

بررسی فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ‌های گندم تحت

تنش خشکی در مرحله گل‌دهی

رعنا نادری زرنقی^{۱*} و مصطفی ولیزاده^۲

(۱) عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

(۲) استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول: Naderi.rana@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۵/۰۲

چکیده

به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلوکاتایون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز در سه گروه از گندم‌های پاییزه حساس، بینابین و متحمل به خشکی در مرحله گل‌دهی تحت سه شرایط آبی عادی (۹۰FC)، تنش متوسط (۶۰FC) و تنش شدید (۳۰FC) اجرا گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد و به منظور بررسی اثر تنش در مرحله گل‌دهی فعالیت آنزیم‌های فوق با استفاده از روش سنجش اسپکتروفتومتری مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تنش خشکی بر فعالیت این آنزیم‌ها معنی‌دار بود. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های متحمل، بینابین و حساس گندم فقط برای آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز معنی‌دار بود. اثر برهمکنش بین تنش خشکی و گروه‌های گندم برای هر دو آنزیم آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز معنی‌دار به‌دست آمد و پاسخ ژنوتیپ‌های بینابین در شرایط محیطی برای هر دو آنزیم یکسان و بدون اختلاف معنی‌دار بود. درحالی‌که ژنوتیپ‌های متعلق به گروه متحمل و حساس افزایش فعالیت معنی‌داری از خود نشان دادند و با افزایش میزان تنش، این افزایش بیش‌تر شد. آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز در مقایسه با آسکوربات پراکسیداز درصد افزایش فعالیت بیش‌تری در شرایط تنش خشکی نشان داد، بنابراین این آنزیم می‌تواند به عنوان یکی از آنزیم‌های مهم جهت افزایش تحمل گیاه گندم در مقابل تنش ناشی از خشکی تلقی شود.

واژه‌های کلیدی: سنجش اسپکتروفتومتری، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش اکسیداتیو.

مقدمه

تنش خشکی عامل اصلی کاهش رشد گیاهان و عملکرد آنها در مناطق نیمه‌خشک محسوب می‌شود که موجب تحریک گیاه به یکسری پاسخ‌های دفاعی در سطوح مختلف مولکولی، سلولی و فیزیولوژیکی می‌شود. کشور ایران در کمربند بیابانی جهان قرار دارد و به عنوان منطقه‌ای خشک و نیمه‌خشک منظور می‌شود. سطح زیر کشت گندم در ایران ۶/۵ میلیون هکتار است که ۴/۲ میلیون هکتار آن به کشت دیم و ۲/۳ میلیون هکتار آن به کشت آبی اختصاص دارد (FAO, 2013). تحت تأثیر تنش، فعالیت‌های فتوشیمیایی گیاه بازداشته می‌شود، محتوی کلروفیلی برگ تغییر و فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین در فرایند فتوسنتز کاهش می‌یابد (Cruz de Carvalho, 2008). یکی از دلایلی که تنش‌های محیطی مثل خشکی، رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهند، اختلال در تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مکانیسم‌های دفاعی برطرف کننده این رادیکال‌هاست که به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن^۱ (ROS)، القای تنش اکسیداتیو، خسارت به پروتئین‌ها، لیپیدهای غشاء و سایر اجزای سلولی منجر می‌گردد (Mittler, 2002). برای جلوگیری از اثرات تنش اکسیداتیو، گیاهان دارای مکانیسم‌های بیوشیمیایی متعددی هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به چرخه مهلر، چرخه آسکورات-گلوتاتیون، چرخه گزانتوفیل و تنفس نوری اشاره نمود (Cruz de Carvalho, 2008). هم‌چنین گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که این سیستم‌ها باعث غیرفعال شدن ROS ها شده و خسارت‌های اکسیداتیو ناشی از فعالیت ROS ها را کاهش می‌دهند. سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز^۲ (SOD)، پراکسیدازها^۳ (POX)، آسکورات پراکسیداز^۴ (APX)، کاتالاز^۵ (CAT) و گلوتاتیون ردوکتاز^۶ (GR) که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کلیدی در مبارزه با ROS ها به شمار می‌روند و مهم‌ترین ترکیبات غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدانی، گلوتاتیون، اسید آسکوربیک، آلفا توکوفول، زازانتین و آنترازانتین می‌باشند (Salin, 1991). آنزیم آسکورات پراکسیداز در چرخه‌های مهلر و گلوتاتیون-آسکورات نقش مؤثری در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن ایفا می‌کند (Mittler, 2002). در چرخه گلوتاتیون-آسکورات با فعالیت آنزیم APX، آسکورات به مونودهدیدروآسکورات اکسیده می‌شود و برای ادامه چرخه تولید آسکورات لازم است. به همین منظور در این چرخه آنزیم‌های مونودهدیدروآسکورات ردوکتاز (MDHAR)، دهدیدرو آسکورات ردوکتاز (DHAR) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) فعالیت می‌کنند و با استفاده از NADPH و گلوتاتیون، آسکورات را احیاء می‌کنند. گلوتاتیون ردوکتاز نیز نقش مهمی در سازگاری با تنش اکسیداتیو بازی می‌کند. این آنزیم مسئول تبدیل

1 Reactive oxygen species

2 Superoxide dismutase

3 Peroxidase

4 Ascorbate peroxidase

5 Catalase

6 Glutathione reductase

گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) به گلوتاتیون احیاء شده (GSH) و حفظ نسبت بالای GSH به GSSG است. گلوتاتیون در چرخه‌های گزانتوفیل، مه‌لر و آسکوربات- گلوتاتیون نقش مؤثری در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و حفظ GSH ایفاء می‌کند. GSH می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان (غیرآنزیمی) مانند آسکوربات عمل کرده و اکسیژن منفرد (O_2^1) را به‌طور مستقیم پاکسازی کند (Noctor and Foyer, 1998). از این‌رو افزایش GR به‌دلیل احیای مجدد گلوتاتیون اکسیدشده، بسیار حائز اهمیت است (Sairam *et al.*, 2003). تحقیقات نشان داده است که یک 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). بررسی‌ها نشان داده‌اند که فعالیت GR و APX در طول تنش خشکی در گیاهچه‌های گندم، یونجه و برنج افزایش می‌یابد (Sharma and Dubey, 2005; Rubio *et al.*, 2002; Keles and Oncel, 2002). 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 ($\Psi_w = -1/3$ MPa) در فعالیت آنزیم‌های چرخه آسکوربات- گلوتاتیون، ابتدا کاهش اندکی مشاهده شد و سپس با افزایش شدت تنش و تحت تنش خشکی شدید ($\Psi_w = -1/93$ MPa) فعالیت هر دو آنزیم به میزان ۵۰ درصد کاهش یافت (Ormaetxe *et al.*, 1998). Mittler و Zilinskas (۱۹۹۴) استدلال می‌کنند که این امر احتمالاً به دلیل کاهش در بازسازی NADPH توسط فتوسنتز تحت تنش خشکی شدید و کاهش میزان GSH باشد. Sharma و Dubey (۲۰۰۵) گزارش کردند که در گیاهچه‌های برنج ۱۲-۱۰ روزه که در شرایط آزمایشگاهی رشد کرده بودند و به مدت ۲۴ ساعت تحت تنش خشکی ۰/۵- تا ۲- مگاپاسکال قرار گرفتند، فعالیت آنزیم‌های چرخه آسکوربات- گلوتاتیون و SOD افزایش و فعالیت CAT کاهش یافت که نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌های متفاوت، می‌توانند پاسخ‌های متفاوتی به تنش خشکی نشان دهند. بدین ترتیب، آگاهی از تغییرات پروتئین‌ها و آنزیم‌ها تحت شرایط تنش خشکی ممکن است برای شناسایی صفات فیزیولوژیکی مؤثر در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام متحمل مفید باشد. از آنجایی که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش خشکی در مرحله گل‌دهی کم‌تر مورد توجه قرار گرفته و بیش‌تر تحقیقات انجام شده در مرحله گیاهچه‌ای و در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای انجام شده است، بنابراین این پژوهش با هدف ارزیابی اثر تنش خشکی در مرحله گل‌دهی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون‌ردوکتاز و آسکوربات‌پراکسیداز در ژنوتیپ‌های حساس، بینابین و متحمل به خشکی گندم پاییزه انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در بهار 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 اجرا شد. در این بررسی بذر ژنوتیپ‌های پاییزه (متحمل، بینابین و حساس) گندم از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور (مراغه)، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل تهیه گردید (جدول ۱) (Mollasadeghi *et al.*, 2011; Roostaei *et al.*, 2014).

جدول ۱: مشخصات ارقام گندم پاییزه مورد مطالعه

ژنوتیپ واکنش به خشکی	شجره	محل تهیه بذر
۱	متحمل	Unknown- 1
۲	متحمل	1-27-6149/Sabalan// 84.40023
۳	متحمل	Ghafghaz//F9.10/Maya"s" IRW92-1-D-474-OMA-OMA-OMA-OMA- IMA-OMA
۴	متحمل	DARIC95-010-OMA-OMA-OMA-OMA-6MA-OMA
۵	متحمل	Azarbaijan/Gobostan
۶	متحمل	Azarbaijan/Roozi-84
۷	متحمل	Tous
۸	متحمل	Azar-2
۹	متحمل	Sardari
۱۰	بینابین	DARIC95-010-OMA-OMA-OMA-OMA-8MA-OMA
۱۱	بینابین	Manning/Sdvl//Dogu88
۱۲	بینابین	RECITL/TIA.2//TRK13
۱۳	بینابین	Vrz/3/Orf1.148/Td1/Blo/4/Sabalan
۱۴	حساس	HK16/7/KVZ/T171/3/MAYA//BB/INIA/4/KAR/JCWH99034-OAP- OAP-OAp-OMAR-6MAR
۱۵	حساس	FKG13/4/NWT/3/TAST/SPRW// TC198-0139-OAP-OAP-OMAR-5MAR
۱۶	حساس	JANZ QT3685-OAUS
۱۷	حساس	RINA-11
۱۸	حساس	Azarbaijan/Saratoveskaya-29
۱۹	حساس	Cimmyt/Saysonz

اعمال تنش خشکی بصورت وزنی بوده و به منظور تعیین ظرفیت زراعی خاک^۱ (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 درآمد و بعد از ۴۸ ساعت، با توجه به خروج آب اضافی در هر نمونه، میزان FC محاسبه گردید (Klute, 1986). سطوح تنش خشکی بصورت حدود FC ۹۰ درصد (نرمال)، FC ۶۰ درصد (تنش خشکی متوسط) و FC ۳۰ درصد (تنش خشکی شدید) در نظر گرفته شد. کاشت در گلدان‌هایی به ابعاد ۲۵ × ۲۰ × ۱۵ سانتی‌متر (در مجموع ۱۷۱ گلدان) و گلدان‌ها در مزرعه مورد مراقبت و آبیاری قرار گرفتند، بدین ترتیب که ابتدا بذور گندم پس از ضدعفونی در یخچال ۴°C به مدت ۴۰ روز بهاره‌سازی شده و سپس پنج عدد بذر داخل هر گلدان نشاء گردید. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها یکسان و ترکیب آن به صورت خاک زراعی، ماسه و کود حیوانی به نسبت ۶: ۳: ۱ بود. آبیاری تمام گلدان‌ها تا شروع گل‌دهی به‌طور کامل

^۱ Field Capacity

انجام گرفت و پس از گل‌دهی جهت جلوگیری از بارش باران از پوشش پلاستیکی استفاده و سه نوع شرایط رطوبتی تا زمان برداشت در گلدان‌های مورد نظر اعمال گردید (شکل ۱). آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی اجرا شد. سه گروه از گندم‌های پاییزه حساس، بینابین و متحمل به خشکی در مرحله گل‌دهی در سه شرایط آبی عادی ($90\%FC$)، تنش متوسط ($60\%FC$) و تنش شدید ($30\%FC$) به ترتیب سطوح تیمارهای ژنوتیپ گندم و تنش خشکی بودند. برای تجزیه‌های آنزیمی، ۱۵ روز پس از اعمال تنش، سه یا چهار بوته از هر واحد آزمایش (گلدان) انتخاب و بافت برگ‌های آن‌ها برای استخراج آنزیمی استفاده گردیدند. به منظور استخراج آنزیم‌ها، نمونه‌های برگ‌ها جمع‌آوری شده از مزرعه درون فویل آلومینیومی پیچیده شده و بلافاصله در ازت مایع به آزمایشگاه منتقل گردید تا بررسی فعالیت‌های آنزیمی بر روی آن‌ها صورت بگیرد.



(الف) (ب) (ج)

شکل ۱: نمونه‌ای از بوته‌های گندم ۱۵ روز بعد از اعمال تنش خشکی: (الف) آبیاری عادی ($90\%FC$)، (ب) تنش متوسط ($60\%FC$) و (ج) تنش شدید ($30\%FC$).

اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی

فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون ردوکتاز (GR) و آسکوربات پراکسیداز (APX) توسط اسپکتروفتومتر مدل RAY LEIGH U.V-2601 انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون 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 ($pH=7$) حاوی دو میلی‌مولار EDTA به آن اضافه گردید. پس از یکنواخت کردن محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ و سپس ۵۰ میکرولیتر از آن محلول رویی شناور برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم برداشت شد. فعالیت آنزیم به روش Arora و همکاران (۲۰۰۲) و بر اساس احیاء گلوکاتایون اکسید

شده (GSSG) توسط آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز با مصرف NADPH بود. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۲۰۰ میلی‌مولار (pH=۷/۵)، ۵۰۰ میکرومولار گلوکاتایون 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 ۳۴۰ nm به مدت ۱۲۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (شکل ۲). میزان NADPH مصرف شده با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 6.22 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه گردید. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

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 یک درصد Triton X-100 به آن اضافه شد. پس از یکنواخت کردن محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ و سپس ۵۰ میکرولیتر از آن محلول رویی شناور برای اندازه گیری فعالیت آنزیم برداشت شد. فعالیت آنزیم به روش ناکانو و Nakano (۱۹۸۱) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، یک میلی‌مولار H_2O_2 ، ۵ میلی‌مولار آسکوربات با ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده مخلوط شد تا واکنش اکسیداسیون توسط آنزیم موجود در بافت برگ گیاه انجام گردد. در نهایت کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ nm به مدت ۳۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان آسکوربات اکسیدشده با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 2.8 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه گردید و فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

تعیین غلظت پروتئین محلول

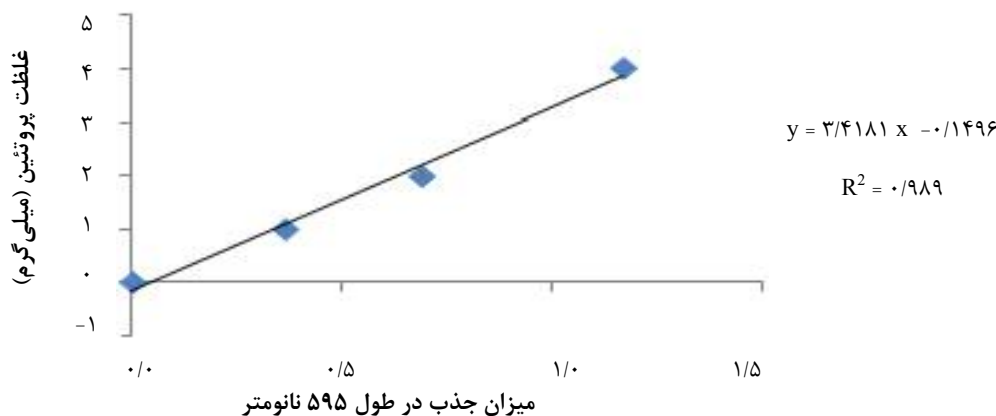
برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول در عصاره‌های استخراج شده از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. به این صورت که پس از استخراج، مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده به ۲۹۵۰ میکرولیتر محلول برادفورد اضافه شد و کاملاً به هم زده شد و پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. برای تعیین غلظت پروتئین از سرم آلبومین گاوی^۱ (BSA) 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 عصاره پروتئینی اضافه نموده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و تا زمان

^۱ Bovine Serum Albumin

اندازه‌گیری در مخلوط آب و یخ نگهداری گردیدند. میزان جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج نوری ۵۹۵ نانومتر قرائت و سپس مقادیر جذب در مقابل غلظت پروتئین رسم گردید (شکل ۲).



شکل ۲: منحنی استاندارد پروتئین

تجزیه آماری داده‌های آنزیمی

آزمون نرمال بودن داده‌ها با روش کولموگروف-اسمیرنوف و یکنواختی واریانس‌ها از طریق آزمون لون انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (SAS Institute, Cary, USA) تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. 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 داشت (جدول ۲). اختلاف بین گروه‌های متحمل، بینابین و حساس گندم فقط برای آنزیم GR معنی‌دار بود و این بیش‌تر از اختلاف گروه متحمل در برابر گروه حساس ناشی شد. برهمکنش تنش خشکی و گروه‌های گندم برای آنزیم‌های GR و APX معنی‌دار شد که نشان‌دهنده پاسخ متفاوت گروه‌های گندم در برابر تنش بود. اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ‌های درون گروه‌ها نتایج اثر متقابل تنش × گروه را در مورد ژنوتیپ‌ها تأیید کرد.

گلوکاتینون ردوکتاز (GR)

آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری در مورد فعالیت این آنزیم بین گروه‌ها وجود داشت و این آنزیم در بین گروه‌ها از فعالیت یکسانی برخوردار نبود (جدول ۲). برخلاف انتظار، گندم‌های گروه حساس بیش‌ترین میزان فعالیت را به خود اختصاص دادند و فعالیت گندم‌های متحمل نسبت به گروه حساس ۲۲ درصد کم‌تر برآورد گردید (جدول ۳). این امر احتمالاً به دلیل بیان بیش از حد GR در گندم‌های گروه حساس در مرحله گل‌دهی بوده و منجر به افزایش محتوی ASA و در نتیجه افزایش فعالیت این آنزیم گردیده است. سطوح تنش خشکی نیز بر میزان فعالیت آنزیم GR اثرگذار بوده و بین

سطوح تنش اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. مقایسه میانگین داده‌های به‌دست 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، به‌طوری‌که میزان افزایش فعالیت ۸۱ درصدی نسبت به شرایط عادی به‌دست آمد (جدول ۴). فعالیت آنزیم GR با افزایش شدت تنش اسمزی طبق انتظار افزایش یافت که افزایش این آنزیم به دلیل احیای مجدد گلوکاتایون اکسید شده، بسیار حائز اهمیت است (Sairam *et al.*, 2003). در مطالعه دیگری افزایش سطح فعالیت آنزیم GR در برگ‌های چغندر قند که تحت تنش شوری (۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار) قرار گرفتند، گزارش شده است که ممکن است با میزان توانایی گیاه برای مقاومت به تنش ارتباط نزدیکی داشته باشد (Bor *et al.*, 2003).

با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل تنش خشکی $\times$ گروه‌های گندم برای GR می‌توان بیان کرد که گندم‌های گروه بینابین در برابر شرایط تنش متفاوت، پاسخ مشابه و غیرمعنی‌داری از خود نشان داده‌اند و به عبارتی دیگر به تنش خشکی پاسخگو نبودند (جدول ۲). درحالی‌که گندم‌های گروه متحمل و حساس فعالیت متفاوتی در سه شرایط محیطی داشته‌اند و بیش‌ترین فعالیت آنزیمی برای هر دو گروه در تنش شدید به‌دست آمد (شکل ۳- الف). Kocsy و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که تنش از طریق ظهور ایزوآنزیم‌های جدید GR باعث افزایش فعالیت این آنزیم در گیاهان می‌شود.

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان GR و APX

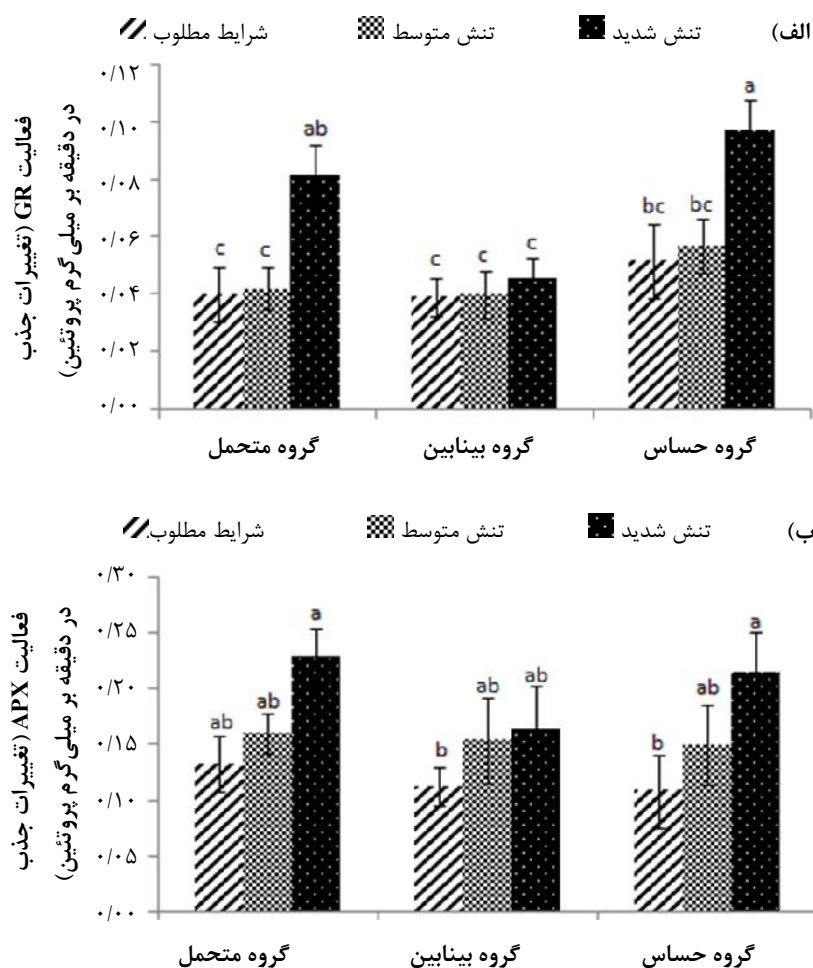
میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
APX	GR		
۰/۰۰۲۲۹ ^{ns}	۰/۰۰۸۰۹**	۲	گروه
۰/۰۰۶۴۳۶**	۰/۰۰۵۲۴**	۱۶	ژنوتیپ/گروه
۰/۱۱۰۱**	۰/۰۲۱۸۸**	۲	تنش خشکی
۰/۰۱۹۹۴**	۰/۰۰۲۰۴*	۴	تنش $\times$ گروه
۰/۰۳۱۸۱**	۰/۰۰۴۴۷**	۳۲	تنش $\times$ ژنوتیپ/گروه
۰/۰۰۵۴۱	۰/۰۰۰۶۸	۱۱۴	خطای آزمایشی
۱۸/۳۲	۱۶/۵۷		درصد ضریب تغییرات

ns، * و **: به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد می‌باشند.

آسکوربات پراکسیداز (APX)

داده‌های به‌دست آمده از تجزیه اسپکتروفتومتری نشان داد که این آنزیم در بین گروه‌ها از فعالیت یکسانی برخوردار بود و اختلاف معنی‌داری در مورد فعالیت این آنزیم بین گروه‌ها وجود نداشت (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 نداشت. با وجود این سطوح تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم APX اثرگذار بوده و بین سطوح تنش اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده نشان داد که فعالیت این آنزیم تحت شرایط تنش خشکی به شکل معنی‌داری افزایش پیدا کرد. به‌طوری‌که کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم

تحت شرایط عادی (بدون تنش) و بیشترین میانگین فعالیت این آنزیم در شرایط وجود تنش (شدید) با ۷۴ درصد افزایش نسبت به حالت عادی (بدون تنش) مشاهده شد (جدول ۴). افزایش فعالیت آنزیم APX در شرایط تنش مانند آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گویاکول پراکسیداز بر اثر 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, 2002). نتایج به‌دست آمده با یافته‌های Khanna-Chopra و Selote (۲۰۰۷) و Amjad و همکاران (۲۰۱۱) که نشان دادند تنش خشکی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آسکوربات پراکسیداز در ارقام گندم و در مرحله پر شدن دانه می‌گردد، مطابقت داشت. کیفیت اثر متقابل تنش خشکی $\times$ گروه‌های گندم برای APX، از نوع تغییر در مقدار بوده و حاکی از این است که گندم‌های گروه بینابین در برابر شرایط تنش متفاوت، پاسخ مشابه و غیرمعنی‌داری داشته‌اند و در واقع به تنش خشکی پاسخگو نبودند. ولی گندم‌های گروه متحمل و حساس فعالیت متفاوتی در سه شرایط محیطی نشان دادند. لازم به ذکر است که در گندم‌های گروه حساس و متحمل، اختلاف معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم در شرایط تنش شدید و متوسط مشاهده نمی‌شود (شکل ۳-ب). Ohe و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند در زمان پیری فعالیت آنزیم‌های اکسند ه شامل سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در برگ‌های اسفناج و تنباکو کاهش پیدا می‌کند، در صورتی که Ye و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند که در برگ‌های آراییدوپسیس بعد از گلدهی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تا پنج برابر افزایش پیدا می‌کند. Al-Ghamdi (۲۰۰۹) با بررسی نقش تنش خشکی در دو رقم گندم (مقاوم و حساس به خشکی) نشان داد که رقم مقاوم با تجزیه بیش‌تر پراکسید هیدروژن و مهار آن توسط آنزیم‌های CAT و APX و عملکرد کارآمد آنزیم APX در چرخه گلو تایتون - آسکوربات، آسیب غشاء کم‌تر و محتوی مالون دی‌آلد هید پایین‌تری (MDA) در مقایسه با رقم حساس دارند و در نتیجه به خشکی سازگارند. تحت شرایط تنش خشکی افزایش فعالیت APX در گندم توسط (Zhang *et al.*, 2004) نیز گزارش شده است که با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر در سه گروه گندم که هر کدام واجد چندین ژنوتیپ بوده‌اند مطابقت داشت. Esfandiari و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که با افزایش سن برگ در گندم، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. آن‌ها اظهار کردند که با افزایش سن برگ کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تجمع اکسیدان‌ها را در سلول سبب شده و به دلیل افزایش اختلالات متابولیسمی مرگ سلولی افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد. Swidzinski و همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش کردند که با افزایش سن برگ توان دفاعی سلول کاهش یافته و میزان تولید اکسیدان‌ها بیش از جمع‌آوری آن‌هاست. بنابراین در اواخر رشد توانایی محافظتی سلول در مقابل رادیکال‌های اکسیژن فعال کاهش می‌یابد و سلول دچار تنش اکسیداتیو می‌شود. در چنین شرایطی فعالیت‌های طبیعی سلول و به دنبال آن ماکرومولکول‌های سلول از جمله پروتئین‌ها از بین می‌روند.



شکل ۳: میانگین ترکیبات تیماری تنش و گروه‌های گندم از لحاظ فعالیت آنزیم‌ها (الف) GR، (ب) APX. حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۳: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گروه‌های گندم

گروه	GR (تغییرات جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	درصد تغییرات فعالیت نسبت به گروه حساس
متحمل	0.0546ab	-22
بینابین	0.0415b	-
حساس	0.0685a	-

حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۴: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان GR و APX گندم در سه شرایط آبی متفاوت

تنش	APX (تغییرات جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	GR (تغییرات جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)
شرایط مطلوب	0.0435b	0.1204b
تنش متوسط	0.0463b	0.1257b
تنش شدید	0.0788a	0.2103a
افزایش فعالیت در تنش متوسط نسبت به شرایط عادی (%)	-	4
افزایش فعالیت در تنش شدید نسبت به شرایط عادی (%)	81	74

حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

نتیجه گیری

به عنوان نتیجه گیری کلی می توان اظهار داشت که افزایش حجم خزانه آنتی اکسیدان های محلول در آب آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز در شرایط تنش خشکی سبب می شود سلول از پتانسیل ردوکس بالایی برخوردار شده و تحمل گیاه به شرایط دشوار افزایش یابد. در این پژوهش گندم های گروه بینابین از لحاظ فعالیت آنزیم ها، در برابر تنش خشکی پاسخ معنی داری نشان نداده و در واقع به تنش خشکی پاسخگو نبودند. در حالی که ترکیب گندم های گروه حساس و تنش شدید همانند گندم های گروه متحمل و تنش شدید بیش ترین فعالیت آنزیمی را داشتند و فعالیت دو آنزیم GR و APX در مرحله گل دهی در گروه حساس نیز نسبت به تنش خشکی پاسخگو بوده است. در این پژوهش آنزیم GR در مقایسه با APX درصد افزایش فعالیت بیش تری در شرایط تنش خشکی نشان داد، بنابراین احتمالاً این آنزیم در مرحله گل دهی نقش ویژه ای در القاء تحمل / سازگاری گیاه گندم در شرایط تنش را بر عهده داشته است.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه مسئولین محترم موسسه 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 می گردد.

منابع

- Al-Ghamdi, A.A. 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.
- Amjad, H., Noreen, B., Javed, A. and Nayyer, I. 2011.** Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. *Plant Physiology Biochemistry* 49: 178-185.
- Arora, A., Sairam, R.K. and Srivastava, G.C. 2002.** Oxidative stress and antioxidant system in plants. *Plant Physiology* 82: 1227-1237.
- Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. 2003.** The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science* 164: 77-84.
- 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, M.H. 2008.** Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling and Behavior* 3: 156-165.

Esfandiari, E., Shakiba, M.R., Mahboob, S., Aliari, H. and Shahabivand. S. 2008. The effect of water stress on antioxidant content, protective enzyme activity, proline content and lipid peroxidation in wheat seedling. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11: 1916-1922.

FAO. 2013. Published online at: [Http://faostate.fao.org/sit/339/default.aspx](http://faostate.fao.org/sit/339/default.aspx).

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

Khanna-Chopra, R. and Selote D.S. 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 60: 276-283.

Klute, A. 1986. Water retention: Laboratory methods. In: A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 1*, American Society of Agronomy 9: 635-662.

Kocsy, G., Galiba, G. and Brunold, C., 2001. Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiology Planta* 113 :158-164.

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

Mittler, R. and Zilinskas, B.A. 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.

Mollasadeghi, V., Valizadeh, M., Shahryari, R. and Imani, A.A. 2011. Evaluation of drought tolerance of bread wheat genotypes using stress tolerance indices at presence of potassium humate. *Journal Agriculture & Environment Science* 10 (2): 151-156.

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

Noctor, G. and Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.

Ohe, M., Rapolu, M., Mieda, T., Miyagawa, Y. Yabuta, Y., Yoshimura, K. and Shigeoka, S. 2005. Decline in leaf photooxidative-stress tolerance with age in tobacco. *Plant Science* 168: 1487-1493.

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

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

Rubio, M. C., González, E. M., Minchin, F. R., Webb, K. J., Arrese-Igor, C., Ramos, J. and Becana, M. 2002. Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum* 115: 531-40.

Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C. 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, M.L. 1991. Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. *Free Radical Research* 12: 851-858.

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

Swidzinski, J.A., Leaver, C.J. and Sweetlove, L.J. 2004. A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Photochemistry* 65: 1829-1838.

Ye, Z., Rodriguez, R. and Tran, A. 2000. The development transition of flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 158: 115-127.

Zhang, F., Guo, J.K., Yang, Y.I, He, W.I. and Zhang, L.X. 2004. Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum* 26: 345-352.