بررسی اثر تنش کم آبی بر نحوه فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در مراحل رشد زایشی گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.)

زهره امینی[۱*]، رحیم حداد[۱] و فواد مرادی[۲]

(تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۴/۱)

چکیده

در این پژوهش جهت بررسی اثر تنش کم آبی بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده، اثر تیمارهای آبی، دیم و خشکی بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX)، در مراحل مختلف رشد زایشی گیاه جو در شرایط مزرعه بررسی گردید. هم‌چنین سه شاخص پیری شامل کاهش میزان کلروفیل، پروتئین محلول کل و پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم رابیسکو نیز اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که با افزایش سن گیاه و هم‌چنین در اثر تنش کم آبی میزان نسبی آب برگ پرچم (RWC)، کلروفیل، پروتئین محلول کل و پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم رابیسکو کاهش پیدا کرد. با افزایش سن گیاه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هر سه تیمار و فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز در گیاهان آبی (شاهد) کاهش یافتند. فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان آبی (شاهد) با پیشرفت پیری تغییر معنی‌داری نشان نداد، در صورتی که در تیمارهای دیم و خشکی به تدریج کاهش پیدا کرد. فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش سن گیاه در هر سه تیمار افزایش یافت. تنش کم آبی در تیمارهای دیم و خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده گردید. در این بررسی مشخص گردید که از بین آنزیم‌های مورد بررسی، آنزیم پراکسیداز می‌تواند به عنوان مهم‌ترین آنزیم جهت افزایش مقاومت گیاه جو در مقابل تنش اکسنده ناشی از مراحل پیری و تنش خشکی فعالیت نماید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های ضد اکسنده، تنش خشکی، جو، دیم، مراحل رشد

مقدمه

در موجودات زنده با افزایش سن، فعالیت‌های فیزیولوژیکی موجود کاهش می‌یابد. بدین ترتیب پایداری و ثبات موجود زنده از میان رفته و حساسیت آن به شرایط نامساعد و مرگ افزایش می‌یابد. چگونگی روند کاهش فعالیت‌های فیزیولوژیکی در بین گونه‌های مختلف موجودات زنده و هم‌چنین افراد یک گونه با هم تفاوت دارد (۱۵). در گیاهان، اولین نشانه قابل مشاهده پیری، زرد شدن برگ و در نهایت خشک شدن و ریزش آن می‌باشد (۵). مرحله پیری به دلیل تغییر طول دوره رشد گیاه، یکی از عوامل تعیین کننده عملکرد در

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد بیولوژی مولکولی گیاهی، دانشگاه بین المللی امام خمینی، قزوین

۲. استادیار فیزیولوژی گیاهی، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Zohamini@gmail.com

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]

گیاهان می‌باشد(۹). از سال‌ها پیش تنش اکسنده به عنوان یکی از عوامل مؤثر در آغاز پیری شناخته شده است. طبق این نظریه، دلیل اصلی کاهش توانایی سیستم‌های بیولوژیکی در زمان پیری، افزایش تخریب ماکرو مولکول‌ها به وسیله رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌باشد (۱۵). در اثر شرایط نامساعد محیطی نیز تشکیل انواع اکسیژن فعال(Reactive oxygen species (ROS) افزایش می‌یابد. خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که باعث کاهش رشد گیاهان و در نتیجه عملکرد آنها می‌شود (۲۱). گیاهان جهت مقابله با تنش اکسنده ناشی از رادیکال‌های فعال اکسیژن دارای مکانیزم‌های ضد اکسنده آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند. ضد اکسنده‌های غیرآنزیمی شامل گلوتاتیون و اسید آسکوربیک و ضد اکسنده‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1)، کاتالاز (CAT,EC 1.11.1.6)، آسکوربیت پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR, EC 1.6.4.2) و پراکسیداز (POX, EC 1.11.1.7) می‌باشد (۱۲). در حال حاضر مطالعات وسیعی روی سیستم‌های دفاع ضد اکسنده در زمان پیری و شرایط نامساعد محیطی صورت گرفته است. اما نتایج به دست آمده متفاوت می‌باشد. در حالی که فعالیت تعدادی از ضد اکسنده‌ها در بعضی از گونه‌ها کاهش می‌یابد، فعالیت همان ضد اکسنده‌ها در گونه‌های دیگر افزایش یافته و یا بدون تغییر باقی می‌ماند. هوجز و فورنی (۱۱) و اوه و همکاران (۱۸) گزارش کردند در زمان پیری فعالیت آنزیم‌های اکسنده شامل سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربیت پراکسیداز و کاتالاز در برگ‌های اسفناج و تنباکو کاهش پیدا می‌کند، در صورتی که یی و همکاران (۲۵) گزارش کردند که در برگ‌های آرابیدوپسیس بعد از گل‌دهی فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز تا پنج برابر افزایش پیدا می‌کند. شارما و دوبی (۲۱) گزارش کردند فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و آسکوربیت پراکسیداز با افزایش شدت تنش خشکی افزایش پیدا می‌کند، در صورتی که یانگ و همکاران (۲۶) نشان دادند که با افزایش شدت خشکی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد این اختلاف ناشی از نوع گونه گیاهی، مرحله رشد و نمو بافت گیاهی و شرایط محیطی می‌باشد (۶). از این رو با توجه به اهمیت نقش آنزیم‌های ضد اکسنده در محافظت سلول‌های گیاهی در مقابل تنش اکسنده ناشی از شرایط نامساعد محیطی و دوران پیری، نحوه فعالیت گروهی از این آنزیم‌ها در مراحل رشد زایشی گیاه جو در شرایط آبی، دیم و خشکی در مزرعه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

بذر چهار ژنوتیپ جو (*Hordeum vulgare* L.) به نام‌های Q13، Q15، Q20 و Q22 بر مبنای عملکرد آنها در شرایط دیم (به ترتیب ۱۳۹۰، ۹۲۱، ۱۵۸۲ و ۱۸۷۰ کیلوگرم در هکتار) از خزانه ژنتیکی موجود در گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین انتخاب گردید. بذرها با تراکم ۲۵ بوته در متر مربع در تاریخ ۱۲ آبان ماه ۱۳۸۴ در مزرعه کاشته شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل ۴ × ۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل پراکندگی مورد مطالعه در این تحقیق عبارت از الف: سه نوع تیمار (آبی، دیم و خشکی،T) و ب: چهار مرحله رشد گیاه (شروع باروری، پر شدن دانه، شیری شدن ثانویه و خمیری نرم، GS) بودند. از زمان کاشت تا اول اردیبهشت ۱۳۸۵ گیاهان در شرایط طبیعی مزرعه قرار داشتند و فقط آب باران را دریافت می کردند. از این تاریخ به بعد (۲۰۰ روز بعد از کاشت) روی گیاهانی که باید تحت تنش خشکی قرار می گرفتند، پوشش پلاستیکی قرار داده شد تا از رسیدن آب باران به آنها جلوگیری شود. برای تیمار دیم آبیاری انجام نشد و میزان آب دریافتی گیاه به نزولات آسمانی محدود شد. گیاهانی که تحت تیمار آبی قرار گرفتند (گیاهان شاهد)، در طول دوره آزمایش هفته‌ای یک بار آبیاری شدند. نمونه‌برداری‌ها در زمان ۲۱۵، ۲۲۹، ۲۳۶ و ۲۴۱ روز بعد از کاشت و براساس روش دهدهی یا زادوکس به ترتیب در مراحل شروع باروری(۱- این اعداد نشان دهنده مراحل رشد و نمو غلات بر اساس روش

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]

دهدهی یا دو صفر تا صد (زادوکس) می‌باشد.) (۶۰-۶۱)، پر شدن دانه (۷۱-۷۲)، شیری شدن ثانویه (۷۵-۷۶) و خمیری نرم (۸۵) و ۲۴ ساعت پس از آبیاری گیاهان آبی (شاهد) از مجموعه برگ‌های ساقه اصلی هر بوته صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله بعد از قرار دادن در ورقه‌های آلومینیمی، توسط نیتروژن مایع منجمد گردیده و تا زمان آزمایش در دمای $-80^{\circ}C$ نگه‌داری شدند. در این آزمایش جهت اطمینان از درستی مراحل رشد گیاه و مرتبط کردن نتایج این تحقیق با نتایج گزارش شده به وسیله سایر محققین در این زمینه، تغییرات در میزان نسبی آب برگ پرچم، کلروفیل و پروتئین محلول کل در طول دوره آزمایش اندازه‌گیری گردید. به منظور محاسبه میزان نسبی آب برگ پرچم(Leaf relative water content (RWC)) از روش مون- بوش و پنولاس (۱۶) استفاده شد. جهت استخراج پروتئین محلول کل(Total soluble protein) یک گرم بافت برگ در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP) و ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) و سدیم متا بی‌سولفات یک میلی‌مولار) له شدند. جهت عصاره‌گیری نمونه حاصل به لوله‌های سانتریفیوژ انتقال داده شده و در rpm ۱۵۰۰۰ و دمای $+4^{\circ}C$ به مدت ۲۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ رومیزی (Beckman مدل Allegra – 64R) سانتریفیوژ شدند. همه مراحل تهیه عصاره آنزیمی در دمای $+4^{\circ}C$ صورت گرفت. میزان پروتئین محلول کل به روش بردفورد (۴) اندازه‌گیری شد. جهت تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی(Bovin serum albumin (BSA)) استفاده گردید. میزان کلروفیل به روش آرنون (۲) و با استفاده از فرمول $C_t = 20/2 \times A_{645} + 8/02 \times A_{663}$ (Ct میزان کلروفیل بر حسب میکروگرم در میلی لیتر، A645 و A663 میزان جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر) محاسبه گردید. فعالیت آنزیم‌ها به روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر Labomed مدل UV-3200) در دمای آزمایشگاه (۲±۲۵) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(۱، ۱، ۱۵، ۱ SOD, EC) از طریق اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید (NBT) به روش دهیندسا و همکاران (۷) اندازه‌گیری شد. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار(pH ۷/۸) ، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیترو بلو تترازولیوم کلراید ۷۵ میکرومولار، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۱ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۳۶۰ ماکرومولار و ۳۰ ماکرولیتر عصاره خام بود. پس از آن که مخلوط به هم زده شد، سل‌های اسپکتروفتومتر به مدت ۱۰ دقیقه در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵w به فاصله ۳۵ سانتی‌متر قرار داده شد. با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند تا۵۰% مانع از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید گردد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC ۱۱,۱,۱۱,۱) به روش ناکانو و اسدا (۱۷) اندازه‌گیری گردید. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (pH ۷/۸)، آسکوربات ۱۰ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۱۰میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی mM-1cm-1 ۲/۸ تعیین گردید. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (۶. ۱. ۱۱. ۱ CAT, EC) از روش بیرز و سیزر (۳) استفاده شد. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (pH ۷/۸) ، پراکسید هیدروژن یک مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه شدن H_2O_2 در طول موج ۲۴۰نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی mM-1cm-1 ۳۹/۴ تعیین گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز (۷. ۱. ۱۱. ۱ POX, EC) به روش همدا و کلین (۱۰) صورت گرفت. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم۵۰ میلی‌مولار (pH ۶/۶) ، گایاکول ۱% و پراکسید

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]

هیدروژن۳ /۰% و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی 1-mM-1cm ۲۶/۶ تعیین گردید. فعالیت ویژه آنزیم‌های آسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز بصورت تعداد ماکرومول H_2O_2 تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد. جهت بررسی تغییرات مقدار پروتئین زیرواحد بزرگ آنزیم رابیسکو (rbcl) در طول دوره آزمایش از روش SDS-PAGE استفاده شد. به منظور آماده سازی نمونه‌های پروتئینی ۵ میکرولیتر از عصاره خام با ۱ میکرولیتر بافر SDS×۳ (شامل تریس هیدروکلراید ۱۸۷/۵ میلی مولار (pH=۶/۸)، سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۶%، گلیسرول ۳۰% و برموفنل بلو ۰/۰۳%) و ۰/۵ میکرولیتر بافر DTT ×۳۰ (دی‌تیوتریتول ۴۰ میلی‌مولار) مخلوط کرده و به مدت پنج دقیقه در آب جوش (با دمای C ^{o} ۹۵) قرار داده شدند. بعد از آن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند. سپس ۵ میکرولیتر از مایع سطحی در چاهک ژل SDS – پلی اکریل آمید به روش لیملی (۱۴) تزریق گردید. با استفاده از نرم افزار LabWorks 4.0 ژل‌های SDS-PAGE تجزیه شده و وزن مولکولی نوارها مشخص گردید. نواری که وزن مولکولی آن KD ۲/۱۲۴ ± ۵۵ بود، به عنوان نوار پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم رابیسکو (rbcl) در نظر گرفته شد. تعیین نوار پروتئینی با وزن مولکولی KD ۵۵ به عنوان نوار پروتئین زیرواحد بزرگ آنزیم رابیسکو به وسیله دیگران نیز گزارش شده است (۲۴). بررسی داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS 11.5 (Chicago, Il, USA) انجام گرفته و میانگین‌ها به وسیله آزمون توکی در سطح احتمال ۱% با یکدیگر مقایسه شدند. در این پژوهش از چهار ژنوتیپ جو استفاده گردید، اما با توجه به این که رفتار چهار ژنوتیپ در واکنش به تنش کم آبی و در دوران پیری مشابه بود، جهت بررسی نحوه رفتار گیاه جو به تنش کم آبی در مراحل مختلف رشد زایشی از عدد میانگین ژنوتیپ‌ها استفاده گردید.

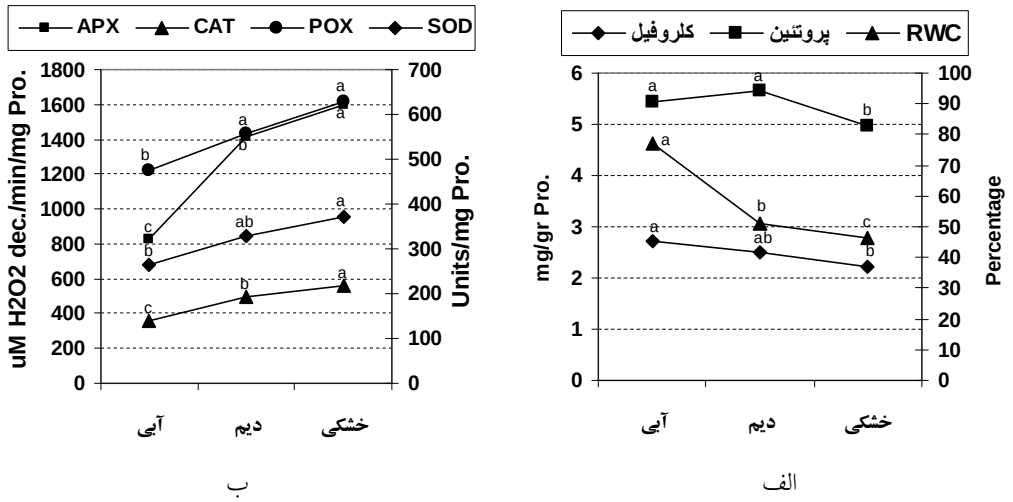
نتایج و بحث

میزان نسبی آب برگ پرچم با افزایش شدت تنش خشکی کاهش پیدا کرد به نحوی که بین سه تیمار تفاوت معنی‌داری (۱%) مشاهده گردید (شکل ۱- الف). میزان کلروفیل نیز در تیمار خشکی نسبت به تیمار آبی (شاهد) کاهش معنی‌داری (۱%) نشان داد. بین تیمار دیم با تیمارهای آبی و خشکی تفاوت معنی‌داری دیده نشد. از نظر میزان پروتئین محلول کل بین تیمارهای آبی و دیم تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. ولی با افزایش شدت تنش کم آبی میزان پروتئین محلول کل در تیمار خشکی به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. میزان پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم رابیسکو در تیمار دیم از تیمارهای آبی و خشکی بیشتر بود (شکل ۲). اما با توجه به تجزیه و تحلیل آماری میزان پروتئین محلول کل به نظر می رسد تفاوت بین تیمارهای آبی و دیم از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار خشکی نسبت به تیمار آبی افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۱ - ب). اما اختلاف معنی‌داری بین تیمار دیم با تیمارهای آبی و خشکی دیده نشد. فعالیت ویژه آنزیم‌های آسکوربیت پراکسیداز و کاتالاز بین سه تیمار تفاوت معنی‌داری نشان داد و تیمارها در گروه‌های آماری متفاوتی قرار گرفتند. بیشترین فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در تیمار خشکی مشاهده گردید. تنش کم آبی باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز گردید، به نحوی که بین تیمارهای دیم و خشکی با تیمار آبی تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید.

میزان نسبی آب برگ پرچم، کلروفیل با افزایش سن گیاه در هر سه تیمار در سطح معنی‌داری ۱% کاهش نشان داد (شکل ۳). کاهش کلروفیل در اثر پیری یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تشخیص پیری در گیاهان می‌باشد(۱۳). میزان پروتئین محلول کل نیز در تیمارهای آبی، دیم و خشکی در طول دوره آزمایش با افزایش سن برگ به تدریج کاهش پیدا کرد. به طور کلی در گیاهان مونوکارپیک، رشد و نمو دانه، پیری گیاه و به ویژه پیری برگ را کنترل می‌کند. به نحوی که حذف دانه در حال رشد،

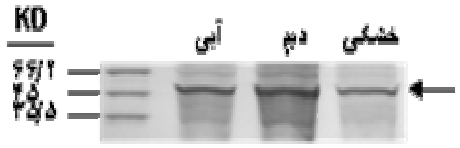
[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]

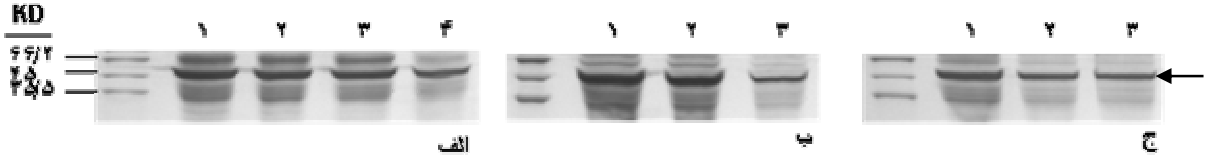


ب الف

شکل۱. اثر تیمارهای آبی، دیم و خشکی بر الف): میزان نسبی آب برگ پرچم (RWC) (برحسب درصد)، میزان کلروفیل و پروتئین محلول کل (برحسب میلی‌گرم در یک گرم بافت برگ، ب): فعالیت ویژه آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (برحسب تعداد واحدهای فعالیت SOD در یک میلی‌گرم پروتئین)، آسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) (برحسب میکرومول H_2O_2 تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین).



شکل۲. اثر تیمارهای آبی، دیم و خشکی بر پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم رابیسکو (rbcl) که با پیکان نشان داده شده است. از ژل متراکم کننده ۴/۵% و ژل جدا کننده ۱۲/۵% استفاده گردیده و در هر چاهک ۵ میکرولیتر عصاره خام تزریق شد.



شکل۳. تغییرات پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم رابیسکو در تیمارهای آبی (الف)، دیم (ب) و خشکی (ج) طی مراحل مختلف رشد. اعداد یک تا چهار به ترتیب نشان دهنده مراحل مختلف رشد شامل شروع باروری (مرحله ۱)، پر شدن دانه (مرحله ۲)، شیری شدن ثانویه (مرحله ۳) و خمیری نرم (مرحله ۴) می‌باشند. برای تجزیه پروتئین‌ها از ژل متراکم کننده ۴/۵% و ژل جدا کننده ۱۲/۵% استفاده گردیده و در هر چاهک ۵ میکرولیتر عصاره خام تزریق شد.

پیر شدن گیاه را به تاخیر می‌اندازد (۲۲). زیرا به محض تشکیل دانه انتقال مواد غذایی به ویژه نیتروژن از برگ به دانه شروع گردیده و در نتیجه پروتئین محلول کل برگ، کاهش می‌یابد (۲۰). در این آزمایش در اثر تنش خشکی میزان پروتئین محلول کل در گیاهان تحت تنش خشکی نسبت به گیاهان آبی (شاهد) و دیم در مرحله اول کاهش پیدا کرد. در این مرحله گیاهان در آغاز مرحله تشکیل و پر شدن دانه بودند. با توجه به این که گیاه جو در طول دوره رشد و نمو خود در مرحله تشکیل دانه و پر شدن آن نسبت به کم آبی حساس می‌باشد (۱)، می‌توان نتیجه گرفت که کاهش شدید پروتئین محلول کل در گیاهان

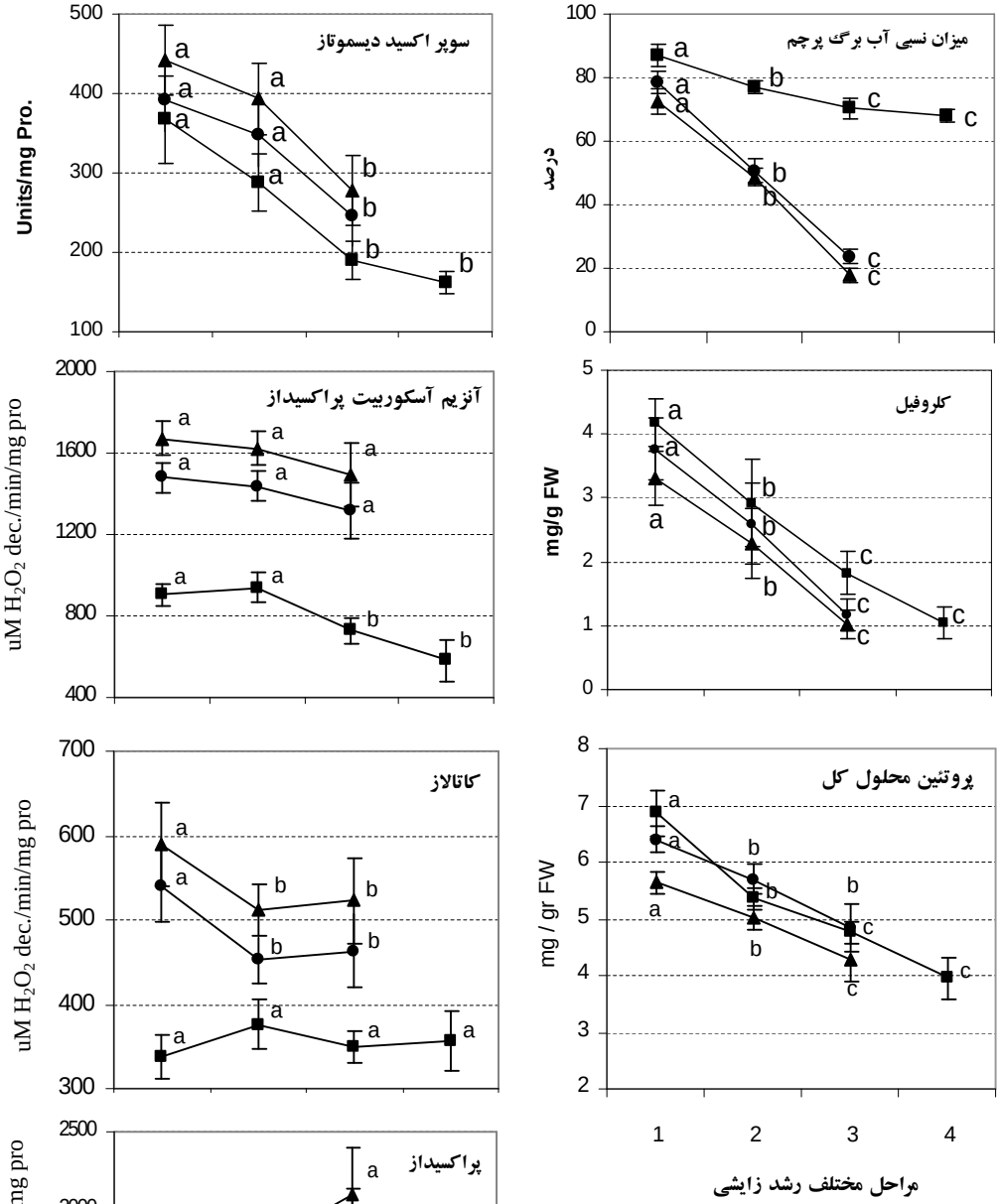
[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]

تحت تنش خشکی در مرحله اول ناشی از حساسیت گیاه جو به کمبود آب در این مرحله می‌باشد. میزان پروتئین rbcl طی مراحل مختلف رشد تیمارهای آبی، دیم و خشکی به تدریج کاهش یافت (شکل ۳). هم‌چنین میزان این پروتئین در هر مرحله در تیمار خشکی کمتر از تیمارهای آبی و دیم بود. مشخص شده است که تخریب پروتئین های استرومای کلروپلاست به ویژه آنزیم رابیسکو در شرایط تنش اکسنده به وسیله رادیکال‌های فعال اکسیژن بصورت غیر آنزیمی صورت می‌گیرد (۱۷). از آنجایی که در زمان پیری و در اثر تنش خشکی میزان ROS در کلروپلاست افزایش می‌یابد، بنابراین هم در اثر پیری و هم در زمان تنش خشکی تخریب پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم رابیسکو افزایش پیدا می کند. فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای آبی، دیم و خشکی در طول دوره آزمایش با افزایش سن گیاه به تدریج کاهش پیدا کرد. الگوی کاهش در هر سه تیمار مشابه بود (شکل ۴). در اثر اعمال تیمار خشکی فعالیت آنزیم افزایش پیدا کرد، به نحوی که اختلاف میان تیمارهای آبی و خشکی طی مراحل مختلف رشد معنی‌دار شد. اما بین تیمارهای آبی و دیم و تیمارهای دیم و خشکی در طول دوره آزمایش تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به این که الگوی کاهش فعالیت ویژه این آنزیم در گیاهان دیم و تحت تنش خشکی مشابه گیاهان آبی (شاهد) بود، به نظر می‌رسد که کاهش فعالیت ویژه این آنزیم در گیاهان تیمارهای دیم و خشکی به دلیل افزایش شدت تنش نبوده و بلکه ناشی از افزایش سن گیاه می‌باشد. فعالیت ویژه آنزیم آسکوربیت پراکسیداز در تیمار آبی در طول دوره آزمایش با افزایش سن گیاه به تدریج کاهش پیدا کرد. اما در تیمارهای دیم و خشکی با افزایش سن گیاه تغییر معنی‌داری در فعالیت این آنزیم مشاهده نگردید. اختلاف بین تیمارها در مراحل مختلف رشد معنی‌دار بود. فقط در مرحله سوم رشد تفاوت بین تیمارهای دیم و خشکی معنی‌دار نشد. با توجه به این که فعالیت آسکوربیت پراکسیداز در طول دوره آزمایش در گیاهان دیم و تحت تنش خشکی به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان آبی (شاهد) بود، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش فعالیت این آنزیم بر اثر اعمال تنش کم آبی (در تیمارهای دیم و خشکی) مانع از کاهش فعالیت این آنزیم در دوران پیری شده است. با توجه به این امر به نظر می‌رسد آنزیم آسکوربیت پراکسیداز می‌تواند نقش مؤثری در مقابله با تنش اکسنده ناشی از شرایط کم آبی داشته باشد. فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز در تیمار آبی با افزایش سن گیاه تغییر معنی‌داری نشان نداد. اما در تیمارهای دیم و خشکی با افزایش سن گیاه فعالیت آنزیم به تدریج کاهش پیدا کرد. اعمال تیمارهای دیم و خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. به نحوی که افزایش فعالیت کاتالاز در طول دوره آزمایش در تیمارهای دیم و خشکی نسبت به تیمار آبی در سطح احتمال ۱% معنی‌دار بود. اختلاف میان تیمارهای دیم و خشکی فقط در مرحله دوم رشد معنی‌دار شد. الگوی تغییر فعالیت آنزیم کاتالاز در طول دوره آزمایش در گیاهان تیمار آبی (شاهد) و گیاهان تحت تنش کم آبی (تیمارهای دیم و خشکی) مشابه نبود. در گیاهان آبی (شاهد) فعالیت ویژه آنزیم در طول دوره آزمایش تغییر معنی‌داری پیدا نکرد. نتایج گزارش شده درباره نحوه فعالیت آنزیم کاتالاز در دوران پیری متفاوت می‌باشد. در بررسی‌هایی که روی گیاه تنباکو در مرحله رشد رویشی انجام شد، فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش سن برگ کاهش پیدا کرد (۱۸). حداد و همکاران (۸) در بررسی نحوه بیان ژن کاتالاز در زمان پیری گیاه کلزا گزارش کردند که میزان بیان ژن کاتالاز و فعالیت آن در زمان پیری افزایش پیدا می‌کند. از این رو نتیجه‌گیری کردند که کاتالاز آنزیم مؤثری در مقابله با تنش اکسیدکنندگی می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایجی که در بالا آورده شده است، به نظر می‌رسد که نحوه فعالیت آنزیم کاتالاز در دوران پیری بستگی به گونه گیاهی، نوع اندام گیاهی و شرایط آزمایش دارد. در این آزمایش که در شرایط مزرعه صورت گرفت فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز که نشان دهنده فراوانی نسبی پروتئین آنزیم می‌باشد، با افزایش سن برگ در گیاهان آبی (شاهد) تغییر معنی‌داری پیدا نکرد. ولی در دو تیمار دیم و خشکی با افزایش سن برگ فعالیت کاتالاز

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]



شکل۴. تغییرات میزان نسبی آب برگ پرچم، کلروفیل، پروتئین محلول کل و آنزیم‌های ضد اکسنده در تیمارهای آبی (■)، دیم(●) و خشکی (▲) طی مراحل مختلف رشد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۱% مقایسه شدند. میله‌های عمودی نشانه SE ± و اعداد یک تا چهار به ترتیب نشان دهنده مراحل مختلف رشد شامل شروع باروری (مرحله ۱)، پر شدن دانه (مرحله ۲)، شیری شدن ثانویه (مرحله ۳) و خمیری نرم (مرحله ۴) می‌باشند. هر نقطه میانگین چهار ژنوتیپ است.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]

جدول۱. هم‌بستگی بین صفات اندازه‌گیری شده شامل میزان نسبی آب برگ پرچم (RWC)، کلروفیل، پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) در تیمار آبی در طول دوره آزمایش

صفت	POX	CAT	APX	SOD	پروتئین	کلروفیل
RWC	-۰/۷۰۲**	-۰/۰۶۵ ns	۰/۶۶۳**	۰/۶۰۳**	۰/۸۰۵**	۰/۶۶۰**
کلروفیل	-۰/۵۷۹**	-/۰۸۷ ns	۰/۵۷۸**	۰/۵۵۶**	۰/۸۵۶**	
پروتئین	-۰/۷۴۲**	-۰/۰۷۴ ns	۰/۵۳۱**	۰/۵۵۹**		
SOD	-۰/۶۳۰**	-۰/۰۸۵ns	۰/۴۷۹**			
APX	-۰/۶۰۶**	۰/۱۸۱ ns				
CAT	۰/۰۵۸ns					

*، ** و ns : به ترتیب معنی‌داری در سطوح ۵% ، ۱% و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.

کاهش پیدا کرد. با توجه به نتایج گیاهان آبی (شاهد) به نظر می‌رسد که این کاهش ناشی از افزایش سن گیاه نمی‌باشد و بلکه به دلیل افزایش شدت تنش کم آبی (در تیمارهای دیم و خشکی) است. شاید بتوان نتیجه گرفت که حداقل در گیاه جو تحت شرایط این آزمایش افزایش میزان کاتالاز جهت مقابله با تنش کم آبی مؤثر نمی‌باشد. فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در تیمارهای آبی، دیم و خشکی در طول دوره آزمایش با افزایش سن گیاه به تدریج افزایش پیدا کرد. الگوی افزایش در هر سه تیمار مشابه بود. بین تیمارها در مراحل اول و سوم رشد تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در مرحله دوم رشد میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای آبی به طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای دیم و خشکی بود. از بین آنزیم‌های ضد اکسنده مورد بررسی در این آزمایش، فعالیت آنزیم پراکسیداز هم در اثر پیری و هم تحت تنش خشکی افزایش پیدا کرد. به نظر می‌رسد این آنزیم می‌تواند نقش مؤثری در مقابله با تنش اکسنده داشته باشد. در این پژوهش هم‌بستگی بین صفات اندازه‌گیری شده شامل میزان نسبی آب برگ پرچم، کلروفیل، پروتئین محلول کل و آنزیم‌های ضد اکسنده با یکدیگر بررسی گردید (جدول ۱). هم‌بستگی بین میزان نسبی آب برگ پرچم، کلروفیل، پروتئین محلول کل و آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و آسکوربیت پراکسیداز مثبت و معنی دار بود. به عبارت دیگر میزان این صفات با افزایش سن گیاه، روند کاهشی را نشان داد. هم‌بستگی بین آنزیم کاتالاز با سایر صفات بی معنی بود. به عبارت دیگر نحوه فعالیت این آنزیم در طول دوره آزمایش متفاوت از نحوه فعالیت سایر صفات می‌باشد. هم‌بستگی بین فعالیت آنزیم پراکسیداز و سایر صفات شامل میزان نسبی آب برگ پرچم، کلروفیل، پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و آسکوربیت پراکسیداز منفی بود. به عبارت دیگر با کاهش میزان این صفات، فعالیت آنزیم پراکسیداز در مراحل آخر رشد گیاه جو افزایش می‌یابد. علی‌رغم این که در مراحل پیری توانایی محافظتی سلول در مقابل رادیکال‌های فعال اکسیژن کاهش می‌یابد و سلول دچار تنش اکسنده می‌شود به نحوی که فعالیت‌های طبیعی سلول و به دنبال آن ماکرومولکول‌های سلول از جمله پروتئین‌ها از بین می‌روند(۲۳)، فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز بر خلاف سایر آنزیم‌های ضد اکسنده افزایش می‌یابد. از آنجایی که فعالیت ویژه آنزیم نشان دهنده فراوانی نسبی پروتئین می‌باشد، این امر می‌تواند ناشی از افزایش بیان ژن‌های کد کننده آنزیم پراکسیداز و یا این که پایداری مولکول‌های پروتئینی این آنزیم در مقابل تخریب اکسنده ناشی از شرایط پیری سلول باشد. اما

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]

نتیجه‌گیری قطعی درباره این موضوع نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه دارد. هم‌چنین در این آزمایش در مراحل بلوغ و پیری گیاه جو علی‌رغم افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در گیاهان تیمارهای دیم و خشکی، دوره زندگی این گیاهان کوتاه‌تر از گیاهان آبی بود. به طوری که گیاهان تیمار آبی (شاهد) تا ۲۴۱ روز بعد از کاشت قابل نمونه برداری بوده و چهار مرحله نمونه‌برداری شدند. در صورتی که گیاهان تیمارهای دیم و خشکی تا ۲۳۶ روز بعد از کاشت قابل نمونه‌برداری بوده و سه مرحله نمونه‌برداری شدند. از این رو به نظر می‌رسد زمانی که گیاه در معرض تنش‌های اکسنده قرار می‌گیرد، سلول‌های گیاهی با افزایش توانایی سیستم دفاعی ضد اکسنده تلاش می‌کنند تا با تنش اکسنده مقابله کنند. اما زمانی که پاسخ سلول به تنش کافی نباشد، سلول و در نتیجه گیاه به سمت مرگ هدایت می‌شود. چنین نتیجه‌ای قبلاً نیز گزارش شده است (۲۳). در آزمایشی روی آرابیدوپسیس مشخص گردید علی‌رغم این که فراوانی نسبی پروتئین چهار آیزوزایم کاتالاز و دو آیزوزایم Mn-SOD میتوکندری، در زمان تنش اکسنده ناشی از دمای بالا افزایش می‌یابد، ولی این افزایش برای توانایی سلول، جهت مقابله با تنش اکسنده کافی نمی‌باشد و سلول به سمت مرگ سلولی برنامه ریزی شده (Programmed Cell Death, PCD) هدایت می‌گردد.

با توجه به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در مراحل آخر رشد گیاه جو در مزرعه، ممکن است، بتوان با استفاده از روش‌های زیست فناوری، گیاهان تراریخته‌ای تولید کرد که این گیاهان بتوانند میزان بیشتری از این آنزیم را در مراحل آخر رشد بیان کنند در این صورت می‌توان در مناطق خشک از گیاهان یاد شده و مقاوم برای کشت و زرع استفاده شود.

منابع مورد استفاده

۱. نور محمدی، ق.، ع. سیادت و ع. کاشانی. ۱۳۸۰. *زراعت*. جلد اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران، اهواز.

2. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxide in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24: 1-15.
3. Beers, R. F. and I. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen by catalase. J. Biochem. 195: 133 - 140
4. Bradford, M. M. 1979. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analy. Biochem. 72: 248-254.
5. Buchanan-Wollaston, V., S. Earl, E. Harrison, E. Mathas, S. Navabpour, T. Page and D. Pink. 2003. The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. Plant Biotechnol. J. 1: 3-22.
6. Casano, L. M., M. Martin and B. Sabater. 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. Plant Physiol. 106: 1033-1039.
7. Dhindsa, R. A., P. Plumb-Dhindsa and T. A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Experim. Bot. 126: 93-101.
8. Haddad, R., K. Morris and V. Buchanan – Wollaston. 2004. Expression analysis of genes related to oxidative protection during senescence in Brassica napus. Ir. J. Biotechnol. 2: 269-278.
9. He, P., M. Osaki, M. Takebe, T. Shinano and J. Wasaki. 2005. Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types of maize. J. Experim. Bot. 56: 1117-1128.
10. Hemeda, H. M. and B. P. Kelin. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. J. Food Sci. 55: 184-185.
11. Hodges, D. M. and C. F. Forney. 2000. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. J. Experim. Bot. 344: 645-655
12. Hsu, S. Y. and C. H. Kao. 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol and antioxidant enzymes in rice leaves. Plant Growth Reg. 39: 83-90.
13. Hukmani, P. and B. C. Tripathy. 1994. Chlorophyll biosynthetic reactions during senescence of excised barley (*Hordeum vulgare* L. cv IB 65) leaves. Plant Physiol. 105: 1295-1300.
14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]

227: 680- 685.
15. Martin, I. and M. S. Grotewiel. 2006. Oxidative damage and age – related functional declines. Mechanisms Ageing and Develop. 127: 411-423.
16. Munne-Bosch, S. and J. Penuelas. 2003. Photo- and antioxidant protection during summer leaf senescence in Pistacia lentiscus L. grown under mediterranean field conditions. Ann. Bot. 92: 385-391.
17. Nakano, Y. and K. Asada. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiol. 28: 131-140.
18. Ohe, M., M. Rapolu, T. Mieda, Y. Miyagawa, Y. Yabuta, K. Yoshimura and S. Shigeoka. 2005. Decline in leaf photooxiadtive-stress tolerance with age in tobacco. Plant Sci. 168: 1487-1493.
19. Parry, M. A. J., P. J. Andralojc, S. Khan, P. J. Lea and A. J. Keys. 2002. Rubisco Activity: Effects of drought stress. Ann. Bot. 89: 833-839.
20. Scarfts-Brandner, S. J. and D. B. Egli. 1987. Sink removal and leaf senescence in soybean. Plant physiol. 85: 662-666.
21. Sharma, P. and R. S. Dubey. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Reg. 46: 209-221.
22. Srivall, B. and R. Khanna-Chopra. 2004. The developing reproductive sink induces oxidative stress to mediate nitrogen mobilization during monocarpic senescence in wheat. Biochem. and Biophy. Res. Commun. 325: 198-202.
23. Swidzinski, J. A., C. J. Leaver and L. J. Sweetlove. 2004. A proteomic analysis of plant programmed cell death. Photochemistry 65: 1829-1838.
24. Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. Plant Physiology. Second Ed., Sinauer Associated Press.
25. Ye, Z., R. Rodriguez and A. Tran. 2000. The development transition of flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in Arabidopsis thaliana. Plant sci. 158: 115-127.
26. Yong, T., L. Zongsuo, S. Hongbo and D. Feng. 2006. Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of Radix astragali at seedling stage. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 49: 60-65.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.37.1]