

## ارزیابی فعالیت آنزیم گایکول پراکسیداز در ژنوتیپ‌های کلزا در شرایط تنش و بدون تنش اسمزی

محمد محسن زاده گلفزانی<sup>۱</sup>، حبیب‌الله سمیع‌زاده لاهیجی<sup>۲</sup> و سید حسن حسنی کومله<sup>۳\*</sup>

۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار، بیوتکنولوژی کشاورزی- گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۹)

### چکیده

گونه‌های اکسیژن فعال به‌طور معمول بی‌درنگ به وسیله مولکول‌های پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان) که در یاخته حضور دارند پاک‌سازی می‌شوند. پراکسیدازها یکی از آنزیم‌های مهم پاداکسنده هستند که می‌توانند با استفاده از پراکسید هیدروژن، بسیاری از بستره (سوبسترا)های آلی و غیر آلی را اکسید کنند. در این تحقیق فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره‌های استخراج شده از کلزا در غلظت‌های مختلف گایکول بررسی شد. نمونه‌برداری همزمان از گیاهچه‌های کلزای در شرایط تیمار تنش و بدون تنش اسمزی، در مرحله ۴ تا ۶ برگی و در چهار زمان ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش اسمزی، انجام شد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو ژنوتیپ مقاوم (SLM046) و حساس (Hyola308) در ساعت‌های مختلف ارزیابی شده در شرایط بدون تنش متفاوت بوده و در ژنوتیپ SLM046 بیشترین فعالیت در ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش مشاهده شد. مقایسه دو ژنوتیپ Hyola308 و SLM046 در شرایط تنش نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در ساعت‌های ۴، ۸ و ۱۲ پس از اعمال تنش به ترتیب در SLM046 بیشتر از Hyola308 است. در ۲۴ ساعت پس از نمونه‌برداری بیشترین میزان فعالیت مربوط به Hyola308 شاهد در غلظت ۶۰ میلی‌مولار و کمترین میزان فعالیت مربوط به ژنوتیپ SLM046 تنش دیده بود. نتایج نشان داد، بالا بودن فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش، در ژنوتیپ SLM046 در مقایسه با Hyola308، سبب می‌شود تجمع  $H_2O_2$  در SLM046 کمتر از Hyola308 باشد.

واژه‌های کلیدی: آب‌کشت، آنزیم‌های پاداکسنده، پلی‌اتیلن گلیکول، کینتیک، گایکول.

## Investigation of guaiacol peroxidase (GPX) activity in two canola genotype under non-stress and osmotic conditions

Mohammad Mohsenzadeh Golfazane<sup>1</sup>, Habibollah Samizadeh Lahiji<sup>2</sup> and Hassan Hassani Kumleh<sup>3\*</sup>

1, 2, 3. Ph. D. Candidate, Associate Professor and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran

(Received: Mar. 5, 2016 - Accepted: May 8, 2016)

### ABSTRACT

Reactive oxygen species in the cell are rapidly removed by antioxidant molecules. Peroxidases are one of the important antioxidant enzymes that can oxidize many organic and inorganic substrates using hydrogen peroxide. In this study, peroxidase enzyme activities of canola extracts were evaluated in different guaiacol concentrations. Simultaneous sampling of rape seedling under non-stress and osmotic stress condition was conducted in 4-6 leaf stage at 4, 8, 12 and 24 hours after osmotic stress. The results showed that the GPX activity in non-stress condition was different in both Hyola308 (susceptible to drought) and SLM046 (tolerant to drought) varieties at different times of exposure to stress, and the highest activity of enzyme in SLM046 were observed at 12 hours after stress. Comparison of the two genotypes under stress condition showed that GPX activity in SLM046 at 4, 8 and 12 hours after osmotic treatment were higher than Hyola308. The highest rate of activity at 8 hours after stress was observed in SLM046 and the lowest activity was seen in Hyola308. At 24 hours after osmotic treatment, Hyola308 showed the highest activity at 60 mM concentration of substrate, and lowest rate was seen in SLM046. The results indicated that the high level of peroxidase activity in SLM046 genotype in stress condition, led to the lower accumulation of  $H_2O_2$  in comparison with Hyola308.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, guaiacol, hydroponic, kinetic, polyethylene glycol.

## مقدمه

تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری، سرما و گرما تأثیر زینباری روی رشد، باروری و تغییرپذیری‌های ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاه دارد (Ahmad & Prasad, 2011). تنش خشکی تأثیرگذارترین تنش غیرزیستی محیطی است (Mathur & Wattal, 1995) که با تأثیر بر فرایندهای رشدی، میزان تولید محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد و میزان تأثیر آن بسته به ژنوتیپ، زمان وقوع تنش خشکی و شدت آن متفاوت است (Robertson *et al.*, 2004). همچنین تنش خشکی با تغییر فعالیت آنزیم‌ها، تغییر در میزان نورساخت (فتوسنتز) گیاه و وضعیت آب برگ، باعث کاهش رشد گیاه می‌شود (Jaleel *et al.*, 2007). تنش خشکی تا حد زیادی فعالیت اسمزی یاخته را تحت تأثیر قرار داده و این امر موجب تنش اسمزی می‌شود که یکی از پی‌آمدهای آن تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و تنش اکسایشی (اکسیداتیو) است. طیف گسترده‌ای از اختلالات مولکولی که منجر به ایجاد آسیب‌های فیزیولوژیکی در گیاهان در شرایط تنش خشکی می‌شوند را می‌توان ناشی از تولید رادیکال‌های فعال و زینتار اکسیژن دانست (Ahmad *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2008).

گونه‌های اکسیژن فعال، توسط آنزیم‌های پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان) و مولکول‌های پاداکسنده غیرفعال شده و خنثی می‌شوند. آنزیم‌های پاداکسنده مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD)، همچنین مولکول‌های پاداکسنده غیرآنزیمی شامل آسکوربات، آلفا توکوفرول، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و گلوکاتینون نقش اساسی در سوخت‌وساز (متابولیسم) کردن ترکیب‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از آسیب و زیان‌های ناشی از تنش اکسایشی را به عهده دارند (Aroca, 2012). پراکسیدازهای گیاهی در چرخه فعالیت معمول خود، می‌توانند احیا  $H_2O_2$  را کاتالیز کنند (Kjalke *et al.*, 1992). پراکسیدازها در بسیاری

از فرایندهای یاخته‌ای مانند متابولیسم اکسین، تشکیل چوب، اتصالات عرضی در دیواره یاخته گیاهی، پاسخ به تنش‌های محیطی و مانند آن شرکت می‌کنند (Yamasaki *et al.*, 1997). گایکول پراکسیداز (EC 1.11.1.7)، یک پروتئین دارای هم می‌باشد که با بستره (سوبسترای) زیادی از جمله گایکول، پیروگالول و فنل واکنش می‌دهد، اما بستره‌های اختصاصی آن پراکسیدهدروژن است. در این آنزیم‌ها ماهیت الکترون‌دهندگی، تا حد زیادی به ساختار آنزیم بستگی دارد و ترکیب‌های فنلی مانند گایکول به‌عنوان دهنده الکترون به پراکسیدهدروژن عمل می‌کنند (Sharma *et al.*, 2012). در ساختار این آنزیم چهار پل دی سولفید حفاظت‌شده و دو یون  $Ca^{2+}$  وجود دارد (Schuller *et al.*, 1996). ایزو آنزیم‌های گایکول پراکسیداز در بافت‌های گیاه در واکوئل، سیتوزول و دیواره یاخته‌ای وجود دارند (Asada, 1992). گایکول پراکسیداز به‌طور گسترده به‌عنوان آنزیم تنش پذیرفته شده است و می‌تواند به‌عنوان کاهنده مؤثر اشکال واسطه اکسیژن مولکولی ( $O_2$ ) و رادیکال پراکسی در شرایط تنش عمل کند (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

کلزا نیز همانند بسیاری از گیاهان زراعی نسبت به تنش اسمزی آسیب‌پذیر است و آسیب ناشی از ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال در تنش اسمزی یکی از علل عمده کاهش محصول است. به دلیل اهمیت آنزیم‌های پاداکسنده به‌ویژه پراکسیداز در خنثی کردن اکسیدان‌ها، کینتیک آنزیم پراکسیداز برای ارزیابی نقش آنزیم یادشده در کلزا در شرایط تنش اسمزی بررسی شد. با توجه به هیدروژن‌زدایی (دهیدروژناسیون) شمار زیادی از ترکیب‌های آلی مانند فنل، آمیدهای آروماتیک و هیدروکینون توسط پراکسیداز در این پژوهش برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز از گایکول به‌عنوان دهنده الکترون استفاده شد. در این تحقیق برای درک رفتار آنزیم به‌جای استفاده از یک غلظت بستره (گایکول) از غلظت‌های مختلف بستره استفاده شد تا با ارزیابی سرعت بیشینه آنزیم در شرایط مختلف تنش و بدون تنش خشکی نقش آنزیم پراکسیداز در کلزا در پاسخ به تنش خشکی مشخص شود.

## 1. Reactive oxygen species

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در این پژوهش از دو ژنوتیپ کلزا به نام SLM046 و Hyola308 به ترتیب به‌عنوان متحمل و حساس به خشکی (Mirzaee *et al.*, 2013)، که بذر آن‌ها از مؤسسه تحقیقات اصلاح نژاد و بذر کرج تهیه شد، استفاده شد.

### جوانه‌زنی، رشد گیاه و اعمال تنش

پس از ضدعفونی، بذرهای دو ژنوتیپ کلزا Hyola308 و SLM046، آن‌ها به پتری‌های هشت سانتی‌متری حاوی کاغذ صافی سترون (استریل) منتقل و برای جوانه‌دار شدن در اتاقک کشت آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی با دمای  $23 \pm 2$  درجه سلسیوس قرار داده و پس از گذشت شش روز، جوانه‌ها به محیط کشت آبکشتی (هیدروپونیک) با محلول  $1/2$  هوگلند همراه با هوادهی (شدت نور ۶۵۵۰ لوکس، دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای  $23 \pm 2$  درجه سلسیوس) منتقل شدند. تعویض محیط کشت هر ۴۸ ساعت یک‌بار، انجام گرفت. شش روز پس از استقرار گیاهچه‌ها در شرایط یادشده، برای ایجاد تنش اسمزی با پتانسیل  $-1/48$  بار، ۱۰ درصد وزنی حجمی پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ مرک آلمان (Michel & Kaufmann, 1973) و برای پتانسیل صفر آب مقطر به‌عنوان شاهد، به بستر کشت آبکشتی اضافه شد.

### نمونه‌گیری، استخراج عصاره آنزیمی و ارزیابی فعالیت آنزیم

به‌منظور ارزیابی فعالیت آنزیم، نمونه‌برداری از برگ‌های با رشد کامل و توسعه‌یافته گیاه کلزا در مرحله رویشی در چهار زمان ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار تنش و همزمان از تیمارهای شاهد نیز انجام شد. پس از نمونه‌برداری، برای توقف فعالیت‌های متابولیک نمونه‌های برگ، در آغاز درون نیتروژن مایع قرار داده شد و سپس به فریزر  $-80$  درجه سلسیوس انتقال یافت.

به‌منظور استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷ استفاده شد.

برگ‌های فریزشده کلزا در هاون چینی ریخته و با نیتروژن مایع به‌خوبی کوبیده شده تا به‌کلی خرد شوند. به میزان ۰/۵ گرم از پودر آسیاب‌شده به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و با افزودن ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات، نخست به‌شدت تکان داده (ورتنکس) شده و سپس دو بار به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتریفوژ شدند و پس از انتقال عصاره رویی به میکروتیوب‌های به فریزر  $-80$  درجه سلسیوس انتقال داده شد (Beauchamp & Fridovich, 1971).

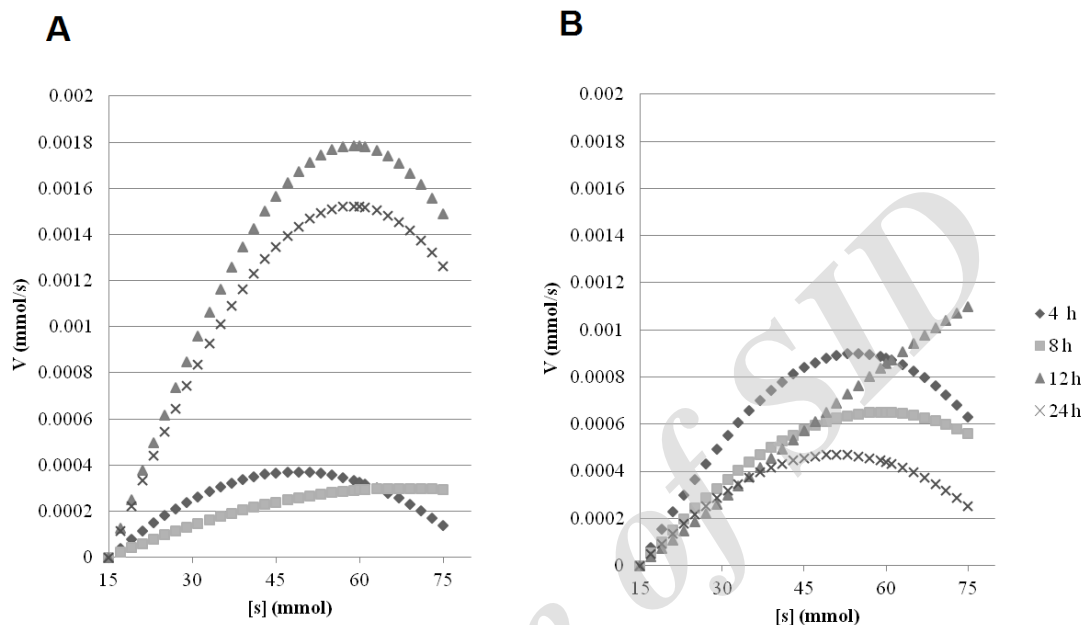
برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز وابسته به گایکول از روش (Chance & Maehly, 1955) استفاده شد. در این روش از بافر  $H_2O_2$  با غلظت ثابت (۲۲۵ میلی‌مولار) و بافر گایکول در غلظت‌های مختلف ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ میلی‌مولار گایکول استفاده شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، بافر  $H_2O_2$  به میزان ۴۹۵ میکرولیتر و بافر گایکول به همان میزان در دمای پایین (ظرف حاوی یخ) در کوت ۱ میلی‌لیتر با هم مخلوط شد و منحنی جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز پس از اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به این مخلوط در دو دقیقه با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) خوانده شد. در محلول بلانک به‌جای عصاره آنزیمی، ۱۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7) استفاده شد.

### نتایج و بحث

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط بدون تنش در دو ژنوتیپ SLM046 و Hyola308 در ساعت‌های مختلف یکسان نبود (شکل ۱). در ژنوتیپ SLM046 بیشترین فعالیت به میزان ۰/۰۰۱ در ۱۲ ساعت و کمترین میزان فعالیت آنزیم در ۸ و ۲۴ ساعت (به ترتیب ۰/۰۰۰۶ و ۰/۰۰۰۴۷) پس از نمونه‌برداری در گیاهان بدون تنش دیده شد. در حالی‌که، در ژنوتیپ Hyola308 در ۴ و ۸ ساعت کمترین فعالیت (به ترتیب ۰/۰۰۰۳۷ و ۰/۰۰۰۳) و با گذشت زمان در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت بیشترین فعالیت به ترتیب با میزان ۰/۰۰۱۷ و ۰/۰۰۱۵ دیده شد.

۸ و ۲۴ ساعت به تدریج کاهش یافته و میزان فعالیت آن بین دو حد فعالیت آنزیم در ژنوتیپ Hyola308 قرار دارد. به طور کلی بیشترین فعالیت آنزیم در ساعت‌های آغازین ژنوتیپ SLM046 و در ساعت‌های پایانی ژنوتیپ Hyola308 مشاهده شد.

مقایسه میزان فعالیت آنزیم در دو ژنوتیپ SLM046 و Hyola308 در شرایط بدون تنش نشان داد که در ۱۲ و ۲۴ ساعت برای ژنوتیپ Hyola308 بیشترین فعالیت و در همین ژنوتیپ در ۴ و ۸ ساعت کمترین فعالیت آنزیم، ولی در ژنوتیپ SLM046 فعالیت آنزیم به ترتیب ۱۲، ۴،



شکل ۱. سرعت واکنش آنزیم پراکسیداز در غلظت‌های مختلف بستره در زمان‌های مختلف در شرایط بدون تنش برای ژنوتیپ‌های Hyola308 (A) و SLM046 (B)

Figure 1. The rate of POD reaction at different substrate concentrations and times under non-stress growth condition in (A) Hyola308 and (B) SLM046

در ۲۴ ساعت فعالیت آنزیم کاهش پیدا می‌کند. در ژنوتیپ Hyola308 در ۴ و ۸ ساعت پس از اعمال تنش، فعالیت آنزیم کمتر از ساعت‌های ۱۲ و ۲۴ پس از اعمال تنش بود (شکل ۲).

مقایسه دو ژنوتیپ Hyola308 و SLM046 در شرایط تنش نشان داد که فعالیت آنزیم در ژنوتیپ SLM046 در ساعت‌های ۴، ۸ و ۱۲ به ترتیب بیشتر از ۴، ۸ و ۱۲ ژنوتیپ Hyola308 در شرایط تنش است ولی فعالیت آنزیم در ژنوتیپ SLM046 در شرایط تنش در ۲۴ ساعت کمتر از فعالیت آنزیم در Hyola308 در شرایط تنش در ۲۴ ساعت است. در ژنوتیپ SLM046 در ساعت‌های اولیه تنش افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز احتمال دارد به دلیل افزایش میزان بیان ژن‌های آنزیم پراکسیداز باشد در نتیجه با

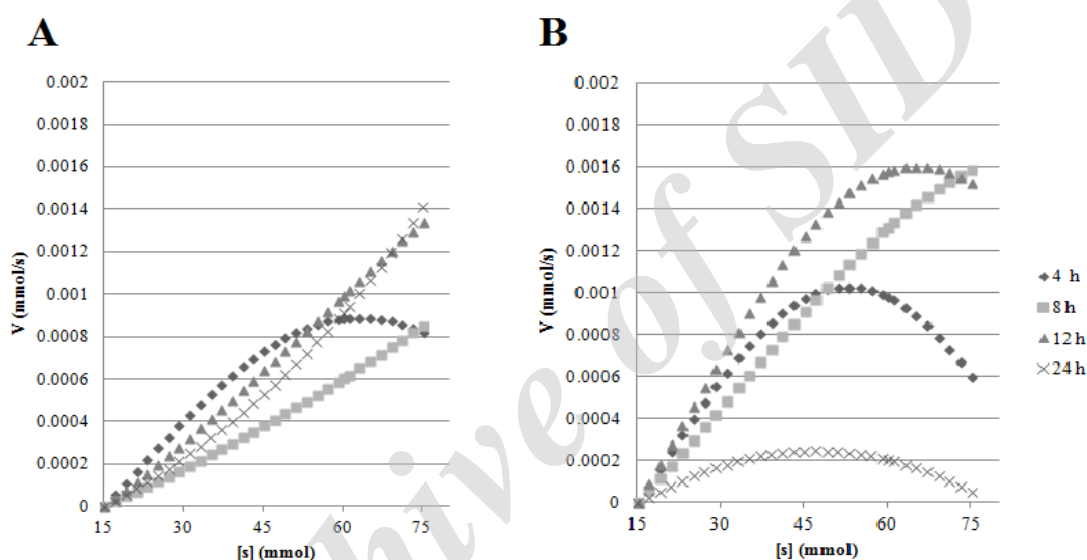
فعالیت آنزیم پراکسیداز ژنوتیپ شاهد SLM046 در زمان‌های ۴ و ۸ ساعت تا غلظت حدود ۶۰ میلی‌مولار و در زمان ۲۴ ساعت تا غلظت ۴۵ میلی‌مولار گایکول افزایش می‌یابد ولی در غلظت‌های بالاتر باعث کاهش فعالیت پراکسیدازی می‌شود، اما در زمان ۱۲ ساعت روند افزایش فعالیت تا غلظت ۷۵ میلی‌مولار دیده شد. در ژنوتیپ شاهد Hyola308 در زمان‌های ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت تا غلظت ۶۰ میلی‌مولار گایکول فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش می‌یابد ولی غلظت‌های بالاتر کاهش فعالیت پراکسیدازی دیده شد.

در بررسی ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش مشاهده شد که در ژنوتیپ تنش دیده SLM046 به تدریج از ساعت‌های ۴ الی ۱۲ فعالیت آنزیم افزایش، و سپس

گایکول، و در زمان‌های ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت تا غلظت ۷۵ میلی‌مولار گایکول، فعالیت پراکسیداز افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌تواند به دلیل رویارویی با تنش اکسایشی و محافظت از سامانه دفاعی گیاه در برابر آسیب اکسایشی باشد (Malecka *et al.*, 2012)، به همین دلیل شاید بتوان گفت در ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش در ژنوتیپ Hyola308، به دلیل افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز به احتمال ژن پراکسیداز افزایش بیان داشت.

افزایش میزان آنزیم، فعالیت آنزیم بیشتر شده و گیاه از این راه می‌تواند میزان  $H_2O_2$  افزایش یافته در تنش را کاهش دهد.

فعالیت پراکسیداز در ژنوتیپ تنش دیده SLM046 در زمان‌های ۴ و ۲۴ ساعت تا غلظت ۴۵ میلی‌مولار و در زمان ۱۲ ساعت تا غلظت ۶۰ میلی‌مولار گایکول افزایش یافت ولی در غلظت‌های بالاتر باعث کاهش فعالیت پراکسیداز شد، ولی در زمان ۸ ساعت تا غلظت ۷۵ میلی‌مولار کاهش فعالیت دیده نشد. در ژنوتیپ Hyola308 در زمان ۴ ساعت تا غلظت ۶۰ میلی‌مولار



شکل ۲. سرعت واکنش آنزیم پراکسیداز در غلظت‌های مختلف بستره در زمان‌های مختلف در شرایط تنش برای ژنوتیپ‌های Hyola308 (A) و SLM046 (B)

Figure 2. The rate of POD reaction at different substrate concentrations and times under non-stress growth condition in (A) Hyola308 and (B) SLM046

ساعت‌های ۱۲ و ۸ پس از اعمال تنش و کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بوده و میزان فعالیت آنزیم در SLM046 بدون تنش تا حدودی یکسان بود. به عبارتی در ساعت‌های ۴، ۸ و ۱۲ در ژنوتیپ SLM046 در شرایط تنش فعالیت آنزیم بیشتر از ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ بدون تنش بوده ولی در ۲۴ ساعت مشاهده شد فعالیت آنزیم در شرایط بدون تنش بیشتر از شرایط تنش است.

به‌طور کلی بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف بستره (گایکول) و نمونه‌برداری در ساعت‌های مختلف از تیمارهای تنش دیده و شاهد برای ژنوتیپ

در نتایج (2007) Khanna-Chopra & Selote بررسی خود گزارش کردند که فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم‌های متحمل به خشکی گندم بیشتر از رقم‌های حساس است. نتایج بررسی‌های انجام شده توسط Mercado *et al.* (2004) نشان داد که فعالیت بیشتر پراکسیداز همراه با قابلیت نگهداری آب بیشتر در برگ‌ها است.

بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف بستره و نمونه‌برداری در ساعت‌های مختلف اعمال تنش و بدون تنش برای ژنوتیپ SLM046 نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به

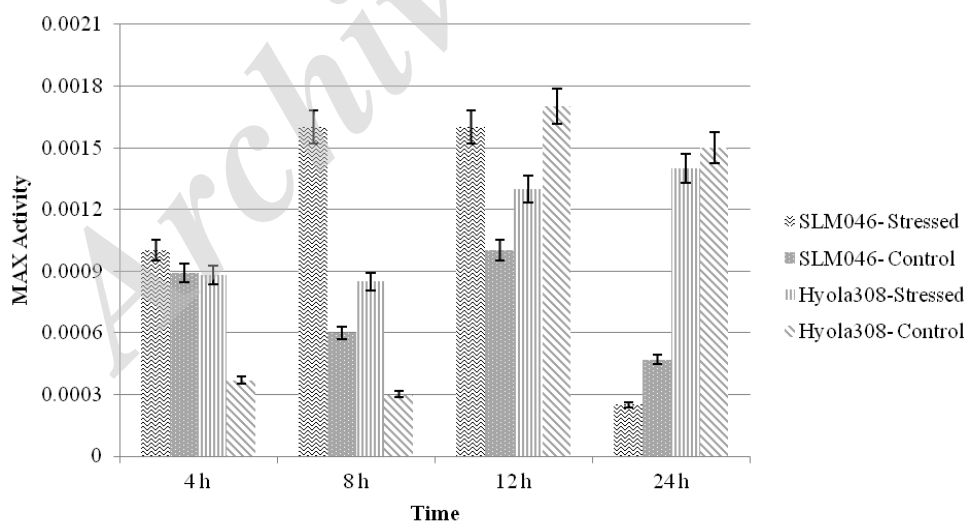
پراکسیداز در ۱۲ ساعت برای ژنوتیپ شاهد در غلظت حدود ۶۰ میلی مولار گایکول و کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۴ و ۸ ساعت برای ژنوتیپ شاهد در غلظت حدود ۴۵ میلی مولار گایکول بود این امر گویای این است که جایگاه فعال آنزیم به اشباع رسیده است.

افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز پاسخی از جانب گیاه به افزایش ROS ها است. البته این نکته را نیز باید مدنظر قرار داد که سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی چندی در مقاومت یا حساسیت گیاهان به تنش خشکی دخالت دارند. تنش کم آبی در گیاه جو باعث افزایش فعالیت آنزیم های سوپراکسید دسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز می شود و مشخص شده است که در بین آنزیم های مورد ارزیابی، پراکسیداز می تواند به عنوان مهم ترین آنزیم برای افزایش مقاومت گیاه جو در مقابل تنش اکسایشی ناشی از کم آبی فعالیت کند (Amini et al., 2009). نتایج دیگر بررسی ها، افزایش (Zhang & Kirkham, 1994) و کاهش (Zhang & Kirkham, 1996) فعالیت پراکسیداز را در پاسخ به تنش خشکی نشان دادند.

SLM046 نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۸ و ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش و کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش تا غلظت ۴۵ میلی مولار گایکول بود.

فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ Hyola308 در ۴ و ۸ ساعت پس از اعمال تنش نسبت به ۴ و ۸ ساعت بدون تنش بیشتر بود، ولی در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش فعالیت آنزیم کمتر از ۱۲ و ۲۴ ساعت بدون تنش بود. فعالیت آنزیم در ۴ و ۸ ساعت در شرایط تنش و بدون تنش و نیز در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تنش پایین بوده ولی بیشترین فعالیت آنزیم در ۲۴ ساعت بدون تنش مشاهده شده است. با توجه به نتایج بالا می توان نتیجه گرفت که تغییر فعالیت آنزیم در ژنوتیپ Hyola308 در ساعت های ۱۲ و ۲۴ ناشی از اعمال تنش نیست.

به طور کلی بررسی فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف بستره (گایکول) و نمونه برداری در ساعت های مختلف از تیمارهای تنش دیده و شاهد برای ژنوتیپ Hyola308 نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم



شکل ۳. فعالیت آنزیم پراکسیداز در زمان های مختلف در شرایط تنش و بدون تنش برای ژنوتیپ های Hyola308 و SLM046  
Figure 3. Activity POD reaction at different times under stress and non-stress growth condition in Hyola308 and SLM046

تنش و بدون تنش بود، این امر می تواند گویای پاسخ کلزا به شرایط خشکی برای کاهش  $H_2O_2$  باشد (شکل ۳). به طور کلی در چهار ساعت پس از اعمال تنش

در چهار ساعت پس از اعمال تنش فعالیت پراکسیداز در ژنوتیپ SLM046 تنش دیده بیشتر از ژنوتیپ SLM046 بدون تنش و Hyola308 در شرایط

در ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش در ژنوتیپ SLM046 و Hyola308 شاهد تا غلظت ۶۰ میلی‌مولار گایکول، فعالیت پراکسیداز افزایش یافت و در هر دو ژنوتیپ، در غلظت‌های بالاتر کاهش فعالیت پراکسیداز مشاهده شد، اما فعالیت آنزیم در ژنوتیپ Hyola308 تنش‌دیده و SLM046 شاهد در غلظت‌های بالاتر از ۷۵ میلی‌مولار همچنان در حال افزایش بود. در ۱۲ ساعت پس از تنش بیشترین میزان فعالیت مربوط به ژنوتیپ Hyola308 شاهد و کمترین میزان فعالیت مربوط به ژنوتیپ SLM046 شاهد بود. بنابراین فعالیت آنزیم در ژنوتیپ Hyola308 برخلاف ژنوتیپ SLM046 با کاهش همراه بوده است.

برای تیمارهای ۲۴ ساعت مشاهده شد فعالیت آنزیم در ژنوتیپ SLM046 در شرایط تنش کمتر از SLM046 بدون تنش و Hyola308 در شرایط تنش و بدون تنش است (شکل ۳).

در ۲۴ ساعت در ژنوتیپ SLM046 کنترل و تنش‌دیده تا غلظت ۴۵ میلی‌مولار گایکول، فعالیت پراکسیدازی آنزیم افزایش داشت و در هر دو ژنوتیپ در غلظت‌های بالاتر کاهش فعالیت پراکسیداز دیده شد، اما فعالیت آنزیم در ژنوتیپ SLM046 کنترل نسبت به تنش دیده بیشتر بود. در ژنوتیپ Hyola308 کنترل فعالیت آنزیم تا غلظت ۶۰ میلی‌مولار گایکول افزایش یافت و در غلظت‌های بالاتر کاهش فعالیت پراکسیداز مشاهده شد، اما در ژنوتیپ Hyola308 تنش‌دیده پس از ۲۴ ساعت تا غلظت ۷۵ هنوز به نقطه اشباع نرسیده و شاید بتوان گفت در ژنوتیپ Hyola308 پس از ۲۴ ساعت تنش گیاه با افزایش بیان آنزیم پراکسیداز همراه بود و در غلظت بالاتر بستره، جایگاه‌های اتصال آنزیم هنوز اشغال نشده است. در ۲۴ ساعت پس از تنش بیشترین میزان فعالیت مربوط به ژنوتیپ Hyola308 شاهد در غلظت ۶۰ بود و کمترین میزان فعالیت مربوط به ژنوتیپ SLM046 تنش‌دیده بود.

همان‌طور که گفته شد فعالیت پراکسیداز سبب شکسته شدن هیدروژن پراکسید می‌شود که این امر در کاهش اثرگذاری سمی ROS نقش دارد چون هیدروژن پراکسید بسیار فعال است و سبب تحریک

فعالیت پراکسیدازی در ژنوتیپ SLM046 کنترل و تنش دیده تا غلظت حدود ۶۰ میلی‌مولار گایکول، افزایش داشت و در هر دو غلظت‌های بالاتر از آن باعث کاهش فعالیت پراکسیدازی شد. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود در ژنوتیپ Hyola308 تنش‌دیده فعالیت آنزیم تا غلظت ۶۰ میلی‌مولار و در ژنوتیپ کنترل تا غلظت ۴۵ میلی‌مولار گایکول افزایش می‌یابد و از این غلظت بالاتر باعث کاهش فعالیت پراکسیدازی می‌شود. از آنجایی که برای ژنوتیپ Hyola308 تنش‌دیده، به نقطه اشباع رسیدن زودتر دیده شد، شاید بتوان گفت، این ژنوتیپ در چهار ساعت با کاهش بیان آنزیم پراکسیداز همراه بود و جایگاه‌های اتصال آنزیم در غلظت پایین از بستره اشغال شده است. در چهار ساعت پس از تنش بیشترین میزان فعالیت مربوط به ژنوتیپ SLM046 تنش‌دیده و کمترین میزان فعالیت مربوط به ژنوتیپ Hyola308 شاهد بود.

در ۸ ساعت پس از اعمال تنش نیز فعالیت آنزیم در ژنوتیپ SLM046 بیشتر از دیگران بود که این امر بیانگر نقش آنزیم پراکسیداز به‌عنوان یکی از عامل‌های کنترل عامل‌های زیانبار در کلزا است. در این ساعت فعالیت پراکسیداز در هر دو ژنوتیپ تا غلظت ۷۵ میلی‌مولار گایکول، افزایش داشت و سرعت واکنش در ژنوتیپ SLM046 کنترل نسبت به تنش‌دیده کمتر بود. افزایش فعالیت در ژنوتیپ Hyola308 (شاهد و تنش‌دیده) تا غلظت ۷۵ میلی‌مولار دیده شد. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود بر پایه خطای استاندارد مربوطه مشخص است که در هشت ساعت پس از اعمال تنش بیشترین میزان فعالیت مربوط به ژنوتیپ SLM046 تنش‌دیده و کمترین میزان فعالیت مربوط به ژنوتیپ Hyola308 شاهد بود. فعالیت آنزیم در هر دو ژنوتیپ با افزایش همراه بوده است.

همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود در ۱۲ ساعت بیشترین میزان فعالیت پراکسیدازی مربوط به ژنوتیپ Hyola308 بدون تنش است. ولی نکته مهم این است که فعالیت آنزیم در SLM046 در شرایط تنش بیشتر از فعالیت آنزیم در SLM046 بدون تنش و Hyola308 در شرایط تنش است.

در آنزیم گایکول پراکسیداز می‌شود. آن‌ها بیان کردند که افزایش فعالیت گایکول پراکسیداز می‌تواند یک عامل مهم برای تجزیه آب اکسیژنه به‌ویژه در هنگامی باشد که کاتالاز غیرفعال شده است. افزایش فعالیت آنزیم گایکول پراکسیداز در نتایج بررسی‌های Esfandiari *et al.* (2011) در برگ‌های گیاه خلر در رویارویی با تنش شوری نیز مشاهده شد.

در گیاهان کلم (*Brassica oleracea*) که در معرض پلی‌اتیلن گلیکول واقع شده بودند، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در مدت ۲۴ ساعت افزایش یافت (Sun *et al.*, 2010). در بررسی Mirzaee *et al.* (2013)، فعالیت پراکسیداز در تنش خشکی در ریشه و برگ در هر دو ژنوتیپ کلزا القا شد. افزایش فعالیت پراکسیداز در شرایط تنش خشکی در آرابیدوپسیس (Jung, 2004)، گندم (Hasheminasab *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2007) و دیگر ژنوتیپ‌های کلزا (Abedi & Pakniyat, 2010) نیز گزارش شده است.

زیرا همان‌طور که گفته شد افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌تواند به‌دلیل رویارویی با تنش اکسایشی و حفاظت از گیاه در برابر آسیب اکسایشی باشد. همچنین کاهش فعالیت آنزیم در غلظت‌های بالای بستره احتمال دارد به‌دلیل افزایش تولید  $H_2O_2$  در یاخته و غیرفعال شدن آنزیم توسط  $H_2O_2$  باشد (Fatima & Ahmad, 2005).

#### نتیجه‌گیری کلی

میزان فعالیت آنزیم در شرایط بدون تنش در ژنوتیپ‌های SLM046 و Hyola308 در زمان‌های مختلف متفاوت است به‌طوری‌که در SLM046 در ۱۲ ساعت بیشترین و ۸ و ۲۴ ساعت کمترین میزان فعالیت آنزیم دیده شده است، ولی در Hyola308 در ۴ و ۸ ساعت کمترین فعالیت و با گذشت زمان در ۱۲ و ۲۴ ساعت بیشترین فعالیت دیده شد. به عبارتی رفتار آنزیم در زمان‌های مختلف حتی در شرایط بدون تنش نیز یکسان نیست. مقایسه دو ژنوتیپ‌های SLM046 و Hyola308 در شرایط تنش و بدون تنش نشان داد که فعالیت آنزیم در SLM046 در ساعت‌های

تجمع دیگر گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. پایین بودن فعالیت آنزیم در SLM046 در ۲۴ ساعت پس از تنش نسبت به بدون تنش در ساعت همسان و ساعت‌های ۴، ۸ و ۱۲ پس از اعمال تنش نشان می‌دهد که SLM046 در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش نمی‌تواند با پراکسیداز میزان  $H_2O_2$  را کاهش دهد.

به‌طورکلی در شرایط تنش خشکی، روزنه‌ها بسته می‌شوند و در پی آن غلظت  $CO_2$  در بافت میان‌برگ (مزوفیل) کاهش می‌یابد و به دنبال این وضعیت واکنش‌های چرخه کالوین مختل شده و محصولات به‌دست‌آمده از واکنش‌های روشنایی، که شامل ATP و NAD(P)H است، مصرف نمی‌شوند. در چنین شرایطی میزان NAD(P)H افزایش یافته و با انتقال الکترون به مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون رادیکال سوپر اکسید ( $O_2^-$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال هیدروکسیل ( $OH^\cdot$ ) تشکیل می‌شود (Sairam & Saxena, 2000; Türkan *et al.*, 2005). رادیکال‌های آزاد ایجاد شده با آسیب‌های مولکولی و یاخته‌ای به گیاه در نهایت باعث مرگ گیاه می‌شوند. گیاه با راه‌اندازی چرخه مهلر، آنیون سوپراکسید را توسط آنزیم سوپراکسید دسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل خواهد کرد. در مرحله بعد گیاه با آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز و کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به آب می‌شود. فعال شدن آنزیم پاداکسنده، در ژنوتیپ مقاوم کلزا می‌تواند از تشکیل انواع اکسیژن فعال پیشگیری کرده و سبب شود که الکترون مازاد موجود روی زنجیر انتقال الکترون کاهش یابد (Edreva, 2005). در نتیجه آسیب‌های ناشی از تنش اکسایشی متوقف شود. آنزیم گایکول پراکسیداز یکی از مهم‌ترین گروه‌های پراکسیداز بوده که عمل اکسایش و احیا را بر عهده دارند و گایکول را به‌عنوان یک بستره اکسید می‌کند و در نهایت واکنش گایکول با آب اکسیژنه منجر به تولید ترکیبی به نام تترآگایاکوکوئینون می‌شود (Amiri *et al.*, 2010). Abedi & Pakniyat (2010) با بررسی تأثیر تنش خشکی بر آنزیم‌های پاداکسنده گیاه کلزا دریافتند تنش خشکی باعث افزایش فعالیت



غیرزیستی پیچیده بوده و با بیان ژن‌های چند و مسیرهای بیوشیمیایی گوناگونی همراه است. به احتمال گیاه در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش از مسیرهای دیگر برای ایجاد مقاومت استفاده می‌کند. همچنین در ژنوتیپ Hyola308 در ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش افزایش فعالیت آنزیم و در ۱۲ ساعت تنش کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز دیده شد. بنابراین به دلیل دخالت سازوکارهای آنزیمی و غیر آنزیمی پرشمار در تحمل یا حساسیت گیاهان به تنش خشکی، برای درک بهتر عامل‌های سم‌زدای ROS بایستی ارزیابی جامعی روی کل سامانه پاداکسندگی گیاه انجام شود.

۴، ۸ و ۱۲ پس از اعمال تنش بیشتر از SLM046 بدون تنش و Hyola308 در شرایط تنش و بدون تنش است. بنابراین با توجه به بالا بودن فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش، در ژنوتیپ SLM046 در مقایسه با Hyola308، تجمع  $H_2O_2$  در SLM046 کمتر از Hyola308 خواهد بود. همان‌طور که گفته شد در ژنوتیپ SLM046 فعالیت آنزیم از ۴ ساعت تا ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش افزایش یافته ولی در ۲۴ ساعت فعالیت پراکسیداز کاهش می‌یابد. تحمل تنش در یک ژنوتیپ گیاهی به برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیک و ریخت‌شناختی (مورفولوژیک) آن بستگی دارد به عبارتی پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های

## REFERENCES

1. Abedi, T. & Pakniyat, H. (2010). Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal Genetics and Plant Breeding*, 46(1), 27-34. (in Farsi)
2. Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G. & Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical reviews in biotechnology*, 30(3), 161-175.
3. Ahmad, P. & Prasad, M. N. V. (2011). *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. Springer Science & Business Media.
4. Ahmad, P., Sarwat, M. & Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51(3), 167-173.
5. Amini, Z., Hadad, R. & Moradi, F. (2009). The Effect of Water Deficit Stress on Antioxidant Enzymes During Generative Growth Stages in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Water and Soil Science*, 12(46), 65-74. (in Farsi)
6. Amiri, D. A. S. R., Parsa, M., Nezami, A. & Ganjeali, A. (2010). The effects of drought stress at different phenological stages on growth indices of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in greenhouse conditions. *Iranian Journal of Pulses Research*, 1(2), 69-84.
7. Aroca, R. (2012). Plant responses to drought stress From Morphological to Molecular Features
8. In Springer. *Verlag Berlin Heidelberg New York Dordrecht London: Springer*.
9. Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase –a hydrogen peroxide- scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 235-241.
10. Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.
11. Chance, B. & Maehly, A. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775.
12. Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106(2), 119-133.
13. Esfandiari, E., Abbasi, A., Enayati, V. & Mosavi, S. (2011). Different Behavior of Root and Leaf in Grass Pea Landraces in Response to Oxidative Stress Caused by Salinity. *Journal of Agricultural Science*, 20(4), 65-76. (in Farsi)
14. Fatima, R. A. & Ahmad, M. (2005). Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment*, 346(1), 256-273.
15. Hasheminasab, H., Assad, M. T., Aliakbari, A. & Sahhafi, S. R. (2012). Influence of drought stress on oxidative damage and antioxidant defense systems in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Journal of Agricultural Science*, 4(8), 20.
16. Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. & Panneerselvam, R. (2007). Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60(2), 201-206.

17. Jung, S. (2004). Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science*, 166(2), 459-466.
18. Khanna-Chopra, R. & 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(2), 276-283.
19. Kjalke, M., Andersen, M. B., Schneider, P., Christensen, B., Schülein, M. & Welinder, K. G. (1992). Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1120(3), 248-256.
20. Malecka, A., Piechalak, A., Mensinger, A., Hanc, A., Baralkiewicz, D. & Tomaszewska, B. (2012). Antioxidative defense system in *Pisum sativum* roots exposed to heavy metals (Pb, Cu, Cd, Zn). *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(6), 1721-1730.
21. Mathur, D. & Watal, P. (1995). Influence of water stress on seed yield of Canadian rape at flowering and role of metabolic factors. *Plant Physiology and Biochemistry New Delhi*, 22, 115-118.
22. Mercado, J. A., Matas, A. J., Heredia, A., Valpuesta, V. & Quesada, M. A. (2004). Changes in the water binding characteristics of the cell walls from transgenic *Nicotiana tabacum* leaves with enhanced levels of peroxidase activity. *Physiologia Plantarum*, 122(4), 504-512.
23. Michel, B. E. & Kaufmann, M. R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, 51(5), 914-916.
24. Mirzaee, M., Moieni, A. & Ghanati, F. (2013). Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(3), 593-602.
25. Robertson, M., Fukai, S. & Peoples, M. (2004). The effect of timing and severity of water deficit on growth, development, yield accumulation and nitrogen fixation of mungbean. *Field Crops Research*, 86(1), 67-80.
26. Sairam, R. & Saxena, D. (2000). Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 184(1), 55-61.
27. Schuller, D. J., Ban, N., van Huystee, R. B., McPherson, A. & Poulos, T. L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4(3), 311-321.
28. Shahverdikandi, M. A., Tobeh, A., Godehkahriz, S. J. & Rastegar, Z. (2011). The study of germination index of canola cultivars for drought resistance. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 2(3), 89-95.
29. Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Wu, G., Zhang, J.-H., Lu, Z.-H. & Hu, Y.-C. (2007). Changes of some anti-oxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54(2), 143-149.
30. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*.
31. Sun, C., Johnson, J. M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmüller, R. & Lou, B. (2010). *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of plant Physiology*, 167(12), 1009-1017.
32. Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F. & Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1), 223-231.
33. Vangronsveld, J. & Clijsters, H. (1994). Toxic effects of metals. Plants and the chemical elements. *Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity*, 150-177.
34. Yamasaki, H., Sakihama, Y. & Ikehara, N. (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, 115(4), 1405-1412.
35. Zhang, J. & Kirkham, M. (1994). Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology*, 35(5), 785-791.
36. Zhang, J. & Kirkham, M. (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, 132(3), 361-373.