

اثر تنش کمبود آب بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در دوره زایشی

گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) در شرایط مزرعه

رحیم حداد^۱، مرتضی سالک جلالی^۲

۱- و مسئول عهده دار مکاتبات، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین،

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

۲- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی

(ره) قزوین

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raheemhaddad@yahoo.co.uk

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

واژه‌های کلیدی

آنزیم‌های ضد اکسنده،
پیری،
تنش کمبود آب،
جو،
دوره زایشی

در این تحقیق، فرضیه اثر آنزیم‌های ضد اکسنده بر میزان کاهش آسیب‌پذیری گیاه در دوره زایشی ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن مورد بررسی قرار گرفته است. لذا اثر تنش آب در تغییر فعالیت آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) و سوپراکسید دسموتاز (SOD) در دوره زایشی گیاه جو (۵ مرحله) با اعمال ۳ تیمار آبی، دیم و خشکی در شرایط مزرعه با استفاده از روش‌های سنجش اسپکتروفتومتری و سنجش ژل مطالعه شد. آزمایش در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار اجرا و به صورت فاکتوریل (۳ نوع تنش × ۵ مرحله رشد × ۵ ژنوتیپ) تجزیه گردید. در نتیجه تجزیه واریانس، تمام اثرات ساده و متقابل عوامل مورد مطالعه معنی‌دار شد. بر اساس نتایج بدست آمده، میزان پروتئین و کلروفیل کل گیاه در مراحل آخر رشد گیاه کاهش معنی‌داری داشت. فعالیت همه آنزیم‌ها در مراحل اولیه دوره زایشی ابتدا افزایش یافته و سپس در مراحل آخر، فعالیت آنها قدری کاهش نشان داد. اگر چه این کاهش معنی‌دار بود ولی اختلاف شدیدی با مراحل اول نداشت. در مقایسه با تغییرات شدید کاهش پروتئین کل سلولی، در مجموع آنزیم‌های ضد اکسنده مورد مطالعه از افزایش بیان برخوردار بودند. در بین این آنزیم‌ها دو آنزیم اسکوربیت پراکسیداز و کاتالاز بویژه در دو تیمار دیم و خشکی فعالیت بیشتری در حفاظت سلول‌ها از خود نشان دادند. مطالعه فعالیت آیزوآنزیم این آنزیم‌ها، نتایج بدست آمده را تأیید کرد. از نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آنزیم‌های مورد بررسی در حفاظت سلول در مقابل عوامل رادیکال‌های آزاد تولید شده بر اثر تنش خشکی در دیم زارها نقش اساسی دارند.

مقدمه

یک سیستم ضد اکسنده تجهیز کرده‌اند، معه‌ذا اگر تولید رادیکال‌های اکسیژن فعال به هر دلیلی بیشتر شود یا ظرفیت ضد اکسنده‌ها کاهش یابد، نتیجه آن به صورت تنش اکسیداتیو که در واقع بهم خوردن تعادل بین این دو عامل است، ظاهر می‌شود (۱۹). سیستم آنزیمی شامل آنزیم‌هایی همچون سوپراکسید دسموتاز، گوئیکول پراکسیداز، کاتالاز، اسکوربیت پراکسیداز، گلوکاتایون پراکسیداز و برخی آنزیم‌های دیگر می‌باشد. آنزیم سوپر اکسید دسموتاز یک آنزیم حد واسط بوده و رادیکال‌های آزاد سوپر اکسید را به O_2 و H_2O_2 تبدیل می‌کند. بقیه آنزیم‌ها در پاکسازی مولکول‌های H_2O_2 تولید شده در سلول، ایفای نقش می‌نمایند. نقش و تأثیر ضد اکسنده‌ها در محافظت گیاه از تنش‌های اکسیداتیو، با استفاده از گیاهان تراریخته‌ای که در آنها سطوح برخی از ضد اکسنده‌ها افزایش یافته بود، ثابت شده است. تغییر در بیان و فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده، در چندین گونه از گیاهان در پاسخ به شرایط بد محیطی از قبیل کمبود آب و نیز دیگر تنش‌های غیر زنده، تنش‌های زنده و تحریکات رشدی مشخص شده است (۲).

تا کنون مطالعات مختلفی در خصوص اثرات عوامل تنش زا بویژه شوری (۲۰ و ۲۱) و خشکی (۱۴، ۲۲ و ۳۰) بر روی آنزیم‌های ضد اکسنده در گیاه جو صورت گرفته است. در بررسی اثر تنش شوری بر افزایش آسیب ناشی از تجمع ضد اکسنده‌ها در جو، حضور اکسید نیتریک موجب افزایش آنزیم‌های SOD، APX و CAT و لذا کاهش صدمات ناشی از نمک گردید (۲۰). در مطالعه تاثیر تنش‌های غیر هوازای بر روی رشد ریشه‌های جو میزان فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون اس ترانسفراز (GST) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) بررسی شده و مشاهده شد که کادمیوم و جیوه با میزان تجمع دو آنزیم یاد شده همبستگی بالایی دارند (۱۴). عناصر سنگین دیگر نظیر سرب، نیکل، روی و کبالت GST را قدری افزایش داده، ولی بر روی تجمع GPX تاثیری نداشتند. در همین کاوش اثرات سرما، گرما و خشکی بر روی ریشه‌های جو بررسی شده و ملاحظه شد که این تیمارها بر روی بیان GPX اثری ندارند، ولی در حضور H_2O_2 موجب افزایش GPX می‌گردند. در مطالعه‌ای دیگر در بررسی اثر سیلیکون در دو رقم

پیری دوره‌ای از رشد گیاه است که طی آن مولکول‌های درشت شکسته شده و مواد حاصله به سایر بخش‌های گیاه، بویژه بذر، مهاجرت می‌نمایند. این مرحله تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر شرایط محیطی و قابلیت‌های ژنتیکی قرار داشته و تنش ناشی از کمبود آب در دوره زایشی گیاه، آنرا تشدید می‌نماید. پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به عنوان یکی از مواد تولید شده در چرخه فیزیولوژی تولید مواد سلولی و نیز واسطه نشانه مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Programmed Cell Death) غالباً در جریان پراکسیداسیون چربی غشاء مصرف می‌شود. گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species) و رادیکال‌های آزاد از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده پیری می‌باشند که در شرایط تنش ناشی از کمبود آب افزایش می‌یابند. بدین ترتیب که با اکسیداسیون گلیسرولپیدها و فسفولیپیدهای غشای سلولی باعث می‌شوند که این غشاها نقش زیستی خود را در جریان فرایند پیری از دست بدهند (۱۱، ۱۹ و ۲۶). افزایش سن در گیاه موجب تحریک گیاه به پاسخ‌های دفاعی در سطوح مختلف مولکولی، سلولی و فیزیولوژیکی می‌شود. پیری، تنش‌ها و تحریکات رشدی در گیاه باعث افزایش مقادیر انواع اکسیژن فعال از قبیل: آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (HO^{\cdot}) و اکسیژن منفرد (O_2^1)، می‌شود. این مولکول‌های فعال موجب صدمه به ماکرو مولکول‌ها و نیز ساختار سلولی گردیده، یا اینکه به عنوان مولکول منفرد موجب فعال شدن سلسله پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌گردند (۲۶ و ۲). به طور کلی، ضد اکسنده‌ها می‌توانند در یک یا چند مرحله از مراحل پراکسیداسیون چربی‌ها شرکت کرده و از عمل فوق در یکی از مراحل شروع، توسعه و خاتمه یا شروع مجدد، جلوگیری بعمل آورند (۷). گیاهان از دو سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی برای دفاع در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال استفاده می‌نمایند (۲). سیستم دفاعی ضد اکسنده در حالت طبیعی در تعادل با سرعت تولید رادیکال‌های فعال می‌باشد و این امر در انجام فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاه مثل التیام زخم‌ها، دفاع در مقابل آفات و بیماری‌ها و غیره نقش دارد. در طی تکامل، ارگانیزم‌ها خود را با

گندم مطالعه گردیده (۱۲)، ولی اثر این ماده در تنش خشکی گیاه جو در مزرعه طی سال‌های اخیر بویژه در نواحی مرکزی ایران صورت نگرفته است. لذا با توجه به اهمیت آنزیم‌های ضد اکسنده در ایجاد مقاومت در گیاهان زراعی بویژه در اراضی کشت دیم، در تحقیق حاضر روند تغییر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و اسکوربیت پراکسیداز در دوره زایشی گیاه جو تحت سه تیمار مختلف آب یعنی آبیاری کامل، شرایط دیم و تنش کمبود آب (خشکی) در شرایط طبیعی مزرعه بررسی گردید. نتایج حاصل از این مطالعه تجزیه آماری شده و فعالیت آنزیم‌ها توسط نمودار و ژل نشان داده شده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مزرعه گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی طی سال زراعی ۸۴-۸۳ اجرا گردید. زمین مزرعه در فصل پائیز شخم و دیسک زده شده و به میزان ۲۰ تن در هکتار کود دامی به آن اضافه گردید. پس از نرم کردن زمین، بذور پنج ژنوتیپ منتخب گیاه جو دو پر (جدول ۱) که از محل کلکسیون ژنوتیپ جو دو پر موجود در گروه مذکور که اصالتا متعلق به توده کلکسیون جو دو پر پردیس کشاورزی کرج بوده و طی آزمایشات قبلی در شرایط دیم استان باختران (۱۳۶۶-۱۳۷۰) کشت و انتخاب شده بودند، به فاصله ۲۵ سانتی‌متر از یکدیگر و با تراکم کشت بذر ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار (۳۰۰ بذر در متر مربع) در تاریخ نیمه اول آبان ۱۳۸۳ در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار کشت گردید.

حساس و مقاوم جو، اثرات این تیمار بر روی فسفو لیپیدها و آنزیم H^+ -ATP غشاء دیواره سلولی و میزان کاهش گلوکاتینون (GSH) در شرایط تنش شوری بررسی شد (۲۱). نتایج نشان داد که حضور سیلیکون موجب کاهش صدمات سلول توسط اکسنده‌های فعال ناشی از تنش شوری شده و مقاومت گیاه را افزایش می‌دهد. در یکی از بررسی‌ها، اثر پلی اتیلن گلیکول و آبسیدیک اسید بر روی β -آمیلاز، H_2O_2 و ABA دانه در شرایط تنش اسمزی در دوره زایشی گیاه جو نشان داد که میزان β -آمیلاز دانه با H_2O_2 همبستگی مثبت داشته و افزایش می‌یابد، در حالی‌که با ABA همبستگی منفی داشته و کاهش می‌یابد (۳۰). همچنین میزان این ماده در حضور تیمار پلی اتیلن گلیکول به عنوان عامل تنش‌زای آبی، با میزان H_2O_2 همبستگی نشان داده ولی با ABA همبستگی ندارد. در مطالعه‌ای دیگر اثر سطوح مختلف آب و ۲-آمینو اتانول بر روی رشد و عملکرد گیاه جو در شرایط مزرعه و گلدان بررسی شد (۲۲). در شرایط تنش خشکی، پیش‌درمانی گیاه با ۲-آمینو اتانول موجب افزایش عملکرد دانه گیاه بین ۳۰-۵ درصد گردید. گیاهان تیمار شده با این ماده وقتی در معرض تنش خشکی قرار گرفتند، مقدار کمتری کلروفیل از دست داده و رشدشان نیز بهبود یافت. فعالیت برخی از هم‌شکلی‌های ضد اکسنده SOD نیز بر اثر حضور این ماده در شرایط تنش خشکی افزایش یافت. این تحقیق نشان داد که پیش‌درمانی با ۲-آمینو اتانول موجب افزایش مقاومت جو در مقابل اکسنده‌ها که در شرایط تنش خشکی افزایش یافته‌اند، می‌گردد. با بررسی اجمالی در منابع موجود، اگرچه اثر سیلیکون در تنش خشکی در گلدان ضمن بررسی آنزیم‌های ضد اکسنده، بر روی

جدول ۱- برخی مشخصات زراعی ژنوتیپ‌های بکار برده شده در طرح.

شماره ژنوتیپ	ارتفاع بوته (سانتی متر)	فاصله برگ پرچم تا زیر خوشه (سانتی متر)	طول برگ پرچم (سانتی متر)	عرض برگ پرچم (سانتی متر)	وزن هزار دانه (گرم)	متوسط عملکرد دانه (کیلو گرم / هکتار)
۱	۵۸	۱۵/۶	۹/۱	۰/۸	۳۴/۷۸	۱۵۱۹
۲	۶۵	۱۴/۳	۸/۶	۰/۸۶	۳۷/۵۶	۱۴۵۸
۳	۶۴	۱۸/۳	۱۱/۲	۰/۸۳	۳۴/۶۲	۱۵۸۲
۴	۶۰	۱۵/۱	۸/۶	۰/۶۷	۳۲/۳۶	۱۲۸۸
۵	۷۳	۱۴/۳	۹/۱	۰/۵۳	۳۳/۶۶	۱۲۷۹

(۱۶)، آنزیم اسکوربیت پراکسیداز از روش راثو و همکاران (۲۴) و آنزیم سوپراکساید دسموتاز از روش بیوشامپ و فریدوویچ (۵) استفاده گردید. به منظور تجزیه آماری داده‌ها، از نرم افزارهای Excel و SPSS استفاده گردید. گروه‌بندی آماری میانگین داده‌ها به روش دانکن در سطح ۱٪ انجام شد. به علت از بین رفتن برخی از ژنوتیپ‌ها در مرحله پنجم (مرحله آخر رشد) تیمارها دیم و خشکی، داده‌های گم شده به وسیله تخمین رگرسیونی برآورد و جایگذاری شد. با توجه به عنوان تحقیق، از ژنوتیپ‌ها میانگین گرفته شده و نتایج برای مراحل مختلف رشد گیاه به تفکیک صفات نشان داده شده است.

نتایج و بحث

در این تحقیق، بدلیل معنی‌دار نشدن اثرات بلوک برای صفات مورد مطالعه، تجزیه در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. نتایج میانگین مربعات تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در جدول ۲ آمده است. از آنجایی که برای اولین بار چنین آزمایشی در شرایط خشکی و دیم در مزرعه مطالعه می‌شد و اهمیت عوامل مورد نظر در چنین وضعیتی قابل رتبه‌بندی نبود، لذا تجزیه به صورت فاکتوریل برای داده‌ها اعمال گردید. در نتیجه تجزیه واریانس، تقریباً کلیه نتایج اثرات ساده و متقابل برای صفات مورد بررسی و بیشتر در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. معنی‌دار شدن اثرات متقابل حاکی از وجود اثرات کاهنده و یا افزایشنده در خصوص صفات مربوطه بر روی یکدیگر می‌باشد که از بحث در این خصوص خودداری شده است. در تجزیه فعالیت پروتئین کل، باندی که وزن مولکولی آن $2/124 \pm 55$ KD بود، به عنوان باند پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم رایبیسکو (rbcl) در نظر گرفته شد. تعیین باند پروتئینی با وزن مولکولی ۵۵ KD به عنوان باند پروتئین rbcl به وسیله دیگران نیز گزارش شده است (۱۰ و ۱۵). در این تجزیه، در مراحل رشد تیمار آبی تفاوت معنی‌داری در غلظت پروتئین مشاهده نشد (شکل ۱) که علت آن می‌تواند نبود تنش کمبود آب در گیاه باشد. اما در مورد تیمارهای دیم و خشکی، کاهش معنی‌داری در مرحله دوم رشد مشاهده شد که با نتایج سایر محققین از جمله جانگ (۱۷) و بای و سوئی (۴)

آزمایش به صورت فاکتوریل با سه عامل تغییر ۱- سه نوع تنش کمبود آب ۲- پنج مرحله رشد و ۳- پنج ژنوتیپ تجزیه شد. در تیمار آبی، گیاهان ۲۴ ساعت قبل از هر نمونه‌برداری آبیاری غرقابی شدند. برای تیمار دیم آبیاری صورت نگرفت و میزان آب دریافتی گیاه، بستگی به نزولات آسمانی داشت. برای تیمار خشکی به منظور جلوگیری از دسترسی گیاه به آب، از اول بهار و در طول مدت زایشی، سطح گیاهان به کمک چهار پایه فلزی و پلاستیک پوشانده شد. طول دوره آزمایشی در مرحله زایشی گیاه و به مدت ۴۰ روز بود و در این مدت، طی ۵ مرحله (شروع خوشه دهی، خوشه کامل، دانه بستن، سفت شدن دانه و رسیدن کامل دانه) برای هر تیمار نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها پس از انجماد در ازلت مایع، تا مرحله استخراج پروتئین در فریزر 80°C - نگهداری شدند. به منظور استخراج پروتئین از برگ‌های فریز شده (۱ g)، از روش حداد و همکاران (۱۳) استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین و کلروفیل به ترتیب از روش بردفورد (۷) و روش آرنون (۳) استفاده شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش ابی (۱)، آنزیم پراکسیداز از روش شانس و مهلی (۹)، آنزیم اسکوربیت پراکسیداز از روش ناکانو و اسادا (۲۳)، آنزیم سوپراکساید دسموتاز از روش بیوشامپ و فریدوویچ (۵)، برای الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) و همچنین آشکار سازی فعالیت آیزوزایم‌های آنزیمی (Native-PAGE) از روش لاملی (۱۸) استفاده گردید. برای ژل پروتئین در هر چاهک ۵ میکرولیتر پروتئین و برای ژل آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکساید دسموتاز به ترتیب ۳۰، ۲۰، ۸۰ و ۴۰ میکروگرم پروتئین بارگذاری شد. جهت اعمال میانگین فعالیت ژنوتیپ‌ها برای سنجش فعالیت آنزیم در ژل مربوطه، حجم پروتئین مورد نیاز بارگیری به تفکیک هر مرحله از رشد در ۵ قسمت مساوی از هر ژنوتیپ برداشته شده و پس از مخلوط کردن بارگیری شد. برای آنزیم کاتالاز از ژل اکریل آمید ۶٪ و برای آنزیم‌های پراکسیداز، اسکوربیت پراکسیداز و سوپراکساید دسموتاز از ژل اکریل آمید ۱۰٪ استفاده شد. به منظور مشاهده فعالیت آیزوزایم‌های آنزیم کاتالاز از روش رنگ‌آمیزی روبرتسون و همکاران (۲۵)، آنزیم پراکسیداز از روش هارت و همکاران

در واقع در اثر تنش کمبود آب وارد شده، گیاه در مراحل اولیه رشد فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده را القاء یا افزایش داده و بدین ترتیب از صدمات ناشی از تجمع اکسنده‌ها به ماکرومولکول‌های آلی گیاهی می‌کاهد. ولی تحت تنش کمبود آب و در مراحل آخر رشد، به علت تنش شدید وارد شده گیاه، فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده متناسب با کاهش مواد در سلول گیاه کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر با کاهش مواد ذخیره شده آلی در انتهای مراحل زایشی و در نتیجه کاهش سرعت شکسته شدن ماکرومولکول‌ها و مهاجرت آنها از مبدأ به مقصد (بذر)، فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده نیز کاهش می‌یابد. هر چند که این کاهش فعالیت آنزیم‌ها، همانطوری که در نمودارها و شکل‌های مربوطه نیز مشخص است، شدید نمی‌باشد. در مجموع روند فعالیت آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیداز دسموتاز بر اساس مراحل رشد در مراحل آخر رشد گیاه جو و تحت تنش کمبود آب با مطالعات قبلی صورت گرفته در این زمینه در سایر گیاهان مطابقت داشته و این نتایج را تأیید کرد. از جمله می‌توان به بررسی تاثیر تنش خشکی بر روی فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در ذرت (۴) و مطالعه تغییر فعالیت این آنزیم‌ها در برگ پرچم‌های گندم در مراحل رشد و نمو مختلف آن اشاره کرد (۶، ۸ و ۲۶).

همچنین در تحقیق حاضر، همبستگی صفات مورد مطالعه بر اساس مراحل رشد زایشی تیمارهای دیم و خشکی بررسی شد (جدول ۳). بر اساس نتایج بدست آمده، فعالیت آنزیم APX در مراحل رشد ۲، ۳ و ۴ تیمار آبی، مراحل ۲ و ۵ تیمار دیم و مراحل ۳، ۴ و ۵ تیمار خشکی با فعالیت آنزیم POX همبستگی مثبت معنی‌داری نشان داد. لذا مشابه برخی نتایج محققین دیگر (۲ و ۲۰) به نظر می‌رسد که فعالیت همزمان این دو آنزیم در مراحل آخر رشد گیاه بویژه تحت تیمار خشکی به منظور دفاع در مقابل رادیکال‌های آزاد ضروری به نظر می‌رسد. از طرفی دیگر فعالیت آنزیم SOD تحت تنش تیمار خشکی و در تمامی مراحل رشد همسو با فعالیت آنزیم‌های APX و POX بود که نشان می‌دهد همزمان با فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و اسکوربیت پراکسیداز که وظیفه سم زدایی H_2O_2 را بر عهده دارند، فعالیت آنزیم

مطابقت داشت. با توجه به افزایش باند بزرگ رایبیسکو (۵۵ KDa) در شرایط تنش خشکی (شکل ۱) یکی از دلایل آن اثر افزایش دما و در نتیجه تنش ناشی از خشکی در زمان دانه بندی گیاه می‌باشد (۲۹). در مورد غلظت کلروفیل، بر اثر اعمال هر سه نوع تیمار طی مراحل مختلف رشد این ماده کاهش یافت. این کاهش در مراحل آخر رشد نسبت به مراحل اولیه آن بیشتر و معنی‌دار بود که با برخی نتایج ثبت شده (۲۷ و ۲۸) مطابقت داشت.

به علت کاهش شدید میزان پروتئین در مرحله آخر رشد گیاهان تحت شرایط دیم و خشکی، پروتئین استخراج شده در برخی نمونه‌ها فقط برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر کفایت نمود. در تطابق نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم بروش اسپکتروفتو متری در نمودارها با سنجش فعالیت در ژل‌های مرتبط، در تعداد اندکی از چاهک‌های ژل مربوط به مراحل رشد (۴ چاهک از مجموع ۵۲ چاهک) تطابق کامل وجود ندارد. لیکن به علت اتمام پروتئین‌های استخراج شده و اهمیت نشان دادن میزان فعالیت آنزیم‌ها در مراحل رشد، استفاده از میانگین اینگونه فعالیت‌ها توصیه می‌گردد. در مورد نحوه تغییر فعالیت آنزیم‌های چهار گانه ضد اکسنده بر اساس مراحل رشد و به تفکیک تیمارهای آبی، دیم و خشکی تقریباً روند متناسب و موزونی دیده شد. در تیمار آبی، در مراحل اولیه رشد زایشی فعالیت آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز و کاتالاز ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت. در حالیکه فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسیداز دسموتاز از ابتدا روندی افزایشی داشت. در مجموع فعالیت تمامی این آنزیم‌ها در مراحل آخر رشد افزایش یافت (شکل ۲). می‌توان گفت که در تیمار آبی، به علت نبود تنش کمبود آب در گیاه، نیازی به افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در مراحل اولیه رشد نبوده است. ولی به تدریج که گیاه پیر شده و تنش وارد شده افزایش یافت، ژنوم گیاه برای محافظت سلول‌ها در برابر مولکول‌های اکسیژن فعال، فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده را القاء کرده و افزایش می‌دهد. در تیمارهای دیم و خشکی اگرچه تمام آنزیم‌ها افزایش یافتند، ولی ابتدا در مراحل اولیه رشد زایشی گیاه فعالیت این آنزیم‌ها افزایش یافته و سپس با ورود گیاه به مراحل آخر رشد، فعالیت آنها به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد.

آنزیم‌های ضد اکسنده افزایش بیان دو آنزیم اسکوربیت پروکسیداز و کاتالاز بویژه برای دو تنش دیم و خشکی بارزتر بوده است و لذا نقش این دو آنزیم در حفاظت سلول‌ها از تنش اعمال شده بیشتر می‌باشد. به طور کلی، دوره زایشی و سن گیاه اثر معنی‌داری بر روی فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده مورد مطالعه در این تحقیق نشان داد. در بررسی جامع‌تر با تطبیق فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی در مرحله رویشی و نیز بررسی همزمان آنزیم‌های دیگر در مراحل رویشی و زایشی، ضمن بررسی عوامل غیر آنزیمی حفاظت سلول در مقابل تنش‌ها، تبیین نقش این آنزیم‌ها دقیق‌تر خواهد بود. همسانه سازی این ژن‌ها، ضمن جمع بندی با نتایج سایر محققین در مطالعات تنش خشکی، در تولید گیاه جو با مقاومت بیشتر در مقابل تنش‌های سالیانه خشکی بویژه در دیم زارها جهت افزایش عملکرد گیاه، کمک موثری در ارتقاء سطح در آمد کشاورزان تولید کننده خواهد بود. همچنین با توجه به اینکه در این آزمایش از ژنوتیپ‌های مختلف استفاده شده و اثر متقابل تیمار تنش و ژنوتیپ برای ۴ آنزیم معنی‌دار شده است، بنابراین بررسی ژنوتیپ‌ها به صورت مستقل با اعمال تنش بکار برده شده توصیه می‌شود تا در نتیجه آن آلل‌های مقاومت شناسایی و از آن‌ها در اهداف اصلاحی ایجاد ارقام مقاوم استفاده گردد.

سوپراکسید دسموتاز نیز موجب تجزیه و تبدیل رادیکال خطرناک سوپراکسید به H_2O_2 و O_2 می‌گردد. جانگ (۱۷) در سال ۲۰۰۴ گزارش کرد که افزایش همزمان فعالیت آنزیم‌های CAT، POD، SOD و GR در مراحل آخر رشد گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) موجب کاهش رادیکال‌های آزاد و لذا افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش خشکی می‌گردد. نتایج حاصل از نحوه فعالیت آیزوزایم‌های مختلف این آنزیم‌ها با نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنها مطابقت داشت و نتایج قبلی را که پیشتر بحث شد، تأیید کرد (شکل ۲). تعداد آیزوزایم هر آنزیم توسط فلش بطور تقریب نشان داده شده است. جهت اطمینان کامل از تعدا آیزوزایم‌های هر آنزیم، استفاده از روش ایزو الکترو فوکویزینگ (Isoelectro Focusing) با pH های متفاوت قابل توصیه است (۳۱). در مجموع با توجه به کاهش چشمگیر میزان پروتئین در دو تیمار دیم و خشکی، کاهش میزان آنزیم‌های ضد اکسنده بعنوان بخشی از پروتئین موجود سلولی، از تناسب متعادلی برخوردار نبوده است و لذا در بررسی کلی و مقایسه شدت کاهش پروتئین و آنزیم‌های مورد بررسی می‌توان ابراز نمود که مشابه یکی از منابع (۲۱)، غلظت حضور آنزیم‌ها نسبت به پروتئین آن‌ها بالاتر بوده است. بنابر این با کاهش پروتئین طی هر مرحله از رشد، آنزیم‌ها افزایش بیان داشته‌اند. در بین این

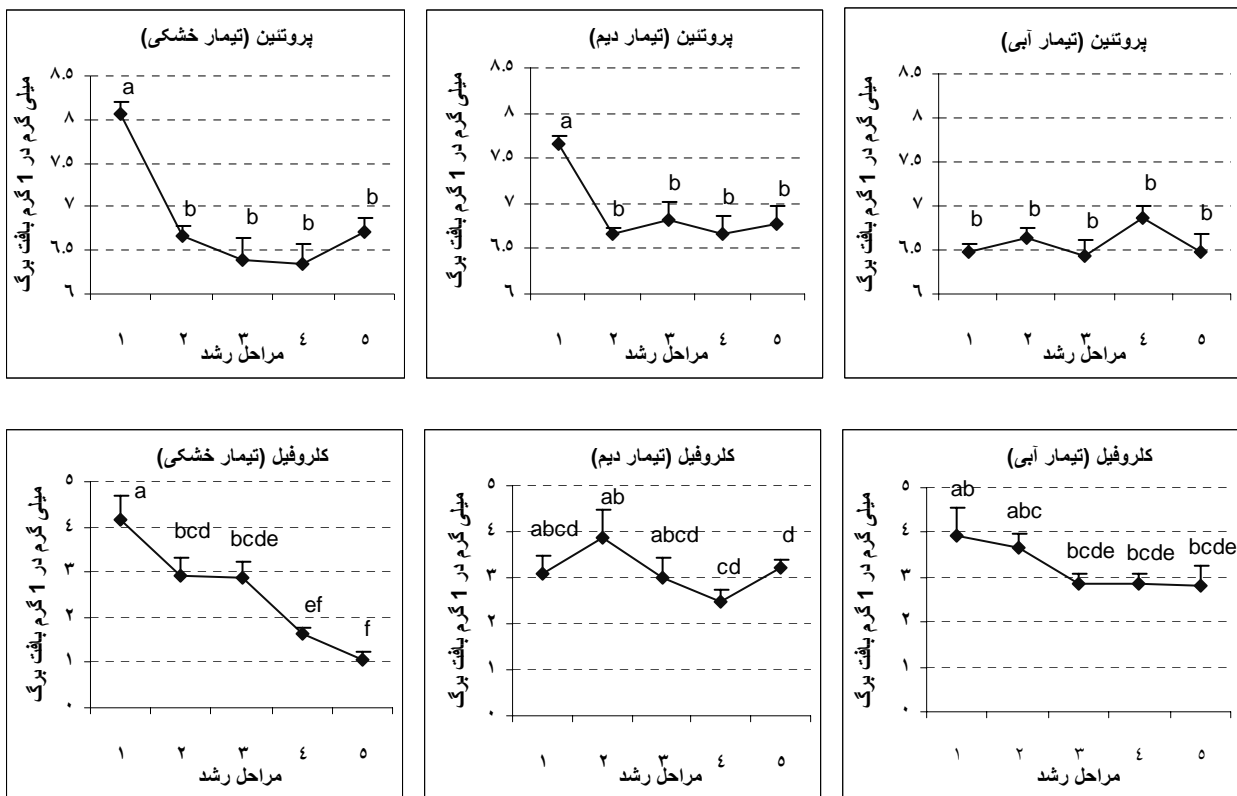
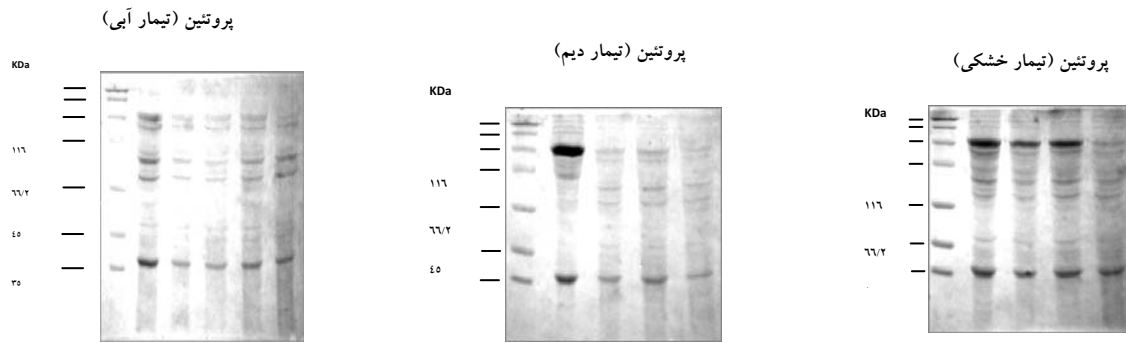
جدول ۲- میانگین مربعات تجزیه واریانس غلظت‌های پروتئین کل و کلروفیل (بر حسب میلی گرم در یک گرم بافت برگ)، فعالیت آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) (بر حسب میکرومولار H_2O_2 تجزیه شده در یک میلی گرم پروتئین و در یک دقیقه) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD) (بر حسب یونیت در یک میلی گرم پروتئین).

میانگین مربعات

منبع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین	کلروفیل	APX	CAT	POX	SOD
تیمار تنش (T)	۲	۴/۸**	۱۶/۹**	۵۸۱۵*	۱۴۹۵۳**	۱۷۳۵۲۸۰۶**	۵۸۸۴/۱**
مراحل رشد (GS)	۴	۱۰/۹**	۴۶۷**	۱۱۱۵۲۳**	۷۴۹۱**	۳۱۳۵۷۷۶**	۹۸۳/۱**
ژنوتیپ (V)	۴	۴/۱**	۱۷/۷**	۲۲۹۷۱ ^{ns}	۱۰۹۷۷**	۸۹۷۵۶۶**	۲۶۲/۹ ^{ns}
اثر متقابل (T × GS)	۸	۵/۳**	۸/۳**	۸۷۶۲۹۵**	۱۱۴۳۸**	۲۲۰۶۷۷۹**	۱۲۲۳/۵**
اثر متقابل (T × V)	۸	۱/۱**	۱۳/۹**	۹۷۲۵۶**	۴۲۱۵**	۳۱۳۹۳۲**	۴۷۲/۱**
اثر متقابل (GS × V)	۱۶	۱/۹**	۵/۹*	۵۰۴۸۰**	۲۰۰۰**	۲۳۶۶۶۸**	۳۵۰/۶**

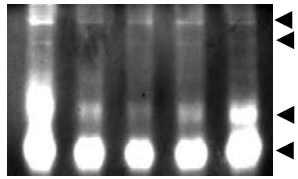
۳۳۰/۶**	۲۰۸۶۱۲**	۳۷۰۹**	۸۱۹۱۳**	۱۱/۷**	۲/۱**	۳۲	اثر متقابل (T × GS × V)
۱۱۷/۰	۸۴۰۴۰	۸۲۰	۱۸۵۵۴	۳/۳	۰/۶	۱۵۰	خطای آزمایشی
۲۰/۱۸	۵۰/۱۶	۱۷/۹۴	۱۹/۲۷	۶۳/۵۳	۱۱/۹۷		% CV

* = در سطح ۰.۵٪ معنی دار می‌باشد. ** = در سطح ۱٪ معنی دار می‌باشد. ns = غیر معنی دار.

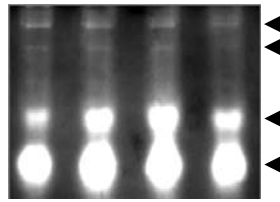


شکل ۱- تغییر غلظت و تعداد باندهای پروتئین کل و کلروفیل بر اساس مراحل رشد زایشی گیاه در تیمارهای مختلف به تفکیک ژل و نمودار. اعداد ۱ تا ۵ مبین مراحل رشد گیاه در ژل و نمودار می‌باشند. در تصاویر ژل به علت کاهش شدید میزان پروتئین در اثر خشکی شدید در مرحله آخر رشد، مرحله پنجم رشد مشاهده نمی‌شود. در ترسیم نمودارها از میانگین داده‌های حاصل از پنج ژنوتیپ استفاده شده است.

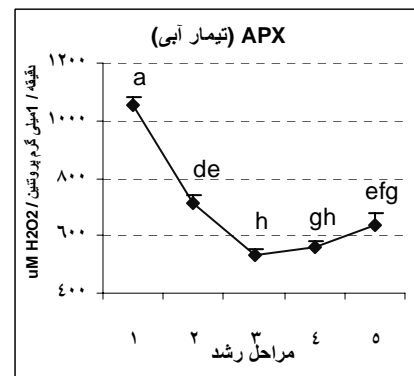
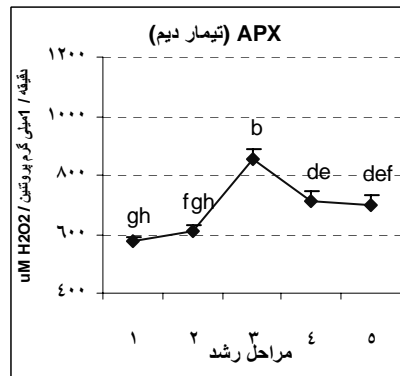
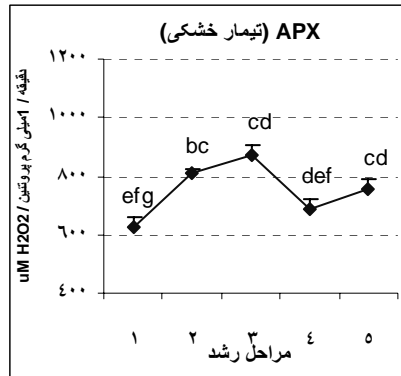
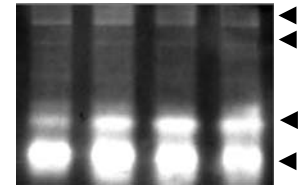
APX (تیمار خشکی)



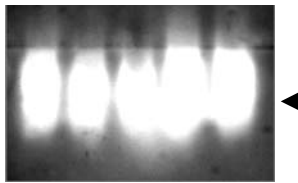
APX (تیمار دیم)



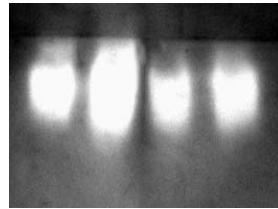
APX (تیمار آبی)



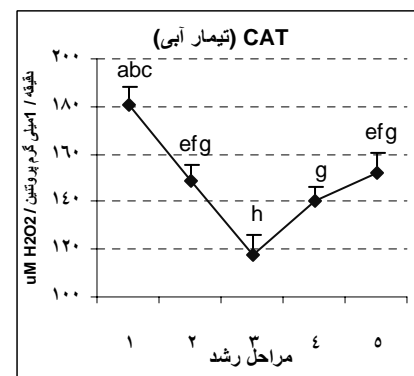
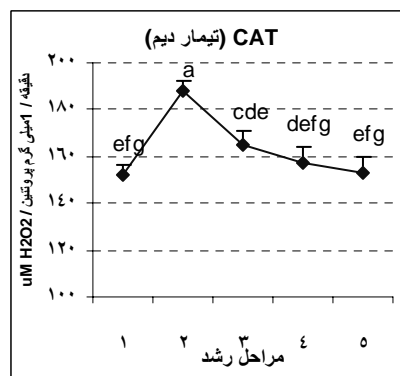
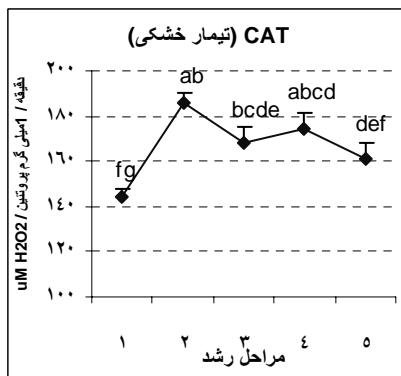
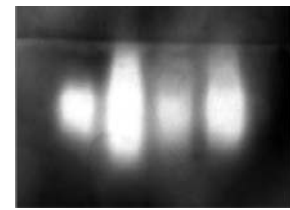
CAT (تیمار خشکی)

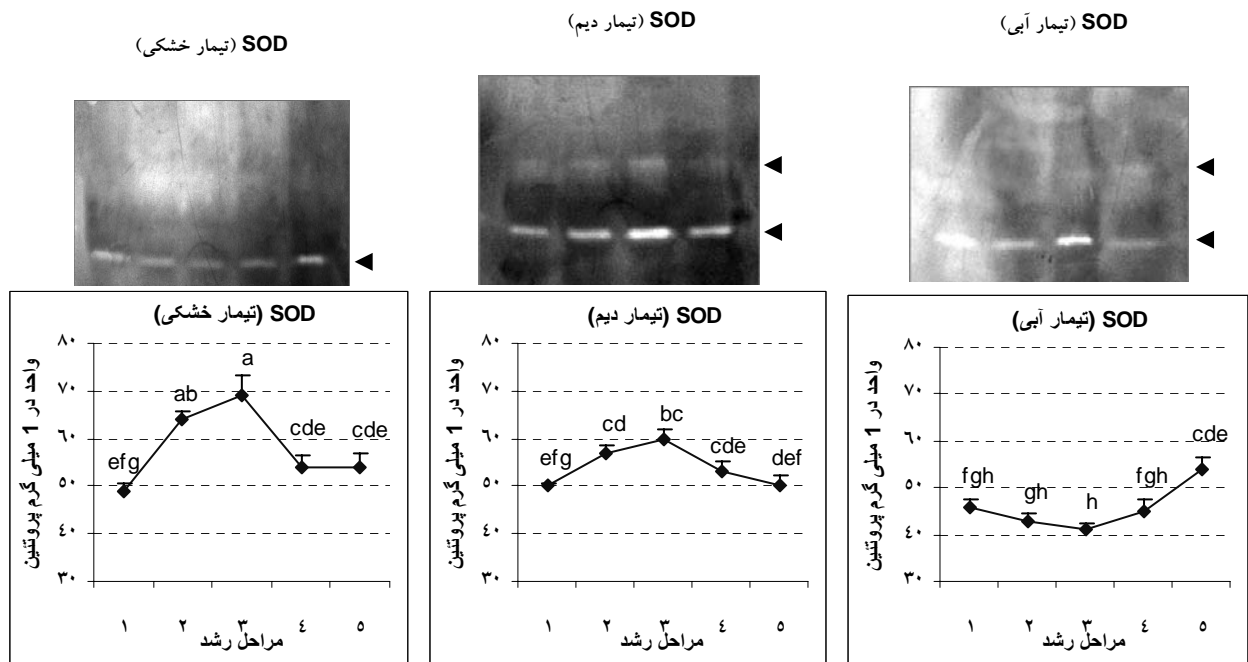
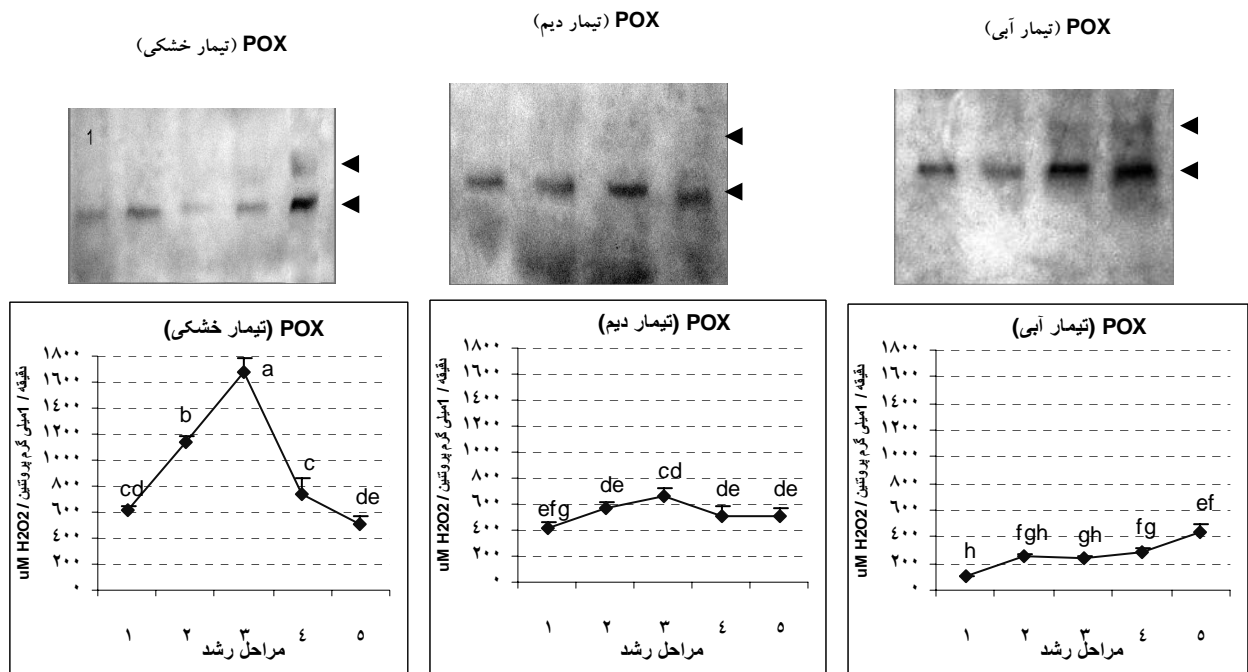


CAT (تیمار دیم)



CAT (تیمار آبی)





شکل ۲- تغییر غلظت و تعداد باندهای آنزیم‌های مورد بررسی بر اساس مراحل رشد زایشی گیاه در تیمارهای مختلف. روند تغییر غلظت و فعالیت آیزوایمی آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز بر اساس مراحل رشد زایشی در تیمارهای مختلف به تفکیک ژل و نمودار نشان داده شده است. در تصاویر ژل، فلش‌ها تعداد آیزوایم‌ها را نشان می‌دهند. در این تصاویر، به علت کاهش شدید میزان پروتئین در اثر خشکی شدید در مرحله آخر رشد، مرحله پنجم رشد مشاهده نمی‌شود. در ترسیم نمودارها از میانگین داده‌های حاصل از پنج ژنوتیپ استفاده شده است.

جدول ۳- همبستگی بین صفات مورد مطالعه بر اساس مراحل رشد زایشی گیاه (S) تحت تیمارهای آبی، دیم و خشکی در سطوح احتمال ۱٪ و ۵٪.

مرحله رشد	تیمار خشکی				تیمار دیم				تیمار آبی			
	S2	S3	S4	S5	S2	S3	S4	S5	S2	S3	S4	S5
POX SOD	• ns	•/۷۹ **	•/۷۲ **	•/۴۸ **	•/۰۷ ns	•/۲۲ ns	•/۳۳ ns	•/۳۵ ns	-•/۱۹ ns	•/۲۲ ns	•/۰۵ ns	•/۴ *
CAT PRO	-•/۰۶ ns	-•/۴۸	-•/۴۲ *	•/۱۹ ns	•/۲۲ ns	-•/۰۲ ns	-•/۰۹ ns	-•/۰۳ ns	•/۴۹ **	•/۲۹ ns	-•/۰۴ ns	-•/۱۷ ns
CAT CHL T	•/۱۶ ns	•/۱۳ ns	•/۱۳ ns	-•/۰۳ ns	•/۱۷ ns	•/۲۲ ns	•/۰۹ ns	•/۰۴ ns	-•/۲۹ ns	•/۲۱ ns	•/۳۴ ns	•/۳۷ *
CAT SOD	-•/۰۷ ns	•/۴۸ **	•/۲۷ ns	• ns	-•/۱۷ ns	-•/۰۱ ns	•/۰۴ ns	•/۳۳ ns	-•/۲۴ ns	-•/۰۶ ns	•/۰۲ ns	•/۰۹ ns
CAT POX	-•/۱۳ ns	•/۴۴ *	-•/۰۹ ns	•/۰۵ ns	•/۱۳ ns	•/۲۶ ns	•/۱۱ ns	•/۴۱ *	-•/۲۴ ns	-•/۴۲	•/۳۸ *	•/۲۴ ns
APX PRO	-•/۵۴ **	-•/۴۶ *	-•/۰۳ ns	•/۰۶ ns	-•/۳۸ *	-•/۰۵ ns	•/۱۹ ns	-•/۳۲ ns	-•/۱۰ ns	-•/۲۳ ns	-•/۰۵ ns	-•/۱۱ ns
APX CHL T	•/۰۴ ns	•/۳۵ ns	•/۱۵ ns	•/۱۶ ns	-•/۱۸ ns	-•/۲۴ ns	•/۲۴ ns	•/۰۲ ns	-•/۳۳ ns	-•/۰۷ ns	•/۲۵ ns	•/۰۳ ns
APX SOD	•/۷۲ **	•/۶ *	•/۶۱ **	•/۵۷ **	•/۲۷ ns	-•/۰۱ ns	•/۱۰ ns	•/۰۳ ns	•/۱۹ ns	•/۲۹ ns	•/۰۲ ns	•/۰۵ ns
APX POX	-•/۱۷ ns	•/۳۶ *	•/۳۷ *	•/۲۸ *	•/۵۷ **	•/۳۱ ns	•/۰۹ ns	•/۴۱ *	•/۵۶ **	•/۶۹ **	•/۷۲ **	•/۰۱ ns
APX CAT	-•/۰۱ ns	•/۶۲ **	•/۳۵ ns	-•/۰۲ ns	-•/۱۵ ns	•/۱۱ ns	•/۰۲ ns	•/۲۷ ns	•/۱۹ ns	•/۱۷ ns	•/۴۹ **	•/۶۴ **
PRO CHL T	-•/۰۳ ns	•/۰۶ ns	-•/۱۱ ns	•/۱۳ ns	•/۲۹ ns	•/۱۲ ns	-•/۳۹ *	•/۰۷ ns	-•/۴۴ **	-•/۳۵ ns	-•/۰۵ **	-•/۰۶ ns
SOD PRO	-•/۶۶ **	-•/۰۹ **	-•/۶۶ **	-•/۱۷ ns	-•/۲۶ ns	-•/۰۸ **	-•/۵۸ **	-•/۳۶ ns	-•/۱۵ ns	-•/۳۳ ns	-•/۰۶ ns	-•/۳۸ *
SOD CHL T	-•/۰۹ ns	•	•/۰۶ ns	•/۲۲ ns	•/۰۴ ns	•/۰۱ ns	•/۳۷ *	-•/۰۲ ns	-•/۰۱ ns	•/۱۵ ns	-•/۰۱ ns	-•/۱۳ ns
POX PRO	-•/۱۱ ns	-•/۹۳	-•/۵۲ **	-•/۲۹ ns	-•/۳۴ ns	-•/۶۵ **	-•/۴۹ **	-•/۵۸	-•/۴۴ **	-•/۳۲ ns	-•/۲۰	-•/۲۹ ns
POX CHL T	-•/۵۷ **	-•/۲ ns	-•/۰۹ ns	•/۲۶ ns	-•/۳۲ ns	-•/۰۷ ns	•/۲۲ ns	-•/۱۲ ns	-•/۰۵ ns	-•/۳۶ ns	•/۱۱ ns	• ns

منابع

- Aebi H. E. (1984) Catalase *in vitro*. Method in Enzymology, 105:121-126.
- Ariano S., Bartolomeo D., Cristos X., and Andras M. (2005) Antioxidant defences in Olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. Functional Plant Biology, 32:45-53.
- Arnon D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24:1-15.
- Bai L. P., and Sui F. G. (2006) Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. Pedosphere Journal, 16:326-332.
- Beauchamp C., and Fridovich F. (1971) Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44:276-287.
- Bender J., Weigel H. J., and Jger H. J. (1994) Response of cellular antioxidants to ozone in wheat flag leaves at different stages of plant development. Environmental Pollution, 84:15-21.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annal of Biochemistry, 72:248-254.
- Cai R., Zhang M., Yin Y., Wang P., Zhang T., Gu F., Dai Z., Liang T., Wu Y., and Wang Z. (2008) Photosynthetic characteristics and antioxidative metabolism of flag leaves in responses to nitrogen application during grain filling of field-grown wheat. Agricultural Sciences in China, 7:157-167.
- Chance B., and Maehly A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology, 2:764-817.
- Dhindsa R. A., Plumb-Dhindsa P., and Thorpe T. A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental botany. 126: 93-101.
- Gallé A., Csiszár J., Secenji M., Guóth A., Cseuz L., Tari I., Györgyey J., and Erdei L. (2009) Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: response to water deficit. Journal of Plant Physiology, 166:1878-1891.
- Gong H., Zhu X., Chen K., Wang S., and Zhang C. (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. Plant Science, 169:313-321.
- Haddad R., Morris K., and Buchanan-Wollaston V. (2004) Expression analysis of two senescence involved genes in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Journal of Agricultural Science and Technology, 6:63-72.
- Halušková L., Valentovičová K., Huttová J., Mistrík I., and Tamás L. (2009) Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. Plant Physiology and Biochemistry, Article in Press, Corrected Proof - Note to users.
- Harris G. C., Antoine V., Chan M., Nevidomskyte D., and Königer M. (2006) Seasonal changes in photosynthesis, protein composition and mineral content in Rhododendron leaves. Plant Science, 170:314-325.
- Hart M. A., Tyson H., and Bloomberg B. (1971) Measurement of activity of peroxidase isoenzymes in flax. Canadian Journal of Botany, 49:2129-2137.
- Jung S. (2004) Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. Plant Science, 166:459-466.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.
- Lee J., Koo N., and Min D. (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidant nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3:21-33.
- Li O. Y., Niu H. B., Yin J., Wang M. B., Shao H. B., Deng D. Z., Chen X. X., Ren J. P., and Li Y. C. (2008) Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 65:220-225.
- Liang Y., Zhang W., Chen Q., Liu Y., and Ding R. (2006) Effect of exogenous silicon (Si) on H⁺-ATPase activity, phospholipids and fluidity of plasma membrane in leaves of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). Environmental and Experimental Botany, 57:212-219.
- Mascher R., Nagy E., Lippmann B., Hörnlein S., Fischer S., Scheiding W., Neogoe A., and Bergmann H. (2005) Improvement of tolerance to paraquat and drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) by exogenous 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. Plant Science, 168: 691-698.
- Nakano Y., and Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by scorbate-specific peroxidase in Spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology, 22:867-880.
- Rao M. V., Paliyath G., and Ormord D. P. (1996) Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology, 110:125-136.
- Robertson E. F., Dannelly H. K., Malloy P. G., and Reeves H. C. (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. Annals of Biochemistry, 167:290-294.
- Srivalli S., and Khanna-Chopra R. (2009) Delayed wheat flag leaf senescence due to removal of spikelets is associated with increased activities of leaf antioxidant enzymes, reduced glutathione/oxidized glutathione ratio and oxidative damage to mitochondrial proteins. Plant Physiology and Biochemistry, 47:663-670.
- Suriyan C., and Chalermopol K. (2009) Proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantlets in response to iso-osmotic salt and water-deficit stress. Agricultural Sciences in China, 8:51-58.
- Tan Y., Liang Z., Shao H., and Du F. (2006) Effect of water deficits on the activity of anti-oxidant enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix astragali* at seedling stage. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 49:60-65.
- Todorov D. T., Karanov E. N., Smith A. R., and Hall M. A. (2003) Chlorophyllase activity and chlorophyll content in wild type and *eti 5* mutant of *Arabidopsis thaliana* subjected to low and high temperatures, Biol. Plant., 46:633-636.
- Wei K., Jin X., Chen X., Wu F., Zhou W., Qiu B., Qiu L., Wang X., Li C., and Zhang G. (2009) The effect of H₂O₂ and abscisic acid (ABA) interaction on β -amylase activity under osmotic stress during grain development in barley. Plant Physiology and Biochemistry, 47: 778-784.
- Yannarelli G. G., Gallego S. M., and Tomaro M. L. (2006) Effect of UV-B radiation on the activity and isoforms of enzymes with peroxidase activity in sunflower cotyledons. Environmental and Experimental Botany, 56:174-181.