولار در متانول ۵۰٪ ٤ میلی‌لیتر، حداقل به مدت ۲ تا ۳ ساعت در تاریکی و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از آشکار شدن نوارهای قرمز مایل به قهوه‌ای با آب مقطرسه بار شستشو داده شده و در آب مقطر نگهداری شدند (Van Loon, 1971).

ـ پلی فنل اکسیداز

مخلوط واکنش برای ظهور پلی فنل اکسیداز شامل : بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH= ٦/٨ ۵۰میلی لیتر ، ۳و٤- دی هیدروکسی فنیل آلانین (L-DOPA) ۰/۱ گرم در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر وکلسیم کلراید ۷۳/۵ ٪ ، ۰/۷ میلی‌لیتر بود. ژل ها تا زمان آشکار شدن نوارهای آنزیمی خاکستری رنگ در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شدند، سپس شسته و در آب مقطر نگهداری گردیدند (Van Loon, 1971).

ـ سوپر اکسید دیسموتاز

برای ظهور نوارهای آنزیمی با فعالیت SOD ژل ها در محلولی شامل ترکیبات زیر قرار گرفتند:

بافر Tris –HCl (pH=8) ۱۰۰ میلی‌لیتر، Na–EDTA ۰/۰۰٤ گرم ، ریبوفلاوین۰/۰۰٤ گرم

نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۰/۰۲ گرم . ژل‌ها ابتدا برای مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و بر روی شیکر قرار گرفتند و سپس روی صفحه Light box و زیر نور فلورسنت قرار داده شدند تا زمانی که باندهای بی رنگ حاصل از فعالیت آنزیم ظاهر شد، سپس شسته و در آب مقطر نگهداری شدند (Constantine and Stanley, 1997).

جهت شناسایی ایزوفرمهای SOD یعنی Mn-SOD ، Fe-SOD و Cu/Zn-SOD از بازدارنده‌های اختصاصی استفاده گردید. برای این منظور قبل از اینکه ژل ها در گهرمایه اختصاصی آنزیم قرار داده شود، به مدت ۳۰ دقیقه در محلول (H_2O_2 ۵mM) یا

در محلول KCN(۳ Mm) قرار داده شدند و بعد از شستشو با آب مقطر در مخلوط واکنش اختصاصی SOD قرار گرفتند. از میان ایزوفرم ها، Cu/Zn-SOD حساس به سیانید، ایزوفرم های Fe-SOD و Cu/Zn-SOD حساس به H_2O_2 ظ و ایزوفرم Mn-SOD مقاوم به هردو بازدارنده بودند (Martinez et al, 2001).

آنالیز آماری

کلیه آزمایشات در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی انجام شد. پردازش داده‌ها با استفاده از نرم افزار رایانه‌ای SPSS (version 18) صورت گرفت. همه آزمایش ها حداقل سه بار تکرار شدند. جهت تعیین معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها تجزیه واریانس دوطرفه با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت. نمودارها توسط نرم‌افزار Excel 2007 رسم شدند.

نتایج

اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم ها

- پراکسیداز

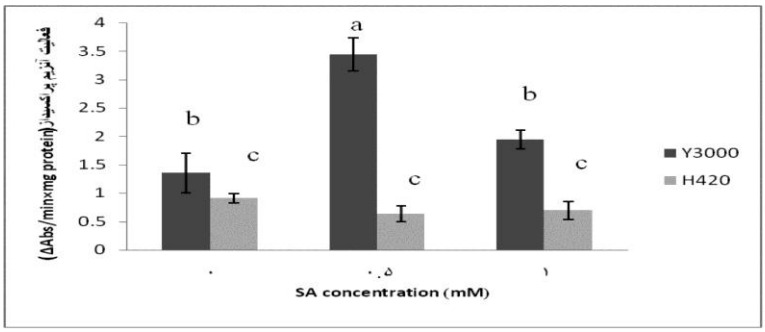
فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ درگیاهان شاهد رقم حساس Y3000 بیشتر از رقم نسبتا مقاوم H420 بود. در رقم H420 در اثر تیمار با سالیسلیک‌اسید فعالیت آنزیم کاهش یافت ،ولی در رقم Y3000 سالیسیلیک اسید به خصوص با غلظت ۰/۵ میکرومولار فعالیت آنزیم را افزایش داد. در مجموع تیمار با سالیسیلیک‌اسید بر رقم حساس Y3000 نسبت به رقم مقاوم H420 اثر بیشتری داشت (شکل ۱ الف).

- پلی‌فنل‌اکسیداز

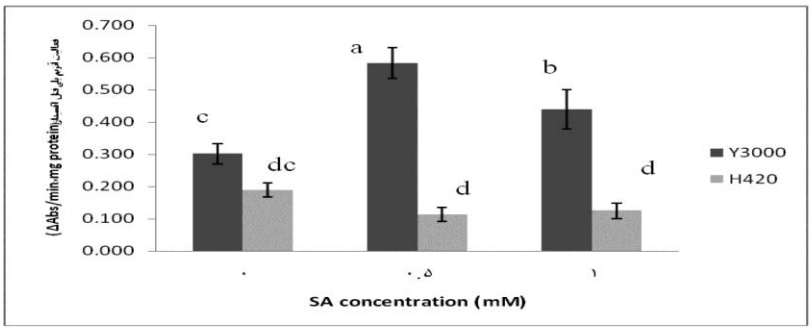
فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز در رقم Y3000 بیشتر از رقم H420 بود. تیمار با سالیسیلیک اسید بر رقم حساس Y3000 نسبت به رقم نسبتا مقاوم H420 اثر بیشتری داشت و فعالیت آنزیم را به طرز معنی‌داری افزایش داد که این افزایش به ویژه در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار معنی‌دار بود ، درحالیکه تیمار با سالیسیلیک اسید بر رقم نسبتا مقاوم H420 اثر کمی داشت و منجر به کاهش جزئی در فعالیت آنزیم شد (شکل ۲ ب).

- سوپراکسیددیسموتاز

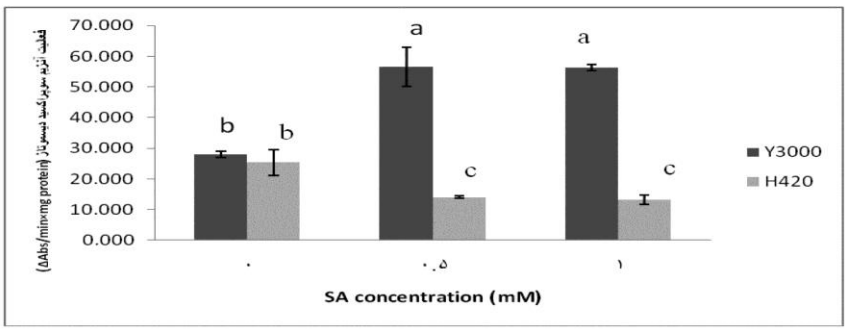
فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان شاهد رقم Y3000 و H420 تفاوت زیادی نداشت . در رقم H420 تیمار با سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم را کاهش داد، در حالی که در رقم Y3000 سالیسیلیک اسید موجب افزایش در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شد (شکل ۲پ).



الف



ب



شکل ۱- فعالیت آنزیم های پراکسیداز پلی فنل اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز برگ در ارقام Y3000 و H420 تحت تأثیر غلظت های مختلف سالیسیلیک‌اسید.

نتایج حاصل از فعالیت آنزیم ها بر روی ژل های پلی آکریل آمیدی

- پراکسیداز

مقایسه نیمرخ الکتروفورزی آنزیم پراکسیداز دو رقم Y3000 و H420 دو نوار آنزیمی با Rm های ۲۱ و ٤٠ نشان داد که با شماره‌های ۱ و ۲ شماره‌گذاری شدند. شدت نوارها نیز در دو رقم متفاوت بود. در رقم Y3000 نمونه های تیمار شده و در رقم H420 نمونه های شاهد نوارهای پررنگ‌تری داشتند. تیمار با سالیسیلیک اسید در رقم Y3000 به ویژه با غلظت ۱ میکرومولار باعث افزایش فعالیت آنزیم شد. در رقم H420 غلظت ۰/۵میکرومولار موثرتر بود و با غلظت ۱ میکرومولار یکی از باندها ناپدید شد (شکل۲ الف).

- پلی‌فنل اکسیداز

مقایسه نیمرخ الکتروفورزی آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز دو رقم Y3000 و H420 دو نوار آنزیمی با Rm های ۸ و ۳۷ را نشان داد که با شماره‌های ۱ و ۲ شماره‌گذاری شدند. هر دو نوار آنزیمی در همه نمونه‌ها دیده شدند. ولی نوار آنزیمی شماره ۲ در نمونه‌های Y3000 نسبت به رقم H420 پررنگ تر بود (شکل ۲ب).

- سوپراکسید دیسموتاز

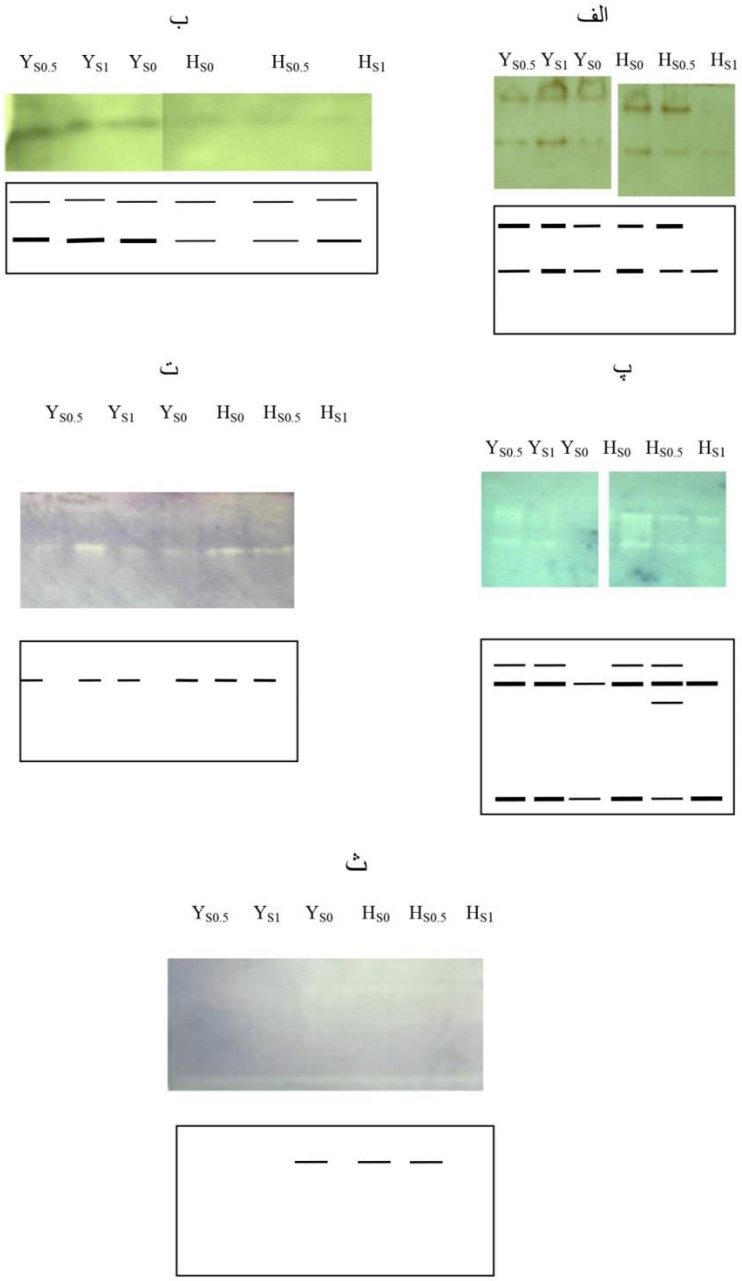
مقایسه نیمرخ الکتروفورزی آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ٤ نوار آنزیمی با Rmهای ۳۲، ۳٤، ۳٦ و ٤٥ را نشان داد که با شماره‌های ۱ تا ٤ شماره‌گذاری شدند. نوارهای آنزیمی ۲ و ٤ در همه نمونه‌ها دیده شدند، ولی شدت آن ها متفاوت بود (شکل ۲پ).

پیش‌تیمار ژل با KCN ایزوفرم های مقاوم به KCN را آشکار کرد. این پیش تیمار باعث حذف ایزوفرم های Cu/Zn-SOD و آشکار شدن ایزوفرم های مقاوم Fe-SOD و Mn-SOD می شود. در این پیش‌تیمار تنها نوارهای آنزیمی شماره ۲ با Rm=34 باقی ماندند و بقیه ایزوفرم ها حذف شدند لذا این ایزوفرم ها شامل انواع مقاوم Fe-SOD و Mn-SOD بودند (شکل ۲ت). پیش‌تیمار ژل با H_2O_2 باعث ظهور ایزوفرم های مقاوم به H_2O_2 یعنی Mn-SOD و حذف ایزوفرم‌های Fe-SOD و Cu/Zn-SOD گردید. در ژل های تیمار شده با H_2O_2 تنها رقم H420 نوارهای آنزیمی را با Rm=34 نشان دادند که نشان دهنده این است که این نمونه‌ها دارای ایزوفرم های مقاوم Mn-SOD بوده‌اند، ولی فاقد ایزوفرم های Fe-SOD بوده‌اند (شکل ۲ث).

با توجه به مقایسه الگوی الکتروفورزی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با پیش‌تیمار KCN و H_2O_2 با الگوی الکتروفورزی آنزیم بدون پیش‌تیمار، نتیجه گرفته می‌شود که باندهای آنزیمی باقی‌مانده متعلق به نوارهای آنزیمی شماره ۱ با Rm=32، نوار آنزیمی شماره ۳ با Rm=36 و نوار آنزیمی شماره ٤ با Rm=45 مربوط به ایزوفرم های Cu/Zn-SOD می‌باشند که بیشترین تعداد نوارهای آنزیمی را در کل تیمارها داشتند.

با بررسی الگوی الکتروفورزی هر سه ژل مربوط به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بدون بازدارندگی و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بازدارندگی شده توسط KCN و H_2O_2 نتیجه گرفته می شود که دو جایگاه ژنی بر روی ژل ها قابل تشخیص است. یک ایزوزیم با حرکت الکتروفورزی سریع که باندهایی را در پایین ژل نشان می‌دهد که از نظر ژنتیکی هموزیگوت بوده و این جایگاه تنها با یک نوار مشخص می‌شود. دومین جایگاه متعلق به

ایزوزیمی است که از نظر ژنتیکی توسط یک ژن هتروزیگوت رمزگذاری می شود و بر حسب هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن بین یک تا سه نوار آنزیمی را بر روی ژل آشکار می‌نماید. ایزوزیم Cu/Zn-SOD فراوانترین ایزوزیم در هر دو رقم است . این ایزوزیم در گیاهان تیمار شده نوارهای بیشتری داشته و باندها پر رنگ تر بودند.



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی آنزیم پراکسیداز (الف)، پلی فنل اکسیداز(ب) و سوپراکسید دیسموتاز(پ) آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با پیش تیمار KCN (ت) آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با پیش‌تیمار H_2O_2 (ث) برگ تحت تأثیر سالیسیلیک‌اسید . ارقام Y3000 و H420 با حروف Y و H و غلظت ها در کنار ارقام مشخص شده اند.

بحث

یکی از پیامدهای عمومی ناشی از تنش های زیستی و غیر زیستی تولید انواع گونه‌های واکنشگرفعال اکسیژن و تنش اکسیداتیو است (Mass et al, 1994) بروز تنش اکسیداتیو بر اجزای مختلف سلول اثر می گذارد. آنزیم‌ها مهمترین و حساس ترین ترکیباتی هستند که با تغییرات کمی و کیفی خود بروز تنش های مختلف را منعکس می‌کنند. افزایش غلظت یونی و کاهش پتانسیل اسمزی ناشی از تنش ، ساختار و عملکرد پروتئین های آنزیمی را تحت تأثیر قرار داده و فعالیت آن‌ها را تغییر می‌دهد (Kuznetsov and Shevyakova, 1997). رادیکال های آزاد اکسیژن با تحریک پراکسیداسیون لیپیدها در بافت های کشت شده بسیاری از آنزیم ها را از فعالیت باز می‌دارند (Smith, 1984). درباره اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم بین پژوهشگران توافق نظر وجود ندارد. عده ای معتقدند که فعالیت چند آنزیم کلیدی در گیاهان تحت تنش کاهش می یابد، اما بسیاری از محققین گزارش داده‌اند که تفاوتی بین آن ها مشاهده نمی‌شود (Wimberg, 1975). در برخی موارد افزایش فعالیت آنزیم در غلظت های پایین نمک و کاهش آن در غلظت های بالای نمک روی می‌دهد (Gosset, 1996). در تنش شوری میزان پروتئین ها و آنزیم ها تغییر کرده و سنتز عده‌ای از پروتئین ها (پروتئین های شوک گرمایی) و آنزیم ها افزایش و فعالیت و سنتز عده‌ای از آن ها کاهش می‌یابد (Hames and Rickwood, 1990). در اغلب موارد تحت تنش های زیستی و غیر زیستی میزان آنزیم های آنتی اکسیدان از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیدازو کاتالاز افزایش می‌یابد (Malgorzate and Zlatco, 2002). تغییر در فعالیت آنزیم به سطح تنش اعمال شده، گونه گیاهی و نوع آنزیم بستگی دارد. به عنوان مثال بررسی تغییر فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدان در هشت رقم کلزا در پاسخ به تنش خشکی نشان داد که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در پاسخ به تنش خشکی افزایش و فعالیت کاتالاز کاهش یافت (Abedi and Pakniat, 2010). در گیاهچه‌های کلزای تیمار شده با NaCl فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز در ۲٤ ساعت اول پس از اعمال تنش شوری افزایش یافت (Qi-lin et al, 2009) . در گیاهچه های خیار تحت تنش سرما فعالیت سوپراکسید دیسموتاز افزایش و فعالیت کاتالاز کاهش یافت و فعالیت پراکسیداز ابتدا افزایش و بعد کاهش یافت (Liu et al, 2009). افزایش در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در پاسخ به تنش خشکی در آفتابگردان

(Gunes et al, 2008)، شیرین‌بیان (Pan et al, 2006)، گندم (Bakalova et al, 2004,; Csiszar et al, 2005) و نخود (Malecka et al, 2001) نیز گزارش شده است. در ارقام حساس و مقاوم به نمک کلزا فعالیت سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت و این افزایش در رقم مقاوم به نمک بیشتر بود (Alizadeh et al, 2011). افزایش فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدان در پاسخ به تنش های محیطی مختلف پیشنهاد می‌کند که ژن های مربوط به اجزای سیستم جاروب کننده گونه‌های واکنشگر فعال اکسیژن به طور همزمان با یکدیگر تنظیم می شوند (Qi-lin et al., 2009).

بر اساس نتایج این پژوهش تیمار با سالیسیلیک‌اسید فعالیت آنزیم های پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را در رقم حساس Y3000 افزایش و در رقم نسبتا مقاوم H420 کاهش داد. از آن جایی که گیاهان کلزای تیمار شده با سالیسیلیک اسید در خاک هایی با شوری طبیعی رشد کردند، افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در رقم حساس Y3000 به کاهش اثرات تنش کمک می کند. در رقم نسبتا مقاوم H420 میزان فعالیت آنزیم درنمونه های تیمار نشده و تیمار شده در مقایسه با رقم Y3000 کمتربود. احتمالا به دلیل مقاومت نسبی این رقم به تنش شوری رادیکال های آزاد زیادی تولید نشدند و تنش اثر زیادی بر فعالیت سیستم آنتی اکسیدان نداشت. گزارش هایی از کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در تنش نمک یا تحت تاثیر سالیسیلیک اسید وجود دارد . افزایش غلظت نمک تا ۱۵۰ میلی مولار فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را در گیاه کلزا کاهش داد و این کاهش در رقم حساس بیشتر بوده است (Jalali et al, 2011). کاربرد سالیسیلیک اسید در گیاه رز با کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز همراه بود(Gerailoo and Gasemnezad, 2011). که با یافته های ما در رابطه با کاهش فعالیت این آنزیم در رقم نسبتا مقاوم H420 مطابقت دارد. در رابطه با علت کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در رقم مقاوم با قرار گرفتن گیاهان Echinochola cruis- galli در تنش نمک میزان سالیسیلیک اسید افزایش یافت . وقتی دانه رست ها پس از اسپری برگی با سالیسیلیک اسید با نمک تیمار شدند، سالیسیلیک اسید رشد جلوگیری شده با نمک را افزایش داد. تیمار با نمک فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش داد، در حالی که پیش تیمار با سالیسیلیک اسید از القای فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز جلوگیری کرد. افزایش خزانه سالیسیلیک اسید با کاهش فعالیت کاتالاز و افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز تولید

پراکسید هیدروژن را افزایش داده و صدمه اکسیداتیو ایجاد شده با نمک را افزایش می‌دهد (Sawade et al, 2008).

القای فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به گیاهان توانایی چیره شدن به تنش های اکسیداتیو را می دهد و سایر آنزیم های آنتی اکسیدان به طور ثانوی در فرودست این آنزیم فعال می شوند (Alscher et al, 2002). در نتیجه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز پراکسید هیدروژن تولید می شود که باید خیلی سریع از محیط عمل خارج شود. سالیسیلیک اسید میزان پراکسید هیدروژن را افزایش می دهد (Sawada et al, 2008). در این شرایط افزایش در فعالیت پراکسیداز موجب حذف پراکسید هیدروژن می شود. در کلروپلاست منبع اولیه گونه های واکنشگرفعال اکسیژن واکنش مهلر و رنگیزه های موج گیر هستند . تولید گونه های واکنشگرفعال اکسیژن توسط این منابع با شرایطی که تثبیت CO_2 را محدود می کنند افزایش می یابد. در گیاهان سه کربنی محدودیت دسترسی به دی اکسید کربن مسیر تنفس نوری را فعال می کند که در این مسیر H_2O_2 در پراکسی زوم ها تولید می شود (Sarikan, et al 2005) . به دلیل حساسیت بیشتر رقم Y3000 به تنش شوری و افزایش میزان رادیکال های آزاد و پراکسید هیدروژن در این رقم حتی در نمونه‌های شاهد فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدان از رقم H420 بیشتربود.

آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز بیشتر در کلروپلاست ها حضور دارد و در این اندامک بیشتر فعالیت می‌کند (Schandalois, 1993). پلی فنل اکسیداز با شرکت در واکنش مهلر میزان اکسیژن پلاستیدی را تنظیم می کند (Vaughn et al ,1988). گزارش هایی از افزایش یا کاهش فعالیت این آنزیم در شرایط تنشی وجود دارد (Kilian et al., 1972,; ;، Zivkovic et al., 2010,; Vela et al., 2003 نیاکان و همکاران ۱۳۸۸; ، جعفری و همکاران ۱۳۸٦). این تغییر به نوع گونه گیاهی، نوع و شدت تنش اعمال شده بستگی دارد (دولت آبادیان و همکاران ۱۳۸۷). تنش های محیطی با تغییر در محتوای ترکیبات فنلی بر فعالیت این آنزیم اثر می گذارند و در نهایت تحمل به تنش را افزایش می دهند (Yoruk and Marshal ,2003). تنظیم کننده‌های رشد نیزبا افزایش فعالیت این آنزیم به تحمل تنش کمک می کنند (جعفری و همکاران ۱۳۸٦).

افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در رقم حساس به شوری Y3000 تحت تاثیر سالیسیلیک اسید با یافته های سایر پژوهشگران مطابقت دارد. من جمله اسپری برگی سالیسیلیک اسید بر روی گیاهچه های خیار قبل از اعمال تنش سرما

و شدت نور با افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز باعث افزایش مقاومت به تنش شد (Liu et al, 2009). تیمار با سالسیلیک اسید تحمل به سرما را در گندم و ذرت بالا برد (Nemeth et al 2002). پیش تیمار سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و تحمل به تنش سرما را در گیاه ذرت افزایش داد (Janda et al ,1999). در دانه رست‌های برنج که تحت تنش شوری قرار داشتند، نیز انباشتگی سالسیلیک‌اسید درون زا مشاهده شد (Sawada et al, 2008). در سلول های سازش یافته گوجه فرنگی به نمک میزان سالیسیلیک اسید از سلول های سازش نیافته کمتر بود (Molina et al, 2002). تغییر در توزیع درون سلولی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در رابطه با حساسیت ایزوزیم های مختلف ممکن است استراتژی محافظتی کاراتری نسبت به افزایش فعالیت آنزیم باشد (Foyer et al, 1994). آنالیز ایزوزیم های مختلف سوپراکسید دیسموتاز بسیار مهم است، زیرا به درک اثر تنش بر اجزای درون سلولی مختلف کمک می کند. ایزوزیم های Cu/ZnSOD فراوانترین سوپراکسید دیسموتازها در گیاهان عالی هستند که در سیتوسل و کلروپلاست ها جای گرفته‌اند. Mn-SOD در میتوکندری و گلی‌اکسیزوم و Fe-SOD در کلروپلاست ها و پراکسی زوم ها جای گرفته است (Bowler et al , 1992). تعداد ایزوزیم های هر نوع از SOD از گیاهی به گیاه دیگر تغییر می‌کند (Gratao et al , 2005). به گزارش سایر محققین، تنش های مختلف نیز فعالیت ایزوزیم های سوپراکسید دیسموتاز را یکسان تحت تاثیر قرار ندادند. عابدی و پاک-نیت ۸ ایزوزیم را برای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کلزا تحت تنش خشکی گزارش کردند که سه ایزوزیم تای ازآن ها از نوع Mn-SOD بودند و ٥ ایزوزیم تا از آن ها به Cu/Zn-SOD تعلق داشتند. ایزوزیم های متعلق به Fe-SOD در ژل الکتروفورز آن‌ها مشاهده نشد (Abedi and Pakniat ,2010). همچنین در سلول های سازش یافته به نمک گوجه فرنگی فعالیت Mn-SOD کمتر بود (Molina et al, 2002).

بر اساس یافته های ما نیز ایزوزیم های Cu/Zn SODپراکندگی بیشتری داشتند. از آن جایی که کلروپلاست منبع اصلی تولید گونه های واکنشگرفعال اکسیژن است، افزایش در فعالیت ایزوزیم های Cu/Zn-SOD طبیعی به نظر می رسد (Abogadallah et al, 2010). از طرفی سالیسیلیک اسید موجب القای بیشتر این ایزوزیم شده است. به گزارش Rao و همکاران نیز سالیسیلیک اسید با القای پراکسیدهیدروژن فعالیت Cu/Zn-SOD رادر گیاه آرابیدوپسیس افزایش داد

(Rao et al , 1997). ایزوزیم Fe-SOD در رقم Y3000 و ایزوزیم Mn-SOD در رقم H420 حضور داشت. این ایزوزیم ها فعالیت کمتری داشتند و سالیسیلیک اسید اثر زیادی در القای فعالیت آن ها نداشت. به گزارش Molina با افزودن ۲۰۰µM سالیسیلیک اسید Mn-SOD در سلول های سازش یافته به نمک گوجه فرنگی القا شد (Molina et al, 2002). تفاوت در پراکندگی این ایزوزیم ها نشان می دهد که اکسیژن فعال در ارقام حساس و نسبتا مقاوم به شوری از مسیرهای علامت دهی متفاوتی در کده های سلولی مختلف وارد عمل می‌شود.

افزایش فعالیت پراکسیداز در رقم Y3000تحت تاثیر سالیسیلیک اسید با بیان بیشتر آن ها بر روی ژل مشخص بود و کاهش فعالیت این آنزیم در رقم H420 با بیان کمتر ($Hs_{0.5}$) یا ناپدید شدن یکی از نوارها (Hs_1) همراه بود. افزایش فعالیت پراکسیداز بر روی ژل های پلی اکریل آمید در حضور سالیسیلیک اسید توسط سایر محققین و در مطالعه با سایر گیاهان نیز گزارش شده است (Fernanders et al, 2006,; Audenaert et al, 2002;,Ferrari et al, 2003).

در اغلب بررسی های انجام شده تیمار با نمک فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان را در ارقام مقاوم به نمک بیشتر از ارقام حساس به نمک افزایش می دهد و به این طریق به گیاه کمک می کند تا بتواند شرایط تنش را تحمل کند. در گیاهان کلزا در تنش ۰- ۳۰۰ میلی مولار نمک فعالیت پراکسیداز افزایش یافت. تنش با ظهور نوارهای جدید بر روی ژل های پلی اکریل آمیدی همراه بود شدت بیان نوارها هم افزایش یافت. این افزایش در ارقام مقاوم به نمک بیشتر بود (Sawsan et al, 2007).

گیاهان کلزای مورد بررسی در این پژوهش در مناطقی با خاک های شور رشد کرده اند و در جهت مقابله با تنش شوری فعالیت سیستم آنتی اکسیدان در این گیاهان به ویژه در رقم حساس به شوری بالا است. سالیسیلیک اسید نیز تولید پراکسید هیدروژن را القا می کند و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی را به خصوص در رقم حساس افزایش می‌دهد . سالیسیلیک اسید در غلظت ۰/۵ میکرومولار و بر روی رقم حساس به شوری موثرتر عمل کرده است و با بهبود سیستم دفاعی گیاه در برابر تنش شوری به افزایش مقاومت گیاه به تنش کمک کرده است. در رقم نسبتا مقاوم به شوری تیمار با سالیسیلیک اسید با کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان همراه بود که بررسی مکانیسم دقیق آن به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

منابع

جعفری ،س.ر. منوچهری کلانتری،خ و احمدی موسوی،ع. (پاییز ۱۳۸٦). اثر پاکلوبوترازول بر تجمع آنتی آکسیدانها در نهال های گوجه فرنگی (*Lycopersicum esculentom* L.) تحت تنش سرما. مجله زیست شناسی ایران جلد ۲۰. شماره ۳. ص.۲۰٦-۲۱۷.

دولت آبادیان ،آ. مدرس ثانوی ،س.ع.م و اعتمادی، ف. (۱۳۸۷). اثر پیش تیمار اسید سالیسیلیک برجوانه زنی بذر گندم در شرایط تنش شوری. مجله زیست شناسی ایران.جلد ۲۱. شماره ٤. ٦۹۲- ۷۰۲

شمس الدین سعید،م. فرح بخش، ح. و مقصودی مود،ع. (۱۳۸٦) اثرات تنش شوری برجوانه زنی ،رشد رویشی و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی ارقام کلزای پائیزه. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی.۱۹۱جلد ۱۱. شماره ٤۱.ص .۱۹۱-۲۰۲.

نیاکان، م.رشیدزاده، و.نوری نیا ،ع. ع (۱۳۸۸). بررسی اثر نمک، ژیبرلین و آسکوربات بر جوانه زنی، رشد و اثر آنتی اکسیدانی دانه رست جو (*Hordeum vulgare L.*) پژوهش های علوم گیاهی.جلد ٤ شماره ۱ پیاپی ۱۳ص. ۲۰-۲۸ .

Abedi, T., and Pakniat, H., (2010). Antioxidant Enzyme Changes in Response to Drought Stress in Ten Cultivars of Oilseed Rape (Brassica napus L.). Czech J. Genet. Plant Breed., 46(1): 27–34.

Abogadallah GM, Serag MM, Quick WP.(2010).Fine and coarse regulation of reactive oxygen species in the salt tolerant mutants of barnyard grass and their wild-type parents under salt stress.Physiologia plantarum. 138(1): 60-73.

Alizadeh,B.,Zaefizadeh,M.,AsghariZakarya.R and Khayatnezhad ,M.(2011).Super oxidedismutase activity in in NaCl stress in salt- sensitive and salt tolerantGenotypes of colza(Brassica napus L.). Middle east journal of Scientific research.7(1):7-11

Alscher,R.G., Erturk,N and Lenwood S. Heath.,(2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany,53(372): 1331-1341

Arfan, M., Athar, HR., Ashraf, M., (2007). Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? Journal of Plant Physiology, 164(6): 685-694.

Audenaert,K.,Pattery,T., Cornelis.P and Hofte,M.(2002). Induction of systematic resistance to Botrytis cinera in tomato by Pseudomonas aeruginosa 7NSK2: role of salycilic acid and pyachelin and pyocyanin .Molecular plant- microbe interactions.15:1147-1156.

Bakalova S., Nikolova A., Wedera D. (2004): Isoenzyme profiles of peroxidase catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. Journal of Plant Physiology, 30: 64–77.

Bande-hagh. A., Toorchi, M., Mohammadi, A., Chaparzadeh,N., Hosseini salekdeh,G. and Kazemnia,H.(2008) Growth and osmotic adjustment of canola genotypes in response to salinity. Journal of Food Agricultur and Environment. 6(2):201-208.

Barkosky,R.R. and Einhelling,F.A.(1993) Effect of salicylic acid on plant water relationship. Journal of chemical Ecology 19;237-247..

Berukova, MV., Sakhabutdinova, R., Farkhutdinowa , RA., Kyldiarov,I. and Shakirova, F. (2001)The role of hormonal changes in protective action of salicylic acid on growth of wheat seedlings under water deficit. Agrochemiya 2:51-54.

Bowler C., Montagu M.V., Inze D. (1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Review of Plant Physiology, 43: 83–116.

Bradford M., (1976) . A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities in utilizing the principle of protein dye Binding. Analytical Biochemistry, 72:254-284.

Constantine,N and Stanley K.R (1997). Superoxide dismutase occurrence in highere plants. Plant physiology.59:309-314

Csiszar J., Feher-Juhasz E., Kotai E., Ivankovits- Kiss O., Horvath G.V., Mai A., Galle A., Tari I., Pauk J., Dudits D., Erdei L. (2005): Effect of osmotic stress on antioxidant enzyme activities in transgenic wheat calli bearing *MsALR* gene. Acta Biologica Szegediensis, 49: 49–50.

Fernanders,C.F.,Moraes,V.C.P.,Vasconcelos.I.,Sileiva,A.G andOliveira,J.T.A.(2006).Induction an anionic peroxidase in Cowpea leaves by exogenous salycilic acid .Journal of Plant Physiology.163:1040-1048.

Ferrari,S.,Plotnikova,J.M.,De Lorenzo,G and Ausubel ,F.M.,(2003).Arabidopsis local resistance to Botrytis cinerea involves salycilic acid and camelexin and requires EPS4 and PAD2 but not SID2,EDS5 or PAD4.The Plant Journal .35:193-205.

Foyer C.H., Lelandais M. Kunert K.J. (1994): Photooxidative stress in plants. Physiologia Plantarum,92: 696–717.

Gerailo.S and Gasemnezad,M. (2011). Effect of Salicylic acid on antioxidant enzyme activity and petal senecens in yellow island cut rose flowers. Journal of fruit and ornamental Plant Research .19(1):183-193.

Giannopolitis, C.N., and Ries, S.K., (1977). Superoxide dismutases II. Purification and quantitative relationship with water – soluble protein in seedlings. Plant Physiology., 50:315-318.

Glass, A. D.M. (1975) Inhibition of phosphate uptake in barley roots by hydroxyl- benzoic acids. Phytochemistry 14:2127-2130.

Glass, A.D.M. and Dunlop, J.(1974) Influence of phenolic acids on ion uptake IV Depolarization of membrane potentials .plant Physiology 54:855-858.

Gosset, D.R., (1996). Antioxidant response to NaCl stress. I. a control and NaCl- tolerant cotton cell- line growth in the presence of paraquate and endogenus glothation. Plant. Physiology., 12:803-809.

Gratao P.L., Polle A., Lea P.J., Azevedo R.A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology, 32: 481–494.

Gunes A., Pilbeam D., Inal A., Coban S. (2008): Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: Growth, antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 39: 1885–1903.

Hames, B.D., and Rickwood, D., (1990). Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. Oxford University press, 290 pages.

Hajihashemi, SH., Kiarostami, KH., Enteshari, SH. Saboora, A. (2007). The effect of Paclobutrazole and stress on Growgh and Ionic Contents in two cultivars of Wheat. Pakistan Journal of Biological Science., 10 (1): 41-48.

Jalali .S.M., Alizadeh,B., Zaefizadeh.M ., Asghari,R and Khayatnejad.M. (2011). Superoxide dismutase (SOD) activity in NaCl strss in salt sensitive and salt tolerance genotypes of colza (Brassica napus.L). Middle east Journal of Scientific Research.7(1):7-11.

Janda,T., Szalai,G., Tari.I and Paldi, E. (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decrease the effects of chilling injury in maize (*Zeamays* L.) plants. *Planta*, 208 : 175–180.

Karabanl,E., Pinto,M.C and Tommasi. F. (2003).The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant- pathogen interaction, Plant Physiology and Biochemistry,41:863-870.

Kilian .W., Chung. K. Michael Hunderson. H. (1972). Effect of physiological stress on potato polyphenol oxidase.Phytochemistry 11(4): 1255-1260

Kono and Fridorich ,(1983). Inhibition and reactivation of Mn-catalase. The journal of Biological Chemistry,258.13646-13468.

Kraus, T. E. and Fletcher, R. A. (1994). Paclobutrazol protects wheat seedlings from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved? Plant Cell Physiology., 35: 45-42.

Kuznetsov, V.V., and Shevyakova, (1997). Stress responces of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphohydration of polypeptids. Physiologia Plantarum, 100:320-326.Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 48: 251-275.

Lee J. S. (1998) The mechanism of stomatal closing by salicylic acid in *Commelina communis* L. Journal of Plant Biology. 41:(2) 97-102

Liu, W., Fang, J., Zhu, W.M., and Gao, P.J., (1999). Antioxidant defense system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivar subjected to drought. Plant Physiology., 119: 1091-1099.

Liu W, Ai XZ, Liang WJ, Wang HT, Liu SX, Zheng N. (2009). Effects of salicylic acid on the leaf photosynthesis and antioxidant enzyme activities of cucumber seedlings under low temperature and light intensity. The Journal of Aapplied Ecology 20(2):441-445.

Malecka A., Jarmuszkiewicz W., Tomaszewska B. (2001): Antioxidative defense to leaf stress in subcellualr compartment of pea root cells. Acta Biochimica Polonica, 48: 687–698.

Malgorzate, B., Zlatco, Z., Stoeva, N., (2002) Effect of paclobutrazol on wheat seedling under low temperature stress. Blugarian Journal of Plant Physiology., 28(1-2):75-84.

Martinez, C.A., Loureiro, M.E., Oliva, M.A., Maesrri, M., (2001). Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *solanum curilubum* and freezing sensitive *solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. Plant Science., 160: 505-515.

Mass, E.V., Leasch, S.M., Francios, L.E., Grieve, C.M., (1994) Tiller development in salt stressed wheat. Crop Science, 30: 1309-1313.

Molina. A., Bueno,P., Carmen, Marín, M., Rodríguez-Rosales,P., Belver,A., Venema,K and Donaire,J.P.(2002).Involvement of Endogenous Salicylic Acid Content, Lipoxygenase and Antioxidant Enzyme Activities in the Response of Tomato Cell Suspension Cultures to NaCl. New Phytologist. 156(3): 409-415.

Nemeth, M., Janda,T.,Horvath,E., Paldi,E., and Szalai,G. (2002).Exogenous Salicylic acid increases polyamine content but may decrease drough tolerance in maiz. Plant Science,162: 569-574.

Pan Y., Wu L.J., Yu Z.L. (2006): Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycorhiza uralensis* Fisch). Journal of Plant Growth Regulation, 49: 157–165.

Qi-lin, D., Chen, C., Bin, F., Ting-ting, L., Xia, T.,Yuan-ya, G., Ying-kun S.,Jin, W ., and Shi-zhang, D.,(2009). Effects of NaCl treatment on the antioxidant enzymes of oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings. African Journal of Biotechnology., 8 (20): 5400-5405.

Rajasekaran,L.R, Stiles,A. and Caldwell,C.D.(2002) Stand establishment in processing carrots. Effect of various temperature regimes on germination and the role of salicylates in promoting germination at low temperatures . Canadian Journal of plant Science 82:443- 450

.

Raskin, I., (1992). Role of salicylic acid in plants. Annual Review. of Plant Physiology and . Molecular Boilogy., 43: 439-463.

Raymond, J., Rakariyathem, N., and Azanza, JL., (1993). Purification and some properties of polyphenol oxidase from sunflower seeds. Phytochemistry., 34: 927-931.

Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB (1997) Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress, and H_2O_2-metabolizing enzymes: salicylic acid mediated oxidative damage requires H_2O_2. Plant Physiology. 115: 137-149.

Sarikan Agarwal., R.K.Sairam., G.C.Srivastava, Arun Tyagi.R.C.Meena. (2005). Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings.Plant Science.169(3):559-570.

Sairam,R.K. and Tyagi , A. (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science 86:407-412.

Sakiham.,Y.,Cohen.M.F.,Grace.S.C and Yamasaki.H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities ,Phenolics induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology,177:67-80.

Sawada. H., Shim b, Ie-Sung., Usui a, Kenji., Kobayashi a, Katsuichiro., Fujihara a,c, Shinsuke, (2008). Adaptive mechanism of Echinochloa crus-galli Beauv. Var. formosensis Ohwi under salt stress: Effect of salicylic acid on salt sensitivity . Plant Science., 174(6): 583–589.

Sawsan, S.Y., Reda. E.A.M., Rabab, G.E.I and Ahmed, M.E.I. (2007). Genetic markers associated with salt tolerance in canola (Brassica napus). Arabian Journal Biotechnology.10(1):143-154.

Senaratna, T.,Touchell, D., Bunn ,T and Dixon,K. (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) induce multiple stress in bean and tomato plants. Plant Growth Regulation 30:157-161.

Schandalios, J.G., (1993). Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiology., 101:7-12.

Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit .New phytologist .125:27-58.

Smith, B.J., (1984). SDS- Polyacrilamid gel electrophoresis of proteins. In: Methods in Molecular Biology. Vol., 1. Proteins. Hummana Press, Clifton, New York.41-56.

Srivastava, M.K. and U.N. Dwivedi, (2000). Delaying ripening of banana fruits by salicylic acid. Plant Science., 158: 87-96.

Vela, G., Leon, D.M., Garcia. H.S and Cruz. G.D.L. (2003). Polyphenoloxidase activity during ripening and chilling stress in manila mangoes. Journal of Horticultural Science Biotechnology .78(1):104-107.

Van loon LC., (1971). Tobacco polyphenol oxidase. Phytochemistry, 10: 503-507.

Vaughn, K.C., Lax, A.R., Duke, S.O. (1988). Polyphenol oxidase The chloroplast oxidase with no established function. Physiologia Plantarum.72:659-665.

Wimberg, R., (1975). Effect of growth in highly salinized media on enzymes of the photosynthetic apparatus in pea seedlings. Plant Physiology., 56:8-12.

Zivkovic.S., Popovic. M., Maksimovic. J.D., Momcilovic. I and Grubisic. D. (2010). Dehydration related changes of peroxidase and polyphenoloxidase activity in fronds of the Resurrection fern *Asplenium ceterach* L.Archieves of Biological Sciences Belgrade 62(4):1071-1081.

Yeshitella, T.B., Robbertse, P. J., Stassen, P. J. C., (2004) Paclobutrazol suppressed vegetative growth and improved yield as well as fruit quality of tommy atkins mango (*Mangifera indica*) in Ethiopia. New Zealand J. of Crop and Hort. Sci., 32(3): 281 – 293.

Yoruk and Marshal, (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review.Journal of Food Chemistry. 27:361-422.