زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هفتم، شماره بیست و چهارم، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۷۷-۸۹
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۱۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۳/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۲/۲۹

پاسخ گیاه سویا (*Glycine max*) به تنش خشکی در رابطه با شاخص‌های رشد و برخی آنزیم‌های کلیدی متابولیسم کربن و نیتروژن

مریم نصر اصفهانی * و مریم مددکار حق‌جو
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

چکیده

تنش خشکی یکی از مهم ترین عوامل محدود کننده تولید محصول در گیاه سویا است. به همین دلیل، شناسایی مکانیسم های مرتبط با تحمل تنش خشکی در گیاه سویا به منظور بهبود و افزایش مقاومت به خشکی با روش های مهندسی ژنتیک بسیار مهم است. در مطالعه حاضر، تأثیر تنش خشکی بر شاخص‌های رشد (ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه) و نیز فعالیت آنزیم‌های ایزوسیترات دهیدروژناز (ICDH)، فسفو انول پیروات کربوکسیلاز (PEPC)، مالات دهیدروژناز (MDH)، گلوتامین سنتتاز (GS) و نیترات ردوکتاز (NR) در ارقام حساس و متحمل به خشکی گیاه سویا ارزیابی شد. نتایج نشان داد که شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده تحت هر دو شرایط مناسب آبیاری (شاهد) و محدودیت آب (تیمار خشکی)، در رقم متحمل به خشکی در مقایسه با رقم حساس، بالاتر بود. فعالیت آنزیم ICDH در هر دو رقم، در پاسخ به تنش افزایش یافت، در حالی که این افزایش در رقم متحمل به خشکی در مقایسه با رقم حساس بالاتر بود. فعالیت آنزیم های PEPC، MDH، GS و NR تحت شرایط تنش در رقم حساس، کاهش معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان داد، در حالی که فعالیت این آنزیم ها در رقم متحمل نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت. به طور کلی، داده‌های به دست آمده پاسخ متفاوت فعالیت‌های آنزیمی ارزیابی شده دو رقم سویا را که از نظر سطح تحمل به خشکی متفاوت هستند نشان می دهد. همچنین به نظر می‌رسد که کاهش فعالیت آنزیم های PEPC، MDH، GS و NR در رقم حساس به خشکی به واسطه کم آبی احتمالا می‌تواند از دلایل کاهش رشد در گیاه سویا، تحت شرایط تنش خشکی باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، سویا، متابولیسم کربن، متابولیسم نیتروژن

مقدمه

گیاهان زراعی اغلب در معرض عوامل تنش‌زای زنده (ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها) و غیرزنده (خشکی و شوری) قرار دارند که سبب وارد آمدن آسیب‌هایی به

* نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: esfahani.m@lu.ac.ir، شماره تماس: ۰۶۶۳۳۱۲۰۶۲۰

Archive of SID
www.SID.ir

رشد و نمو و در نهایت میزان محصول آنها می‌شود (Mahajan and Tuteja, 2005). خسارات ناشی از عوامل تنش‌زا به ویژه در ارتباط با محصولات اقتصادی مهم نظیر گندم و جو که در شرایط تنش، ۷۸ تا ۸۷ درصد کاهش محصول دارند، حایز اهمیت بوده، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Bray *et al*., 2000).

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده عملکرد و تولید محصول در گیاهان است (Ciais *et al*., 2005؛ Loreto and Centritto, 2008). این تنش سبب بازدارندگی فرآیندهای تقسیم و رشد سلولی (Prasad *et al*., 2008)، بسته شدن روزنه‌ها و در نتیجه کاهش جریان CO_2 به درون سلول‌های مزوفیل (Arve *et al*., 2011)، کاهش بازسازی ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات، کاهش مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم روبیسکو و بازداشته شدن فسفریلاسیون نوری و سنتز ATP شده، در نهایت کیفیت و میزان تولید محصول را به طور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهد (Lawlor and Tezara, 2009؛ Bertolli *et al*., 2012؛ Pinheiro and Chaves, 2011). تنش کم‌آبی همچنین دسترسی گیاه به نیتروژن، توان جذب نیتروژن و نیز فعالیت آنزیم‌های تثبیت کننده نیتروژن، عمدتا نیترات ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز را کاهش می‌دهد (Araya *et al*., 2010). از آنجا که ظرفیت فتوسنتزی گیاه با میزان نیتروژن برگ مرتبط است، بنابراین محدودیت در فتوسنتز و رشد در اثر تنش‌های محیطی نظیر خشکی احتمالا نتیجه وقوع تغییر در مقادیر نیتروژن و نیز قابلیت دسترسی گیاه به این عنصر است (Prasad *et al*., 2008). آثار تنش خشکی بر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه شامل: تأثیر بر رشد (Zlatev and Lidon, 2012)، بیان ژن (Bhargava and Sawant, 2013)، مسیرهای سیگنالی (Chaves *et al*., 2003)، فتوسنتز (Pinheiro and Chaves, 2011) و تنفس میتوکندریایی (Galle *et al*., 2010) به طور گسترده مطالعه شده است.

گیاهان به منظور مقابله با تنش خشکی، پاسخ‌ها و سازش‌های متنوع مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی را در سطوح مختلف نشان می‌دهند (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006؛ Munns and Tester, 2008). پاسخ‌ها به تنش خشکی در سطح سلولی، شامل تنظیمات سیستم غشایی، تغییر در معماری دیواره سلولی، تغییر در چرخه سلولی و تقسیمات سلولی و نیز تولید و تجمع متابولیت‌های سازگار (مانند پرولین، رافینوز و گلایسین بتائین) است.

در شرایط تنش، به منظور حذف مقادیر اضافی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و برقراری مجدد تعادل ردوکس سلولی، متابولیسم ردوکس سلول فعال شده (Valliyodan and Nguyen, 2006؛ Krasensky and Jonak, 2012) و در سطح مولکولی نیز، بیان برخی ژن‌ها نظیر ژن‌های دخیل در حفاظت و مقابله مستقیم با تنش نظیر: عوامل محافظت کننده اسمزی (osmoprotectant)، آنزیم‌های دخیل در سم‌زدایی، انتقال دهنده‌ها و نیز پروتئین‌های تنظیم‌کننده مانند: عوامل نسخه‌برداری، پروتئین کینازها و فسفاتازها (Krasensky and Jonak, 2012؛ Osakabe *et al*., 2014) القا و تحریک می‌شوند. شناسایی این مسیرهای سازشی تحت شرایط تنش خشکی در گونه‌های گیاهی به ویژه ارقام حساس و متحمل بسیار حایز اهمیت است، زیرا می‌توان از آنها به عنوان نشانگرهایی (markers) در برنامه‌های اصلاح نباتات با هدف گسترش و توسعه

Archive of SID

www.SID.ir

ارقام گیاهی مقاوم به خشکی استفاده نمود.

سویا (*Glycine max* L.) از مهم‌ترین گیاهان روغنی در دنیا است که با دارا بودن ۲۰ درصد روغن و ۴۰ درصد پروتئین، بیشترین سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است. به طوری که در سال ۲۰۱۰ سطح زیر کشت سویا در سرتاسر جهان ۱۰۰ میلیون هکتار تخمین زده شد، که در حدود نیمی از این مقدار مربوط به آمریکا و برزیل است (Ku *et al*., 2013). سطح زیر کشت سویا در ایران تقریبا ۱۰۰ هزار هکتار است و استان مازندران با ۲۵ تا ۳۰ هزار هکتار از مناطق مهم کشت این محصول به شمار می‌رود. سایر مناطق کشت سویا مربوط به استان‌های گلستان، لرستان، آذربایجان شرقی و دشت مغان است (Tajik Khaveh *et al*., 2011). از گیاه سویا علاوه بر استحصال روغن، به عنوان گیاه مرتعی، علوفه تازه و خشک و کود سبز نیز استفاده می‌کنند. علاوه بر این، گیاه سویا از طریق همزیستی با ریزوبیوم قادر است نیتروژن موجود در اتمسفر را تثبیت کند (Manavalan *et al*., 2009). در سال‌های اخیر، علیرغم تقاضای روز افزون برای این محصول، کاهش قابل ملاحظه‌ای در تولید سویا گزارش شده به طوری که میزان تولیدی برابر با ۶۹ درصد کمتر از ظرفیت واقعی برای این محصول تخمین زده شده است (Guimaraes-Dias *et al*., 2012). کم‌آبی یکی از دلایل مهم برای کاهش تولید سویا در جهان است (Manavalan *et al*., 2009) و خشکی‌های طولانی مدت تابستان، مقدار تولید این محصول را در کشور برزیل (به عنوان دومین کشور تولید کننده سویا) به میزان قابل توجهی کاهش داده است (Guimaraes-Dias *et al*., 2012).

با توجه به اهمیت مسأله و مواردی که اشاره شد، به منظور بررسی و مقایسه رفتارهای متفاوت ارقام حساس و متحمل در شرایط تنش خشکی، پاسخ شاخص‌های رشد (ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک ساقه و وزن تر و خشک ریشه) و نیز فعالیت آنزیم‌های فسفو انول پیروات کربوکسیلاز (PEPC)، مالات دهیدروژناز (MDH)، ایزوسیترات دهیدروژناز (ICDH)، گلوتامین سنتتاز (GS) و نیترات ردوکتاز (NR) برگ، در دو رقم حساس (W28) و متحمل (DT2008) گیاه سویا در مقابله با تنش خشکی، دستور کار این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر روی دو رقم حساس و متحمل به خشکی گیاه سویا در قالب یک طرح کاملا تصادفی و در چهار تکرار انجام شد. DT2008 به عنوان رقم متحمل و W28 به عنوان رقم حساس به خشکی گیاه سویا معرفی شده است (Ha *et al*., 2013). بذرهای سویا در گلدان‌های پر از ورمیکولیت کشت شد و سه روز در هفته با محلول غذایی پیشنهاد شده توسط Vadez و همکاران (۲۰۰۰) آبیاری شد. بقیه روزها آبیاری با آب معمولی صورت گرفت. گلدان‌ها به مدت سه هفته در شرایط گلخانه (۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی، ۳۰ درجه سانتیگراد، ۶۰ درصد رطوبت نسبی و نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) قرار گرفتند. در پایان این مدت، اعمال شرایط آزمون روی گیاهان سه هفته‌ای آغاز شد. برای این منظور، گیاهان به طور تصادفی در دو گروه شاهد و تحت تنش خشکی قرار گرفتند. گیاهان شاهد به طور روزانه با آب آبیاری شدند

Archive of SID

www.SID.ir

در حالی که برای گیاهان تحت تنش خشکی، آبیاری به مدت ۴ روز و ۷ روز متوقف شد و پس از پایان این دو دوره زمانی، گیاهان تیمار شده به همراه نمونه‌های شاهد مربوط برداشت شدند و شاخص‌های رشد (ارتفاع گیاه، وزن تر ریشه و ساقه و وزن خشک ریشه و ساقه) و نیز فعالیت آنزیم‌های PEPC، MDH، ICDH، GS و NR در برگ‌ها ارزیابی شد.

به منظور استخراج عصاره آنزیمی، ۲۰۰ میلی‌گرم بافت تازه برگ با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل ۵۰ میلی‌مولار MOPS (۴- مورفولین پروپان سولفونیک اسید)، ۱۰ میلی‌مولار ۲- مرکاپتواتانول، ۱ میلی‌مولار EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید)، ۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۵ درصد PVPP (پلی وینیل پلی پیرولیدون)، ۱۰ درصد گلیسرول و ۱ میلی‌مولار PMSF (فنیل متیل سولفونیل فلوراید) در هاون سرد، ساییده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد (Nasr Esfahani *et al.*, 2014). عصاره حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی و سنجش پروتئین کل استفاده گردید.

فعالیت آنزیم‌های PEPC (EC 4.1.1.31)، MDH (EC 1.1.1.37) و NR (EC 1.6.6.1) بر اساس کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به واسطه اکسیداسیون NAD(P)H و فعالیت ICDH (EC 1.1.1.42) بر اساس افزایش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به واسطه تولید NADPH اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم GS (EC 6.3.1.2) بر اساس میزان تولید گاما گلوتامیل هیدروکسامات در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. ترکیب بافر واکنش مورد استفاده برای PEPC: ۰/۲ مول بر متر مکعب NADH، ۲ میلی‌مولار فسفو انول پیروات، ۲ میلی‌مولار بی‌کربنات سدیم و ۳/۶ واحد آنزیم مالات دهیدروژناز؛ GS: آنزیم‌های اندازه‌گیری شده شامل: ۲۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۲۵ میلی‌مولار هیدروکسی آمین، ۱۰۰ میلی‌مولار گلوتامات و ۱۰۰ میلی‌مولار ATP (González *et al.*, 1995)؛ MDH: ۰/۲ میلی‌مولار NADH و ۱ میلی‌مولار اگزالواستیک اسید (Gordon and Kessler, 1990)؛ NR: ۰/۱ میلی‌مولار فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD)، ۱۲ میلی‌مولار NADPH و ۱۰۰ میلی‌مولار نیترات پتاسیم (Bories and Bories, 1995) و ICDH: ۰/۵ میلی‌مولار $NADP^+$، ۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و ۱ میلی‌مولار ایزوسیترات (Marino *et al.*, 2006) اندازه‌گیری شدند. مقدار پروتئین کل با روش Bradford (۱۹۷۶) ارزیابی شد.

تحلیل داده‌ها: تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ صورت گرفت و مقایسه میانگین از طریق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

خشکی یکی از عوامل مهم محدود کننده رشد و تولید محصول در گیاهان زراعی نظیر سویا است و در نتیجه پتانسیل تولید محصول یک چالش عمده در تعداد زیادی از کشورهایی است که با مشکل کم‌آبی روبرو هستند (Zhao *et al.*, 2008). از آنجا که گونه‌های گیاهی بسته به نوع گونه و شدت تنش، راهکارهای متنوعی را برای غلبه بر شرایط کم‌آبی به کار می‌گیرند (Ha *et al.*, 2012؛ Tran *et al.*, 2007; 2010)، شناخت راهکارهای تحمل در گونه‌های متحمل به خشکی می‌تواند در افزایش پتانسیل تولید محصول در

Archive of SID

www.SID.ir

گیاهان زراعی مهم از طریق مهندسی ژنتیک و دستکاری‌های ژنتیکی به کار گرفته شود. در رابطه با گیاه سویا، کاهش محصول به واسطه خشکسالی‌های اخیر در سرتاسر جهان از یک سو و تقاضای روزافزون از سوی دیگر باعث شده است که تلاش‌های گسترده‌ای در جهت شناسایی صفات مرتبط با مقاومت به خشکی و استفاده از راهکارهای اصلاح با هدف توسعه رقم‌های مقاوم به خشکی سویا صورت گیرد (Manavalan *et al*., 2009).

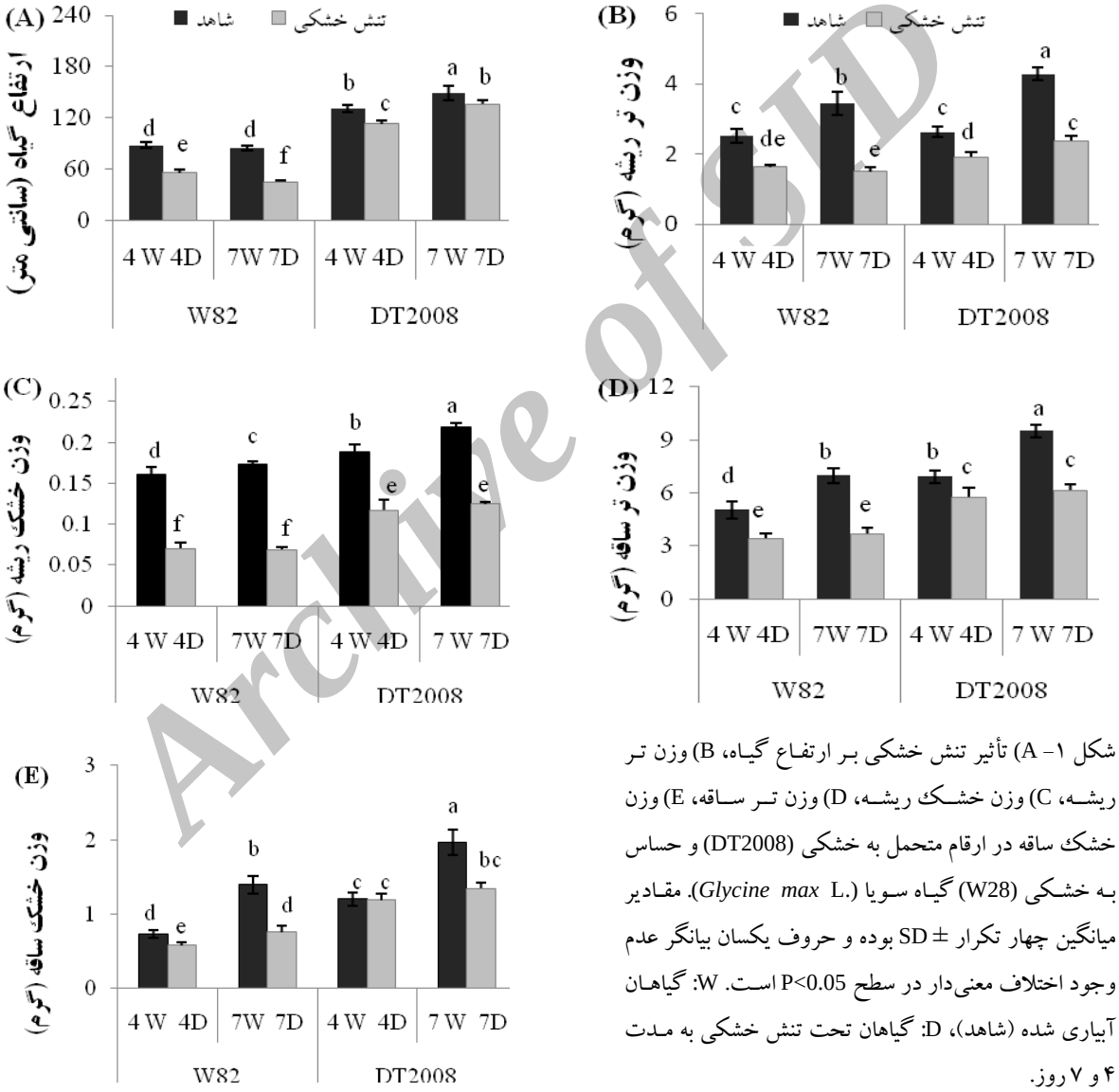
میزان تحمل به خشکی گیاه با تغییرات شاخص‌های رشد گیاه (ارتفاع، وزن تر و وزن خشک) تحت شرایط تنظیم شده رشد و محدودیت دسترسی به آب مرتبط است (Ha *et al*., 2013) و به این ترتیب می‌توان از این تفاوت‌های فنوتیپی برای تعیین سطح تحمل گیاهان به شرایط کم‌آبی و شناسایی گونه‌های مقاوم به خشکی در روش غربالگری سنتی بهره جست. نتایج بررسی شاخص‌های رشد در دو رقم متفاوت (DT2008 و W82) گیاه سویا در شرایط مناسب آبیاری (شاهد) و خشکی (تیمار) در این مطالعه نشان داد که ارتفاع گیاه در رقم متحمل به خشکی (DT2008) رشد یافته تحت شرایط مناسب آبیاری در مقایسه با رقم حساس به خشکی (W82) بیشتر بود که نشان دهنده سرعت رشد بیشتر در رقم DT2008 نسبت به رقم W82 است (شکل ۱-A). توقف آبیاری به مدت ۴ و ۷ روز، سبب کاهش قابل ملاحظه سرعت رشد گیاه در رقم W82 در مقایسه با شاهدهای مربوطه شد به طوری که ارتفاع گیاهان تحت تنش، به ترتیب ۳۶ و ۴۶ درصد کمتر از ارتفاع گیاهان رشد یافته تحت شرایط مناسب آبیاری بودند. در مقابل، ارتفاع رقم DT2008 پس از توقف آبیاری برای ۴ و ۷ روز، تنها ۱۳ و ۹ درصد در مقایسه با شاهدش کاهش یافت (شکل ۱-A).

گزارش‌ها گویای آن است که سطح تحمل به خشکی در گونه‌های مختلف گیاهی با صفات مربوط به ریشه ارتباط مثبت دارد (Manavalan *et al*., 2009؛ Thao and Tran, 2012) و افزایش رشد و نمو ریشه می‌تواند به عنوان یک صفت اساسی و مهم برای تعیین سطح تحمل به خشکی در نظر گرفته شود (Sarker *et al*., 2005؛ Kang *et al*., 2011). در گیاه سویا ریشه‌ها در شرایط آب کافی و قابل دسترس، در سطوح بالاتری از خاک گسترش پیدا می‌کنند، در حالی که تحت شرایط کم‌آبی، توسعه و گسترش ریشه در بخش‌های عمیق‌تری از خاک صورت می‌گیرد (Shao *et al*., 2009). به این ترتیب، شاخص‌های رشد ریشه برای غربالگری و مهندسی ژنتیک به منظور توسعه گیاهان سویا اصلاح شده متحمل به خشکی پیشنهاد شده است (Manavalan *et al*., 2009؛ Nishiyama *et al*., 2011). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با توقف آبیاری به مدت ۴ و ۷ روز، وزن تر ریشه در رقم DT2008 به ترتیب ۲۶ و ۴۴ درصد و در رقم W82 به ترتیب ۳۵ و ۵۶ درصد در مقایسه با شاهد، کاهش یافت (شکل ۱-B). مقادیر وزن خشک ریشه نیز به همین ترتیب در رقم DT2008، ۳۸ و ۴۳ درصد و در رقم W82، ۵۶ و ۶۰ درصد در مقایسه با شاهدهاشان کاهش یافت (شکل ۱-C). بنابراین، از آنجا که تأثیر منفی تنش خشکی روی سیستم ریشه‌ای رقم W28 شدیدتر از رقم DT2008 است، به نظر می‌رسد که رقم DT2008 می‌تواند توان تحمل بیشتری در شرایط کم‌آبی نسبت به رقم W82 داشته باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه شاخص‌های رشد ساقه در دو رقم مزبور نشان می‌دهد که تنش خشکی می‌تواند رشد ساقه در رقم W82 را به میزان بیشتری در مقایسه با رشد ساقه در رقم DT2008 تحت تأثیر قرار دهد. به طوری که محدودیت دسترسی به آب سبب شد که وزن تر (شکل ۱-D) و خشک ساقه (شکل ۱-E) در رقم W82 به یک مقدار پایین در مقایسه با رقم DT2008 کاهش یابد. اثر بازدارندگی تنش خشکی روی رشد ساقه را احتمالا می‌توان به محدود شدن فتوسنتز تحت این شرایط نسبت داد (Preuss *et al*., 2012).



شکل ۱- A) تأثیر تنش خشکی بر ارتفاع گیاه، B) وزن تر ریشه، C) وزن خشک ریشه، D) وزن تر ساقه، E) وزن خشک ساقه در ارقام متحمل به خشکی (DT2008) و حساس به خشکی (W28) گیاه سویا (*Glycine max* L.). مقادیر میانگین چهار تکرار ± SD بوده و حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است. W: گیاهان آبیاری شده (شاهد)، D: گیاهان تحت تنش خشکی به مدت ۴ و ۷ روز.

Archive of SID

www.SID.ir

خشکی تغییرات پیچیده‌ای را در متابولیسم کربن و نیتروژن القا می‌کند که این تغییرات نتیجه کمبود آب و تغییر در قابلیت دسترسی گیاه به مواد غذایی است (Xu and Zhou, 2006). در برگ‌ها، آنزیم ICDH، تبدیل ایزوسیترات به ۲-اکسو گلوتارات را کاتالیز نموده و اسکلت کربنی مورد نیاز برای تثبیت آمونیوم توسط مسیر گلوتامین سنتتاز و گلوتامات سنتاز را فراهم می‌نماید (Chopra *et al*., 2002) و به این ترتیب نقش کلیدی در بیوسنتز و صدور آمینو اسیدها و تأمین NADPH در سیتوزول را ایفا می‌کند. آنزیم ICDH همچنین در برگ‌ها، جریان‌های متابولیکی کربن و نیتروژن را تنظیم و تعدیل می‌نماید (Gálvez *et al*., 2005). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که توقف آبیاری به مدت ۴ و ۷ روز قادر است فعالیت آنزیم ICDH را در برگ‌های هر دو رقم سویا به طور معنی‌داری افزایش دهد، در حالی که این افزایش در رقم متحمل به خشکی بیشتر از رقم حساس به خشکی بود (شکل ۲-A). بنابراین افزایش فعالیت آنزیم ICDH طی کاهش پتانسیل آب می‌تواند احتمالا بیانگر این موضوع باشد که در شرایط تنش، تعادل و توازن کربن/ نیتروژن در برگ‌های گیاهان تحت تنش آسیب دیده است و افزایش فعالیت این آنزیم ممکن است بتواند در رفع محدودیت کربن ناشی از تنش خشکی مؤثر باشد. در مطالعه‌ای روی گرهک‌های ریشه گیاه نخود فرنگی تحت شرایط تنش خشکی، افزایش فعالیت آنزیم ICDH گزارش شده است (Gálvez *et al*., 2005؛ Marino *et al*., 2007). در برخی گزارش‌ها، افزایش فعالیت آنزیم ICDH تحت تنش: شوری (Valderrama *et al*., 2006; 2007؛ Leterrier *et al*., 2012)، دمای پایین (Airaki *et al*., 2012) و فلزات سنگینی نظیر کادمیوم (León *et al*., 2002) گزارش شده است. همه این مدارک به نقش کلیدی آنزیم ICDH تحت شرایط تنش اشاره و پیشنهاد می‌کند که افزایش فعالیت این آنزیم تحت شرایط تنش می‌تواند از دو جنبه دارای اهمیت باشد: الف) تنظیم متابولیسم کربن و نیتروژن و فراهم نمودن NADPH، که محدودیت مسیر پنتوز فسفات اکسیدی را برطرف می‌کند و ب) شرایط را برای دفاع آنتی‌اکسیدانتی فراهم می‌نماید.

آنزیم PEPC نیز نقش مهمی در متابولیسم کربن دارد. کربوکسیلاسیون فسفو انول پیروات به اگزالواستات در نتیجه فعالیت این آنزیم صورت می‌گیرد و به این ترتیب آنزیم مزبور در فرآیندهای متابولیک گیاه حایز اهمیت است. زمانی که اسیدهای آلی چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید به سمت سایر مسیرهای متابولیکی مانند بیوسنتز آمینو اسیدها هدایت می‌شود (Miyao and Fukayama, 2003)، آنزیم PEPC در سنتز و فراهم نمودن مجدد حدواسط‌های چرخه، نقش ایفا می‌کند (Cousins *et al*., 2007). در بررسی‌های متعدد، افزایش فعالیت آنزیم PEPC در پاسخ به تنش خشکی گزارش شده است (Bertolli *et al*., 2012؛ Lawlor and Tezara, 2009). آنزیم MDH تبدیل اگزالواستات به مالات را کاتالیز می‌کند و ایزوفرم‌های مختلفی از آن در اندامک‌های درون سلولی نظیر پراکسی‌زوم، میتوکندری‌ها، سیتوزول و کلروپلاست وجود دارد (Kumar *et al*., 2000). تغییرات در بیان و فعالیت آنزیم مزبور در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی تحت شرایط تنش گزارش شده است (Seki *et al*., 2002).

نتایج بررسی حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم PEPC پس از دو دوره زمانی ۴ و ۷ روزه تنش خشکی، به میزان معنی‌داری در رقم مقاوم (DT2008) در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافته است، در حالی که در رقم حساس (W28) فعالیت آن پس از گذشت ۴ روز در

Archive of SID

www.SID.ir

تنش خشکی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. با تمدید تنش خشکی تا ۷ روز، میزان فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهدش به طور معنی‌دار کاهش یافت (شکل ۲-B). فعالیت آنزیم MDH در برگ‌های رقم DT2008 پس از ۴ روز توقف آبیاری اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت، اما در گیاهان تحت تنش خشکی برای ۷ روز، فعالیت این آنزیم بالاتر از میزان آن در برگ‌های گیاهان رشد یافته تحت شرایط مناسب آبیاری (شاهد) بود. در رقم W28، میزان فعالیت MDH در برگ‌های تحت تنش خشکی ۴ و ۷ روزه نسبت به گیاهان شاهد، کاهش یافت (شکل ۲-C). کاهش فعالیت آنزیم MDH احتمالا باز شدن روزنه‌ها، چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید و وضعیت ردوکس سلولی را تحت تأثیر قرار داده و به این ترتیب بر فتوسنتز و تنفس مؤثر است (Miyao and Fukayama, 2003). به علاوه، کاهش فعالیت این آنزیم سبب کاهش میزان اگزالواستیک اسید و همچنین مالات شده که به خاطر ضروری بودن مالات در مراحل رشد، به فرآیندهای رشد گیاه آسیب وارد می‌شود (Kumar *et al*., 2000).

آنزیم NR در تنظیم متابولیسم نیتروژن تحت تنش‌های مختلف محیطی دخالت دارد (Prasad *et al*., 2008) و در برخی گزارش‌ها عنوان شده است که فعالیت آنزیم مزبور تحت تأثیر تنش خشکی ممانعت می‌شود. این بازدارندگی می‌تواند به واسطه کاهش قابلیت دسترسی و جذب نیتروژن توسط ریشه و نیز جریان آهسته نیتروژن از ریشه به برگ‌ها و در نهایت، کاهش مقادیر نیترات برگی طی تنش خشکی اتفاق بیافتد (Prasad *et al*., 2008). نتایج مربوط به اندازه‌گیری فعالیت آنزیم NR پس از ۴ و ۷ روز توقف آبیاری نشان داد که فعالیت این آنزیم در رقم حساس به خشکی W28 کاهش یافته است در حالی که در رقم متحمل به خشکی DT2008 فعالیت این آنزیم با توقف آبیاری، به میزان قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گیاهان شاهد، افزایش یافت (شکل ۲-D). فعالیت بالاتر آنزیم NR در رقم متحمل DT2008 در مقایسه با رقم حساس W28 احتمالا به واسطه کارآیی بیشتر جذب NO_3^- در این رقم تحت تنش خشکی است.

آنزیم GS نقش مهمی در متابولیسم نیتروژن دارد و به عنوان یک شاخص مهم در تعیین مقاومت به تنش خشکی پیشنهاد شده است (Nagy *et al*., 2013). نتایج مربوط به فعالیت آنزیم GS تحت شرایط ۴ و ۷ روز توقف آبیاری نشان داد که در رقم DT2008 میزان فعالیت این آنزیم پس از ۴ و ۷ روز توقف آبیاری تفاوت معنی‌داری در مقایسه با برگ‌های شاهد نشان نداد، در حالی که در رقم W28 کاهش معنی‌داری در مقدار فعالیت آنزیم پس از ۷ روز توقف آبیاری در مقایسه با شاهد مشاهده گردید (شکل ۲-E). در مطالعه‌ای روی گندم، کاهش فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز در پاسخ به تنش خشکی در رقم حساس گزارش شده است (Nagy *et al*., 2013).

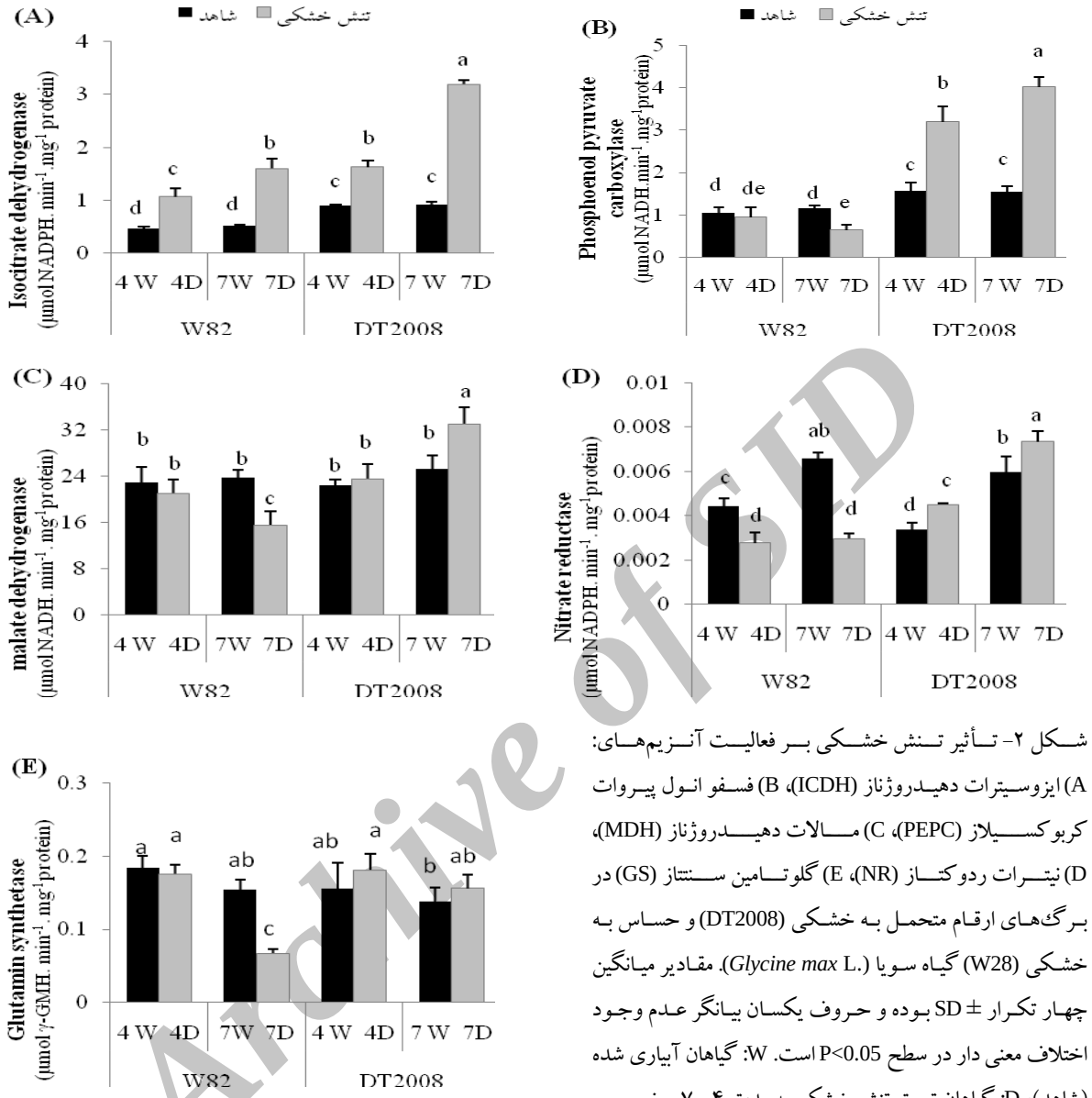
در مجموع، نتایج این مطالعه حاضر گویای آن است که شاخص‌های رشد در رقم حساس به خشکی W28 در مقایسه با همین شاخص‌ها در رقم متحمل به خشکی DT2008، بیشتر تحت تأثیر قرار گرفته و تأثیرات منفی تنش احتمالا با آثار تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های متابولیسم کربن و نیتروژن در گیاهان مزبور مرتبط است.

سپاسگزاری

نگارندگان از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان صمیمانه سپاسگزاری می‌کنند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- تأثیر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های: A) ایزوسیترات دهیدروژناز (ICDH)، B) فسفو انول پیروات کربوکسیلاز (PEPC)، C) مالات دهیدروژناز (MDH)، D) نیترات ردوکتاز (NR)، E) گلوتامین سنتتاز (GS) در برگ‌های ارقام متحمل به خشکی (DT2008) و حساس به خشکی (W28) گیاه سویا (*Glycine max* L.). مقادیر میانگین چهار تکرار ± SD بوده و حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح $P<0.05$ است. W: گیاهان آبیاری شده (شاهد)، D: گیاهان تحت تنش خشکی به مدت ۴ و ۷ روز.

Archive of SID

منابع

Airaki, M., Leterrier, M., Mateos, R. M., Valderrama, R., Chaki, M., Barroso, J. B., Del Rio, L. A., Palma, J. M. and Corpas, F. J. (2012) Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. Plant, Cell and Environment 35: 281-295.

Araya, T., Noguchi, K. and Terashima, I. (2010) Effect of nitrogen nutrition on the carbohydrate repression of photosynthesis in leaves of *Phaseolus vulgaris* L.. Journal of Plant Research 123: 371-379.

Arve, L. E., Torre, S., Olsen, J. E. and Tanino, K. K. (2011) Stomatal responses to drought stress and air humidity. In: Abiotic stress in plants mechanisms and adaptations (Eds. Shanker, A. K. and Venkateswarlu, B.) 267-280. InTech, Hyderabad, India.

www.SID.ir

Bertolli, S. C., Rapchan, G. L. and Souza, G. M. (2012) Photosynthetic limitations caused by different rates of water-deficit induction in *Glycine max* and *Vigna unguiculata*. Photosynthetica 50: 329-336.

Bhargava, S. and Sawant, K. (2013) Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. Plant Breeding 132: 21-32.

Bories, P. N. and Bories, C. (1995) Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. Clinical Chemistry 41: 904-907.

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

Bray, E. A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. (2000) Responses to abiotic stresses. In: Biochemistry and molecular biology of Pplants (Eds. Buchanan, B. B., Gruissem, W. and Jones, R. L.) 1158-1203. American Society of Plant Physiologists, Rockville.

Chaves, M. M., Maroco, J. P. and Pereira, J. (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. Functional Plant Biology 30: 239-264.

Chopra, J., Kaur, N. and Gupta, A. (2002) A comparative developmental pattern of enzymes of carbon metabolism and pentose phosphate pathway in mungbean and lentil nodules. Acta Physiologia Plantarum 24: 67-72.

Ciais, P., Reichstein, M., Viovy, N., Granier, A., Ogee, J., Allard, V., Aubinet, M., Buchmann, N., Bernhofer, C., Carrara, A., Chevallier, F., De Noblet, N., Friend, A. D., Friedlingstein, P., Grunwald, T., Heinesch, B., Keronen, P., Knohl, A., Krinner, G., Loustau, D., Manca, G., Matteucci, G., Miglietta, F., Ourcival, J. M., Papale, D., Pilegaard, K., Rambal, S., Seufert, G., Soussana, J. F., Sanz, M. J., Schulze, E. D., Vesala, T. and Valentini, R. (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. Nature 437: 529-533.

Cousins, A. B., Baroli, I., Badger, M. R., Ivakov, A., Lea, P. J., Leegood, R. C. and Caemmerer, S. V. (2007) The role of phosphoenolpyruvate carboxylase during C_4 photosynthetic isotope exchange and stomatal conductance. Plant Physiology 145: 1006-1017.

Galle, A., Florez-Sarasa, I., Thameur, A., de Paepe, R., Flexas, J. and Ribas-Carbo, M. (2010) Effects of drought stress and subsequent rewatering on photosynthetic and respiratory pathways in *Nicotiana sylvestris* wild type and the mitochondrial complex I-deficient *CMSII* mutant. Journal of Experimental Botany 61: 765-775.

Gálvez, L., González, E. M. and Arrese-Igor, C. (2005) Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. Journal of Experimental Botany 56: 2551-2561.

González, E. M., Gordon, A. J., James, C. L. and Arrese-lgor, C. (1995) The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. Journal of Experimental Botany 46: 1515-1523.

Gordon, A. J. and Kessler, W. (1990) Defoliation-induced stress in nodules of white clover: II. immunological and enzymic measurments of key proteins. Journal of Experimental Botany 41: 1255-1262.

Guimaraes-Dias, F., Neves-Borges, A. C., Viana, A. A. B., Mesquita, R. O., Romano, E., Grossi-de-Sa, M. F., Lima Nepomuceno, A., Loureiro, M. E. and Alves-Ferreira, M. (2012) Expression analysis in response to drought stress in soybean: shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. Genetics and Molecular Biology 35: 222-232.

Ha, C. V., Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Tran, U. T., Dong, N. V. and Phan Tran, L. S. (2013) Characterization of the newly developed soybean cultivar DT2008 in relation to the model variety W82 reveals a new Genetic Resource for Comparative and Functional genomics for improved drought

Archive of SID

www.SID.ir

tolerance. BioMed Research International 2013: 1-8.

Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L. S. P. (2012) Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. Trends in Plant Science 17: 172-179.

Kang, Y., Han, Y., Torres-Jerez, I., Wang, M., Tang, Y., Monteros, M. and Udvardi, M. (2011) System responses to long-term drought and re-watering of two contrasting alfalfa varieties. The Plant Journal 68: 871-889.

Krasensky, J. and Jonak, C. (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. Journal of Experimetal Botany 63: 1593-1608.

Ku, Y. S., Au-Yeung, W. K., Yung, Y. L., Li, M. W., Wen, C. Q., Liu, X. and Lam, H. M. (2013) Drought stress and tolerance in soybean. In: A comprehensive survey of international soybean research - genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships. (Ed. Broard, J. E.) 209-238. InTech, Rijeka, Croatia.

Kumar, R. G., Shah, K. and Dubey, R. S. (2000) Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. Plant Science 156: 23-34.

Lawlor, D. W. and Tezara, W. (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. Annals of Botany 103: 561-579.

León, A. M., Palma, J. M., Corpas, F. J., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C., Chatterjee, D., Mateos, R. M., del Río, L. A. and Sandalio, L. M. (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. Plant Physiology and Biochemistry 40: 813-820.

Leterrier, M., Barroso, J. B., Valderrama, R., Palma, J. M. and Corpas, F. J. (2012) ADP-Dependent isocitrate dehydrogenase from Arabidopsis roots contributes in the mechanism of defence against the nitro-oxidative stress induced by salinity. The Scientific World Journal 2012: 1-9.

Loreto, F. and Centritto, M. (2008) Leaf carbon assimilation in a water-limited world. Plant Biosystems 142: 154-161.

Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444: 139-158.

Manavalan, L. P., Guttikonda, S. K., Phan Tran, L. S. and Nguyen, H. T. (2009) Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. Plant and Cell Physiology 50: 1260-1276.

Marino, D., Frendo, P., Ladrera, R., Zabalza, A., Puppo, A., Arrese-Igor, C. and González, E. M. (2007) Nitrogen fixation control under drought stress, localized or systemic? Plant Physiology 143: 1968-1974.

Marino, D., González, E. M. and Arrese-Igor, C. (2006) Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses. Journal of Experimental Botany 57: 665-673.

Miyao, M. and Fukayama, H. (2003) Metabolic consequences of overproduction of phosphoenolpyruvate carboxylase in C_3 plants. Archives of Biochemistry and Biophysics 414: 197-203.

Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology 59: 651-681.

Nagy, Z., Németh, E., Guóth, A., Bona, L., Wodala, B. and Pécsváradi, A. (2013) Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: glutamine synthetase isoenzymes and rubisco. Plant Physiology and

Archive of SID

www.SID.ir

Biochemistry 67: 48-54.

Nasr Esfahani, M., Sulieman, S., Schulze, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L. S. P. (2014) Approaches for enhancement of N_2 fixation efficiency of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under limiting nitrogen conditions. Plant Biotechnology Journal 12: 387-397.

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmülling, T. and Tran, L. S. P (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. The Plant Cell Online 23: 2169-2183.

Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L. S. P. (2014) ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. New Phytologist 202: 35-49.

Pinheiro, C. and Chaves, M. M. (2011) Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. Journal of Experimental Botany 62: 869-882.

Prasad, P. V. V., Staggenborg, S. A. and Ristic, Z. (2008) Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. In: Response of crops to limited water :understanding and modeling water stress effects on plant growth processes. (Eds. Ahuja, L. R., Reddy, V. R., Saseendran, S. A. and Yu, Q.) 301-355. American Society of Agronomy, Crop Science Society of American, Soil Science Society of American, Madison, USA.

Preuss, S. B., Meister, R., Xu, Q., Urwin, C. P., Tripodi, F. A., Screen, S. E., Anil, V. S., Zhu, S., Morrell, J. A., Liu, G., Ratcliffe, O. J., Reuber, T. L., Khanna, R., Goldman, B. S., Bell, E., Ziegler, T. E., McClerren, A. L., Ruff, T. G. and Petracek, M. E. (2012) Expression of the *Arabidopsis thaliana BBX32* gene in soybean Iincreases grain yield. PLoS ONE 7: e30717.

Sarker, A., Erskine, W. and Singh, M. (2005) Variation in shoot and root characteristics and their association with drought tolerance in lentil landraces. Genetic Resources and Crop Evolution 52: 89-97.

Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. The Plant Journal 31: 279-292.

Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Panneerselvam, R. and Shao, M. A. (2009) Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants - biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe. Critical Reviews in Biotechnology 29: 131-151.

Tajik Khaveh, M., Alahdadi, I., Daneshian, J. and Armandpisheh, O. (2011) Evaluating effect of biofertilizer on nodulation and soybean (*Glysin max* L.) plants growth characteris under water deficit stress of seed. Journal of Agroecology 3(3): 337-346 (in Persian).

Thao, N. P. and Tran, L. S. P. (2012) Potentials toward genetic engineering of drought-tolerant soybean. Critical Reviews in Biotechnology 32: 349-362.

Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S. D., Maruyama, K., Fujita, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. The Plant Journal 49: 46-63.

Tran, L. S. P., Nishiyama, R., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2010) Potential utilization of

Archive of SID

www.SID.ir

NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. GM Crops 1: 32-39.

Vadez, V., Sinclair, T. R. and Serraj, R. (2000) Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N2 fixation in soybean. Physiologia Plantarum 110: 215-223.

Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Colmenero-Varea, P., del Río, L. A. and Barroso, J. B. (2007) Nitrosative stress in plants. FEBS Letters 581: 453-461.

Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Gomez-Rodriguez, M. V., Chaki, M., Pedrajas, J. R., Fernandez-Ocana, A. N. A., Del Rio, L. A. and Barroso, J. B. (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. Plant, Cell and Environment 29: 1449-1459.

Valliyodan, B. and Nguyen, H. T. (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. Current Opinion in Plant Biology 9: 189-195.

Xu, Z. and Zhou, G. (2006) Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass Leymus chinensis. Planta 224: 1080-1090.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annual Review of Plant Biology 57: 781-803.

Zhao, C. X., Guo, L. Y., Jaleel, C. A., Shao, H. B. and Yang, H. B. (2008) Prospectives for applying molecular and genetic methodology to improve wheat cultivars in drought environments. Comptes Rendus Biologies 331: 579-586.

Zlatev, Z. and Lidon, F. C. (2012) An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. Emirates Journal of Food and Agriculture 24: 57-72.

Archive of SID

www.SID.ir

Response of *Glycine max* to drought stress in relation to growth parameters and some key enzymes of carbon and nitrogen metabolism

Maryam Nasr Esfahani * and Maryam Madadkar Haghjou

Department of Biology, Faculty of Sciences, Lorestan University, Khorram abad, Iran

Abstract

Drought stress is one of the major constraints for production and yield of soybean (*Glycine max*). For this reason, identifying mechanisms associated with drought tolerance in soybean is very impotent for improving and increasing drought resistance by genetic engineering methods. In this study, the effect of drought on growth traits (plant height, fresh and dry weight of shoot and also fresh and dry weight of root) and enzyme activities of isocitrate dehydrogenase (ICDH), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), malate dehydrogenase (MDH), glutamine synthetase (GS) and nitrate reductase (NR) were assessed in drought sensitive and tolerant cultivars of soybean. The results showed that growth indicators are higher in drought tolerant cultivar under water availability (control) and water deficient when compared with those of drought sensitive cultivar. An increase in the activity of ICDH was observed in both the cultivars under drought stress as compared with their respective control plants but this activity was higher in tolerant cultivar. The activities of PEPC, MDH, GS and NR were significantly decreased in drought sensitive cultivar whereas the activities of these enzymes were higher in another cultivar. In general, the results of this study showed different behavior in the activities of assayed enzymes in two sets of soybean cultivars differing in drought tolerance and also decline of the activities of these enzymes in drought sensitive cultivar due to water deficit stress may be one of the possible reasons for decreased growth of the soybean plants under drought.

Key words: Drought stress, Soybean, Carbon metabolism, Nitrogen metabolism

* Corresponding Author: esfahani.m@lu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir