بررسی میزان پروتیین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تحت تنش کمبود آب در لاین-های جو

Protein Changes and Antioxidant Enzymes Activity on Barley Inbred Lines Under Water Shortage

رحیم حداد[1*] و مرتضی سالک جلالی[2]

چکیده

پژوهش‌های زیادی درباره اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گیاهان زراعی صورت گرفته است، اما اطلاعات اندکی درباره این نوع مطالعات در شرایط مزرعه وجد دارد. در پژوهش حاضر میزان پروتیین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت شامل سوپراکساید دسموتاز (SOD)، اسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) تحت تنش کمبود آب برای 5 لاین مختلف جو، با استفاده از روش‌های سنجش اسپکتروفتومتری و سنجش ژل در قالب آزمایش فاکتوریل مطالعه گردید. میزان پروتیین کل با اعمال تنش خشکی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار آبی نشان داد، در حالی‌که میزان کلروفیل کاهش یافت. طبق نتایج تجزیه واریانس، فعالیت آنزیم‌های سوپر اکساید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز تحت تنش کمبود آب به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان این افزایش برای آنزیم پراکسیداز در شرایط خشکی نسبت به آبی شدیدتر بود. هم‌چنین افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکساید دسموتاز تحت تنش خشکی نسبت به تنش دیم معنی‌دار شد. مطالعه فعالیت آیزوزایم این آنزیم‌ها، نتایج به-دست آمده را تایید کرد. نتایج به‌دست آمده حاکی از آن است که از بین مجموع آنزیم‌های مورد مطالعه، آنزیم اسکوربیت پراکسیداز فعالیت کمی داشته و لذا نقش کمرنگی در محافظت گیاه از تنش خشکی ایفا می‌کند، در حالی‌که آنزیم پراکسیداز به‌عنوان یکی از آنزیم‌های مهم جهت افزایش مقاومت گیاه جو در مقابل تنش ناشی از خشکی نقش کلیدی بر عهده دارد. هم‌چنین فعالیت آنزیم‌ها نشان داد که آنزیم‌های مختلفی بسته به میزان تنش خشکی در جو بیان شده و فعالیت نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: لاین‌های جو، خشکی، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، پروتیین، کلروفیل

Archive of SID

1. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین.
2. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین.
*. نویسنده مسوول Email: rahimhadadd

www.SID.ir

مقدمه

تنش خشکی علت اصلی کاهش رشد گیاهان و عملکرد آن‌ها در مناطق نیمه خشک محسوب می‌شود که موجب تحریک گیاه به یکسری پاسخ‌های دفاعی در سطوح مختلف مولکولی، سلولی و فیزیولوژیکی می‌شود. هم‌چنین برخی آزمایش‌ها نشان می‌دهند که در مراحل پیری مثل خوشه‌دهی، رسیدگی دانه و غیره و در اثر تنش‌های زنده و غیر زنده مانند نور شدید، کم آبی و خشکی میزان پروتیین محلول کل سلول کاهش می‌یابد (پیرز *آمادور*[1] و همکاران، 2000 و *اوهه*[2] و همکاران، 2005). کمبود آب در گیاه باعث افزایش مقادیر اشکال اکسیژن فعال (ROS) از قبیل آنیون سوپراکساید ($O_2^{\cdot -}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل ($HO^{\cdot}$) و اکسیژن منفرد (O_2^1) می‌شود. این مولکول‌های فعال موجب صدمه به ماکرومولکول‌ها و نیز ساختار سلولی گردیده یا این‌که به‌عنوان مولکول منفرد موجب فعال شدن سلسله پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌گردند. گیاهان از دو سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی برای دفاع در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال استفاده می‌نمایند. سیستم آنزیمی شامل آنزیم‌هایی نظیر سوپراکساید دسموتاز، گوئیکول پراکسیداز، کاتالاز و اسکوربیت پراکسیداز می‌باشد. آنزیم سوپر اکساید دسموتاز یک آنزیم حد واسط بوده و رادیکال‌های آزاد سوپر اکساید را به O_2 و H_2O_2 تبدیل می‌کند. بقیه آنزیم‌های مذکور در پاکسازی مولکول‌های H_2O_2 تولید شده در سلول، ایفای نقش می‌نمایند (*آریانو*[3] و همکاران، 2005). در سیستم غیر آنزیمی، آنتی اکسیدانت‌هایی مانند آلفا-توکوفرول (ویتامین E)، اسید اسکوربیک (ویتامین C) و ویتامین A خط دفاعی بعدی را در مقابل حمله انواع رادیکال‌های اکسیژن فعال تشکیل می‌دهند (*بیابر*[4] و همکاران، 2004). در مقایسه با گیاهان حساس، بالا بودن فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در گیاهان مقاوم به تنش خشکی، نقش مهمی در مقاوم کردن آن‌ها در مقابل تنش یاد شده را دارد (هسو و *کائو*[5]، 2003). با توجه به این‌که کشور ایران در منطقه خشک و نیمه‌خشک قرار گرفته است، تولید گیاهان مقاوم به خشکی با عملکرد مناسب با استفاده از روش‌های جدید زیست فناوری امری ضروری به‌نظر می‌رسد. جهت تحقق این امر، آگاهی از وضعیت دفاعی گیاه در مقابله با تنش خشکی ضروری است تا بتوان در مراحل بعدی، ژن‌های مسوول این مکانیسم‌ها را شناسایی و همسانه کرد.

پژوهش‌های متعددی در شرایط آزمایشگاهی برای اعمال تنش خشکی و بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت صورت گرفته است، در صورتی‌که به‌نظر می‌رسد اگر این نوع از تنش در شرایط طبیعی رشد گیاه صورت گیرد، اعتماد به نتایج و اطلاعات به‌دست آمده بیش‌تر خواهد بود. لذا در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم‌های سوپراکساید دسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و اسکوربیت پراکسیداز با اعمال سه تیمار مختلف آب یعنی آبیاری کامل، شرایط دیم و تنش شدید کمبود آب (خشکی) در گیاه زراعی جو دو پر در شرایط طبیعی مزرعه بررسی شده و میزان تغییر فعالیت آنزیم‌های مذکور تحت تنش کمبود آب در مقایسه با شرایط آبیاری کامل، مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

طی سال زراعی 84-1383 آزمایش مذکور در مزرعه گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین انجام گردید. زمین مزرعه در فصل پاییز شخم و پس از اضافه کردن 20 تن در هکتار کود دامی به آن دیسک زده شد. پس از نرم کردن زمین، بذرهای پنج لاین گیاه جو دو پر (جدول 1) که بر اساس آزمایش‌های دیم از بین ژنوتیپ‌های موجود در گروه مذکور طی طرح‌های قبلی انتخاب شده بودند، به فاصله 25 سانتی‌متر از یکدیگر در آبان ماه سال 1383 در قالب آزمایش بلوک کامل تصادفی با سه نوع تیمار آبی، دیم و خشکی در سه تکرار به‌منظور مطالعه تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کشت گردید. در تیمار آبی، گیاهان 24 ساعت قبل از هر نمونه‌برداری آبیاری غرق‌آبی شدند. برای تیمار دیم آبیاری صورت نگرفت و میزان آب دریافتی گیاه، بستگی به نزولات آسمانی داشت. برای تیمار خشکی، به‌منظور جلوگیری از دسترسی گیاه به آب، سطح گیاهان با چهار پایه فلزی و پلاستیک پوشانده شد. در طول مدت خوشه‌دهی تا دانه‌بندی 5 نوبت نمونه‌برداری انجام گرفت. برای هر نوبت 3 نمونه 1 گرمی تهیه گردید. از میانگین مراحل رشد و ژنوتیپ‌ها برای تجزیه اطلاعات و تهیه مستندات ژل استفاده گردید. نمونه‌ها پس از انجماد فوری در ازت مایع، تا مرحله استخراج پروتیین در فریزر $-80^{\circ}C$ نگهداری شدند.

1. Pérez-Amador *et al.*
2. Ohe *et al.*
3. Ariano *et al.*
4. Biaber *et al.*
5. Hsu & Kao

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1: خصوصیات مهم کمی ژنوتیپ‌های به‌کار برده شده در آزمایش

Table 1: Important quantitative characteristics of genotypes used in the experiment.

Genotype No.	Grain yield (t/ha)	average flag leaf length (cm)	average flag leaf width (cm)	Peduncle length (cm)	Thousand Kernels Weight(g)	Plant height (cm)
1	1.519	9.1	0.8	15.6	17.39	58
2	1.458	8.6	0.86	14.3	18.78	65
3	1.582	11.2	0.83	18.3	17.31	64
4	1.288	8.6	0.67	15.1	16.18	60
5	1.279	9.1	0.53	14.3	16.83	73

برای استخراج پروتیین کل، برگ منجمد شده در نیتروژن مایع در حضور 100 میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ساییده شد. سپس 3 میلی‌لیتر بافر استخراج (فسفات پتاسیم 50 میلی‌مولار (pH=7) و سدیم متا بی سولفات یک میلی‌مولار) اضافه گردید. پس از این‌که نمونه‌ها به خوبی له شدند، عصاره گیاهی حاصل به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل و در rpm 15000 و دمای C ° 4 به‌مدت 25 دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ رومیزی (Beckman Coulter مدلAllegra–64R، ساخت آمریکا) سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ کردن لایه شفاف بالایی جدا گردیده و 1050 میکرولیتر از آن با 350 میکرولیتر گلیسرول50% مخلوط و پس از انجماد فوری در ازت مایع، در فریزر C°80- نگهداری شد. برای اندازه‌گیری غلظت پروتیین و کلروفیل به‌ترتیب از روش *برادفورد*[1] (1976) و روش *آرنون*[2] (1949) استفاده گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش *ابی*[3] (1984)، آنزیم پراکسیداز از روش *شانس* و *مهلی*[4] (1955)، آنزیم اسکوربیت پراکسیداز از روش *ناکانو* و *اسادا*[5] (1981)، آنزیم سوپراکساید دسموتاز از روش *بیاچامپ* و *فریدوویچ*[6] (1971)، الکتروفورز پروتیین به وسیله روش SDS-PAGE و برای آشکارسازی فعالیت آیزوزایم‌های آنزیمی، از روش Native-PAGE طبق روش *لاملی*[7] (1970) استفاده شد. برای ژل پروتیین در هر چاهک 5 میکرولیتر پروتیین و برای ژل آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکساید دسموتاز به ترتیب 30، 20، 80 و40 میکروگرم پروتیین بارگذاری گردید. جهت اعمال میانگین فعالیت آنزیم در ژل مربوطه، حجم پروتیین مورد نیاز بارگیری به تفکیک تنش مورد نظر در قسمت‌های مساوی به تفکیک مراحل رشد و ژنوتیپ برداشته شده و پس از مخلوط کردن بارگیری شد. برای آنزیم کاتالاز از ژل اکریل آمید 6% و برای آنزیم‌های پراکسیداز، اسکوربیت پراکسیداز و سوپراکساید دسموتاز از ژل اکریل آمید 10% استفاده شد. برای مشاهده فعالیت آیزوزایم‌های آنزیم کاتالاز از روش رنگ‌آمیزی *روبرتسون*[8] و همکاران (1987)، آنزیم پراکسیداز از روش *هارت*[9] و همکاران (1971)، آنزیم اسکوربیت پراکسیداز از روش *رائو*[10] و همکاران (1996) و آنزیم سوپراکساید دسموتاز از روش *بیاچامپ* و *فریدوویچ* (1971) استفاده گردید. به‌منظور تجزیه آماری داده‌های حاصل از سنجش غلظت کلروفیل، پروتیین و فعالیت آنزیم از نرم افزارهای Excel و SPSS استفاده شد.

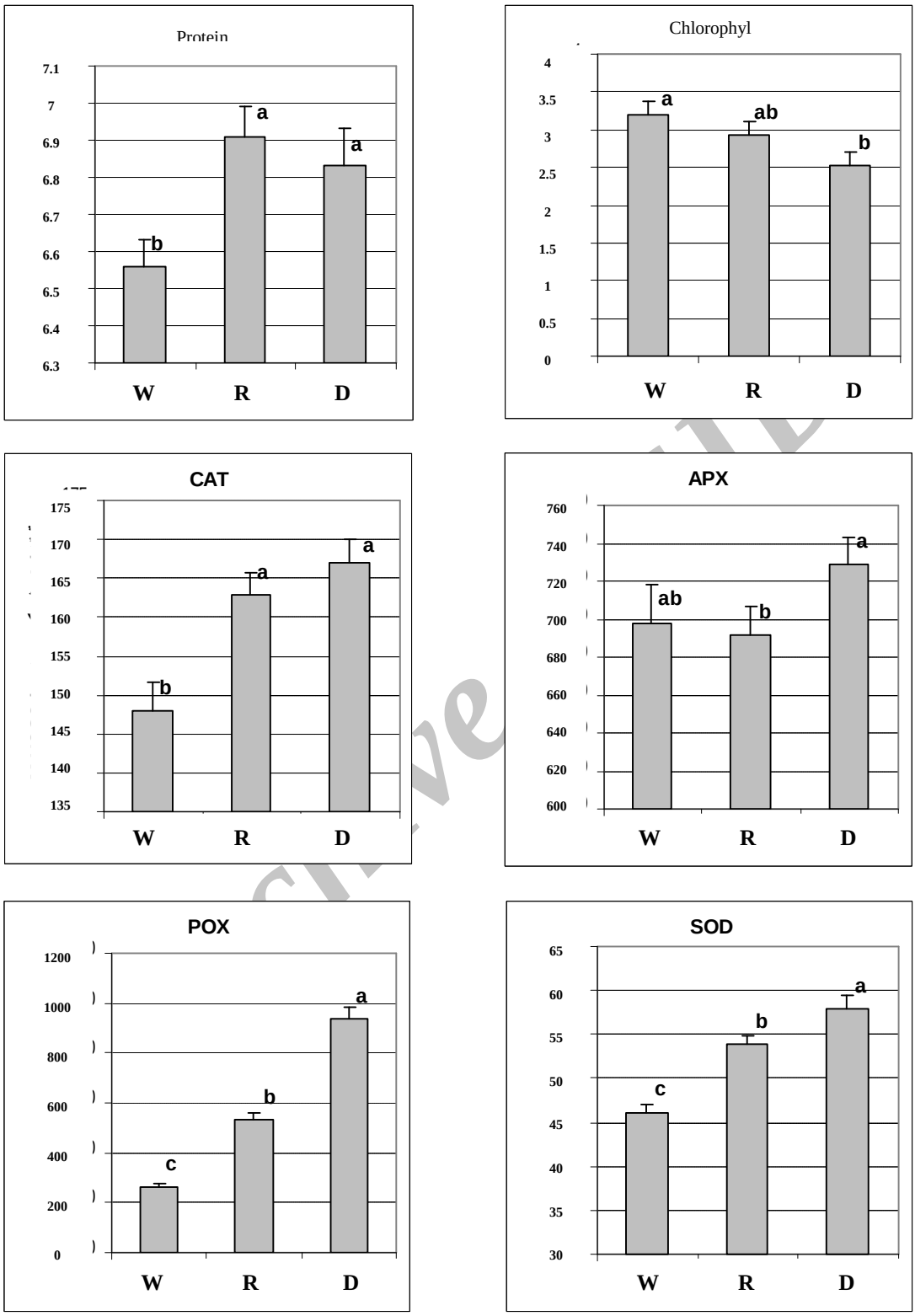
نتایج و بحث

در این بررسی، از آن‌جایی که برای اولین بار چنین آزمایشی در شرایط خشکی و دیم در مزرعه مطالعه می‌شد و نیز با توجه به موضوع پژوهش و اهمیت نشان دادن اثر تنش-های مختلف اعمال شده، از ژنوتیپ‌ها و نیز مراحل مختلف رشد زایشی گیاه میانگین و نتایج مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. از آن‌جا که اثرات بلوک برای صفات مورد مطالعه معنی‌دار نشد، لذا تجزیه در قالب آزمایش فاکتوریل تصادفی صورت گرفت (جدول 2). در نتیجه تجزیه واریانس، تقریباً کلیه نتایج اثرات ساده و متقابل برای صفات مورد بررسی و بیش‌تر در سطح 1% معنی‌دار شد. معنی‌دار شدن نتایج بیانگر آن است که واکنش ژنوتیپ‌ها در مراحل مختلف رشد در هر یک از شرایط تنش مورد مطالعه متفاوت خواهد بود. در این

1. Bradford
2. Arnon
3. Aebi
4. Chance & Maehly
5. Nakano & Asada
6. Beachamp & Fridovich
7. Laemmli
8. Robertson *et al.*
9. Hart *et al.*
10. Rao *et al.*

Archive of SID
www.SID.ir

تجزیه، غلظت پروتیین تحت تنش‌های دیم و خشکی در مقایسه با تیمار شاهد (آبی) افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل 1).



شکل 1: تغییر غلظت‌های پروتیین کل، کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکساید دسموتاز تحت تنش کمبود آب. در این نمودار اعداد مربوطه، میانگین داده‌های حاصل از پنج لاین مورد مطالعه می‌باشد

Diagram 1: The change of total protein, chlorophyll concentration and activity of APX, CAT, POX and SOD enzymes under water shortage stress. The numbers are average data from five studied lines in this chart.

www.SID.ir

جدول 2: میانگین مربعات تجزیه واریانس غلظت‌های پروتیین کل و کلروفیل (بر حسب میلی‌گرم در یک گرم بافت برگ)، فعالیت آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) (بر حسب میکرومولار H_2O_2 تجزیه شده در یک میلی‌گرم پروتیین و در یک دقیقه) و فعالیت آنزیم سوپراکساید دسموتاز (SOD) (بر حسب یونیت در یک میلی‌گرم پروتیین)

Table 2: Analysis of variance squares mean of total protein and chlorophyll concentrations (mg per gr of leaf tissue), activity of APX, CAT, and POX enzymes (µmol of decomposed H_2O_2 per mg protein and in a minute) and activity of SOD enzyme (unit per mg protein).

SOD	POX	CAT	APX	Chlorophyll	Protein	Freedom Degree	Source of Variation
5884.2**	17352806**	14953**	58815*	16.9**	4.8**	2	Stress treatment (T)
983.1**	3135776**	7491**	111523**	46.7**	10.9**	4	Growth stages (GS)
262.9ns	897566**	10977**	22971ns	17.7**	4.1**	4	Genotype (V)
1223.5**	2206779**	11438**	876295**	8.3**	5.3**	8	T × GS)
472.1**	313932**	4215**	97256**	13.9**	1.1**	8	T × V
350.6**	236668**	2000**	50480**	5.9*	1.9**	16	GS × V
330.6**	208612**	3709**	81913**	11.7**	2.1**	32	T × GS × V
117.0	84040	820	18554	3.3	0.6	150	Experiment error

*: significant at 5% level

**: significant at 1% level

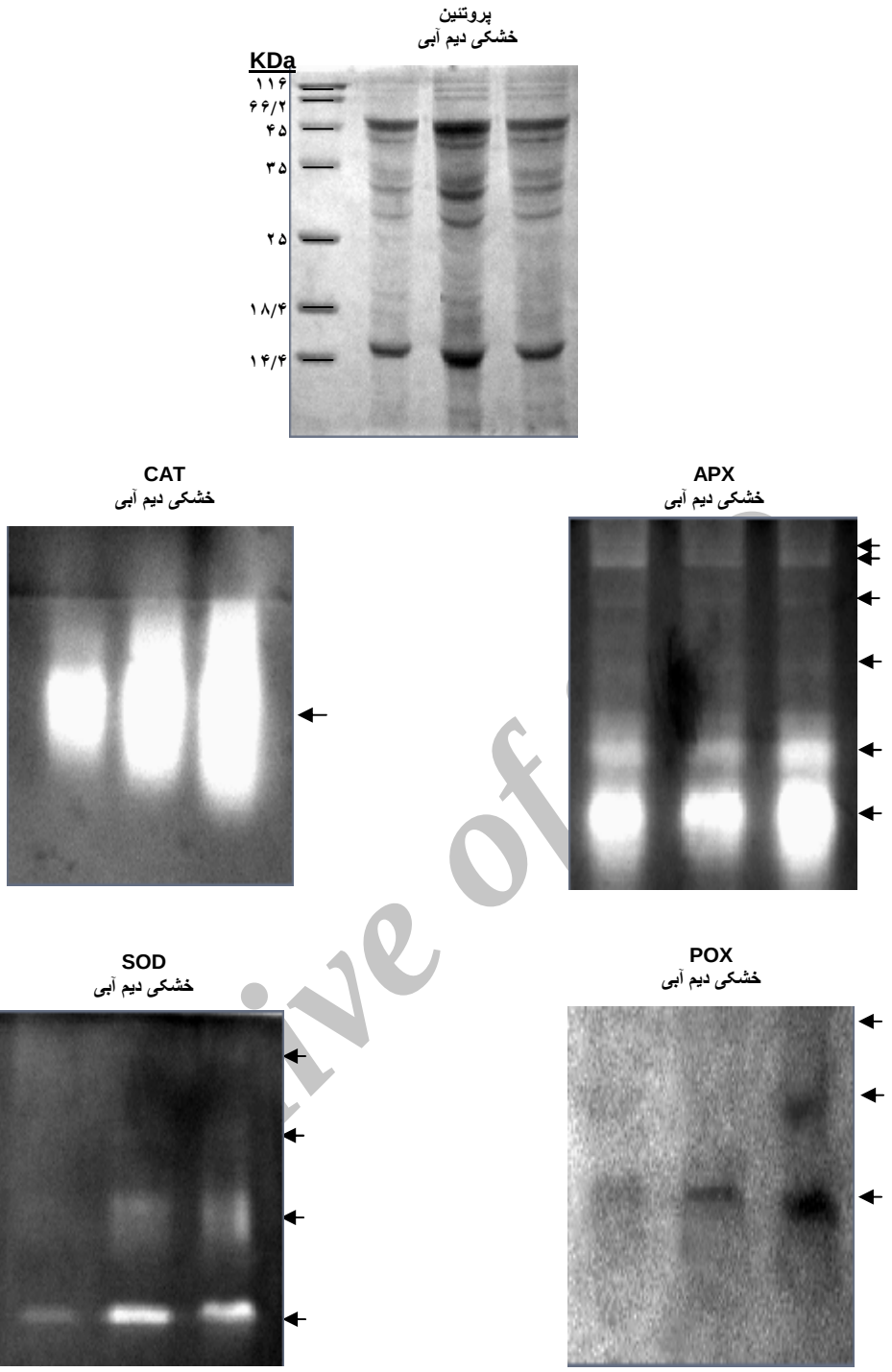
ns: not significant at 5% or 1% level

همان‌گونه که در تصویر ژل مربوط به پروتیین مشخص می‌باشد غلظت باندهای پروتیینی در تیمارهای دیم و خشکی به خصوص در محدوده‌های 45، 30 و 15 کیلو دالتون (KDa) در مقایسه با تیمار آبی افزایش یافته است (شکل 2). *راجندرا*[1] و همکاران (1991) در مورد گیاه ارزن و *گنادی*[2] و همکاران (2002) در مورد غلات گزارش کرده بودند که تحت تنش خشکی، غلظت پروتیین در این گیاهان افزایش یافته است. می‌توان گفت که افزایش فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانت تحت تنش کمبود آب، احتمالا مانع از تجزیه پروتیین‌های گیاهی در تنش خشکی شده است. میزان کلروفیل در گیاهان تحت تیمار تنش دیم نسبت به گیاهان تیمار آبی، تغییر معنی‌داری نشان نداد (شکل 1). ولی در گیاهان تیمار تنش خشکی در مقایسه با گیاهان تیمار آبی، به طور معنی‌داری کاهش یافت که با گزارش‌های *جانگ*[3] (2004) و *گنگ*[4] و همکاران (2005) مطابقت دارد. آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز نقش موازی و مشابهی را در سیستم دفاعی گیاه ایفا می‌نمایند. به طوری‌که وظیفه هر سه این آنزیم‌ها، سم‌زدایی و تجزیه پراکسید هیدروژن تولید شده در سلول‌ها می‌باشد (*آریانو* و همکاران، 2005). در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم اسکوربیت پراکسیداز تحت تنش‌های آبی و دیم، افزایش معنی‌داری نیافت (شکل 1 و جدول 4). لذا به‌نظر می‌رسد که در گیاه جو، آنزیم اسکوربیت پراکسیداز فعالیت کمی داشته و لذا نقش کمرنگی در محافظت گیاه از تنش خشکی ایفا می‌کند. *سیمیرنوف* و *کلمب*[5] (2000) گزارش کرده بودند که در جو تحت تنش خشکی، فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز افزایش یافته ولی تغییری در میزان فعالیت آنزیم اسکوربیت پراکسیداز رخ نمی‌دهد.

1. Rajendra *et al.*
2. Genadii *et al.*
3. Jung
4. Gong *et al.*
5. Simirnoff & Colombe

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 2: غلظت و تعداد باندهای پروتیین و فعالیت آیزوزایمی آنزیم‌های اسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکساید دسموتاز تحت تنش کمبود آب در مقایسه با فعالیت آن‌ها در تیمار شاهد (آبی). فلش‌ها تعداد آیزوزایم‌ها را نشان می‌دهند.

Figure 1: The concentration and number of protein bands and activity of APX, CAT, POX and SOD enzymes under water shortage stress compared with those in control treatments. The narrows show the numbers of isozyme.

در عوض، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و نیز سوپراکساید دسموتاز تحت شرایط خشکی افزایش یافت (شکل 1) که این نتایج با گزارش‌های *جانگ* (2004) در مورد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تحت تنش خشکی در گیاه آرابیدوپسیس، *بای* و *سوئی*[1] (2006) در مورد تاثیر تنش خشکی بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ذرت و *سلینا*[2] و همکاران (2004) در مورد تاثیر تنش خشکی بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در گندم مطابقت دارد. در مطالعه حاضر، گیاه جو پاسخ‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت متفاوتی را تحت شرایط دیم و خشکی از خود بروز داد. به طوری‌که میزان

1. Bai & Sui

2. Celina *et al.*

www.SID.ir

فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز تحت تنش خشکی، به‌طور معنی‌داری از میزان فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان تحت تنش دیم و آبیاری کامل بیش‌تر بود (شکل 1). لذا به نظر می‌رسد که در گیاه جو، عکس‌العمل این گیاه در فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط آبی، دیم و خشکی متفاوت از یکدیگر می‌باشد. در تحقیق حاضر، پیوستگی صفات مورد مطالعه بر حسب تیمارهای دیم و خشکی جداگانه بررسی شد (جدول 3).

جدول 3: پیوستگی بین صفات مورد مطالعه تحت تنش‌های دیم و خشکی در سطوح احتمال 1% و 5% .

Table 3: The regression between the studied traits under drought and rain fed stresses in 1% and 5% risk levels.

POX SOD	CAT PRO	CAT CHL T	CAT CHL B	CAT CHL A	CAT SOD	CAT POX	APX PRO	APX CHL T	APX CHL B	APX CHL A	APX SOD	APX POX	APX CAT	CHL T PRO	CHL B PRO	CHL B CHL T	CHLA PRO	CHL A CHL T	CHL A CHLB	SOD PRO	SOD CHL T	SOD CHL B	SOD CHL A	POX PRO	POX CHL T	POX CHL B	POX CHL A	Trait / Treatment
0.29 **	0.01 ns	0.11 ns	-0.04 ns	0.05 ns	0.38 **	0.12 ns	-0.19 *	0.16 *	0.07 ns	0.01 ns	0.33 **	0.11 ns	0.49 **	-0.08 ns	0.03 ns	-0.54 **	-0.04 ns	0.5 **	-0.4 **	-0.2*	-0.08 ns	-0.11 ns	0.11 ns	-0.18 *	0.01 ns	0.01 ns	0.01 ns	rain fall condition
0.57 **	-0.28 **	0.02 ns	0.03 ns	0.04 ns	0.42 **	0.28 **	-0.44 **	-0.05 ns	-0.07 ns	-0.11 ns	0.52 **	0.27 **	0.66 **	0.04 ns	0.02 ns	0.48 **	0.02 ns	0.78 **	0.47 **	-0.42 **	-0.01 ns	0.01 ns	0 ns	-0.32 **	0.06 ns	0.05 ns	0.02 ns	Drought Stress

*: significant at 5% level

**: significant at 1% level

ns: not significant at 5% or 1% level

جدول 4: میزان افزایش فعالیت آنزیم ها به تفکیک تنش های ایجاد شده در واحد مربوطه

Table 4: The increased enzyme activity to break the tension created in the unit

Enzyme activity / Enzyme	Watery condition (control)	rain fall condition	Drought Stress	Activity increase in drought stress compared with watery condition (%)	Activity increase in drought stress compared with rain fall condition (%)
APX	698	692	729	4.44	5.35
CAT	148	163	167	12.8	3.45
POX	261	534	937	259	75
SOD	46	54	58	26	7.4

بر اساس نتایج به دست آمده، فعالیت تمامی آنزیم‌ها با غلظت پروتیین در تنش‌های دیم و خشکی همبستگی منفی معنی‌دار نشان داد. لذا می‌توان عنوان کرد که هم‌زمان با افزایش فعالیت و غلظت آنزیم‌ها تحت تنش‌های دیم و خشکی به منظور مقابله با رادیکال‌های آزاد، از غلظت پروتیین کل گیاه به علت تنش وارده کاسته شده است. فعالیت هیچ‌کدام از آنزیم‌ها با غلظت هیچ یک از کلروفیل‌ها همبستگی معنی‌داری نشان نداد. فعالیت آنزیم‌های APX، CAT، POX و SOD در هر دو تیمار دیم و خشکی هم‌سوی یکدیگر بوده به طوری‌که همبستگی مثبت معنی‌داری داشتند که بیانگر فعالیت هم‌زمان این آنزیم‌ها برای مقابله با تنش‌های دیم و خشکی در گیاه می‌باشد. ندزویدز[1] و همکاران (2004) نشان دادند که همبستگی مثبت بین آنزیم‌های SOD، CAT و GR نقشی اساسی را در مقابل تنش ناشی از کمبود آب در گیاه گندم ایفا می‌نماید. کلروفیل a با کلروفیل t در هر دو تیمار دیم و خشکی همبستگی مثبت معنی‌داری نشان داده ولی کلروفیل b با کلروفیل‌های a و t در تیمار دیم همبستگی منفی معنی‌دار و در تیمار خشکی همبستگی

1. Neidzwiedz *et al.*

Archive of SID

www.SID.ir

مثبت معنی‌داری داشت. از طرف دیگر، نتایجی که از تغییرات فعالیت آیزوزایم‌های مختلف چهار آنزیم آنتی‌اکسیدانت، تحت تنش کمبود آب به دست آمد، با نتایجی که از داده‌های سنجش فعالیت این آنزیم‌ها به دست آمده بود مطابقت داشت (شکل 2). به‌طوری‌که در آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز، تحت تنش کمبود آب، شدت باندهای آیزوزایمی که بیانگر میزان فعالیت این آنزیم‌ها می‌باشد، افزایش یافت. هم‌چنین تحت تنش دیم و خشکی آیزوزایم-هایی از آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز فعال شده و رویت گردید که در تیمار شاهد (آبی) فعالیتی از آن‌ها مشاهده نشد (شکل 2). بدین ترتیب آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز بیش‌ترین فعالیت را نسبت به بقیه آنزیم‌ها تحت تنش کمبود آب از خود بروز دادند. همان‌طوری که پیش‌تر اشاره شد، این دو آنزیم در سنجش فعالیت آنزیمی نیز بیش‌ترین فعالیت را داشتند. به‌طوری که حتی افزایش فعالیت آن‌ها در تیمار خشکی نسبت به تیمار دیم معنی‌دار بود. تغییراتی که در نحوه بیان و فعالیت آیزوزایم-های آنزیم‌های سوپراکساید دسموتاز و پراکسیداز تحت تنش کمبود آب مشاهده شد، پیشنهاد می‌کند که آیزوزایم‌های مختلفی در تنظیم میزان اشکال مختلف اکسیژن فعال سلول-های گیاه جو، بسته به سطوح مختلف آب خاک (آبی، دیم و خشکی) دخالت کرده و فعالیت نشان می‌دهند (فیبو و گوپینگ[1]، 2003). در بین آنزیم‌های مورد مطالعه، آنزیم پراکسیداز درصد افزایش فعالیت بیش‌تری در شرایط تنش-های ناشی از دیم و خشکی را از خود نشان داد (جدول 4). لذا این آنزیم شاید نقش ویژه‌ای در القا مقاومت به گیاه جو در شرایط تنش‌های یاد شده را بر عهده دارد. انجام مطالعات بیش‌تر ضمن بررسی جنبه‌های فیزیولوژیکی و کمی این نظریه را صریح‌تر می‌نماید. از ویژگی‌های مهم این نتایج، انجام آزمایش در شرایط طبیعی و مزرعه می‌باشد که حصول اطمینان از نتایج حاضر را نسبت به انجام آزمایش در گلخانه افزایش می‌دهد. برای نتایج مشابه حاصل از مطالعه در گلخانه که با نتایج این طرح مغایرت داشته باشد، تکرار آن آزمایش در شرایط مزرعه پیشنهاد می‌شود تا مقایسه‌ای منطقی صورت پذیرد. جهت تکمیل مطالعه حاضر، بررسی سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت که در این بررسی مطالعه نشده، در کنار تغییرات سیستم دفاعی غیر آنزیمی نتایج دقیق‌تری را نشان خواهد داد.

1. Feibo & Gouping

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Aebi, H. E. 1984. Catalase *in vitro*. Method in Enzymology 105: 121-126.

Ariano, S., Bartolomeo, D., Cristos X. and Andras, M. 2005. Antioxidant defenses in Olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. Functional Plant Biology 32: 45-53.

Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Bai, L. P. and Sui, F. G. 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. Pedosphere Journal 16: 326-332.

Beachamp, C. and Fridovich, F. 1971. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.

Biaber B., Cureuett J. T. and Kipnes R. S. 2004. Biologic defense mechanisms. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 85: 235-244.

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

Celina, M. L., Gabriela, M. P. and Simon D. 2004. Drought and CAT gene expression in wheat. Journal of Experimental Botany 56: 417-423.

Chance, B., and Maehly, A. C. 1955. Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology. 2: 764-817.

Feibo, W., Gouping Z. and Peter, D. 2003. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. Environmental and Experimental Botany 50: 67-78.

Genadii, B., Irina, V., Anna, I. and Victor, K. 2002. Accumulation of dehydrin-like protein in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. Plant Biology 2: 157-170.

Gong, H., Zhu, X., Chen, K. and Wang, S. 2005. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pot under drought. Plant Science 169: 313-321.

Haddad, R., Morris, C. and Buchanan-Wollaston, V. 1999. Characterization and functional analysis of senescence-enhanced genes in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. PhD Thesis, Wye College, University of London.

Hart, M. A., Tyson, H. and Bloomberg, B. 1971. Measurement of activity of peroxidase isoenzymes in flax. Canadian Journal of Botany 49: 2129-2137.

Hsu, S. y. and Kao, C. H. 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol and antioxidant enzymes in rice leaves. Plant Growth Regulation 39: 83-90.

Jung, S. 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. Plant Science 166: 459-466.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680- 685.

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

Neidzwiedz, I., Bogatek, R., Come, D. and Coibineau, F. 2004. Effects of drying rate on dehydration sensitivity of excised wheat seedling shoots as related to sucrose metabolism and antioxidant enzyme activities. Plant Science 167: 879-888.

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

Pérez-Amador, M., Abler, M. L., De Rocher, E. J., Thompson, D. M., Van Hoof, A., Lebrasseur, N. D., Lers, A. and Green, P. J. 2000. Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in Arabidopsis. Plant Physiology 122: 169-179.

Rajendra, P., Kandpal, C. S., Vaidyanathan, M., Udayakumar, K. S. and Appaji, R. 1991. Alterations in the activities of the enzymes of proline metabolism in Ragi (*Eleusine coracana*) leaves during water stress. Journal of Biosciences 3: 361-370.

Rao, M. V., Paliyath, G. and Ormord, D. P. 1996. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 110: 125-136.

Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J. and Reeves, H. C. 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. Annals of Biochemistry 167: 290-294.

Simirnoff, N. and Colombe, S. V. 2000. Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. Journal of Experimental Botany 39: 1097-1108.

Archive of SID

www.SID.ir

Protein Changes and Antioxidant Enzymes Activity on Barley Inbred Lines Under Water Shortage

Haddad[1*], R. and Salek Jalali[2], M.

Abstract

So far, extensive research projects have been sort out to study effects of drought stress on the plant antioxidant enzymes activity, while there is some information lacking of such studies on the field condition. In the present research project, total protein content and enzypmes activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and peroxidase (POX) were analyzed under water shortage stress using spectrophotometer and gel assay procedures in a factorial experiment for five inbred lines of barley. Amount of total protein was significantly increased under water shortage, while amount of chlorophyll decreased. Activity of SOD and CAT, POX were significantly increased under water shortage stress. Level of enhancement in the activity of POX was more intensive for watering plants than drought stress plants. Also increased activities of POX and SOD were significant under drought stress in comparison to rain fall condition. The kinetic assays were confirmed by isozymic analysis of gel assay. Results indicated that among all studied enzymes, activity of APX was low and didn't have important role in plant protection under water stress, while POX might have a key role as important enzyme to increase tolerance to drought stress in *Hordeum vulgare* inbred lines. Also, such activity of enzymes suggests that different isozymes might be induced and exhibit activity depending on water shortage stress level in barley.

Keywords: Antioxidant enzymes, Barley inbred lines, Chlorophyll, Drought, Total protein

Archive of SID

1. Assistant professor, Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Qazvin.
2. MSc. Student of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin.
∗. Corresponding author Email: rahimhadadd

www.SID.ir