

نقش اسید آبسيزک در ايجاد تحمل به گرما در گياهچه‌های ذرت و ارتباط آن با يون کلسيم و سيستم‌های آنتی اکسیدان

فرهنگ مراقبی^۱، احد مدنی^۲، محبوبه قاسمی^۲

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری

۲- دانشجوی دکتری زراعت واحد علوم و تحقیقات تهران و عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رامهرمز

۲- مربی گروه زراعت دانشگاه آزاد اسلامی واحد رامهرمز

چکیده

در این آزمایش نقش ABA و Ca در افزایش مقاومت گياهچه‌های ذرت به گرما بررسی شد. هم‌چنین نقش بازدارنده‌های جذب Ca مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که تیمار با ABA به طور معنی‌داری موجب افزایش تحمل به گرما در گياهچه‌های ذرت می‌گردد. تیمار بذرهاي ذرت با کلرید کلسیم به دلیل افزایش محتوای کلسیم گياهچه‌های ذرت، منجر به افزایش اثر ABA و ايجاد تحمل به گرما در گياهچه‌ها می‌گردد. در مقابل تیمار بذرها با EGTA به دلیل کاهش محتوای کلسیم گياهچه‌های ذرت، منجر به کاهش اثر ABA و عدم تحمل به گرما در گياهچه‌ها می‌گردد. علاوه بر این تیمار با وراپامیل و يون لانتانیوم به دلیل مسدود کردن کانال‌های غشای پلاسمایی و جلوگیری از ورود کلسیم خارج سلولی به داخل سلول، موجب کاهش اثر ABA و عدم تحمل به گرما در گياهچه‌های ذرت می‌گردد. هم‌چنین WY و CPZ به دلیل کاهش مقدار کلسیم سلول موجب کاهش اثر ABA و ايجاد تنش گرمایی در گياهچه‌ها می‌شوند. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند GPX, APX, CAT, SOD و میزان اکسیداسیون چربی‌ها (از طریق اندازه‌گیری MDA) نشان می‌دهد که تنش گرما موجب تنش اکسیداتیو در گياهچه‌های ذرت می‌گردد. تیمار گياهچه‌های ذرت با ABA

موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مذکور شده و کاهش اکسیداسیون چربی‌ها در دمای کاشت معمولی (شاهد) و شرایط تنش گرمایی را در پی دارد. همچنین تیمار با یون Ca^{+2} از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و APX و کاهش اکسیداسیون چربی‌ها منجر به کاهش تنش گرمایی در گیاهچه‌های تحت تیمار ABA می‌شود، در حالی که تیمار با EGTA اثری عکس دارد. این نتایج نشان می‌دهد که نقش ABA در تقلیل تنش گرما از طریق کلسیم صورت می‌گیرد و نیازمند ورود کلسیم خارج سلولی به داخل سلول از طریق غشاهای پلاسمایی است. آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان نیز موجب افزایش اثر ABA و تقلیل تنش گرمایی می‌گردد.

کلمات کلیدی: ذرت، اسید آسبیزیک، سیستم آنتی‌اکسیدان، کلسیم، تحمل گرما.

مقدمه

به خوبی مشخص شده است که تنش‌های محیطی به طور قابل توجهی موجب افزایش سطح ABA داخل سلول در گیاهان می‌شود (Bond, 1988). تیمار گیاه با ABA در شرایط محیطی مطلوب (عدم تنش) منجر به فعال شدن سیستم‌های حفاظتی در گیاه می‌گردد (Robertson & all, 1994) و زمانی که گیاه تحت تنش‌های مختلف چون یخ‌زدگی، سرمازدگی، خشکی و شوری قرار می‌گیرد نیز حالت مشابهی ایجاد می‌شود (Heath & Packer, 1968). همچنین موجب افزایش درصد بقای سلول‌های گیاه بروموگراس کشت شده در دمای ۴۲/۵ درجه می‌گردد (Gong & all, 1997). وجود ABA به عنوان یک پیغام رسان شیمیایی جهت انجام سازش‌های مولکولی و فیزیولوژیکی در پاسخ به شرایط مختلف محیطی الزامی است (Noctor & all, 1998). فعالیت ژن‌های رمز کننده‌ی ABA با تحمل تنش‌های محیطی در ارتباط است (Campbell & all, 1996). از سوی دیگر پیشنهاد شده که هورمون ABA نقش خود را از طریق یون کلسیم ایفا می‌کند (Munshi, 1998) و برخی از اثرات ABA در ارتباط با مقدار کلسیم آزاد سیتوزول می‌باشد (Lu & Zhang, 1998). در واقع ورود و خروج یون‌های Ca^{+2} به درون سلول به عنوان یک سیگنال عمل کرده و منجر به پاسخ‌های فیزیولوژیکی به تنش‌های محیطی در حضور ABA می‌گردد (Rao & Davis, 1999). شواهد قابل توجه نشان می‌دهد که ABA موجب افزایش سطح کلسیم سیتوزولی از طریق افزایش فعالیت کانال‌های کلسیم غشاء و افزایش ورود کلسیم از خارج سلول به درون سلول می‌گردد (Gong & all, 1998a). نتایج دیگر نشان داده است که تیمار با ABA منجر به کاهش میزان کلسیم سیتوزولی در سلول‌های آلورون جو می‌گردد

(Annamalai & Yanaghiara, ۱۹۹۹). علاوه بر آن ABA در حضور کلسیم موجب افزایش پروتئین در بافت آلورون گندم می‌گردد (Gong & all, ۱۹۹۸) و فعالیت ژن‌های رمزکننده‌ی ABA به حضور کلسیم بستگی دارد و مواد بلوکه‌کننده‌ی کانا‌های کلسیمی بر میزان ABA اثر منفی می‌گذارد (Delaney & all, ۱۹۹۴). تمام مطالعات فوق نشان می‌دهد که باید ارتباطی بین میزان کلسیم، ABA و تحمل تنش در سلول گیاهی وجود داشته باشد (Schoffl & all, ۱۹۹۷) ولی شواهد محکمی که نشان دهنده‌ی ارتباط موثر بین مقدار ABA و میزان تحمل به گرما در گیاهچه‌های ذرت باشد مشاهده نشده است (Jakob & Buchner, ۱۹۹۴). در این آزمایش اثر استعمال ABA بر تحمل گرما در گیاهچه‌های ذرت و نقش کلسیم در تنظیم مقدار ABA و ارتباط آن با سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت مواد گیاهی و تیمار با ABA و Ca^{+2} و تنش گرمایی

بذرهای ذرت در محلول ۰/۱٪ کلرید جیوه به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند. سپس برای جذب آب در آب مقطر، کلرید کلسیم، EGTA، کلرید لانتانیوم، وراپامیل، CPZ یا WY با PH ثابت ۶/۵ به مدت ۱۲ ساعت و دمای ۲۵ درجه خیسانده شدند. سپس بذرهای خیسانده شده به مدت ۲/۵ روز (۶۰ ساعت) در میان ۶ لایه‌ی کاغذ صافی مرطوب و دمای ۲۵-۲۸ درجه و تاریکی قرار گرفتند. برای اعمال تیمار ABA بذرهای جوانه زده دور ریخته شدند و بذرهای جوانه زده ۲/۵ روزه بر روی کاغذهای صافی مرطوب حاوی محلول ABA و آب مقطر (شاهد) منتقل شدند و به مدت یک روز دیگر در تاریکی نگهداری شدند. بعد از تیمار ABA گیاهچه‌های ۳/۵ روزه دوباره به کاغذهای صافی مرطوب حاوی آب مقطر منتقل شدند و به مدت ۱۰ ساعت در تاریکی و دمای ۵۰ درجه تحت تیمار گرما قرار گرفتند سپس در پایان روز هشتم، درصد گیاهچه‌های زنده شمارش شد. گیاهچه‌هایی که توانستند رشد مجدد انجام دهند و در طول ۸ روز سبز بمانند، زنده نظر گرفته شدند. (Knight & Knight,

اندازه‌گیری تراوش الکتروولیت‌ها از ریشه

گیاهچه‌های ۲/۵ روزه در دمای ۲۵-۲۸ درجه کشت شدند. سپس با محلول ۰/۳ میلی مول در لیتر ABA

به مدت یک روز تیمار گردیدند. ۱-۲ روز نیز در دمای ۴۶ درجه و در تاریکی نگهداری شدند.

سپس ۱ سانتی‌متر از نوک ریشه‌های اولیه قطع شد و درصد تراوش الکترولیت‌ها از نوک ریشه با استفاده از یک جریان سنج اندازه‌گیری گردید (Rojas & all, ۱۹۹۹).

اندازه‌گیری بقای کولئوپتیل

گیاهچه‌های ۲/۵ روزهی ذرت که در دمای ۲۸-۲۵ درجه کشت شده بودند به مدت ۱ روز با محلول ۰/۳ مولار ABA تیمار شدند و ۱-۲ روز در دمای ۴۶ درجه و در تاریکی قرار گرفتند. سپس ۱ سانتی‌متر از نوک کولئوپتیل قطع گردید. میزان بقای کولئوپتیل ذرت با استفاده از محلول ۰/۱۶٪ تریفنیل تترازولیوم کلراید (TTC) و نمونه‌های ۰/۲ گرمی کولئوپتیل در دمای ۲۷ درجه به مدت ۱۵ ساعت بررسی گردید. سپس TTC دور ریخته شد و نمونه‌های کولئوپتیل در آناتول ۰/۹۵٪ شستشو داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها برای پاک شدن از TTC به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۸۰ درجه قرار گرفتند سپس نمونه‌های کولئوپتیل همراه ۲۵ میلی لیتر آناتول ۰/۹۵٪ با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند تا به این وسیله فعالیت آنزیم‌ها اندازه‌گیری گردد (Karim & all, ۱۹۹۹).

مقدار آنزیم‌ها

کولئوپتیل‌های ۱ گرمی ذرت در محلول حاوی ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۱ پلی وینیل پیرولیدون و ۱ میلی مولار آسکوربات قرار گرفته و در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مواد شناور بر روی محلول بعد از سانتریفوژ به عنوان مقدار آنزیم آسکوربات پروکسیداز (APX) در نظر گرفته شد (Lu & Zhang, ۱۹۹۹). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با استفاده از توانایی آن در جلوگیری از احیاء فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) اندازه‌گیری شد. در اینجا یک واحد فعالیت آنزیم معادل مقدار آنزیم لازم جهت کاهش ۵۰ درصدی در احیاء فتوشیمیایی NBT در نظر گرفته شد (Storozhenko & all, ۱۹۹۸). فعالیت کاتالاز با استفاده از میزان تجزیه آب اکسیژنه در واکنش ۵۰ میلی مول در لیتر فسفات پتاسیم با ۱۲/۵ میلی مول H_2O_2 (با استفاده از تابش طول موج ۲۴۰ نانومتر) اندازه‌گیری گردید (Knight & all, ۱۹۹۱). فعالیت آسکوربات پروکسیداز با استفاده از اندازه‌گیری میزان کاهش جذب نور در طول موج ۲۹۰ nm (در اثر اکسیده شدن آسکوربات توسط آسکوربات پروکسیداز) اندازه‌گیری شد (Jaenicke & Creighton, ۱۹۹۳).

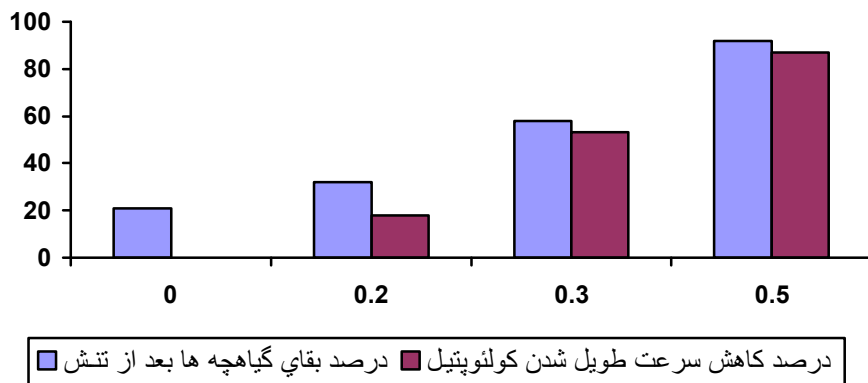
فعالیت گواپکول پروکسیداز با اندازه‌گیری افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ nm (در اثر اکسیده شدن گولیکول) اندازه‌گیری شد (Nover & all, ۱۹۸۳).

میزان اکسیداسیون چربی‌ها

میزان اکسیداسیون چربی‌ها در کولتوپتیل گیاهچه‌های ذرت قبل و بعد از ۲ روز تنش گرما در دمای ۴۶ درجه با استفاده از اندازه‌گیری مالون دی آلدهید از طریق واکنش موسوم به واکنش تیوباربیتیک اسید انجام گرفت (Knight & all, ۱۹۹۵)

نتایج

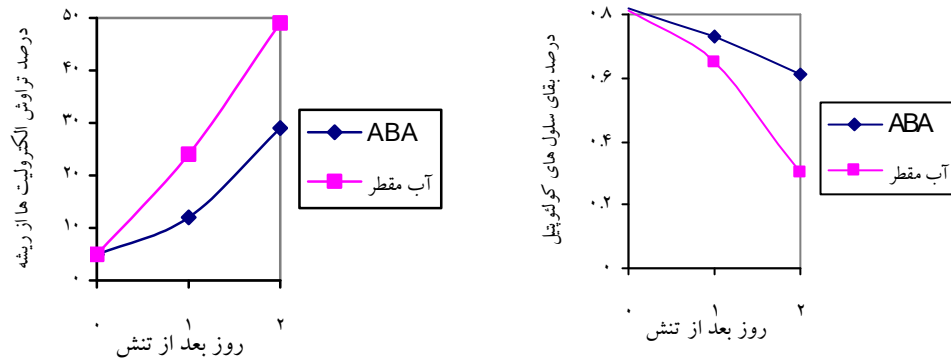
هنگامی که گیاهچه‌های ۳/۵ روزهی ذرت از محیط کشت با دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه به مدت ۱۰ ساعت به دمای ۵۰ درجه منتقل شدند تنها ۲۱/۴ درصد گیاهچه‌ها پس از تیمار گرما زنده ماندند. سپس گیاهچه‌های ۲/۵ روزهی با محلول ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۵ میلی مولار ABA به مدت یک روز تیمار شدند در این حال درصد بقای گیاهچه‌های ۳/۵ روزهی تیمار شده با ABA بعد از تیمار گرما به طور معنی‌داری افزایش یافت (نمودار ۱). از سوی دیگر تیمار ABA منجر به جلوگیری قابل توجه در طول شدن کولتوپتیل شد (نمودار ۱). همچنین تیمار با ۳/۰ میلی مولار ABA میزان رشد مجدد گیاهچه‌های ذرت را بعد از تیمار گرما افزایش داد. تیمار گرما همچنین موجب افزایش تراوش الکترولیت‌ها از نوک ریشه شد و درصد بقای کولتوپتیل‌های ذرت را کاهش داد. در نمودار ۲ نشان داده شده که وقتی گیاهچه‌های ۳/۵ روزه به مدت ۲ روز در دمای ۴۶ درجه قرار گرفتند درصد تراوش الکترولیت‌ها از ریشه، به سرعت به طول تیمار گرما افزایش یافت (نمودار ۲) و در همین زمان بقای کولتوپتیل‌های ذرت به شدت کاهش یافت. تیمار گیاهچه‌ها با ۰/۳ میلی مولار ABA به طور معنی‌داری موجب کاهش تراوش الکترولیت‌ها از نوک ریشه و افزایش بقای کولتوپتیل‌ها گردید. نتایج نمودار ۱ و ۲ نشان می‌دهند که تیمار ABA تحمل گرما توسط گیاهچه‌های ذرت را افزایش می‌دهد.



نمودار ۱: اثر تیمار بر درصد بقا و میزان جلوگیری از افزایش طول کولئوپتیل گیاهچه‌های ذرت

نمودار ۱ اثر تیمار ABA بر درصد بقا و میزان جلوگیری از افزایش طول کولئوپتیل گیاهچه‌های ذرت تحت تنش گرما را نشان می‌دهد. گیاهچه‌های ۲/۵ روزه کشت شده در دمای ۲۸-۲۵ درجه به مدت یک روز با ABA تیمار شدند. طول کولئوپتیل قبل و بعد از تیمار ABA اندازه‌گیری شد و درصد جلوگیری از افزایش طول کولئوپتیل محاسبه گردید. هر داده از میانگین ۳ تکرار (هر تکرار حاوی ۴۰ کولئوپتیل) می‌باشد. برای اندازه‌گیری درصد بقا بعد از تنش گرما گیاهچه‌های ۳/۵ روزه به مدت ۱۰ ساعت به دمای ۵۰ درجه منتقل شدند. سپس ۸ روز در دمای ۲۸-۲۵ درجه شمارش گردیدند. هر داده از میانگین ۳ تیمار (هر تکرار حاوی ۳۵۰ گیاهچه) به دست آمده است.

درصد جلوگیری از طویل شدن کولئوپتیل = (طول کولئوپتیل گیاهچه‌های ۳/۵ روزه بدون تیمار ABA - طول کولئوپتیل گیاهچه‌های ۳/۵ روزه تیمار شده با ABA) / (طول کولئوپتیل گیاهچه‌های ۳/۵ روزه بدون تیمار ABA - طول کولئوپتیل گیاهچه‌های ۲/۵ روزه بدون تیمار ABA)



نمودار ۲: A) اثر تیمار ABA بر تراوش الکترولیت ها از ریشه های ذرت و B) کاهش بقای کولتوپتیل های گیاهچه‌ی ذرت در طول تنش گرمایی (۴۶ درجه).

گیاهچه‌های ۲/۵ روزه‌ی کشت شده در دمای ۲۵-۲۸ درجه به مدت ۱ روز با ABA تیمار شدند و سپس تا ۱-۲ روز به دمای ۴۶ درجه منتقل و درصد انتشار الکترولیت‌ها از نوک ریشه و کاهش بقای کولتوپتیل‌ها اندازه گیری شد. هر داده از میانگین ۳-۶ تکرار به دست آمده است.

اثر یون کلسیم بر نقش ABA در ایجاد تحمل به تنش گرما

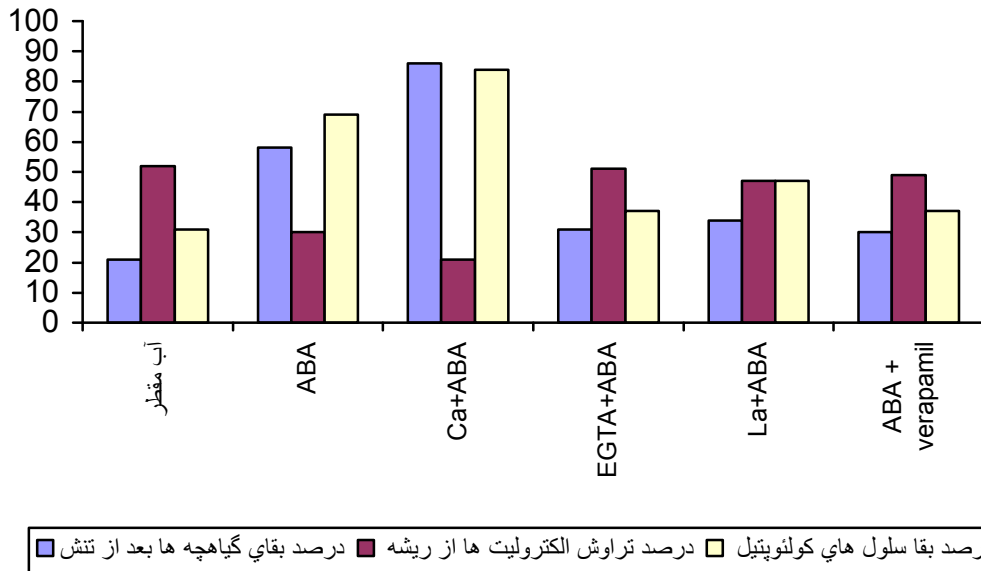
همان‌طور که نمودارهای ۱ و ۲ نشان می‌دهد تیمار ABA به طور معنی‌داری موجب افزایش تحمل به گرما در گیاهچه‌های ذرت می‌شود. ابتدا بذرهای ذرت در محلول ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم به مدت ۱۲ ساعت خیسانده شدند و محتوای کلسیم ریشه‌ها و کولتوپتیل‌های ۲/۵ روزه افزایش یافت.

سپس ۱ روز با ۳/۰ میلی مولار ABA تیمار شدند. در تیمار هم‌زمان Ca^{+2} و ABA (ABA+Ca) درصد بقای گیاهچه‌ها بعد از ۱۰ ساعت تنش گرمایی ۵۰ درجه بسیار بیش‌تر از زمانی بود که تیمار ABA به تنهایی اعمال شد (نمودار ۳). هم‌چنین وقتی بذرها در محلول ۵ میلی مولار EGTA به مدت ۱۲ ساعت خیسانده شدند، کلسیم ریشه و کولتوپتیل گیاهچه‌های ۲/۵ روزه کاهش یافت.

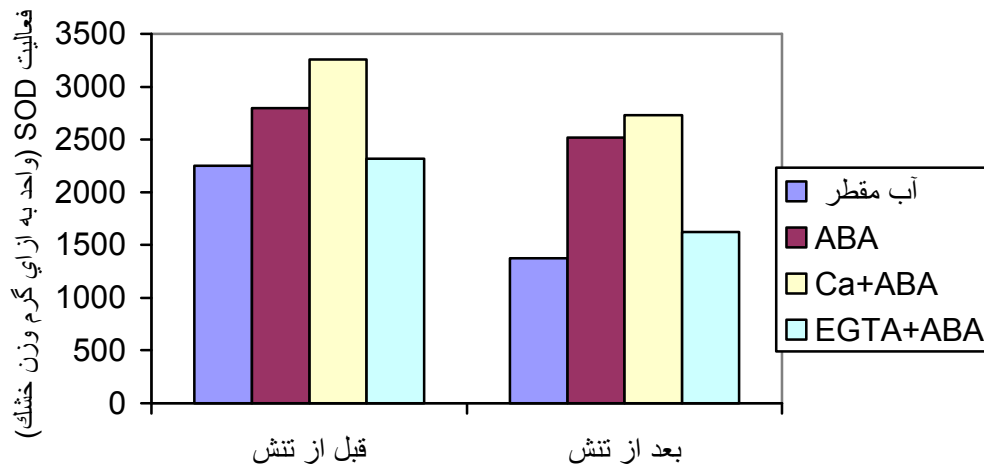
سپس تیمار گیاهچه‌های ۲/۵ روزه با ۳/۰ میلی مولار ABA به مدت یک روز انجام شد.

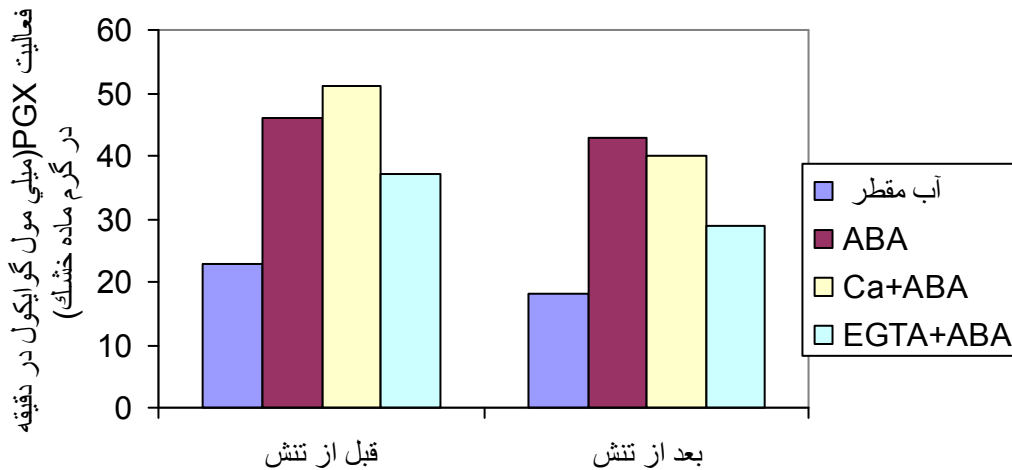
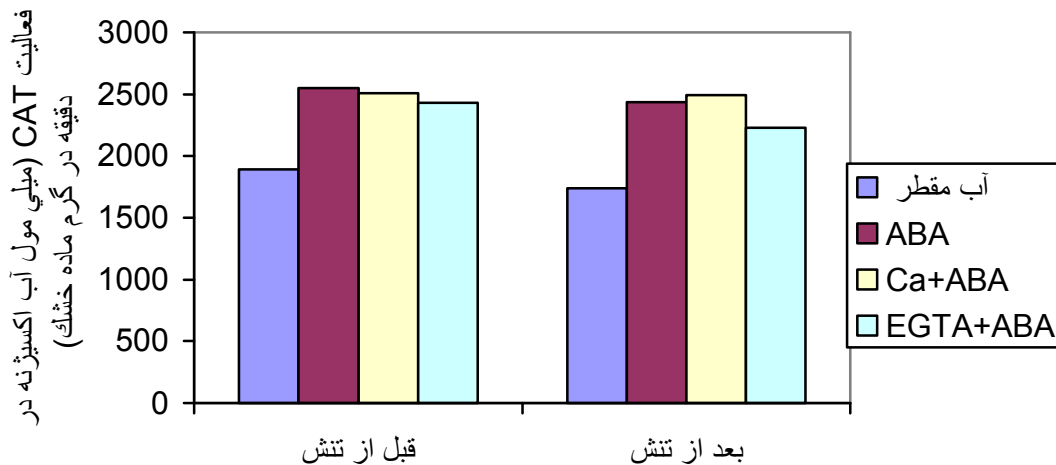
تیمار هم‌زمان ABA و EGTA درصد بقای گیاهچه‌ها را نسبت به زمانی که تیمار ABA به تنهایی اعمال شده بود، کاهش داد. هم‌چنین تیمار با بلوکه کننده‌های غشای پلاسمایی مانند لانتانوم (ABA+La) و

وراپامیل (Verapamil+ABA) که موجب جلوگیری از ورود کلسیم خارج سلولی به داخل سلول از طریق غشاهای پلاسمایی می‌گردند، درصد بقای گیاهچه‌های ذرت تحت تنش گرما (۵۰ درجه) را نسبت به زمانی که تیمار ABA به تنهایی اعمال شد، کاهش داد. (نمودار ۳) اندازه‌گیری تراوش الکترولیت‌ها از نوک ریشه و تغییر در بقای کولتوپتیل بعد از تنش گرما در دمای ۴۶ درجه به مدت دو روز نیز نتایج مشابهی نشان داد. همان‌طور که نشان داده شده است تیمار همزمان با Ca^{2+} و ABA موجب کاهش تراوش الکترولیت‌ها از ریشه شده و افزایش درصد بقای کولتوپتیل در گیاهچه‌های ذرت بعد از تنش (در مقایسه با تیمار تنها با ABA) شد. همچنین تیمار همزمان با EGTA و ABA موجب افزایش تراوش الکترولیت‌ها از ریشه و کاهش بقای کولتوپتیل‌های تحت تنش (در مقایسه با تیمار تنها با ABA) شد. همین‌طور تیمار همزمان لانتانیوم و ABA (لانتانیوم + ABA) یا وراپامیل با ABA (وراپامیل + ABA)، موجب کاهش اثر ABA در تقلیل تنش گرما شد. نتایج نمودار ۳ نشان داد که تیمار بذرها با Ca^{2+} موجب افزایش نقش ABA و تقلیل تنش گرما می‌شود. در مقابل تیمار با کاهش دهنده‌های کلسیم سلولی مانند EGTA و بلوکه‌کننده‌های کلسیم مانند لانتانیوم و وراپامیل موجب تضعیف نقش ABA و تشدید تنش گرما در گیاهچه‌های ذرت گردید به خوبی مشخص شده است که Ca^{2+} نقش خود را از طریق کالمودولین اعمال می‌کند و نتایج اخیر ما نیز نشان داد که تحمل تنش گرما با کلسیم و کالمودولین در ارتباط است. استعمال کاهش دهنده‌های کالمودولین مانند CPZ و W7 به کاهش تحمل گرما در گیاهچه‌های ذرت منجر می‌شود. برای بررسی این موضوع تیمار گیاهچه‌های ذرت با ۳ میلی مول در لیتر CPZ و ۰/۵ میلی مول در لیتر W7 انجام شد که موجب کاهش مقاومت به گرما در گیاهچه‌های ذرت شد و تیمار گرما موجب افزایش سطح کالمودولین در گیاهچه‌های ذرت گردید.



نمودار ۳: اثر کلسیم، EGTA (کاهش دهنده ی کلسیم سلول) و بلوکه کننده های کلسیم مانند لانتانوم و وراپامیل بر تحمل به گرما در گیاهچه های ذرت تحت تیمار ABA.





نمودار ۴: اثر کلسیم، EGTA و ABA بر فعالیت SOD، CAT، GPX، APX در گیاهچه‌های ذرت قبل از

تیمار گرما در دمای ۴۶ درجه به مدت ۲ روز.

بذرهای ذرت در آب مقطر (شاهد)، ABA، ۲۰ میلی مول در لیتر کلرید کلسیم ($Ca^{2+}+ABA$) یا ۵ میلی مول در لیتر EGTA ($ABA+EGTA$) در دمای ۲۵ درجه به مدت ۱۲ ساعت خیسانده شدند. سپس بذرهای خیسانده شده در تاریکی و دمای ۲۵-۲۸ درجه به مدت ۲/۵ روز برای جوانه زنی قرار گرفتند. گیاهچه‌های ذرت در کاغذهای صافی مرطوب حاوی ۰/۳ میلی مول در لیتر ABA یا آب مقطر (شاهد) به مدت یک روز تیمار شدند. گیاهچه‌های ۳/۵ روزه تیمار شده با ABA یا آب مقطر (شاهد) به دمای ۴۶ درجه به مدت دو روز منتقل شدند. فعالیت آنزیم‌ها در کولئوپتیل ذرت اندازه‌گیری شد. هر داده از میانگین ۳-۶ تکرار به دست آمده است. در آزمایش حاضر تیمار بذر با ۳ میلی مول در لیتر CPZ یا ۰/۵ میلی مول در لیتر W7 (کاهش دهنده‌های کالمودولین) تأثیر اندکی بر نقش ABA در ایجاد تحمل به گرما در گیاهچه‌های ذرت داشت و بر خلاف تصور تیمار همزمان با Ca^{2+} و ABA مقدار کالمودولین را چندان تحت تأثیر قرار نداد. همچنین تیمار با ABA منجر به کاهش کالمودولین در گیاهچه‌های ذرت گردید. نتایج نشان داد که می‌تواند رابطه‌ای بین مقدار کالمودولین و نقش ABA در تخفیف تنش گرما در گیاهچه‌های ذرت وجود داشته باشد.

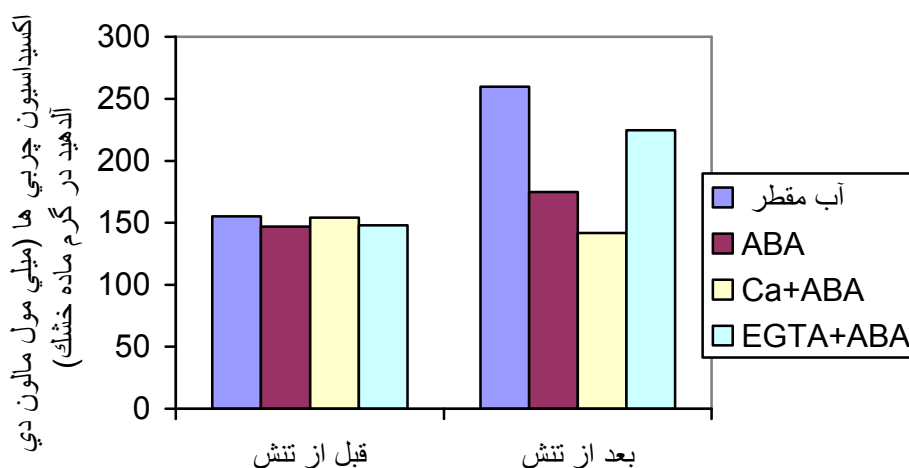
نقش سیستم آنتی اکسیدان در ایجاد تحمل به گرما

سیستم آنتی اکسیدان شامل انواع آنزیم‌ها و مولکول‌های آنتی اکسیدان مانند SOD, CAT, GPX, APX است که نقش مهمی در سازش گیاهان با شرایط مختلف تنش بازی می‌کنند. در آزمایش حاضر تیمار گیاهچه‌های ۲/۵ روزه ذرت با ۰/۳ میلی مول در لیتر ABA به مدت ۱ روز، به طور معنی‌داری تحمل به گرما را در گیاهچه‌های ذرت را افزایش داد (نمودار ۱و۲). همچنین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند SOD, CAT, APX در گیاهچه‌های ۳/۵ روزه تیمار شده با ABA در مقایسه با شاهد (عدم تیمار با ABA) گردید (نمودار ۴, B, C, D). تیمار بذرهای ذرت با کلسیم ($Ca^{2+} + ABA$) به دلیل افزایش محتوای کلسیم گیاهچه‌های ذرت و افزایش نقش ABA باعث ایجاد تحمل به گرما گردید (نمودار ۳). همچنین موجب افزایش فعالیت APX, SOD, CAT در گیاهچه‌ها در مقایسه با زمانی شد که تیمار ABA به تنهایی اعمال شده بود (نمودار ۴; A-C). در مقابل تیمار بذرهای ذرت با EGTA ($EGTA+ABA$) موجب کاهش محتوای کلسیم گیاهچه‌ها شد و موجب کاهش نقش ABA و تشدید تنش گردید (نمودار ۳). همچنین موجب کاهش فعالیت APX, SOD, CAT در گیاهچه‌های ذرت ۳/۵ روزه کشت شده در دمای ۲۵-۲۸ درجه گردید (نمودار ۴; A,C,D) بعد از این که گیاهچه‌های ذرت در دمای ۴۶ درجه به مدت ۲ روز تنش دیدند، فعالیت

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD, CAT, APX افزایش نشان داد (نمودار ۴; A-D). همچنین تیمار با ABA به طور معنی‌داری موجب افزایش سطح SOD, CAT, APX (در مقایسه با عدم تیمار با ABA) بعد از تنش گرما شد (نمودار ۴; A-D). و کلسیم همراه با ABA به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم را نسبت به تیمار ABA افزایش داد. در مقابل تیمار با EGTA+ABA موجب کاهش فعالیت در شرایط تنش در مقایسه با تیمار ABA گردید (نمودار ۴; A-D). مقدار MDA اغلب به عنوان معیار اکسیداسیون چربی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در این آزمایش، گیاهچه‌های ذرت در دمای ۲۵-۲۸ درجه به مدت ۳/۵ روز کشت شدند. و مقدار MDA آن‌ها اندازه‌گیری شد، تفاوت کمی بین تیمارها (آب مقطر، Ca^{2+} +ABA، EGTA+ABA) وجود داشت و بعد از تنش ۲ روزه در دمای ۴۶ درجه، در گیاهچه‌ها محتوای MDA افزایش یافت (نمودار ۵). گیاهچه‌های تحت تیمار ABA به طور معنی‌داری سطح MDA کمتری نسبت به تیمارهای فاقد ABA داشتند.

کلرید کلسیم همراه ABA (Ca^{2+} +ABA) موجب تخفیف تنش گرما و کاهش مقدار MDA در گیاهچه‌ها در مقایسه با تیمار ABA شد. در مقابل، تیمار همزمان با ABA و EGTA (EGTA+ABA) اثر ABA را کاهش داد و موجب افزایش سطح MDA در گیاهچه‌های ذرت و تشدید تنش در مقایسه با تیمار ABA گردید (نمودار ۵).



نمودار ۵: اثر EGTA, ABA و Ca^{2+} بر اکسیداسیون چربی‌ها (براساس مقدار MDA) در گیاهچه‌ها

قبل و بعد از تیمار گرما (۴۶ درجه به مدت ۲ روز).

بحث

اثر استعمال خارجی ABA بر تحمل گرما بسته به مواد گیاهی مورد استفاده، متفاوت است (Harndahl & all, ۱۹۹۸). گزارش شده است که تیمار به طور معنی‌داری موجب کاهش تحمل گرما در برگ‌های ارقام وحشی سیب‌زمینی می‌گردد (Meyer & all, ۱۹۹۴). از طرف دیگر تیمار ABA موجب بهبود رشد گیاهچه‌های ذرت بعد از تیمار گرما شد (Vallelian & all, ۱۹۹۸) همچنین گزارش شده است که موجب افزایش درصد بقای سلول‌های بروموگراس کشت شده در دمای ۴۲/۵ درجه می‌گردد (Price andall, ۱۹۹۶).

در آزمایش حاضر، تیمار ABA به طور معنی‌داری درصد بقای گیاهچه‌های ذرت را در دمای ۵۰ درجه افزایش داد (نمودار ۱) و موجب کاهش تراوش الکترولیت‌ها از ریشه‌های ذرت و افزایش بقای کولتوپتیل‌های ذرت بعد از تیمار گرما شد (نمودار ۲; A-B) و نشان داد که تیمار با ABA تحمل گرما را در گیاهچه‌های ذرت افزایش می‌دهد. اکنون مشخص شده است که بسیاری از سیگنال‌های فیتوکرومی از طریق تغییر در میزان کلسیم آزاد داخل سلولی انتقال می‌یابند (Sanders & all, ۱۹۹۹) و کلسیم می‌تواند به عنوان واسطه‌ای جهت انتقال سیگنال‌های ABA باشد (Park & all, ۱۹۹۶). در آزمایش حاضر، مشخص شد که افزایش سطح کلسیم در گیاهچه‌های ذرت یا بلوکه کردن جریان کلسیم به داخل سلول و پروتوپلاست منجر به تغییراتی در نقش ABA و قابلیت تحمل تنش گرما می‌شود (نمودار ۳).

اثر ABA در ایجاد تحمل به گرما وابسته به کلسیم است و ایجاد تحمل به گرما نیازمند ورود کلسیم خارج سلولی از طریق غشای پلاسمایی به داخل سلول است (Lindquist, ۱۹۸۰). نتایج این آزمایش نیز نشان می‌دهد که تنش گرما توسط ABA و با وساطت کلسیم و پروتئین‌های پیوندی کلسیم مانند کالمودولین کاهش می‌یابد. در آزمایش حاضر انتظار می‌رفت که مواد ضد کالمودولین مانند CPZ, WY از قدرت تحمل گیاهچه‌ها در برابر تنش بکاهند ولی این مواد تاثیر چندانی بر نقش ABA و قابلیت تحمل تنش نداشتند. به طور احتمال ارتباط ABA با تحمل گرما از طریق سیگنال‌ها و مسیرهای انتقال پیام دیگری به جز مسیر کالمودولین نیز انجام می‌گیرد (Sharkey & all, ۲۰۰۱) و شاید غیر از کالمودولین پروتئین‌های پیوندی کلسیم دیگری نیز داشته باشد (Dat & all, ۱۹۹۸). به طور کلی پروتئین‌های پیوندی کلسیم مانند کالمودولین در پاسخ و سازگاری گیاهان به شرایط تنش موثرند (Munro & Pelham, ۱۹۸۵).

نقش ABA در کاهش تنش گرما با تجلی ژن‌ها نیز مرتبط است و موجب سنتز پروتئین‌ها و تغییر در انواع فرایندهای متابولیک می‌گردد (Burke, ۲۰۰۱). از طرف دیگر، در سال‌های اخیر مشخص شده است که انواع تنش‌های محیطی منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد (Gong & all, ۱۹۹۷b). افزایش مقاومت به تنش اغلب با فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان رابطه دارد (Havaux & all, ۱۹۹۱). آنزیم‌های SOD, CAT, APX نقش مهمی در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهان دارند و با تیمار ABA مقدار این آنزیم‌ها افزایش می‌یابد (Polisensky & Braam, ۱۹۹۶). مشخص شده است که ABA نسخه برداری ژن‌های $SOD_{۳.۴}$, $SOD_{۳.۳}$, $SOD_{۳.۲}$, $SOD_{۳.۱}$ در مزوکوتیل ذرت (Knight, ۲۰۰۰) و نسخه برداری ژن‌های $CAT_۳$ و $CAT_۲$ در جنین ذرت را افزایش می‌دهد (Bendena & all, ۱۹۸۹). در آزمایش حاضر، تیمار ABA موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD, CAT, APX در گیاهچه‌های ذرت کشت شده در شرایط تنش گرما با کاهش اکسیداسیون چربی‌ها و کاهش مقدار MDA (در مقایسه با عدم تیمار با ABA) گردید و این امر نشان داد که ایجاد تحمل به گرما توسط ABA در گیاهچه‌های ذرت با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مرتبط است. علاوه بر این، کلسیم نقش فعالی در ارتباط با تنش اکسیداتیو و سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان دارد (Jurivich & all, ۱۹۹۲). تولید گروه‌های فعال اکسیژن با حضور کلسیم و کالمودولین در غشای پلاسمایی ریشه‌های گندم افزایش می‌یابد (Foyer & all, ۱۹۹۴). در تنباکوی ترانس ژنیک (که یک ژن کالم + کالمودولین خارجی به آن منتقل شده است)، تیمار با ABA موجب افزایش کلسیم آزاد سیتوزولی در گیاهچه‌ها شد (Lopez-Delgado & all, ۱۹۹۸). فعالیت GPX در سلول‌های کشت شده‌ی بادام زمینی از طریق کلسیم و کالمودولین تنظیم گشت (Foyer & all, ۱۹۹۷). نتایج اخیر نشان داد که تیمار بذرها با کلرید کلسیم، فعالیت SOD, CAT, APX را در گیاهچه‌های ۲/۵ روزه ذرت افزایش می‌دهد. در این آزمایش، کلسیم و EGTA به ترتیب موجب افزایش و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های ذرت کشت شده در شرایط تنش (۴۶ درجه به مدت ۲ روز) گردید (نمودار ۴). تیمار Ca^{2+} و EGTA و هم‌چنین بر نقش ABA به ترتیب اثر مثبت و منفی داشتند (نمودار ۳). نتایج نشان داد که ABA از طریق کلسیم تحمل گرما را افزایش داده و این مقاومت با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز مرتبط است.

پی‌نویس:

ABA=Abscisic acid

APX=ascorbate peroxidase

CAT=catalase

CPZ=chlorpromazine

EGTA=ethylene glycol-tetraacetic acid

GPX= Guaiacol peroxidase

MDA= malon dialdeyde

SOD= superoxide dismutase

TTC= triphenyl tetrazolium chloride

Wv= amino hexyl naphthalene sulfonamide hydrochloride

- ۱- Annamalai P, Yanaghiara S (۱۹۹۹) Identification and characterization of a heat stress induced gene in cabbage encodes a kunitz type protease inhibitor. J Plant Physiol ۱۵۵: ۲۲۶-۲۳۳.
- ۲- Bendena WG, Garbe JC, Traverse KL, Lakhota SC, Pardue ML (۱۹۸۹) Multiple inducers of the *Drosophila* heat shock locus- ω (HSR- ω)-inducer-specific patterns of the ω transcripts. J Cell Biol ۱۰۸: ۲۰۱۷-۲۰۲۲
- ۳- Bond U (۱۹۸۸) Heat shock but not other stress inducers leads to the disruption of a subset of snRNPs and inhibition of *in vitro* splicing in HeLa cells. EMBO J ۷: ۳۵۰۹-۳۵۱۸.
- ۴- Burke JJ (۲۰۰۱) Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance. Physiol Plant ۱۱۲: ۱۶۷-۱۷۰.
- ۵- Campbell AK, Trewavas AJ, Knight MR (۱۹۹۶) Calcium imaging shows differential sensitivity to cooling and communication in luminous transgenic plants. Cell Calcium ۱۹: ۲۱۱-۲۱۸.
- ۶- Dat JF, Foyer CH, Scott IM (۱۹۹۸) Changes in salicylic acid and antioxidants during induction of thermotolerance in mustard seedlings. Plant Physiol ۱۱۸: ۱۴۵۵-۱۴۶۱.
- ۷-Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (۱۹۹۴) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science ۲۶۶: ۱۲۴۷-۱۲۵۰.
- ۸-Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ (۱۹۹۴) Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. Plant Cell Environ ۱۷: ۵۰۷-۵۲۳.

- ۹- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (۱۹۹۷) Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* ۱۰۰: ۲۴۱-۲۵۴.
- ۱۰- Gong M, Li Y-J, Chen SZ (۱۹۹۸a) Abscisic acid induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by Ca^{2+} and associated with antioxidant systems. *J Plant Physiol* ۱۵۳: ۴۸۸-۴۹۶.
- ۱۱- Harndahl U, Hall R, Osteryoung K, Vierling E, Bornman JF, Sundby C (۱۹۹۸) The chloroplastic small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress Chaperon* ۴: ۱۲۹-۱۳۸.
- ۱۲- Havaux M, Greppin H, Strasser RJ (۱۹۹۱) Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light. *Planta* ۱۸۶: ۸۸-۹۸.
- ۱۳- Heath RL, Packer L (۱۹۶۸) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* ۱۲۵: ۱۸۹-۱۹۸.
- ۱۴- Jaenicke R, Creighton TE (۱۹۹۳) Junior chaperones. *Curr Biol* ۳: ۲۳۴-۲۳۵.
- ۱۵- Jakob U, Buchner J (۱۹۹۴) Assisting spontaneity: the role of HSP_{۹۰} and smHSPs as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci* ۱۹: ۲۰۵-۲۱۱.
- ۱۶- Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI (۱۹۹۲) Effect of sodium salicylate on the human HS response. *Science* ۲۵۵: ۱۲۴۳-۱۲۴۵.
- ۱۷- Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, Uozumi N, Muto S (۱۹۹۸) Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol* ۳۹: ۷۲۱-۷۳۰.

- ۱۸- Knight H (۲۰۰۰) Calcium signalling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* ۱۹۰: ۲۶۹-۳۲۴.
- ۱۹- Knight H, Knight MR (۱۹۹۰) Recombinant aequorin methods for intracellular calcium measurement in plants. *Methods Cell Biol* ۴۹: ۲۰۱-۲۱۶.
- ۲۰- Knight H, Knight MR (۲۰۰۰) Imaging spatial and cellular characteristics of low temperature calcium signature after cold acclimation in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* ۵۱: ۱۶۷۹-۱۶۸۶.
- ۲۱- Knight H, Veale EL, Warren GJ, Knight MR (۱۹۹۹) The *sfr1* mutation in *Arabidopsis* suppresses low-temperature induction of genes dependent on the CRT/DRE sequence motif. *Plant Cell* ۱۱: ۸۷۰-۸۸۶.
- ۲۲- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ (۱۹۹۱) Transgenic aequorin reports the effects of touch and cold shock and elicitors on cytosolic calcium. *Nature* ۳۵۲: ۵۲۴-۵۲۶.
- ۲۳- Lindquist S (۱۹۸۰) Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: implications for regulation. *Dev Biol* ۷۷: ۴۶۳-۴۷۹.
- ۲۴- Lu C, Zhang J (۱۹۹۹) Effects of water stress on PSII photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J Exp Bot* ۵۰: ۱۱۹۹-۱۲۰۶.
- ۲۵- Meyer K, Leube MP, Grill E (۱۹۹۴) A protein phosphatase ΨC involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* ۲۶۴: ۱۴۵۲-۱۴۵۵.
- ۲۶- Munro S, Pelham H (۱۹۸۰) Molecular genetics: what turns on heat shock genes. *Nature* ۳۱۷: ۴۷۷-۴۷۸
- ۲۷- Noctor G, Foyer CH (۱۹۹۸) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* ۴۹: ۲۴۹-۲۷۹
- ۲۸- Nover L, Scharf KD, Neumann D (۱۹۸۳) Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol Cell Biol* ۳: ۱۶۴۸-۱۶۵۵.

- ۲۹- Park S-Y, Shivaji R, Krans J, Luthe DS (۱۹۹۶) Heat shock response in heat tolerant and nontolerant variants of *Agrostis palustris* Huds. *Plant Physiol* ۱۱۱: ۵۱۵-۵۲۴.
- ۳۰- Polisensky DH, Braam J (۱۹۹۶) Cold-shock regulation of the Arabidopsis Tch genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiol* ۱۱۱: ۱۲۷۱-۱۲۷۹.
- ۳۱- Price AH, Taylor A, Ripley SJ, Griffiths A, Trewavas AJ, Knight MR (۱۹۹۶) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* ۶: ۱۳۰۱-۱۳۱۰.
- ۳۲- Robertson AJ, Ishikawa M, Gusta LV, MacKenzie SL (۱۹۹۴) Abscisic acid induced heat tolerance in *Bromus inermis* Lees cell suspension cultures. *Plant Physiol* ۱۰۵: ۱۸۱-۱۹۰.
- ۳۳- Rojas A, Almoguera C, Jordano J (۱۹۹۹) Transcriptional activation of a heat shock gene promoter in sunflower embryos: synergism between ABI ۳ and heat shock factors. *Plant J* ۲۰: ۶۰۱-۶۱۰.
- ۳۴- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (۱۹۹۹) Communicating with calcium. *Plant Cell* ۲۲: ۶۹۱-۷۰۶.
- ۳۵- Schett G, Steiner CW, Groger M, Winkler S, Graninger W, Smolen J, Xu Q, Steiner G (۱۹۹۹) Activation of Fas inhibits heat induced activation of HSF^۱ and up-regulation of HSP^{۷۰}. *FASEB J* ۱۳: ۸۳۳-۸۴۲.
- ۳۶- ۴۴- Schoffl F, Rossol I, Angermuller S (۱۹۹۷) Regulation of the transcription of heat shock genes in nuclei from soybean (*Glycine max*) seedlings. *Plant Cell Environ* ۱۰: ۱۱۳-۱۱۹.
- ۳۷- ۴۵- Sharkey TD, Chen XY, Yeh S (۲۰۰۱) Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiol* ۱۲۵: ۲۰۰۱-۲۰۰۶.

۳۸- ۴۶ -Sopory SK, Munshi M (۱۹۹۸) Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signalling in plants. Crit Rev Plant Sci ۱۷: ۲۴۵-۳۱۸.

۳۹- ۴۷- Storozhenko S, De Pauw P, Van Montagu M, Kushnir S (۱۹۹۸) The heat shock element is a functional component of the *Arabidopsis APX1* gene promoter. Plant Physiol ۱۱۶: ۱۰۰۵-۱۰۱۴.

۴۰- ۴۹- Vallelian-Bindschedler L, Schweizer P, Mosinger E, Metraux J-P (۱۹۹۸) Heat induced resistance in barley to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) is associated with a burst of AOS. Physiol Mol Plant Pathol ۵۲: ۱۸۵-۱۹۹.

Archive of SID