نقش توقف فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز بر رشد و سیستم آنتی اکسیدانتی در گیاه گندم

عزت‌اله اسفندیاری*[۱،]، امیر وحدتی‌راد[۱]، مجید شکرپور[۳] و فریبرز شکاری[۱]

[۱] مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده کشاورزی گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۲] اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی گروه زراعت و اصلاح نباتات

۳ کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم باغبانی و فضای سبز

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۴

چکیده

در این بررسی گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) رقم کوهدشت کاشته شده و در مرحله ۴-۳ برگی با استفاده از ستوکسیدیم، فعالیت آنزیم استیل‌کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز متوقف شد. دانه‌رستهای گندم در مراحل مختلف نمونه برداری و تولید ماده خشک، شاخص پایداری غشاء، فعالیت آنزیمهای جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن، تجمع پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید به همراه فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز بررسی گردید. توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز، رشد گیاه گندم را کاهش داد که به احتمال زیاد در اثر ممانعت از بیوسنتز اسیدهای چرب بوده است. فعالیت آنزیمهای جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن به جز گایاکول پراکسیداز در زمان توقف فعالیت استیل‌کوآ کربوکسیلاز تغییر معنی‌داری نشان نداد. در گیاهانی که فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز در آنها متوقف شده بود تجمع پراکسید هیدروژن مشاهده گردید. تجمع پراکسید هیدروژن، همچنین سبب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی شد که همراه با آن فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز افزایش یافت. نتایج کلی نشان داد که توقف فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز باعث توقف رشد گیاه و اختلال در عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی گیاه می‌گردد.

واژه های کلیدی: استیل‌کوآنزیم آ کربوکسیلاز، اکسیداسیون مواد بیولوژیک، تولید ماده خشک و لیپواکسیژناز.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۲۱-۲۲۷۳۰۶۸، پست الکترونیکی: esfand1977@yahoo.com

مقدمه

لیپیدها از مهم ترین بیومولکولهای ساختاری سلولهای زنده از جمله در گیاهان به شمار می‌آیند. لیپیدها علاوه بر نقش ذخیره‌ای، در ساختار غشای سلول و اندامکها، به صورت فسفولیپید، به کار می‌روند (۱۳). مهم ترین ویژگی فسفولیپیدها نفوذ ناپذیری آنهاست که با اضافه شدن پروتئینها به ساختار غشاها، نفوذ پذیری انتخابی غشاهای بیولوژیک به عنوان مهم ترین ویژگی آنها حاصل می‌گردد (۱۷). از عمده‌ترین ترکیبات به کار رفته در ساختار فسفولیپیدها می‌توان به اسیدهای چرب اشاره کرد که واحد سازنده آنها استیل کوآنزیم آ (استیل کوآ) می‌باشد. استیل‌کوآ از کاتابولیسم کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و برخی از اسیدهای آمینه به وجود می‌آید (۲). ورود این متابولیت به چرخه کربس و تجزیه آن به دی‌اکسید کربن طی واکنشهای متوالی دکربوکسیلاسیون - اکسیداتیو و آزاد شدن انرژی آنها از سرنوشتهای ممکن این متابولیت می‌باشد. با تجزیه کامل استیل‌کوآ، بیوسنتز اسیدهای چرب به دلیل نبود واحدهای سازنده متوقف خواهد شد (۲). لذا لازم است به نحوی از ورود این متابولیت به چرخه کربس پیشگیری

Archive of SID
www.SID.ir

شده و زمینه لازم برای بیوسنتز اسیدهای چرب فراهم گردد. این عمل با فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز صورت می‌گیرد (۲۷). با فعالیت این آنزیم، استیل‌کوآ طی عمل کربوکسیلاسیون به مالونیل‌کوآ تبدیل می‌شود که بدین ترتیب استیل‌کوآ در مسیر آنابولیسمی و بیوسنتز اسیدهای چرب قرار می‌گیرد. با توجه به نقش کلیدی آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز، توقف فعالیت آن مانع از بیوسنتز اسیدهای چرب خواهد شد (۲۱). از طرفی به دلیل حضور اسیدهای چرب در ساختار غشاها، توقف فعالیت آنزیم یاد شده عدم رشد گیاه را در پی خواهد داشت. مومها ترکیباتی هستند که در پوشش بافتهای گیاهی به کار می‌روند. این ترکیبات از اسیدهای چرب با تعداد کربن زیاد (بیش از ۲۰ کربن) به وجود می‌آیند. از این رو، توقف فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز، بیوسنتز مومها را نیز مانع خواهد شد (۱۸ و ۲۷).

بیوسنتز اسیدهای چرب در کلروپلاست و پلاستید سلولهای برگ صورت می‌گیرد که پتانسیل هیدروژن مورد نیاز برای بیوسنتز آنها از واکنشهای نوری فتوسنتز تأمین می‌شود (۲۱). توقف بیوسنتز اسیدهای چرب می‌تواند سبب کاهش پتانسیل ردوکس کلروپلاست شده و در نتیجه تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) افزایش یابد. انواع اکسیژن فعال از میل ترکیبی بسیار بالایی در واکنش با بیومولکولهای حیاتی سلول نظیر لیپیدها، پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک برخوردارند. عواقب این پدیده به ترتیب پراکسیداسیون لیپیدی، واسرشته شدن پروتئینها و جهش در ساختار DNA می‌باشد (۲۰). تجمع صدمات وارده ضمن ایجاد اختلالات متابولیسمی، سبب مرگ سلول خواهد شد (۱۱). از روشهای مقابله با اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال، می‌توان به استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها (مانند آسکوربات، گلوتاتیون، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی و توکوفرول) و آنزیمهای آنتی اکسیدانت (مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) در چرخه‌های گلوتاتیون- آسکوربات (۱۰)، گزانتوفیل (۲۲) و مهلر (۷) اشاره کرد. اجرای چرخه‌های مذکور ضمن کنترل تولید انواع اکسیژن فعال، از بروز تنش اکسیداتیو در سلولهای برگ پیشگیری می‌کند (۱).

آنزیم لیپواکسیژناز یک ترکیب آهن‌دار غیرهم است که مولکول اکسیژن را به ساختار اسیدهای چرب غیر اشباع به ویژه اسید لینولنیک و اسید لینولئیک وارد نموده و آنها را به فرم هیدروپراکسید اسیدهای چرب تبدیل می‌کند (۱۵). این آنزیم در سلولهای جانوران، گیاهان و قارچها وجود دارد. این آنزیم در گیاهان در فرآیندهای جوانه‌زنی بذر، مقاومت به بیماریها، پاسخ به تنشهای محیطی مانند کمبود آب و صدمات مکانیکی و پیری نقش مؤثری دارد (۲۳ و ۲۸).

امروزه شناخت الگوی رفتار فیزیولوژیک گیاهان و اثرات هر یک از مسیرهای بیوسنتزی بیومولکولهای گیاهی در راستای درک اثر آنها روی رشد و نمو گیاهان با هدف غلبه بر عوارض محیطی کاهش دهنده عملکرد و امنیت غذایی، الزامی است. اثر توقف فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز بر روی رشد گیاه، فعالیت آنزیمهای جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن و اکسیداسیون مواد بیولوژیک تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. به همین منظور در پژوهش حاضر پس از توقف فعالیت آنزیم مذکور در گندم، فعالیت آنزیمهای درگیر در مکانیسمهای دفاعی و شاخصهای تنش اکسیداتیو به همراه فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز و رشد گیاه بررسی شده است.

مواد و روشها

مواد گیاهی و اجرای آزمایش: بذور یکنواخت گیاه گندم نان (*Triticum aestivum* L.) رقم کوهدشت با فواصل ۱۵ سانتیمتر بین ردیفها و ۱ سانتیمتر روی ردیفها در خاکی با بافت سبک در شرایط کنترل شده در اتاقک رشد کشت شد. در طول دوره رشد دانه‌رستها، دمای محیط ۱±۲۵ درجه سانتی گراد، طول دوره روشنایی ۱۴ ساعت، رطوبت

Archive of SID

www.SID.ir

نسبی ۵±۶۵ درصد و شدت نور محیط ۲۵۰۰ لوکس بود. لازم به ذکر است که نور محیط رشد گیاه با استفاده از لامپهای فلورسنت زرد و سفید که در ارتفاع یک متری از سطح کانوپی قرار گرفته بودند تامین شد. جهت توقف فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز، محلول ۳ درصد ستوکسیدیم در مرحله ۴-۳ برگی روی دانه‌رستها اسپری شد (۲۴). بعد از گذشت صفر، ۲۴، ۷۲، ۱۲۰ و ۱۶۸ ساعت از توقف فعالیت آنزیم، نمونه‌های برگی تهیه و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شدند. نمونه‌های برگی تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمهای مورد نظر و شاخصهای اکسیداسیون مواد بیولوژیک در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به علاوه در زمانهای مورد اشاره شاخص پایداری غشاء و میزان تولید ماده خشک نیز اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری شاخص پایداری غشاء و وزن خشک گیاه: شاخص پایداری غشاء بر اساس میزان هدایت الکتریکی حاصل از نشت یونها از سلولهای برگ به درون آب دیونیزه اندازه‌گیری شد (۸). بدین منظور ۰/۱ گرم از نمونه‌های برگی (در دو گروه جداگانه) در لوله‌های آزمایش محتوی ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه غوطه‌ور گردید. سپس گروه اول نمونه‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه و گروه دوم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. هدایت الکتریکی تمامی نمونه‌ها بعد از رسیدن به دمای اتاق با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری و ثبت گردید. شاخص پایداری غشاء بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{شاخص پایداری غشاء} = [1-(C1/C2)]\times 100$$

در رابطه فوق C1 و C2 به ترتیب نشان دهنده میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها در دمای ۴۰ و ۱۰۰ درجه سانتی گراد می‌باشد.

جهت به دست آوردن میزان ماده خشک تولیدی در زمانهای مورد اشاره، ۱۵ بوته از سطح خاک کف‌بر گردید. سپس هر بوته به طور جداگانه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری و وزن خشک آنها با ترازوی حساس اندازه‌گیری و ثبت شد.

استخراج آنزیمهای جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن: جهت استخراج آنزیمهای کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، ۰/۵ گرم از نمونه برگی با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموژن شده و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH 7.5) محتوی ۰/۵ EDTA میلی‌مولار اضافه گردید. هموژنها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در ۱۵۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (۱۲).

جهت استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز، به محلول استخراج آنزیمی علاوه بر ترکیبات مورد اشاره پلی وینیل پیرولیدین (۵ درصد) و آسکوربات ۲ میلی‌مولار اضافه و همانند آنزیمهای فوق عمل گردید (۱۲).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمهای جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن و میزان پروتئین محلول کل: فعالیت آنزیم کاتالاز طبق روش ابی (۶) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنشی (۳ میلی‌لیتر) شامل ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7)، ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی بود. حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز گردید و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی با استفاده از ضریب خاموشی ۳۶ $mmol^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز طبق روش یوشیمورا و همکاران (۳۲) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7)، ۲۵۰ میکرولیتر آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر پراکسید

Archive of SID
www.SID.ir

هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده بود. تغییرات جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر ثبت و با استفاده از ضریب خاموشی ۲/۸ $mmol^{-1}$ cm^{-1} میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر اساس روش یوشیمورا و همکاران (۳۲) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنشی (۳ میلی‌لیتر) شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7)،۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار ، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده بود. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از ضریب خاموشی $mmol^{-1}$ cm^{-1} ۲۶/۶ به دست آمد.

میزان پروتئین موجود در نمونه‌های آنزیمی استخراج شده به روش بردفورد (۹) اندازه‌گیری شد. از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز: فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز براساس روش Rodriguez و همکاران (۲۵) سنجش شد. ۰/۲ گرم نمونه برگی با استفاده از بافر تریس- HCl ۰/۱ مولار (pH 7) هموژن و در g ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت سانتریفیوژ گردید. از روشناور حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز استفاده شد. محلول سنجش آنزیم ترکیبی از ۱۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده با ۲/۸۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH 7) محتوی اسید لینولئیک ۱۰ میلی‌مولار بود. فعالیت آنزیم از میزان تغییر جذب در طول موج ۲۳۴ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در مدت یک دقیقه محاسبه و به دست آمد.

میزان پراکسید شدن لیپیدها یا مالون دی آلدئید: این شاخص بر اساس روش استوارت و بولی (۲۹) اندازه گیری شد. ۰/۵ گرم از برگ‌های گندم در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید هموژن و به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۵۰۰۰سانتریفیوژ گردید. ۲ میلی‌لیتر از روشناور حاصل با ۴ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید محتوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل شد. نمونه‌ها مجددا به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها با استفاده از اختلاف بین طول موج‌های جذبی و ضریب خاموشی ۱۵۵ $mmol^{-1}$ cm^{-1} به دست آمد.

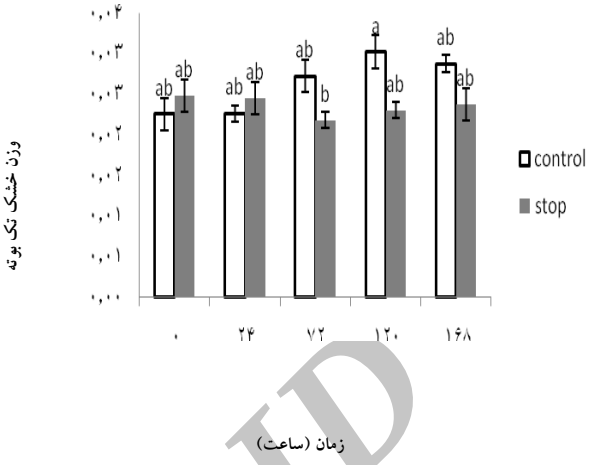
اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن: میزان پراکسید هیدروژن نمونه‌های برگی براساس روش سرجیو و همکاران (۲۶) اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم نمونه برگی هموژن و به آن ۵ میلی لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری کلرو استیک اسید (وزنی- حجمی) اضافه و در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. کمپلکس واکنش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از روشناور حاصل، ۰/۵ میلی‌لیتر بافرفسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH 7) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار بود. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر ثبت شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از پراکسید هیدروژن، غلظت آن محاسبه گردید.

تجزیه آماری داده‌ها: این مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. به‌طوری که سطوح یک عامل شامل توقف و عدم توقف فعالیت آنزیمی و عامل دیگر زمانهای اندازه‌گیری فعالیتهای آنزیمی در نظر گرفته شد. پس از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به پارامترهای مورد اندازه‌گیری, منابع تغییری که در سطح ۵ درصد معنی دار بودند, با استفاده از روش LSD مورد مقایسه میانگین قرار گرفتند. تجزیه آماری داده‌ها و رسم

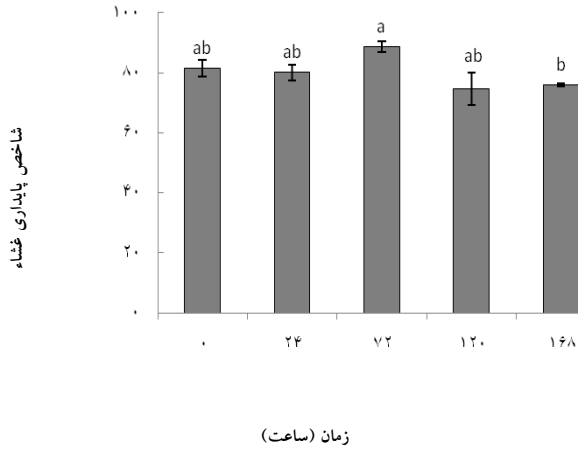
Archive of SID

www.SID.ir

نمودار میانگینها به ترتیب با نرم‌افزارهای SPSS16 و Excel 2007 صورت گرفت.



شکل۱- اثر توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز بر میزان تولید ماده خشک اندامهای هوایی (گرم) در گیاه گندم در بازه‌های زمانی مختلف پس از کاربرد مهار کننده فعالیت آنزیم.



شکل۲- اثر توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز بر شاخص پایداری غشاء (درصد) در گیاه گندم در بازه‌های زمانی مختلف پس از کاربرد مهار کننده فعالیت آنزیم.

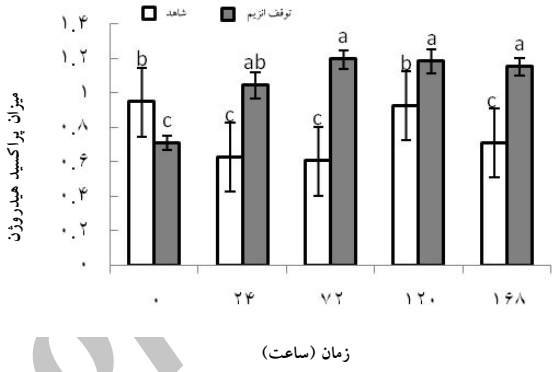
نتایج و بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که توقف فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز مانع رشد دانه‌رستها و در نتیجه ممانعت از افزایش ماده خشک گردید. درحالی که در گیاهان شاهد رشد دانه‌رستها و افزایش ماده خشک به روند صعودی خود ادامه داده و پس از گذشت ۱۶۸ ساعت تفاوت معنی‌داری با تیمار نشان داد (شکل ۱). در گیاهان فرآیند رشد و افزایش ماده خشک، حاصل تقسیمات سلولی، تمایز آنها در مریستم انتهایی و افزایش حجم سلولها در بخشهای جوان می‌باشد (۳). جهت انجام تقسیم سلولی و افزایش حجم آن، تشکیل غشاء الزامی است. با توجه به اینکه بخش اصلی تشکیل دهنده غشاها فسفولیپیدها می‌باشد و جهت تشکیل آن به اسیدهای چرب نیاز است، توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز از انجام تقسیمات سلولی در ناحیه مریستم انتهایی و رشد سلول در برگهای جوان و نابالغ پیشگیری خواهد نمود. به علاوه عدم بیوسنتز اسیدهای چرب از فرآیند تمایز پلاستیدها و تشکیل کلروپلاست نیز جلوگیری نموده و باعث کاهش فتوسنتز در برگهای جوان نیز خواهد شد.

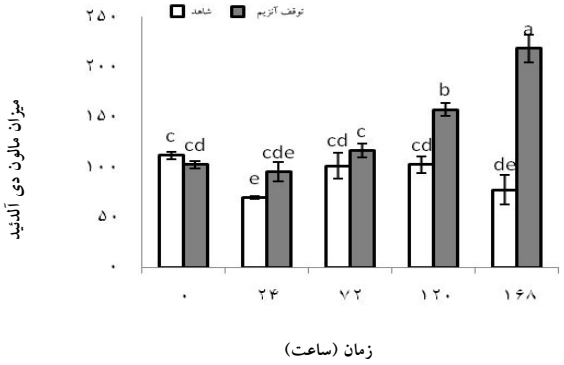
توقف فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز تأثیری بر شاخص پایداری غشاء در برگهای جوان و بالغ در مراحل مختلف نمونه‌برداری نداشت (شکل ۲). در حالی که میزان پراکسید هیدروژن (شکل ۳) و پراکسیده شدن لیپیدها (شکل ۴) پس از گذشت ۲۴ ساعت از توقف فعالیت آنزیم به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داشت. جهت ارزیابی میزان آسیب به غشاهای بیولوژیک و پراکسیداسیون لیپیدی از بیومارکر مالون‌دی‌آلدئید استفاده می‌گردد (۴، ۵ و ۱۱). به علاوه پراکسید هیدروژن اکسیدانی فوق‌العاده سمی است که یکی از نقاط آسیب‌رسانی آن غشاهای سلولی می‌باشد (۳۱). بدین ترتیب انتظار می‌رفت که با توجه به افزایش پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید در اثر پراکسیداسیون لیپیدی، شاخص پایداری غشاء نیز کاهش یابد. در حالی که شاخص پایداری غشاء برخلاف انتظار تغییر معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲). احتمال می‌رود این تناقض ناشی از

Archive of SID
www.SID.ir

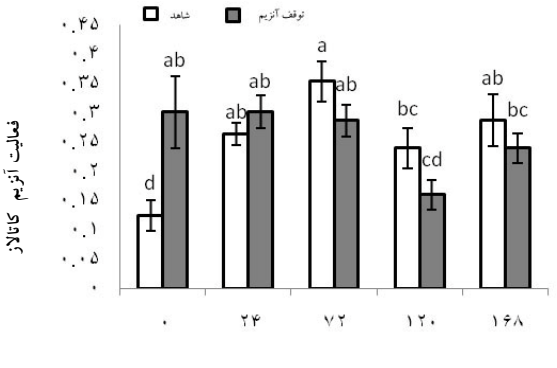
عملکرد متفاوت سازوکارهای دفاعی در برابر عوامل آسیب‌رسان نظیر انواع اکسیژن فعال در اندامکهای مختلف سلول باشد. پلاسمالما غشایی بیولوژیکی است که فضای درون سلول را از بیرون آن جدا می‌نماید. فضای درونی سلول نیز توسط غشاهای بیولوژیک تقسیم شده و اندامکهای سلولی نظیر میتوکندری و کلروپلاست به وجود می‌آید. در اندازه‌گیری شاخص پایداری غشاء، هدایت الکتریکی الکترولیت‌های نشت یافته از سلولهای دست نخورده برگ به محلول سنجیده می‌شود (۸). لذا این شاخص صرفاً میزان آسیب به پلاسمالما را بیان می‌کند. در حالی که ممکن است به غشای اندامکهای درون سلولی آسیب وارد شده باشد که به دلیل حفظ ساختار نفوذپذیری انتخابی پلاسمالما از خروج عناصر و متابولیت‌ها پیشگیری گردد. احتمالاً برآیند این عوامل سبب شده است که علی‌رغم افزایش آسیب به غشاهای سلولی (شکل ۴)، شاخص پایداری غشاء بدون تغییر باقی بماند (شکل ۲).



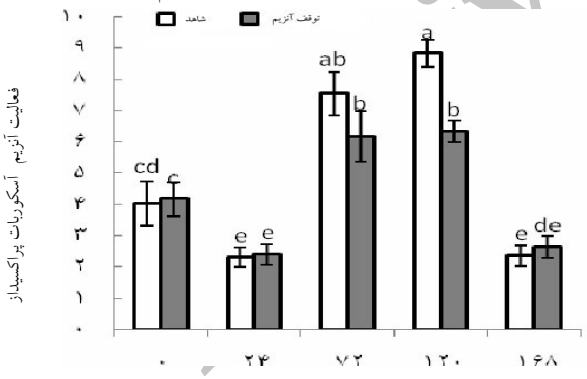
شکل ۳- اثر توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز بر میزان پراکسید هیدروژن (میلی‌مول بر گرم وزن تر) در گیاه گندم در بازه‌های زمانی مختلف پس از کاربرد مهار کننده فعالیت آنزیم.



شکل۴- اثر توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز بر میزان مالون دی آلدئید (نانو مول بر گرم وزن تر) در گیاه گندم در بازه‌های زمانی مختلف پس از کاربرد مهار کننده فعالیت آنزیم.



شکل۵- اثر توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) در گیاه گندم در بازه‌های زمانی مختلف پس از کاربرد مهار کننده فعالیت آنزیم.

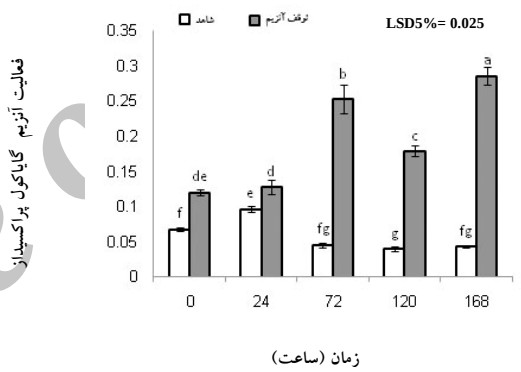


شکل۶- اثر توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) در گیاه گندم در بازه‌های زمانی مختلف پس از کاربرد مهار کننده فعالیت آنزیم.

بررسی فعالیت آنزیمهای جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن در بازه‌های زمانی مختلف پس از توقف فعالیت آنزیم مورد نظر نشان داد که تغییرات فعالیت آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود (شکلهای ۵ و ۶). البته آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ۱۲۰ ساعت پس از توقف آنزیم مورد مطالعه، فعالیت

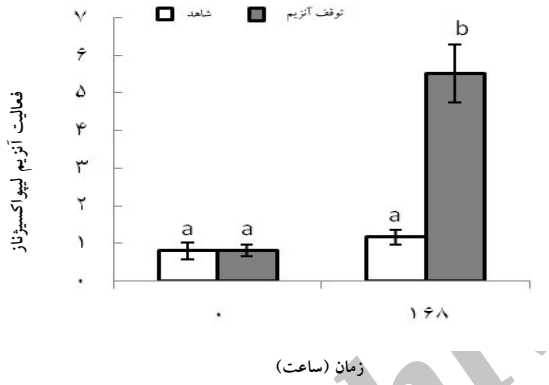
www.SID.ir

کمتری نسبت به شاهد داشت (شکل ۶). آنزیم گایاکول پراکسیداز دیگر آنزیم جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن، برعکس سایر آنزیمهای آنتی‌اکسیدان مورد بررسی بعد از گذشت ۷۲ ساعت از توقف فعالیت آنزیم نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۷). احتمالاً برآیند اثر فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز برروی فعالیت آنزیمهای جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن منجر به تجمع این متابولیت سمی شده است (شکل ۳). نتایج حاصل حاکی از آن است که میزان تولید پراکسید هیدروژن بر سازوکارهای جمع‌آوری کننده آن غلبه کرده و در نتیجه عدم تعادل، تجمع این اکسیدانت رخ داده است. مقادیر بالای اکسیدانت یاد شده سبب اکسیده شدن گروههای



شکل۷- اثر توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) در گیاه گندم در بازه‌های زمانی مختلف پس از کاربرد مهار کننده فعالیت آنزیم.

تیولی می‌گردد که بدین ترتیب آنزیمها به طور ناخواسته فعال و یا غیر فعال می‌شوند (۱۶). همچنین برخی از آنزیمهای چرخه کالوین نظیر بی‌فسفاتازها به مقادیر بالای پراکسید هیدروژن حساس بوده و فعالیت آنها در حضور این ترکیب متوقف می‌گردد (۳۱). به علاوه پراکسید هیدروژن، اسیدهای چرب به کار رفته در غشاها را اکسیده می‌کند (۳۱). همچنین آیزوزیم‌های Fe-SOD و Cu/Zn-SOD به مقادیر بالای پراکسید هیدروژن حساس بوده و تجمع آن سبب توقف فعالیت این آیزوزیم‌ها می‌گردد (۱۹). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن ایفای نقش می‌کند (۱۴).



شکل۸- اثر توقف فعالیت آنزیم استیل کوآ کربوکسیلاز بر میزان فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز (واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) در گیاه گندم در بازه‌های زمانی مختلف پس از کاربرد مهار کننده فعالیت آنزیم.

یکی از محلهای فعالیت آیزوزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز کلروپلاست می‌باشد (۱۰). امروزه مشخص شده‌است که کلروپلاست از مهم ترین اندامکهای تولید کننده انواع اکسیژن فعال در سلولهای گیاهی است (۲۰). لذا کاهش فعالیت آنزیمهای یاد شده به تجمع رادیکال سوپراکسید می‌انجامد. با افزایش مقادیر رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن زمینه لازم برای اجرای واکنش هابر- ویز و تولید رادیکال بسیار خطرناک هیدروکسیل فراهم می‌گردد (۱۰). این رادیکال خطرناک‌ترین شکل اکسیژن فعال بوده و تمامی بیومولکولهای حیاتی از جمله اجزای تشکیل دهنده غشاها را اکسیده می‌نماید (۳۰). افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی‌آلدئید در این پژوهش با توقف فعالیت آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز تأییدی بر این ادعاست (شکل ۴).

فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز تنها در زمانهای صفر و ۱۶۸ ساعت پس از توقف فعالیت آنزیم مورد نظر ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بعد از گذشت ۱۶۸ ساعت از توقف فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز، فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش

www.SID.ir

داشت (شکل ۸). آنزیم لیپواکسیژناز در سلولهای گیاهی نقشهای متعددی ایفاء می‌کند که یکی از آنها اکسیده کردن اسیدهای چرب به کار رفته در ساختار غشاهاست (۲۳). به علاوه اثرات بازدارندگی آنتی‌اکسیدانت‌ها را روی فعالیت لیپواکسیژناز گزارش شده‌است (۱۵). در این پژوهش نیز فعالیت آنزیمهای جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن کاهش یافته و تجمع این ترکیب نیز اتفاق افتاده‌است. لازم به ذکر است که ترکیبات حاصل از فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز به طور نسبی فعال بوده و سبب افزایش نفوذ پذیری غشاها می‌گردند (۲۸).

در نهایت می‌توان اظهار داشت که توقف فعالیت آنزیم استیل‌کوآ کربوکسیلاز سبب کندی رشد گیاه می‌گردد که ناشی از اثر آن در جلوگیری از تقسیم سلولی و رشد آنها است. به علاوه توقف فعالیت آنزیم مورد نظر سبب تجمع پراکسید هیدروژن در سلولهای برگ می‌گردد. تجمع این ترکیب سمی و عدم افزایش فعالیت آنزیمهای جمع‌آوری کننده آن به همراه افزایش فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز می‌تواند میزان آسیب به غشاهای اندامکها را به طور قابل توجهی افزایش دهد. همچنین نتایج متفاوت پارامترهای شاخص پایداری غشاء و مالون دی‌آلدئید نشان می‌دهد که هر یک از پارامترهای یاد شده دارای معایب و محاسنی می‌باشند. لذا جهت برطرف نمودن معایب و تقویت محاسن آنها بهتر است در مطالعات از هر دو پارامتر به طور همزمان استفاده شود.

منابع

۱- اسفندیاری، ع. س. محبوب و ف. شکاری. ۱۳۸۷. اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال ،مکانیسم های محافظتی گیاه و ضرورت توجه به آن ها. مجموعه مقالات کلیدی دهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران ۳۰-۲۸ مرداد ماه ۱۳۸۷۱ کرج.

۲- اسفندیاری، ع. س. محبوب و ف. شکاری. ۱۳۸۸. اصول فیزیولوژی گیاهی (جلد اول). انتشارات عمیدی. تبریز.

۳- شکاری، ف. ف. شکاری و ع. اسفندیاری. ۱۳۸۹. فیزیولوژی عمکلرد در گیاهان زراعی (ترجمه). انتشارات دانشگاه مراغه.

۴- خلیقی جمال آباد، ا. و ج. خارا. ۱۳۸۷. تاثیر قارچ میکوریزای آربوسکولار (*Glomus intraradices*) بر روی تنش اکسیداتیو و برخی پارامترهای رشدی و فیزیولوژی در گیاه گندم. مجله زیست شناسی ایران. سال ۲۱. جلد پنجم. صفحات ۷۶۹ تا ۷۸۳.

۵- ملک احمدی، ف. خ. منوچهری کلانتری و م. ترک‌زاده. ۱۳۸۴. اثر تنش غرقابی بر القاء تنش اکسیداتیو و غلظت عناصر در گیاه فلفل (*Capsicum annum L.*). مجله زیست شناسی ایران. سال ۱۸. جلد دوم. صفحات ۱۱۰ تا ۱۱۹.

6- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. Method of Enzymology 105: 121-126.

7- Asada K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Phill. Trans. R. Sco. Lond. B 355: 1419-1431.

8- Azizpour K, Shakiba MR, Khosh Kholgh Sima NA, Alyari H, Moghaddam M, Esfandiari E and Pessarakli M. 2010. Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. Journal of plant nutrition 33: 859-873.

9- Bradford MM. 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.

10- Edreva A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. Agriculture, Ecosystems and Environment 106: 119-133.

11- Esfandiari E, Shakiba MR, Mahboob S, Alyari H and Toorchi M. 2007. Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. Journal of Food, Agriculture & Environment 5: 48-53.

12- Esfandiari E, Alavi-Kia SS, Bahmani A and Aazami MA. 2009. The effect of light on ROS-scavenging systems and lipid peroxidation under cold conditions in saffron (*Crocus sativus* L.). African Journal of Agricultural Research 4: 378-382.

13- Gupta PK. 2002. Cell and Molecular Biology. Rastogi Publication, India.

14- Jiang L and Yang H. 2009. Prometryne –induced oxidative stress and impact on antioxidative enzymes in wheat. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1687-1693.

15- Komaraswamy MV and Satish S. 2008. Antioxidant and anti-lipoxygenase activity of

Archive of SID
www.SID.ir

Thespesia lampas Dalz and Gibs. Advances in Biological Research 2: 56-59.

16- Kono Y and Fridovich I. 1983. Inhibition and reactivation of Mn-catalase. The Journal of Biochemical Chemistry 258: 13646-13468.

17- Koolman J and Roehm KH. 2005. Color atlas of biochemistry. Thieme Publication. Germany.

18- Kulattukudy P and Brown L. 1974. Inhibition of cuticular lipid biosynthesis in *Pisum sativum* by thiocarbamates. Plant Physiology 53: 903-906.

19- Milone MT, Sgherri C, Clijsters H and Navari-Izzo F. 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. Environmental and Experimental Botany 50: 265-276.

20- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405410.

21- Murphy D and Walker D. 1982. Acetyl coenzyme A biosynthesis in the chloroplast. What is the physiological Precursor? Planta 156: 84-88.

22- Ort D. 2001. When there is too much light. Plant Physiology 125: 29-32.

23- Porta H and Rocha-Sosa M. 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. Plant Physiology 130: 15-21.

24- Rendina A and felts JM. 1988. Cyclohexanedione herbicides are selective and potent inhibitors of acetyl-CoA carboxylase from grasses. Plant Physiology 86: 983-986.

25- Rodriguez LE, Barrett DM and Selivonchick DP. 1995. Peroxidase and lipoxygenase influence on stability of polyunsaturated fatty acids in sweet corn (*Zea mays* L.) during frozen storage. Journal of Food Science 60: 1041-1044.

26- Sergiv I, Alexieva V, and Karanov E. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 51: 121-124.

27- Shaner D. 2003. Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals. Pest Management Science 60: 17-24.

28- Siedow J. 1991. Plant lipoxygenase: Structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 145-188.

29- Stewart RRC and Bewley JD. 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. Plant Physiology 65: 245-248.

30- Tewari R, Kumar P and Sharma P. 2005. Signs of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. Plant Science 169: 1037-1045.

31- Yamazaki J, Ohashi A, Hashimoto Y, Negishi E, Kumagai S, Kubo T, Oikawa T, Maruta E and Kamimura Y. 2003. Effects of high light and low temperature during harsh winter on needle photodamage of *Abies mariesii* growing at the forest limit on Mt. Norikura in central Japan. Plant Science 165: 257-264.

32- Yoshimura K, Yabute Y, Ishikawa T and Shigeoka S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology 123: 223-233.

Archive of SID

www.SID.ir

The effect of activity ceasing of acetyl coa-carboxylase on growth and antioxidant system in wheat

Esfandiari E.A.[1], Vahdati Raad A.[1], Shokrpour M.[3] and Shekari F.[1]

[1] Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of IRAN

[2] Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of IRAN

[3] Dept. of Horticultural science and landscape, College of Agriculture and Natural sciences, University of Tehran, Karaj,I. R.of Iran

Abstract

In order to the better understanding and to defense against environmental factors affecting yield, it is necessary to know patterns of plant physiological behaviors and association between biosynthetic pathways of biomolecules. Therefore, wheat variety of 'Kouhdasht' was planted and activity of acetyl coa-carboxylase (ACoC) enzyme of the plants was stopped using sethoxydim in 3-4 leaf old stage. Sampling was done from wheat seedlings at various stages and the parameters of dry matter production, membrane stability index, activities of scavenging enzymes of hydrogen peroxide, hydrogen peroxide accumulation, malondialdehyde and lipoxygenase enzyme were analyzed. The growth and development of the seedlings were inhibited by activity ceasing of ACoC. It has been made by inhibition of fatty acid biosynthesis needed to generate new cells and to increase the cells sizes. During activity ceasing of ACoC, there was no significant changes in activity of hydrogen peroxide scavenging enzymes except to guaiacol peroxidase. Activity of the all enzymes was resulted in accumulation of hydrogen peroxide in plants with ceased activity of ACoC. The accumulation of hydrogen peroxide also caused to increase lipids peroxidation and also increasing activity of lipoxygenase enzyme. The obtained results displayed ceasing of ACoC enzyme resulted in inhibition of plant growth and disruption of plant defense mechanisms.

Keywords: acetyl co-a carboxylase, biological compounds, lipoxygenase and oxidation.

Archive of SID

www.SID.ir