تأثیر تنش خشکی در مرحله پنجه‌زنی بر فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز ژنوتیپ های گندم پاییزه

رعنا نادری زرنقی*[1]، مصطفی ولیزاده[1]، سولماز فیروزی[2]

۱- گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲-گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی پردیس، واحد تبریز، جلفا، ایران

چکیده

تنش خشکی به عنوان عامل اصلی کاهش عملکرد گیاهان در مناطق نیمه خشک محسوب شده و منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون‌ردوکتاز (GR) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) در سه گروه از گندم‌های پاییزه حساس، بینابین و متحمل به خشکی در مرحله پنجه‌زنی تحت سه شرایط آبی عادی (FC90%)، تنش متوسط (FC60%) و تنش شدید (FC30%) اجرا گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. در مرحله پنجه‌زنی، فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدان GR و APX در بافت های برگی با استفاده از روش سنجش اسپکتروفتومتری مورد اندازه گیری قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنش خشکی اثر معنی‌داری بر افزایش فعالیت این آنزیم ها دارد. اثر متقابل بین تنش خشکی و گروه‌های گندم برای هر دو آنزیم APX و GR معنی‌دار بدست آمد. در ژنوتیپ های حساس به خشکی، فعالیت هر دو آنزیم یکسان و بدون اختلاف معنی‌دار بود، در حالی که ژنوتیپ های متحمل افزایش فعالیت معنی‌داری از خود نشان دادند و با افزایش میزان تنش، این افزایش بیشتر شد. ژنوتیپ های گروه بینابین بسته به نوع آنزیم پاسخ های متفاوتی در شرایط مختلف محیطی از خود نشان دادند. آنزیمAPX در مقایسه با GR درصد افزایش فعالیت بیشتری در شرایط تنش خشکی نشان داد، بنابراین این آنزیم می‌تواند به عنوان یکی از آنزیم های مهم جهت افزایش مقاومت گیاه گندم در مقابل تنش ناشی از خشکی تلقی شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش اکسیداتیو، گندم

* نویسنده مسئول: *Naderi.rana@gmail.com* تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۵ تاریخ پذیرش:۱۳۹۳/۱۱/۱۴

مقدمه

خشکی از جمله یکی از مهمترین عوامل محدود کنندهٔ رشد و کاهش تولید محصولات زراعی در سراسر جهان است (Zhu, 2002). ایران یکی از کشورهایی است که تنش‌های زیستی و غیرزیستی در آن باعث کاهش عملکرد گیاهان زراعی ازجمله گندم می‌شود. در ایران تقریباً ۶۷٪ گندم کشت شده به مناطق دیم اختصاص دارد که نشان دهنده حضور تنش خشکی در طول فصل خشک است. در سال‌های اخیر، به دلیل تغییرات در شرایط آب و هوایی و نیز افزایش سطح CO_2 اتمسفری، تنش خشکی بسیار شدیدتر شده است. تحت تأثیر تنش خشکی، فعالیت‌های فتوشیمیایی گیاه بازداشته می‌شود، محتوی کلروفیلی برگ تغییر می‌کند و فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین در فرایند فتوسنتز کاهش می‌یابد (Monakhova and Chernyadev, 2002). در اثر بسته شدن روزنه‌ها نسبت $NADPH-NADP^+/H^+$ به دلیل عدم مصرف $NADPH-H^+$، جهت تثبیت CO_2 در چرخه کالوین کاهش می‌یابد. افت نسبت مذکور سبب بسته شدن زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1] افزایش می‌یابد (Egneus *et al.*, 1975). گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) و هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) می‌توانند شدیداً با مولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و پراکسیداسیون لیپید، واسرشته شدن پروتئین و جهش در DNA را سبب شوند که این امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی گیاه و در نهایت به مرگ سلول‌ها منجر می‌شود (Mittler, 2002). برای جلوگیری از اثرات تخریبی تنش اکسیداتیو، گیاهان دارای مکانیسم‌های بیوشیمیایی متعددی هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به چرخه مهلر، چرخه آسکوربات-گلوتایتون، چرخه گزانتوفیل و تنفس نوری اشاره نمود (Edreva, 2005 ;Cruz de Carvalho, 2008). همچنین گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که این سیستم‌ها باعث غیرفعال شدن ROSها شده و خسارت‌های اکسیداتیو ناشی از فعایت ROSها را کاهش می‌دهند. سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل سوپراکسیددیسموتاز (SOD)[2]، پراکسیدازها (POX)[3]، آسکوربات‌پراکسیداز (APX)[4]، کاتالاز (CAT)[5] و گلوتاتیون‌ردوکتاز (GR)[6] که آنزیم‌های آنتی اکسیدان کلیدی در مبارزه با ROSها به شمار می‌روند و مهم‌ترین ترکیبات غیرآنزیمی آنتی‌کسیدانی، گلوتاتیون، اسیدآسکوربیک، آلفاتوکوفورل، زازانتین و آنترازانتین می‌باشند (Salin, 1991).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که در کلروپلاست به دو فرم آیزوزیمی، متصل به غشای تیلاکوئید و محلول در استروما، حضور دارد (Edreva, 2005). این آنزیم در چرخه‌های مهلر و گلوتایتون آسکوربات نقش موثری در جمع‌آوری پراکسید

1 - Reactive oxygen species

2 - Superoxide dismutase
3 - Peroxidase
4 - Ascorbate peroxidase
5 - Catalase
6 - Glutathione reductase

هیدروژن ایفا می‌کند (Mittler, 2002). براساس داده‌های تعیین توالی موجود، هفت نوع آنزیم آسکوربات پراکسیداز مختلف در گیاهان تشخیص داده شده‌است: دو فرم سیتوسولی محلول، سه نوع سیتوسولی متصل به غشاء (که شامل یک فرم متصل به گلی‌اکسی‌زوم است)، یک فرم استرومایی کلروپلاستی و یک فرم تیلاکوئیدی متصل به غشاء (Jespersen *et al.*, 1997). کیتی‌جیما و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که APX متصل به غشای تیلاکوئیدی عامل اصلی تحمل گیاه به تنش اکسیداتیو است. گلوتاتیون‌ردوکتاز نیز نقش مهمی در سازگاری با تنش اکسیداتیو بازی می‌کند. این آنزیم مسئول تبدیل گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) به گلوتاتیون احیاء شده (GSH) و حفظ نسبت بالای GSH به GSSG است. گلوتایتون در چرخه‌های گزانتوفیل، مهلر و آسکوربات-گلوتایتون نقش موثری در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و حفظ GSH ایفا می‌کند. از این‌رو افزایش GR به‌دلیل احیای مجدد گلوتاتیون اکسیدشده بسیار حائز اهمیت است (Sairam *et al.*, 2003).

تحقیقات نشان داده است که ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود و افزایش در غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان فتوسنتزکننده وجود دارد (Mittler, 2002; Cruz de Carvalho, 2008). لاسکانو و همکاران (۲۰۰۱) با قرار دادن دو ژنوتیپ گندم متحمل و حساس در معرض تنش خشکی در شرایط مزرعه‌ای مشاهده نمودند که در ژنوتیپ متحمل میزان فعالیت آنزیم‌های APX، GR، GSH افزایش یافته و آسیب اکسیداتیو کمتر می‌شود، در حالی که در رقم حساس تغییر چندانی در فعالیت آنزیم‌ها رخ نمی‌دهد. شارما و دوبی (۲۰۰۵) گزارش نمودند که در گیاهچه‌های برنج ۱۲-۱۰ روزه که در شرایط آزمایشگاهی رشد یافته‌اند و به مدت ۲۴ ساعت تحت تنش خشکی ۰/۵- تا ۲- مگاپاسکال قرار گرفته‌اند، فعالیت آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتایتون (APX و GR) و SOD افزایش و فعالیت CAT کاهش می‌یابد که بیانگر این است که آنتی اکسیدان‌های متفاوت، می‌توانند پاسخ‌های متفاوتی به تنش خشکی نشان دهند. هان و لی (۲۰۰۵) نتیجه گرفتند که افزایش شدت تنش بطور معنی‌داری فعالیت‌های آنزیمی آنزیم‌هایی نظیر گلوتاتیون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز را در برگ گیاه کاهو در مقایسه با تیمار شاهد (بدون تنش) را بالا می‌برد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های APX و GR در دوره‌های زمانی مختلف در برگ‌های ذرت که تحت تنش ملایم اسمزی ناشی از PEG (۰/۷- مگاپاسکال) قرار داشتند نشان داد که افزایش معنی‌داری در فعالیت هر دو آنزیم دیده می‌شود (Jiang and Zhang, 2002). با این حال در گیاه نخود تحت تنش ملایم خشکی (w = -۱/۳ MPa) در فعالیت آنزیم‌های چرخه آسکوربات- گلوتایتون، ابتدا کاهش اندکی مشاهده شد و سپس با افزایش شدت تنش و تحت تنش خشکی شدید (MPa ۱/۹۳- = w) فعالیت هر دو آنزیم به میزان ۵۰٪ کاهش یافت (Ormaetxe *et al.,* 1998). میتلر و زلینزکاس (۱۹۹۴) استدلال می‌کنند که این امر احتمالاً به دلیل کاهش در بازسازی NADPH توسط فتوسنتز تحت تنش خشکی شدید و کاهش میزان GSH باشد.

بدین ترتیب، آگاهی از تغییرات پروتئین‌ها و آنزیم‌ها تحت شرایط تنش خشکی ممکن است کمکی برای شناسایی صفات فیزیولوژیکی مؤثر در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام متحمل باشد. از آنجایی‌که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش خشکی در مرحله پنجه‌زنی کمتر مورد توجه قرار گرفته و بیشتر تحقیقات انجام شده در مرحله گیاهچه‌ای و در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای انجام شده‌است، بنابراین این پژوهش با هدف مطالعه تأثیر تنش خشکی در مرحله پنجه‌زنی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون‌ردوکتاز و آسکوربات‌پراکسیداز در ژنوتیپ‌های حساس، بینابین و متحمل به خشکی گندم پاییزه انجام گردیده‌است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در پاییز سال ۱۳۹۱ در ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در اراضی کرکج در ۱۲ کیلومتری شرق تبریز با ارتفاع ۱۳۶۱ متر از سطح دریا به اجرا درآمد. در این بررسی بذر ژنوتیپ‌های پاییزه گندم (از گروه‌های متحمل، بینابین و حساس) از موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور (مراغه) (Roostaei *et al.,* 2014) و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (Mollasadeghi *etal.,* 2011) تهیه گردیدند (جدول ۱). اعمال تنش خشکی بصورت وزنی بوده و به منظور تعیین ظرفیت زراعی خاک (Field Capacity = FC)، از مخلوط خاک تهیه شده سه نمونه برداشت و بعد از خشک کردن آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۲۰°C، توزین و با اضافه کردن آب به حالت اشباع درآمده و بعد از ۴۸ ساعت، با توجه به خروج آب اضافی در هر نمونه، میزان FC محاسبه گردید. سطوح تنش خشکی بصورت حدود FC ۹۰٪ (نرمال)، FC ۶۰٪ (تنش خشکی متوسط) و FC ۳۰٪ (تنش خشکی شدید) در نظر گرفته شد. کاشت بذر در گلدان‌هایی به ابعاد ۲۵ × ۲۰ × ۱۵ سانتی‌متر (در مجموع ۱۷۱ گلدان) و گلدان‌ها در گلخانه پلاستیکی مستقر در مزرعه مورد مراقبت و آبیاری قرار گرفتند، بدین ترتیب که ابتدا در هر گلدان ده عدد بذر کشت شد و سپس در مرحله دو برگی بوته‌ها تنک شدند تا در نهایت در هر گلدان پنج بوته باقی ماند. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها یکسان و ترکیب آن به صورت خاک زراعی، ماسه و کودحیوانی به نسبت ۶ :۳ :۱ بود. هیچ کودی به گلدان‌ها اضافه نشد و علائم کمبود مواد غذایی و بیماری نیز در گیاهان مشاهده نشد. آبیاری تمام گلدان‌ها تا شروع پنجه‌زنی به طور کامل انجام گرفت و پس از پنجه‌زنی جهت جلوگیری از بارش باران از پوشش پلاستیکی استفاده و سه نوع شرایط رطوبتی به مدت حدود دو هفته در گلدان‌های مورد نظر اعمال گردید (شکل ۱). آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی شامل ژنوتیپ‌ها (۱۹ ژنوتیپ) و سطوح آبیاری (سه سطح) با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. برای تجزیه‌های آنزیمی، ۱۵ روز پس از اعمال تنش، سه یا چهار بوته از هر واحد آزمایش (گلدان) انتخاب و برای استخراج آنزیمی استفاده گردیدند.

اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی

فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون‌ردوکتاز (GR) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) توسط اسپکتروفتومتر (مدل RAY LEIGH U.V-2601) انجام شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR)

ابتدا ۰/۱ گرم برگ نمونه در هاون چینی به وسیله نیتروژن مایع کاملاً پودر شده و سپس یک میلی‌لیتر بافر ۱۰۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH=۷) حاوی دو میلی مولار EDTA به آن اضافه گردید. پس از یکنواخت کردن محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ و سپس۵۰ میکرولیتر از آن محلول رویی شناور برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم برداشت شد. فعالیت آنزیم به روش آرورا و همکاران (۲۰۰۲) و بر اساس احیاء گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) توسط آنزیم گلوتاتیون‌ردوکتاز با مصرف NADPH بود. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۲۰۰ میلی‌مولار (pH=۷/۵)، ۵۰۰ میکرومولار گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG)، ۵۰ میکرومولار NADPH، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار Na_2EDTA و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن آنزیم مخلوط واکنش کاملاً به هم زده شد سپس کاهش جذب در طول موج 340 nm به مدت ۱۲۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان NADPH مصرف شده با استفاده از ضریب خاموشی ($\varepsilon = 6.22\ Mm^{-1}\ cm^{-1}$) محاسبه گردید. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

(الف) (ب) (ج)

شکل ۱- بوته‌های گندم ۱۵ روز بعد از اعمال تنش خشکی: الف) آبیاری عادی (۹۰٪FC)، ب) تنش خشکی متوسط (۶۰٪FC) و ج) تنش خشکی شدید (۳۰٪FC).

اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات - پراکسیداز (APX)

ابتدا ۰/۱ گرم برگ نمونه در هاون چینی به وسیله نیتروژن مایع کاملاً پودر شده و سپس یک میلی‌لیتر بافر ۱۰۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH=۷) حاوی ۲ میلی‌مولار EDTA، یک میلی‌مولار آسکوربات و ۱٪ Triton X-100 به آن اضافه شد. پس از یکنواخت کردن محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ و سپس۵۰ میکرولیتر از آن محلول رویی شناور برای اندازه گیری فعالیت آنزیم برداشت شد. فعالیت آنزیم به روش ناکانو و آسادا (۱۹۸۱) اندازه گیری شد.

مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، یک میلی‌مولار H_2O_2، 5 میلی‌مولار آسکوربات با ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده مخلوط شد تا واکنش اکسیداسیون توسط آنزیم موجود در بافت برگی گیاه انجام گردد. در نهایت کاهش جذب در طول موج 290 nm به مدت ۳۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان آسکوربات اکسیدشده با استفاده از ضریب خاموشی ($\varepsilon = 2.8\ Mm^{-1}\ cm^{-1}$) محاسبه گردید و فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

تعیین غلظت پروتئین محلول

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول در عصاره‌های استخراج شده از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. به این صورت که پس از استخراج، مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده به ۲۹۵۰ میکرولیتر محلول برادفورد اضافه شد و کاملاً به هم زده شد و پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. برای تعیین غلظت پروتئین از سرم آلبومین گاوی (BSA)[1] به عنوان استاندارد استفاده شد.

روش تهیه منحنی استاندارد

به منظور استانداردسازی نمونه‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول برادفورد را در داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۷۹۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۵ میکرولیتر عصارهٔ پروتئینی اضافه نموده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شده و تا زمان اندازه‌گیری در مخلوط آب و یخ نگهداری گردیدند. میزان جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج نوری ۵۹۵ نانومتر قرائت وسپس مقادیر جذب در مقابل غلظت پروتئین رسم گردید (شکل ۲).

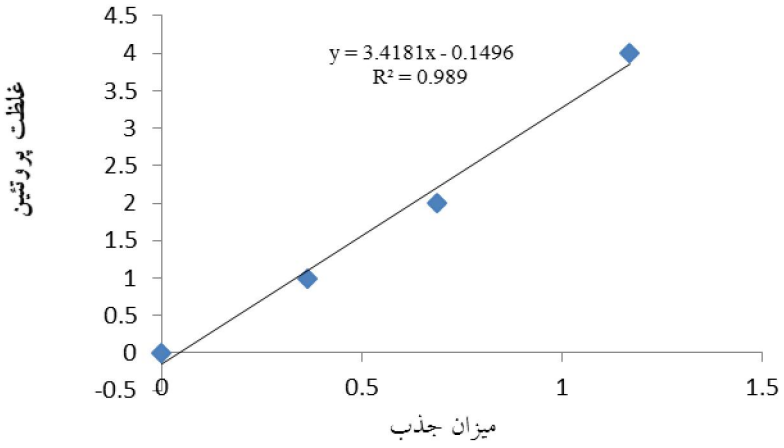
تجزیه آماری داده‌های آنزیمی

آزمون نرمال بودن داده‌ها با روش کولموگروف- اسمیرنوف و یکنواختی واریانس‌ها از طریق آزمون لون انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی از طریق SAS انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و نرم‌افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس برای فعالیت دو آنزیم آنتی‌اکسیدان GR و APX نشان داد که تنش خشکی اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌ها داشته‌است (جدول ۲). اختلاف بین گروه‌های متحمل، بینابین و حساس گندم فقط برای آنزیم APX معنی‌دار بدست آمد و این بیشتر از اختلاف گروه متحمل در برابر گروه حساس ناشی بود. اثرمتقابل بین تنش خشکی و گروه‌های گندم برای آنزیم‌های GR و APX معنی‌دار شد که نشان‌دهندهٔ پاسخ متفاوت گروه‌های گندم در برابر تنش است. در این مطالعه، اثرمتقابل بین تنش خشکی و ژنوتیپ‌های درون گروه‌ها برای آنزیم APX (جدول ۲) وجود اثر متقابل تنش× گروه را در مورد ژنوتیپ‌ها تأیید نمود.

1 - Bovine Serum Albumin



شکل ۲- منحنی استان دارد پروتئین

جدول ۱- مشخصات ارقام گندم پاییزه مورد مطالعه

ژنوتیپ	محل تهیه بذر	واکنش به خشکی	شجره
۱	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	متحمل	Unknown- 1
۲	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	متحمل	1-27-6149/Sabalan// 84.40023
۳	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	متحمل	Ghafghaz//F9.10/Maya"s" IRW92-1-D-474-OMA-OMA-OMA-OMA- IMA-OMA
۴	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	متحمل	DARIC95-010-OMA-OMA-OMA-OMA-6MA-OMA
۵	تحقیقات کشاورزی و استان اردبیل	متحمل	Azarbaijan/Gobostan
۶	تحقیقات کشاورزی و استان اردبیل	متحمل	Azarbaijan/Roozi-84
۷	تحقیقات کشاورزی و استان اردبیل	متحمل	Tous
۸	تحقیقات کشاورزی و استان اردبیل	متحمل	Azar-2
۹	تحقیقات کشاورزی و استان اردبیل	متحمل	Sardari
۱۰	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	بینابین	DARIC95-010-OMA-OMA-OMA-OMA-8MA-OMA
۱۱	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	بینابین	Manning/Sdv1//Dogu88
۱۲	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	بینابین	RECITL/TIA.2//TRK13
۱۳	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	بینابین	Vrz/3/Orf1.148/Td1/Blo/4/Sabalan
۱۴	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	حساس	HK16/7/KVZ/T171/3/MAYA//BB/INIA/4/KAR/JCWH99034-OAP- OAP-OAp-OMAR-6MAR
۱۵	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	حساس	FKG13/4/NWT/3/TAST/SPRW// TCI98-0139-OAP-OAP-OMAR-5MAR
۱۶	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	حساس	JANZ QT3685-OAUS
۱۷	موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور	حساس	RINA-11
۱۸	تحقیقات کشاورزی و استان اردبیل	حساس	Azarbaijan/Saratoveskaya-29
۱۹	تحقیقات کشاورزی و استان اردبیل	حساس	Cimmyt/Saysonz

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان GR و APX در مرحله پنجه زنی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		GR	APX
تنش خشکی	۲	۰/۰۱۷۴۲**	۰/۰۱۴۹۷*
گروه	۲	۰/۰۰۰۶۳ns	۰/۰۴۵۴۰**
ژنوتیپ/گروه	۱۶	۰/۰۱۰۳۹**	۰/۰۱۳۹۱**
تنش × گروه	۴	۰/۰۰۹۱۳**	۰/۰۴۱۲۷**
تنش × ژنوتیپ/گروه	۳۲	۰/۰۰۳۶۲ns	۰/۰۱۲۷۳**
خطای آزمایشی	۱۱۴	۰/۰۰۲۴۰	۰/۰۰۴۰۲
درصد ضریب تغییرات		۲۴/۳۹	۲۶/۱۹

ns ، * و ** : به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

گلوتاتیون‌ردوکتاز (GR)

تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده نشان داد که آنزیم GR در بین گروه‌های مختلف از فعالیت یکسانی برخوردار بوده و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها از نظر فعالیت این آنزیم وجود ندارد (جدول ۲). به عبارت دیگر با توجه به نوع فعالیت این آنزیم نمی‌توان گروه‌ها را از یکدیگر تفکیک نمود و هیچ یک از گروه‌ها نسبت به دیگری از نظر میزان فعالیت این آنزیم برتری ندارند. با وجود این سطوح تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم GR اثرگذار بوده و بین سطوح تنش اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده نشان داد که تنش شدید باعث افزایش فعالیت این آنزیم در برگ‌های گندم شده و اختلاف معنی‌داری از نظر میزان فعالیت با سایر سطوح تنش نشان داده است، به طوری‌که میزان افزایش فعالیت ۳۱ درصدی نسبت به شرایط عادی بدست آمد (جدول ۳). فعالیت آنزیم GR با افزایش شدت تنش اسمزی طبق انتظار افزایش یافت که افزایش این آنزیم به دلیل احیای مجدد گلوتاتیون اکسید شده بسیار حائز اهمیت است (Sairam *et al.*, 2003).

با توجه به معنی‌دار بودن اثرمتقابل تنش خشکی×گروه‌های گندم برای GR (جدول ۲) می‌توان بیان کرد که گروه‌های حساس، بینابین و متحمل پاسخ متفاوتی به سطوح تنش نشان دادند. به‌طوری‌که ژنوتیپ‌های حساس گندم در سه شرایط آبی (عادی، تنش خشکی متوسط و شدید) اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و در نتیجه در برابر شرایط محیطی پاسخ معنی‌داری از خود بروز ندادند. در حالی‌که ژنوتیپ‌های گندم متحمل و بینابین در برابر شرایط آبی مختلف، اختلاف فعالیت آنزیمی معنی‌داری داشته‌اند. به‌ویژه ژنوتیپ‌های بینابین در تنش شدید نسبت به شرایط عادی و تنش متوسط بیشترین افزایش فعالیت آنزیمی را نشان داده‌اند (شکل ۳، الف). در تحقیقی، لوگینی و همکاران (۱۹۹۹) با قرار دادن گیاهچه‌های دو رقم گندم در معرض تنش خشکی (به مدت ۳۵ روز) مشاهده

کردند که در طول تنش میزان گلوتاتیون در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل کاهش می‌یابد ولی فقط ژنوتیپ حساس کاهش معنی‌داری در فعالیت گلوتاتیون‌ردوکتاز نشان می‌دهد که با نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر در سه گروه گندم که هر کدام واجد چندین ژنوتیپ بوده‌اند مطابقت دارد. کلس و اونسل (۲۰۰۲) نیز گزارش کردند که افزایش فعالیت GR سبب افزایش تحمل به تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌های گندم می‌شود.

آسکوربات‌پراکسیداز (APX)

فعالیت این آنزیم تحت شرایط تنش خشکی به شکل معنی‌داری افزایش یافت. به‌طوری‌که کمترین میزان فعالیت این آنزیم تحت شرایط عادی (بدون تنش) و بیشترین میانگین فعالیت این آنزیم در شرایط وجود تنش (شدید) با ۶۵٪ افزایش و تنش متوسط با ۵۳٪ افزایش نسبت به حالت عادی (بدون تنش) بدست آمد (جدول ۳). افزایش فعالیت آنزیم APX در شرایط تنش مانند آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و گویاکول‌پراکسیداز براثر افزایش گونه‌های فعال اکسیژن است که با فعال کردن مسیرهای ترارسانی پیام باعث افزایش بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتیاکسیدان و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود (Mittler *et al.*, 2004).

با توجه به جدول (۲) این آنزیم در بین گروهها از فعالیت یکسانی برخوردار نیست و این تفاوت فعالیت آنزیم بین گروه‌ها از اختلاف بین گروه متحمل با سایر گروه‌های گندم ناشی می‌شود (جدول۴). به‌طوری‌که گروه متحمل نسبت به گروه حساس ۴۸٪ فعالیت آنزیمی بیشتری نشان داد. القامدی (۲۰۰۹) با بررسی نقش تنش خشکی در مرحله رویشی در دو رقم گندم، (Veery) مقاوم به خشکی و (SIDS) حساس به خشکی نشان داد که رقم مقاوم با تجزیه بیشتر پراکسیدهیدروژن و مهار آن توسط آنزیم‌های CAT و APX و عملکرد کارآمد آنزیم APX در چرخه گلوتایتون - آسکوربات، آسیب غشاء کمتر و محتوی مالون‌دی‌آلدهید پایین‌تری (MDA) در مقایسه با رقم حساس دارند و در نتیجه به خشکی سازگارند. تحت شرایط تنش خشکی افزایش فعالیت APX در گیاهچه‌های گندم توسط (Bartoli *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004) نیز گزارش شده است که این یافته با نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر در سه گروه گندم که هر کدام واجد چندین ژنوتیپ بوده‌اند مطابقت دارد. سیگری و همکاران (۲۰۰۰) نیز با قرار دادن گیاهچه‌های (۱۶ روزه) دو رقم گندم در معرض تنش خشکی مشاهده کردند که رقم مقاوم به تنش در مقایسه با رقم حساس از فعالیت بالاتر آنزیم APX برخوردار است، در حالی‌که در حالت عادی و بدون تنش میزان APX در گیاه حساس دو برابر گیاه مقاوم بود و فعالیت آنزیم به تدریج از زمانی‌که تنش اعمال شد، افزایش یافت.

بررسی کیفیت اثر متقابل تنش خشکی× گروه‌های گندم نشان داد که ژنوتیپ‌های درون گروه حساس گندم در سه شرایط محیطی افزایش فعالیت یا اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. در حالی‌که گروه‌های گندم متحمل و بینابین در مواجه با تنش خشکی پاسخ‌های متفاوتی در مقابله با اثرات تنش از خود نشان دادند. بیشترین میانگین فعالیت آنزیم APX در گروه گندم‌های متحمل در شرایط تنش خشکی شدید بدست آمد. در گروه گندم‌های بینابین

کاهش فعالیت معنی‌داری در شرایط خشکی شدید مشاهده شد (شکل ۳، ب). با وجود این، اثرمتقابل تنش × ژنوتیپ‌های درون‌گروه برای APX حاکی از این بود که ژنوتیپ‌های درون گروه‌ها در سه شرایط آبی رفتار متفاوتی از خود نشان داده‌اند، با این توضیح که در شرایط عادی ژنوتیپ‌های گروه بینابین و در تنش متوسط و شدید ژنوتیپ‌های متحمل بیشترین فعالیت آنزیمی را به خود اختصاص دادند. به عبارتی در ژنوتیپ‌های متحمل با افزایش تنش اکثراً افزایش فعالیت آنزیمی مشاهده می‌شود، در حالی‌که در ژنوتیپ‌های حساس و بویژه ژنوتیپ‌های بینابین عکس این مسأله رخ می‌دهد و این می‌تواند بیانگر آن باشد که پاسخ به تنش، به محیط وابستگی کمی داشته و بطور عمده به ژنوتیپ وابسته است.

جدول ۳- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان GR و APX گندم در سه شرایط آبی متفاوت در مرحله پنجه‌زنی

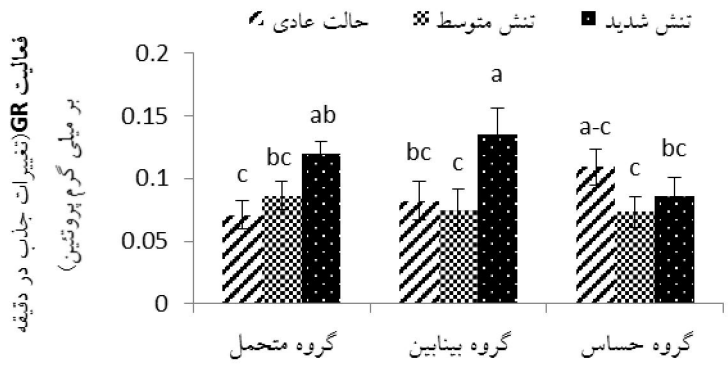
تنش	GR	APX
	(تغییرات جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	
حالت عادی	۰/۰۸۵۴ b	۰/۰۷۹۴ b
تنش متوسط	۰/۰۷۹۸ b	۰/۱۲۱۹ a
تنش شدید	۰/۱۱۲۵ a	۰/۱۳۱۵ a
درصد افزایش فعالیت تنش متوسط/ شرایط عادی	-	۵۳
درصد افزایش فعالیت تنش شدید/ شرایط عادی	۳۱	۶۵

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

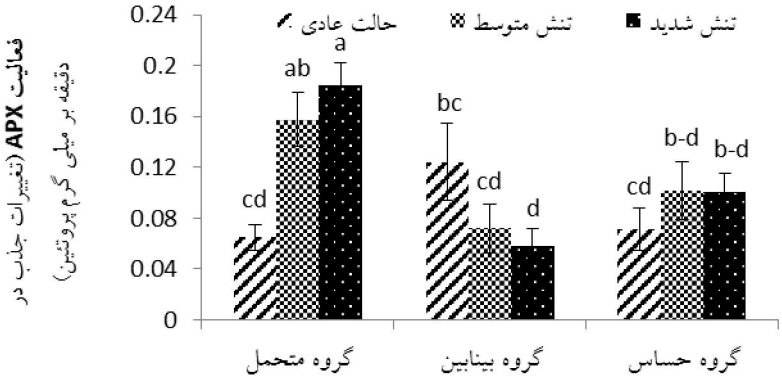
جدول ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان APX در گروه‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی

گروه	APX
	(تغییرات جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)
متحمل	۰/۱۳۵۶ a
بینابین	۰/۰۸۴۸ b
حساس	۰/۰۹۱۳ b
درصدافزایش فعالیت گروه متحمل/ بینابین	-
درصدافزایش فعالیت گروه متحمل/ حساس	۴۸

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



(الف)



(ب)

شکل ۳- میانگین ترکیبات تیماری تنش و گروه‌های گندم از لحاظ فعالیت آنزیم‌ها در مرحله پنجه‌زنی (الف) GR ، (ب) APX

در مطالعات انجام شده توسط سایرام و همکاران (۲۰۰۳) عنوان شده که ارقام مقاوم گندم در شرایط تنش خشکی تولید مالون‌دی‌آلدهید کمتری دارند و بنابراین فعالیت بالاتر آنزیم APX را نشان می‌دهند. در بین آنزیم‌های فوق، آنزیم APX درصد افزایش فعالیت بیشتری در شرایط تنش ناشی ازخشکی نشان داد (جدول ۳) لذا شاید این آنزیم نقش ویژه‌ای در القا تحمل/ سازگاری گیاه گندم در شرایط تنش را بر عهده دارد.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه مسئولین محترم موسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور (مراغه) و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل به ویژه آقایان دکتر مظفر روستایی و دکتر رضا شهریاری در تهیه بذر و مواد آزمایشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Al-Ghamdi AA. 2009. Evaluation of oxidative stress tolerance in two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars in response to drought. International Journal of Agriculture and Biology 11: 7-12.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. 2002. Oxidative stress and antioxidant system in plants. Plant Physiology 82: 1227-1237.

Bartoli CG, Simontacchi M, Tamambussi E, Beltrano J. 1999. Drought and watering-dependent oxidative stress: Effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. Journal of Experimental Botany 50: 375-383.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Cruz de Carvalho MH. 2008. Drought stress and reactive oxygen species. Plant Signaling and Behavior 3: 156-165.

Edreva A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. Agriculture, Ecosystems and Environment 106: 119-133.

Egneus H, Heber U, Krik M. 1975. Reduction of oxygen by the electron chain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide. Biochimica et Biophysica Acta 408: 252-268.

Han HS, Lee KD. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of Lettuce under soil salinity. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 1: 210-215.

Jespersen HM, Kjaersgard IVH, Qstergaard L, Welinder KG. 1997. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from Arabidopsis thaliana to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. Biochemical Journal 326: 305-310.

Jiang M, Zhang J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and upregulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. . Journal of Experimental Botany 53: 2401-2410.

Keles Y, Oncel I. 2002. Response of the antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. Plant Science 163: 783-90.

Kitijima K, Mulkey S, Samaniego M, Wright S. 2002. Decline of photosynthetic capacity with leaf age and position in two tropical pioneer tree species. American Journal of Botany 88: 1925-1932.

Lascano HR, Antonicelli GE, Luna CM, Melchiorre MN, Ggomez LD, Racca RW, Trippi VS, Casano LM. 2001. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: Field and in vitro studies. Australian Journal of Plant Physiology 28: 1095-1102.

Loggini B, Scartazza A, Brugnoli E, Navari-Izzo F. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Plant Physiology 119: 1091-1100.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem FV. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science 9: 490-498.

Mittler R, Zilinskas BA. 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. Plant Journal 5: 397-405.

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

Mollasadeghi V, Valizadeh M, Shahryari R, Imani AA. 2011. Evaluation of drought tolerance of bread wheat genotypes using stress tolerance indices at presence of potassium humate. Journal Agriculture and Environment Science 10: 151-156.

Monakhova OF, Chernyadev II. 2002. Protective role of kartolin-4 in wheat plants exposed to soil drought. Applied Environmental Microbiology 38: 373-380.

Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Ormaetxe I, Escuredo PR, Arrese-Igor C, Becana M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. Plant Physiology 116: 173-181.

Roostaei M, Mohammadi R, Amri A. 2014. Rank correlation among different statistical models in ranking of winter wheat genotypes. The Crop Journal 2: 154-163.

Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC. 2003. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science 163:1037-1046.

Salin ML. 1991. Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. Free Radical Research 12: 851-858.

Sgherri CLM, Maffei M, Navari-Izzo F. 2000. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering . Plant Physiology 157: 273-279.

Sharma P, Dubey RS. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Regulation 46: 209-221.

Zhang F, Guo JK, Yang YI, He WI, Zhang LX. 2004. Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. Acta Physiologiae Plantarum 26: 345-352.

Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology 53: 273-247.

The effects of drought stress in tillering stage on glutathione reductase and ascorbate peroxidase activities of winter wheat genotypes

R. Naderi Zarnaghi*[1], M. Valizadeh[1] and S. Firoozi[2]

1- Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Department of Biotechnology, University of Pardis Tabriz, Jolfa, Iran

Abstract

Drought stress is one of the main limiting factors in plant production in semiarid regions; this is due to its oxidative stress. In order to evaluate the response of winter wheat genotypes to drought stress, the activity of glutathione reductase and ascorbate peroxidase enzymes were studied in three wheat groups (sensitive, intermediate and tolerant to drought) under three watering regimes (watered to 90, ,60, and 30% of field capacity). The experiment was conducted in factorial form in completely randomized design with three replications. At tillering stage, the activities of GR and APX enzymes were measured using spectrophotometry. The data showed that drought stress increased significantly the activity of both enzymes. The interaction between drought stress and wheat groups was significant for both GR and APX activities. In drought-sensitive genotypes, the activity of enzymes did not change under different watering regimes; whereas drought-tolerant genotypes showed significant activity increment as drought stress increased. Drought-intermediate genotypes showed discrete responses, depending on enzyme type and watering regimes. It can be concluded that APX enzyme, compared with GR, showed more activity in response to drought. Thus, the APX might play crucial roles in antioxidant defense under drought stress in wheat.

Keywords: Antioxidant enzymes, Oxidative stress, Wheat

*Corresponding Author: *Naderi.rana@gmail.com* Received: 2014/06/26 Accepted: 2015/02/03