حث الأنزيمات المضادة للأكسدة في الحنطة النامية تحت الاجهاد الملحي

اسماعيل خليل السامرائي* سعدي مهدي الغريري** حمدالله سليمان راهي*

استلام البحث 23 ، ايلول ,2012,
قبول النشر 9، كانون الاول، 2012

الخلاصة:

نفذت تجربة أصص في البيت الزجاجي التابع لقسم علوم التربة والموارد المائية في كلية الزراعة جامعة بغداد في ابي غريب في الموسم 2009-2010، لدراسة تاثير التسميد الورقي ببعض أسمدة المغذيات الكبرى والصغرى في حث فعالية بعض الأنزيمات المضادة للأكسدة Antioxidants enzymes وتقليل الأثر الضار للإجهاد الملحي خلال مرحلة النمو الخضري لصنفين من الحنطة ، حنطة الخبز صنف تموز3 (*Triticum aestivum L.*) و الحنطة الخشنة صنف دور85 (*Triticum durum L.*) تحت ثلاث مستويات من الاجهاد الملحي مع استعمال ثلاث توليفات من التسميد الورقي هي المغذيات الكبرى (البوتاسيوم + الكالسيوم) وبتراكيز 3000 و 1500 ملغم . لتر$^{-1}$ على التتابع ، والصغرى(الحديد+ الزنك + المنغنيز) بتراكيز 30 ، 20 و10 ملغم . لتر$^{-1}$على التتابع ، و الكبرى + الصغرى،اضافة الى معاملة المقارنة(بدون رش اسمدة).

بينت النتائج ان إضافة مستويات مختلفة من مياه الري الحاوية على كلوريد الصوديوم أدت إلى حدوث زيادة معنوية في فعالية انزيمات ال SOD و الPOD ، بينما انخفضت معنويا فعالية انزيم الCAT في أوراق نباتات الحنطة. كما بينت النتائج ان عملية رش الاسمدة الورقية لبعض المغذيات الكبرى والصغرى قد أدت إلى خفض فعالية انزيمات الSOD و الPOD في اوراق صنفي الحنطة مقارنة مع معاملة المقارنة(بدون رش) عند كافة مستويات الملوحة ، بينما لوحظ زيادة فعالية انزيم الCAT في اوراق صنفي الحنطة عند رش الاسمدة مع كافة مستويات الملوحة ، ولوحظ تفوق معاملة رش الاسمدة (الكبرى+الصغرى) على معاملتي رش الاسمدة الصغرى والاسمدة الكبرى في زيادة فعالية الانزيمات المضادة للأكسدة في اوراق النباتات المعرضة للاجهاد الملحي . وظهر من خلال النتائج وجود اختلافات معنوية بين صنفي الحنطة في استجابتها للاجهاد الملحي في ظروف الدراسة والتي يمكن الافادة منها في برامج التربية والتحسين لصفة تحمل الملوحة، وهذا يظهر بوضوح اهمية التسميد الورقي وفعاليته في حث فعالية الانزيمات المضادة للأكسدة وتقليل الاثر الضار للاجهاد الملحي في نمو نباتات الحنطة .

الكلمات المفتاحية: الانزيمات المضادة للأكسدة، الحنطة ، التسميد الورقي، الاجهاد الملحي

المقدمة:

يعد الاجهاد الملحي الناشيء عن ملوحة التربة او المياه من اهم الاجهادات البيئية المحددة لنمو وتطور وانتاج المحاصيل في معظم مناطق العالم وخصوصا في المناطق الجافة وشبه الجافة اذ يسبب الاجهاد الملحي تأثيرات ضارة في نمو نباتات المحاصيل ناشئة عن الاجهاد الازموزي والاجهاد المائي واختلال التوازن الغذائي والهرموني والأنزيمي والتأثير السمي للايونات الملحية علاوة على التأثيرات الناجمة عن التغير في خصائص التربة بفعل الملوحة وما ينتج عن ذلك من اختلال في جاهزية المغذيات وامتصاص الماء من قبل النباتات [1]، واخيرا ظهر ان الملوحة تسبب الاجهاد التأكسدي oxidative stress المؤدي الى انتاج عدد من الجذور الاوكسجينية النشطة (reactive oxygen species (ROS مثل (H_2O_2, OH^{-1} ,O_2^- والمسببة لتلف الغشاء الخلوي من خلال اطلاق تفاعلات سامة للنبات مثل أكسدة اللبيدات ، انحلال البروتين ، وتغيرات وراثية في ال DNA ، الا ان النباتات طورت بعض الاليات لمقاومة هذا الاجهاد بازالة التأثيرات السامة لل ROS عن طريق التحكم في الانزيمات المضادة للأكسدة كال superoxide dismutase (SOD: EC 1.15.1.1), peroxidase (POD: EC 1.11.1.7), catalase (CAT: EC 1.11.1.6) وبعض مضادات الأكسدة غير الانزيمية كال ascorbate (AS) وغيرها [2, 3] .

* قسم التربة والموارد المائية، كلية الزراعة، جامعة بغداد
** مركز التربة والموارد المائية، دائرة البحوث الزراعية ، وزارة العلوم والتكنولوجيا

الحنطة من المحاصيل المتوسطة التحمل للملوحة [4] ، ذكر Bray [5] أن حاصل الحنطة انخفض بنسبة 82% بسبب الاجهاد البيئي وبنسبة 5% بسسبب الاجهاد الحيوي . ونظرا لوجود دراسات حديثة حول استخدام مفهوم تقليل الاثر الضار للاجهاد الملحي في نمو وحاصل النبات باستخدام التسميد الورقي في بعض المغذيات الكبرى كالكالسيوم والبوتاسيوم والمغذيات الصغرى كالحديد والزنك والمنغنيز والتي اكدت معظمها على الدور الفاعل لهذه المغذيات في نمو وحاصل النباتات المعرضة لظروف الاجهاد الملحي وتحسين حالة النبات التغذوية [7,6]. ولقلة الدراسات التي تناولت النشاط الانزيمي لمضادات الاكسدة في القطر فقد تم اجراء الدراسة الحالية بهدف دراسة تاثير التسميد الورقي في حث فعالية بعض الأنزيمات المضادة للأكسدة Antioxidants enzymes وتقليل الأثر الضار للأملاح من خلال ازالة الـROS خلال مرحلة النمو الخضري للحنطة.

المواد وطرائق العمل :

نفذت هذه التجربة في البيت الزجاجي التابع لقسم علوم التربة والموراد المائية في كلية الزراعة –جامعة بغداد في ابي غريب بتاريخ 2009/12/1، وذلك لدراسة اثر استعمال بعض المغذيات الكبرى والصغرى في تقليل التأثير الضار للإجهاد الملحي في مرحلة النمو الخضري لمحصول الحنطة النامي في تربة كلسيه ، وباستعمال اصص سعة 10 كغم تربة. جلبت التربة من العمق (0-30) سم من مزرعة خاصة في قضاء المحمودية - 35 كم جنوب بغداد ، نسجتها مزيجة طينية غرينية مصنفة إلى (Typic Torrifluvent) ، والجدول (1) يبين بعض الخواص الكيميائية والفيزيائية لتربة الدراسة قبل الزراعة والتي اجريت حسب الطرائق القياسية الواردة في [9,8] وباستعمال اجهزة مقياس شدة اللهب Flame photometer والمطياف الضوئيSpectrophotometer والامتصاص الذري Atomic Absorption Spectrophotometer .

جدول(1) بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية لتربة الحقل قبل الزراعة

الصفة	القيمة	وحدة القياس
أس الهيدروجين pH_e	7.76	
التوصيل الكهربائي لمستخلص العجينة المشبعة EC_e	4.25	ديسي سيمنز . م$^{-1}$
السعة التبادلية للايونات الموجبة	23.8	سنتيمول . كغم$^{-1}$ تربة
معادن الكاربونات	224.6	غم . كغم$^{-1}$ تربة
النسجة	مزيجة طينية غرينية	
السعة الحقلية	%27	
المحتوى الجاهز من العناصر(ملغم.كغم تربة$^{-1}$)		
النتروجين الجاهز(NO_3+NH_4)	73.65	الحديد الجاهز 4.3
الفسفور الجاهز	26.00	الزنك الجاهز 0.46
البوتاسيوم الجاهز	131.00	المنغنيز الجاهز 5.8
الايونات الذائبة في مستخلص العجينة المشبعة (ملي مول.كغم تربة$^{-1}$)		
الصوديوم	13.80	الكلوريد 15.63
الكالسيوم	5.46	الكبريتات 11.70
المغنيسيوم	8.72	الكاربونات 0
البوتاسيوم	1.87	البيكاربونات 4.66
نسبة امتزاز الصوديوم SAR		3.67

معاملات التجربة:

شملت التجربة المعاملات التالية :-

اولا- أصناف ألحنطة :اختيارصنفي حنطة، صنف تموز3 يمثل حنطة الخبز (*Triticum aestivum*) (و صنف دور85 يمثل الحنطة الخشنة) (*Triticum durum* تم الحصول عليهما من مركزبحوث تربية وتحسين النبات في وزارة العلوم والتكنولوجيا .

ثانيا- أسمدة المغذيات : وشملت التوليفات الاتية:

ا- بدون رش مغذيات (معاملة المقارنة) ماء اعتيادي.

ب - المغذيات الكبرى : رش أسمدة مغذيات البوتاسيوم والكالسيوم بصورة مجتمعة وبهيئة ($Ca(NO_3)_2 + K_2SO_4$) بتراكيز 3000 و 1500 ملغم /لتر في كل رشة للبوتاسيوم والكالسيوم وعلى التوالي .

ج - المغذيات الصغرى : رش أسمدة مغذيات (Mn + Zn + Fe) بصورة مجتمعة بهيئة ($MnSO_4. H_2O+ ZnSO_4.7H_2O +$ $FeSO_4.7H_2O$) وبتراكيز للحديد والزنك والمنغنيز (30+ 20 +10) ملغم.لتر$^{-1}$ في كل رشة وعلى التوالي .

د- رش الاسمدة في(ب +ج) بصورة مزدوجة.

ثالثا- المياه: رويت الوحدات التجريبية بمياه ري حاوية على كلوريد الصوديوم وبثلاثة تراكيز 0، 50، 100 ملي مول.لتر$^{-1}$.

طبقت التجربة وفقا لترتيب الألواح المنشقة- المنشقة Split Split -Plot Design باستعمال تصميم القطاعات الكاملة المعشاة (R.C.B.D.) وبثلاثة مكررات، وتم إجراء التحليل الإحصائي للنتائج باستعمال برنامج Genstat مع حساب اقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 0.05 ولكافة مؤشرات الدراسة.

زرعت بذور صنفي الحنطة بواقع 15 بذرة/اصيص ، خفت بعد الانبات الى عشرة نباتات فقط، وأضيفت اسمدة النتروجين، والفسفور، والبوتاسيوم بكمية 100 و 60 و50 ملغم سماد.كغم$^{-1}$ تربة من اسمدة اليوريا وTSP و K_2SO_4 على التوالي ، رويت كافة المعاملات بماء النهر خلال مرحلة الانبات والذي كان ذو توصيل كهربائي 1.2 دسيسيمنز.م$^{-1}$ واس هيدروجيني 7.4 ومحتواه من ايون الصوديوم الذائب 3.7ملي مول.لتر$^{-1}$ والكالسيوم الذائب 1.6ملي مول.لتر$^{-1}$ والمغنيسيوم الذائب 2.4ملي مول.لتر$^{-1}$ والكلوريد الذائب4.3ملي مول.لتر$^{-1}$ ، ثم استمرت عملية الري بالمياه الحاوية على كلوريد الصوديوم ، وحسبت كمية الماء المضافة على اساس السعة الحقلية . رشت محاليل المغذيات المستعملة في مرحلتي الاستطالة والبطان بوساطة المرشة الظهرية عند المساء لتلافي ارتفاع درجات الحرارة.

حصاد النباتات:

بعد انتهاء رش اسمدة المغذيات ومرور سبعة ايام ، حصدت النباتات واخذ الوزن الطري لها باستخدام ميزان حساس ، واخذ 5 غم من الاوراق العلمية الطرية(نصل+غمد) لكل معاملة لغرض تقدير فعالية الانزيمات المضادة للاكسدة ، فيما جفف المتبقي من النباتات في فرن كهربائي على درجة حرارة 65 مئوي لمدة 48 ساعة لحين ثبات الوزن ، ثم اخذ الوزن الجاف لها .

تقدير فعالية الانزيمات المضادة للاكسدة :

لاستخلاص الانزيمات المضادة للاكسدة، تم اخذ 5غم من المادة النباتية الطرية للاوراق العلمية، هرست باستخدام مطحنة كهربائية واضيف لها 5مل من المحلول المنظم فوسفيت بتركيز 50 ملي مولار (رقم هيدروجيني 7.8)، ووضعت في حمام ثلجي، اجري على المستخلص عملية طرد مركزي بجهاز النبذ المركزي بسرعة 15000 جاذبية (g) لمدة 20 دقيقة على درجة 4 مئوي، واستعمل الجزء الرائق لتقدير فعالية الانزيمات.

تقدير فعالية الSOD:

تم تقدير فعالية انزيم الSOD من خلال قياس قابليته لتثبيط اختزال الضوء بمادة ال nitroblue tetrazolium (NBT) حسب طريقة Beyer [10]، وتمت قراءة الامتصاصية بجهاز Spectrophotometer عند طول موجي (560 nm).

بعد استخراج أعلى نسبة تثبيط من منحنى التثبيط القياسي تم حساب فعالية SOD على وفق المعادلة التالية:

$$SOD(inhibitation\%) = \frac{(A_2B - A_1B) - (A_2S - A_1S)}{(A_2B - A_1B)} \times 100$$

حيث إن :

A_1B = قيمة الامتصاصية للBlank قبل الإضاءة.

A_2B = قيمة الامتصاصية للBlank بعد الإضاءة.

A_1S = قيمة الامتصاصية للعينة قبل الإضاءة.

A_2S = قيمة الامتصاصية للعينة بعد الإضاءة.

يمكن تعريف الوحدة الواحدة one unit من SOD وفق هذه الطريقة بأنها كمية العينة أو النموذج التي تسبب نقصاناً في اختزال مادة Nitro blue tetrazolium (NBT) بمقدار 50%.

لذلك يمكن التعبير عن فعالية إنزيم SOD على النحو الآتي :

$$\text{فعالية(SOD)} = U.ml^{-1} = \frac{\%\ \text{تثبيط العينة}}{\%\ \text{أعلى نسبة تثبيط}} \times \frac{2 \times 1000}{V_s(\mu L)}$$

حيث إن :

U = الوحدة Unit.

V_s = حجم العينة.

كما يمكن حساب قيمة الفعالية النوعية specific activity للـSOD كما يلي :

$$\text{الفعالية النوعية} (U.mg^{-1}) = \frac{\text{وحدة من SOD } (U.ml^{-1})}{\text{تركيز البروتين (mg/ml)}}$$

تقدير فعالية الCAT

قدرت فعالية الCAT حسب طريقة Aebi [11] باستخدام جهاز المطياف الضوئي ، حيث تم الاعتماد على مقدار التغير في امتصاصية بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في المحلول المنظم فوسفيت بتركيز 0.05 مولاري (رقم هيدروجيني 7.0) ، وتم قراءة قيمة الامتصاصية بجهاز spectrophotometer عند طول موجي 240 نانومتر لكل دقيقة.

في هذه الطريقة فان فعالية إنزيم Catalase تعرف بأنها غير خطية وتعرف بقيمة K ، وتحسب قيمةK من العلاقة التالية :

$$K/ml = 0.153 \times [\log A_1 / A_2] \times [3.0/0.1]$$
$$= 4.59 \times [\log A_1 / A_2]$$

حيث إن :

A_1 = قيمة الامتصاصية عند الوقت صفر – قيمة الامتصاصية للـ control.

A_2 = قيمة الامتصاصية عند الوقت 15 ثانية – قيمة الامتصاصية للـ control.

ولحساب قيمة الفعاليةالنوعية لإنزيم Catalase بوحدة $K.mg\ protein^{-1}$ استعملت العلاقة التالية:

$K.mg\ protein^{-1} = (K.ml^{-1})/protein\ (mg.ml^{-1})$

وتم تحويل قيم فعالية انزيمات SOD و Catalase الى (وحدة /ملغم بروتين) بعد ان تم تقدير المحتوى البروتيني في مستخلص اوراق النباتات حسب طريقة Lowry و اخرين [12].

تقدير فعالية الPOD

قدرت فعالية الPOD حسب طريقة Muftugil [20] خلط 1مل من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 0.1% مع 0.1 مل من راشح مستخلص الاوراق العلمية مع 1مل من صبغة الGuaicol وتم قراءة قيمة الامتصاص مباشرة في جهاز المطياف الضوئيSpectrophotometer وبطول موجي 420 نانومتر.

حسبت الفعالية لإنزيم POD وفق المعادلة التالية :

$$\text{الفعالية الإنزيمية (وحدة امتصاص.غم نموذج}^{-1}) = \frac{\text{قراءة الجهاز}}{\text{وزن النموذج}} \times \text{الحجم المأخوذ للقراءة}$$

$$\text{حجم الاستخلاص}$$

حساب دليل تحمل الجهد (STI):

تم حساب Stress tolerance (STI) index حسب معادلة Fernandez [14]التالية:

$$STI=(Ypi*Ysi)/Yp^2$$

حيث أن:

STI=دليل تحمل الجهد Stress tolerance index.

Ysi=معاملة الأصناف بوجود الجهد.

Ypi=معاملة الأصناف عند إزالة الجهد.

Yp^2=معدل معاملات الأصناف عند إزالة الجهد.

النتائج والمناقشة :

تأثير مستويات ملوحة كلوريد الصوديوم في مياه الري والتسميد الورقي في فعالية بعض الانزيمات المضادة للاكسدة في أوراق نباتات الحنطة

الفعالية النوعية لانزيم الSOD (وحدة/ملغم بروتين):

توضح نتائج الجدول(2) تأثير مستويات ملوحة كلوريد الصوديوم في مياه الري والتسميد الورقي ببعض العناصر الكبرى والصغرى في الفعالية النوعية لانزيم الـSOD في أوراق نباتات الحنطة ، ومنه يلاحظ ان الفعالية النوعية لانزيم الـSOD المضاد للأكسدة قد زادت معنويا عند مستوى احتمالية 0.05 مع زيادة ملوحة كلوريد الصوديوم في ماء الري وعدم رش الاسمدة (السيطرة)، وبلغت نسبة الزيادة 15.53، 19.95% في حنطة الخبز، و14.00، و 18.70% في الحنطة الخشنة للمستويات 50 و100ملي مول كلوريد الصوديوم على التتابع مقارنة بالمستوى (0ملي مول) .ان هذا يشير الى ان مستوى توليد ال ROS على مستوى الخلية النباتية قد ازداد مع زيادة مستويات الملوحة المعرض لها النبات مما ادى الى تحفيز انزيم الSOD كخط دفاعي اول لمواجهة زيادة الROS .وهذ يتفق مع ما اشار اليه Baby وJini [15] ان تعرض النباتات للاجهاد الملحي يؤدي الى الاجهاد المؤكسد oxidative stress ولمواجهة ذلك فان خلايا النباتات قد طورت اليات مضادة للأكسدة مثل الانزيم SOD والانزيم POD ، كما تدعم هذه النتائج ما توصل اليه عدد من الباحثين مع مجموعة من المحاصيل ان تعرض النبات للإجهاد الملحي يسهم في زيادة فعالية انزيمات مضادات الأكسدة [16 ,17] .

ويلاحظ من الجدول(2) ان رش النباتات باسمدة الكالسيوم والبوتاسيوم كان له تأثير واضح في خفض فعالية الانزيم النوعية في اوراق صنفي الحنطة مقارنة مع معاملة السيطرة (بدون رش) عند كافة مستويات الملوحة.

نفس الاتجاه حدث في تقليل النشاط الأنزيمي عند رش نباتات كلا الصنفين بمعاملة المغذيات الصغرى الحديد والزنك والمنغنيز ، الا ان رش كلا الصنفين باسمدة الكالسيوم والبوتاسيوم والحديد والزنك والمنغنيز وخصوصا عند المستويين 50 و 100 ملي مول .لتر$^{-1}$ حيث انخفضت الفعالية

النوعية لانزيم الـSOD معنويا عند مستوى احتمالية 0.05 من 39.285 و 37.095 الى 35.860 و 33.615 وايضا من 41.450 و 39.195 الى 37.745 و 35.620 وحدة . ملغم بروتين$^{-1}$ ولصنفي حنطة الخبز والحنطة الخشنة على التوالي . ان هذه النتائج تشير الى ان انزيم الSOD المضاد للأكسدة قد سلك هذا السلوك بسبب ان رش الصنفين بمغذيات K+Ca قد اسهم في تقليل امتصاص الصوديوم من محلول التربة مما زاد من نسب K/Na و Ca/Na في اوراق النباتات وهذا بدوره قلل من مستويات الROS في الخلايا النباتية وبالتالي انخفض نشاط الأنزيم ، كما ان مجموعة المغذيات الصغرى(Mn, Zn, Fe) والتي استخدمت في رش كلا الصنفين قد كونت أشكال مختلفة من مناظرات انزيم الSOD اذ تدخل هذه المغذيات في تكوين الانزيم ومنها Zn/Cu-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD ، لذا فأن رش هذه المغذيات قد اسهم في تقليل الاجهاد الملحي مما انعكس ذلك على انخفاض فعاية الانزيم ، وهذا يؤكد نتائج Cui و Zhao [18] مع نباتات الذرة ونتائج Manal واخرون [7] مع نباتات الحنطة.

جدول (2). تأثيرالتسميد الورقي على الفعالية النوعية لانزيم الـSOD (وحدة /ملغم بروتين) في اوراق صنفي الحنطة المعرضة لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم

معاملات الأسمدة	0mmol NaCl		50 mmol NaCl		100mmol NaCl	
	Bread	Durum	Bread	Durum	Bread	Durum
المقارنة	33.180	31.860	39.285	37.095	41.450	39.195
(K+Ca) ions	31.555	29.670	35.360	33.140	36.550	34.100
(Fe+ Zn + Mn) ions	30.900	29.505	35.120	32.725	34.920	32.645
(K+Ca) + (Fe+ Zn +Mn) ions	31.800	30.145	35.860	33.615	37.745	35.620

أقل فرق معنوي على مستوى احتمالية 0.05 = 0.897

فعالية انزيم الPOD (وحدة/غم نموذج)

تبين نتائج الجدول(3) تأثير مستويات ملوحة كلوريد الصوديوم في مياه الري والتسميد الورقي ببعض العناصر الكبرى والصغرى في فعالية انزيم الPOD في أوراق نباتات الحنطة ، اذ يلاحظ هناك زيادة معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 في فعالية انزيم الPOD مع زيادة ملوحة كلوريد الصوديوم في ماء الري وعدم رش الاسمدة وهو مشابه لسلوكية انزيم الSOD ، الا ان فعالية انزيم الPOD لم تختلف كثيرا مابين الصنفين مقارنة لما هو عليه مع نشاط وفعالية انزيم الSOD . ان هذه النتائج تقترح ان انزيم الPOD قد اسهم في تقليل مستويات الجذور الاوكسجينية الفعالة ROS المتولدة مع الجهد الملحي وخصوصا تقليل تراكيز ال H_2O_2 وتحويلها الى H_2O وذلك كوسيلة للتخلص من الاجهاد الاكسدي الذي تسببه مكونات الـROS ، وهذا يتفق مع ما اشارت اليه عدد من الدراسات من حصول زيادة في فعالية الانزيمات المضادة للاكسدة عند تعرضها للاجهادات الملحية كاحد الميكانيكيات البايوكيميائية لمقاومة الاجهادات البيئية [3 ,19 ,20] كما يعني ذلك امتلاك صنفي الحنطة قيد الدراسة انظمة كفوءة لازالة scavenges جذور الانواع الاوكسجينية الحرة ROS [21] .

ويلاحظ من الجدول ان رش اسمدة بعض المغذيات الكبرى والصغرى قد ادى الى خفض فعالية انزيمات الSOD و الPOD في اوراق صنفي الحنطة مقارنة مع معاملة السيطرة (بدون رش) عند كافة مستويات الملوحة، وهذا يفسر على ان رش اسمدة بعض العناصر الكبرى والصغرى قد ادى الى تحسين الاجهاد الملحي الناشيء عن وجود مستويات مختلفة من كلوريد الصوديوم في مياه الري مما انعكس على خفض فعالية هذه الانزيمات خصوصا ان عناصر Fe و Zn و Mn تدخل في تركيب هذه الانزيمات [23, 22, 7].

جدول(3) تأثيرالتسميد الورقي على فعالية انزيم الPOD (وحدة /غم نموذج) في اوراق صنفي الحنطة المعرضة لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم

معاملات الأسمدة	0mmol NaCl		50 mmol NaCl		100mmol NaCl	
	Bread	Durum	Bread	Durum	Bread	Durum
المقارنة	32.44	31.65	38.22	36.26	41.91	40.64
(K+Ca) ions	31.61	30.58	34.66	32.39	35.53	34.61
(Fe+ Zn + Mn) ions	31.36	30.37	34.33	32.25	34.93	33.55
(K+Ca) + (Fe+ Zn +Mn) ions	31.85	30.82	35.17	33.16	37.57	36.95

أقل فرق معنوي على مستوى احتمالية 0.05 = 1.47

الفعالية النوعية لانزيم الـCAT (وحدة/ملغم بروتين)

توضح نتائج الجدول(4) تأثير مستويات ملوحة كلوريد الصوديوم في مياه الري والتسميد الورقي ببعض العناصر الكبرى والصغرى في فعالية انزيم الCAT في أوراق نباتات الحنطة ، ويلاحظ من النتائج ان انزيم الCAT اظهر سلوكا مغايرا لانزيمات الSOD و الPOD في اوراق نباتات الحنطة عند تعرضها للاجهاد الملحي الناشيء عن وجود كلوريد الصوديوم في مياه الري ، اذ يلاحظ انخفاض الفعالية النوعية لأنزيم الـCAT من45.720 و43.550 الى32.885 و30.735 وحدة.ملغم بروتين$^{-1}$ عند المستوى 50 ملي مول .لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم والى 29.125 و27.220 عند المستوى 100 ملي مول .لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم ولصنفي حنطة الخبز تموز3 والحنطة الخشنة دور85 على التوالي. ان نتائج هذه الدراسة تتفق مع دراسة Esfandiari واخرون [24] الذي اوضح ان انزيم الCAT قد تنخفض فعاليته مع زيادة الاجهاد الملحي.

ويلاحظ من الجدول(4) ان رش اسمدة بعض المغذيات الكبرى والصغرى قد ادى الى زيادة معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 لفعالية الانزيم النوعية في اوراق صنفي الحنطة مقارنة مع معاملة السيطرة (بدون رش) عند كافة مستويات الملوحة ، وسجلت المعاملة (K+ Ca+ Fe+ Zn+ Mn) اعلى فعالية لأنزيم الCAT مقارنة بالمعاملة (K +Ca) او المعاملة(Fe+ Zn+ Mn) او معاملة السيطرة (بدون رش مغذيات)، هذا يفسر ان تراكيز المغذيات K, Ca, Fe, Zn, Mn في نباتات الحنطة عند معاملة السيطرة لم تكن كافية الى الحد الذي يزيد من فعالية الانزيم لمواجهة الاجهاد الملحي الا ان العكس حدث عند معاملات التسميد الورقي اذ زادت فعالية الانزيم وعند كافة مستويات الاجهاد الملحي ولكلا الصنفين مع تفوق معنوي واضح للمعاملة(K+ Ca+ Fe+ Zn+ Mn). ان هذه النتائج تشير الى ان المغذيات قد زادت من نشاط انزيم CAT في مواجهة وازالة scavenging الROS المتولدة مع زيادة الاجهاد الملحي ، وتعد مجموعة انزيمات الCatalases من نوع Heam-containing tetrameric التي تسهم في ازالة البيروكسيد H_2O_2 احد مكونات الROS [25] . كما ان هذا الانزيم يلعب دور بالغ الاهمية في ازالة scavenge الـH_2O_2 [26] .

جدول (4). تأثيرالتسميد الورقي على الفعالية النوعية لأنزيم الـCAT (وحدة /ملغم بروتين) في اوراق صنفي الحنطة المعرضة لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم

معاملات الأسمدة	0mmol NaCl		50 mmol NaCl		100mmol NaCL	
	Bread	Durum	Bread	Durum	Bread	Durum
المقارنة	45.720	43.550	32.885	30.735	29.125	27.220
(K+Ca) ions	48.170	45.760	38.525	35.630	35.465	32.450
(Fe+ Zn + Mn) ions	46.465	44.825	35.445	32.650	32.180	29.920
(K+Ca) + (Fe+ Zn +Mn) ions	50.390	46.545	41.830	38.270	36.515	33.760

أقل فرق معنوي على مستوى احتمالية 0.05 = 1.198

دليل تحمل الجهد Stress tolerance index (STI):

يبين الجدول (5) قيم دليل تحمل الجهد والمحسوب على اساس نشاط انزيمات مضادات الاكسدة (CAT and POD and SOD)، ان أهم مؤشر في نتائج هذه التجربة ان قيم الSTI لكل من POD and SOD قد انخفض وفي كلا الصنفين وعند كلا المستويين من الإجهاد الملحي وفي كل معاملة من معاملات التسميد الورقي مقارنة بمعاملة السيطرة ، وان اعلى معاملة انخفاض سجلت 16.7% عند معاملة التسميد الورقي (Fe + Zn + Mn) وللمستويين 50 و100 ملي مول كلوريد الصوديوم على التوالي. نفس الاتجاه من النتائج ظهر مع الSTI- POD كما في جدول(5).

ان ذلك يعطي مؤشرا ان الانخفاض في الSTI- SOD و الSTI- POD قد يعزى الى الدور البالغ الأهمية لآيونات الكالسيوم والبوتاسيوم ومجموعة المغذيات الصغرى Fe و Zn وMn في تقليل حالة الاجهاد المؤكسد التي يتعرض لها النبات بحيث انخفضت فعالية ونشاط هذين الانزيمين كانعكاس لتخفيف حالة الجهد الملحي. ان الاجهاد المؤكسد الناتج عن تعرض النبات للاجهاد الملحي قد يعمل على تحفيز انزيم الSOD في تحويل الاوكسجين المؤكسد القوي O_2 الى ماء واوكسجين ، ان زيادة الH_2O_2 يتطلب قيام الانزيمينCAT and POD في تحويل الـ H_2O_2الى ماء وأوكسجين وذلك للتخلص من الـ H_2O_2 في الخلية. إن التسميد الورقي مع K + Ca ومع بعض العناصر الصغرى بصورة منفردة أو مجتمعة قد أسهم وبشكل كبير في تقليل الأثر الضار للملوحة [7 ,22 ,23] .

ان سلوك STI-CAT كان مغايراً لسلوك دليل تحمل الجهد لأنزيمي STI- PODand STI- SOD، حيث نلاحظ زيادة الـSTI-CAT مع كل معاملة من معاملات التسميد الورقي مقارنة بمعاملة السيطرة. لقد ازدادت قيم الـ STI عند 50mM NaCl بنسبة بلغت (18.9% ,8.7% ,27.7) وبنسبة بلغت (21.9% ,10.9% ,27.5) عند 100Mm NaCl لمعاملات التسميد الورقي (K+Ca) و (Fe+Zn+Mn) و(Fe+Zn+Mn+K+Ca) لحنطة الخبز على التوالي. نفس الاتجاه من النتائج ظهر مع صنف الحنطة الخشنة، ومن الجدير بالذكر ان اعلى نسبة زيادة مع الـ STI-CAT تحققت مع معاملة التسميد الورقي(Fe+Zn+Mn+ K+Ca). نستنتج من الدراسة ان صنفي الحنطة قيد الدراسة كانت ذات نظام دفاعي كفوء ضد الاجهاد الاكسدي المتسبب عن الاجهاد الملحي خصوصا انزيمي SOD و POD بينما لم يكن انزيم CAT بمستوى الكفاية تحت الاجهاد الملحي وكان ذلك واضحا من حيث زيادة نشاط هذا الانزيم تحت التسميد الورقي ولذا يفضل دراسة النشاط الانزيمي لمضادات الاكسدة والنشاط الغير انزيمي لنباتات مختلفة وفي مراحل مختلفة وتحت مستويات مختلفة من التسميد والاجهاد الملحي وفترات زمنية مختلفة لأن هذه العوامل هي التي تحدد قدرة تحمل النباتات للاجهادات غير الحيوي.

جدول(5). قيم دليل تحمل الجهد لNaCl والمحسوب على اساس نشاط انزيمات مضادات الأكسدة (CAT and POD and SOD).

STI-CAT*10²		STI-POD*10²		STI-SOD*10²		أصناف الحنطة	معاملات التسميد
100mM NaCl	50mM NaCl	100mM NaCl	50mM NaCl	100mM NaCl	50mM NaCl		
58.6	66.1	134.3	122.5	127.1	128.1	Bread	F_0
58.2	65.6	127.0	113.3	136.0	128.9	Durum	
75.1	81.6	110.9	108.2	113.4	109.9	Bread	F_1
72.9	79.8	104.3	97.7	110.3	107.2	Durum	
65.8	72.4	108.2	106.3	105.9	106.6	Bread	F_2
65.7	71.7	100.6	96.7	103.3	103.7	Durum	
80.9	92.7	118.2	110.6	118.1	112.2	Bread	F_3
77.0	87.3	112.5	100.9	117.1	116.4	Durum	

F_0: المقارنة، F_1= (K+Ca) ؛ F_2= (Fe+ Zn + Mn) ؛
F_3= (K+Ca) +(Fe+ Zn +Mn)

المصادر:

1. Marschner H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd ed., Academic Press, San Diego, USA.
2. Tester M. and R. Davenport, 2003. Na+ tolerance and Na+ transport in higher plants, Ann. Bot. 91(3): 503–507.
3. Garrat, L. C., Janagoundar,B. S.,Lowe K. C.,Anthony P.,Power J. B.,and Davey M. R., 2002. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. Free Radicle Biol. and Medicine, 33(3):502-511.
4. Levitt, J. 1980. Responses of plant to environmental stresses., Academic Press. New York. pp. 36-49.
5. Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses, in Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Am. Soc. of Plant Phys., pp. 1158–1203.
6. El-Fouly, M.M., Zeinab M.M. and Zeinab A.S. 2001. Micronutrient sprays as a tool to increase tolerance of faba bean and wheat plants to salinity, In: Plant nutrition-Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research. Eds. Horst. W. J. et al., pp: 422-423.
7. Manal, F. Mahmed; A. T. Thalooth; R. Kh. Khalifa M.. 2010. Effect of foliar spraying with uniconazole and micronutrients on yield and nutrients uptake of wheat plants grown under saline condition. J. Amer. Sci., 6(8):398-404.
8. Black, C. A. 1965. Methods of Soil Analysis, Part 2. Amer. Soc. Agric. Inc. Pub., Madison, Wis. USA. pp: 122-126
9. Page, A. L. (ed), R. H. Miller and D. R. Keeney, 1982. Methods of soil

analysis part 2 : chemical and micro biological properties. Argon. Series no. 9 Amer. Soc. Agron. Soil sic. Soc. Am. Inc. Madison USA. pp: 212-223

10. Beyer WF, Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity, some large consequences of minor changes in conditions. Anal Biochem 161(5): 559-566.
11. Aebi, H., 1983. Catalase. In: Bergmeyer (ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 3, pp: 273–277. Verlag Chemie, Weinheim, Germany
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Fare AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193(2): 265-270
13. Muftugil, N. 1985. The peroxidase enzyme activity of some vegetable and its resistance to heat. Food Agric. 36(4):877-880.
14. Fernandez, G.C.J. 1992 . Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In: Proceeding of the international symposium on Adaptation of vegetables and other Food crop in Temperature and water stress. Taiwan, PP: 257-270 .
15. Baby, J. and D. Jini . 2011. Development of salt stress-tolerant plants by gene manipupulation of antioxidant enzymes. Asian J. of Agric. Res. 5(1): 17-27 .
16. Heidari, M.,2009. Antioxidant activity and osmolyte concentration of sorghum(Sorghum bicolor) and wheat(Triticum aestivum) genotypes under salinity stress.Asian J.Plant Sci., 8(2): 240-244.
17. Sairam, R.K.; Rao K.V.; Srivastava G.C..2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress ,antioxidant activity, and osmolyte concentration . Plant Sci.163(6):1037-1047.
18. Cui,Y. and Zhao N. 2011. Oxidative stress and change in plant metabolism of Maize (Zea mays L.) growing in contaminated soil with elemental sulfur and toxic effect of zinc.8(4):112- 123.
19. Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M. 2002. Salt stress induces up regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt tolerant wild tomato species Lycopersicon pennellii but not in the cultivated species. Phys. Plantarum J., 115(2): 393–400.
20. Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M. 2003. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species Lycopersicon pennellii. Plant Cell Environ 26(4): 845-856.
21. Foyer, C. H., Desco Urvieres, P. and Kunert, K. J. 1994. Protection against oxygen radicals; an important defense mechanism studied in transgenic plants. Cell Environment, 17(3) :507-523.
22. Cakmak, I., 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects in plants. J. Plant Nutr. 168(3): 521-530.
23. Moran JF, James EK, Rubio MC, Sarath G, Klucas RV, Becana M.2003. Functional characterization and expression of a cytosolic iron superoxide dismutase from Cowpea

root nodules. Plant Physiol.133(4): 773-782.

24. Esfandiari Ezatollah, Fariborz Shekari, Farid Shekari, Manouchehr Esfandiari. 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, 35(1): 48-56.

25. Willekens, S.H.,Irnze D.,van Montagh M.,van campw .,(1995). Catalase in plants. Mol. Breed .1(1):207-218 .

26. Moriwaki, T.; Y. Yamato; T. Aida; T. Funahashi, T. Shishido; and M. Asada. 2008. Overexpression of the Escherichia coli catalase gene , KatE, enhances tolerance to salinity stress in the transgenic Indica rice cultivar, BR5. Plant Biotechnol. Rep., 1(1): 49-55.

Induction of antioxidant enzymes in wheat (*Triticum spp*.) grown under salt stress

Ismail K. Al-Samerria* ***Saadi M. Al-Ghrairi*****
Hamad Allah S. Rahi*

* Soil and water resources dept. , college of agriculture, University of Baghdad
** Soil and water resources cent., Agric. Research Office, Minst. Of Science and Technology, Baghdad- Iraq .

Abstract:

A pot culture experiment was conducted at the greenhouse of soil and water resources department in College of Agriculture, University of Baghdad in Abo-Ghraib at season 2009-2010 to investigate the effects of using foliar application of some macro and micronutrients in induce antioxidant enzymes in wheat grown under salt stress . Doar85 planted under three levels of salt stress, and three combinations of foliar application were used from nutrients (K+ Ca) at 3000 and 1500 $mg.L^{-1}$ respectively, and (Fe + Zn + Mn) at 30, 20, and 10 $mg.L^{-1}$ respectively , and (K+ Ca) + (Fe+ Zn + Mn).

The results showed that increasing levels of sodium chloride in the irrigation of water significantly increased at $p<0.05$ level SOD and POD activity ,while CAT activity was decreased in leaves of wheat, and dry matter yield of wheat plants. The results obtained showed that there was significant differences at $p<0.05$ level between wheat cultivars in their responses to salt stress.

Also the results showed that application of foliar fertilizers led to significant decrease at $p<0.05$ level in SOD and CAT activity in leaves in all levels of sodium chloride compare with control, while CAT activity was increased. Results revealed that combination of (K+ Ca) + (Fe+ Zn + Mn) was significantly superior to other treatments for all Parameters, when irrigated with saline water of 50 and 100 mM NaCl . L^{-1} compared with no foliar fertilizers . That is clearly show the importance of foliar application in justification and induction of antioxidant enzymes and alleviation of the adverse effect of salt stress on growth of wheat .