تأثير حامض السالسليك في فعالية الأنزيمات المضادة للأكسدة لكالس أصل الخوخ Garnem تحت الإجهاد الملحي خارج الجسم الحي

*زينب جلال جودي **محسن جلاب عباس

*قسم البستنة و هندسة الحدائق / كلية الزراعة / جامعة الكوفة /جمهورية العراق

**قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الكوفة /جمهورية العراق

المستخلص

اجـري البحـث فـي مختبـر زراعـة الانسـجة النباتيـة العائـدة لقسـم البسـتنة و هندسـة الحـدائق فـي كليـة الزراعـة – جامعـة الكوفـة لبيـان تـأثير حـامض السالسـليك فـي فعاليـة الانزيمـات المضـادة للأكسـدة فـي كـالس أصـل Garnem المنمـى تحـت تـأثير الاجهـاد الملحـي، مـن تنميـة الكـالس فـي الوسـط الغـذائي MSالمـزود بتراكيـز (0 و 30 و 60 و 120 ملـي مـول) مـن ملـح كلوريـد الصـوديوم بالتـداخل مـع (0 و 0.1 و 0.2 و 0.3 ملـي مـول) مـن حـامض السالسـليك لمـدة 21 يومـا . أظهـرت النتـائج وجـود التـأثير المعنـوي لملـح كلوريـد الصـوديوم فـي فعاليـة الانزيمـات المضـادة للأكسـدة سـوبر اوكسـيد ديسـموتيز Superoxide dismutase (SOD) ، الاسـكوربيت بيروكسـيديز Ascorbate peroxidas (APX) والكتليـز Catalase (CAT) ، إذ زادت فعاليتهـا بزيـادة التراكيـز الملحيـة و سـجلت أعلـى القـيم فـي تركيـز 120 ملـي مـول بالمقارنـة مـع معاملـة المقارنـة التـي أعطـت أقـل القـيم كمـا أثـر حـامض السالسـليك معنويـا فـي فعاليـة الانزيمـات المضـادة للأكسـدة إذ زادت فعاليتهـا فـي تركيـز 0.3 ملـي مـول باسـتثناء انـزيم SOD الـذي قلـت فعاليتـه فـي تركيـز 0.3. كمـا اظهـر كـالس معاملـة التـداخل بـين 120 ملـي مـول ملـح كلوريـد الصـوديوم و 0.2 ملـي مـول أعلـى معـدل لفعاليـة الانزيمـات المضـادة للأكسـدة (SOD و APX) بينمـا أعطـت معاملـة 120 ملـي مـول مـن الملـح مـع 0.3 ملـي مـول مـن السالسـليك أعلى معدل لفعالية انزيم الكتليز بالمقارنة مع معاملة المقارنة .

الكلمات المفتاحية: أصل الخوخ ، كالس، اجهاد ملحي، حامض السالسليك، انزيمات مضادة للأكسدة

*البحث جزء من رسالة ماجستير للباحث الاول

المقدمة

تنتمي أشجار الخوخ *Prunus persica* L.) (إلى العائلة الوردية Rosaceae والى الجنس *Prunus* الذي يضم الفاكهة ذات النواة الحجرية (2)، وتصنف انواع جنس Prunus ومنها الخوخ و الاجاص ضمن الانواع الحساسة للملوحة (9) ونظراً لإكثار الأصناف التجارية للأنواع العائدة لجنس *Prunus* على الأصول الملائمة لذا فإنَّ تحمل الأصل للملوحة لغرض تطعيم الأصناف الملائمة للزراعة عليه بات مهماً نظراً للتزايد المستمر للملوحة سنويا سواء للتربه او المياه.

اتبع العديد من الباحثين وسائلاً مهمة في زيادة تحمل النباتات للملوحة منها استعمال منظمات النمو ومنها حامض السالسليك SA وهو مركب فينولي نباتي يعد كمنظم نمو الشبيهة بالهرمونات وهناك اهتمام كبير لتوضيح دوره في آليات الدفاع ضد الاجهادات الحيوية و غير الحيوية (5). أكدَّت العديد من الدراسات إن الإجهاد الملحي salt stress من الممكن أن يسبب عند التراكيز العالية من الملح ضررا لنمو النبات وتطوره ، إذ تتمثل هذه الأضرار بتأثير الأملاح في الحالة الفسيولوجية والبايوكيميائية لنمو النبات عن طريق تأثيره في زيادة الإجهاد الأزموزي واختلال التوازن الأيوني والتأثير السمي للأيونات داخل الخلية (8)،إن هذه التأثيرات الرئيسة للملوحة تقود إلى استحثاث حالة الإجهاد التأكسدي oxidative stress خلال تعرض النبات او الخلية للتراكيز العالية للملوحة ولمدّة طويلة اذ يزداد انتاج جذور الأوكسجين الفعالة Reactive Oxygen Species (ROS) مثل جزيئة الأوكسجين الحرة superoxide (O_2^-) ، وبيروكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide (H_2O_2) وجذر الهيدروكسيل hydroxyl radical (OH) الناتجة من الاختزال غير التام للأوكسجين (24و7).وتعد جذور الأوكسجين الفعالة عالية السمية للخلايا حيث تعمل على التاثي السلبي في وظائف الأغشية الخلوية وتضررها وتضررالحامض النووي DNA والبروتينات والكلوروفيل (11).

و تمتلك النباتات نظاماً دفاعياً للحد من سميّة هذه الأشكال وتتضمن هذه الآلية نوعين من الأنظمة الأولى: هي أنظمة غير إنزيمية مثل Ascorbate و Carotenoids ، والثانية: إنزيمية مثل السوبر اوكسديز دسميوتيز Superoxide dismutase(SOD) و البيروكسيديز Peroxidase (POD)و الكتليز Catalase(CAT).ففي دراسةShivanna و اخرون (22) اشار الى أن فعالية انزيم الكتليز قد ازادت في كالس نبات النيم *Azadirachta indica* المزروع في وسط غذائي مزود بتركيز 150 ملي مول من ملح كلوريد الصوديوم و انخفضت في التركيز الاعلى من ذلك.ولاحظ Mutlu واخرون (18) تحت تأثير الملوحة أن المعاملة بحامض السالسليك في نباتات القمح أدت الى تثبيط فعالية انزيم الكتليز(CAT)وكذلك قدزادت فعالية انزيم SOD في تركيز(0.01 mM) من حامض السالسليك في الصنف المتحمل للملوحة بينما

زادت بـالتركيز (0.1mM) فـي الصـنف الحساس للملوحة.

اجـري هـذا البحـث لمعرفـة تـأثير ملـح كلوريـد الصـوديوم و حـامض السالسـليك فـي فعاليـة الانزيمـات المضـادة للأكسـدة فـي كـالس اصـل الخـوخ Garnem خـارج الجسـم الحـي ومعرفـة مـدى تحمـل النبـات للأجهـاد الملحـي بوجـود حامض السالسليك.

المواد و طرائق العمل

تنشـئة الكـالس: اسـتعمل الوسـط الغـذائيMurashige and Skoog(MS) (17) المـزود ب NAA بتركيـز1.5 ملغـم. لتـر$^{-1}$ مـع BA بتركيـز 1 ملغـم. لتـر$^{-1}$مضـافاً لـه السـكروز (3%) والفتيامينـات و المـايو-إينوسـيتول Myo-inositol (100 ملغـم. لتـر$^{-1}$) اختيـرت العقـل السـاقية بطـول (20 – 25 سـم) و ازيلـت عنهـا كافـة الاوراق و قطعـت الـى قطـع صـغيرة بطـول 1 سـم كـل قطعـة حاويـة علـى عقـدة مفـردة و زرعـت علـى الوسـط بعـد تعقيمهـا، إذ عقمـت بتغطيسـها بـالكحول الاثيلـي 96% لمـدة 5 ثـواني ثـم غمـرت بمحلـول هـايبوكلورات الصـوديوم بتركيـز 1% لمـدة 15 دقيقـة و بعـدها غسـلت الاجـزاء النباتيـة بالمـاء المقطـر المعقـم 3 مـرات كـل مـرة لمـدة 5 دقـائق لأزالة أثر مادة التعقيم.

تـأثير الاجهـاد الملحـي و السالسـليك فـي فعاليـة الانزيمات المضادة للأكسدة

زرع وزن ثابـت 50 ملغـم مـن الكـالس لكـل انبوبـة زراعـة سـعة 10 مـل حاويـة علـى وسـط MS المـزود بتراكيـز (0 و 30 و 60 و 120 ملـي مـول) مـن ملـح كلوريـد الصـوديوم و تراكيـز (0 و 0.1 و 0.2 و 0.3 ملـي مـول) مـن حـامض السالسـليك و حضـنت الانابيـب المزروعـة فـي غرفـة النمـو بدرجـة حـرارة 23-25°م وشـدة اضـاءة 1000 لـوكس لمـدة 16 سـاعة/يوم لمـدة 21 يـوم. و بعـد انتهـاء مـدة التعـريض للملـح تـم اخـراج الكـالس مـن الوسـط الغـذائي و تـم قيـاس فعاليـة الانزيمـات CAT,APX,SOD إذ أخـذ 0.5 غـم مـن الكـالس الطـري ووضـع بالهـاون الخزفـي وسـحق وهـرس وبعـد إتمـام الهـرس أضـيف إليـه 5 مـل مـن مـزيج الاسـتخلاص ومـزج معـه ، وتمـت عمليـة الطـرد المركـزي بسـرعة 10000 دورة / دقيقـة وبدرجـة حـرارة 4^{O}م لمـدة 10 دقـائق ، ثـم أخـذ مـن المحلـول الرائـق2.5 مـل ووضـع فـي أنابيـب خاصـة بجهـاز الطـرد المركـزي سـعة 2.5مـل وحفظـت بدرجـة حـرارة -80°م إلـى حين أخذ القراءات بجهاز المطياف.

تقـدير الفعاليـة الكليـة لأنـزيم Superoxide dismutase(SOD)

قـدرت الفعاليـة حسـب طريقـة (14) والتـي تعتمـد علـى قابليـة SOD لتثبـيط أكسـدة البايروكـالولpyrogallol ، وقـيس علـى طـول مـوجي 420 نـانوميتر بأسـتخدام جهـاز المطيـاف الضـوئي. حيـث تعـرف الوحـدة الواحـدة مـن الفعاليـة علـى أنهـا كميـة الإنـزيم التـي تسـبب تثبـيط مقـداره 50% لاختـزال البايروكـالول الدقيقـة الواحـدة . وحسـبت اعتمـادا علـى المعادلـة التالية (6).

$$\text{SOD activity (units)} = \frac{\%\,inhibition\ /\ 50\% \times reaction\ volume}{total\ test\ period}$$

تقـــــدير فعاليـــــة انـــــزيم الاســـــكوربيت بيروكســـيديز(APX) Ascorbate peroxidase

قـدرت فعاليــة انــزيم الاسـكوربيت بيروكسـيديز APX حسـب طريقـة (19)، حيـث تـم تحضـير المحاليل التالية :

1)تحضـــير 0,1 مـــولاري محلـــول مـــنظم فوسفات البوتاسيوم (K-buffer)

- أذيـــبَ 1,3609غـــم مـــن KH2 PO4 (الـوزن الجزيئـي لـه 136,09 غـم . مـول$^{-1}$) فـي 100 مل من الماء المقطَّر (محلول حامضي)
- أذيـــبَ 1,7418 غـــم مـــن K2H PO4 (الـوزن الجزيئـي لـه174,18 غـم .مـول$^{-1}$) فـي 100 مل من الماء المقطَّر (محلول قاعدي)
- أخـذ كميـة كافيـة_ لإجـراء القياسـات_ مـن KH2PO4 وعـدلت دالتـه الحامضـية (pH) إلى 7 بإضافة K2H PO4 .

2) تحضـــــــــير محلـــــــــول 0,025 مـولاري Ethylene diaminete tracetic acid (EDTA) (الـــوزن الجزيئـــي لـــه 292,25غـــم . مـــول$^{-1}$) حُضِـــر بإذابـــة 0,7306 غـم مـن EDTA فـي 100 مـل مـن المـاء المقطَّـر و عـدل ال PH إلـى 8 بإضـافة هيدروكسـيد الصـوديوم (0,5 مـولا ري) لكـي يذوب EDTA كلياً في الماء المقطر.

3) تحضـير محلـول 0,01 مـولاري حـامض الاســكوربيك Ascorbate acid (الـــوزن الجزيئـي لـه176.12غـم.مـول$^{-1}$) حُضِـر بإذابـة 0,0881 غـم مـن حـامض الاسـكوربيك فـي 50 مل من الماء المقطَّر.

4) تحضـــرمحلول بيروكســـيد الهيـــدروجين H_2O_2 احـذ 4 مـل مـن H_2O_2 تركيـز 50% فـي 100مل ماء مقطر.

طريقة العمل :

يخلـط 1.5 مـل k-buffer مـع 0.5 مـل حـــامض الاســـكوربيك و 0.2 مـــل EDTA و H_2O_2 0.2 ويضـــاف المســـتخلص الانزيمـــي 0.1 مـل يكـون الحجـم الكلـي 2.5 مـل. ثـم يقـاس الفـرق فـي الامتصاصـية فـي جهـاز المطيـاف الضوئي على طول موجي 290nm.

ويحسب تركيز الانزيم حسب المعادلة التالية :

$$\text{APX activity (unit)} = \frac{\Delta Abs.\because \min \times reaction\ volume}{2.8\ mM-1}$$

تقدير فعالية انزيم الكتليز(CAT)Catalase

قــدرت فعاليــة الكتليــز باســتعمال طريقــة (4) وكالآتي :

أولاً _ تحضــير محلــول الاســتخلاص الــذي يتكون من :

1) تحضــير 0.1 مــولاري محلــول مــنظم فوسفات البوتاسيوم (K-buffer).

- أذيـبَ 1,3609غـم مـن KH_2PO_4 (الـوزن الجزيئــي لــه 136,09 غــم .مــول $^{-1}$) فــي 100 مل من الماء المقطَّر (محلول حامضي)
- أذيــبَ 1,7418 غــم مــن K2H PO4 (الـوزن الجزيئـي لـه174,18 غـم . مـول$^{-1}$) فـي 100 مل من الماء المقطَّر (محلول قاعدي)

أخــذ كميــة كافيــة_ لإجــراء القياســات_ مــن KH_2PO_4 وعــدلت دالتــه الحامضــية (pH) إلى 7 بإضافة KH_2PO_4 .

2) تحضــــــــير محلــــــــول 0,025 مـولاري Ethylene diaminete tracetic acid(EDTA) (الـــوزن الجزيئـــي لـــه 292,25غـم. مـول $^{-1}$) حُضِـر بإذابـة 7,306 غم من EDTA في 100 مل من الماء المقطَّر و عــدلت ال PH إلــى 8 بإضــافة هيدروكســيد الصـــوديوم (0,5 مـــولا ري) لكـــي يـــذوب EDTA كلياً في الماء المقطر.

3) تحضــير محلــول 0,01 مــولاري حــامض الاســكوربيك Ascorbate acid(الـــوزن الجزيئـي لـه176.12غم.مـول $^{-1}$) حُضِـر بإذابـة 0,0881 غـم مـن حـامض الاسـكوربيك فـي 50 مل من الماء المقطَّر.

ثانيــاً _مـزج المحاليـل للحصـول علـى محلـول الاستخلاص

مـزج 50 مـل مـن (K-buffer) و0.4 مـل (EDTA) و2 مـل حـامض الاسـكوربيك وأضـيف إليـه 4 غـم مـن Poly vinyl pyrrolidone (PVP) وأكمـل الحجـم إلـى 100 مـل مـن المـاء المقطَّـر للحصـول علـى 100 مل محلول الاستخلاص .

ثالثــاً _تحضـير0,5 مـولاري محلـول بيروكسـيد الهيـدروجين H2O2 اذ اخـذ 7.75 مـل مـن بيروكســيد الهيــدروجين (30 %) وأكمــل الحجم إلـى 100 مـل مـن المـاء المقطَّـر، ثـم اخـذ 50 مـل مـن المحلـول وأكمـل الحجـم إلـى 100 مـل مـن المـاء المقطَّـر للحصـول علـى التركيـز 0.5 مولاري.

رابعاً_ استخلاص الكتليزCatalase

أُخذ0.5 غـم مـن الكـالس الطـري ووضـع بالهـاون الخزفـي وسـحق وهـرس بوجـود النتـروجين السـائل وبعـد إتمـام الهـرس أضـيف إليـه 5 مـل مـن مـزيج الاسـتخلاص ومـزج معـه ، وضـع الخلـيط بأنبوبـة المخصصـة لجهـاز الطـرد المركـزي وتمـت عمليـة الطـرد المركـزي بسـرعة 10000 دورة / دقيقـة وبدرجـة حـرارة 4^{O}م لمـدة 10 دقـائق ، ثـم أخـذ مـن المحلـول الرائـق2.5 مـل ووضـع فـي أنابيـب خاصـة بجهـاز الطـرد المركـزي سـعة 2.5 مـل ووضـعت فـي صـندوق مملـوء بـالثلج وحفظـت بدرجـة حـرارة 80°م تحـت الصـفر إلـى حـين أخـذ القـراءات بجهـاز المطيـاف. وضـع 3 مـل

مـن المـاء المقطـر فـي أنبوبـة جهـاز المطيـاف ثـم أضـيف إليـه 120 مـايكرو مـول مـن المحلـول الرائـق وأضـيف إليهـا 2.8 مـل (K.buffer) و80 مـايكرو مـول مـن H2O2، ووضـعت الأنبوبة في موضعها المخصص.

وتـم وضـع 3 مـل مـن المـاء المقطَّـر فـي الأنبوبـة القياسـية (blank) وأضـيف إليهـا نفـس كميـات المحاليـل المضـافة إلـى الأنبوبـة التـي تحتـوي محلـول العينـة ووضـعت الأنبوبـة فـي موضـعها المخصـص. أخـذت القـراءة علـى الطـول المـوجي 240 نـانوميتر وبـثلاث أزمـان (0 ، 30 ، 60 ثانيـة)، وبواقـع ثلاثـة مكـررات لكـل معاملـة. وعـدلت فعاليـة الكتليـز باسـتخدام معامـل التصـحيح للبروكسـيديز الهايـدروجين H2O2 40 مـايكرومول $^{-1}$ سـم $^{-1}$ للحصـول علـى وحـدة القياس مايكرومول/ ملغم بروتين/ دقيقة .

خامساً_ تقـدير فعاليـة الكتليـز **:** وحـددت فعاليـة الكتليز من خلال المعادلات الآتية :

∴ الكتليز(مـايكرو مـول / لتـر) = (الامتصاصـية خـلال أجـزاء مختلفـة مـن الدقيقـة x 25 x 10 x 1000000)/40 = س

حيث إن :

10 : معامـل تخفيـف العينـة 0.5 غـم وزن رطب جونس بـ 5 مل مزيج الاستخلاص.

25 :معامـل التخفيـف لمسـتخرج الإنـزيم (120مايكرو لتر في 3 مل خليط).

X1000 1000: لتكـون النتيجـة النهائيـة مايكرومول / لتر .

∴ محتوى البروتين (ملغم / لتر) = س$_1$

∴ فعاليـة الكتليز(مـايكرومول/ ملغـم بـروتين/ دقيقة) = س / س$_1$.

تصميم التجربة و التحليل الاحصائي

نفـذت الدراسـة بوصـفها تجربـة عامليـة باسـتعمال التصـميم العشـوائي الكامـل وبعـاملين (تراكيـز حـامض السالسـليك x تراكيـز ملـح NaCl) (1) وبواقـع عشـرة مكـررات لكـل معاملـة . وتـم اسـتعمال برنـامج التحليـل الاحصـائي الجـاهز (GenStat 12th Edition) تحـت نظـام تشـغيل الحاسـوب الالـي Windows لاجـراء التحلـيلات الاحصـائية . وتمـت مقارنـة المتوسـطات باسـتعمال اختبـار دنكـن متعـدد الحـدود Duncan's Multiple range Test عنـد مسـتوى احتمـال 0.05 لاختبـار الفـروق المعنويَّة بين متوسطات المعاملات.

النتائج و المناقشة

فعالية انزيم SOD (وحدة . ملغم $^{-1}$بروتين)

مـن خـلال نتـائج جـدول (1) يتضـح التـأثير المعنـوي لملـح كلوريـد الصـوديوم حيـث اعطـى التركيـز ملـي مـول 120 اعلـى معـدل لانـزيم SOD بلـغ 7.26 وحـدة. ملغـم$^{-1}$ بـروتين والـذي اختلـف عـن بقيـة التراكيـز الملحيـة ولكـن لـم يختلـف عـن التركيـز 30 ملـي مـول فـي حـين اعطـى التركيـز 0 ملـي مـول اقـل معـدل لانـزيم SOD بلـغ 3.00 وحـدة . ملغـم$^{-1}$ بـروتين والذي اختلف عن بقية التراكيز.

كـذلك اظهـرت النتـائج فـي الجـدول نفسـه تـاثيراً معنويـاً لحـامض السالسـليك فـي فعاليـة انـزيم السـوبر اوكسـيد دسـتموتيز SOD فـي الكـالس المـزروع حيـث اعطـى التركيـز 0.2 ملـي مـول اعلـى معـدل بلـغ 6.25 وحـدة .ملغـم$^{-1}$ بـروتين والـذي لـم يختلـف معنويـا عـن التركيـز 0.1 ملـي مـول فـي حـين اعطـى التركيـز 0.3 ملـي مـول اقـل معـدل بلـغ 5.31 وحـدة . ملغـم$^{-1}$ بـروتين والـذي لـم يختلـف عـن التركيـز 0 ملـي مـول ،وهـذه النتـائج تتفـق مـع مـا جـاء بـهMutlu و اخـرون(18) مـن حيـث زيـادة فعاليـة انـزيم SOD بوجود حامض السالسليك.

فـي حـين ان التـداخلات اظهـرت تفـوق معاملـة 30 ملـي مـول ملـح كلوريـد الصـوديوم و0.1 ملـي مـول حـامض السالسـليك فـي اعطـاء اعلـى معـدل لفعاليـة الانـزيم بلغـت 8.49 وحـده .ملغـم$^{-1}$ بـروتين والتـي اختلفـت معنويـا مـع بعـض المعـاملات، فـي حـين بلـغ اقـل معـدل لفعاليـة الانـزيم 1.89 وحـدة .ملغـم $^{-1}$بـروتين فـي معاملـة 0 ملـي مـول ملـح كلوريـد الصـوديوم مـع 0 ملـي مول حامض السالسليك.

جـدول (1) تـأثير ملـح كلوريـد الصـوديوم وحـامض السالسـليك و تـداخلاتهما فـي فعاليـة انـزيم السـوبر اوكسـيد ديسـموتيز SOD (وحـدة . ملغـم$^{-1}$ بـروتين) فـي كـالس أصـل الخوخ Garnem بعد مرور 21 يوماً من الزراعة خارج الجسم الحي

تركيزNaClفي الوسط الغذائي (ملي مول)	تراكيز حامض السالسليك في الوسط الغذائي				معدل تأثير تركيزNaCl
	0	0.1	0.2	0.3	
0	1.89 e	1.91 e	4.19 d	4.02 d	3.00 c
30	6.38 c	8.49 a	5.74 c	5.63 cd	6.56 ab
60	6.91 c	5.81 cd	7.85 ab	5.10 cd	6.48 b
120	b7.01	8.29 a	7.22 ab	6.51 bc	7.26 a
معدل تاثير حامض السالسليك	5.55 b	6.12 a	6.25 a	5.31 b	

فعاليــة انــزيم الاســكوربيت بيروكســيديز APX (وحــدة .مــايكرومول$^{-1}$ حــامض الاســكوربك المؤكسد / دقيقة)

مــن نتــائج جــدول (2) يتبــين أن ملــح كلوريــد الصــوديوم قــد اثــر معنويــاً فــي فعاليــة انــزيم الاسـكوربيت بيروكسـيديز فـي الكـالس المـزروع إذ تفـوق تركيـز 120 ملـي مـول بأعطـاء أعلـى معــدل لفعاليــة الانــزيم بلــغ 0.0053 وحــدة . مــايكرومول $^{-1}$حــامض الاســكوربك المؤكســد / دقيقـة و التـي اختلفـت معنويـا عـن بـاقي التراكيـز، فـي حـين اعطـى التركيـز 0 ملـي مـول اقـل معـدل بلــغ 0.0023 وحــدة.مــايكرومول$^{-1}$ حــامض الاسكوربك المؤكسد / دقيقة.

جـدول (2) تـأثير ملـح كلوريـد الصـوديوم وتـداخلاتهما فـي فعاليـة انـزيم الاسـكوربيت بيروكسـيديز (وحـدة . مـايكرومول$^{-1}$ حـامض الاسـكوربك المؤكسـد / دقيقـة) فـي كـالس أصل الخوخ Garnem بعد مرور 21 يوماً من الزراعة خارج الجسم الحي

تركيز NaClفي الوسط الغذائي (ملي مول)	تراكيز حامض السالسليك في الوسط الغذائي				معدل تأثير تركيز NaCl
	0	0.1	0.2	0.3	
0	0.0019 gh	0.0018 h	0.0027 fg	0.0028 fg	0.0023 d
30	0.0029 fg	0.0022 gh	0.0031 ef	0.0038 ef	0.0030 c
60	0.0045 cd	0.0032 ef	0.0047 cd	0.0067 b	0.0047 b
120	0.0071 ab	0.0078 a	0.0022 gh	0.0043 cd	0.0053 a
معدل تاثير حامض السالسليك	0.0041 ab	0.0037 b	0.0032 c	0.0044 a	

امـا تـأثير حـامض السالسـليك فـأظهرت النتـائج ان تركيـز 0.3 ملـي مـول تفـوق فـي اعطـاء اعلـى معـدل لفعاليـة الانـزيم بلـغ 0.0044 وحـدة . مـايكرومول$^{-1}$ حـامض الاسـكوربك المؤكسـد / دقيقـة، بينمـا اعطـى تركيـز 0.2 ملـي مـول اقـل معـدل بلـغ 0.0032 وحـدة . مـايكرومول$^{-1}$ حـامض الاسـكوربك المؤكسـد / دقيقـة والتـي اختلفت معنويا مع بقية التراكيز.

وبينـت نتـائج التـداخل بـين ملـح كلوريـد الصـوديوم وحـامض السالسـليك تفـوق معاملـة 120 ملـي مـول ملـح كلوريـد الصـوديوم مـع 0.1 ملـي مـول حـامض السالسـليك فـي اعطـاء اعلـى معـدل لفعاليـة الانـزيم بلـغ 0.0078 وحـدة . مـايكرومول$^{-1}$ حـامض الاسـكوربك المؤكسـد / دقيقـة و التـي اختلفـت معنويـا مـع بـاقي المعـاملات، فـي حـين بلـغ اقـل معـدل 0.0018 وحـدة . مـايكرومول$^{-1}$ حـامض الاسـكوربك المؤكسـد / دقيقـة فـي معاملـة 0 ملـي مـول ملـح كلوريـد الصـوديوم مـع 0.1 ملـي مـول حـامض السالسـليك و التـي اختلفـت معنويـا مـع بـاقي المعاملات.

فعاليـة انـزيم الكتليـز CAT (مـايكرومول . ملغم $^{-1}$ بروتين / دقيقة)

مـن نتـائج جـدول (3) يتبـين التـأثير المعنـوي لتراكيـز ملـح كلوريـد الصـوديوم فـي فعاليـة انـزيم الكتليـز فـي الكـالس المـزروع حيـث اعطـى التركيـز 60 ملـي مـول اعلـى معـدل لانـزيم الكتليزبلـغ 9.849 مـايكرومول . ملغـم$^{-1}$ بـروتين / دقيقةوالـذي لـم يختلـف معنويـا عـن التركيـز 120 ملـي مـول فـي حـين اعطـى التركيـز 0 ملـي مـول اقـل معـدل بلـغ 8.192 مـايكرومول . ملغـم$^{-1}$ بـروتين / دقيقـة والـذي لـم يختلـف معنويـا عـن التركيـز 30 ملـي مـول ، بينمـا تبـين النتـائج التـأثير المعنـوي لحـامض السالسـليك فـي فعاليـة الانـزيم إذ تفـوق التركيـز 0.3 ملـي مـول بأعطـاء اعلـى فعاليـة للانـزيم بلغـت 9.512 مـايكرومول.ملغـم$^{-1}$ بروتين/دقيقـة، فـي حـين اقـل فعاليـة للكتـاليز كانـت فـي تركيـز 0.2 ملـي مـول اذ بلغـت 8.717 مـايكرومول.ملغـم$^{-1}$ بروتين/دقيقـة. وهـذه النتـائج تتفـق مـعSajid و اخرون (20) في المزارع النسيجية للبطاطا.

امـا بالنسـبة للتـداخل بـين ملـح كلوريـد الصـوديوم و حـامض السالسـليك تبـين النتـائج ان هنـاك تـأثير معنـوي للتـداخل فـي فعاليـة انـزيم الكتليـز إذ تفوقـت معاملـة 60 ملـي مـول ملـح كلوريـد الصـوديوم مـع 0.3 ملـي مـول حـامض السالسـليك فـي أعطـاء اعلـى فعاليـة للكتـاليز بلغـت 10.185 مـايكرومول.ملغـم$^{-1}$ بروتين/دقيقـة، بينمـا اقـل فعاليـة للانـزيم بلغـت 7.345مـايكرومول.ملغـم $^{-1}$بروتين/دقيقـة فـي معاملـة 0 ملـي مـول ملـح كلوريـد الصـوديوم مـع 0 ملي مول حامض السالسليك.

ان انتـاج الجـذور الحـرة فـي الظـروف الطبيعيـة التـي ينمـو بهـا النبـات يكـون فـي مسـتويات واطئـة لاتـؤذي الخليـة وان هـذه الجـذور الحـرة المتمثلـة بـ (بيروكسـيد الهيـدروجين hydrogen peroxide و جـذر الهيدروكسـيل hydroxyl radicals وذرة الاوكسـجين الاحاديـة superoxide) مـن الممكـن أن تكـون مسـؤولة عن ضرر الخلية تحت الاجهاد الملحي وإن

جـدول (3) تـأثير ملـح كلوريـد الصـوديوم و حـامض السالسـليك و تـداخلاتهما فـي فعاليـة انــزيم الكتليــز(مــايكرومول . ملغــم$^{-1}$ بــروتين / دقيقــة) فــي كــالس أصــل الخــوخ Garnem بعد مرور 21 يوماً من الزراعة خارج الجسم الحي

تركيزNaClفي الوسط الغذائي (ملي مول)	تراكيز حامض السالسليك في الوسط الغذائي				معدل تأثير تركيزNaCl
	0	0.1	0.2	0.3	
0	7.345 d	8.590 cd	8.315 cd	8.520 cd	8.192b
30	9.090 bc	7.580 d	7.895 d	9.223 bc	8.447b
60	10.135 a	9.495 bc	9.580 abc	10.185 a	9.849 a
120	10.150 a	9.890 abc	9.080 bc	10.120 ab	9.817 a
معدل تاثير حامض السالسليك	9.184a	8.889 ab	8.717b	9.512 a	

هذا الاجهاد يؤدي إلى إنتاج كميات عالية من الجذور الحرة التي تعمل على تضرر الاغشية الخلوية (16) . إذ إن ملح كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي يؤدي الى زيادة كمية بيروكسيد الهيدروجين في نسيج الكالس وبوجود الاوكسجين الحر يتكون عن تفاعلهما جذر الهيدروكسيل الذي يسبب الاضرار التاكسدية للخلايا وفي هذه الحالات فان النبات يقوم بتفعيل جهازه الدفاعي الانزيمي في ميكانيكيات معينة للتقليل والتخلص من هذه الجذور، اذ ان على النبات في مثل هذه الحالات ولغرض استمرار بقاءه يتطلب منه الحفاظ على اقل المستويات من H_2O_2 و O_2(13)وقد اشارت العديد من الدراسات العلمية الى ان العديد من الانزيمات المضادة للاكسدة ومنها CAT و SOD و APX تزداد فعاليتها تحت ظروف الاجهاد الملحي . وقد يعزى السبب في زيادة فعالية هذه الانزيمات في الكالس النامي في مستويات عالية من ملح كلوريد الصوديوم الى كونها

واحدة من الوسائل لتحمل ظروف الإجهاد الملحي التي تؤدي إلى إستحداث الجهد التأكسدي المتمثل بزيادة جذور الأوكسجين الفعالة (ROS) الضارة للنبات، فتقوم الخلايا بزيادة إنتاج الأنزيمات المضادة للأكسدة لما لها من أهمية في التخلص منها (15) . ان زيادة فعالية انزيم SOD في الدراسة الحالية و الموضحة في النتائج الواردة في جدول (1) قد تعود إلى الزيادة في مستويات الجذور الحرة بسبب وجود تراكيز عالية من ملح كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي إذ يتمثل عمل هذا الانزيم بالتخلص من الاوكسجين الحر والتي يتسبب عنها انتاج بيروكسيد الهيدروجين الذي تتخلص منه الخلية بفعل زيادة فعالية كل من ال CAT و APX (12) والذي زادت فعاليتهما في نسيج الكالس النامي على وسط غني بتراكيز من ملح كلوريد الصوديوم (الجدول 2 و 3)، اذ يعمل الكتليز على التخلص من بيروكسيد الهيدروجين فضلا عن ما يعمله انزيم APX من نفس الفعل عبر تفاعل الاسكوربيك مع البيروكسيد وانتاج الماء (21) . وتتفق هذه النتائج ما وجده كل من Kusvuran و اخرون (10) في مزارع كالس البطيخ*Malusspp*و Wang و اخرون (23) في كالس التفاح وShivanna و اخرون(22) في المزارع النسيجية لنبات النيم*Azadirachtaindica*وناجي (3) في الحمضيات*Citruss spp.* . الذين اشاروا إلى زيادة في فعالية الانزيمات المضادة للاكسدة عند زراعتها في اوساط مزودة بملح كلوريد الصوديوم.

الاستنتاجات

ان التراكيز العالية من ملح كلوريد الصوديوم زادت من فعالية الانزيمات المضادة للأكسدة (SOD و APX و CAT) في المزارع النسيجية لكالس أصل الخوخ Garnem وكذلك حامض السالسليك أثر معنويا في زيادة فعالية الانزيمات، و بذلك فأن النظام الانزيمي يعمل تحت الاجهاد الملحي.

المصادر

1-الساهوكي، مدحت و وهيب، كريمة محمد.1990. تطبيقات في تصميم و تحليل التجارب. وزارة التعليم العالي و البحث العلمي. جامعة بغداد. العراق.

2-حامد، فيصل و عماد العيسى و محمد بطحة. 2007. انتاج الفاكهه، كلية الهندسة الزراعية، مطبعة جامعة دمشق،سوريا.

3-ناجي، ضرغام باسم. 2013. تقييم بعض أصول الحمضيات *Citruss spp.* لتحمل الملوحة خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير.كلية الزراعة . جامعة الكوفة .جمهورية العراق.

4-Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*, Method of Enzymology. Plant Cell Physiol., 105:121-126.

5-Edral, S.; M. Aydin; Ms. Taspinar; R. Dumlupinar ;O.

Kaya and Gorcek, Z. 2012. Effect of salicylic acid on Wheat salt sensitivity. Afr. J. Biotechnol., 10(30): 5713-5718

6-Frary , A.; D. Göl; D. Keleş; B. Ökmen; H. Pınar; H. Ö Şığva; A. Yemenicioğlu and Doğanlar, S. 2010.Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL.BMC Plant Biology, 10:58.

7-Jaspers, P.; and J. Kangasjärvi. 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. Physiology Plantarum, 138(4):405-13.

8-Karim, S. 2007. Exploring plant tolerance to biotic and a biotic stresses. PhD thesis. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Plant Biology and Forest Genetics Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences. Sweden. pp: 66.

9-Kotuby-Amacher, J. and K.B. Kitchen. 2000. Salinity and Plant Tolerance. Utah State University Extension, Logan, USA,AG-SO-03.

10- Kusvuran, S.; S. Ellialtioglu; F. Yaser. and Abak, K. 2012. Autioxidative enzyme activities in the leaves and callus tissues of salt-tolerant and salt-susceptible melon varieties under salinity. African J. of Biotechnology, 11(3):635-641.

11- Lin, J. ; Y. Wang, and Wang,G. 2006. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. J. Plant Physiol., 163: 731-739.

12- Lokhande, V.H.; T.D., Nikam; V.Y., Patade. M. L., Ahire. and Suprasanna, P. 2011. Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and in vitro growth responses in *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult.,104:41–49.

13- Mallik, S.;M. Nayak; B. B., Sahu; A. K., Panigrahi and

Shaw, B.P. 2011. Response of antioxidant enzymes to high NaCl concentration in different salt-tolerant plants. Biol. Plant., 55:191–195.

14- Marklund, S. and G., Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase .Eur. J. Biochem., 47:469-474.

15- Mittal, S.;N., Kumari , and Sharma, V. 2012. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. Plant Physiol. Biochem., 54:17–26.

16- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci., 7: 405-410.

17- Murashige, T. and F., Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473 – 497.

18- Mutlu, S.; O., Atici; and Nalbantoglu, B. 2009. Effect of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. Biologia Plantarum, 53:334-338.

19- Nakana, Y. and K., Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell. Physiol., 22:867-880.

20- Sajid, Z.A. and A., Faheem. 2012. Role of salicylic acid in amelioration of salt tolerance in Potato (*Solanum tuberosum* L.) under *in vitro* conditions. Pak. J. Bot., 44:37-42, Special Issue.

21- Sergio, L.; A. D., Paola; V., Cantore; M., Pieralice; N. A; Cascarano; V. V. Bianco and Venere, D.D. 2012. Effect of salt stress on growth parameters, enzymatic antioxidant system, and lipid peroxidation in wild chicory (*Cichorium intybus* L.). Acta Physiol. Plant., 34(6) pp: 2349-2358.

22- Shivanna, M.B; B. R. Nagashree and Gurumurthy, B.R. 2013. *In Vitro* response of *Azadirachta indica* to salinity stress and its effect on certain osmoprotectants and antioxidant enzymes. Int. J. Pharm. Bio. Sci., 4(2): 591-602.

23- Wang, K. ;L., Zhang; M., Gao; L., Lv; Y., Zhao; Lg., Zhan; LI, B.;N.M, Han,and Alva, K. 2013. Influence of salt stress on growth and antioxidant responses of two *Malus* species at callus and plantlet Stages. Pak. J. Bot., 45(2): 375-381.

24- Xiong, L.; K. S. Schumaker, and Zhu, J.-K. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. The Plant Cell, 14(1):165-183.

Effect of Salicylic acid on the antioxidant enzymes activity for callus of Garnem peach rootstock under *in vitro* salt stress

*Zainab Jalal Joudi **Muhson Chellab Abbas

*Department of Horticulture. Faculty of Agriculture. University of Kufa. Republic of Iraq

** Department of Biology. Faculty of Science. University of Kufa. Republic of Iraq

Abstract

An experiment was conducted at the laboratory of plant tissue culture in the Department of Horticulture and Landscape at the College of Agriculture / University of Kufa to study the effect of salicylic acid onthe activity of antioxidant enzymes of Garnem callus rootstock under *in vitro* salt stress through of callus cultured on MS medium provided with (0, 30, 60, 120) mM of sodium chloride and (0, 0.1, 0.2, 0.3) mM of salicylic acid for 21 days.

Result showed a significant effect ofsodium chloride salt on the activity of antioxidant enzymes Superoxide dismutase (SOD), Ascorbate peroxidase (APX) and Catalase (CAT) that recorded highest values at the concentration of 120mM compared with the control treatment recorded lowest values. Salicylic acid also has significant effect on the activity of antioxidant enzymes that increased in 0.3mM of salicylic acid except SOD enzymes activity which decreased at 0.3mM> Interaction between 120mM sodium chloride salt and 0.2mM salicylic acid gave highest values of antioxidant enzyme activity (SOD , APX) while 120mM sodium chloride salt and 0.3mM salicylic acid gave highest value of CAT enzymes activity compared with control treatment.

Keywords: Peach rootstock, Salt stress, Salicylic acid, Callus, Antioxidant enzyme activity.

*Part of Ms.C thesis of the first author